

Семенова Мария Львовна

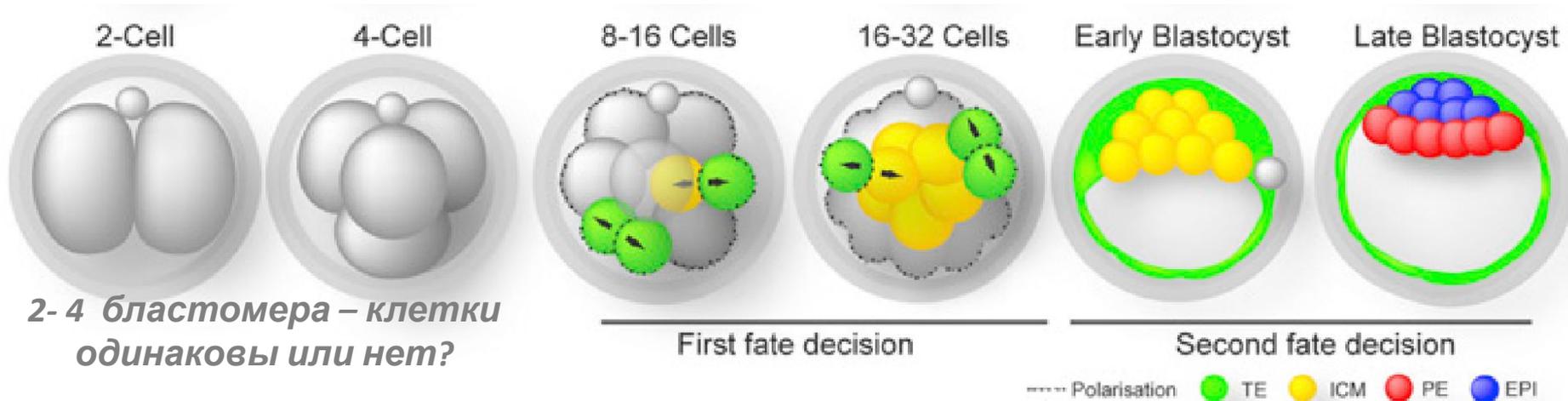
**д.б.н., профессор кафедры эмбриологии биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова**

***Клетки преимплантационного эмбриона:
потенции и пластичность***

Выбор судьбы клетками раннего эмбриона: решение в 2 этапа

1 этап: внутри или снаружи (вопрос: за счет каких клеточных процессов клетки становятся ТЭ или ВКМ)

2 этап: как клетки внутренней клеточной массы разбираются на эпибласт и гипобласт



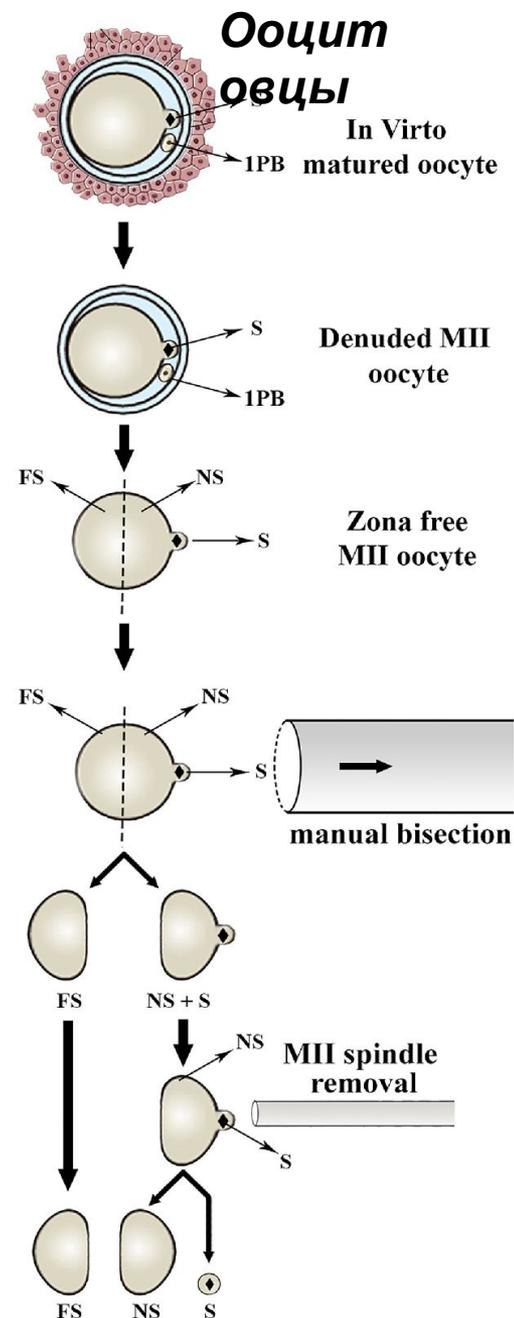
Дробление клеток раннего эмбриона: насколько клетки идентичны?

Попытки найти различия между бластомерами на 2 клеточной стадии не прекращаются:

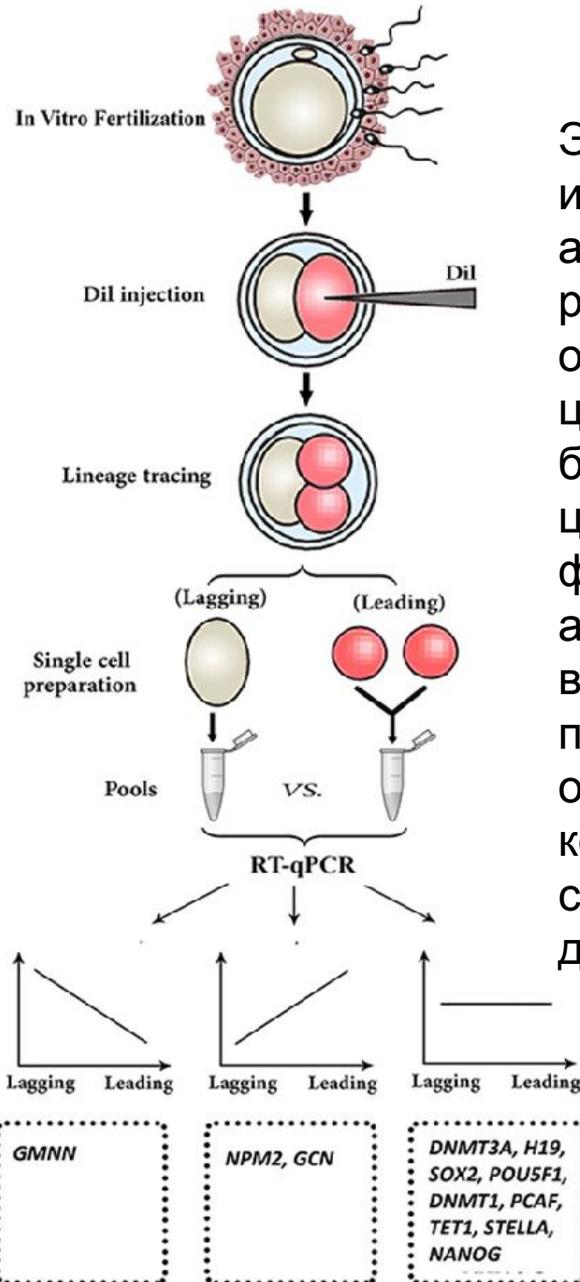
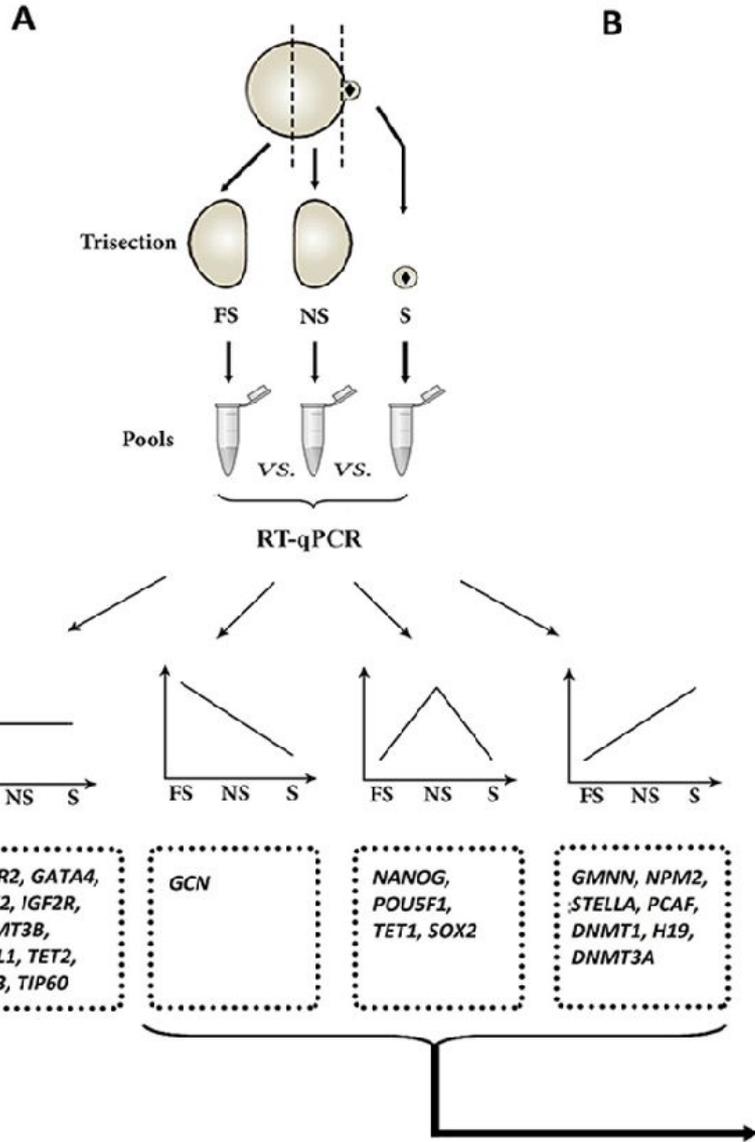
[PLoS One](#). 2016 Mar 31;11(3). The Principal Forces of Oocyte Polarity Are Evolutionary Conserved but May Not Affect the Contribution of the First Two Blastomeres to the Blastocyst Development in Mammals.

[Hosseini SM¹](#), [Moulavi F¹](#), [Tanhaie-Vash N¹](#), [Asgari V¹](#), [Ghanaei HR¹](#), [Abedi-Dorche M¹](#), [Jafarzadeh N²](#), [Gourabi H³](#), [Shahverdi AH⁴](#), [Dizaj AV⁵](#), [Shirazi A^{6,7}](#), [Nasr-Esfahani MH¹](#).

- Бластомеры 2кл. и 4 кл. эмбриона выглядят одинаково;
- Если они не одинаковы, то эта асимметрия должна закладываться еще в оогенезе;
- На анимальной полюс ооцита (где веретено) и протиположенный полюс отличаются морфологически (есть веретено-нет веретена);
- Если есть морфологические, то должны быть и молекулярные отличия.



Дробление клеток раннего эмбриона: насколько клетки идентичны?



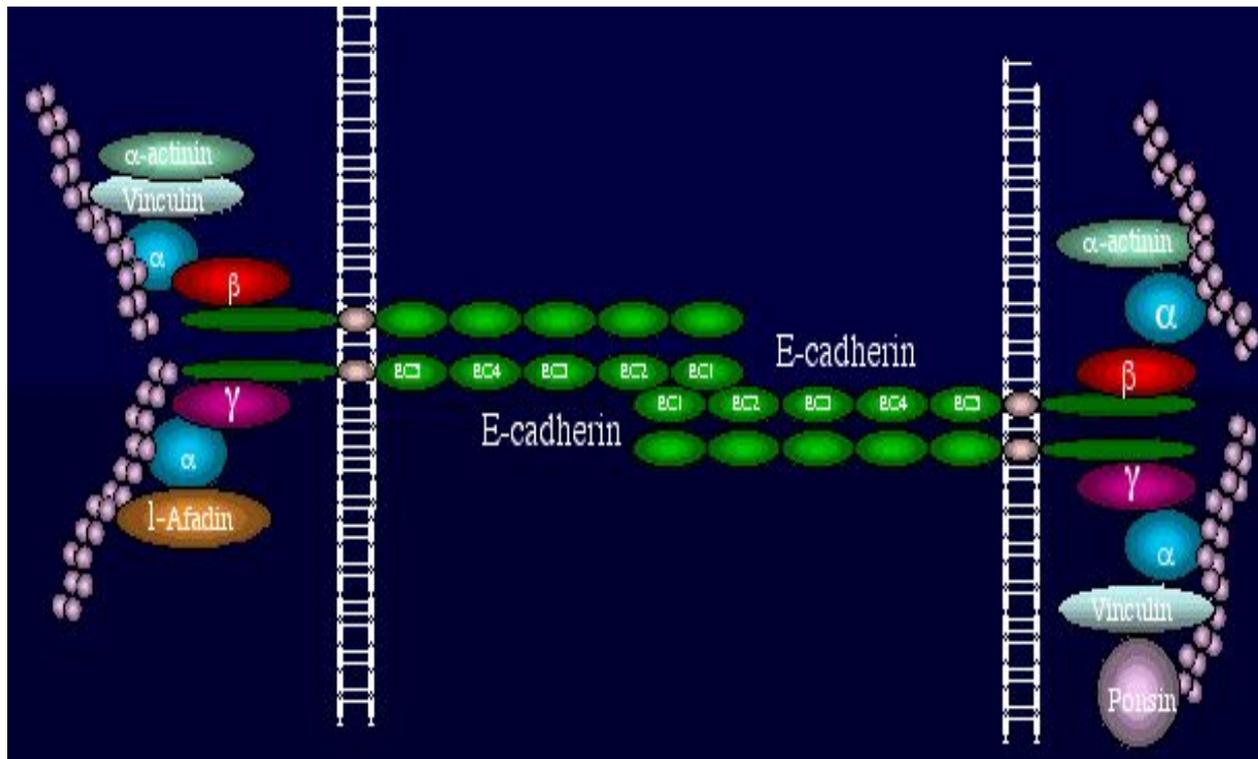
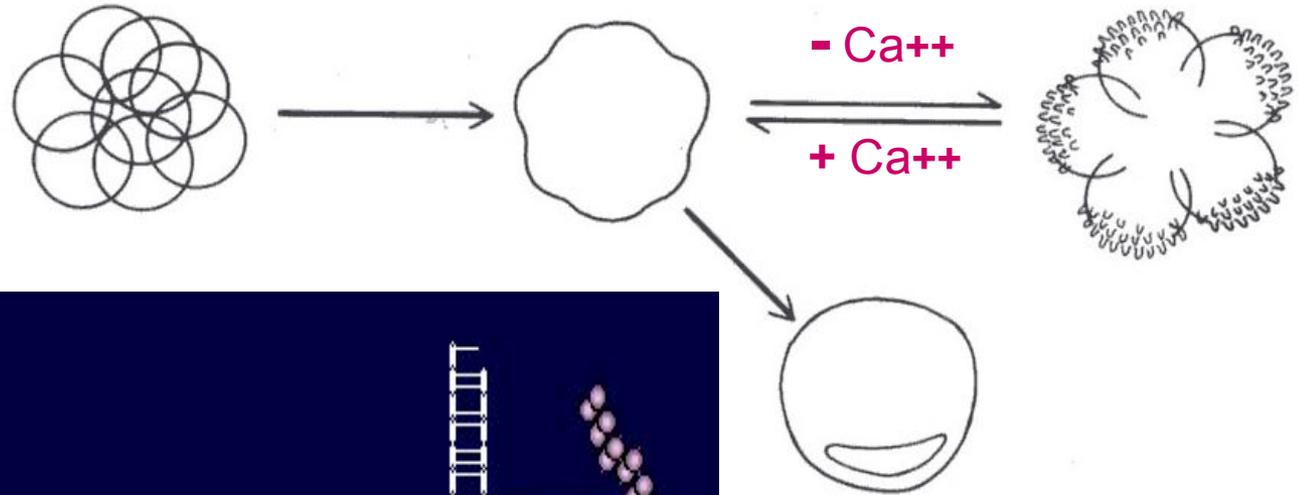
Эксперименты по исследованию асимметрии ооцита и раннего эмбриона овцы показали, что в цитоплазма (и в бластомерах в цитоплазматических фрагментах) анимальной и вегетативной позициях имеют отличия по количественному содержанию важных для развития РНК.

Компактизация и поляризация клеток эмбриона:

вот она, классическая схема с формированием адгезионных контактов!

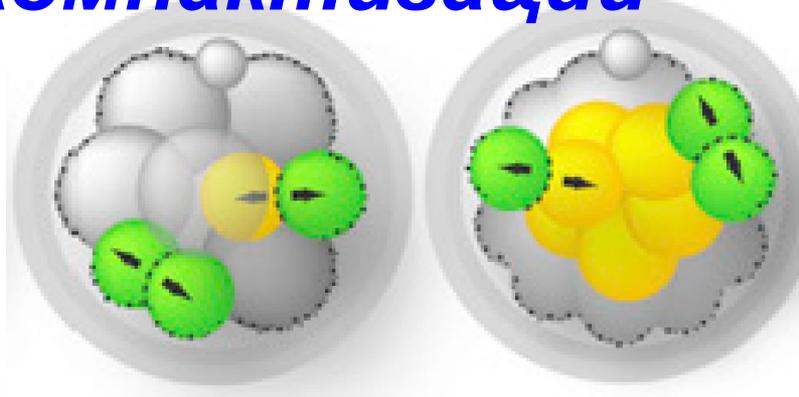
4-8 бластомеров

8-16 бластомеров



Основной вопрос:
как круглые клетки становятся плоскими?

Период компактизации



**Переход от 8 к 16
к 32**

Переход от 16

- **Клеток мало для формирования внутренней среды**
- **На обеих этих стадиях наружные клетки могут делиться давая как пару наружных потомков, так и пару наружный-внутренний**
- **Клетки “слишком круглые” – для формирования адгезивных контактов есть только точечные зоны контактов почти сферических**

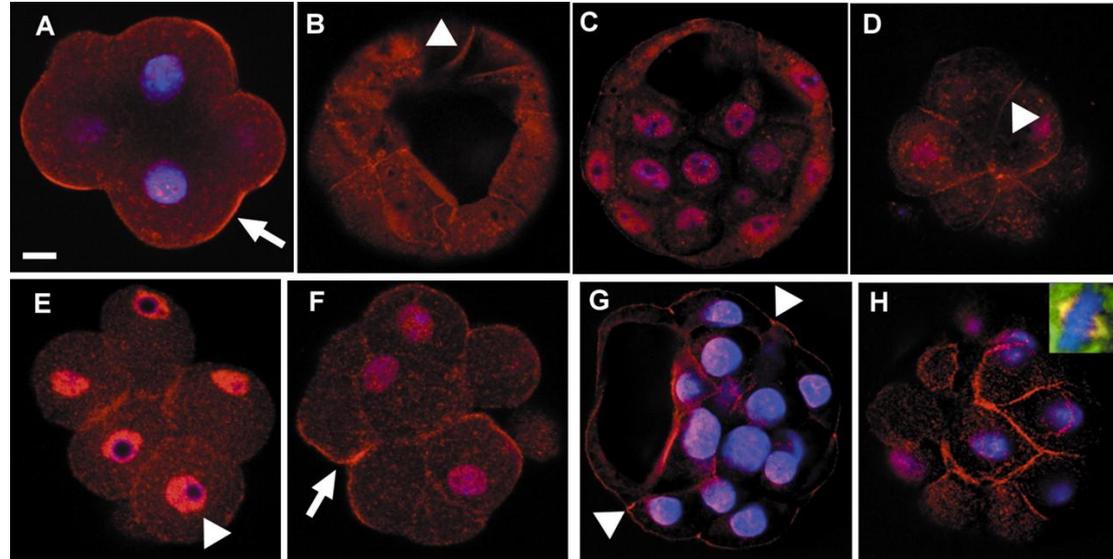
Гипотеза «Внутри- снаружи»

Асимметричная

локализация в клетках:

aPKC, Par3 и ezrin

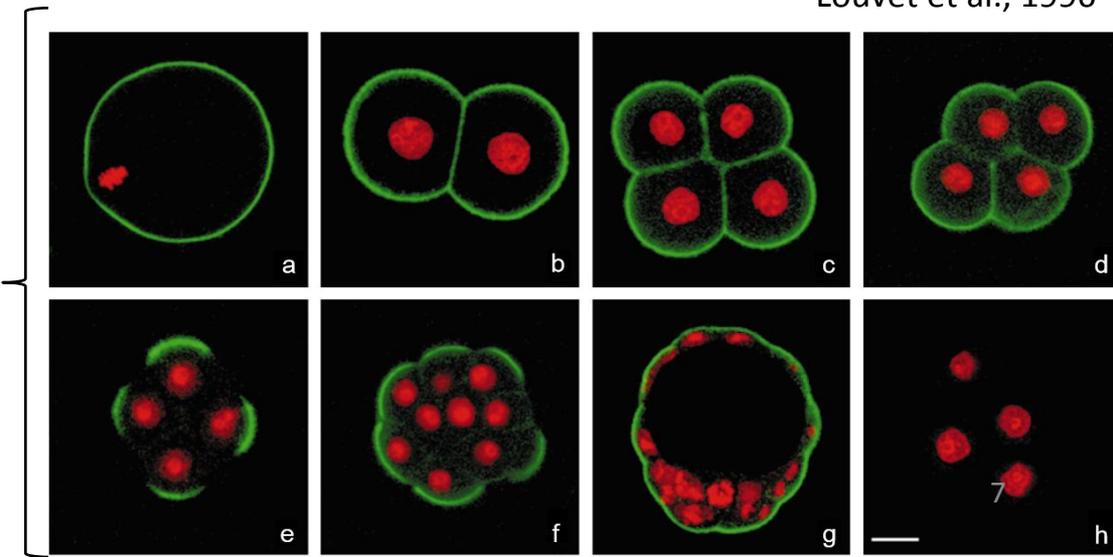
Plusa et al., 2005



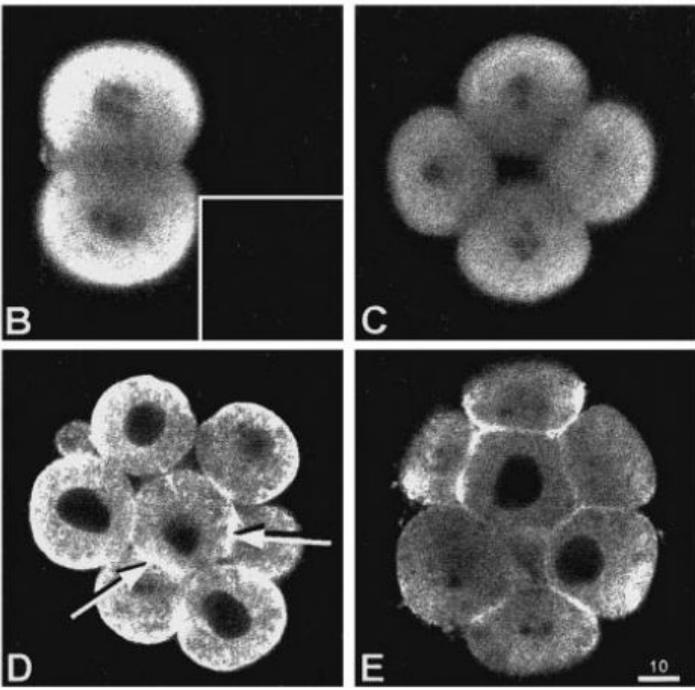
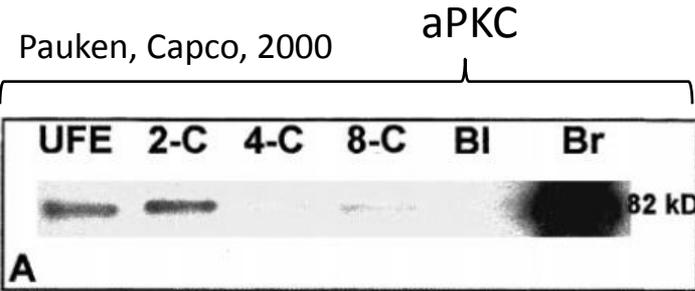
aPKC

Par3

Louvet et al., 1996



ezrin



B

C

D

E

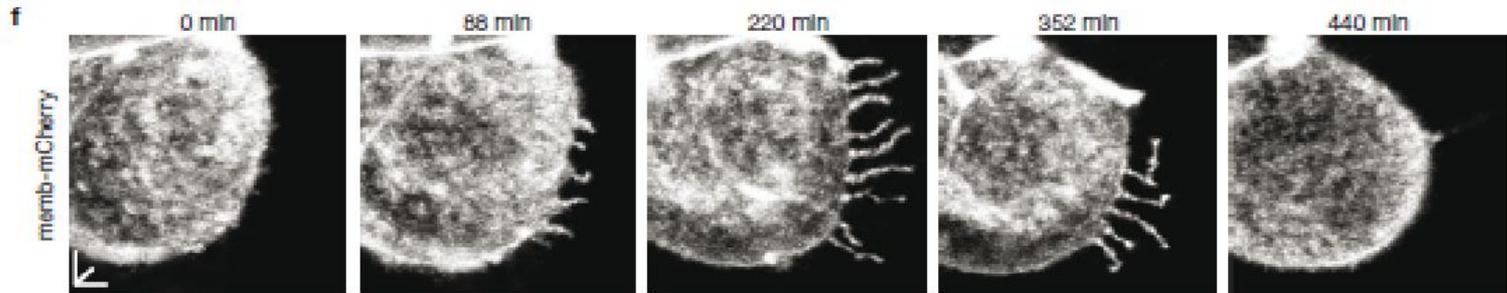
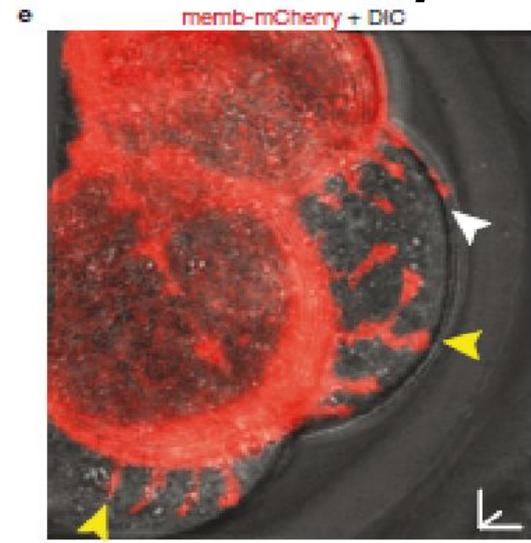
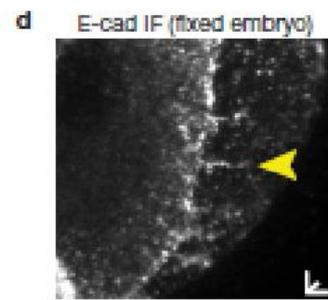
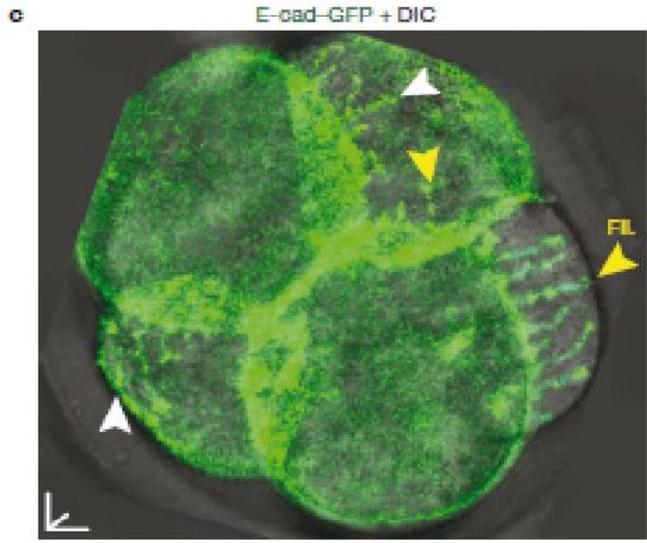
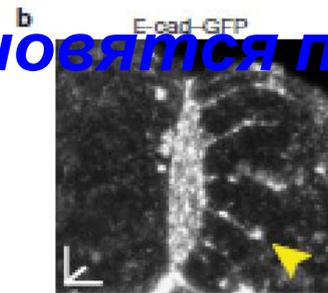
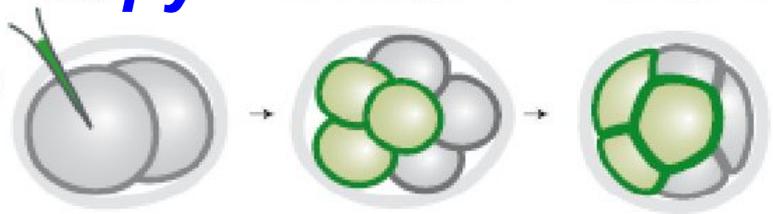
7

Компактизация и поляризация клеток эмбриона:

как круглые клетки становятся плоскими?

Формируются филоподии

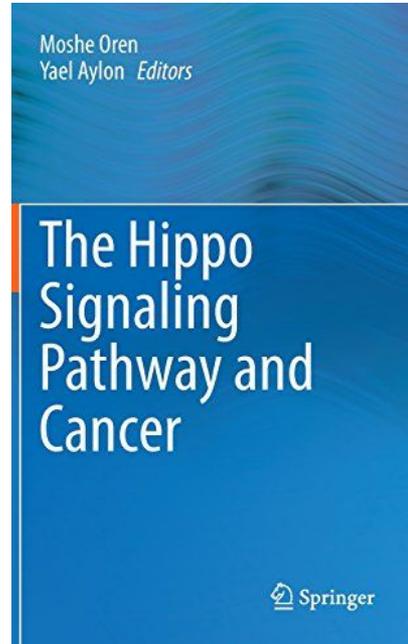
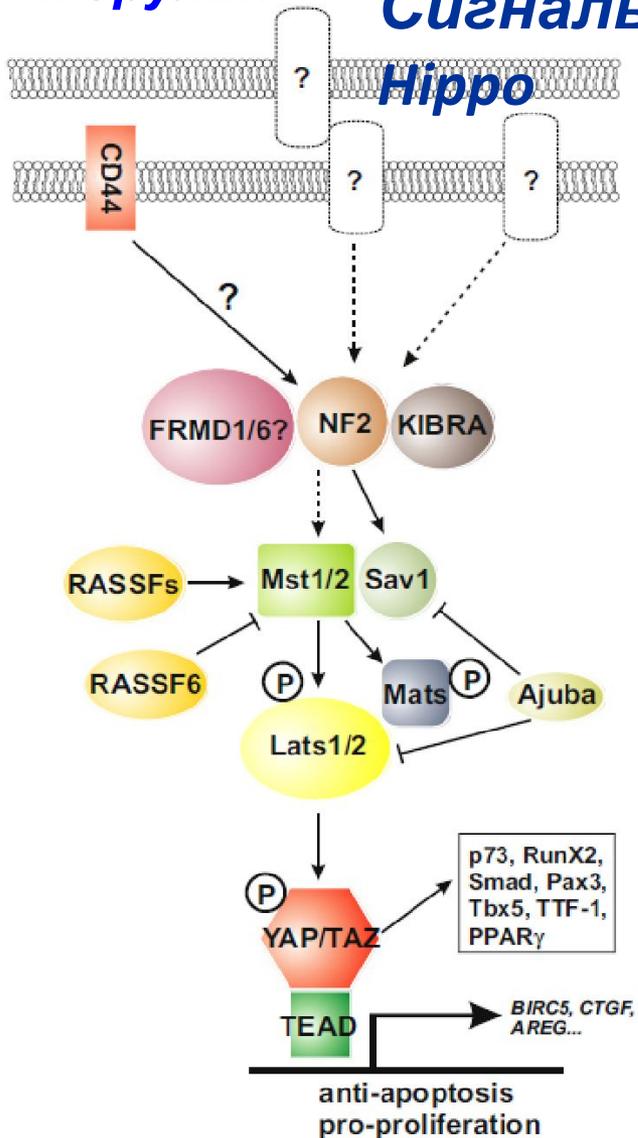
Эмбрионы мыши



Time-lapse microscopy

Как информация о положении бластомера транслируется в различные транскрипционные программы у внешних и внутренних клеток морулы?

Сигнальный путь протеин-киназы

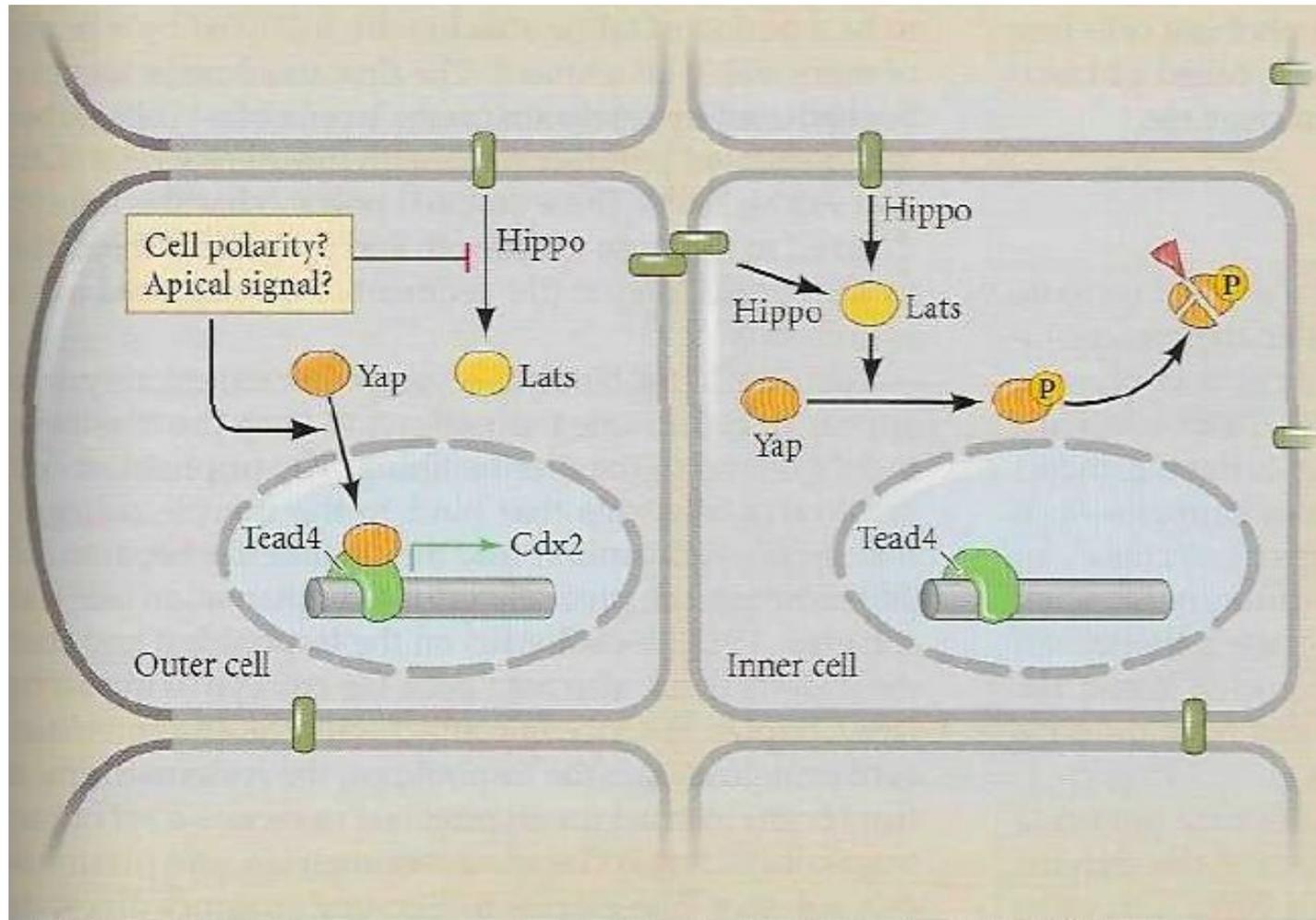


Размер печени
МЫШЦИ: норм
сверхэкспрессия YAP



- Протеин-киназа Hippo (у млекопитающих называется Mst1/2);
- Этот каскад контролирует пролиферацию и апоптоз;
- Мутации в этом гене или в других генах каскада приводят к разрастанию ткани и увеличению размера органа (Hippo – hippopotamus);
- Активный каскад Hippo приводит в фосфорилированию белка YAP1 – в результате он уходит из ядра и деградирует. Разрушается комплекс YAP/TEAD и блокируется экспрессия ряда генов.

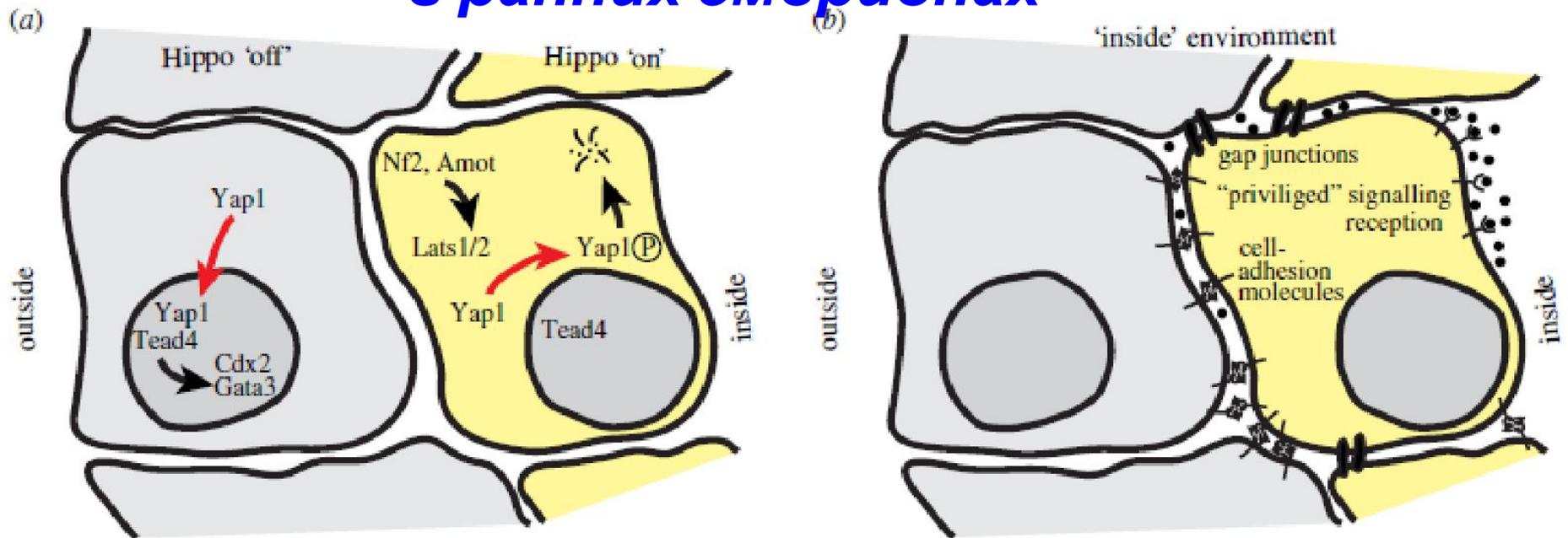
Нippo сигналинг: преобразование позиционной информации в молекулярный каскад



Gata3 – ранний маркер
клеток ТЭ

Oct4, Sox2 – ранние маркеры
клеток ВКМ

Сигнальный путь Hippo в ранних эмбрионах

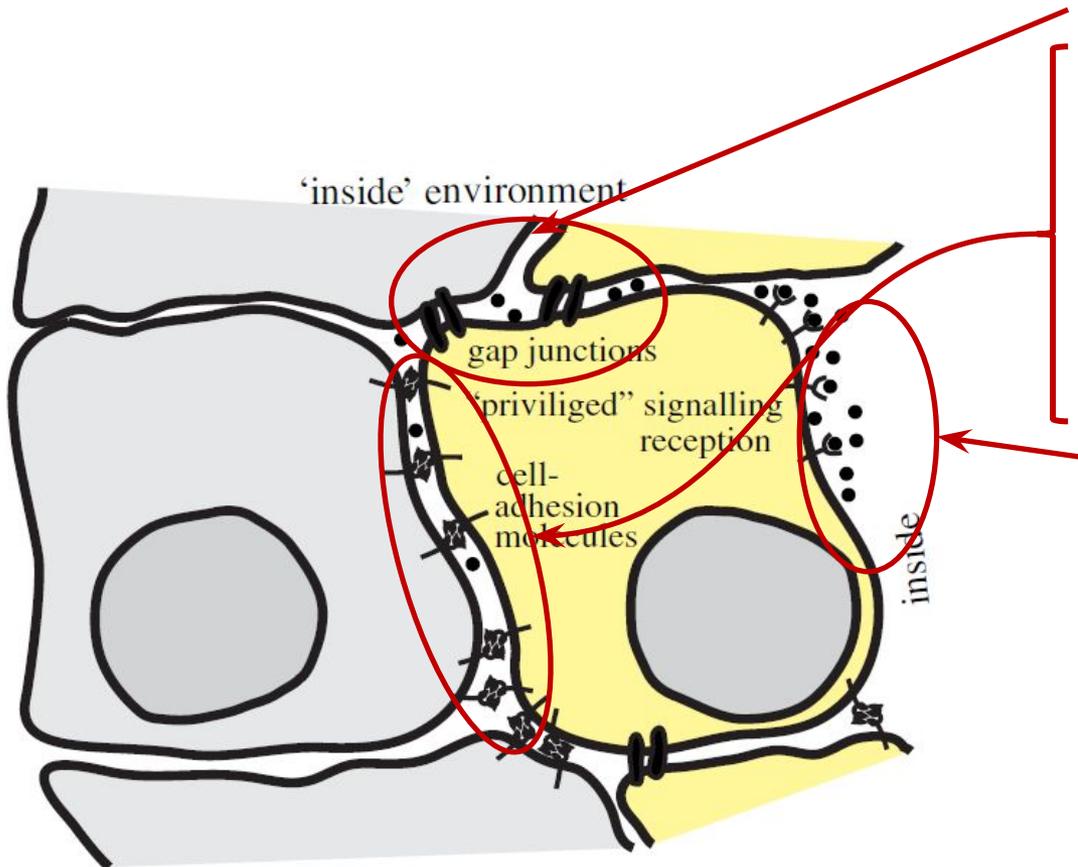


Выключение Hippo во внешних клетках – вторичное событие по отношению к установлению позиций бластомеров в эмбрионе

Нippo сигналинг недостаточен, необходима «внутренняя» среда

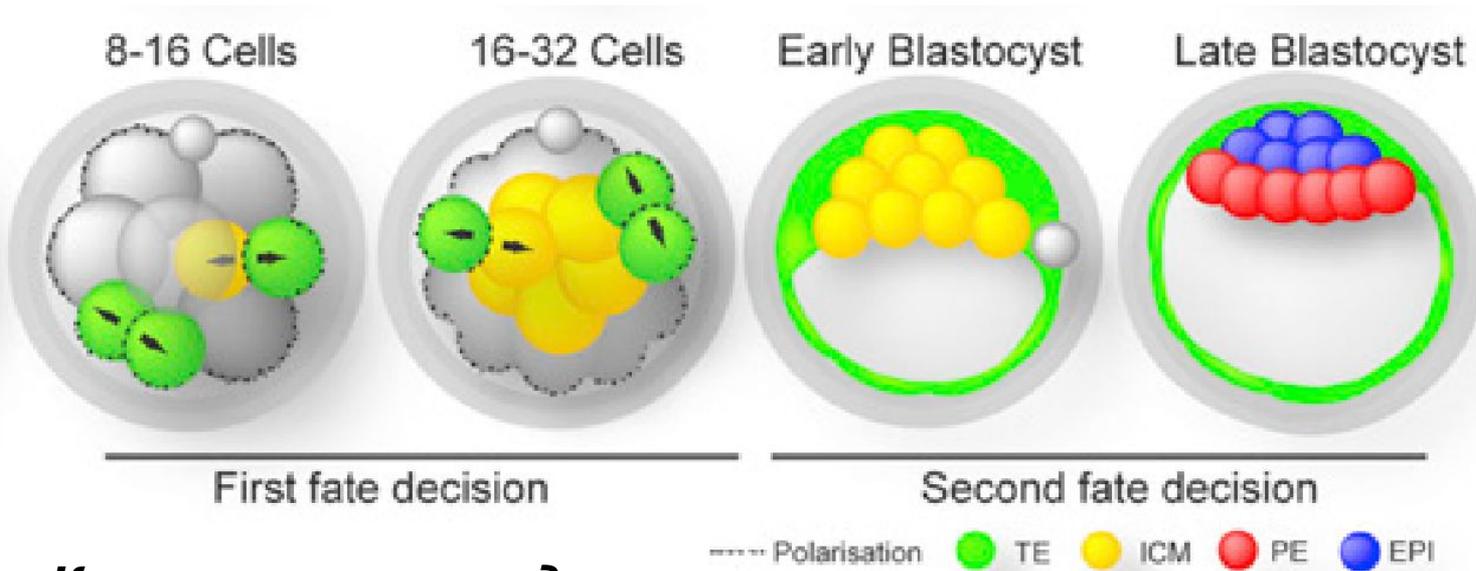
Эксперименты на трансгенных животных:

- Оверэкспрессия *Nf2* неспособна изменить локализацию Yap в трофэктодерме.
- Нокадаун *Lats1/2* приводит к эктопической экспрессии *Cdx2* в ВКМ, но экспрессия *Oct4* и *Nanog* сохраняется.



- Щелевые контакты
- Адгезионные контакты → сигналинг через цитоплазматические тирозин-киназы
- Фокальные контакты → сигналинг через FAK
- Внутренние клетки занимают привилегированную позицию для получения сигналов из внутренней среды
- Базальная мембрана или некий её аналог?

Второй этап выбора судьбы (для внутренних клеток): разделение на эпибласт и гипобласт

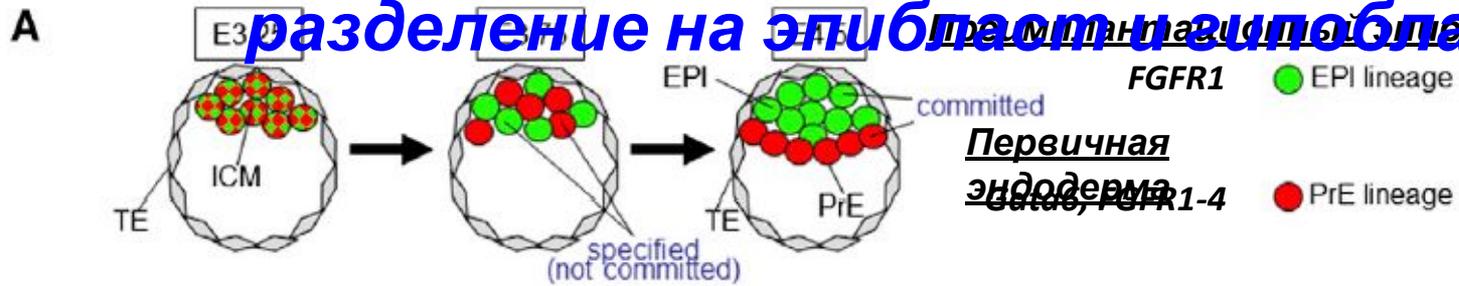


Классические представления:

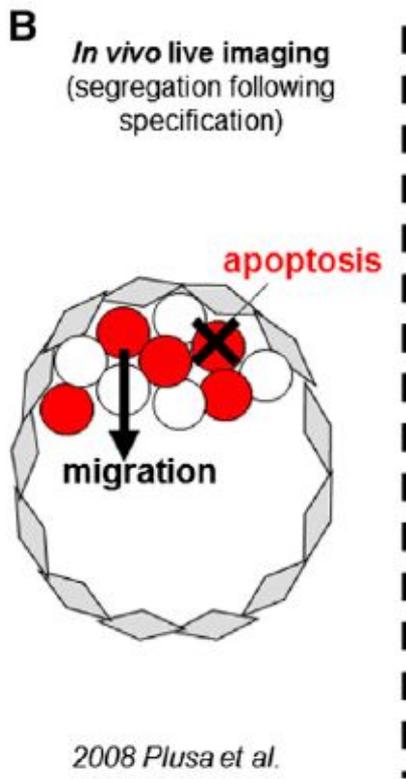
- В ранней бластоцисте все клетки ВКМ с самого начала различаются по положению, в результате они приобретают молекулярные и морфологические различия;
- Те клетки, которые контактируют с полостью бластоцисты, быстро приобретают апикально-базальную полярность и становятся гипобластом;
- Клетки, которые не контактируют с полостью не поляризуются и становятся клетками эпибласта. Они дольше сохраняют недифференцированный статус (ЭСК происходят именно из таких

Второй этап выбора судьбы (для внутренних клеток):

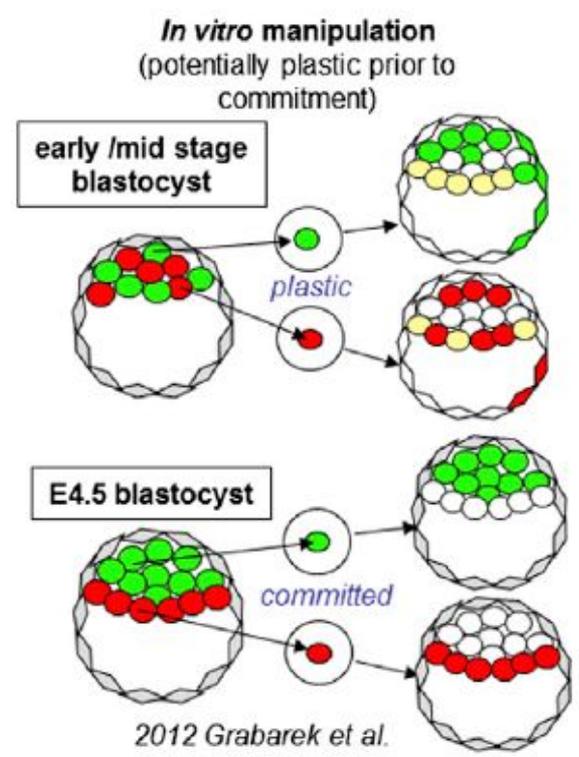
разделение на эпибласт и гипобласт



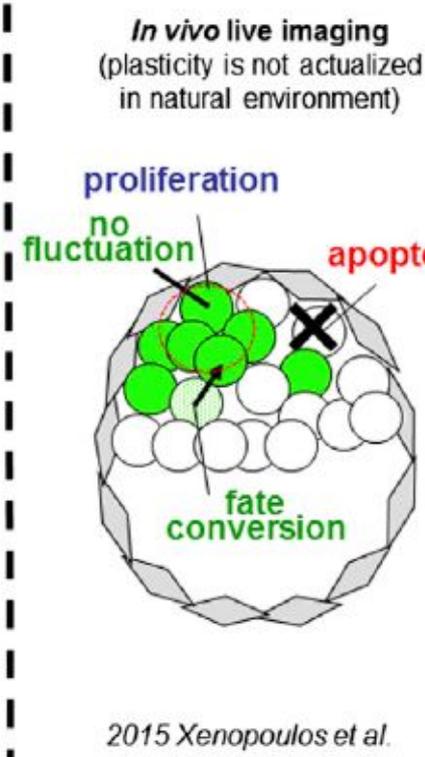
- 2008: PrE - предшественники первичной энтодермы (гипобласт) мигрируют к полости бластоцисты; клетки которые ошиблись и не сумели занять правильную позицию уходят в апоптоз



2008 Plusa et al.



2012 Grabarek et al.

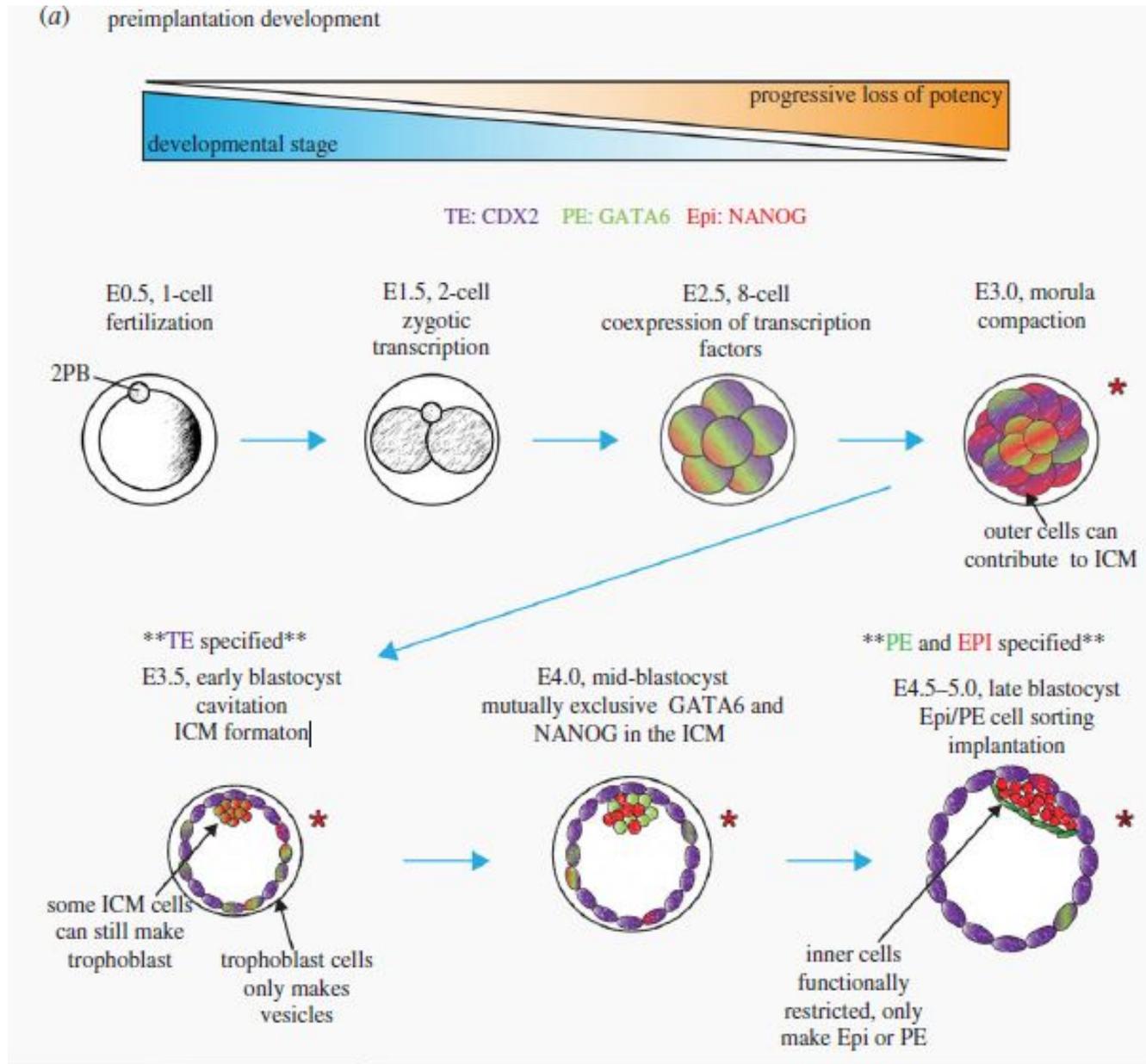


2015 Xenopoulos et al.

- 2012: в ранней бластоцисте, EPI-предшественники и PrE-предшественники могут менять свою судьбу, если в них активировать экспрессию специфических (для альтернативной судьбы) маркеров

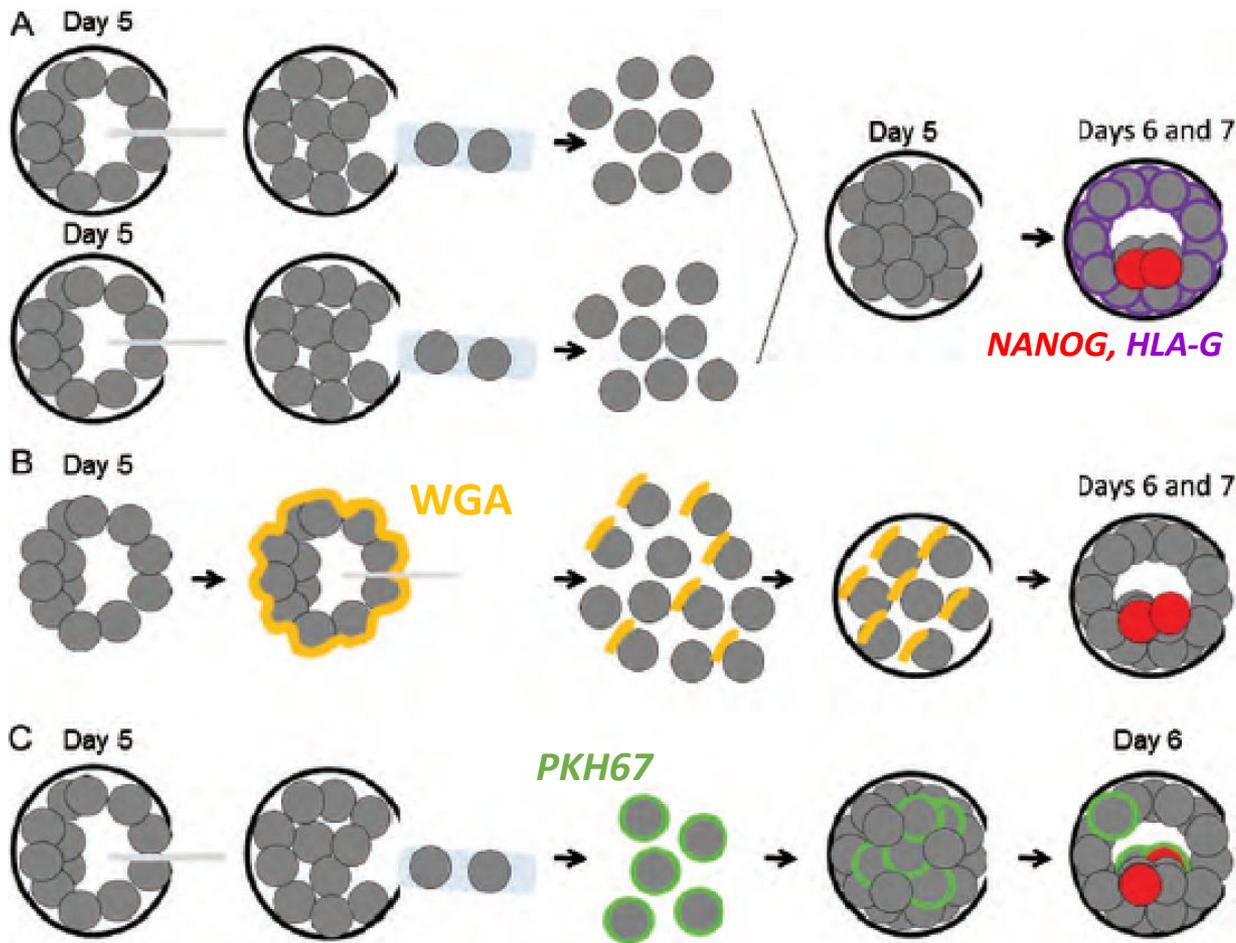
- 2015: очень редко предшественники PrE превращаются в EPI, но обратное событие не наблюдается.

С развитием преимплантационного эмбриона происходит потеря потенции клеток



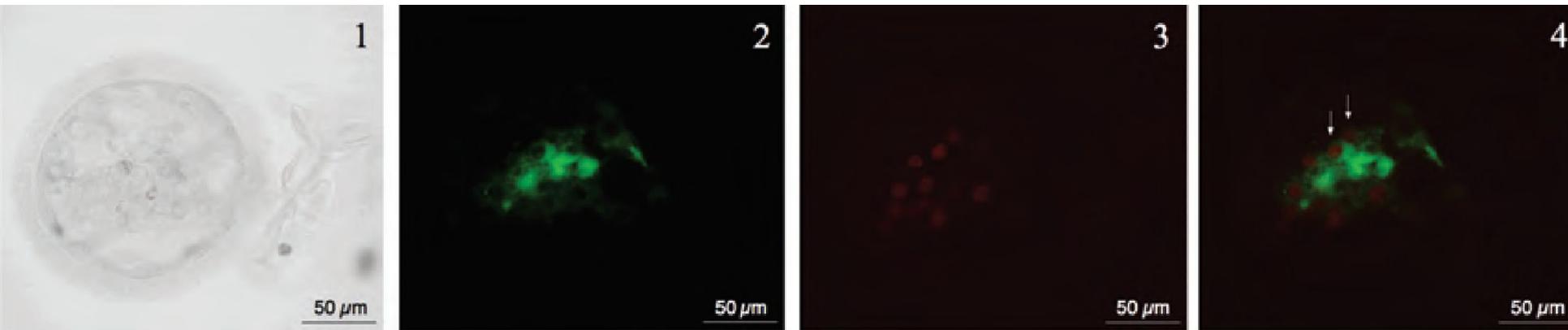
Является ли у бластоцисты человека разделение клеток на ТЭ и ВКМ окончательным ?

Paape C.D. et al., *Human trophoctoderm cells are not yet committed.*
Human Reproduction, Vol.28, No.3 pp. 740–749, 2013



Результаты микрохирургических операций:

Наружные клетки, помещенные внутрь эмбриона оставались в этой позиции и начинали экспрессировать **NANOG**:

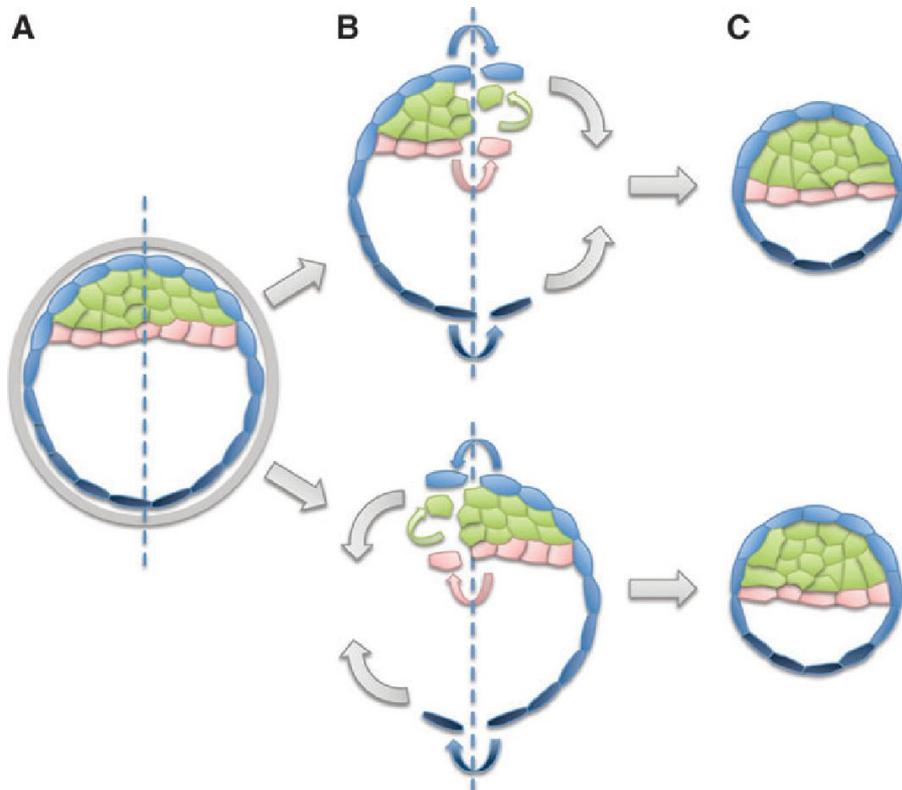


То есть при реконструкции эмбриона клетки ТЭ бластоцисты превращались в ВКМ

Предпосылки для приобретения отличительных черт эпибласта бластоцисты

- Гипометилирование ДНК
- Метилирование гистонов
- Декомпактизация хроматина
- Время, которое клетка занимает внутреннюю позицию; подверженность действию внеклеточного матрикса:
 - *Laminin511(Lama5, Lamb1, Lamc1)*
 - *Фибронектин*

События в жизни преимплантационного эмбриона: что влияет на время их наступления?

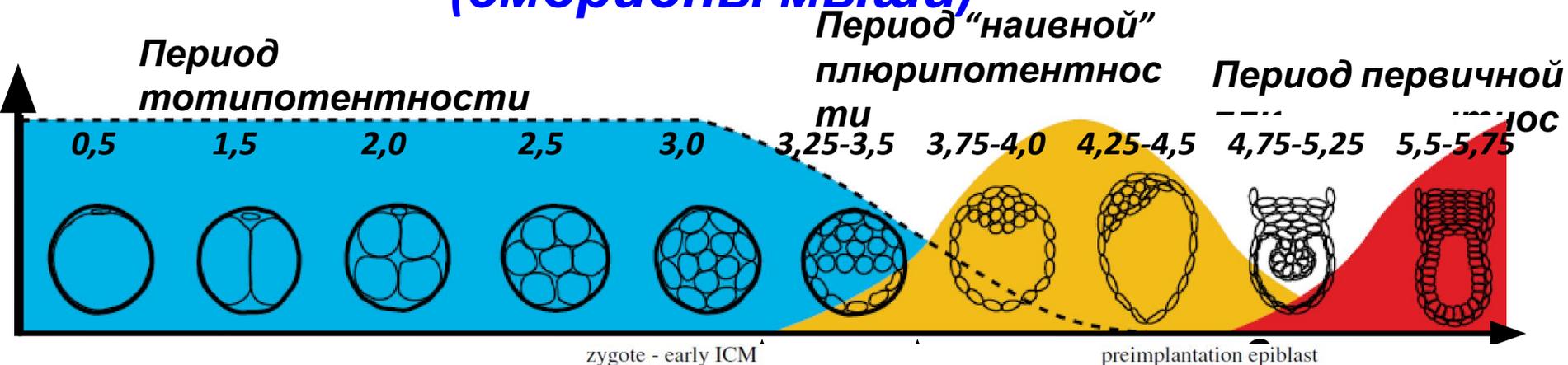


- Эмбрион разрезали на две половинки по эмбриональной – абэмбриональной оси (таких экспериментальных работ было много в 80-е годы – так пытались получать монозиготных близнецов))
- Эмбрионы восстанавливали поврежденные структуры, но оказывались значительно меньше размером.
- Последующие события у таких эмбрионов происходили в те же сроки, что у интактных.
- Но часть “половинных” эмбрионов погибала, так как у них было мало клеток эпибласта

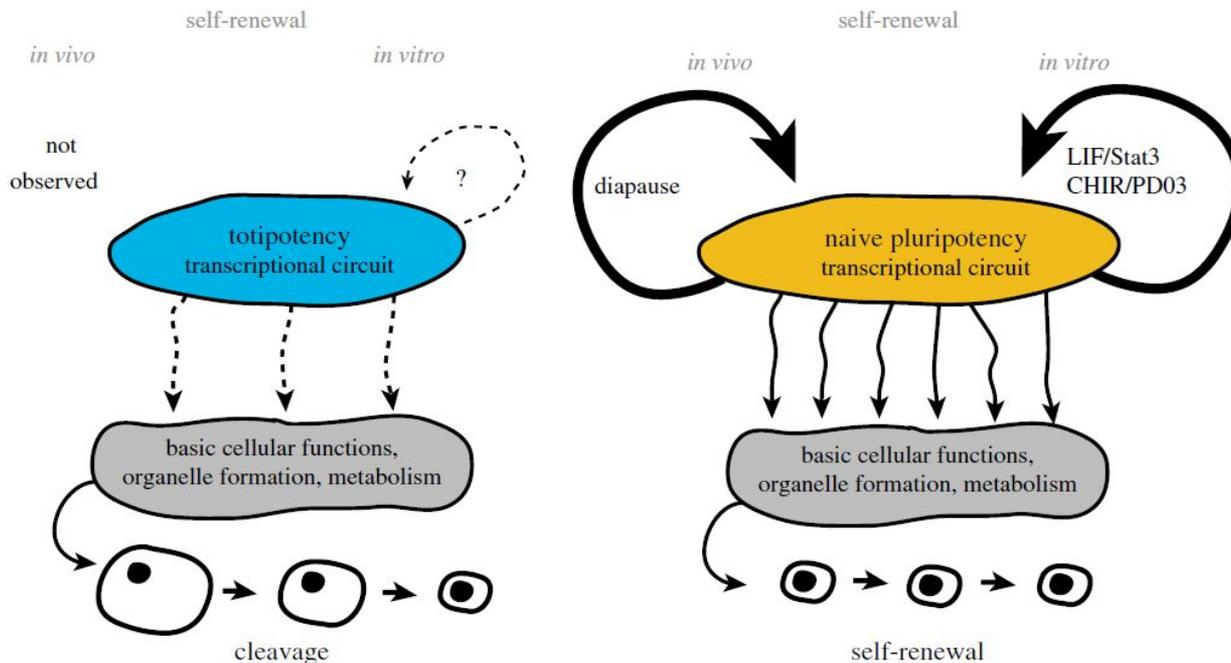
Le Douarin and McLaren, 1984:
“внутренние часы” эмбриона
контролируют время
наступления стадий

Переход от тотипотенции у клеток ВКМ

(эмбрионы мыши)



Возможно, состояние "наивной" плюрипотентности (характерное для клеток эпибласта) необходимо для спецификации эпибласта.

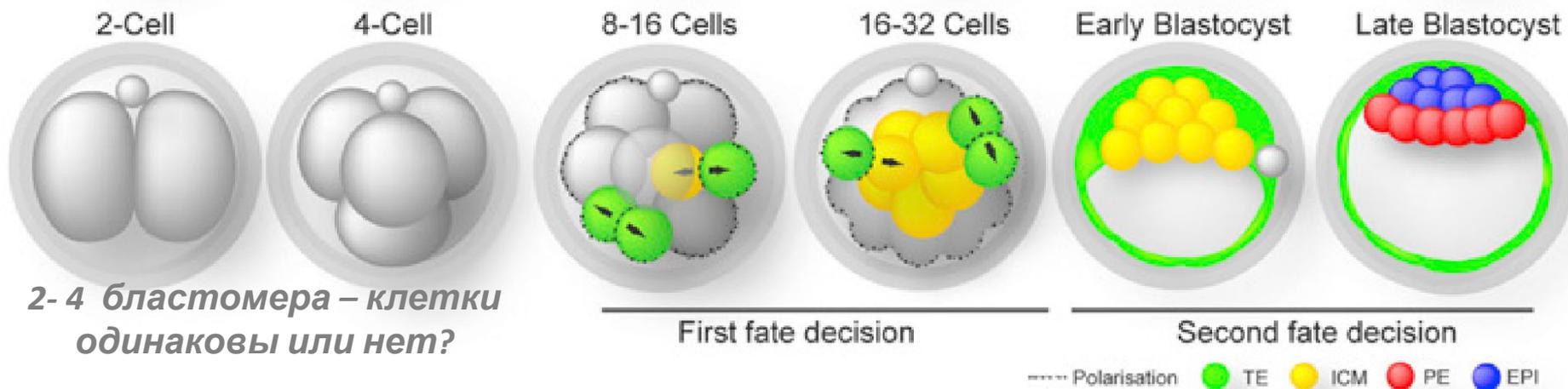


Возвращаемся к первому слайду:

Выбор судьбы клетками раннего эмбриона - решение в 2 этапа:

1 этап: внутри или снаружи (вопрос: за счет каких клеточных процессов клетки становятся ТЭ или ВКМ)

2 этап: как клетки внутренней клеточной массы разбираются на эпибласт и гипобласт



Вопрос для обсуждения:

за счет каких клеточных процессов клетки эмбриона становятся трофэктодермы или внутренней клеточной массы?

Гипотеза №1: С самого начала клетки раннего эмбриона не идентичны по своим потенциям. Возможно, эти различия закладываются во время оогенеза или при оплодотворении. Это обычно для других типов животных, почему же у млекопитающих должно быть иначе?

Гипотеза №2: Все клетки раннего эмбриона до начала компактизации одинаковы. Ведь клетки эмбрионов млекопитающих в этот период реально тотипотентны!

Выход из состояния наивной плюрипотентности *in vivo*

- FGF-сигналинг → MAPK-каскад
- Подавление Wnt/Gsk3b-каскада

