

Blastosist gelişimi; hücre soylarının farklanma mekanizmaları

BLASTOCYST DEVELOPMENT; DIFFERENCE MECHANISMS OF CELL LAYERS

Filiz YILMAZ, Işıl TEKMEN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Fertilizasyon sonucu oluşan zigot art arda mitoz bölünmeler geçirir ve ilk 3 mitoz bölünme simetrik olup morfolojik olarak birbirinin aynısı 8 adet blastomer oluşmaktadır. 8 hücreli aşamada embriyoda önemli morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bunlar; kompaksiyon, polarizasyon ve asimetrik hücre bölünmesidir. Bu değişikliklerin ardından 8-32 hücreli morula evresinde embriyoda yer alan hücrelerde birincil soy farklanması yani iç hücre kitlesi (ICM) ve dış hücre kitlesi (Trofoektoderm;TE) hücre soyları oluşmaktadır. ICM'den kısa bir süre sonra ikincil soy farklanması denilen epiblast (EPI) ve primitif endoderm (PE) hücre soyları farklanmaktadır. Bu derlemede; preimplantasyon döneminde blastosist gelişim aşamaları sırasıyla ve moleküler yollar üzerinden ayrıntılandırılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Blastosist, preimplantasyon, hücre soyları

ABSTRACT

Zygotes formed after fertilization undergo successive mitotic divisions, the first three mitosis divisions are symmetric and morphologically identical 8 blastomeres are formed. Important morphological changes occur in the embryo in 8-cell stage. These are compaction, polarization, and asymmetric cell division. Following these changes, the primary lineage differentiation in the cells of the embryo in the 8-32 cell morulae, consist of namely inner cell mass (ICM) and outer cell mass (Trofoektoderm; TE). Shortly after the ICM, epiblast (EPI) and primitive endoderm (PE) cell lines differentiate in the process called secondary progeny differentiation. In this review, the stages of blastocyst development in the preimplantation period will be elaborated sequentially and via molecular pathways.

Keywords: Blastocyst, preimplantation, cell lineage

Filiz YILMAZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

 orcid.org/0000-0003-0505-3905

Fertilizasyon sonucu oluşan zigot art arda mitoz bölünmeler geçirmektedir. Bu olaya zigotun yarıklanması

denir. Her bir bölünme ile oluşan hücreye ise blastomer denmektedir. Embriyoda toplam hücre sayısı artarken,

embriyonun toplam hacminde değişim izlenmemektedir (1). Blastomerler; totipotent özelliğe sahip olup, tek başına bir organizmayı oluşturabilir. Zigotun geçirdiği ilk 3 mitoz bölünme simetrik olup oluşan her bir blastomer boyut ve morfolojik olarak birbirinin aynısıdır (2). 8 hücreli aşama; totipotent özelliğin sona erdiği ve hücre soylarının farklanma kararlarının alındığı önemli kritik bir noktadır. Araştırmacılar gerçekten 8 hücreli aşamada yer alan blastomerlerin birbirinin aynısı olup olmadığını merak etmişler ve bu aşamadan önce farklanmaya yönelik bazı ipuçlarının olabileceğini düşünerek 4 hücreli embriyodaki blastomerlerde protein ekspresyonlarını değerlendirmişler. 3 molekülün ekspresyonunda farklılık olduğu gözlenmiştir;

1) H3R26me; 3 blastomerde yüksek metilasyon gösterirken, bir blastomerde düşük metilasyon olduğu görülmüş; yüksek metilasyon gösteren blastomerlerde tüm gelişim aşamalarının başarılı bir şekilde tamamladığı, düşük metilasyon gösteren blastomerde ise gastrulasyon aşamasına kadar başarılı gelişim olduğu gözlenmiştir.

2) PRDM14 proteini; 2 blastomerde yüksek ekspresyon olduğu, 2 blastomerde ise düşük veya hiç ekspresyon olmadığı gösterilmiş; PRDM14' ün düşük veya yüksek ekspresyon olan hücrelerde gelişim açısından herhangi bir defekt izlenmemiştir.

3) Oct4; 2 blastomerde yüksek, diğer 2 blastomerde düşük ekspresyon olduğu gösterilmiş; yüksek ekspresyon gösteren blastomerlerin 8 hücreli aşamada simetrik bölünme, düşük Oct 4 ekspresyonu içeren hücrelerin ise asimetrik bölünme ile çoğaldığı gösterilmiştir (3).

MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

8 hücreli aşamada önemli morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bunlar; kompaksiyon, polarizasyon ve asimetrik hücre bölünmesidir. Kompaksiyon; 8 hücreli aşamada yer alan blastomerlerin birbiri ile maksimum düzeyde temas etmesi, hücre içi ve hücre dışı boşluklarının da minimuma indirmek amacıyla blastomerlerin belirsiz hücre sınırları olan, sıkı bir şekilde gruplandırılmış bir hücre kütleli oluşturmasına denir (4). Kompaksiyon derecesi, IVF başarısı için oldukça önemlidir (5). Embriyo transfer kriterlerine göre değerlendirme yapılırken; 3. günde erken kompaksiyonun izlenmesinin destekleyici

parametre olacağı vurgulanmıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte in vitro koşullarda oluşturulan zigotun blastosist aşamasına kadar gelişimi; hücre bölünmeleri, kompaksiyon, blastosel oluşumu time-lapse mikroskop ile kaydedilmiş ve en uygun embriyo seçiminde kolaylık sağlamaktadır (6). Kompaksiyonda 3 mekanizma önemli rol oynamaktadır; hücre adezyonu (e-kadherin), filopodia ve korteks gerilim (aktomyozin). Hücre adezyonunun önemli bir komponenti olan e-kadherin; kompaksiyondan önce 8 hücreli embriyodaki blastomerlerin tüm yüzeylerinde homojen şekilde yer almakta iken, kompaksiyondan sonra e-kadherin ekspresyonu sadece bazolateral yüzeyde lokalize olduğu gösterilmiştir (7). Filopodia; embriyo yüzeyi boyunca gerginliği korumak ve komşu hücre yüzeylerin düzleştirilmesini desteklemek için bir çekme kuvveti oluşturur. Sekiz hücreli embriyoların blastomerlerinin yaklaşık % 60'ında filopodia uzantıları bulunmaktadır. Filopodia, kompaksiyon başlamasıyla sadece 8 hücreli aşamada ortaya çıkar ve embriyo tamamen sıkıştırıldığında 16 hücre evresinde kaybolur. Çalışmada filopodiaların e-kadherine bağımlı olarak ve kompaksiyon başlangıcı ile oluştuğu ve kompaksiyonun sona ermesi ile gerilediği gösterilmiştir (9). Filopodia; E-kadherin, F-aktin ve myosin-10'dan (Myo10) oluşur. Yapılan çalışmalarda preimplantasyon fare embriyosunda, miyosin-10 ekspresyonunun kompaksiyon sırasında arttığı kanıtlanmıştır (8). Kortikal gerilim ise hücre membranının hemen altında yer alan hücre iskeleti elemanı olan aktomyozinlerin kasılması ile oluşmaktadır (4, 10). Özellikle apolar hücrelerin serbest yüzünde yani apikal bölgede kortikal gerilim görülmektedir, bu kontraksiyon sayesinde apikal daralma oluşmaktadır, bu da hücrenin içselleşmesini yani iç alana göç etmesini sağlar. Apolar hücre; iç kısma göç edince polar hücreler tarafından çevrelenir ve polar hücrelerde de kortikal gerilim ile temas yüzeylerinde eğrilik oluşur. Bu sırada apolar hücreler, hücre içi basıncı arttırarak dengeyi korumaktadır. Maître ve ark. çalışmalarında; mikropipet aspirasyon yöntemi ile kompaksiyonda rol oynayan kortikal gerilim varlığını ispatlamışlar ve sıkıştırma sırasında hücrelerin temassız yüzeyindeki yüzey kontraktilesinin arttığı gösterilmiştir. Miyozin II inhibitörü olan blebbistatin ile aktomyozin kontraktilesini bloke etmenin kompaksiyonu önlediği, ancak daha önce oluşmuş hücre-hücre adezyonlarını

bozmadığı, bu aktomyozin aracılı yüzey kontraktilesinin hücre yüzey düzleşmesi için bir itici güç sağladığını düşündürmektedir (11).

Polarizasyon; kompaksiyon ile eşzamanlı olarak meydana gelmektedir. Sitoplazmada yer alan proteinlerin asimetric dağılımından kaynaklanmaktadır. Apikal bölgede Ezrin, F-aktin, aPKC (atipik protein kinaz), Par3 ve 6 ekspresyonu ve bazolateral bölgede ise Par1 ve Na/K ATPaz yer almaktadır. Par kompleksi; özellikle polar hücrelerde yer alır ve aPKC enzimini aktive ederek Cdx2 ekspresyonunu uyarmakta ve trofoektoderm (TE) yönünde farklılaşmada destekleyici özellik göstermektedir (12).

Asimetrik hücre bölünmesi; morula aşamasında, dördüncü (8-16 hücre) ve beşinci (16-32 hücre) hücre bölünmesinde olmak üzere iki tur meydana gelmektedir. Asimetrik bölünmeden sonra, iki hücre popülasyonu; polar ve apolar hücreler ortaya çıkar. Polar hücreler, TE oluşturmak üzere dış kısımda ve apolar hücreler ise iç hücre kitlesi (inner cell mass = ICM) 'ne farklılaşmak üzere iç kısımda yer alır. Bu da embriyo içindeki dış / iç hücre kitlelerinin oluşumuna yol açmaktadır. Asimetrik bölünmede; bölünen hücredeki apikal alan hangi hücreye transfer edildi ise o hücre polar hücre; apikal alan içermeyen hücre ise apolar hücre olmaktadır. Anani ve ark. yaptığı çalışmada apikal alan proteinleri olan p-ERM ve F-aktin ekspresyonlarını immünfloresan görüntüleme yöntemiyle değerlendirilmiş; 8 hücreli aşamada izlenen asimetrik bölünme sonucu, 8 adet hücrenin apolar hücre ve 8 adet hücrenin ise polar hücreye dönüştüğü gösterilmiştir (13). Bölünme açısı, mitoz bölünmenin simetrik mi asimetrik mi olduğunun kararında önemli rol oynamaktadır. Bölünme düzlemsel ise simetrik bölünme izlenirken, bölünme açısı ortogonal düzlemde gerçekleşirse asimetrik bölünme gerçekleşir (15). Korotkevich ve ark. yaptığı çalışmada; 8 hücreli aşamadaki embriyodan elde edilen blastomerler, ayrı ayrı invitro kültür ortamında kültüre edilmiş ve mini blastosistler oluşturulmuş. Mini blastosistte meydana gelen asimetrik bölünme sonucunda polar hücreler dış kısımda yer alırken, apolar hücreler iç kısımda yer almış. Sonuç olarak; 8 hücreli embriyoların blastomerlerinde gözlenen apikal bazal polaritenin; sonraki hücre bölünmelerinin yönlendirilmesinde, ICM ve

TE soylarına ayrılmasında önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (14).

BİRİNCİL SOY FARKLANMASI (ICM / TE)

Birincil soy farklılaşması; preimplantasyon fare embriyosunda 8 hücre ile 32 hücreli aşamalar arasında gerçekleşmektedir. TE / ICM farklılaşması ilk kez 1967 yılında Tarkowski ve ark. tarafından iç-dış model ile açıklanmıştır. Çalışmalarında preimplantasyon fare embriyoları 2 hücreli ve 4 hücreli aşamada toplanmış; embriyodaki hücrelerin dış çevreye göre konumlarının hücre kaderini belirlediği hipotezi kurulmuştur (16). Daha sonra araştırmacılar hücrelerin buldukları konumu nasıl algıladıklarını incelerken polarite modelini geliştirmişlerdir. Johnson ve ark. 1981 yılında apikal bölgenin işareti olan mikrovillus varlığı ile polarite hipotezini kurmuşlardır (17). Günümüzde de polarite modeli desteklenmektedir. Örneğin; polarize 8 hücreli aşamadaki bir embriyonun blastomerlerinin apikal alanı, apolar bir embriyoya transplante edildiğinde, asimetrik bölünmeyi indüklediği ve apikal alana sahip olan hücrenin TE'ye doğru farklılandığı artan Cdx2 ekspresyonu ile gösterilmiştir. Apikal alanın, soy farklılaşmasını başlatmak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (14).

TE/ICM farklılaşmasında transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır. Blastosist aşamasına kadar soya spesifik hücre markerlarının ekspresyonunda fark görülmemektedir. Cdx2 (TE marker), Oct4 ve Nanog (ICM marker) 32 hücreli aşamaya kadar homojen olarak eksprese olurken; 32 hücreli aşamadan itibaren sadece kendi soyuna özgü transkripsiyon faktörlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (18).

Hippo Sinyal Yoluğu da birincil soy farklılaşmasında rol oynamaktadır. İlk kez drosophila sinek ailesinde organ boyutunu korumada rol oynayan yolak şeklinde tanımlanmıştır. Bu yolağın komponentleri olan Lats 1 / 2 kinaz, YAP ve TAZ; sitoplazma ve çekirdek arasında gidebilen koaktivatörlerdir. Tead4 TE'ye özgü, Sox2 ICM'ye özgü transkripsiyon faktör iken, yolağın kontrolünde ise Amot (Anjiomotin) ve NF2 (tümör supresör genlerden olan nörofibromatozis) rol oynamaktadır. Bu yolak TE'de aktif değilken, ICM'de aktiftir. ICM'de; hippo sinyal yoluğu Lats 1/2 kinaz enzimi aracılığı ile YAP proteinini fosforiller.

Fosforilenen YAP molekülü nükleusa geçemez ve ICM'ye özgü genlerin transkripsiyonunu teşvik ederek hücre soyunun ICM yönünde farklanmasını sağlar. TE'de hippo sinyal yolağı inaktif, yani Lats 1 / 2 kinaz enzimi aktif olmadığı için YAP fosforillenememekte ve serbest olan YAP molekülü kolaylıkla nükleusa geçmektedir. Nükleusa geçen YAP, Tead4 molekülünü aktive ederek Cdx2 ekspresyonunu uyarmaktadır ve hücreler TE yönünde farklanmaktadır (2). Hippo sinyal yolağının aktivasyonu; Amot (Anjiomotin) ve NF2 gen ekspresyon ürünü olan Merlin proteini tarafından düzenlenmektedir. TE'de Amot apikal bölgede lokalize olması sebebiyle, Lats kinaz enziminin aktivasyonunu engelleyerek hippo sinyal yolağını inaktive etmektedir. Amot molekülü ICM'de ise bazolateral yüzeyde eksprese olmaktadır. Merlin molekülü ise TE'e ve ICM'de yani her iki hücre grubunda da bazolateral bölgede yer almaktadır. ICM'de bazolateralde yer alan Amot ve Merlin; hippo sinyal yolağını aktive eder (19).

Hippo sinyal yolağı; sadece TE'e özgü transkripsiyon faktörlerini değil, aynı zamanda iç hücrelerin en erken belirleyicilerinden biri olan Sox2 ekspresyonunu da düzenlemektedir. TE hücrelerinde YAP nükleer lokalizasyonunu önlemek, Sox2 ekspresyonunu indüklemek için yeterlidir. TE'de Sox2 ekspresyonunun önlenmesi Cdx2'den bağımsızdır ve bu nedenle Nanog ve Oct4 düzenlemelerinden farklıdır. Bu, YAP'nin Sox2 ifadesinin düzenlenmesi için dış hücrelerde ayrı bir inhibisyon mekanizmasını harekete geçirdiğini göstermektedir (20). Araştırmacılar, bu kadar önemli bir soy farklanması için mutlaka alternatif veya kompanzatuvar mekanizmaların bulunması gerektiğini vurgulamışlardır.

TE soy spesifikasyonunun regülasyonunda transkripsiyon faktör AP2C da önemli rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktör AP2C ise apikal protein kompleksininin (PARD6B, p-ERM, PKC) sentezini uyarmaktadır. Apikal protein kompleksi de hippo sinyal yolağını baskılayarak hücre soyunun TE yönünde farklanmasını uyarmaktadır (21). Apikal alanda yer alan PARD6B'nin; aPKC, YAP nükleer lokalizasyonu ve TE soy farklanmasında gerekli olduğu gösterilmiştir. PARD6B mutant suşta; Cdx2 ekspresyonunun azaldığı, Nanog ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. TE soy farklanması için

mutlaka olması gereken bir protein olduğu ispatlanmıştır (22). ICM markerları ve TE markerları arasında negatif feedback bulunmaktadır. ICM'e özgü transkripsiyon faktörleri Oct4, Sox2 ve Nanog iken; TE markerları Cdx2 tarafından kontrol edilir. Çalışmalarda Notch sinyal yolunun; TE farklanmasında rol aldığı, fakat bu yolağın inaktive olduğu durumlarda soy farklanmasının etkilenmediği gösterilmiştir. Bu yüzden araştırmacılar bu yolağı çalışmalarında göz ardı etmektedir (23).

2. SOY FARKLANMASI (Epiblast / Primitif Endoderm)

Preimplantasyon fare embriyolarında; E3.5 ile E4.5 günlerde ICM'den epiblast (EPI) ve primitif endoderm (PE) farklanmaktadır. Nanog ve Gata6, sırasıyla EPI ve PE kaderini yönlendiren ana düzenleyicilerdir. 32 hücreli aşamada Gata6 ve Nanog ekspresyonu ICM'de birlikte yer alırken; 58 hücreli aşamada ise farklı hücrelerde ayrı ayrı eksprese olduğu gösterilmiştir (24).

Farklı bir çalışmada E3.0 – E3.25 günlerden başlayarak (20 ila 32 hücre aşaması) ICM hücreleri, EPI veya PE'ye farklanmaya başladığı gösterilmiştir. Nanog ve Gata6'nın, E3.75 – E4.0 günlerdeki ekspresyonu "tuz ve biber" şeklinde tanımlanmıştır. Nanog ve Gata6; 8 hücreli aşamada tüm blastomerlerde birlikte eksprese edilmektedir. Markerlardan birinin kaybıyla hücre soy kararı verilmektedir. Bu yüzden Nanog ve Gata6 ekspresyon seviyelerini birlikte değerlendirilir, yüksek düzeye sahip olana göre hücre soy adlandırması yapılmaktadır (26).

ICM'de yer alan hücrelerin farklanma süreci, hücre içi dört değişkenin seviyesi ile düzenlenmektedir: Gata6, Nanog, FGFR2 (Fibroblast Growth Faktör Reseptör-2) ve ERK (Endojen Regülatör Kinaz). Bu dört değişken, pozitif ve negatif düzenlemelerle birbirine bağlıdır (26). Nanog, Oct4, ve Sox2 eksprese eden EPI hücreleri; Gata6 ekspresyonunu baskılayarak hücrede FGF-4 (Fibroblast Growth Faktör-4) sentezini uyarmaktadır. Ortamda artan FGF4 molekülü; PE hücrelerinin yüzeyinde yer alan FGFR2'e bağlanarak, PE hücrelerinin gelişimini/farklanmasını uyarmaktadır. FGF / ERK sinyal yolunun aktivitesine karşılık gelen ERK, hücre tarafından algılanan FGF4'ün hücre dışı konsantrasyonuna bağlıdır. PE hücrelerinin sitoplazmasında yer alan ERK enzimi

aktive olur, PE hücrelerinde Gata6 ekspresyonunu arttırırken Nanog ekspresyonunu azaltır (20).

ETV4 ve SPRY4, reseptör tirozin kinaz (RTK) yolunun negatif düzenleyicileridir. EPI hücreleri tarafından eksprese edilir ve FGFR1 aktivitesine bağımlıdır. ETV4 ve SPRY4, FGFR aktivitesini sadece EPI hücrelerinde bloke etmektedir, muhtemelen hücreleri kendi salgılarına duyarsızlaştırır. Öte yandan, PE hücrelerinde FGFR1 aktivasyonu, ERK'yi inhibe eden bir fosfataz proteini olan Dusp4'ün ekspresyonunu indüklemektedir. PE hücrelerinde Dusp4 yeniden düzenleme ile resensitizasyon sağlar. Böylece PE hücreleri, ERK aktivasyonunun yeni sinyallerini algılayabilmektedir (26, 35).

Yapılan çalışmalarda, PE farklanmasının 3 aşamada meydana geldiği gösterilmiştir. 1) 8 hücreli aşamada (E2.5), Nanog ve Gata6 birlikte eksprese olur; Gata6, FGF4 / RTK sinyal yolağı ile doğrudan aktive olur. 2) Morula ve erken blastosist aşamasında, daha yüksek Gata6 seviyeleri izlenirken Nanog seviyeleri azalır. Gata6, RTK tarafından doğrudan aktivasyon gerektirmez ve muhtemelen bir otoregülatör mekanizma ile korunur 3) PE olgunlaşması için gerekli olan Sox17 ve Gata4'ün upregülasyonu, EPI hücrelerinden FGF-4 ekspresyonuna bağlıdır. EPI hücreleri, yüksek seviyede Nanog içerirken, Gata6 markeri azalmaktadır (27).

PE olgunlaşma süreci için; Sox 17 ve Gata 4 önemli markerlardandır. Frankenberg ve ark yaptığı çalışmada; Nanog - / - embriyolarda PE markerlarını değerlendirilmiş, Sox 17 ve Gata 4 ekspresyonunda düşüklüğü izlenmiştir. Bunun sebebi; farklanma sürecinde EPI hücrelerinden salgılanan FGF4'ün eksikliğine bağlanmıştır. Araştırmacılar bunu kanıtlamak için FGF4 takviyesi yaparak, Sox17 ve Gata4 ekspresyonlarının arttığını göstermişler. Sonuç olarak; PE olgunlaşma süreci için mutlaka EPI hücrelerinden salgılanan FGF4 varlığı gerekmektedir (27).

EPI markerı olan Sox2'nin EPI/PE farklanmasında değil, PE olgunlaşmasında gerekli olduğu gösterilmiştir. Sox2 mutant embriyolarda, E3.75'de sox 17 ekspresyon düşüklüğü izlenmiştir (28). Benzer şekilde pluripotensi faktörü Oct4'ün; PE olgunlaşma sürecinde önemli rol

oyndığı; Oct 4, Sox2 ve Nanog 'un, FGF4 üretmek üzere işbirliği içinde olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (29).

PE için bir diğer önemli marker; PDGF (Platelet Derived Growth Factor)dir. PDGFRa; PE hücrelerinde spesifik eksprese olmakta ve PE hücrelerinin hayatta kalmasında PDGF sinyalleşmesinin rolü kanıtlanmıştır. PDGF sinyalleşme aktivitesinin yokluğu, özellikle PE soyunu etkiler ve kaspaz bağımlı seçici apoptozu indüklemektedir. Ek olarak, FGF ve PDGF reseptör tirozin kinaz sinyallerinin, sırasıyla PE soy spesifikasyonunda ve hayatta kalmada (survelans) farklı rollerde yer aldığı gösterilmiştir (30).

Artus ve ark., ICM içinde EPI ve PE soylarının oluşumu sırasında orta blastosist evrelerinden geçişte (3.5 ve 3.75 günler arasında) apoptoz artışı bildirilmiştir. Bir PE kaderini doğru bir şekilde belirtmedeki başarısızlığın, hücre ölümüne yol açan PDGF aktivitesinin seviyelerini doğrudan etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu mekanizma, sadece PE programını doğru bir şekilde aktive edemeyen hücrelerin değil, aynı zamanda ICM içinde yanlış bir şekilde konumlandırılan PE hücrelerinin de çıkarılmasını kolaylaştıracaktır (30, 31).

Araştırmalar, blastosist gelişimi sırasında PE hücrelerinin aşamalı olarak epitel özellikleri kazandığını göstermektedir. Bu süreç henüz tam olarak açıklanamamış olup, epitelizasyonu düzenleyen faktörleri tanımlamak için yapılan çalışmalar devam etmektedir. Lrp 2, Kollajen 4, DAB gibi molekül ekspresyonlarının düzenleyici olduğu düşünülmektedir. PE epitelizasyonu sürecinde meydana gelen olaylar şu şekilde açıklanmıştır; E3.5'te ICM dağınık bir şekilde pre-EPI ve pre-PE hücrelerinden oluşmaktadır. Lrp2, ICM'nin bazılarında eksprese edilmektedir. Lrp2 ve Nanog çift boyama yöntemi ile boyandığında, Lrp2 ve Nanog ile boyanan hücrelerin aynı olmadığı görülmüş ve Lrp2 ile boyanan hücreler pre-PE hücreleri olarak tanımlanmıştır. Lrp2 lokalizasyonu, embriyonun yaşına ve pre-PE hücrenin konumuna göre değişmektedir. E3.5 erken blastosistlerde Lrp2 pozitif hücreleri, blastosist yüzeyinde yer almakta ve henüz polarize değildir. E3.75'te, ICM hala pre-EPI ve pre-PE hücrelerinden oluşmaktadır. Pre-PE hücreler farklılaşma sürecinde, epitelizasyondan önce kollajen-IV ve laminin gibi epitelin yapısal proteinlerini

biriktirmeye başlamaktadır. Blastosel boşluğunun yüzeyinde yer alan pre-PE hücreler, Kollajen-IV ve Lrp2'nin birlikte ekspresyonu ile epitelizasyon gösterirler. Kollajen ve laminin bazal membran oluşumunda rol alır. Blastosel yüzeyinde yer alan hücreler Lrp2 ve DAB2'in apikal birikimi ile polarize olur. Dab2, Lrp2'ye bağlanan bir adaptör proteindir ve PE farklılaşmasında rol oynadığı bilinmektedir. Lrp2'nin apikal membrana lokalizasyonu, Dab2 ekspresyonunun başlangıcına denk gelir. Dab2 seviyesi de E4.5'te büyük ölçüde artmıştır ve epitelin apikal yüzeyinde açıkça tespit edilmiştir (26). E4.5'te PE ile oluşturulan epitel, Kollajen-IV içeren bir bazal membrana sahiptir. Dab2 ve Lrp2 tüm PE hücrelerde apikal olarak lokalizedir (32).

Çalışmalarda, Dab2 ve Lrp2'nin apikal lokalizasyonunun, PE hücrelerinin polarizasyonunun ilk belirtisi olduğu gösterilmiştir (26, 32). Daha sonra apikal aPKC lokalizasyonu gözlenmektedir. Hücre polaritesinin, aPKC ve Dab2 yolları yoluyla oluşturulması, epitelizasyon için gereklidir. Bu nedenle, polariteye bağımlı bu mekanizma, EPI kümelenmesinden tek sıra halindeki PE hücrelerinin ayrılmasını sağlamaktadır.

Time-lapse görüntüleme sistemi ile kaydedilen videoda; ICM hücreleri içinde dağınık halde yer alan PDGFRa floresan marker ile işaretli PE hücrelerinin zamanla blastosel boşluğuna bakacak şekilde tek sıra halinde hizalandıkları gösterilmiştir (33).

Sonuç olarak; embriyogenezis, blastosistin meydana geldiği preimplantasyon süreci ile başlamaktadır. Blastosist oluşumu, implantasyonun meydana gelmesi ve gebeliğin devamı için esastır. Bu dönemde yer alan mekanizmaların anlaşılması ve bilinmesi; hem embriyogenezisi hem de üremeye yardımcı tedavi merkezlerine başvuran çiftlerin çocuk sahibi olabilmeleri açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmaların çokluğu ile in vitro fertilizasyon gibi yöntemlerde kullanılacak embriyoların yüksek kalitede olmasının başarılı implantasyon ve fetal gelişimi beraberinde getirdiği görülmüştür (34).

KAYNAKLAR

1. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 8th Edition. Saunders Elsevier, 2008.
2. Cell Polarity-Dependent Regulation of Cell Allocation and the First Lineage Specification in the Preimplantation Mouse Embryo. *Curr Top Dev Biol*, 2018;128: 11-35.
3. Tabansky I, Lenarcic A, Draft RW et al. Developmental bias in Cleavage-Stage Mouse Blastomeres. *Curr Biol*. 2013; 23: 21–31. doi: 10.1016/j.cub.2012.10.054.
4. White MD, Bissiere S, Alvarez YD, Plachta N, Mouse Embryo Compaction. *Curr Top Dev Biol*. 2016;120:235-58. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.04.005.
5. Le Cruguel S, Ferré-L'Hôtelier V. Early Compaction at day 3 May Be a Useful Additional Criterion for Embryo Transfer, *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30: 683–690. doi: 10.1007/s10815-013-9983-3
6. Iwata K, Yumoto K. Analysis of Compaction Initiation in Human Embryos by Using Time-Lapse Cinematography. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31: 421–426. doi: 10.1007/s10815-014-0195-2
7. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. Cell Adhesion in the Preimplantation Mammalian Embryo and its Role in Trophectoderm Differentiation and Blastocyst Morphogenesis. *Front Biosci*. 2001 ;6:D1000-7
8. Kerber ML, Cheney RE. Myosin-X: a MyTH-FERM Myosin at the Tips of Filopodia. *J Cell Sci* 2011; 124: 3733-3741; doi: 10.1242/jcs.023549
9. Fierro-González JC, White MD, Silva JC, Plachta N. Cadherin-Dependent Filopodia Control Preimplantation Embryo Compaction, *Nat Cell Biol*. 2013 Dec;15:1424-33. doi: 10.1038/ncb2875.
10. Samarage CR, White MD, Álvarez YD, Fierro-González JC, Henon Y, Jesudason EC. Cortical

- Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo. *Dev Cell*. 2015; 24; 34: 435 – 47. doi: 10.1016/j.devcel.2015.07.004.
11. Maître JL, Niwayama R, Turlier H, Nédélec F, Hiiragi T. Pulsatile Cell-Autonomous Contractility Drives Compaction in the Mouse Embryo. *Nat Cell Biol*. 2015; 17: 849 – 55. doi: 10.1038/ncb3185.
 12. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and Molecular Regulation of the Mouse Blastocyst. *Dev Dyn*. 2006; 235: 2301 – 14.
 13. Anani S, Bhat S, Honma-Yamanaka N, Krawchuk D, Yamanaka Y. Initiation of Hippo Signaling is Linked to Polarity Rather Than to Cell Position in the Pre-implantation Mouse Embryo. *Development*. 2014; 141: 2813 – 24. doi: 10.1242/dev.107276.
 14. Korotkevich E, Niwayama R, Courtois A, et al. The Apical Domain Is Required and Sufficient for the First Lineage Segregation in the Mouse Embryo. *Cell*, 2017; 40: 235 – 247.
 15. Watanabe T, Biggins JT, Tannan NB, Srinivas S. Limited Predictive Value of Blastomer Cleavage Angle in Trophododerm and Inner Cell Mass Specification. *Development*. 2014; 141: 2279 – 2288, doi: 10.1242/dev.103267
 16. Tarkowski AK, Wróblewska J. Development of Blastomeres of Mouse Eggs Isolated at the 4- and 8-Cell Stage. *J Embryol Exp Morphol*. 1967; 18: 155 – 80.
 17. Johnson MH, Ziomek CA. Induction of Polarity in Mouse 8-Cell Blastomeres: Specificity, Geometry, and Stability. *J Cell Biol*. 1981; 91: 303 – 8.
 18. Wu G, Gentile L, Fuchikami T, Sutter J, Psathaki K. Initiation of Trophectoderm Lineage Specification in Mouse Embryos is Independent of Cdx2. *Development*. 2010; 137: 4159 – 4169. doi: 10.1242/dev.056630
 19. Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K. Polarity-Dependent Distribution of Angiomotin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos, *Curr Biol*. 2013; 23: 1181 – 94. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.014.
 20. Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage Specification in the Mouse Preimplantation Embryo. *Development*. 2016; 143: 1063 – 74. doi: 10.1242/dev.128314
 21. Cao Z, Carey TS, Ganguly A, Wilson CA, Paul S, Knott JG. Transcription factor AP-2 γ Induces Early Cdx2 Expression and Represses HIPPO signaling to Specify the Trophectoderm Lineage. *Development*. 2015; 142: 1606 – 15. doi: 10.1242/dev.120238.
 22. Alarcon VB. Cell polarity regulator PARD6B is Essential for Trophectoderm Formation in the Preimplantation Mouse Embryo. *Biol Reprod*. 2010; 83: 347 – 58. doi: 10.1095/biolreprod.110.084400.
 23. Menchero S, Sainz de Aja J, Manzanares M. Our First Choice: Cellular and Genetic Underpinnings of Trophectoderm Identity and Differentiation in the Mammalian Embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2018; 128: 59 – 80. doi: 10.1016/bs.ctdb.2017.10.009.
 24. Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK. Distinct Sequential Cell Behaviours Direct Primitive Endoderm Formation in the Mouse Blastocyst. *Development*. 2008; 135: 3081 – 91. doi: 10.1242/dev.021519.
 25. Bessonnard S, De Mot L, Gonze D, et al. Gata6, Nanog and Erk Signaling Control Cell Fate in the Inner Cell Mass Through a Tristable Regulatory Network. *Development*. 2014; 141: 3637 – 48. doi: 10.1242/dev.109678.
 26. Bassalart C, Valverde-Estrella L, Chazaud C. Primitive Endoderm Differentiation: From Specification to Epithelialization. *Curr Top Dev Biol*. 2018; 128: 81 – 104.
 27. Frankenberg S, Gerbe F, Bessonnard S, Belville C, Pouchin P. Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and

- RTK Signaling. *Dev Cell.* 2011; 21: 1005 – 13. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.019.
28. Wicklow E, Blij S, Frum T, Hirate Y, Lang RA. HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass where it Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst. 2014 *PLoS Genet.* 2014;10:e1004618. doi: 10.1371/journal.pgen.1004618.
29. Frum T, Halbisen MA, Wang C, Amiri H, Robson P, Ralston A. Oct4 cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst, *Dev Cell.* 2013; 25: 610 – 22. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.004.
30. Artus J, Kang M, Cohen-Tannoudji M, Hadjantonakis AK. PDGF Signaling is Required for Primitive Endoderm Cell Survival in the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst. *Stem Cells.* 2013; 31: 1932 – 41. doi: 10.1002/stem.1442
31. Xenopoulos P, Kang M, Puliafito A, Di Talia S, Hadjantonakis AK. Heterogeneities in Nanog Expression Drive Stable Commitment to Pluripotency in the Mouse Blastocyst. *Cell Rep.* 2015; 10: 1508 – 1520.
32. Gerbe F, Cox B, Rossant J, Chazaud C. Dynamic Expression of Lrp2 Pathway Members Reveals Progressive Epithelial Differentiation of Primitive Endoderm in Mouse Blastocyst. *Dev Biol.* 2008; 313: 594 – 602.
33. Saiz N, Grabarek JB, Sabherwal N, Papalopulu N, Plusa B, Atypical Protein kinase C Couples Cell Sorting with Primitive Endoderm Maturation in the Mouse Blastocyst, *Development.* 2013; 140: 4311 – 22. doi: 10.1242/dev.093922.
34. Mutluay D, Öner H. Farelerde Preimplantasyon Döneminde Trofoektoderm ve İç Hücre Kütlelerinin Oluşumu. *MAKÜ Sağ.Bil. Enst. Derg.* 2015; 3: 1 – 9.
35. Kang M, Garg V, Hadjantonakis AK. Lineage Establishment and Progression Within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2. *Dev Cell.* 2017; 41: 496 – 510.