

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné a vývojové biologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kamila Chramostová**

Asymetrická segregace buněčných determinantů v rámci regulačně se  
vyvíjejících embryí

Asymmetric segregation of cell determinants in embryos with regulatory  
development

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Ing. RNDr. Vladimír Krylov, PhD.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 8. 2015

Kamila Chramostová

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi PhD. za odborné konzultace, cenné rady a vstřícný přístup.

## Abstrakt

Asymetrická segregace buněčných determinantů v časném embryonálním vývoji určuje úlohu buněk. U *C. Elegans* jsou v časném vývoji odděleny somatické a zárodečné buňky. Na základě prvních pěti asymetrických dělení je vytvořeno šest zakladatelských buněk: AB, MS, C, E, D, P4. Na této specifikaci se podílí par geny a geny zodpovědné za specifikaci blastomer. Do P4 buněk jsou segregovány P granule, které jsou odpovědné za určení germinální linie. Rod *Xenopus*, jako zástupce obojživelníků, kteří se řadí do skupiny s regulačním vývojem, vykazuje prvky mozaikového vývoje podobně jako *C. Elegans*. Maternální RNA zárodečné plasmu specifikují germinální linii buněk již v oocytu. Tyto RNA jsou transportované dvěma odlišnými drahami. METRO dráha využívá k transportu RNA mitochondriální obal a je specifická pro Xcat-2, Xpat, Xlsirt a Xdazl. Druhá dráha, Vg1, je určena pro transport Vg1 a VegT. Tyto RNA se podílí na specifikaci mesodermu a endodermu. Savci taktéž vykazují znaky mozaikového vývoje, i když jejich časná embryogeneze je regulačního typu. U myšičího embrya v 8-buněčném stádiu dochází ke kompaktaci zvýšenou expresí kadherinů. Poté jsou buňky embrya polarizovány. Z polarizovaných vnitřních buněk vzniká ICM. Naopak z nepolarizovaných vnějších buněk TE. Specifickým faktorem pro TE je Cdx2, pro ICM Oct4. K potlačení těchto faktorů v buňkách, kde nemají být aktivní, může docházet vzájemnou reprimací mezi těmito faktory. Další model pracuje s Brg1, který se spolu s Cdx2 váže do ARE Oct4. Tímto mechanismem dochází k umlčení transkripce Oct4 v TE.

**Klíčová slova:** asymetrická segregace, buněčné determinanty, *C. Elegans*, *Xenopus*, zárodečná plasma, myšičí embryo, Cdx2, trofoektoderm, embryoblast

## **Abstract**

Asymmetric segregation of cell determinants specifies the cell fates in early embryonic development. In *C. Elegans* somatic and germ cells are separated in early development. On the basis of the first five asymmetric divisions AB, MS, C, E, D, P4 are found. In this specification, par genes and genes responsible for the specification of blastomeres are involved. P granules are segregated to P4 cells. *Xenopus* as a representative of amphibians, belonging to a group with regulative embryogenesis, exhibit features of mosaic development like *C. Elegans*. Maternal RNAs in germ plasma determine germ cells already in oocyte. These RNAs are transported through two distinct pathways. METRO pathway is used for a transportation of mitochondrial cloud RNA. It is specific for Xcat-2, Xpat, Xlirt, Xdazl. Vg1 and VegT RNAs are involved in the second pathway called Vg1. This RNA contributes to the specification of mesoderm and endoderm. Although mammals reveal regulative development they also exhibit some features of the mosaic embryos. As an example, in the mouse embryo, overexpressing cadherin leads to compaction at the 8-cell stage. Then the cells of embryo are polarized. Polarized internal cells give rise to ICM. Conversely, the outer nonpolarized cells give rise to TE. Specific factor for TE is Cdx2, for ICM is Oct4. To suppress these factors in cells which are not to be active, it may cause mutual repression between these factors. Another model works with Brg1, which together with Cdx2 binds ARE Oct4. This mechanism leads to transcriptional silencing of Oct4 in TE.

**Key words:** asymmetric segregation, cell determinants, *C. Elegans*, *Xenopus*, germplasm, mouse embryo, Cdx2, trophoectoderm, embryoblast

## Obsah

Úvod .....	1
<b>1. <i>Caenorhabditis elegans</i></b> .....	<b>2</b>
1.1. Asymetrické dělení .....	2
1.2. P granule .....	3
<b>2. Obojživelníci</b> .....	<b>5</b>
2.1. Asymetrická segregace RNA v rámci zárodečné plazmy .....	5
2.1.1 RNA zárodečné plazmy transportované METRO dráhou .....	6
2.1.2 RNA transportované Vg1 dráhou .....	8
<b>3. Ustanovení linie vnitřní buněčné masy (ICM) a trofoektodermu (TE) v rámci myšího zárodku</b> .....	<b>10</b>
3.1. Kompaktace a polarizace časného embrya .....	10
3.1.2. Hippo signalizace .....	11
3.2. Přehled hlavních transkripčních faktorů ICM a TE .....	12
3.3. Síť transkripčních faktorů ovlivňující formaci ICM a TE .....	13
<b>Závěr</b> .....	<b>16</b>
<b>Použitá literatura</b> .....	<b>17</b>

## Úvod

Osud buněk v časném embryonálním vývoji je determinován různými způsoby. U živočichů s mozaikovým vývojem, kam řadíme např. půdní hlístici *Caenorhabditis elegans*, je závislý na uložených buněčných determinantech. Každá buňka má předem danou pozici v embryu. Na základě asymetrického dělení dochází k vytvoření zakladatelských somatických buněk a buněk zárodečné linie.

Cílem této práce je shrnout současné poznatky o asymetrické segregaci buněčných determinantů u embryí živočichů, kteří se vyvíjejí regulačně, tj. na základě mezibuněčné indukce. Ukazuje se totiž, že mechanismy, které jsou typické pro živočichy s mozaikovým vývojem, se objevují i u regulačně se vyvíjejících zárodků.

V rámci své bakalářské práce jsem se zaměřila na dvě významné skupiny živočichů a to obojživelníky a savce. Modelovým rodem obojživelníku je rod *Xenopus*. Z pohledu časného embryonálního vývoje se jedná o typické zástupce živočichů s regulačním vývojem. Přesto u těchto žab nacházíme prvky typické pro mozaikový vývoj. Zárodečné buňky jsou determinovány v oocytu pomocí maternálních RNA a taktéž formace mesodermu a endodermu je závislá na maternálních determinantech.

Savci také patří do skupiny s regulačním vývojem. V časném zárodku jsou blastomery rovnocenné. První diferenciační událost, tj. ustanovení dvou buněčných linií -vnitřní buněčné masy a trofoektodermu je ale řízena na základě asymetrické segregace, a to hlavně Cdx2.

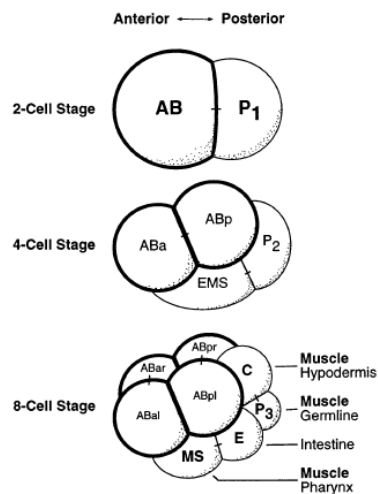
# 1. *Caenorhabditis Elegans*

Ve své bakalářské práci se zaměřuji na molekulární mechanismy mozaikového vývoje u regulačně se vyvíjejících embryí. V této kapitole bych zmínila *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), jako modelový organismus mozaikového vývoje. Ráda bych na tomto modelu vysvětlila podstatu tohoto vývoje.

*C. Elegans* je příkladem živočicha s tzv. mozaikovým vývojem. Tento typ vývoje je závislý na uložených buněčných determinantech s tím, že každá buňka v embryu se diferencuje podle přesně daného plánu. Jakmile dojde ke zničení určité buňky, dochází k vývoji defektního organismu.

## 1.1. Asymetrické dělení

V rámci časného embryonálního vývoje *C. elegans* je na základě prvních pěti asymetrických dělení vytvořeno šest různých typů zakladatelských buněk: AB, MS, E, C, D, P4. Každá z těchto blastomer produkuje klon buněk s odlišným chováním a osudem. Po oplození se vajíčko rozdělí na větší, anteriorní část AB a menší posteriorní část P1. P1 poté podstupuje další asymetrické dělení, za vzniku buněk MS, E a P2. Pomocí dvou asymetrických dělení buňky P2 dojde ke vzniku blastomer P4, prekursorů zárodečné linie (viz obr. 1) (Sulston et al. 1983).



**Obr. 1: Asymetrické dělení u *C. Elegans*:** Prvním asymetrickým dělením dochází k rozdělení na AB buňku a P1 buňku. Dalším dělením se buňka AB dělí na další AB somatické buňky. P1 buňka se dělí na EMS buňku a P2. V průběhu dalších dělení vznikají prekursori zárodečné linie P3 a buňky E a C. Převzato z (Draper et al. 1996)



V časně embryogenezi *C. Elegans* hrají důležitou roli dvě skupiny maternálních genů. První skupinu tvoří geny, které jsou zodpovědné za buněčný osud blastomer. Do druhé skupiny patří par geny, které určují antero-posteriorní polaritu.

Cytoplazma AB a P1 buněk obsahuje geny první skupiny, které jim udávají diferenciační potenciál. V anteriorních blastomerách AB se nachází proteiny GLP-1 a MEX-3 (Evans et al. 1994; Draper et al. 1996). Úkolem MEX-3 proteinu je určovat rozdíl mezi AB a P1 blastomerami ve vývoji tělního svalstva a to tím, že kontroluje expresi více mRNA v časném vývoji embrya. U AB blastomer je potlačována exprese mRNA, které specifikují C blastomery. Tento protein obsahuje RNA-vázací motiv (Draper et al. 1996). GLP-1 je integrální membránový receptor anteriorních buněk. Tento receptor specifikuje osud buněk v anteriorní části embrya přes induktivní interakce mezi anteriorní a posteriorní blastomerou. V blastomerách P1 pak MEX-1, PIE-1 a SKN-1 (Bowerman et al. 1993; Guedes and Priess 1997). SKN-1, který se nachází v EMS, je zodpovědný za vznik střevních buněk a hltanu. Skn-1 gen není závislý na buněčných interakcích s ostatními buňkami (Bowerman et al. 1992). MEX-1 a PIE-1 jsou součástí P granulí. PIE-1 se nachází v cytoplasmě i jádře buňky. MEX-1 je pouze součástí jádra. Tento protein je zodpovědný za omezení aktivity PIE-1 pouze do zárodečných blastomer v časném embryonálním vývoji *C. Elegans* (Guedes and Priess 1997).

Díky par genům dochází k odlišné genové expresi v AB a P1 buňkách. Taktéž jsou odpovědné za odlišnou velikost blastomer AB a P1, s tím že P1 je menší než AB. Další funkcí je řízení orientace druhého buněčného dělení. Do anteriorní části 1 -buněčného embrya jsou lokalizovány proteiny s PDZ doménou. PDZ doména váže krátké C-konce jiných proteinů (Harris and Lim 2001). Do této skupiny patří PAR-3, PAR-6 a aPKC (Etemad-Moghadam et al. 1995; Hung and Kemphues 1999). Do posteriorní části zygoty je lokalizovaný protein s doménou zinkových prstů, PAR-2 (Boyd et al. 1996). PAR-1 obsahuje serin-threoninovou kinázu a také se nachází v posteriorní části 1 -buněčného embrya. PAR-1 je důležitý v udržování asymetrického dělení. U embryí deficientních na PAR-1 docházelo k narušení asymetrie ve velikosti buněk, času dělení a osud buněk byl změněn (Guo and Kemphues 1995).

## **1.2. P granule**

V zárodečných buňkách se nacházejí ribonukleoproteinové partikule (P granule), které byly před oplozením transportovány do posteriorní části zygoty (Strome & Wood, 1983).

V době oplození jsou P granule malé, početné a nachází se roztroušené přes celou cytoplasmu. K jejich shlukování dochází během pseudorýhování a migrace prvojádra. Při migraci maternálního prvojádra k prvojádru spermie dochází k vytvoření rýhy. Tato rýha poté zmizí. Tento proces se nazývá pseudorýhování. Teprve poté dochází k splynutí prvojader. Když se prvojádra setkají, P granule jsou lokalizovány na okraji zygoty v posteriorní části. V prvním rýhování dochází k jejich segregaci do P1 buněk (Strome and Wood 1983). Každé další nerovnoměrné dělení dává vznik větší somatické a menší P buňce, do které jsou segregovány P granule. Poté se P granule postupně dostávají do P1, P2, P3 a nakonec do P4, které jsou prekurzorem zárodečné linie (Strome and Wood 1982).

Segregace P granulí není vždy kompletní. Může se stát, že P granule zůstanou v somatické sesterské buňce P buňky. V cytoplasmatické buňce dochází k jejich degradaci. K tomuhle jen zřídka dochází v pozdějších stádiích embrya (Strome and Wood 1983).

Rozdělování P granulí je závislé na přítomnosti aktinových filament. Jejich cílená inhibice měla za následek absenci pseudorýhování a membránové kontrakce. Místem setkání obou prvojader nebyla posteriorní oblast, ale střed zygot, čímž v rámci první rýhy došlo k porušení asymetrie (Strome and Wood 1983).

## 2. Obojživelníci

Obojživelníci jsou na základě způsobu embryogeneze řazeni do kategorie živočichů s regulačním vývojem. Toto zařazení není nejvýstižnější. U obojživelníků se ukazují i prvky typické pro živočichy s mozaikovým vývojem. Stejně jako u *C. Elegans* i u *Xenopa* jsou zárodečné buňky odděleny již v časném embryonálním vývoji. Ukazuje se, že zárodečné buňky jsou determinovány již v oocytu pomocí mRNA zárodečné plazmy. Formace mesodermu a endodermu je také závislá na maternálních mRNA. Modelem obojživelníků ve vývojové biologii je rod *Xenopus*, kterým se zabývám i v této kapitole.

### 2.1. Asymetrická segregace RNA v rámci zárodečné plazmy

Zárodečné buňky jsou u obojživelníků odděleny již v časném embryonálním vývoji. Determinace zárodečných buněk je závislá na přítomnosti zárodečné plazmy. Zárodečná plasma je speciální částí cytoplazmy oocytu, jenž obsahuje determinanty budoucí zárodečné linie. Zárodečná plasma obsahuje zárodečné granule (u *C. Elegans* P granule), mitochondrie a endoplazmatické retikulum (Billett and Adam 1976). Zárodečné granule jsou uložštěm důležitých faktorů pro formaci zárodečných buněk. Jejich funkcí je zamezení předčasnému vyčerpání molekul, které jsou důležité v rámci embryonálního vývoje. Tyto RNA se nachází v zárodečných granulích od 4 -buněčného stádia do blastuly (Kashikawa et al. 2001). V zárodečných granulích se nachází Xcat-2, Xpat, DEATHSouth RNA. Xdazl a Fatvg RNA jsou lokalizovány v zárodečné plasmě mezi granulemi (Kloc et al. 2002). U obojživelníku ji nazýváme mitochondriální oblak.

K základní prostorové organizaci dochází v časném vývoji ve vegetální části oocytu. Tato část embrya je bohatá na cytoskeletární komponenty a RNA, které jsou sem lokalizované. RNA, které se tady nachází, specifikuji zárodečné buňky a podílejí se na ustanovení mezodermu a endodermu. Tyto RNA můžou být lokalizované do vegetálního kortexu pomocí dvou drah: METRO (časná dráha) a Vg1 dráha (pozdní dráha). Tato lokalizace probíhá během oogeneze.

METRO (messenger transport organizing center) je část mitochondriálního oblaku, která zajišťuje transport a ukotvení různých RNA do vegetálního kortexu. Pomocí této dráhy se transportují tyto RNA-Xdazl, Xcat2, Xpat, Xlsirt a Xwnt11. K jejich transportu

dochází už v oocytu ve stádiu I. Nejdříve dochází k pohybu transkriptu z GV (germinal vesicle) difúzí k mitochondriálnímu oblaku. V následujícím kroku jsou transkripty rozříděny do pozic pro ně unikátních uvnitř METRO. Xcat-2 je detekovatelná jako kruh kolem vnějšku mitochondriálního oblaku. Xwnt11 nalezneme v centru a Xlirt podél povrchu tohoto útvaru. Poté dochází k samotnému transportu do kortexu (Kloc and Etkin 1995).

Druhou cestou lokalizace RNA je Vg1 dráha. V oocytu ve stádiu I-II je tato RNA roztroušená po celé cytoplasmě. Ve stádiu I-II je oocyt previtelogenický. Má velké viditelné jádro a mitochondrie. Později se stává neprůhledný (Dumont 1972). Až ve stádiu III je pomocí této dráhy nejdříve směřovaná ke konci vegetálního kortexu do pozice, kde se nachází METRO. V tomto stádiu oocytu dochází k syntéze pigmentu a akumulaci žloutku (Dumont 1972). Poté transkripty asociují s vegetálním kortexem. Dále dochází k jejich rozšíření podél vnitřní kortikální vrstvy až k marginální zóně (Kloc and Etkin 1995). Tuto pozdní dráhu využívá Vg1 a VegT.

### **2.1.1 RNA zárodečné plasmy transportované METRO dráhou**

#### **Xpat**

Xpat protein má důležitou funkci v lokalizaci, formaci a udržení zárodeční plasmy. Dále řídí počáteční formaci mitochondriálního oblaku. V pozdější fázi oogeneze udržuje celistvost a pozici ostrůvků zárodečné plasmy (Machado et al. 2005).

K největší expresi Xpat dochází v neoplozeném oocytu. Po oplození pak dále k transkripci nedochází a v rámci časného embryonálního vývoje jsou využívány pouze maternální zásoby Xpat RNA. Xpat mRNA po celou dobu oogeneze zůstává v mitochondriálním oblaku, který má ve větších oocytech tvar zploštělého disku. Tento disk přetrvává i v časném rýhování, ale začíná být více granulární. Buňky, v nichž dochází k expresi Xpat jsou během gastrulace více internalizovány. V této pozici přetrvávají i v průběhu neurulace. Během 36. stádia se buňky pohybují laterálně, poté se ve 38. stádiu pohybují dorsálně. Až do stádia 40 se Xpat nachází v dorsálním mesodermu. V tomto stádiu přechází primordiální zárodečné buňky do dorsálního mesentéria. V tomto období exprese Xpat ustává (Hudson and Woodland 1998).

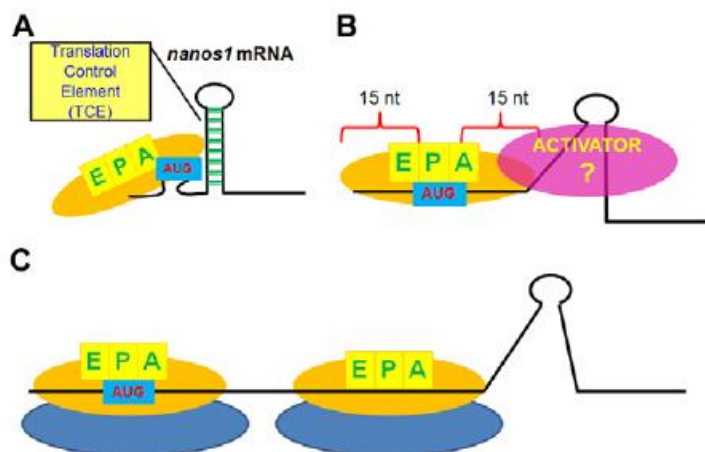
## Xcat-2

Xcat-2 je součástí zárodečné plasmy s tím, že se podílí na její determinaci (MacArthur et al. 1999). Xcat-2 mRNA se nachází v mitochondriálním oblaku, do kterého je transportována ihned po jeho vytvoření. V časném stádiu oocyty I je Xcat-2 RNA transkribována a distribuována rovnoměrně v cytoplazmě. Aby došlo k lokalizaci do mitochondriálního oblaku je zapotřebí 3'-UTR (untranslated region), a to proximálních 250 nt. V této oblasti se nachází lokalizační signál do mitochondriálního oblaku (Zhou and King 1996).

Ve 4 -buněčném stádiu je RNA koncentrována uvnitř 80-ti malých ostrůvků ve vegetální části embrya. V pozdějších stádiích se Xcat-2 RNA nachází ve větších subbuněčných ostrovech, které se nacházejí pouze ve čtyřech buňkách. Tento počet odpovídá počtu budoucích primordiálních zárodečných buněk (MacArthur et al. 1999).

Xcat-2 RNA je translačně reprimována během oogeneze. Hladina RNA je konstantní až do gastruly. V tomto stádiu se zárodečná plazma začíná pohybovat z periferie do perinukleární části cytoplasmy každé buňky embrya. Během tohoto stádia se hladina RNA začíná snižovat a po gastrulaci již není detekovatelná (MacArthur et al. 1999).

K represi translace Xcat-2 mRNA během oogeneze dochází zabráněním skenování ribosomu pomocí TCE (transcription control element). TCE tvoří sekundární strukturu RNA. Tato struktura se nachází za start kodonem AUG. Jedná se o prvních 73 nt v Xcat-2 ORF (open reading frame). Díky této struktuře nedochází k tvorbě iniciačního komplexu. V této translační represi není zahrnut represor. K aktivaci translace Vg1 mRNA dochází brzy po oplození pomocí aktivátoru, který rozruší sekundární strukturu (viz obr. 2) (Luo et al. 2011).



**Obr. 2: Model pro translační represi Xcat-2:** (A) Sekundární struktura zabraňuje skenování ribozomu, čímž blokuje translaci v oocytu. (B) Aktivátor po oplození rozruší sekundární strukturu. (C) Tímto rozrušením dochází k translaci Xcat-2 mRNA. Převzato z (Luo et al. 2011).

## 1.2 RNA transportované Vg1 dráhou

Mezi RNA transportované Vg1 dráhou patří ty, jenž se podílejí na formování mesodermu a endodermu. Nejsou zde zahrnuty RNA, které se podílejí na ustanovení zárodečné linie.

### VegT

VegT je maternální transkripční faktor. Jeho mRNA se v oocytu během oogeneze nachází ve vegetální části oocytu. (Zhang and King 1996). Díky maternálnímu VegT dochází k diferenciaci embryonálního endodermu. U deficientních embryí dochází ke změně osudu buněk ve vegetální a ekvatoriální části embrya. Formování mesodermu je posunuto do vegetální části. K formaci endodermu dochází v obou částech (Zhang et al. 1998).

Hladina maternální mRNA VegT v embryonálním vývoji je konstantní až do pozdní blastuly. Zygotická exprese VegT je zahájena až od tohoto stádia. Zpočátku v pozdní blastule a časně gastrule je zygotická exprese nejvíce soustředěna na dorsální straně v místě budoucího dorsálního rtu blastoporu. Postupně dochází k přesunu exprese do ventrálně-laterální části na posteriorním konci embrya. Exprese toho transkripčního faktoru je zřejmě úplně vyloučena z oblasti chordy (Zhang and King 1996).

Maternální exprese VegT je detekovatelná až do 11. stádia. Exprese maternálního VegT je nejvíce pozorovatelná v endodermu. Zatímco exprese zygotického VegT se nejvíce nachází v mesodermu. Exprese zygotického VegT je regulována růstovými faktory mesodermu např. activinem a bFGF (basic fibroblast growth factor) (Stennard et al. 1999).

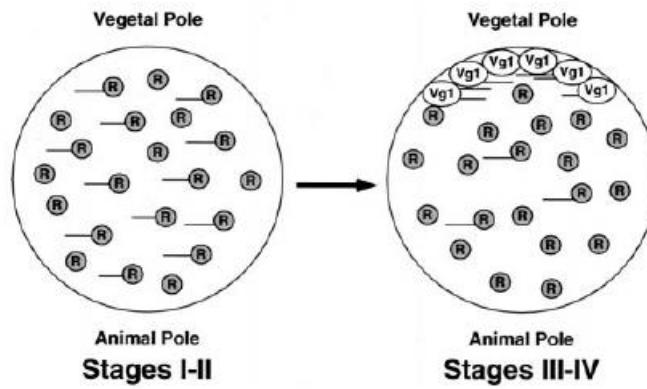
## **Vg1**

Vg1 je členem TGF $\beta$  (transforming growth factor) rodiny. Vg1 exprese je důležitá pro normální vývoj endodermu a také pro vývoj dorsálního mesodermu. Dále indukuje dorsální osu embrya (Thomsen and Melton 1993). Embryo deficientní pro Vg1 ztrácí schopnost indukovat dorsální mesoderm. Tato ztráta také působí negativně na formaci endodermu (Joseph and Melton 1998).

Po oplození dochází k poklesu Vg1 mRNA a proteinu do počátku neurulace. V tomto období nedochází k zygotické transkripci Vg1 (Birsoy et al. 2006).

Embrya, ve kterých nedochází k expresi Vg1 se až do gastrulace vyvíjí normálně. V gastrulaci se u nich objevuje několik abnormalit. Formace blastoporu je opožděna a blastopor zůstává otevřen v pozdní gastrule. Všechny tři zárodečné vrstvy jsou ustanoveny, ale v těchto embryích může docházet k absenci chordy a fúzi somitů (Birsoy et al. 2006).

Vg1 mRNA je během I. a II. stádia oocyty translačně reprimovaná. Tato represe probíhá v celém oocyty. Ve III. - IV. stádiu oocyty jsou Vg1 transkripty pomocí transportního komplexu přemístěny do vegetálního kortexu. V této části oocyty dochází k ukotvení transkriptů k cytoskeletu. Tímto ukotvením dochází k odstranění represoru a začíná docházet k syntéze Vg1 proteinu (viz obr. 3) (Wilhelm et al. 2000).



**Obr. 3: Model pro kontrolu lokalizace a translace Vg1 mRNA.** Během I. -II. stádia oocyty se Vg1 mRNA nachází v komplexu s represorem (R). Tento komplex je roztroušený přes celý oocyt. Ve III. -IV. stádiu se Vg1 mRNA přesouvá do vegetálního kortexu. Zde dochází k odstranění represoru a začíná docházet k syntéze Vg1 proteinu. V ostatních částech oocyty je mRNA stále v komplexu s represorem. Převzato z (Wilhelm et al. 2000)



### 3. Ustanovení linie vnitřní buněčné masy (ICM) a trofoektodermu (TE) v rámci myšího zárodku

Myš, potažmo savci patří do skupiny živočichů s regulačním vývojem. Tento typ vývoje se nachází u všech obratlovců a také u žahavců. Typickým znakem je rovnocennost blastomer v časném zárodku z pohledu jejich vývojové kompetence. Tento stav trvá do 8-buněčného stádia, ve kterém dochází ke kompaktaci embrya na základě zvýšené exprese kadherinů a také k ustanovení dvou klíčových buněčných linií – ICM (inner cell mass) a TE (trofoektoderm) (Tarkowski & Wróblewska, 1967).

Vznik trofoektodermu, ze kterého se později vyvíjí embryonální část placenty, představuje primární diferenciační událost v rámci časného vývoje u savců. Embryoblast dává vzniknout vlastnímu embryu a extraembryonálním obalům.

#### 3.1. Kompaktace a polarizace časného embrya

Jak již bylo uvedeno, kompaktace zárodku je spojená s expresí kadherinů, která má za následek zvýšení mezibuněčného kontaktu (buněčné adheze). Zároveň v tomto období dochází k ustanovení apiko-bazální polarity, a to v každé z osmi buněk časného zárodku. Buňky ICM jsou vnitřní, tudíž nejsou polarizované. Naopak buňky, z nichž vzniká TE jsou polarizované (Johnson & Ziomek, 1981). Buňky TE vykazují podobnost s epiteliálními buňkami. Apikální strana je ohraničena tight junctions. Na bazolaterální straně se nachází adherent junctions (Fleming, 2000). Proteiny zodpovědné za tuto polaritu se asymetricky nachází buď v apikální nebo bazolaterální oblasti příslušné blastomery. V apikální části kompaktované moruly jsou přítomny dva PAR (partitioning defective) proteiny- PARD3, PARD6 a apikální protein kináza C (aPKC). Tyto proteiny dohromady tvoří komplex (Suzuki et al. 2001). Pard6 s aPKC se podílí na formaci tight junctions. Pard3 se ke komplexu připojuje, až když jsou tight junctions plně ustanovené. Tento protein funguje při udržení těchto spojů (Vinot et al. 2005). ParD3 a ParD6 jsou homology Par3 a Par6 proteinů u *C. Elegans* a *Drosophily*. V bazolaterální části se nachází EMK1 a E-kadherin. EMK 1 je serin/threoninová protein kináza. Podílí se na fosforylaci proteinů asociovaných s mikrotubuly, čímž může docházet k jejich disociaci od mikrotubulů (Drewes et al. 1997). EMK1 je homologní proteinu proteinu Par1 u *C. Elegans* a *Drosophilly*. Par6

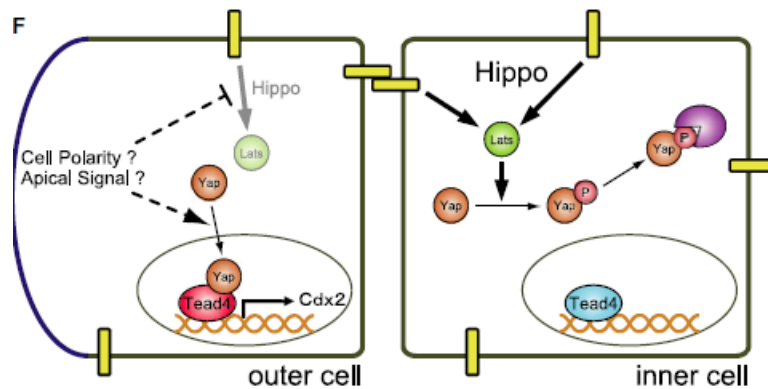
a EMK1 jsou nejprve roztroušené v celé buňce a až po kompaktaci dochází k jejich polarizaci (Plusa et al. 2005; Vinot et al. 2005).

### 3.1.2. Hippo signalizace

Úkolem Hippo signalizace je kontrola velikosti orgánu. Tato kontrola je zajištěna pomocí regulace buněčné proliferace a apoptózy. Jedná se o kinázovou kaskádu. Mts1/2 (orthologem u *Drosophilly* je Hippo) kináza a Sav1 společně fosforylují Lats1/2. Kináza Lats1/2 může fosforylovat koaktivátor YAP. Defosforylací YAP dochází k jeho přesunu do jádra.

Ustanovení vnitřních a vnějších buněk vede k odlišné Hippo signalizaci. Ve vnitřních buňkách dochází k fosforylaci Yapu. Yap je koaktivátorem transkripčního faktoru Tead4 (TEA domain family transcription factor 4). Tento transkripční faktor je zodpovědný za vznik trofoektodermu. K fosforylaci Yap dochází pomocí Lats. Fosforylací dochází k jeho transportu z jádra do cytoplasmy, čímž přestává fungovat jako transkripční faktor. Blastomery s neaktivním Tead4 dávají vznik vnitřní buněčné mase. Na druhou stranu ve vnějších blastomerách nedochází k fosforylaci koaktivátoru Yap, který tak zůstává v jádře a aktivuje transkripční faktor Tead4. Tead4 je klíčový pro expresi Cdx2, který je aktivní v buňkách trofoektodermu (Yagi et al. 2007; Nishioka et al. 2008; Nishioka et al. 2009).

Podstata diferenciální exprese Cdx2 s největší pravděpodobností spočívá v rozdílném množství buněčných kontaktů. Autoři článku zkoušeli, zda může buněčný kontakt regulovat Yap lokalizaci. Ukázalo se, že ve vnitřních buňkách se Yap nacházel pouze v cytoplasmě. Ve vnějších buňkách se Yap nacházel v jádře i v cytoplasmě. Toto podporuje tvrzení, že obvod buněčných kontaktů inhibuje jadernou lokalizaci Yap. Ukazuje se tedy, že obvod buněčných kontaktů je předpokladem pro správnou fosforylaci Yap, čímž nedochází k akumulaci v jádře vnitřních buněk. Vnitřní buňky jsou zcela obklopeny vnějšími buňkami. Zato vnější buňky mají exponované vnější povrchy. Tudíž buněčný kontakt může zabraňovat translokaci Yap do jádra ve vnitřních buňkách (viz obr. 4) (Nishioka et al. 2009).



**Obr. 4: Model lokalizace Yap závislý na stupni buněčných kontaktů:** Vnější buňky vykazují menší stupeň buněčných kontaktů a tak v nich dochází k akumulaci Yap v Jádře. Naopak vnitřní buňky s velkým počtem buněčných kontaktu vykazují fosforylaci Yap, a jeho lokalizaci v cytoplasmě. Převzato z (Nishioka et al. 2009).

### 3.2. Přehled hlavních transkripčních faktorů ICM a TE

#### Cdx2

Klíčovou roli ve specifikaci buněk trofoektodermu hraje transkripční faktor Cdx2, respektive polarizace jeho transkripční produktů. V pozdním 8 - buněčném stádiu je Cdx2 mRNA lokalizována apikálně (Skamagki et al. 2013). Za její lokalizaci je zodpovědný cis-aktinový element, který se obvykle nachází v 3'UTR oblasti, ale také může být i uvnitř ORF nebo v 3'UTR (Jambhekar & Derisi, 2007). V mRNA pro Cdx2 leží část cis elementu uvnitř ORF (posledních 499 nukleotidů) a část v 3'UTR oblasti (97 nukleotidů). Sekvence v 3'UTR oblasti je přímo odpovědná za lokalizaci Cdx2 mRNA a za její ukotvení v apikálním kortexu (Skamagki et al., 2013).

Lokalizace Cdx2 transkriptu závisí na aktino-mikrotubulární síti a na molekulárních motorech patřících do rodiny kinesinových proteinů (Skamagki et al., 2013). Cdx2 má také vliv na symetrické a asymetrické dělení. Buňky, které mají zvýšenou expresi Cdx2 ještě oproti vnitřním buňkám více podléhají symetrickému dělení a proto zaujímají pozice v trofoektodermu a buňky s menší expresí Cdx2 podstupují asymetrické dělení a tím se stávají součástí emryoblastu (Jedrusik et al., 2008).

## **Oct4**

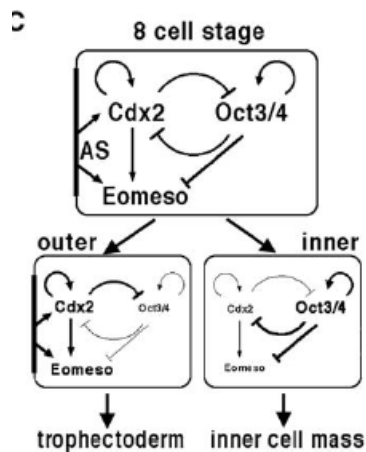
Dalším důležitým transkripčním faktorem v časném vývoji myšího embrya je Oct4 (také Oct3) (Schöler et al. 1990). Oct4 je kódován genem Pou5f1. Jedná se faktor z rodiny POU (Pit-Oct-Unc), které aktivují expresi jejich cílových genů pomocí vazby na ATGCAAAT sekvenci cílových genů. Skládají se z 3 domén: N-terminální doména, POU doména a C-terminální doména. POU doména obsahuje dvě dílčí domény, které jsou propojeny 17 aminokyselinami. Jejím prostřednictvím dochází k vazbě na DNA pomocí motivu helix-turn-helix (Wu and Schöler 2014).

Exprese toho faktoru je nejvíce intenzivní v blastocystě. Nachází se také v neoplozeném oocytu, ale zde je její intenzita velmi nízká. V blastocystě se výhradně nachází v ICM (Schöler et al. 1990).

### **3.3. Síť transkripčních faktorů ovlivňující formaci ICM a TE**

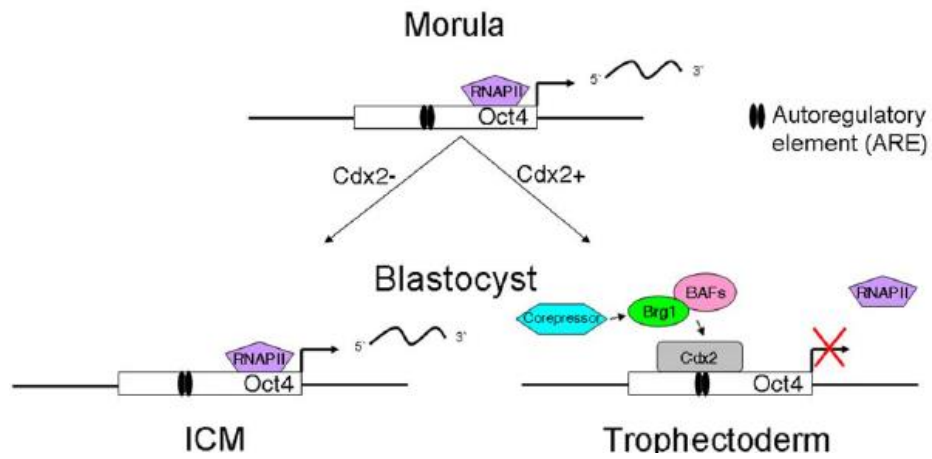
Specifickým faktorem pro TE je Cdx2, Gata3 a naopak v ICM najdeme Oct4 a Nanog. Díky interakci mezi těmito transkripčními faktory dochází k segregaci do dvou buněčných linií-ICM a TE. Cdx2 exprese je v 8 -buněčném stádiu embrya detekovatelná v rámci celého embrya. Stejně jako Cdx2 i Oct4 je detekovatelný ve všech blastomerách embrya. Ve stádiu pozdní moruly se exprese Cdx2 začíná nacházet pouze ve vnějších buňkách. V tomto stádiu se Oct4 ještě nachází ve všech blastomerách. Jeho segregace do vnitřních buněk embrya je kompletní až v blastocystě (Niwa et al. 2005).

Jedním z modelů ustanovení ICM a TE se zdá interakce mezi Cdx2 a Oct4. Ukazuje se, že Oct4 a Cdx2 formují komplex, kterým vzájemně reprimují jejich cílové geny. Cdx2 a Oct4 interagují mezi sebou a tím dochází k změně jejich lokalizace do transkripčně neaktivních míst v buněčném jádru. Dalším podmíněním se zdá apikální signál, který může stimulovat Cdx2 autoregulaci ve vnějších buňkách a tím reprimovat Oct3/4 (viz obr. 5) (Niwa et al. 2005).



**Obr. 5 Model popisující ustanovení ICM a TE buněčných linií v rámci časného embryonálního vývoje myši:** Ve vnějších buňkách, které později dávají vzniknout TE dochází k potlačení Oct4 zprostředkované Cdx2. Z těchto buněk vzniká TE. Naopak ve vnitřních buňkách dochází k expresi Oct3/4 a dochází tak ke vzniku ICM. Převzato z (Niwa et al. 2005).

Další model represe Oct4 v blastomerách trofoektodermu pracuje s Brg1 (Brahma related gene) (Wang et al. 2010). Cdx2 se na Oct4 váže do ARE (autoregulační element). ARE se nachází v promotoru Oct4 (Niwa et al. 2005). V embryu, které mělo knockdownované Brg1, docházelo k expresi Oct4 v trofoektodermu, přičemž nedošlo k žádným změnám v expresi Cdx2. Z tohoto vyplývá, že Brg1 je zodpovědný za represi Oct4 v TE (Wang et al. 2010). První událostí represe Oct4 je vazba transkripčních faktorů Brg1 a Cdx2 do ARE oblasti genu Oct4. Tato událost probíhá 24 hodin po segragaci Cdx2 do buněk budoucího trofoektodermu. Druhým bodem této represe je to, že buď Brg1 nebo Cdx2, usnadňuje remodelaci chromatinu a vazbu dalších korepresorů. Tímto procesem dochází k potlačení Oct4 transkripce v blastocystě (viz Obr. 6) (Wang et al. 2010).



**Obr. 6 Represe Oct4 v trofoektodermu zprostředkovaná Cdx2 a Brg1.** Model pro represi Oct4 v blastocystě. V trofoektodermu se transkripční faktory Cdx2 a Brg1 váží do autoregulačního elementu Oct4. Po tomto kroku dojde k vazbě dalších korepresorů a tím k umlčení transkripce Oct4. Převzato z (Wang et al. 2010).

## Závěr

V této práci byly na základě dostupné literatury shrnuty současné poznatky o asymetrické segregaci buněčných determinantů v rámci regulačně se vyvíjejících embryí. Ukazuje se, že principy mozaikového vývoje se objevují u bezobratlých i obratlovců.

Z této práce je patrné, že striktní rozdělení embryonálního vývoje na mozaikový a regulační není úplně přesné. Jak u *C. Elegans*, typického živočicha s mozaikovým vývojem, tak u obratlovců pozorujeme v rámci časně embryogeneze charakteristické znaky mozaikového vývoje. Jako příklad mohou sloužit PAR proteiny, které jsou klíčové pro polarizaci zárodku jak u *C. Elegans*, tak u savců. U myšího embrya polarizace slouží k vytvoření vnějších a vnitřních buněk embrya s odlišnými vývojovými preferencemi. U *C. Elegans* se ukazuje, že tato polarizace není důležitá pro specifikaci buněk, ale spíše pro první buněčné pohyby během gastrulace.

Dalším příkladem je oddělení zárodečné linie buněk v časném embryonálním vývoji. Stejně jako u *C. elegans* i u rodu *Xenopus* jsou pomocí asymetrické segregace zárodečných granulí (P granule u *C. elegans*) odděleny budoucí pohlavní buňky.

## Seznam použité literatury

- Billett FS, Adam E (1976) The structure of the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J Embryol Exp Morphol* 36:697–710.
- Birsoy B, Kofron M, Schaible K, et al (2006) Vg 1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development* 133:15–20. doi: 10.1242/dev.02144
- Bowerman B, Draper BW, Mello CC, Priess JR (1993) The maternal gene *skn-1* encodes a protein that is distributed unequally in early *C. elegans* embryos. *Cell* 74:443–452. doi: 10.1016/0092-8674(93)80046-H
- Bowerman B, Eaton B a, Priess JR (1992) *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 68:1061–1075. doi: 10.1016/0092-8674(92)90078-Q
- Boyd L, Guo S, Levitan D, et al (1996) PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* 122:3075–3084.
- Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of morphology* 136:153-179
- Draper BW, Mello CC, Bowerman B, et al (1996) MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* 87:205–216. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81339-2
- Drewes G, Ebneith a, Preuss U, et al (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297–308. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80208-1
- Etemad-Moghadam B, Guo S, Kempfues KJ (1995) Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* 83:743–752. doi: 10.1016/0092-8674(95)90187-6
- Evans TC, Crittenden SL, Kodoyianni V, Kimble J (1994) Translational control of maternal *glp-1* mRNA establishes an asymmetry in the *C. elegans* embryo. *Cell* 77:183–194. doi: 10.1016/0092-8674(94)90311-5
- Fleming, T.P., Ghassemifar, M.R. and Sheth, B. (2000) Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18, (2), 185-193. doi:10.1055/s-2000-12557.



- Guedes S, Priess JR (1997) The *C. elegans* MEX-1 protein is present in germline blastomeres and is a P granule component. *Development* 124:731–739.
- Guo S, Kemphues KJ (1995) *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611–620. doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9
- Harris BZ, Lim W a (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114:3219–3231.
- Hudson C, Woodland HR (1998) *Xpat*, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 73:159–168. doi: 10.1016/S0925-4773(98)00047-1
- Hung TJ, Kemphues KJ (1999) PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 126:127–135.
- Jambhekar A, Derisi JL (2007) Cis -acting determinants of asymmetric , cytoplasmic RNA transport Cis -acting determinants of asymmetric , cytoplasmic RNA transport. 625–642. doi: 10.1261/rna.262607.transcripts
- Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, et al (2008) Role of *Cdx2* and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev* 22:2692–2706. doi: 10.1101/gad.486108
- Johnson MH, Ziomek CA (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24:71-80
- Joseph EM, Melton D a (1998) Mutant *Vg1* ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* 125:2677–2685.
- Kashikawa M, Amikura R, Kobayashi S (2001) Mitochondrial small ribosomal RNA is a component of germinal granules in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 101:71–77. doi: 10.1016/S0925-4773(00)00553-0
- Kloc M, Dougherty MT, Bilinski S, et al (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol* 241:79–93. doi: 10.1006/dbio.2001.0488
- Kloc M, Etkin LD (1995) Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* 121:287–297.

- Luo X, Nerlick S, An W, King M Lou (2011) *Xenopus* germline nanos1 is translationally repressed by a novel structure-based mechanism. *Development* 138:589–598. doi: 10.1242/dev.056705
- MacArthur H, Bubunenko M, Houston DW, King ML (1999) Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev* 84:75–88. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00075-1
- Machado RJ, Moore W, Hames R, et al (2005) *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and positioning. *Dev Biol* 287:289–300. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.044
- Nishioka N, Inoue KI, Adachi K, et al (2009) The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Dev Cell* 16:398–410. doi: 10.1016/j.devcel.2009.02.003
- Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, et al (2008) Tead4 is required for specification of trophoctoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125:270–83. doi: 10.1016/j.mod.2007.11.002
- Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell* 123:917–929. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.040
- Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, et al (2005) Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* 118:505–515. doi: 10.1242/jcs.01666
- Schöler HR, Dressler GR, Balling R, et al (1990) Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9:2185–2195. doi: 10.1016/0168-9525(90)90242-X
- Skamagki M, Wicher KB, Jedrusik A, et al (2013) Asymmetric Localization of Cdx2 mRNA during the First Cell-Fate Decision in Early Mouse Development. *Cell Rep* 3:442–457. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.006
- Stennard F, Zorn AM, Ryan K, et al (1999) Differential expression of VegT and Antipodean protein isoforms in *Xenopus*. *Mech Dev* 86:87–98. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00119-7
- Strome S, Wood WB (1983) Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* 35:15–25. doi: 10.1016/0092-8674(83)90203-9

- Strome S, Wood WB (1982) Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:1558–1562. doi: 10.1073/pnas.79.5.1558
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64–119. doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4
- Suzuki a, Yamanaka T, Hirose T, et al (2001) Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia- specific junctional structures. *J Cell Biol* 152:1183–1196.
- Tarkowski a K, Wróblewska J (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18:155–180.
- Thomsen GH, Melton D a (1993) Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell* 74:433–441. doi: 10.1016/0092-8674(93)80045-G
- Vinot S, Le T, Ohno S, et al (2005) Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* 282:307–19. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.03.001
- Wang K, Sengupta S, Magnani L, et al (2010) Brg1 is required for Cdx2-mediated repression of Oct4 expression in mouse blastocysts. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0010622
- Wilhelm JE, Vale RD, Hegde RS (2000) Coordinate control of translation and localization of Vg1 mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13132–13137. doi: 10.1073/pnas.97.24.13132
- Wu G, Schöler HR (2014) Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen* 3:7. doi: 10.1186/2045-9769-3-7
- Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, et al (2007) Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134:3827–3836. doi: 10.1242/dev.010223
- Zhang J, Houston DW, King ML, et al (1998) The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 94:515–524. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81592-5
- Zhang J, King ML (1996) *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* 122:4119–4129.

Zhou Y, King ML (1996) Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* 122:2947–2953.