

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Aneta Suwińska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- **23.06.2008 – doktor nauk biologicznych w zakresie biologii** – Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; tytuł rozprawy: „Różnicowanie komórek zarodkowych myszy i nornicy rudej *in vivo* i *in vitro*“
promotor: prof. dr hab. Andrzej K. Tarkowski
- **25.06.2003 – magister, kierunek biologia w zakresie biologii ogólnej** – Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; tytuł rozprawy: „Rozwój przedimplantacyjny i postimplantacyjny mysich chimer diploidalno <-> triploidalnych uzyskanych eksperymentalnie”
promotor: prof. dr hab. Andrzej K. Tarkowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **2008-2019 – adiunkt w Zakładzie Embriologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski**
w tym:
12.08.2009-29.12.2009 - urlop macierzyński
19.09.2011-19.02.2012 - urlop macierzyński
- **2003-2008 – studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego**

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„MECHANIZMY REGULACYJNE W PRZEDIMPLANTACYJNYM ZARODKU MYSZY”

b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

1. Tarkowski A.K., **Suwinska A.**, Czolowska R, Ozdzinski W. (2010). Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental Biology* 15;348(2): 190-198
(IF ²⁰¹⁰ **4,094**; 5yearIF **4,420**; pkt MNiSW **32**, liczba cytowań: **34**)

2. Krupa M., Mazur E., Szczepańska K., Filimonow K., Maleszewski M., **Suwińska A.** (2014). Allocation of inner cells to epiblast vs primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8→16- and 16→32-cells). *Developmental Biology* 385(1): 136-148
(IF ²⁰¹⁴ **3,547**; 5yearIF **3,761**; pkt MNiSW **35**, liczba cytowań: **27**)

3. Humięcka M., Krupa M., Guzewska M.M., Maleszewski M., **Suwińska A.** (2016). ESCs injected into the 8-cell stage mouse embryo modify pattern of cleavage and cell lineage specification. *Mechanisms of Development* 141: 40-50
(IF ²⁰¹⁶ **1,333**; 5yearIF **1,766**; pkt MNiSW **15**, liczba cytowań: **3**)

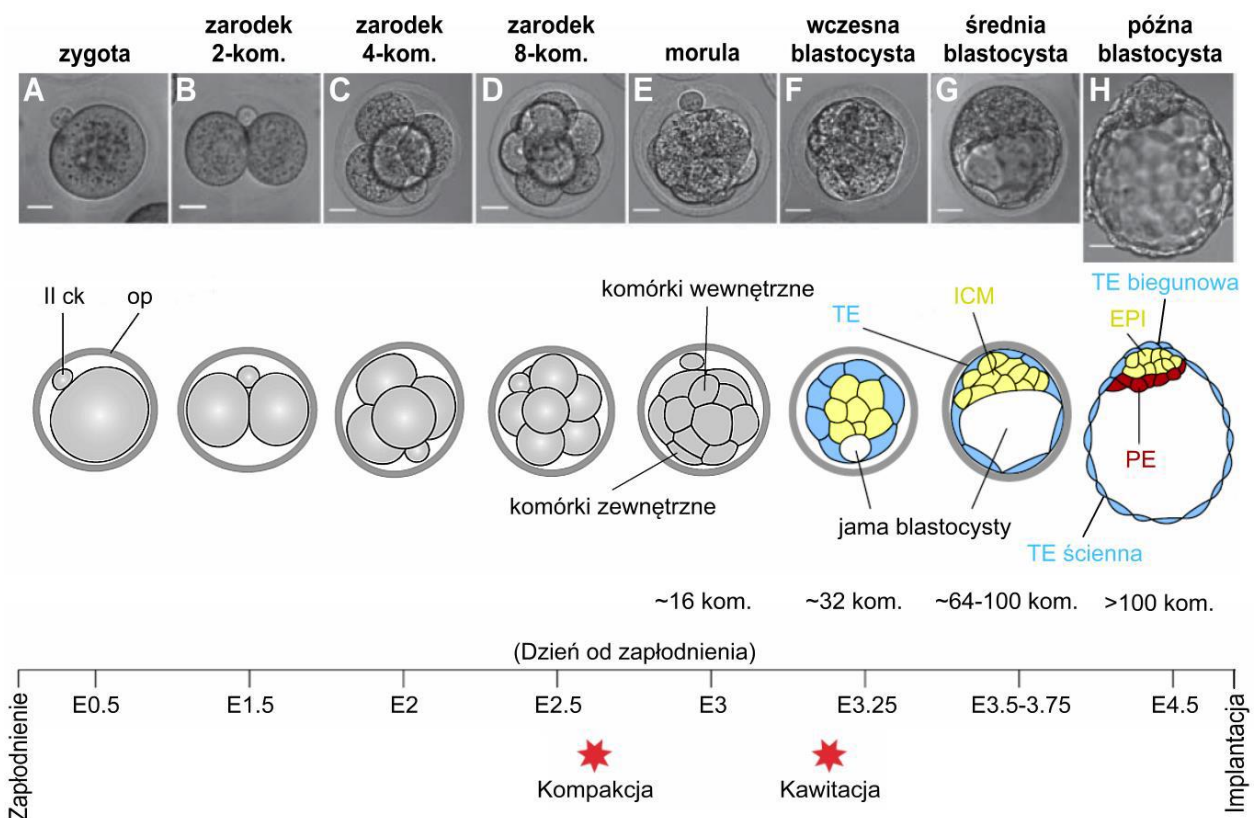
4. Wigger M., Kisiełwska K., Filimonow K., Plusa B., Maleszewski M., **Suwińska A.** (2017). Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *Scientific Reports* 7(1): 15136
(IF ²⁰¹⁷ **4,122**; 5yearIF **4,609**; pkt MNiSW **40**, liczba cytowań: **2**)

Łączny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 13,096; punkty MNiSW: 122, liczba cytowań: 66

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie:

Przedimplantacyjny okres rozwoju zarodkowego myszy trwa od momentu zapłodnienia oocytu przez plemnik aż do implantacji zarodka w macicy (Ryc. 1). Dzieląca się zygota przechodzi kolejne podziały, zwane bruzdkowaniem. Powstające w ich wyniku komórki czyli blastomery, wyjściowo totipotencjalne, stopniowo różnicują się i tworzą linie komórkowe, z których w dalszym rozwoju powstaną wszystkie tkanki zarodka i struktury pozazarodkowe, podtrzymujące jego rozwój w macicy. Zagadnienie utraty przez komórki totipotencji, czyli zdolności do wielokierunkowego różnicowania, było badane w publikacjach nr 1 i 4 wchodzących w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego. W pierwszej kolejności dochodzi do różnicowania zewnętrznych komórek zarodka w trofektodermę (TE; ang. *trophectoderm*), a wewnętrznych w węzeł zarodkowy (ICM; ang. *inner cell mass*) (Tarkowski i Wróblewska, 1967; Johnson i Ziomek, 1981; przegląd w: White i wsp., 2018).

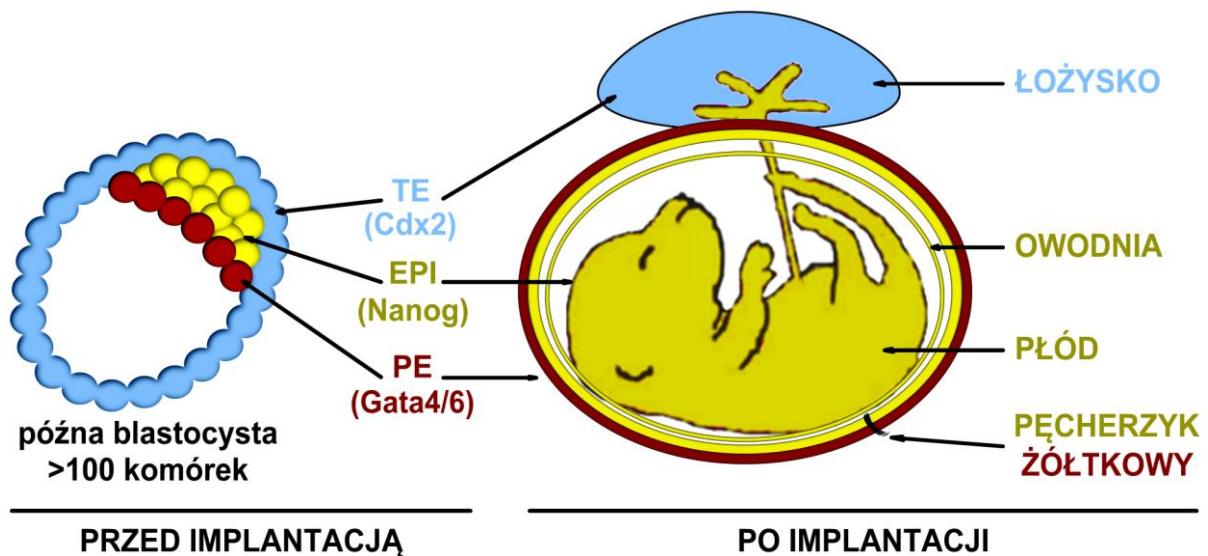


Ryc. 1. Schemat rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy (wg Saiz i Plusa, 2013).

II ck – II ciałko kierunkowe; op – osłonka przejrzysta; kom. - komórkowy. Skala czasu przedstawia rozwój od zapłodnienia do implantacji w dniach rozwoju (E; ang. embryonic day). Skala: 20 μ m.

W ten sposób powstaje blastocysta, czyli pęcherzyk wypełniony płynem, składający się z dwóch pierwszych linii komórkowych wykazujących odmienną morfologię i przeznaczenie (przegląd w: White i wsp., 2018). Regulacja wzoru oraz częstości podziałów, jakim podlegają komórki zarodka (podziały symetryczne vs asymetryczne), a także ich wpływ na specyfikację TE i ICM były przedmiotem moich badań opisanych w pracach nr 2 i 3 składających się na moje osiągnięcie habilitacyjne.

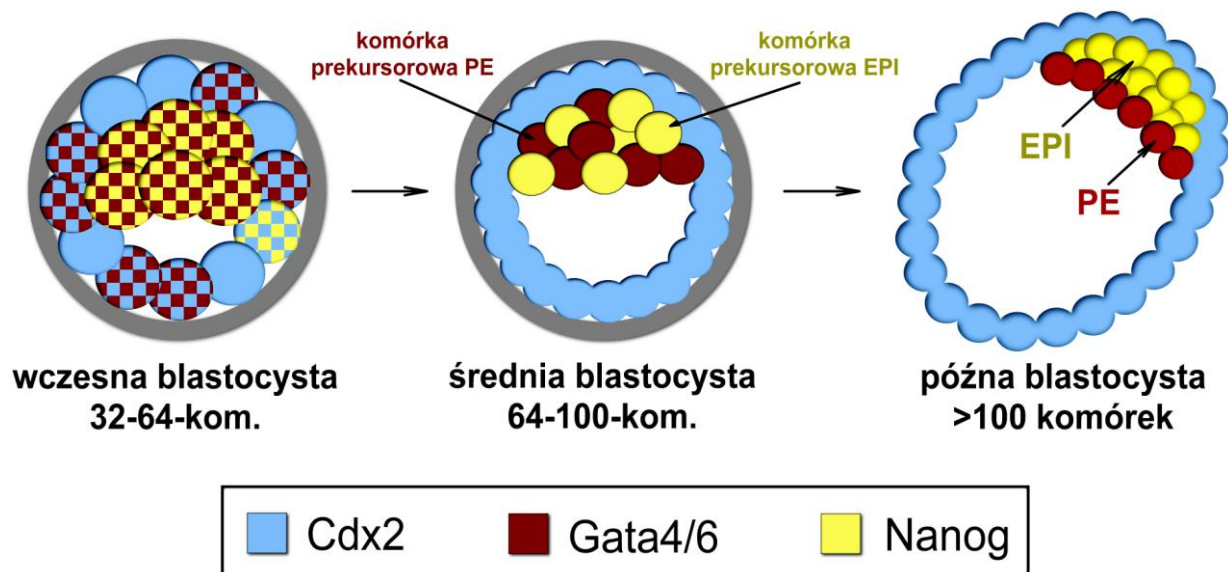
Tuż przed zagnieżdżeniem się blastocysty w macicy komórki ICM podejmują kolejną decyzję odnośnie swojego losu, tworząc dwie subpopulacje komórek: pierwotną endodermę (PE; ang. *primitive endoderm*), która stanowi pojedynczą warstwę komórek na powierzchni wężła zarodkowego oraz epiblast (EPI), zlokalizowany w jego wnętrzu (Ryc. 2; przegląd w: Bassalert i wsp., 2018). Na etapie blastocysty linie komórkowe identyfikowane są na podstawie obecności charakterystycznych dla nich białek. Dla TE, która po implantacji wytworzy zarodkową część łożyska, jest to CDX2 (ang. *caudal type homeobox 2*; Beck i wsp., 1995; Strumpf i wsp., 2005), dla epiblastu stanowiącego materiał na ciało zarodka i większość błon płodowych – NANOG (Mitsui i wsp., 2003), a dla pierwotnej endodermy tworzącej następnie po implantacji endodermę błony płodowej - pęcherzyka żółtkowego markerami są białka z rodziny Gata - GATA4 i 6 (ang. *GATA binding protein*; Morrisey i wsp., 1998; Koutsourakis i wsp., 1999) (Ryc. 2).



Ryc. 2. Linie komórkowe w przedimplantacyjnym zarodku myszy oraz tkanki wywodzące się z nich po implantacji.

W czasie rozwoju przedimplantacyjnego zapadają dwie decyzje dotyczące różnicowania komórek, prowadzące do powstania trzech linii komórkowych. W wyniku pierwszej tury różnicowania (około 3,5. dnia rozwoju) formują się TE i ICM. Około 4,5. dnia rozwoju w efekcie drugiej decyzji w obrębie wężła zarodkowego obecne są już warstwy EPI i PE. Komórki każdej z linii charakteryzują się ekspresją specyficznych czynników transkrypcyjnych, takich jak CDX2, NANOG i SOX2 oraz GATA4/6 i SOX17, odpowiednio dla TE, EPI i PE. Po implantacji tkanki pozazarodkowe – TE i PE – utworzą odpowiednio zarodkową część łożyska i endodermę pęcherzyka żółtkowego. Z kolei z epiblastu powstanie głównie ciało płodu oraz większość błon płodowych.

Proces formowania blastocysty gotowej do implantacji w ścianie macicy można podzielić na trzy fazy (Ryc. 3; Frankenberg i wsp., 2011). W stadium wczesnej, około 32-komórkowej blastocysty markery EPI i PE – NANOG i GATA6 – współwystępują w komórkach wężła zarodkowego. Następnie w wyniku ich antagonistycznego działania w części komórek ustala się ekspresja markerów EPI, a w części markerów PE. W ten sposób powstają prekursorzy obu tych linii, ekspresyjące specyficzne tylko dla nich markery, które w stadium średniej 64-komórkowej blastocysty są wymieszane, a następnie tuż przed implantacją sortują do odrębnych warstw w ten sposób, że PE znajduje się na powierzchni epiblastu (Ryc. 3; Chazaud i wsp., 2006; Plusa i wsp., 2008; Meilhac i wsp., 2009).

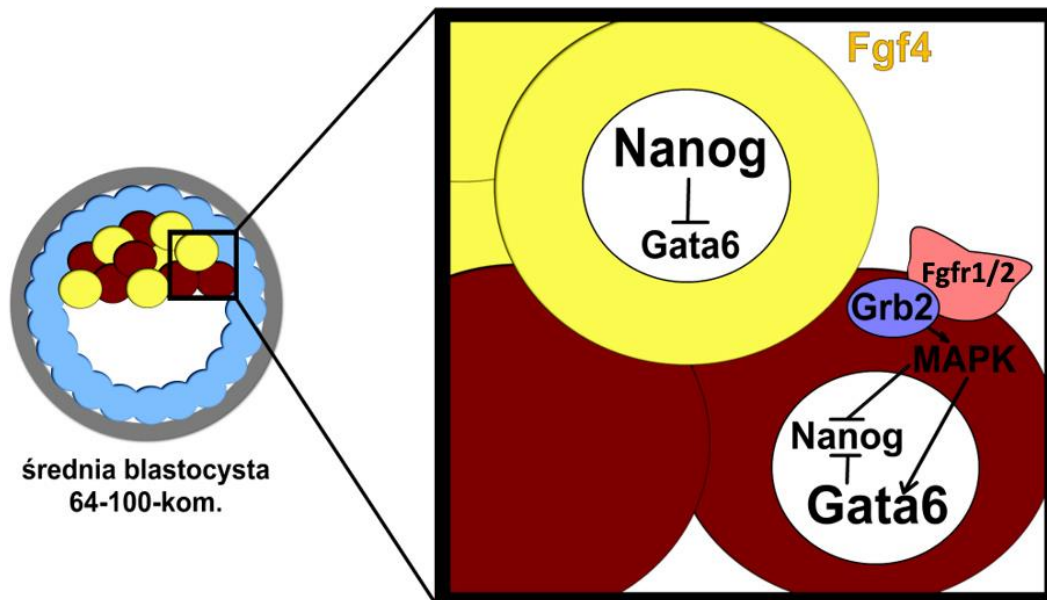


Ryc. 3. Ekspresja czynników transkrypcyjnych specyficznych dla TE, EPI i PE podczas rozwoju blastocysty myszy.

W stadium wczesnej blastocysty (32-64 kom.) obserwowana jest jednoczesna lokalizacja białek specyficznych dla PE i EPI. Ekspresja CDX2 zostaje już ograniczona wyłącznie do blastomerów zewnętrznych, gdzie odpowiada za hamowanie ekspresji markerów ICM. W dalszym etapie rozwoju (64-100 kom.) lokalizacja poszczególnych białek zaczyna się wzajemnie wykluczać. Komórki prekursorowe EPI i PE rozmieszczone w ICM według wzoru „sól i pieprz” segregują następnie do odpowiednich warstw, które w późnej blastocystyce są już odrębne morfologicznie.

Nie jest jasne w jaki sposób dochodzi do ustalenia się takiego mozaikowego wzoru ekspresji. Wiadomo, że w proces ten zaangażowana jest ścieżka sygnałowa FGF4 (ang. *fibroblast growth factor*/kinazy MAP (*mitogen-activated protein kinase*) (Ryc. 4; Kang i wsp., 2013; Krawchuk i wsp., 2013). Transdukcja sygnału tej ścieżki w komórce jest inicjowana przez ligand – czynnik wzrostu fibroblastów FGF4, który łączy się ze swoim receptorem powierzchniowym i uruchamia szlak MAP kinazy (Kang i wsp., 2017; Molotkov i wsp., 2017). Aktywacja tej ścieżki indukuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla PE - GATA6, i hamuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego charakterystycznego dla EPI - NANOG.

Komórki ekspresujące receptor dla FGF będą różnicowały w kierunku PE. Z kolei komórki, które syntetyzują i wydzielają FGF4 staną się prekursorami EPI. Źródło heterogenności komórek wężła zarodkowego oraz mechanizm ich interakcji prowadzący do segregacji komórek prekursorowych PE i EPI do docelowych warstw w ICM stanowią przedmiot badań opisanych w publikacji nr 2 wchodzącej w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego.



Ryc. 4. Udział ścieżki FGF4/MAPK w powstawaniu linii komórkowych EPI i PE (na podstawie Chazaud i wsp., 2006).

FGF4 wydzielany przez komórki prekursorowe EPI łączy się z receptorami FGFR1 i FGFR2 na powierzchni komórek prekursorowych PE, co wywołuje aktywację szlaku FGF/MAPK. W efekcie pobudzenia tej ścieżki komórki różnicują ostatecznie w kierunku PE wskutek zwiększenia ekspresji genów kodujących białka GATA, które następnie hamują transkrypcję NANOG. W komórkach prekursorowych EPI ścieżka FGF/MAPK nie ulega aktywacji, dzięki czemu możliwa jest ekspresja genu NANOG, a komórki takie formują ostatecznie EPI.

W trakcie rozwoju zarodkowego myszy komórki podejmują więc kolejne decyzje odnośnie swojego losu, w wyniku których stopniowo tracą swe potencje rozwojowe (zdolność do wielokierunkowego różnicowania w TE, EPI i PE) i ulegają specjalizacji. Jednak w przeciwieństwie do większości kręgowców, zarodek myszy przez stosunkowo długi okres zachowuje zdolności regulacyjne. Oznacza to, że charakteryzuje go niezwykła plastyczność, przejawiająca się umiejętnością adaptacji, czyli zmiany losu w odpowiedzi na eksperymentalne zaburzenie jego rozwoju. Doświadczenia Profesora Tarkowskiego, prowadzone na przełomie lat 50. i 60. ubiegłego wieku pokazały, że zarówno usunięcie części komórek z zarodka (Tarkowski, 1959), jak i zwiększenie ich liczby poprzez zespolenie ze sobą dwóch kilukomórkowych zarodków (Tarkowski, 1961) prowadzi do powstania prawidłowej blastocysty, która po transplantacji do dróg rodnych samicy biorczyni może rozwinąć się w normalnego osobnika. Zdolności regulacyjne zarodków myszy oraz mechanizmy leżące u ich

podstaw (**patrz prace nr 1 i 4 osiągnięcia habilitacyjnego**) były obiektem moich naukowych zainteresowań po uzyskaniu stopnia doktora. W prezentowanym przeze mnie cyklu prac przedstawionych jako osiągnięcia habilitacyjne, postawiłam sobie za cel zbadanie, w którym momencie rozwoju następuje ostateczna determinacja losu komórek, jakie czynniki decydują o kierunku ich różnicowania i jakie mechanizmy odpowiadają za regulacyjny charakter rozwoju zarodkowego myszy. Modelem w moich badaniach były przede wszystkim zarodki myszy, jednak część uzyskanych przeze mnie wyników pochodzi z badań przeprowadzonych na zarodkowych komórkach macierzystych (ES; ang. *embryonic stem cells*), które są uważane za model *in vitro* komórek węzła zarodkowego blastocysty (Boroviak i wsp., 2014).

1. Określenie momentu ostatecznej determinacji losu komórek w przedimplantacyjnym zarodku myszy

Publikacja 1:

Tarkowski A.K., Suwińska A., Czolowska R, Ozdzinski W. (2010). Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental Biology* 348(2): 190-198
(IF ²⁰¹⁰ **4,094**; 5yearIF **4,420**; pkt MNiSW **32**, liczba cytowań: **34**)

Wstęp:

Ssaki, w tym myszy, charakteryzują się rozwojem regulacyjnym. Oznacza to, że blastomery powstające w wyniku kilku pierwszych podziałów bruzdkowania nie są zdeterminowane i mogą, po ich izolacji z zarodka, wykształcić wszystkie struktury zarodkowe oraz pozazarodkowe, takie jak błony płodowe i łożysko. Niezwykłą plastyczność zarodków myszy udowodniono po raz pierwszy jeszcze w latach 50. ubiegłego wieku, uzyskując normalną mysz z pojedynczego blastomeru wyizolowanego z 2-komórkowego zarodka (Tarkowski, 1959). U innych gatunków ssaków, takich jak królik (Moore i wsp., 1968), owca (Willadsen, 1981) i krowa (Johnson i wsp., 1995) osobniki mogą rozwinąć się również z pojedynczych blastomerów pobranych z późniejszych stadiów bruzdkowania – z zarodka 4- lub 8-komórkowego. W przypadku myszy nie zaobserwowano pełnego rozwoju blastocyst uzyskanych z izolowanych blastomerów stadiów późniejszych, niż 2-komórkowe. Nie oznacza to jednak, że tracą one totipotencję, co można zademonstrować wspomagając takie blastomery komórkami pomocniczymi. Ich rolę mogą pełnić komórki tetraploidalne, uzyskane w wyniku fuzji blastomerów 2-komórkowego zarodka (Kubiak i Tarkowski, 1985). Doskonale nadają się one do roli blastomerów ‘nośnikowych’, gdyż w trakcie rozwoju są eliminowane z tkanek zarodkowych, ale utrzymują się i funkcjonują w strukturach pozazarodkowych (Tarkowski i wsp., 1977; Nagy i wsp., 1990, 1993). Zastosowanie tej metody, zwanej komplementacją tetraploidalną, umożliwia zbadanie potencji blastomerów najbardziej wiarygodną z metod, czyli poprzez przetestowanie ich zdolności do rozwoju w zwierzęta wywodzące się całkowicie z badanej komórki. W ten sposób sprawdzono potencjał rozwojowy pojedynczych blastomerów stadium 4-komórkowego myszy, uzyskując bliźnięta,

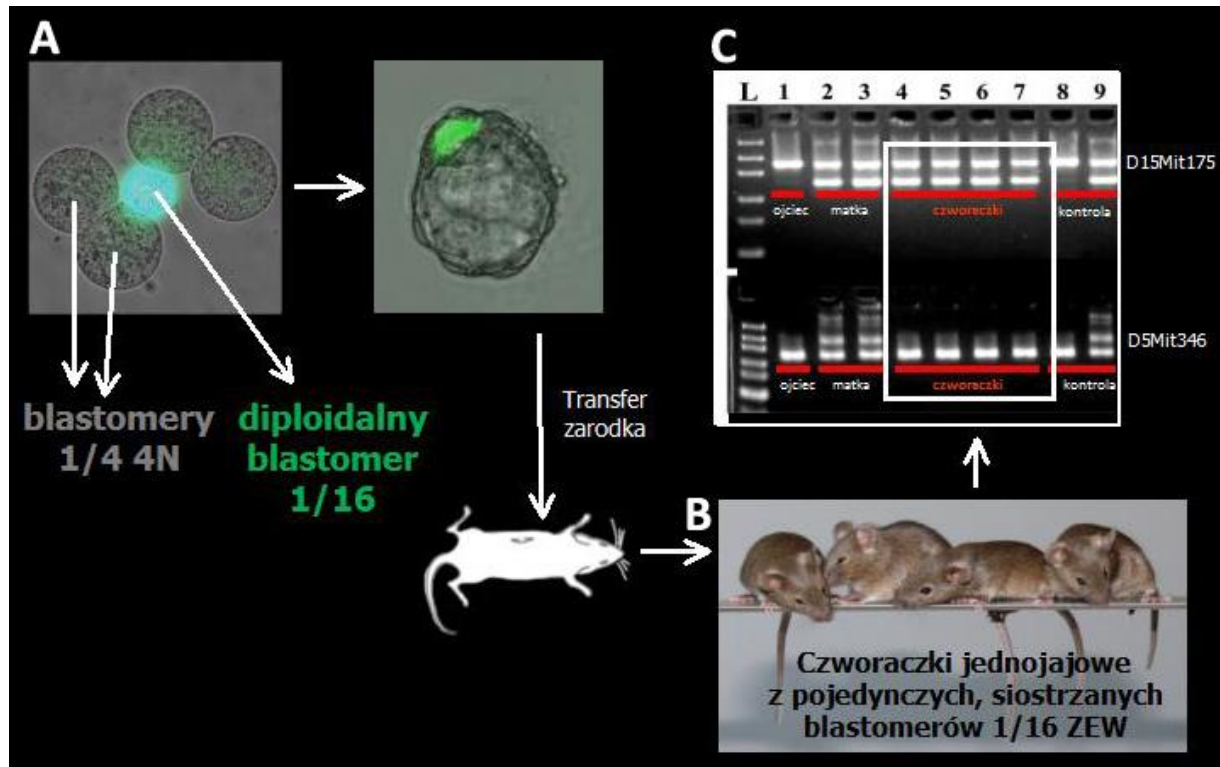
oraz stadium 8-komórkowego, uzyskując trojaczki (Tarkowski i wsp., 2001, 2005). W świetle tych wyników wydawało się, że co najmniej do czwartego podziału bruzdkowania, czyli do stadium 8-komórkowego, los blastomerów nie jest jeszcze ukierunkowany i wszystkie blastomery mają zdolność różnicowania się zarówno w komórki trofektodermy, jak i węzła zarodkowego.

Począwszy od kolejnego podziału, czyli od stadium 16-komórkowego w zarodku widoczne są już pierwsze oznaki różnicowania i można w nim wyróżnić spolaryzowane komórki leżące na zewnątrz i ekspresyjujące marker TE - CDX2, oraz niespolaryzowane komórki wewnętrzne, stykające się jedynie z innymi komórkami. W trakcie studiów doktoranckich wykazałam, że zarodki zrekonstruowane wyłącznie z blastomerów wewnętrznych lub zewnętrznych 16-komórkowych zarodków mogą utworzyć prawidłowo zbudowane blastocysty, które po przeszczepieniu do dróg rodnych samicy biorczyni rozwijają się w zdrowe, płodne osobniki (Suwińska i wsp., 2008). Wyniki otrzymane w ramach mojego doktoratu stały się punktem wyjścia dla dalszych badań, których celem było wyjaśnienie, czy pojedyncze blastomery zewnętrzne i wewnętrzne zarodka 16-komórkowego zachowują pluripotencję, czyli zdolność do różnicowania we wszystkie typy komórek obecne w organizmie i czy przy wsparciu komórek tetraploidalnych są w stanie utworzyć ciało płodu i przejść całą embriogenezę aż do urodzenia. Aby zbadać, w którym momencie rozwoju dochodzi do utraty pełnego potencjału rozwojowego, rozumianego jako zdolność do rozwoju całego organizmu z pojedynczej komórki zarodka, wykorzystaliśmy metodę tetraploidalnej komplementacji.

Wyniki i ich znaczenie:

16-komórkowe diploidalne zarodki konstytutywnie ekspresyjujące gen białka zielonej fluorescencji *Gfp* (ang. **green fluorescent protein**) barwiliśmy czerwonymi mikrokulkami fluorescencyjnymi, w celu wyznakowania komórek zewnętrznych. Po dezagregacji zarodka pojedyncze komórki klasyfikowaliśmy jako wewnętrzne lub zewnętrzne na podstawie obecności lub braku sygnału fluorescencji. Następnie agregowaliśmy jedną zewnętrzną lub wewnętrzną komórkę z 16-komórkowego zarodka (1/16) z tetraploidalnymi blastomerami 4-komórkowego zarodka uzyskanymi w wyniku fuzji blastomerów w stadium 2-komórkowym (Ryc. 5A). Takie chimerowe agregaty były hodowane do stadium blastocysty, w której lokalizację potomnych komórek wywodzących się z pojedynczych blastomerów 1/16 mogliśmy określić dzięki ekspresji GFP. Siostrzane blastomery 16-komórkowego zarodka otoczone tetraploidalnymi blastomerami pomocniczymi transplutowaliśmy również do dróg rodnych samic biorczyń aby zbadać ich potencjał rozwojowy (Ryc. 5B). Stwierdziliśmy, iż potomne komórki pojedynczych blastomerów wewnętrznych (Ryc. 6A) i zewnętrznych (Ryc. 6B) 16-komórkowego zarodka lokowały się we wszystkich trzech liniach komórkowych, a po transplatacji do jajowodów samic biorczyń z dużą częstością rozwijały się w normalne i płodne osobniki (Ryc. 5B). Uzyskaliśmy kilkanaście myszy zarówno z zewnętrznych, jak i wewnętrznych pojedynczych komórek jednego 16-komórkowego zarodka. Wśród nich były

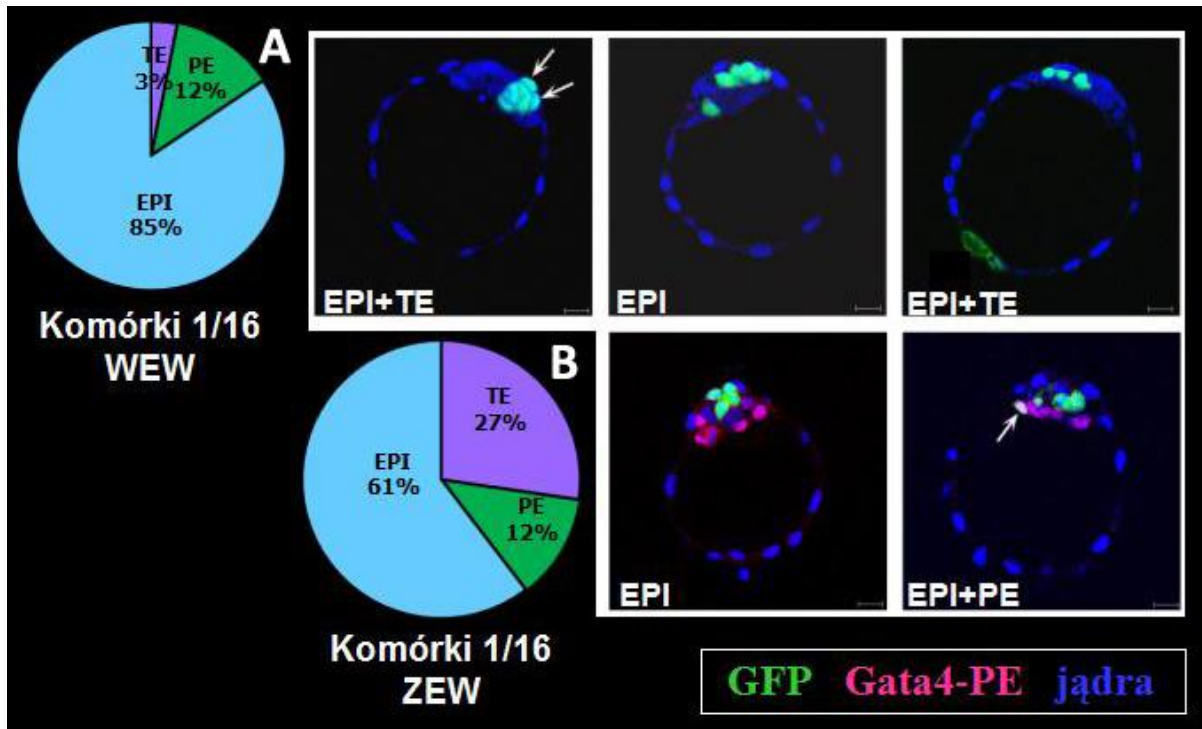
czworaczki (Ryc. 5B), trojaczki, 3 pary bliźniąt i pojedynczy noworodek. Wszystkie one osiągnęły dojrzałość płciową i okazały się płodne. Uzyskane przez nas czworaczki reprezentowały genetyczny klon. Ekspymowały marker GFP w komórkach, były tej samej płci (samice), a ich genetyczna identyczność została udowodniona dzięki analizie markerów mikrosatelitarnego DNA (Ryc. 5C).



Ryc. 5 . Tworzenie agregatów $2n \leftrightarrow 4n$ i ich rozwój przedimplantacyjny i poimplantacyjny

(A) Schemat doświadczenia: agregacja jednego blastomeru 1/16 GFP z 4 blastomerami tetraploidalnymi (B) 6-tygodniowe czworaczki (samice) wywodzące się z pojedynczych, siostrzanych blastomerów zewnętrznych wyizolowanych z 16-komórkowego zarodka (C) Analiza PCR markerów mikrosatelitarnych (D15Mit175 i D5Mit346).

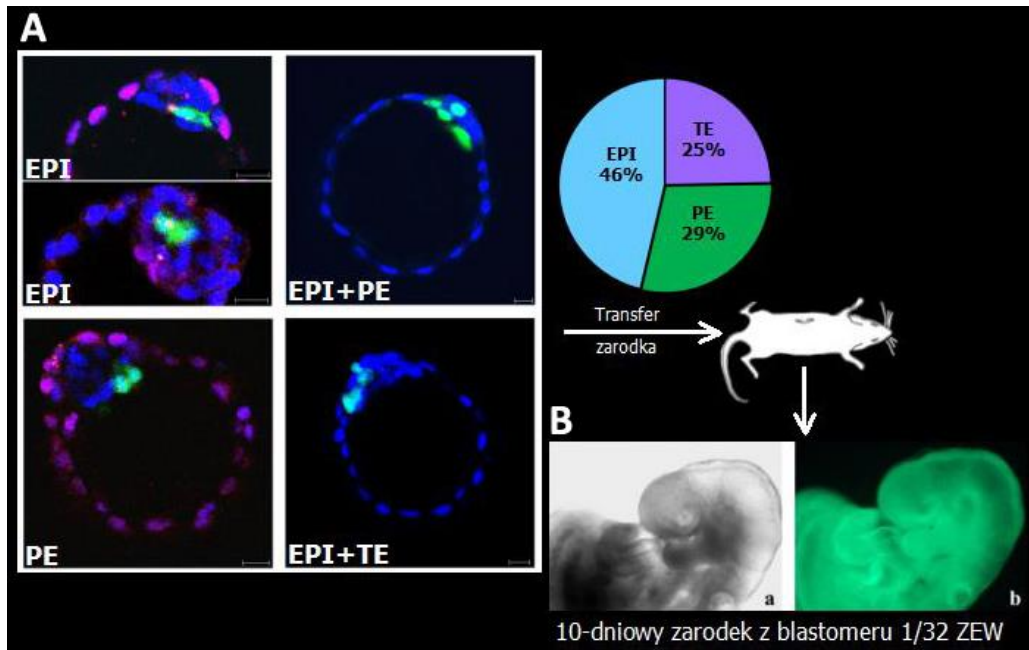
W przypadku pojedynczych komórek późniejszych, 32-komórkowych zarodków, komórki potomne blastomerów zewnętrznych lokalizowały się w rozwijających się blastocystach we wszystkich trzech liniach komórkowych (Ryc. 7A), i co ważne, gdy komórki te lokowały się w epiblaście lub pierwotnej endodermie wyciszały ekspresję CDX2. Takie zarodki po transplatacji do samic biorczyń sporadycznie rozwijały się poza stadium przedimplantacyjne (Ryc. 7B). Z kolei komórki potomne blastomerów wewnętrznych lokowały się przede wszystkim w PE, a znacznie rzadziej w EPI (Ryc. 8A). Ta specyficzna lokalizacja sugerowała, że szansa na pełny rozwój i narodziny myszy z pojedynczego blastomeru była bardzo niewielka. I rzeczywiście, transplatacja takich zarodków do dróg rodnych samic biorczyń tylko w jednym przypadku na 176 zaowocowała narodzinami zwierzęcia (Ryc. 8B).



Ryc. 6. Blastocysty $2n \rightarrow 4n$ tworzone na drodze agregacji pojedynczego blastomeru 1/16 z 4 tetraploidnymi blastomerami pomocniczymi

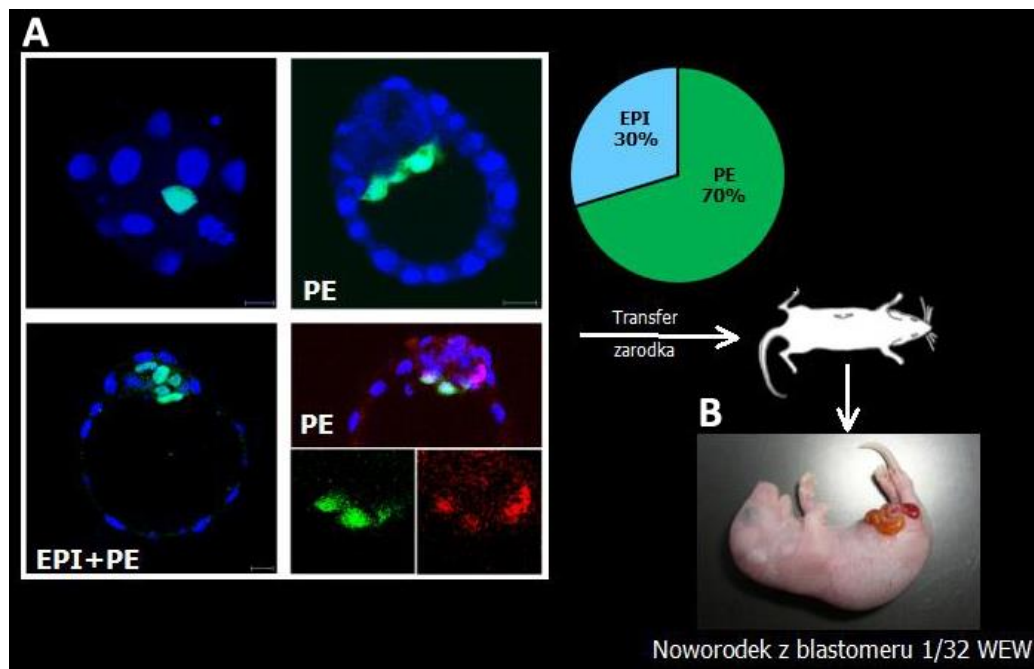
Udział i lokalizacja komórek potomnych (A) blastomeru wewnętrznego (WEW) i (B) blastomeru zewnętrznego (ZEW) 1/16 w liniach komórkowych chimerowych blastocyst. Na górnym panelu strzałkami zaznaczono komórki GFP w TE, a na dolnym panelu w PE. Skala: 20 μ m.

Nasze doświadczenia wpisują się w nurt badań mających na celu sprawdzenie, czy i kiedy blastomery bruzdkującego zarodka zaczynają się od siebie różnić. Badania z ostatnich lat wskazują na coraz więcej różnic pomiędzy uważanymi dotychczas za równocenne blastomerami zarodka 8-, 4-, a nawet 2-komórkowego (Piotrowska-Nitsche i Zernicka-Goetz, 2005; Piotrowska-Nitsche i wsp., 2005; Torres-Padilla i wsp., 2007; Bischoff i wsp., 2008; Jedrusik i wsp., 2008; Plachta i wsp., 2011; Burton i wsp. 2013; Tabansky i wsp. 2013; Biase i wsp., 2014; Goolam i wsp., 2016; White i wsp., 2016). Nasze badania wskazują jednak na to, że obserwowane różnice między blastomerami, dotyczące np. poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych czy znaczników epigenetycznych zaangażowanych w embriogenezę nie przesądzają o kierunku ich różnicowania. Wykazaliśmy, że do stadium 32-komórkowego los blastomerów w zarodku, mimo ekspresji czynników transkrypcyjnych specyficznych dla linii komórkowych, nie jest jeszcze ostatecznie ukierunkowany. Z powodów metodycznych trudno jest bezpośrednio udowodnić, że wszystkie wewnętrzne i zewnętrzne blastomery mają jednakowy potencjał rozwojowy, niemniej jednak narodziny bliźniąt, trojaczków i czworaczków z pojedynczych komórek 16-komórkowego stadium stanowią silną przesłankę przemawiającą za tą hipotezą. Przynajmniej niektóre z tych blastomerów, mimo ekspresji markerów specyficznych dla TE lub ICM, nadal wykazują się plastycznością rozwojową i mogą zmienić swój los w odpowiedzi na eksperymentalne zaburzenie rozwoju.



Ryc. 7. Rozwój przedimplantacyjny (A) i poimplantacyjny (B) zarodków uzyskanych w wyniku agregacji pojedynczego blastomeru zewnętrznego (ZEW) 1/32 eksprymującego GFP z blastomerami tetraploidalnymi.

Wykres kołowy prezentuje rozkład komórek potomnych blastomeru ZEW w trzech liniach komórkowych (EPI, TE i PE) blastocyst $2n \leftrightarrow 4n$.



Ryc. 8. Rozwój przedimplantacyjny (A) i poimplantacyjny (B) zarodków uzyskanych w wyniku agregacji pojedynczego blastomeru wewnętrznego (WEW) 1/32 eksprymującego GFP z blastomerami tetraploidalnymi.

Wykres kołowy prezentuje rozkład komórek potomnych blastomeru ZEW w trzech liniach komórkowych (EPI, TE i PE) blastocyst $2n \leftrightarrow 4n$.

2. Mechanizmy powstawania prekursorów PE i EPI w węźle zarodkowym blastocysty myszy

Publikacja 2:

Krupa M., Mazur E., Szczepańska K., Filimonow K., Maleszewski M., **Suwińska A.** (2014). Allocation of inner cells to epiblast vs primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8→16- and 16→32-cells). *Developmental Biology* 385(1): 136-148
(IF ²⁰¹⁴ **3,547**; 5yearIF **3,761**; pkt MNiSW **35**, liczba cytowań: **27**)

Wstęp:

Mimo intensywnych badań wiedza na temat mechanizmów kontrolujących wczesne etapy różnicowania linii komórkowych w przedimplantacyjnym zarodku myszy wciąż pozostaje niekompletna. Istniejący obecnie model powstawania pierwotnej endodermy i epiblastu w obrębie węzła zarodkowego opiera się na założeniu, że populacja komórek w ICM jest heterogenna. Komórki prekursorowe PE i EPI wykazujące ekspresję specyficznych markerów w 3,5-dniowej blastocystie rozmieszczone są w sposób przypadkowy ("salt-and-pepper"), a następnie sortują do odpowiedniej warstwy (komórki ekspresyjujące GATA6 na powierzchnię, tworząc PE, a komórki syntetyzujące NANOG w głąb ICM, budując EPI). Dotychczas nie było wiadomo w jaki sposób tworzą się pierwotne różnice między komórkami w ICM i jakie czynniki determinują powstawanie prekursorów pierwotnej endodermy i epiblastu.

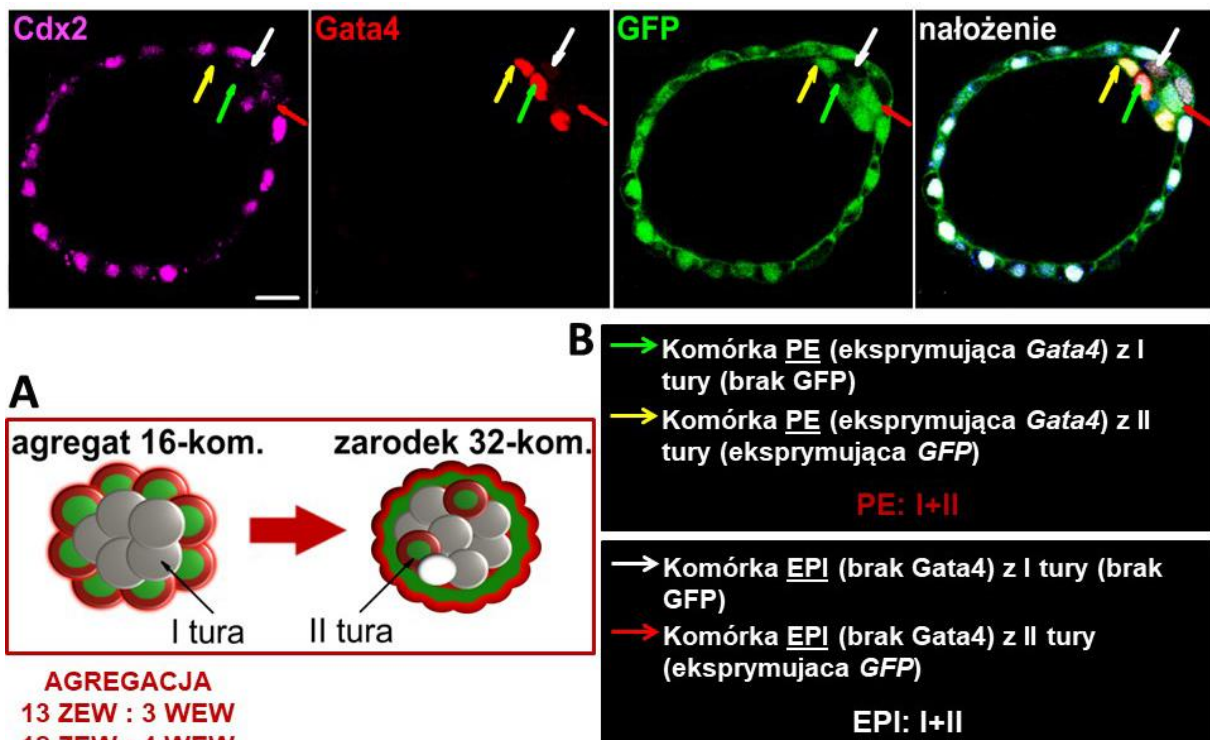
Sugerowano, iż źródłem heterogenności populacji komórek wewnętrznych w zarodku jest moment ich powstania. W stadium 8-komórkowym dochodzi do polaryzacji blastomerów, która związana jest z asymetrycznym ułożeniem w komórce szeregu białek, takich jak białka PAR (ang. *partition defective*) i atypowa białkowa kinaza C (aPKC, ang. *atypical protein kinase C*) (Pauken i Capco, 2000; Vinot i wsp., 2005). W konsekwencji w każdym blastomerze 8-komórkowego zarodka wyróżnić można domenę spodnio-boczną oraz domenę szczytową. W związku z tym kolejne podziały bruzdkowania mogą przebiegać w dwojaki sposób. Kiedy płaszczyzna podziału dzieli domenę szczytową między dwie komórki potomne, mówimy o podziale symetrycznym, w wyniku którego generowane są dwie polarne komórki zewnętrzne tworzące TE. W przypadku podziału asymetrycznego tylko jedna z komórek potomnych dziedziczy domenę polarną. Podział prowadzi wówczas do powstania 1 polarnej komórki zewnętrznej i 1 niespolaryzowanej komórki wewnętrznej, lokalizującej się w ICM. Asymetryczne podziały różnicujące zachodzą w stadium 8-16-komórkowym oraz 16-32-komórkowym, a mogą się również zdarzać, przynajmniej w niektórych zarodkach, w stadium 32-64-komórkowym (Fleming, 1987; Pedersen i wsp., 1986; Morris i wsp., 2010; Yamanaka i wsp., 2010). Komórki wewnętrzne tworzące węzeł zarodkowy powstają więc w różnym momencie, tzn. w trzech następujących po sobie turach podziałów asymetrycznych. Postanowiliśmy zatem sprawdzić, czy tworzenie prekursorów PE i EPI zależy od momentu internalizacji komórek wewnętrznych. Podjęliśmy się również odpowiedzi na pytanie, czy dwie populacje blastomerów wewnętrznych już w stadium 32-

komórkowym różnią się ekspresją markerów specyficznych dla linii EPI i PE, co mogłoby odpowiadać za ich późniejszą specyfikację.

Postawiliśmy hipotezę, według której czynnikiem determinującym los komórek wewnętrznych, czyli ich różnicowanie w kierunku EPI lub PE, jest moment ich powstania, czyli ich pochodzenie z I (8->16 komórek) lub II (16->32 komórki) tury podziałów asymetrycznych. Według naszej hipotezy komórki wewnętrzne pochodzące z I tury podziałów asymetrycznych tworzą EPI, a komórki wewnętrzne powstające w II turze – PE.

Wyniki i ich znaczenie:

Aby zweryfikować postawioną hipotezę wykorzystaliśmy dwa rodzaje zarodków 16-komórkowych – zarodki ekspresyjujące białko zielonej fluorescencji – GFP i zarodki typu dzikiego (Ryc. 9). Zewnętrzne komórki w zarodkach były barwione z wykorzystaniem czerwonych mikrokulek fluorescencyjnych. Zarodki następnie dezagregowaliśmy, a blastomery segregowaliśmy wykorzystując mikroskop epifluorescencyjny na wewnętrzne – pozbawione mikrokulek i zewnętrzne – zabarwione na czerwono.

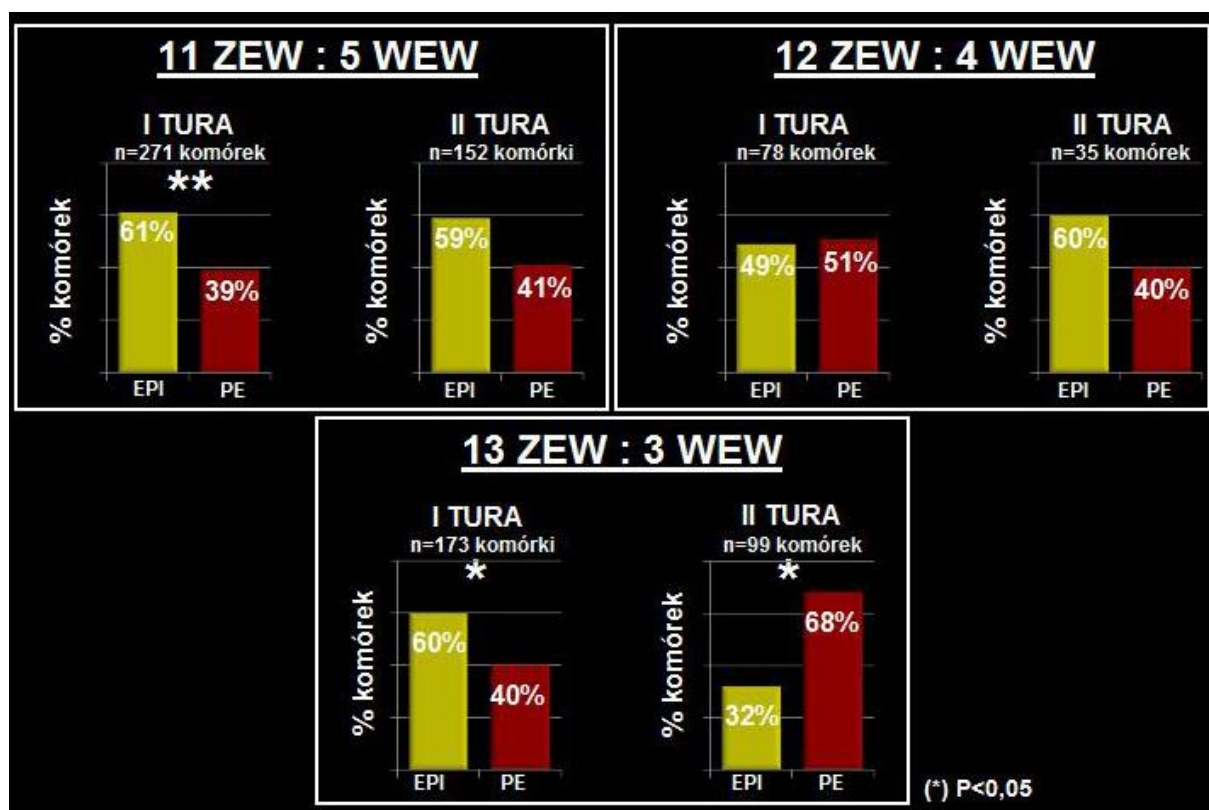


Ryc. 9. Analiza losów komórek pochodzących z I i II podziału asymetrycznego

(A) Główne założenie eksperymentu: wewnętrzne komórki GFP-negatywne otoczone były zewnętrznymi (wyznakowanymi czerwonymi mikrokulkami) komórkami ekspresyjującymi białko GFP. Ekspresja GFP pozwala na odróżnienie pochodzenia komórek; (B) Przykładowy przekrój przez blastocystę pokazujący różne pochodzenie komórek PE i EPI w obrębie ICM. Skala: 20 μ m.

Następnie tworzyliśmy 16-komórkowe agregaty o różnych, najczęściej spotykanych w zarodkach 16-komórkowych, stosunkach komórek zewnętrznych do wewnętrznych, manipulując tym samym liczbą komórek odpowiadających komórkom powstałym w I turze podziałów asymetrycznych (Ryc. 9A). Komórki wewnętrzne, czyli pochodzące z I tury podziałów asymetrycznych (z 8 na 16 komórek) umieszczaliśmy w środku agregatu i otaczaliśmy komórkami zewnętrznymi ekspresyjnymi GFP. Tym sposobem w II podziale asymetrycznym (z 16 na 32 komórki) powstające wtedy komórki wewnętrzne mogliśmy odróżnić od tych z I tury na podstawie obecności GFP. Agregaty hodowaliśmy do stadium późnej blastocysty i wykrywaliśmy w nich markery PE i TE metodą immunofluorescencji pośredniej, celem identyfikacji wszystkich trzech linii komórkowych. W takich blastocystach zliczaliśmy następnie komórki wężła zarodkowego wykazujące ekspresję odpowiednich markerów lub kombinacji markerów, co pozwoliło na przypisanie komórkom EPI i PE pochodzenia z I lub II tury podziałów asymetrycznych (Ryc. 9B).

Nie stwierdziliśmy istotnego związku między pochodzeniem komórek z danej tury podziałów asymetrycznych a ich późniejszym losem gdy stosunek komórek zewnętrznych do wewnętrznych wynosił 11:5 i 12:4 (Ryc. 10).



Ryc. 10. Wpływ pochodzenia komórek (z I lub II tury podziałów asymetrycznych) na ich późniejszy los, czyli tworzenie PE lub EPI

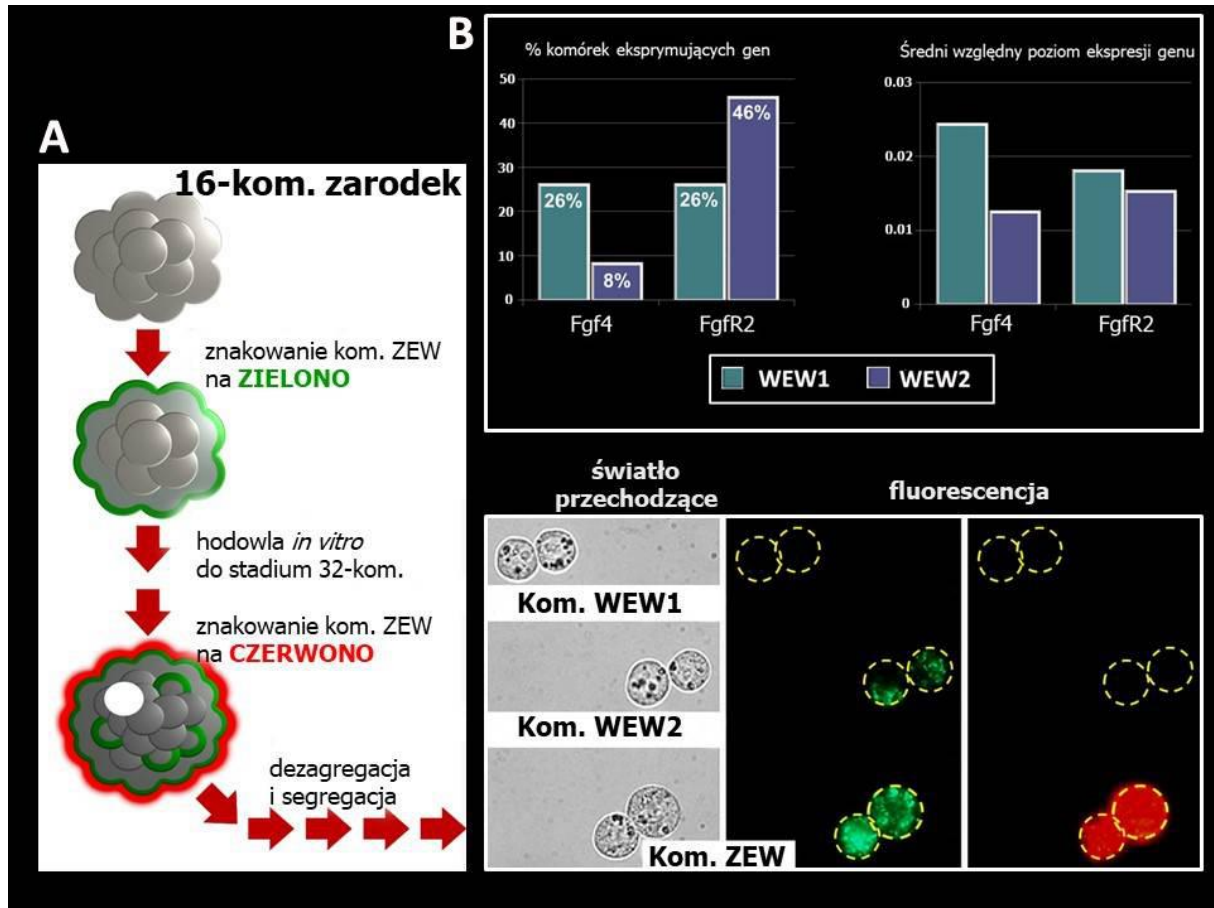
Wykresy prezentują udział komórek EPI i PE w populacji komórek pochodzących z I (lub II) tury podziałów asymetrycznych stanowiącej 100% przy różnych stosunkach komórek ZEW do WEW (odpowiednio: 11:5, 12:4 i 13:3).

Dopiero zmniejszenie liczby komórek wewnętrznych do 3 pozwoliło zaobserwować istotny związek między turą podziałów asymetrycznych a różnicowaniem komórek wężła zarodkowego. W I turze generowane były wtedy głównie komórki EPI (60%) a w II – PE (68%) (Ryc. 10). Te doświadczenia pozwoliły nam wywnioskować, że los komórek nie zależy wyłącznie od momentu, w którym one powstają, czyli od rundy podziałów asymetrycznych, ale także od liczby komórek wewnętrznych tworzonych w wyniku każdej z nich.

Ponieważ komórki prekursorowe EPI są źródłem FGF4 (Niswander i Martin, 1992; Rappolee i wsp., 1994), natomiast ekspresja receptora FGFR2 jest specyficzna dla komórek PE i TE zadaliśmy sobie pytanie, czy zaobserwowana przez nas zależność losu komórek ICM od liczby komórek wewnętrznych wynika ze zróżnicowanej ekspresji składników ścieżki FGF/MAPK w obu populacjach komórek wewnętrznych już w momencie ich powstania, czyli w stadium 32-komórkowym. Postawiliśmy więc kolejną hipotezę, mówiącą o tym, że dwie generacje komórek wewnętrznych (z I i II podziału asymetrycznego) różnią się poziomem ekspresji FGF4 ekspymowanego przez komórki EPI i jego receptora, ekspymowanego przez komórki PE, co może wpływać na ich późniejszy los, czyli kierunek różnicowania.

Dzięki opracowanej przez nas metodzie podwójnego barwienia, po raz pierwszy możliwe było rozróżnienie dwóch generacji blastomerów wewnętrznych i skorelowanie pochodzenia komórek z danej tury podziałów asymetrycznych z ekspresją wymienionych genów (Ryc. 11). W stadium 16-komórkowym komórki zewnętrzne barwione były z wykorzystaniem zielonych mikrokulek fluorescencyjnych, następnie zarodki były hodowane do momentu pojawienia się w nich jamy, co odpowiada mniej więcej stadium 32-komórkowemu. Wtedy ponownie znakowaliśmy komórki zewnętrzne, tym razem mikrokulkami czerwonymi (Ryc. 11A). Zarodki następnie dezagregowaliśmy i wykorzystując mikroskop fluorescencyjny segregowaliśmy komórki na podstawie obecności mikrokulek na 3 populacje: 1) Komórki wewnętrzne z I tury podziałów asymetrycznych (z 8 na 16 komórek) pozbawione znacznika; 2) Komórki wewnętrzne z II tury podziałów asymetrycznych (z 16 na 32 komórki) zabarwione tylko na zielono oraz 3) Komórki zewnętrzne zabarwione podwójnie. Tak uzyskane pojedyncze blastomery z I i II tury były następnie wykorzystane do analizy ekspresji FGF4 i jego receptora metodą RT-qPCR w czasie rzeczywistym (Ryc. 11B).

Na podstawie analiz liczby komórek ekspymujących FGF4 zaobserwowaliśmy, że udział komórek wewnętrznych, w których stwierdzono obecność transkryptu dla FGF4 był wyższy wśród komórek z I tury (Ryc. 11B). Uwzględniając średni względny poziom ekspresji nie tylko więcej komórek z I tury ekspymowało FGF4, ale również na około dwukrotnie wyższym poziomie niż komórki z II tury (Ryc. 11B). Z kolei procent komórek wewnętrznych ekspymujących FGFR2 był wyższy wśród komórek z II tury, przy względnym poziomie ekspresji podobnym w obu populacjach (Ryc. 11B). Wykazaliśmy zatem, że dwie populacje komórek wewnętrznych różnią się ekspresją FGF4 i jego receptora w ten sposób, że komórki wewnętrzne z I tury częściej i na wyższym poziomie niż te z II tury ekspymują FGF4. Z kolei komórki z II tury częściej ekspymują FGFR2.



Ryc. 11. Korelacja pochodzenia komórek z dwóch rund asymetrycznych podziałów z ekspresją pary genów *Fgf4/Fgfr2*

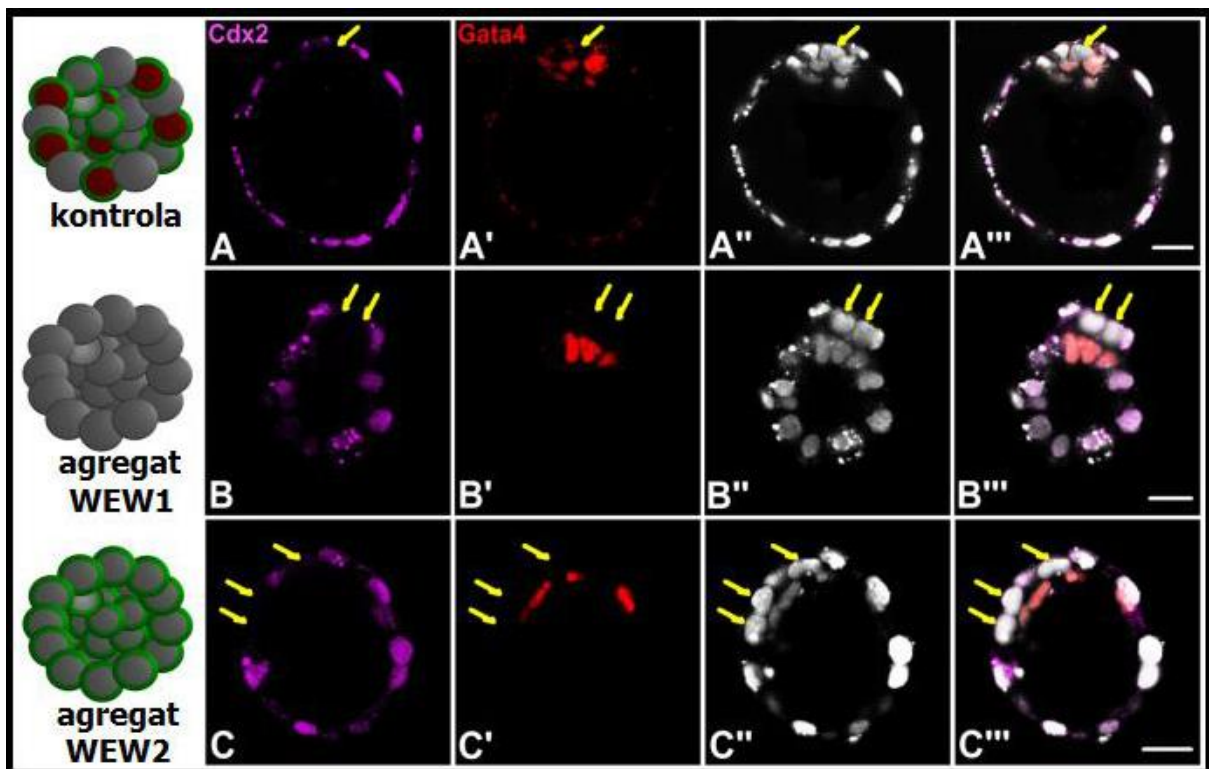
(A) Uzyskiwanie i identyfikacja dwóch generacji komórek wewnętrznych w zarodku 32-komórkowym poddanym procedurze podwójnego znakowania w stadium 16- i 32-komórkowym; (B) Analiza ekspresji *Fgf4* i *Fgfr2* w pojedynczych blastomerach zarodka 32-komórkowego, wywodzących się z I ('WEW1') i II ('WEW2') tury podziałów asymetrycznych.

Kolejne pytanie, jakie sobie postawiliśmy, brzmiało: Czy zaobserwowane przez nas różnice w ekspresji genów ograniczają potencjał komórek z I i II tury podziałów asymetrycznych, czy też może ich los nie został jeszcze zdeterminowany, a zatem charakteryzują się pluripotencją i są w stanie przeprogramować się w odpowiedzi na eksperymentalne zakłócenie rozwoju?

Aby odpowiedzieć na to pytanie, metodą opisaną powyżej wyodrębniliśmy w zarodkach trzy różne populacje blastomerów. Następnie tak uzyskane komórki wykorzystaliśmy do stworzenia 32-komórkowych agregatów złożonych wyłącznie z komórek wewnętrznych z I tury, z II tury oraz agregatów kontrolnych, powstałych wskutek przypadkowej reagregacji blastomerów pochodzących z tego samego zdezagregowanego

zarodka (Ryc. 12). Agregaty hodowaliśmy do stadium późnej blastocysty i wykrywaliśmy w nich markery PE i TE metodą immunofluorescencji pośredniej, celem identyfikacji wszystkich trzech linii komórkowych i określenia zdolności komórek wewnętrznych do odtworzenia prawidłowej blastocysty (Ryc. 12).

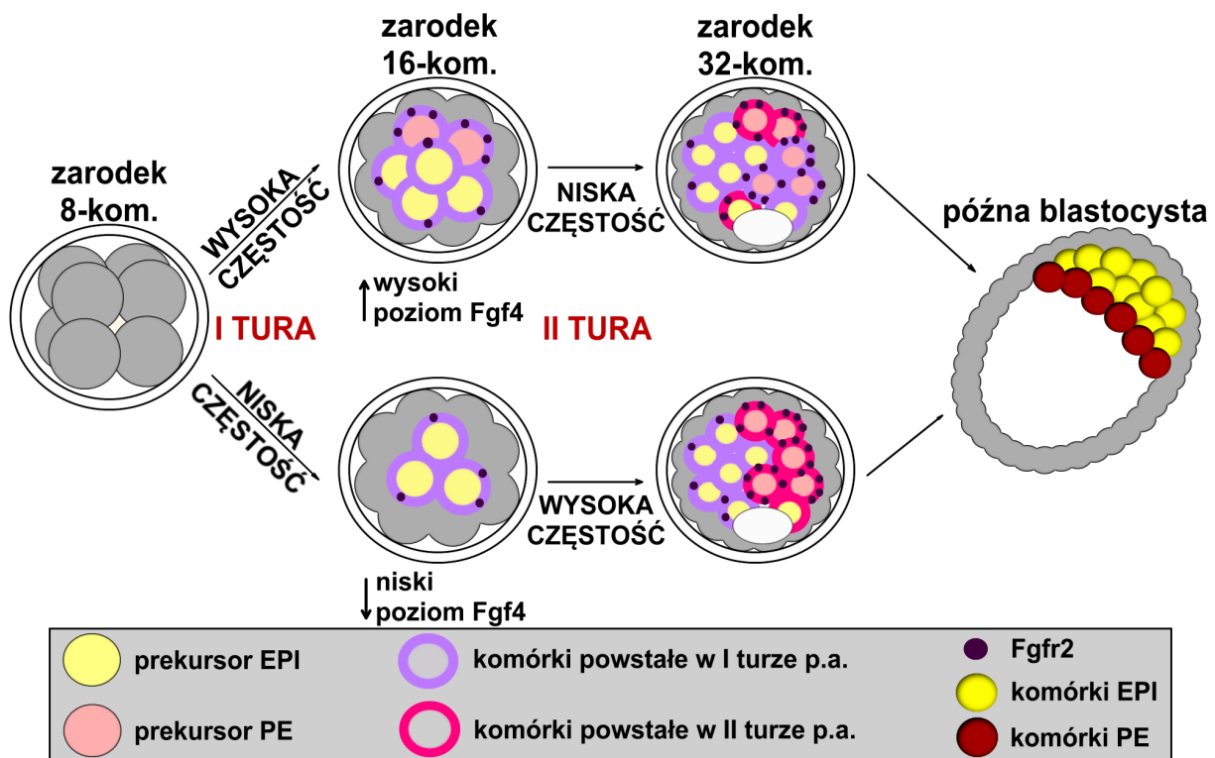
Na podstawie analizy ekspresji markerów TE, czyli CDX2 oraz PE – GATA4 stwierdziliśmy obecność wszystkich linii komórkowych we wszystkich trzech typach agregatów (Ryc. 12). Komórki obu populacji w homogennych agregatach są więc zdolne do odtworzenia prawidłowej blastocysty charakteryzującej się obecnością wszystkich trzech linii komórkowych. Różnice w ekspresji genów między tymi dwiema populacjami komórek nie ograniczają zatem ich potencjału rozwojowego.



Ryc. 12. Potencjał rozwojowy komórek wewnętrznych wywodzących się z dwóch rund podziałów asymetrycznych

Analiza immunofluorescencyjna blastocyst uzyskanych w wyniku hodowli 32-komórkowych agregatów kontrolnych (A-A''') oraz agregatów zbudowanych wyłącznie z komórek wewnętrznych wywodzących się z I ('WEW1'; B-B''') lub II tury podziałów asymetrycznych ('WEW2'; C-C'''). Żółtymi strzałkami zaznaczono komórki EPI (negatywne pod względem ekspresji CDX2 i GATA4). Zdjęcie z prawej przedstawia nałożenie obrazów. Skala: 20 μ m.

Podsumowując, stosując nowatorskie podejście badawcze, polegające na podwójnym znakowaniu zarodków w stadium 16- i 32-komórkowym, poprzedzającym ich dezagregację, po raz pierwszy udało nam się rozdzielić komórki wywodzące się z dwóch następujących po sobie podziałów asymetrycznych. Badając ekspresję genów metodą Real time RT-PCR w tak uzyskanych pojedynczych komórkach wewnętrznych wykazaliśmy różnice w transkrypcji pary genów FGF4/FGFR2 między dwiema generacjami komórek wewnętrznych.



Ryc. 13. Model specyfikacji linii EPI i PE w przedimplantacyjnym zarodku myszy

Blastomery wywodzące się z I tury podziałów asymetrycznych (fioletowe okręgi) częściej i na wyższym poziomie ekspresyjają *Fgf4*, niż komórki wewnętrzne powstałe w II turze (różowe okręgi), w których częściej obecna jest mRNA dla *Fgfr2*. Kiedy częstość podziałów asymetrycznych w I rundzie jest wysoka, białko FGF4 przekracza poziom niezbędny do indukcji różnicowania części z powstałych w tym podziale komórek wewnętrznych w kierunku PE. W tym przypadku II runda generuje małą liczbę blastomerów wewnętrznych, dlatego populacje EPI i PE wywodzą się głównie z I tury podziałów asymetrycznych. Zależność między pochodzeniem komórek a ich późniejszą specyfikacją ulega zatarciu. Gdy częstość podziałów asymetrycznych w I rundzie jest niska, poziom FGF4 nie jest wystarczający, aby zaindukować różnicowanie części z powstałych blastomerów wewnętrznych w PE. Większość z nich wchodzi następnie w skład EPI, a II tura podziałów asymetrycznych kompensuje niedobór komórek PE. Ponieważ komórki wewnętrzne wywodzące się z II rundy podziałów asymetrycznych częściej ekspresyjają *Fgfr2*, to są w stanie odpowiedzieć na FGF4 produkowany przez blastomery wewnętrzne powstałe przy przejściu ze stadium 8- do 16-komórkowego i różnicować w PE. Wówczas związek między turą podziałów asymetrycznych, w której powstały blastomery wewnętrzne a ich późniejszym kierunkiem różnicowania jest widoczny: w I turze powstają głównie prekursorzy EPI, a w II – PE. W stadium późnej blastocysty (>100 komórek) komórki EPI i PE stanowią już dwie odrębne morfologicznie warstwy. Skrót p.a. - podziały asymetryczne.

Z kolei analiza ich dalszych losów w przedimplantacyjnym zarodku myszy pozwoliła nam udowodnić wpływ częstości podziałów asymetrycznych na powstawanie EPI i PE. Na podstawie wyników naszych doświadczeń zaproponowaliśmy nowy model specyfikacji komórek w obrębie ICM (Ryc. 13). Model ten proponuje, że istotne znaczenie dla ustalenia właściwych proporcji liczbowych pomiędzy komórkami EPI i PE ma liczba komórek wewnętrznych obecnych w stadium 16-komórkowym i zakłada kluczową rolę produkowanego przez nie FGF4 (szczegóły na Ryc. 13).

3. Regulacja częstości podziałów asymetrycznych i symetrycznych w przedimplantacyjnym zarodku myszy oraz jej związek z tworzeniem linii komórkowych w blastocystyce

Publikacja 3:

Humińska M., Krupa M., Guzewska M.M., Maleszewski M., **Suwińska A.** (2016). ESCs injected into the 8-cell stage mouse embryo modify pattern of cleavage and cell lineage specification. *Mechanisms of Development* 141: 40-50
(IF ²⁰¹⁶ **1,333**; 5yearIF **1,766**; pkt MNiSW **15**, liczba cytowań: **3**)

Wstęp:

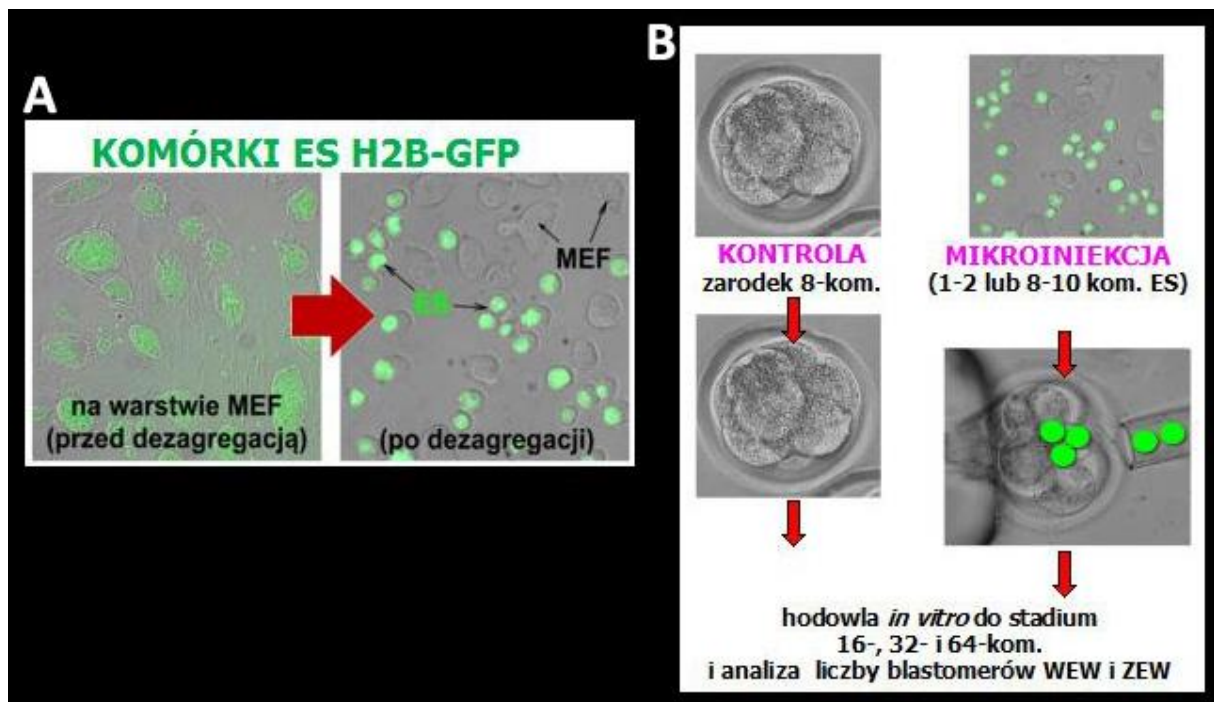
Nie jest do końca jasne, jakie czynniki odpowiadają za wzór podziałów symetrycznych i asymetrycznych w przedimplantacyjnym zarodku myszy. Wiadomo, że regulacja częstości tych dwóch typów podziałów prowadzi do ustalenia się stałej proporcji między populacją komórek TE i ICM, co z kolei jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju zarodka (Fleming, 1987; Bischoff i wsp., 2008). Dezagregując zabarwione podwójnie zarodki 32-komórkowe mogliśmy dokładnie określić liczbę komórek wewnętrznych powstających w I i II rundzie podziałów asymetrycznych. Pozwoliło nam to zaobserwować interesującą zależność. Proporcje komórek wewnętrznych i zewnętrznych, będących prekursorami wężła zarodkowego i trofektodermy, są regulowane przez różną częstość podziałów asymetrycznych w stadium 8- i 16-komórkowym. Niska liczba blastomerów wewnętrznych tworzonych w I turze podziałów asymetrycznych jest kompensowana przez zwiększoną częstość podziałów asymetrycznych w II rundzie i na odwrót: kiedy liczba komórek wewnętrznych powstałych w I turze podziałów asymetrycznych jest wysoka (np. 5), wówczas częstość podziałów asymetrycznych w II rundzie jest niska. Sugeruje to istnienie odwrotnej korelacji między częstością podziałów asymetrycznych w obu turach, dzięki czemu regulowana jest całkowita liczba komórek wewnętrznych w węźle zarodkowym tworzącej się blastocysty. Musi więc istnieć mechanizm komunikacji między komórkami zarodka regulujący, poprzez częstość podziałów asymetrycznych, liczbę generowanych komórek wewnętrznych.

Postawiliśmy hipotezę, według której wzór podziałów bruzdkowania zależy od przestrzennych interakcji między blastomerami. Aby ją zweryfikować postanowiliśmy sprawdzić, w jaki sposób modyfikacja tych interakcji, indukowana obecnością dodatkowych

egzogennych komórek w zarodku, wpływa na wzór podziałów, a w konsekwencji na specyfikację TE i ICM.

Uzyskane wyniki i ich znaczenie:

W tym celu wykorzystaliśmy mysie zarodkowe komórki macierzyste (ES, ang. *embryonic stem cells*), ekspresujące histon H2B w fuzji z GFP, dzięki czemu mogliśmy śledzić los tych komórek w rozwijającym się zarodku (Ryc. 14A). Komórki ES mają charakter komórek wewnętrznych, wywodzą się z epiblastu i po wprowadzeniu do zarodka preferencyjnie lokalizują się w tej właśnie linii komórkowej (Beddington i Robertson, 1989; Poueymirou i wsp., 2007). Co więcej, podobnie jak blastomery wewnętrzne zarodka (Niswander i Martin, 1992; Rappolee i wsp., 1994), komórki ES stanowią źródło FGF4 (Schoorlemmer i Kruijer, 1991; Wilder i wsp., 1997).

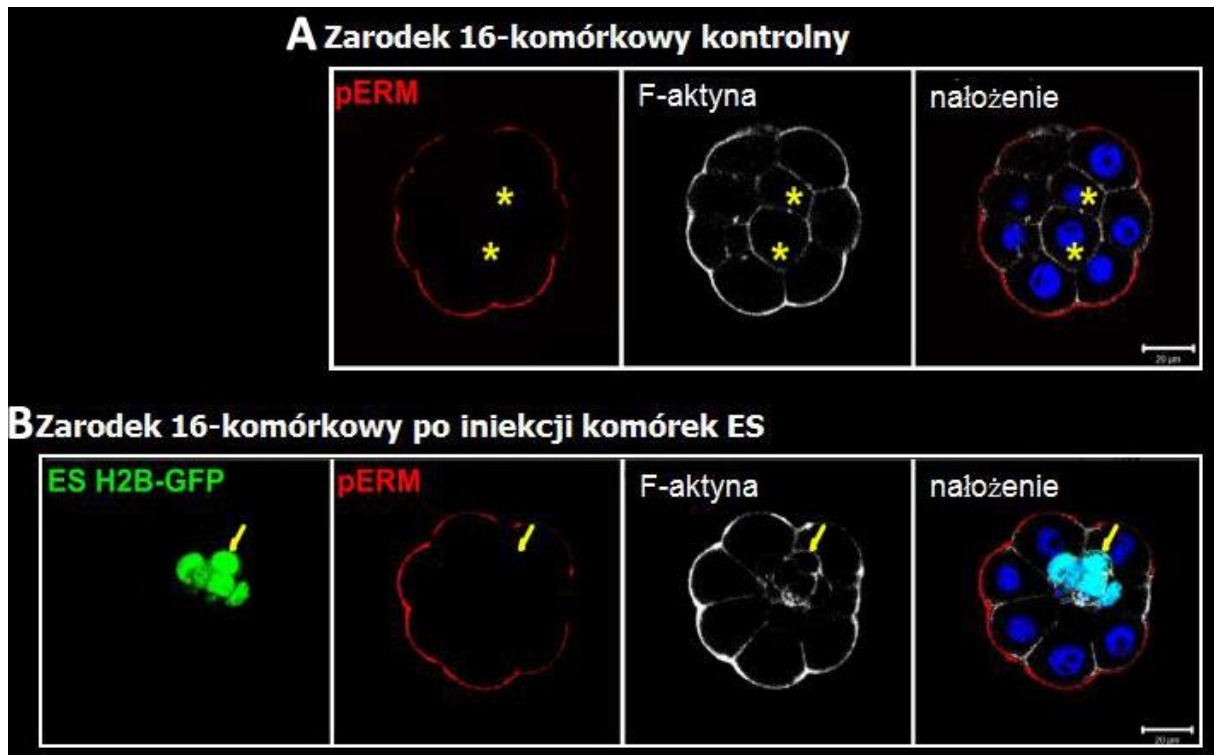


Ryc. 14. Schemat doświadczenia: Wpływ obecności komórek ES na częstość podziałów asymetrycznych w zarodku.

Zdjęcie po lewej stronie przedstawia komórki ES rosnące w koloniach na warstwie odżywczej mysich fibroblastów płodowych (MEF, ang. *mouse embryonic fibroblasts*) oraz w zawieszynie (po dezagregacji). Panel po prawej stronie prezentuje mikroiniekcję komórek ES do zarodków 8-komórkowych.

Komórki ES wprowadzaliśmy do zarodków 8-komórkowych, które w normalnym rozwoju pozbawione są komórek wewnętrznych, i badaliśmy jak ich obecność wpływa na częstość podziałów asymetrycznych w blastomerach w stadium 16- lub 32-komórkowym, a w konsekwencji na liczbę blastomerów wchodzących w skład węzła zarodkowego (Ryc. 14B).

Analizowaliśmy proporcje blastomerów zewnętrznych (polarnych) i wewnętrznych (apolarnych) powstających podczas trzech następujących po sobie podziałów asymetrycznych w zarodkach nastrzykniętych komórkami ES (Ryc. 15B) oraz zarodkach kontrolnych, niepoddawanych manipulacji (Ryc. 15A). Aby rozróżnić blastomery polarne i apolarne, 16-komórkowe zarodki były znakowane na obecność kompleksu białek ezryny, radyksyny i moezyny (pERM; ang. *phosphoezrin radixin moesin*), który jest specyficzny dla komórek polarnych (Yonemura i wsp., 1999).

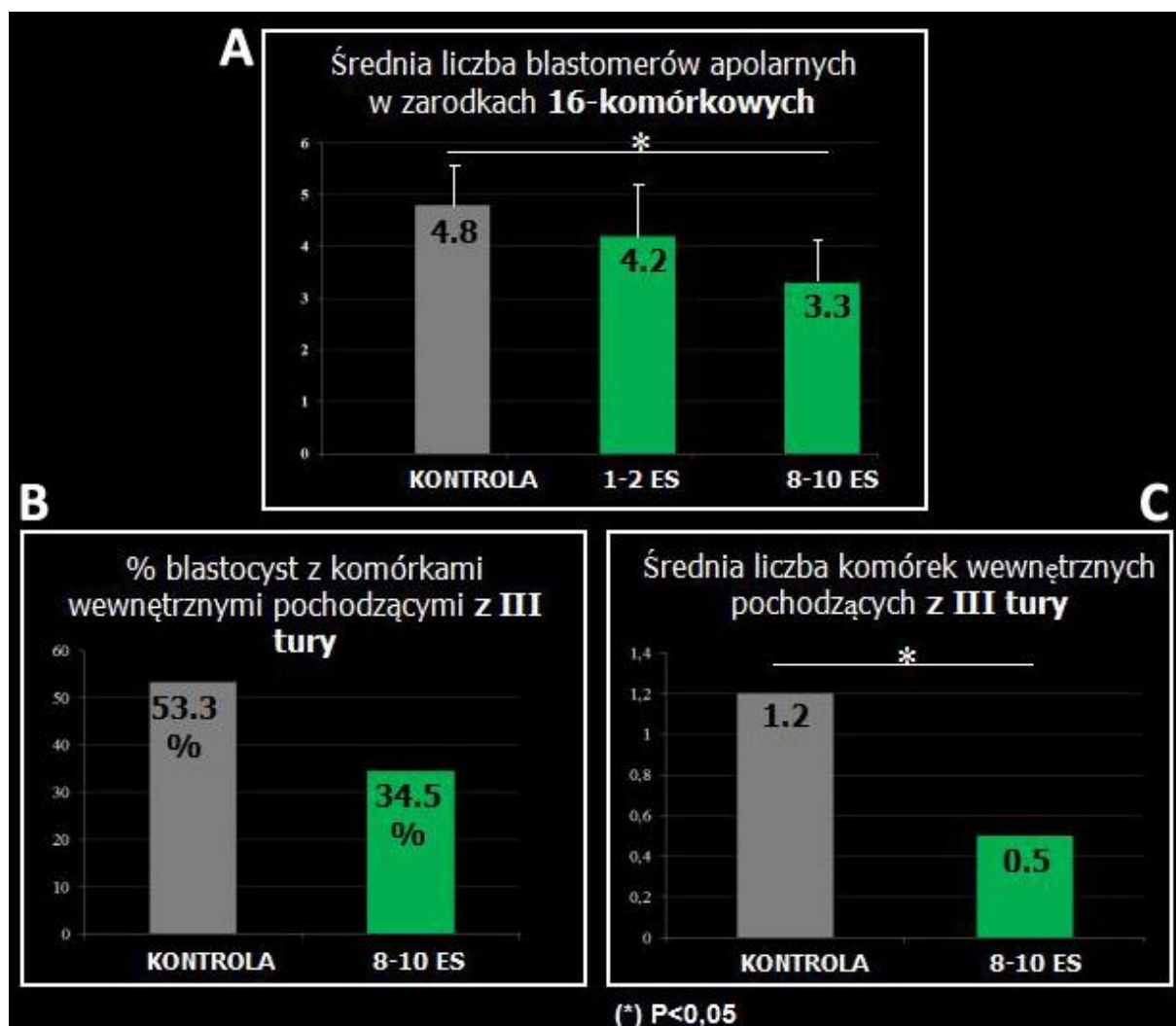


Ryc. 15. Zarodki 16-komórkowe z blastomerami polarnymi (eksprymującymi pERM) i niepolarnymi (nieeksprymującymi pERM)

(A) zarodek kontrolny niepoddawany manipulacjom (gwiazdki wskazują komórki apolarne); (B) zarodek poddany mikroiniekcji 8-10 komórek ES (zaznaczonych żółtą strzałką). Skala: 20 μm .

Wykazaliśmy istnienie dwustopniowego mechanizmu regulującego ostateczne proporcje komórek TE i ICM w blastocystach. Po pierwsze, w zarodkach, do których w stadium 8-komórkowym wprowadzono komórki ES zaobserwowaliśmy spadek częstości podziałów asymetrycznych blastomerów przy przejściu ze stadium 8- do 16-komórkowego (Ryc. 16A). Wpływ obecności dodatkowych komórek na częstość podziałów asymetrycznych był wyraźnie zależny od liczby wprowadzonych komórek ES, co mogłoby sugerować znaczenie przestrzennych oddziaływań między blastomerami w determinowaniu sposobu ich podziału. Kolejna różnica w sposobie podziału blastomerów pomiędzy zarodkami kontrolnymi a zarodkami, w których obecne były komórki ES, wystąpiła dopiero w stadium

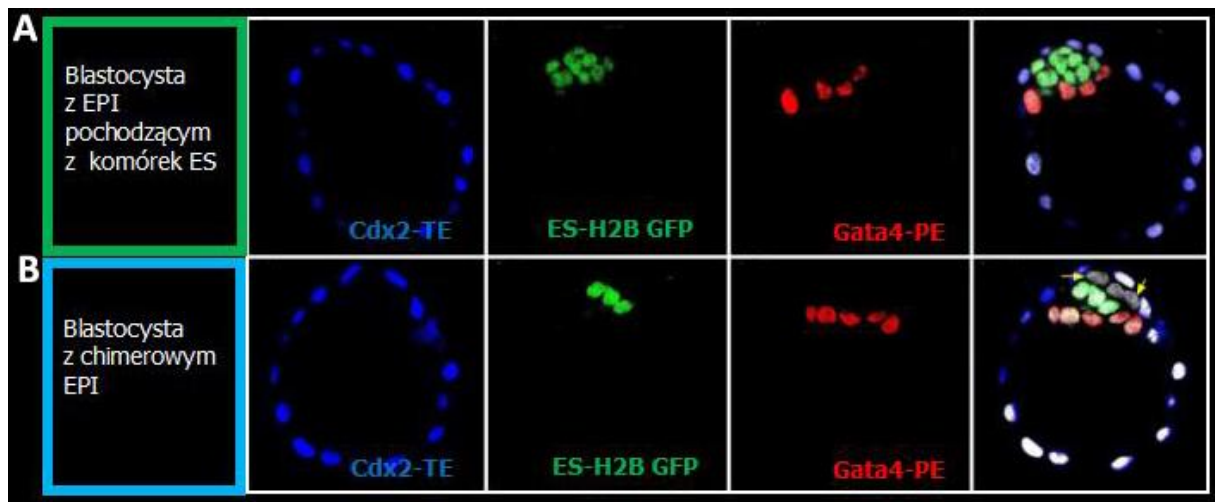
32-komórkowym, w którym część zarodków przechodzi trzecią rundę podziałów asymetrycznych. W zarodkach zawierających komórki ES podział ten zachodził rzadziej w porównaniu do kontroli (Ryc. 16B). Tylko 34,5% blastocyst eksperymentalnych zawierało wewnętrzne komórki pochodzące z III rundy podziałów asymetrycznych w porównaniu do 53% blastocyst kontrolnych (Ryc. 16B). Dodatkowo, w zarodkach zawierających komórki ES stwierdziliśmy dwukrotnie niższą średnią liczbę komórek wewnętrznych wywodzących się z III tury podziałów asymetrycznych w porównaniu do zarodków kontrolnych ($0,5 \pm 0,7$ vs $1,2 \pm 1,3$) (Ryc. 16C).



Ryc. 16. Wpływ egzogennych komórek ES na częstość podziałów asymetrycznych w zarodkach 16-komórkowych

(A) Porównanie średniej liczby komórek apolarnych w 16-komórkowych zarodkach kontrolnych i poddanych mikroiniekcji 1-2 i 8-10 komórek ES w stadium 8-komórkowym; (B) Porównanie blastocyst kontrolnych i doświadczalnych pod kątem obecności komórek wewnętrznych z III tury podziałów asymetrycznych; (C) Porównanie średniej liczby komórek wewnętrznych z III tury w blastocystach kontrolnych i eksperymentalnych (zawierających komórki ES).

Ponieważ wykazaliśmy, że zarodki nastrzyknięte komórkami ES redukują częstość podziałów asymetrycznych w I i III rundzie i w ten sposób regulują ostateczne proporcje komórek ICM i TE w blastocystach, chcieliśmy sprawdzić czy przekłada się to na specyfikację tych dwóch linii komórkowych. Wiadomo, że komórki ES po wprowadzeniu do zarodka preferencyjnie tworzą EPI. Analizując późne blastocysty uzyskane w wyniku hodowli zarodków 8-komórkowych poddanych mikroiniekcji różnej liczby komórek ES stwierdziliśmy, że ich obecność modyfikuje losy komórek własnych zarodka w obrębie ICM, promując ich różnicowanie w linię pozazarodkową (PE i TE). W konsekwencji, epiblast większości zarodków budują wyłącznie komórki potomne ES (70% przypadków; Ryc. 17A).



Ryc. 17. Wpływ obecności komórek ES na losy komórek zarodka-gospodarza

(A) blastocysta, w której EPI zbudowany jest wyłącznie z komórek ES; (B) blastocysta z EPI chimerowym, zbudowanym z komórek ES i komórek własnych zarodka. Skala: 20 μm .

Podsumowując, liczba komórek wewnętrznych i zewnętrznych w bruzdkującym zarodku myszy, a w konsekwencji komórek prekursorowych wężła zarodkowego i trofektodermi, jest kontrolowana przez typ podziałów blastomerów między stadium 8- a 32-komórkowym. Część badaczy sugerowała już wcześniej, chociaż nigdy nie zostało to bezpośrednio dowiedzione, że liczba blastomerów wewnętrznych powstających przy przejściu ze stadium 16- do 32-komórkowego zależy od częstości podziałów asymetrycznych zachodzących w poprzedniej rundzie (Bischoff i wsp., 2008). Wykorzystując komórki ES, będące odpowiednikiem komórek wewnętrznych zarodka, udało nam się eksperymentalnie dowieść, że wzór podziałów blastomerów zarodka (podział symetryczny vs asymetryczny) jest regulowany poprzez oddziaływania zachodzące pomiędzy blastomerami. Wykazaliśmy, że wprowadzenie dużej liczby komórek ES do zarodka 8-komórkowego prowadzi do zmniejszenia częstości podziałów asymetrycznych w I i III rundzie. Chociaż istnienie III rundy podziałów asymetrycznych w części zarodków zostało pokazane już wcześniej w pracy Morris

i wsp. (Morris i wsp., 2010), jej dokładna rola nie była dotychczas znana. Nasze obserwacje wskazują, że w zarodkach 32-komórkowych, do których wcześniej wprowadzono komórki ES, zachodzi ona znacznie rzadziej niż w zarodkach kontrolnych. Oznacza to, że podziały asymetryczne zewnętrznych blastomerów w tym stadium generują komórki wewnętrzne, uzupełniając tym samym pulę komórek tworzących węzeł zarodkowy w sytuacji, gdy ich liczba jest względnie niska po dwóch pierwszych podziałach asymetrycznych.

Nasze badania dowiodły również, że komórki ES wprowadzone do 8-komórkowej moruli zmieniają kierunek różnicowania własnych komórek ICM blastocysty. Wraz ze wzrostem liczby wprowadzonych komórek ES maleje udział komórek własnych zarodka w EPI, a rośnie w PE. Nasze wyniki nie tłumaczą jaki mechanizm jest odpowiedzialny za preferencyjne różnicowanie własnych wewnętrznych komórek zarodka w linię PE. Potencjalna rola interakcji międzykomórkowych z udziałem ścieżki sygnalizacyjnej FGF4/MAPK w regulację rozwoju chimerowego zarodka jest obiektem moich obecnych badań.

4. Wpływ ścieżki FGF4/MAPK na utratę plastyczności komórek węzła zarodkowego blastocysty

Publikacja 4:

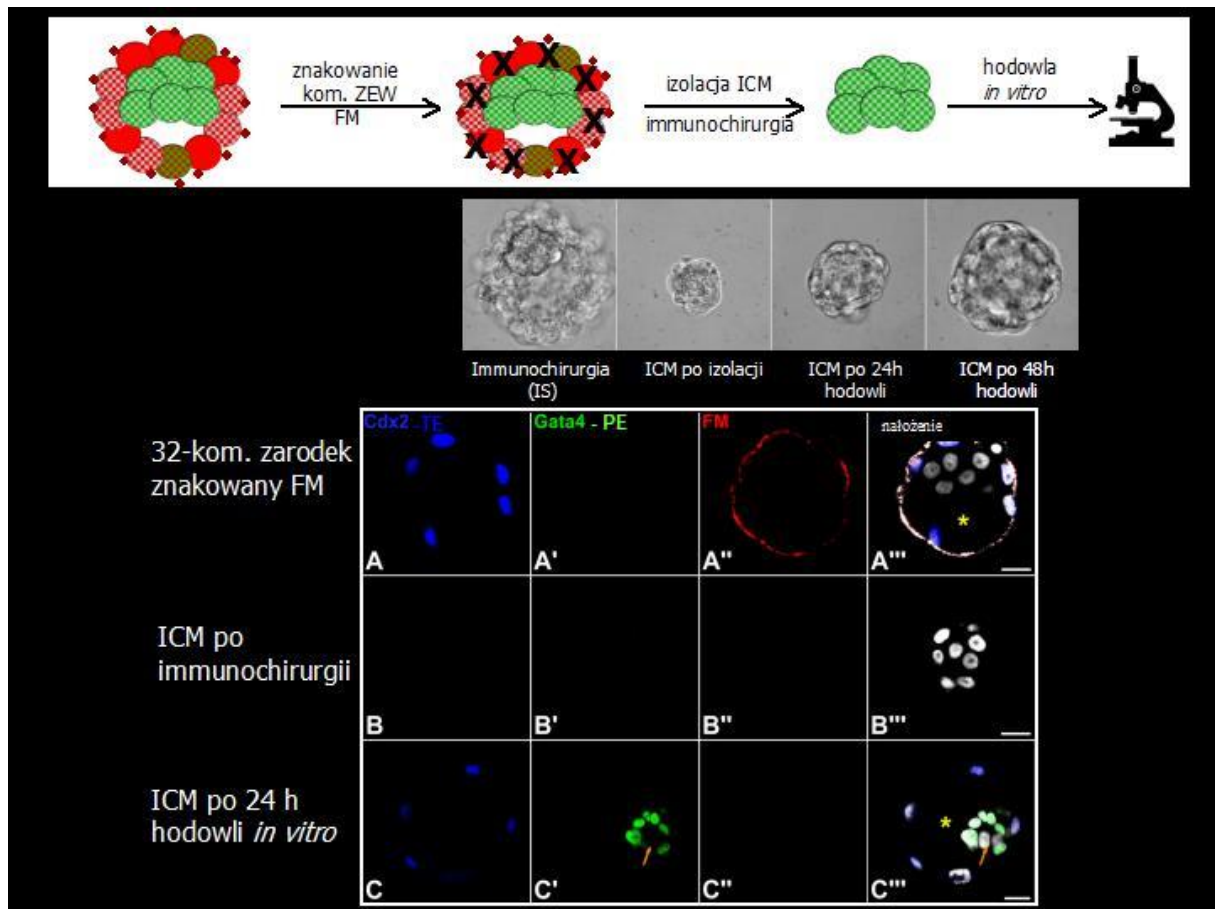
Wigger M., Kisielewska K., Filimonow K., Plusa B., Maleszewski M., **Suwińska A.** (2017). Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *Scientific Reports* 7(1): 15136
(IF ²⁰¹⁶ **4,122**; 5yearIF **4,609**; pkt MNiSW **40**, liczba cytowań: **2**)

Wstęp:

Stadium blastocysty rozciąga się od 32-komórkowego zarodka, w którym zaczyna się dopiero tworzyć jama aż do powstania wyrośniętej blastocysty zawierającej powyżej 150 komórek i gotowej do zagnieżdżenia się w ścianie macicy. Warunkiem niezbędnym do tego aby zarodek myszy (i innych ssaków) pomyślnie zakończył rozwój przedimplantacyjny i był gotowy do implantacji jest precyzyjne rozdzielenie linii zarodkowej, z której powstanie jego ciało, od linii pozazarodkowych – TE i PE, tworzących łożysko i błony płodowe. Dokładny moment, w którym komórki węzła zarodkowego ostatecznie i nieodwracalnie tracą zdolność do tworzenia TE oraz mechanizm odpowiedzialny za ograniczenie tego potencjału nie były dotychczas znane. W okresie okołimplantacyjnym komórki węzła zarodkowego podejmują kolejną decyzję odnośnie kierunku różnicowania, tworząc PE lub EPI. Nie wiadomo było jednak jak długo komórki ICM zachowują plastyczność, definiowaną jako zdolność do zmiany swego losu w alternatywną linię.

Potencjał komórek ICM można badać usuwając z niego warstwę TE i sprawdzając, czy taki izolowany węzeł jest zdolny do odtworzenia tej linii komórkowej. Izolację węzłów zarodkowych przeprowadza się wykorzystując metodę immunochirurgii. Polega ona na

inkubacji blastocyst w roztworze surowicy zawierającej przeciwciała skierowane przeciwko komórkom mysim, a następnie dopełniacza, co w konsekwencji prowadzi do lizy komórek opłaszczonych przeciwciałami, czyli znajdujących się na zewnątrz komórek TE (Ryc. 18).



Ryc. 18. Uzyskiwanie węzłów zarodkowych z 32-komórkowych blastocyst i ich dalszy rozwój *in vitro*

Na górze przedstawiono procedurę immunochirurgii (schemat oraz zdjęcie blastocysty poddanej immunochirurgii i dalsze losy wyizolowanego ICM). Dolny panel prezentuje (A-A''') 32-komórkową kontrolną blastocystę wyznakowaną mikrokulkami fluorescencyjnymi (FM) (żółta gwiazdka wskazuje jamę); (B-B''') węzeł zarodkowy tuż po izolacji z blastocysty i (C-C''') po 24 godzinach hodowli (pomarańczowa strzałka wskazuje komórki EPI). Skala: 20 μm .

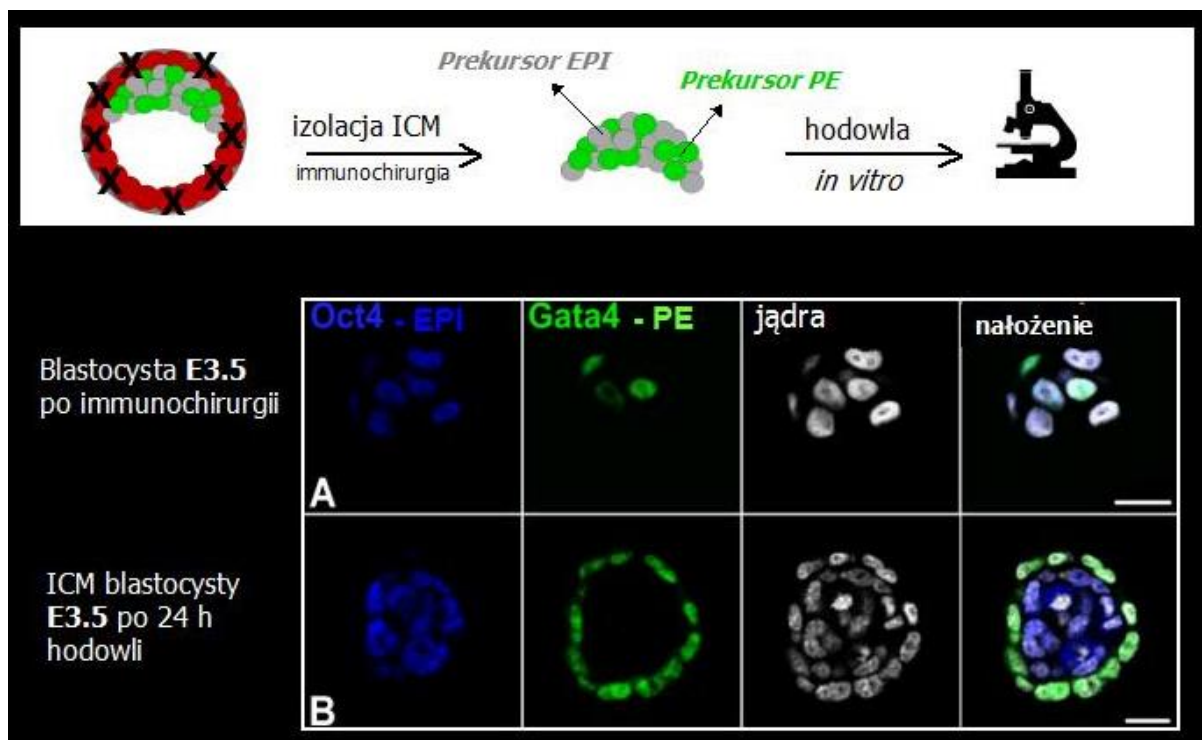
Wyniki i ich znaczenie:

Badania rozpoczęliśmy od sprawdzenia, czy izolowane węzły zarodkowe z wczesnych, 32-komórkowych blastocyst są w stanie odtworzyć usuniętą warstwę TE (Ryc. 18). Aby wykluczyć możliwość, że warstwa TE została odtworzona z oryginalnych komórek TE, które przetrwały procedurę immunochirurgii, tuż przed usunięciem tej warstwy zabarwiliśmy ją fluorescencyjnymi mikrokulkami (Ryc. 18A-A''') (Szczepańska i wsp., 2011). Izolowane ICM utrwalone natychmiast po procedurze immunochirurgii były pozbawione wyznakowanych komórek, co potwierdziło efektywność przeprowadzonej przez nas procedury (Ryc. 18B-B''').

Wykazaliśmy, że węzły zarodkowe wyizolowane z wczesnych blastocyst po 24 godzinach hodowli odtwarzały blastocysty zawierające wszystkie trzy linie komórkowe: CDX2-pozytywną warstwę TE otaczającą jamę, GATA4-pozytywne komórki PE oraz znajdujące się pomiędzy nimi komórki EPI (Ryc. 18C-C’’’). Oznacza to, że w stadium 32-komórkowym komórki ICM nadal są totipotencjalne, czyli zdolne do różnicowania we wszystkie trzy linie komórkowe, włącznie z TE.

W kolejnym etapie doświadczeń sprawdziliśmy, czy zdolność do odtwarzania usuniętej warstwy TE utrzymuje się w 3,5-dniowych, średnich blastocystach, które zawierają już prekursorów komórek PE i EPI, ekspresujące markery specyficzne dla tych linii (Ryc. 19). Wykazaliśmy, że węzły zarodkowe w tym stadium utraciły już zdolność do różnicowania w TE. Zamiast niej formowały na powierzchni warstwę pierwotnej endodermy, która otaczała całkowicie znajdujące się w środku komórki EPI (Ryc. 19B).

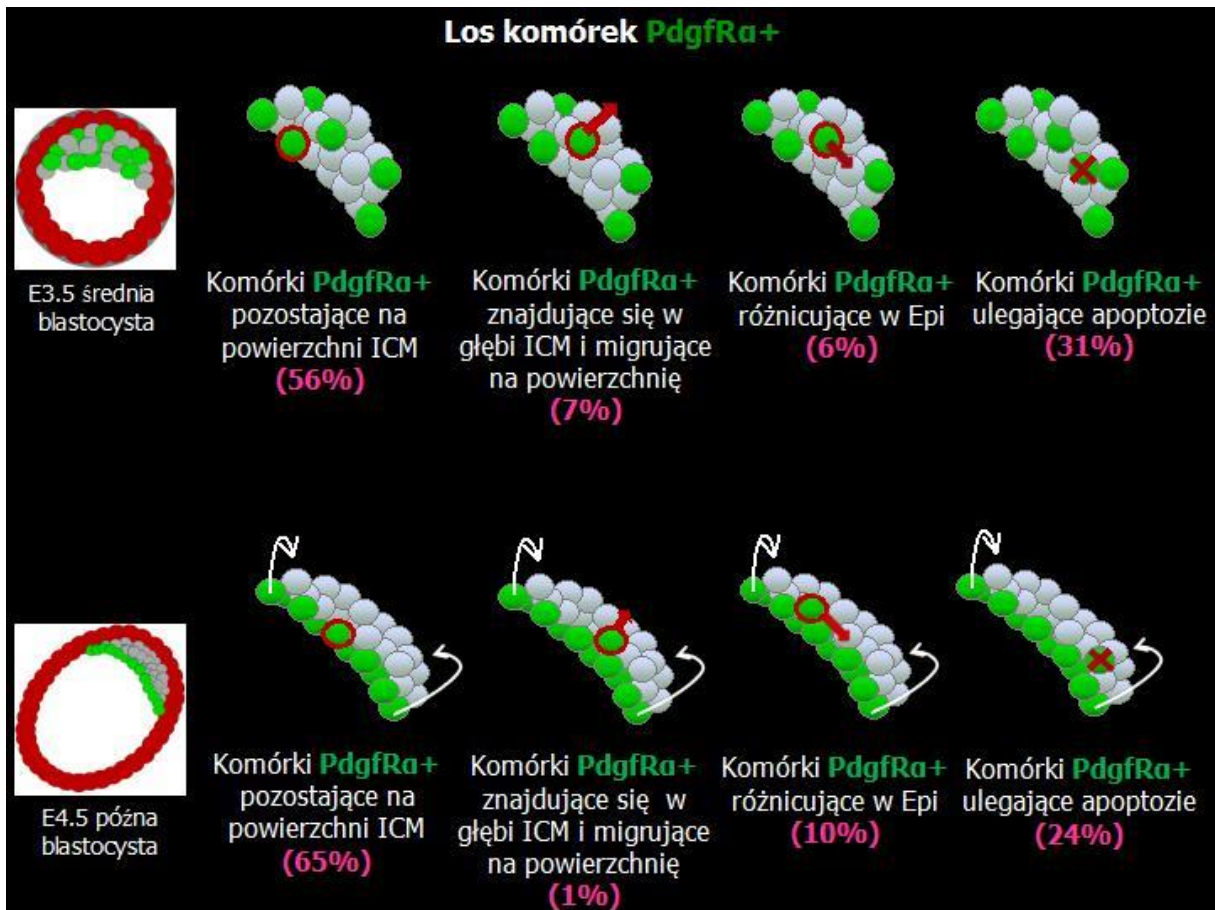
Obserwacja ta nasunęła nam pytanie, czy w tworzeniu warstwy PE otaczającej węzły zarodkowe wzięły udział wyłącznie komórki prekursorowe PE czy również komórki prekursorowe EPI, które po usunięciu TE i wyeksponowaniu na środowisko zewnętrzne uległy przeprogramowaniu w kierunku PE. Chcieliśmy wiedzieć, kiedy następuje ostateczne ukierunkowanie losów komórek w PE i EPI. Odpowiedź otrzymaliśmy filmując izolowane ICM techniką zdjęć poklatkowych (Ryc. 19).



Ryc. 19. Uzyskiwanie węzłów zarodkowych z 64-komórkowych blastocyst i ich dalszy rozwój in vitro

Na górnym panelu przedstawiony jest schemat doświadczenia. Dolny panel prezentuje (A) ICM 64-komórkowej blastocysty tuż po izolacji i (B) po 24 godzinach hodowli. Skala: 20 µm.

Dzięki wykorzystaniu zarodków myszy linii transgenicznej $Pdgfra^{H2B-GFP}$, w których komórki PE oraz ich prekursorzy charakteryzują się zielonym sygnałem fluorescencyjnym w jądrze komórkowym, mogliśmy prześledzić los komórek w obrębie ICM w czasie hodowli *in vitro*. Śledząc losy komórek ekspresyjających PDGFR α dowiedliśmy, że źródłem komórek budujących ostateczną PE w węzłach wyizolowanych z wczesnych, 3,5-dniowych blastocyst są zarówno komórki prekursorowe PE, jak i komórki prekursorowe EPI, w których dochodzi do indukcji ekspresji PDGFR α i w konsekwencji do przekształcenia się w komórki PE.



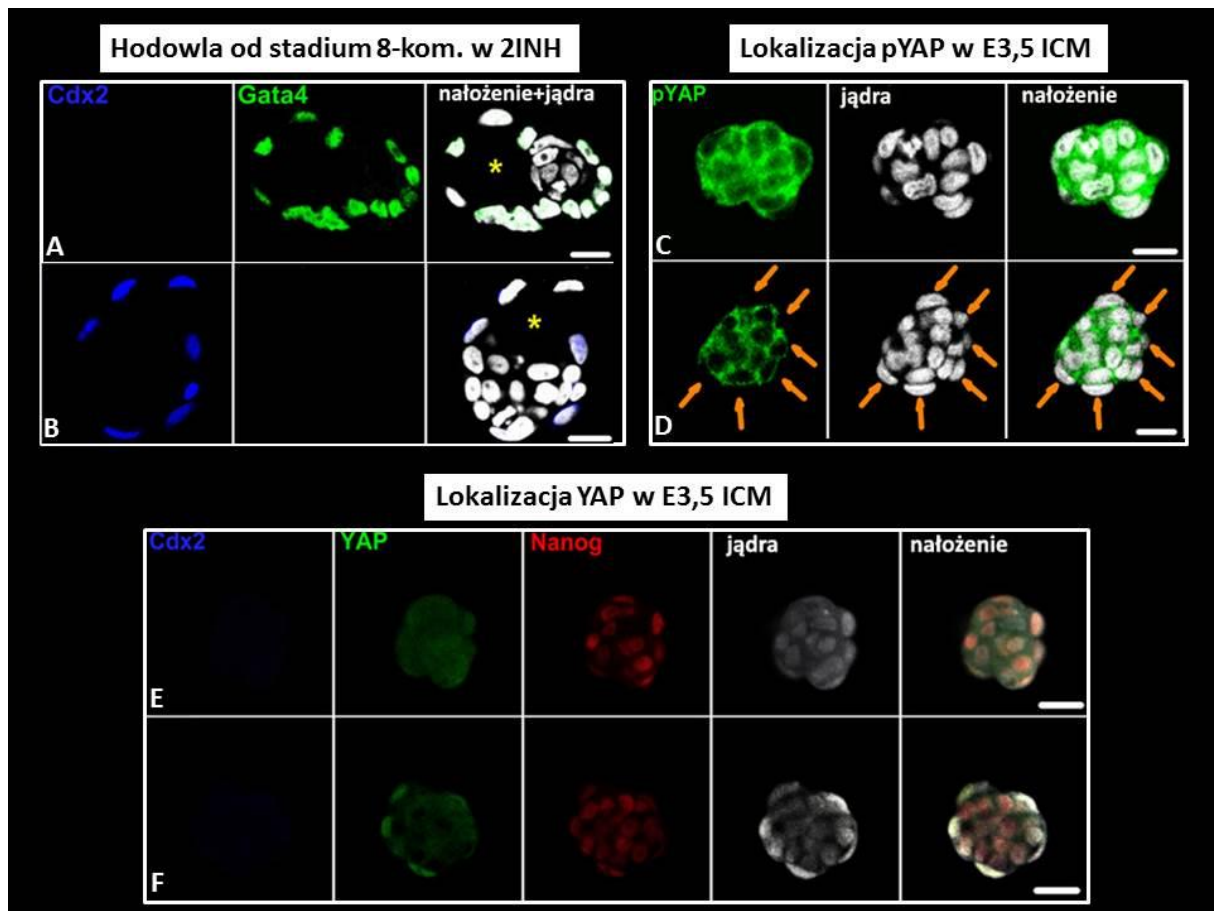
Ryc. 20. Los komórek ekspresyjających PDGFR α w blastocystach E3,5 i E4,5.

Dokładna analiza filmów poklatkowych i możliwość śledzenia losu indywidualnych komórek ekspresyjających PDGFR α w węzłach zarodkowych pozwoliła nam wysunąć konkluzję, że ostateczny los komórek jest wypadkową kilku różnych zjawisk, takich jak informacja pozycyjna decydująca o tym, że komórki PE ułożone na powierzchni węzła zarodkowego pozostają tam i nie zmieniają swego położenia, a także zdolność komórek do migracji i selektywnej apoptozy w przypadku, gdy zajmują one pozycję niezgodną ze swoim profilem ekspresji (Ryc. 20). Tożsamość komórek, wyrażona ekspresją genów specyficznych dla PE i EPI, nie jest czynnikiem wystarczającym, ale znacząco wpływa na decyzję o losie komórek, czyli ich różnicowaniu w konkretną linię.

Aby określić, jak długo komórki ICM zachowują plastyczność, postanowiliśmy zbadać, czy warstwa PE otaczająca wyizolowany ICM pochodzący z późnej, 4,5-dniowej blastocysty jest odtwarzana z komórek PE obecnych wyjściowo na fragmencie jego powierzchni, czy z komórek EPI, nadal zdolnych do zmiany kierunku różnicowania. Wykorzystując dwie metody: znakowania komórek PE barwnikiem fluorescencyjnym wstrzykiwanym przy pomocy mikromanipulatora do jamy blastocysty oraz filmowania poklatkowego stwierdziliśmy, że głównym źródłem komórek obrastających węzeł zarodkowy są komórki PE obecne na powierzchni ICM w momencie izolacji z blastocysty (Ryc. 20). Ostateczną warstwę PE zasilały dodatkowo nieliczne komórki prekursorowe EPI, w których dochodziło do indukcji ekspresji PDGFR α w trakcie hodowli *in vitro* oraz komórki prekursorowe PE, które w chwili rozpoczęcia hodowli znajdowały się we wnętrzu ICM, ale ostatecznie lokowały się w docelowej, powierzchniowej warstwie (Ryc. 20). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że komórki PE i EPI w węźle zarodkowym 4,5-dniowej blastocysty są już w większości przesortowane, a ich los jest zdeterminowany. Komórki PE i EPI w tym stadium zachowują jednak jeszcze plastyczność, ponieważ wciąż możliwe jest przekształcanie się zarówno komórek EPI w PE, jak i utrata sygnału przez komórki PE i przekształcanie ich w komórki EPI.

Ponieważ zauważyliśmy, że utrata zdolności komórek ICM do różnicowania w TE zbiega się w czasie z pojawieniem się prekursorów PE i EPI postanowiliśmy sprawdzić, czy zablokowanie aktywności ścieżki sygnalizacyjnej FGF4/MAPK wpłynie na utrzymanie plastyczności komórek ICM, czyli zachowanie ich zdolności do tworzenia TE. Aby przetestować tę hipotezę inkubowaliśmy zarodki od stadium 8-komórkowego w pożywce z dodatkiem inhibitorów blokujących aktywność ścieżki FGF4/MAPK (tzw. warunki 2INH; Yamanaka i wsp., 2010). W stadium 3,5-dniowej blastocysty izolowaliśmy węzły zarodkowe, które hodowaliśmy przez kolejne 24 lub 48 godzin. W przeciwieństwie do kontrolnych węzłów hodowanych w standardowej pożywce, które formowały warstwę PE na swojej powierzchni (Ryc. 21A), wszystkie węzły pochodzące z blastocyst, w których zablokowaliśmy ścieżkę FGF4/MAPK, odtwarzały warstwę CDX2-pozytywnych komórek TE (Ryc. 21B). Te wyniki pokazują, że aktywacja ścieżki FGF4/MAPK prowadzi do ograniczenia plastyczności komórek węzłów zarodkowych. Aby zbadać dokładny mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko, przeanalizowaliśmy 3,5-dniowe węzły zarodkowe, hodowane od stadium 8-komórkowego w warunkach 2INH. pod kątem obecności komponentów ścieżki Hippo – pYAP (ang. *phospho-Yes-associated protein*) oraz YAP. Wiadomo bowiem, że proces tworzenia TE i ICM jest regulowany przez szlak przekazywania sygnału komórkowego Hippo (Nishioka i wsp., 2008, 2009; Ralston i wsp., 2010; Cockburn i wsp., 2013; Hirate i wsp., 2013; Lorthongpanich i wsp., 2013; Anani i wsp., 2014). Według naszej hipotezy zablokowanie ścieżki FGF4/MAPK utrzymuje zdolność węzłów zarodkowych do odtwarzania TE w wyniku inaktywacji ścieżki Hippo. Udało nam się pozytywnie zweryfikować postawioną hipotezę, wykazując brak pYAP w cytoplazmie (Ryc. 21D) oraz obecność jądrowego białka YAP (Ryc. 21F) w zewnętrznych komórkach ICM po 24 godzinach hodowli w pożywce 2INH., co dowodzi defosforylacji tego białka i jego przemieszczenia się z cytoplazmy do jądra komórkowego. Wiadomo bowiem, że jądrowa akumulacja białka YAP umożliwia jego interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym

TEAD4, co w konsekwencji indukuje transkrypcję białka CDX2 odpowiedzialnego za różnicowanie TE.



Ryc. 21. Wpływ inhibicji FGF4/MAPK na izolowane węzły zarodkowe blastocysty E3,5

(A) kontrolny ICM izolowany z blastocysty E3,5; (B) ICM izolowany z blastocysty E3,5 hodowanej od stadium 8-komórkowego w warunkach 2INH; (C i D) Lokalizacja białka pYAP w ICM tuż po izolacji z blastocysty E3,5 (C) i po 24 godzinach hodowli (D); (E i F) Lokalizacja jądrowego YAP w ICM tuż po izolacji z blastocysty E3,5 (E) i po 24 godzinach hodowli (F). Skala: 20 μ m.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych przez nas wyników możemy jednoznacznie stwierdzić, że komórki węzła zarodkowego od stadium 3,5-dniowej blastocysty bezpowrotnie utraciły zdolność do różnicowania w komórki trofektodermy. Wykazaliśmy ponadto, że utrata totipotencji przez komórki ICM następuje w wyniku aktywacji ścieżki FGF4/MAPK i zbiega się z formowaniem prekursorów PE i EPI. Po raz pierwszy powiązaliśmy ze sobą ścieżkę Hippo ze ścieżką FGF4/MAPK, które do tej pory uważane były za działające odrębnie i odpowiadające za różne etapy różnicowania komórkowego (odpowiednio TE vs ICM i PE vs EPI). Po tym pierwszym etapie ograniczenia potencjału rozwojowego, gdy komórki ICM tracą już zdolność do różnicowania w TE, nadal zachowują dużą plastyczność w kontekście ostatecznego wyboru jednej z dwóch dróg różnicowania - w PE lub EPI. Ta plastyczność

rozwojowa komórek ICM zanika stopniowo wraz z segregacją tych komórek w odrębne warstwy. Potwierdziliśmy tym samym doniesienia innych autorów pokazujące, że ekspresja czynników transkrypcyjnych specyficznych dla linii PE i EPI nie jest wystarczająca do determinacji ich losu (Yamanaka i wsp., 2010; Grabarek i wsp., 2012; Kang i wsp., 2013). Jednocześnie, w przeciwieństwie do innych autorów (Grabarek i wsp., 2012) stwierdziliśmy, że jeszcze w okresie okołoinplantacyjnym obecne są w zarodku nieliczne niezdeteminowane komórki PE i EPI, które mogą ulec przeprogramowaniu.

Nasze badania pokazują, że wyodrębnianie linii EPI i PE w obrębie węzła zarodkowego blastocysty jest złożonym, kilkietapowym procesem. Zarówno liczba, proporcje, jak i ostateczna lokalizacja komórek PE i EPI budujących węzeł zarodkowy są ściśle regulowane dzięki współdziałaniu takich czynników, jak: tożsamość komórki wyrażona ekspresją specyficznych genów, indukcja pozycyjna, a także zdolność komórek do migracji, przeprogramowania oraz selektywnej apoptozy. Ponieważ węzły zarodkowe blastocyst są źródłem komórek ES, rezultaty naszych badań nie tylko wzbogacają wiedzę na temat determinacji losów komórek w zarodku i czynników odpowiedzialnych za formowanie linii komórkowych, ale mogą również przyczynić się do optymalizacji procedury uzyskiwania nowych linii komórek macierzystych.

PODSUMOWANIE

Przedimplantacyjny zarodek myszy cechuje się dużą tolerancją na eksperymentalne zaburzenie jego rozwoju, wykazując wysoki poziom plastyczności i samoorganizacji. O losie komórek we wczesnym zarodku decydują interakcje międzykomórkowe oraz sygnały przestrzenne, dzięki czemu zmniejszenie lub zwiększenie liczby komórek czy też zmiana ich położenia nie uniemożliwia normalnej embriogenezy, która może zakończyć się narodzinami zdrowego osobnika. Pomimo wielu dowodów na regulacyjny charakter rozwoju zarodka myszy, mechanizmy odpowiedzialne za ten fenomen w dużej mierze pozostawały nieznane. Rezultaty naszych doświadczeń rzucają nowe światło na ten szczególny aspekt embriogenezy ssaków. Jesteśmy jedną z nielicznych grup badawczych, zajmujących się przedimplantacyjnym rozwojem myszy pod kątem ich zdolności regulacyjnych. W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp w badaniach mających na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów powstawania pierwszych linii komórkowych. Połączenie w naszym przypadku nowoczesnych technik i narzędzi biologii molekularnej z tradycyjnymi metodami embriologii eksperymentalnej, w tym obejmującymi manipulacje na pojedynczych komórkach, oraz rejestrowaniem rozwoju zarodka na filmach poklatkowych i komputerową analizą obrazu pozwoliło na stworzenie pełniejszego obrazu oddziaływań międzykomórkowych zachodzących w trakcie formowania zarodka i poznanie przynajmniej części z wielu skomplikowanych mechanizmów zapewniających kontrolę przebiegu jego rozwoju.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

Oprócz czterech prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe jestem także współautorką 5 prac oryginalnych i 7 przeglądowych.

Publikacja 1: ORYGINALNA - OPARTA NA WYNIKACH PRACY MAGISTERSKIEJ

Suwinska A., Ozdzinski W., Waksmundzka M., Tarkowski A.K. (2005). Experimentally produced diploid – triploid mouse chimaeras develop up to adulthood. *Molecular Reproduction and Development* 72: 362-376

(IF²⁰⁰⁶ **2.220**; 5yearIF -; pkt MNiSW **20**, liczba cytowań **10**)

Pracę naukową w Zakładzie Embriologii rozpoczęłam od badania potencjału rozwojowego komórek triploidalnych w mysich zarodkach chimerowych diploidalno <-> triploidalnych. Zarodki chimerowe są użytecznym modelem doświadczalnym do badania zarówno przebiegu normalnej embriogenezy, jak i różnych anomalii rozwojowych. Triploidia jest aberracją chromosomową pojawiającą się spontanicznie u wielu gatunków zwierząt, w tym u człowieka, u którego występuje z częstością 1-3% wszystkich zarodków. Mozaicyzm diploidalno <-> triploidalny zdarza się jeszcze rzadziej (van de Laar i wsp., 2002). W przeciwieństwie do zarodków czysto triploidalnych, mozaiki typu 2n <-> 3n rozwijają się lepiej i charakteryzują się większą żywotnością. Ze względu na to, że triploidy i mozaiki 2n <-> 3n stanowią u człowieka znaczący odsetek poronień i zgonów okołourodzeniowych, a liczba dostępnego materiału do badań jest ograniczona, w ramach pracy magisterskiej miałam za zadanie eksperymentalnie wywołać tę anomalię u myszy. Stworzenie odpowiedniego modelu zwierzęcego mogłoby rzucić światło na genezę tych zaburzeń u człowieka i umożliwiłoby dokładniejsze zbadanie ich efektów rozwojowych.

Praca oparta na wynikach mojego magisterium opisuje pierwszą udaną próbę uzyskania diploidalno <-> triploidalnych zarodków, płodów i osobników dorosłych u myszy. Komponent triploidalny tworzyliśmy traktując oocyty inhibitorem cytokinezy - cytochalazyną D, a chimery uzyskiwaliśmy metodą agregacji 4- lub 8-komórkowych zarodków diploidalnych i 4-komórkowych zarodków triploidalnych. Wykazaliśmy, że w początkowych etapach rozwoju zarodkowego komórki triploidalne utrzymują się i są w równym stopniu reprezentowane zarówno w tkankach zarodkowych, jak i pozazarodkowych. Pomimo wyraźnej redukcji odsetka komórek triploidalnych w drugiej połowie ciąży, w otoczeniu prawidłowych komórek diploidalnych mogą się one utrzymywać przez cały okres ciąży, a nawet po urodzeniu, nie powodując u narodzonych młodych żadnych widocznych zaburzeń rozwojowych. Dowodem na to są uzyskane przez nas prawidłowe dorosłe osobniki chimerowe diploidalno <-> triploidalne, z których część potwierdziła swoją płodność.

PRACE ORYGINALNE - OPARTE NA WYNIKACH PRACY DOKTORSKIEJ

Publikacja 2:

Suwinska A., Czolowska R., W., Tarkowski A.K (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Developmental Biology* 322: 133-144
(IF²⁰⁰⁸ **4,416**; 5yearIF **4,677**; pkt MNiSW **24**, liczba cytowań **92**)

Publikacja 3:

Suwinska A., Tarkowski A.K., Ciemerych M.A. (2010). Pluripotency of bank vole embryonic cells depends on FGF2 and activin A signaling pathways, *International Journal of Developmental Biology* 54(1): 113-124
(IF²⁰¹⁰ **2.856**; 5yearIF **2.961**; pkt MNiSW **27**, liczba cytowań **4**)

Kolejne prowadzone przeze mnie badania stały się podstawą mojej pracy doktorskiej. Dotyczyły one różnych aspektów różnicowania się komórek we wczesnych zarodkach dwóch gatunków gryzoni - myszy i nornicy rudej.

Pierwsza część moich doświadczeń, które weszły w skład jednej z publikacji (Suwińska i wsp., 2008), poświęcona była wyodrębnianiu się dwóch pierwszych linii komórkowych we wczesnym rozwoju zarodkowym myszy. Przeprowadzone doświadczenia miały na celu zbadanie potencjału rozwojowego wewnętrznych i zewnętrznych komórek 16- oraz 32-komórkowego zarodka (wczesnej blastocysty) najbardziej wiarygodnym testem, czyli poprzez zbadanie ich zdolności do rozwoju, bez wsparcia innych komórek, w dorosłe zwierzęta. Udało nam się wykazać, że zarówno wewnętrzne, jak i zewnętrzne blastomery zarodków 16-komórkowych, w przeciwieństwie do 32-komórkowych, mogą utworzyć prawidłowo zbudowane blastocysty, które po przeszczepieniu do dróg rodnych samicy biorczyńni rozwijają się w zdrowe, płodne osobniki. Co ważne, dowiedliśmy również, że blastomery w tak skonstruowanych zarodkach mogą zmieniać swój program rozwojowy, modyfikując ekspresję genów kluczowych dla rozwoju wężła zarodkowego i trofektodermi, zgodnie ze swoim nowym położeniem (wewnątrz lub na zewnątrz). Nasze badania pokazały, że zaburzenie struktury zarodka poprzez całkowite przestrzenne przemieszanie blastomerów nie niweczy szans na jego dalszy rozwój, a za regulację tego rozwoju odpowiadają dwa mechanizmy: sortowania komórek oraz przeprogramowania ekspresji genów kluczowych dla procesu różnicowania.

Celem drugiej części moich doświadczeń, których wyniki zostały opublikowane w kolejnej pracy (Suwińska i wsp., 2010), było zbadanie zdolności komórek zarodkowych nornicy rudej do utrzymania pluripotentnego charakteru podczas hodowli *in vitro* i ustalenie optymalnych warunków hodowli pozwalających na uzyskanie z nich zarodkowych komórek macierzystych (komórek ES). Wykazaliśmy, że warunki hodowli optymalne dla uzyskania i

hodowli mysich komórek ES nie pozwalają na wyprowadzenie komórek o podobnych właściwościach z zarodków nornicy. W trakcie hodowli *in vitro* komórki wężła zarodkowego nornicy znacznie szybciej niż komórki myszy tracą ekspresję genu OCT4, co wiąże się z utratą przez nie zdolności do samoodnowy i prowadzi do różnicowania się w kierunku pierwotnej endodermy. W przeciwieństwie do myszy, zwiększenie aktywności czynnika przeciwbiałaczkowego LIF (ang. *leukaemia inhibitory factor*) oraz obecność warstwy odżywczej fibroblastów płodowych myszy i nornicy rudej nie hamują różnicowania się nornicznych komórek zarodkowych *in vitro*. Udało nam się natomiast wykazać, że kombinacja FGF2 w połączeniu z aktywiną A umożliwia utrzymanie ekspresji markera pluripotencji OCT4 w rozrostach blastocyst nornicy, co wskazuje na to, że ścieżki sygnalizacyjne działające w ludzkich, a nie w mysich komórkach ES, mogą być zaangażowane w proces samoodnowy zarodkowych komórek nornicy.

PRACE PRZEGLĄDOWE

Publikacja 4:

Witkowska A., Ciemerych M.A., **Suwińska A. (2010)**. Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste – regulacja pluripotencji i różnicowania. *Postępy Biologii Komórki* 37: 23-40 (IF²⁰¹⁰ **0,077**; pkt MNiSW **9**, liczba cytowań **2**)

Publikacja 5:

Suwińska A., Lenkiewicz A. **(2010)**. Pierwotne linie komórkowe w zarodku myszy – źródło zarodkowych komórek macierzystych. *Postępy Biologii Komórki* 37: 3-21 (IF²⁰¹⁰ **0,077**; pkt MNiSW **9**, liczba cytowań **1**)

Publikacja 6:

Suwińska A. and Ciemerych M.A. **(2011)**. Factors regulating pluripotency and differentiation in early mammalian embryos and embryo-derived stem cells In '*Vitamins and Hormones*' ed. by Litwack G. (Elsevier), 87: 1-37 (IF **2,190**; 5yearIF **2,918**; pkt MNiSW **30**, liczba cytowań **6**)

Publikacja 7:

Suwińska A. (2012). Preimplantation mouse embryo: Developmental fate and potency of blastomeres In '*Results and Problems in Cell Differentiation*' ed. by Kubiak J.Z. (Springer Verlag), 55: 141-163

Publikacja 8:

Filimonow K., Krupa M., **Suwińska A. (2013)**. Pierwsze decyzje rozwojowe: różnicowanie komórek w przedimplantacyjnym zarodku myszy. *Postępy Biochemii* 2: 59 (pkt MNiSW **8**)

Kolejny etap mojej działalności naukowej, który przypadł na okres realizacji grantu POMOST Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, zaowocował nie tylko pracą oryginalną (Krupa i wsp., 2014), która weszła w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego, ale również opublikowaniem szeregu prac przeglądowych, w tym: trzech opublikowanych w czasopiśmie krajowym, jednej w czasopiśmie zagranicznym oraz jednej anglojęzycznej monografii naukowej. Artykuły te przybliżają zjawiska towarzyszące najwcześniejszemu okresowi embriogenezy myszy: bruzdkowanie, różnicowanie się komórek i formowanie ich w tkanki. Wraz z doktorantką i studentkami, wykonującymi prace pod moim kierunkiem, zebraliśmy w nich informacje o tym, jakie mechanizmy, w tym czynniki transkrypcyjne oraz ścieżki sygnalizacyjne, sterują tymi procesami. Odkrycie różnych rodzajów komórek macierzystych, które odzwierciedlają właściwości linii komórkowych blastocysty, otworzyło nowy rozdział w badaniach wczesnych etapów rozwoju ssaków. Prace przeglądowe mojego autorstwa ukazują w jakim stopniu badanie mechanizmów odpowiedzialnych za samoodnowę i różnicowanie komórek macierzystych różnych gatunków ssaków może wpływać na lepsze zrozumienie pierwszych krytycznych decyzji dotyczących przeznaczenia komórek podejmowanych w zarodku.

Publikacja 9: PRACA ORYGINALNA

Bożyk K., Gilecka K., Humięcka M., Szpila M., **Suwińska A.**, Tarkowski A.K., (2017).
Mouse<->rat aggregation chimaeras can develop to adulthood. *Developmental Biology*
427: 106-120
(IF²⁰¹⁷ **3,262**; 5yearIF **3,290**; pkt MNiSW **35**; liczba cytowań **2**)

W ciągu następnych kilku lat mojej działalności naukowej byłam zaangażowana również jako wykonawca w grantie kierowanym przez Profesora Andrzeja K. Tarkowskiego dotyczącym rozwoju chimer międzygatunkowych szczurzo <-> mysich. Po śmierci Pana Profesora przejął nadzór nad tymi badaniami, czego efektem było dokończenie doświadczeń i opublikowanie pracy, w której jestem autorem korespondencyjnym. Celem doświadczeń wykonywanych w ramach tego grantu było zbadanie, czy mechanizmy kontrolujące rozwój ssaków są uniwersalne. Chcieliśmy odpowiedzieć na pytanie, czy komórki różnych gatunków ssaków, dość odległych ewolucyjnie, są w stanie porozumieć się podczas embriogenezy i czy takie zarodki są zdolne do implantacji i do pełnego rozwoju aż do urodzenia. Chimery międzygatunkowe tworzone były metodą agregacji 8-komórkowych zarodków myszy i szczura, ekspresujących różne białka fluorescencyjne (GFP i RFP). Dzięki temu możliwa była identyfikacja i śledzenie losu komórek obu gatunków we wszystkich stadiach rozwojowych oraz po urodzeniu na filmach poklatkowych. Udało nam się zaobserwować, że w przeciwieństwie do komórek mysich, komórki szczurze ulegały selektywnej eliminacji z zarodka. Chcąc sprawdzić, czy może to wynikać z braku komunikacji między komórkami obu gatunków rozdzieliliśmy zarodki mysie i szczurze na pojedyncze

komórki, a następnie ponownie je losowo zagregowaliśmy. Zauważyliśmy, że niezależnie od pierwotnego rozmieszczenia komórek, komórki obu gatunków segregowały się w taki sposób, że ostatecznie układały się w odrębne, jednogatunkowe regiony, co może świadczyć o odmiennych właściwościach adhezyjnych komórek obu gatunków i różnicach w sygnalizacji międzykomórkowej. Transplantacja chimerowych zarodków do dróg rodnych samic myszy pozwoliła nam wykazać, że łożyska rozwijających się płodów zbudowane były wyłącznie z komórek mysich, co świadczy o tym, że zgodność gatunkowa zarodkowej części łożyska i matki-biorczyni warunkuje rozwój zarodków chimerowych po implantacji. Chimery rozwijały się w tempie charakterystycznym dla myszy, rodziły się zgodnie z mysim harmonogramem rozwoju i miały mysi fenotyp, a wzór i zasięg chimeryzmu w tkankach powstałych chimer były bardzo zróżnicowane.

Podsumowując, wykazaliśmy, że chociaż mysie i szurcze komórki są zdolne do komunikacji w początkowych etapach embriogenezy, to w wielu przypadkach organogeneza takich chimerowych zarodków jest silnie zaburzona i uniemożliwia formowanie funkcjonalnych narządów. Nasze obserwacje są o tyle ważne, że w ostatniej dekadzie opublikowanych zostało kilka prac, których celem było utworzenie chimer międzygatunkowych posiadających specyficzny narząd zbudowany z komórek jednego z gatunków. W świetle ogromnego deficytu ludzkich narządów do przeszczepów te doświadczenia rozbudziły wielkie nadzieje na produkcję ludzkich narządów w organizmach zwierząt (przegląd w: De Los Angeles i wsp., 2018).

Publikacja 10: PRACA ORYGINALNA

Filimonow K., Saiz N., **Suwińska A.**, Wyszomirski T., Grabarek J.B., Ferretti E., Piliszek A., Plusa B., Maleszewski M. (2019). No evidence of involvement of E cadherin in cell fate specification or the segregation of Epi and PrE in mouse blastocysts, *PLoS One Feb 8;14(2):e0212109*

(IF²⁰¹⁷ 2,766; 5yearIF 3,352; pkt MNiSW 40; liczba cytowań -)

Ostatnia z oryginalnych prac, których jestem współautorką, dotyczy roli białka adhezyjnego kadheryny E w tworzeniu PE w zarodkach myszy. Prace nad tą publikacją zapoczątkowane zostały w trakcie doktoratu Pani dr Katarzyny Filimonow, której byłam promotorem pomocniczym. Praca powstała we współpracy z dr Bereniką Płusą z Uniwersytetu w Manchesterze, dr Elisabetta Ferretti z Uniwersytetu w Kopenhadze oraz dr Anną Piliszek z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN.

Wykazaliśmy, że pierwsze różnice dotyczące poziomu ekspresji kadheryny E między komórkami EPI i PE pojawiają się dopiero w późnych, 4,5-dniowych blastocystach. Pomiędzy komórkami PE w tym stadium kadheryny E jest mniej, niż pomiędzy komórkami EPI. Ponadto, komórki PE, znajdujące się na powierzchni ICM, wykazują spolaryzowaną lokalizację kadheryny E, czego odzwierciedleniem jest brak tego białka w apikalnej części

blony, a obecność w jej części bocznej i podstawnej. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy jądrową lokalizację kadheryny E w komórkach PE, co może mieć znaczenie w ochronie komórek tej linii przed apoptozą. Aby dokładniej przyjrzeć się roli, jaką kadheryna E mogłaby pełnić w zarodku, zbadaliśmy wpływ obniżenia poziomu kadheryny E (przy użyciu dsRNA; ang. *double stranded RNA*) na kierunek różnicowania blastomerów. Nie zaobserwowaliśmy jednak preferencyjnej lokalizacji ani różnicowania w kierunku PE komórek w zarodku, co wyklucza rolę tego białka w tworzeniu tej linii komórkowej i procesie segregacji. Według naszych badań kadheryna E może natomiast odgrywać rolę w dalszych etapach różnicowania pierwotnej endodermy – w procesie jej przemiany w endodermę proksymalną i dystalną. Zaobserwowany spadek ekspresji kadheryny E w endodermie dystalnej oraz jej obecność w endodermie proksymalnej, któremu towarzyszy indukcja ekspresji innych kadheryn (P i R) oraz markerów specyficznych dla przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*), takich jak Wimentyna i Twist w komórkach PE 4,5-dniowej blastocysty myszy potwierdza hipotezę, że proces ten może być zaangażowany w specyfikację endodermy proksymalnej i dystalnej w okołoimplantacyjnym okresie rozwoju myszy.

PRACE PRZEGLĄDOWE

Publikacja 11:

Klimczewska K., Kasperczuk A., **Suwińska A. (2018)**. The regulative nature of mammalian embryos, *Current Topics of Developmental Biology* (IF²⁰¹⁷ **3,110**; 5yearIF **3,784**; pkt MNiSW **40**; liczba cytowań -)

Publikacja 12:

Soszyńska A., Klimczewska K., **Suwińska A. (2019)**. Fgf4/Erk signaling pathway: how it operates in mammalian embryos and embryo-derived stem cells, *International Journal of Developmental Biology* (w druku). (IF²⁰¹⁷ **1,579**; 5yearIF **2,110**; pkt MNiSW **25**; liczba cytowań -)

W ostatnim okresie mojej pracy zawodowej współtworzyłam wraz z doktorantkami, które pod moją opieką wykonują prace doktorskie, dwie obszerne prace przeglądowe dotyczące regulacyjnej natury zarodków ssaków. W pierwszej z nich (Klimczewska i wsp., 2018), koncentrujemy się na wyjaśnieniu molekularnych i komórkowych mechanizmów leżących u podstaw plastyczności przedimplantacyjnych zarodków ssaków. W tym celu przedstawiając różne aspekty regulacyjnych zdolności zarodków ssaków omawiamy wyniki klasycznych eksperymentów demonstrujących ich potencjał rozwojowy i wiążemy je z nowymi danymi dostarczonymi w ciągu ostatniej dekady dzięki nowoczesnym technikom i podejściom badawczym. Prezentujemy także w jaki sposób plastyczność rozwojowa ssaków jest manifestowana w naturze oraz omawiamy jej implikacje w badaniach podstawowych i medycynie.

W drugiej z prac (Soszyńska i wsp., 2019) zagadnienie plastyczności zarodków rozpatrujemy bardziej szczegółowo, pokazując jaką rolę pełni w regulacji ich rozwoju ścieżka FGF4/MAPK. Obecnie jestem w trakcie realizacji grantu Sonata Narodowego Centrum Nauki, w ramach którego badam znaczenie tego szlaku w interakcjach między sąsiadującymi komórkami, które zapewniają prawidłowy rozwój chimerowego zarodka myszy. Badania te stały się podstawą pracy doktorskiej oraz kilku prac magisterskich i licencjackich. W oparciu o uzyskane wyniki przygotowywane są obecnie publikacje.

PODSUMOWANIE:

Rozwój zarodkowy ssaków dokonuje się dzięki trzem głównym procesom: wzrostu różnicowania i morfogenezy. Przebieg różnicowania się komórek embrionalnych ssaków można badać zarówno *in vivo*, w żywym organizmie, jak również *in vitro*, wykorzystując do tego celu różne modele doświadczalne. Większość tego typu badań wykonuje się na gatunku modelowym, jakim dla ssaków jest mysz. Nasuwa się jednak pytanie, na ile dokonane obserwacje można uogólnić na inne gatunki ssaków. Ostatnie badania molekularne ujawniły nieoczekiwane różnice między gatunkami. Z tego względu rozszerzenie badań na inne modele zwierzęce, np. tak jak w moim przypadku na nornicę rudą czy szczura, ma obecnie kluczowe znaczenie, ponieważ może pomóc – poprzez wykrycie różnic i podobieństw gatunkowych - w zrozumieniu podstawowych mechanizmów rozwojowych działających we wczesnej embriogenezie ssaków, w tym człowieka.

BIBLIOGRAFIA:

- Anani, S., Bhat, S., Honma-Yamanaka, N., Krawchuk, D., Yamanaka, Y.** (2014) Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.*, 141: 2813–2824
- Bassalart, C., Valverde-Estrella, L., Chazaud, C.** (2018) Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelialization. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 128: 81-104
- Beck, F., Erler, T., Russell, A., James, R.** (1995) Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.*, 204: 219–227
- Beddington, R.S., Robertson, E.J.** (1989) An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 105: 733–737
- Biase, F.H., Cao, X., Zhong, S.** (2014) Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Genome Res.*, 24 (11): 1787–1796
- Bischoff, M., Parfitt, D.E., Zernicka-Goetz, M.** (2008) Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development*, 135(5): 953-962
- Boroviak, T., Loos R., Bertone, P., Smith A., Nichols J.** (2014) The ability of inner cell mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired upon epiblast specification. *Nat. Cell Biol.*, 16(6): 516-528
- Burton, A., Muller, J., Tu, S., Padilla-Longoria, P., Guccione, E., Torres-Padilla, M.E.** (2013) Single-cell profiling of epigenetic modifiers identifies PRDM14 as an inducer of cell fate in the mammalian embryo. *Cell Rep.*, 5(3): 687–670
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., Rossant, J.** (2006) Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* 10: 615-624
- Cockburn, K., Biechele, S., Garner, J., Rossant, J.** (2013) The Hippo pathway member Nf2 is required for inner cell mass specification. *Curr. Biol.* 23: 1195–1201
- De Los Angeles, A., Pho, N., Redmond, D.E. Jr.** (2018) Generating human organs via interspecies chimera formation: advances and barriers. *Yale J. Biol. Med.* 91(3): 333-342
- Fleming, T.P.** (1987) A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.*, 119: 520–531
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., Chazaud, C.** (2011) Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev. Cell*, 21: 1005–1013
- Goolam, M., Scialdone, A., Graham, S.J.L., Macaulay, I.C., Jedrusik, A., Hupalowska, A., et al.** (2016) Heterogeneity in Oct4 and Sox2 targets biases cell fate in 4-cell mouse embryos. *Cell*, 165(1): 61–74
- Grabarek, J.B., Zzyńska, K., Saiz, N., Piliszek, A., Frankenberg, S., Nichols, J., Hadjantonakis, A.K., Plusa, B.** (2012) Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development*, 139(1): 129-139
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K.-I., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., i wsp.** (2013) Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 23: 1181–1194

- Jedrusik, A., Parfitt, D.E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J.B., Johnson, M.H., 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(19): 2692–2706
- Johnson, M.H., Ziemek, C.A.** (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, 24: 71–80
- Johnson, W. H., Loskutoff, N.M., Plante, Y., Betteridge, K.J.** (1995) Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *Vet Rec.*, 137(1): 15–16.
- Kang, M., Garg V., Hadjantonakis, A.K.** (2017) Lineage establishment and progression within the inner cell mass of the mouse blastocyst requires FGFR1 and FGFR2. *Dev. Cell*, 41: 496–510
- Kang, M., Piliszek, A., Artus, J., Hadjantonakis, A.K.** (2013) FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Dev. Camb. Engl.*, 140: 267–279
- Kang, M., Garg, V., Hadjantonakis, A.K.** (2017) Lineage establishment and progression within the inner cell mass of the mouse blastocyst requires FGFR1 and FGFR2. *Dev. Cell*, 41(5): 496–510
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., Grosveld, F.** (1999) The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*, 126: 723–732
- Krawchuk, D., Honma-Yamanaka, N., Anani, S., Yamanaka, Y.** (2013) FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev Biol.*, 384(1): 65–71
- Kubiak, J.Z., Tarkowski, A.K.** (1985) Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp. Cell Res.*, 157: 561–566
- Lorthongpanich, C., Messerschmidt, D. M., Chan, S. W., Hong, W., Knowles, B. B., Solter, D.** (2013) Temporal reduction of LATS kinases in the early preimplantation embryo prevents ICM lineage differentiation. *Genes Dev.*, 27: 1441–1446
- Meilhac, S.M., Adams, R.J., Morris, S.A., Danckaert, A., Le-Garrec, J.F., Zernicka-Goetz, M.** (2009) Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse. *Dev. Biol.*, 331: 210–221
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Murayama, M., Yamanaka, S.** (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5): 631–642
- Molotkov A., Mazot P., Brewer J.R., Cinalli R.M., Soriano P.** (2017) Distinct requirements for FGFR1 and FGFR2 in primitive endoderm development and exit from pluripotency. *Dev. Cell*, 41: 511–526
- Moore, N., Adams, C.E., Rowson, L.E.A.** (1968) Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fert.*, 17: 527–531
- Morris, S.A., Teo, R.T., Li, H., Robson, P., Glover, D.M., Zernicka-Goetz, M.** (2010) Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107: 6364–6369
- Morris, S.A., Graham, S.J., Jedrusik, A., Zernicka-Goetz, M.** (2013) The differential response to Fgf signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. *Open Biol.*, 3(11): 130104
- Morrissey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S., Parmacek, M.S.** (1998) GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.*, 12: 3579–3590
- Nagy, A., Góczy, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Iványi E., Markkula, M., Rossant, J.** (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110(3): 815–821

- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C.** (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(18): 8424-8428
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., i wsp.** (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
- Niswander, L., Martin, G.R.** (1992) Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development*, 114(3): 755-768
- Pauken, C.M., Capco, D.G.** (2000) The expression and stage specific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Dev Biol.*, 223(2): 411-421
- Pedersen, R., Wu, K., Bałakier, H.** (1986) Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev. Biol.*, 117: 581-595
- Piotrowska-Nitsche, K., Perea-Gomez, A., Haraguchi, S., Zernicka-Goetz, M.** (2005) Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development*, 132(3): 479-490
- Plachta, N., Bollenbach, T., Pease, S., Fraser, S.E., Pantazis, P.** (2011) Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat. Cell Biol.*, 13(2): 117-123
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., Hadjantonakis, A.K.** (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*, 135(18): 3081-3091
- Poueymirou, W.T., Auerbach, W., Frenthewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dor, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., DeChiara, T.M., Valenzuela, D.M.** (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat. Biotechnol.*, 25: 91-99
- Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J. S., Rossant, J.** (2010) Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Dev. Camb. Engl.*, 137: 395-403
- Rappolee, D.A., Basilico, C., Patel, Y., Werb, Z.** (1994) Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Development*, 120(8): 2259-2269
- Saiz, N., Plusa, B.** (2013) Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction*, 145(3): 65-80
- Schoorlemmer, J., Kruijer, W.** (1991) Octamer-dependent regulation of the kFGF gene in embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Mech. Dev.*, 36: 75-86
- Strumpf, D., Mao, C.A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., Rossant, J.** (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*, 132: 2093-2102
- Suwińska, A., Czołowska, R., Ożdżeński, W., Tarkowski, A.K.** (2008) Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev. Biol.*, 332: 133-144
- Szczepanska, K., Stanczuk, L., Maleszewski, M.** (2011) Isolated mouse inner cell mass is unable to reconstruct trophectoderm. *Differ. Res. Biol. Divers.*, 82: 1-8
- Tabansky, I., Lenarcic, A., Draft, R.W., Loulier, K., Keskin, D.B., Rosains, J., et al.** (2013). Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Cur. Biol.*, 23 (1): 21-31
- Tarkowski, A.K.** (1959) Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, 184: 1286-1287
- Tarkowski, A.K.** (1961) Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature*, 190: 857-860

- 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
- Tarkowski, A.K., Witkowska, A., Opas, J.** (1977) Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, 41: 47-64
- Tarkowski, A.K., Ożdżeński, W., Czołowska, R.** (2001) Mouse singletons and twins developed from isolated diploid blastomeres supported with tetraploid blastomeres. *Int J Dev Biol.*, 45: 591-596
- Tarkowski, A.K., Ożdżeński, W., Czołowska, R.** (2005) Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *Int J Dev Biol.*, 49(7): 825-832
- Torres-Padilla, M.E., Parfitt, D.E., Kouzarides, T., Zernicka-Goetz, M.** (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*, 445: 214–218
- van de Laar, I., Rabelink, G., Hochstenbach, R., Tuerlings, J., Hoogeboom, J., Giltay, J.** (2002) Diploid/triploid mosaicism in dysmorphic patients. *Clin. Genet.*, 62: 376–382
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., Louvet- all e, S.** (2005) Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol.*, 282: 307-319
- White, M.D., Angiolini, J.F., Alvarez, Y.D., Kaur, G., Zhao, Z.W., Mocskos, E., et al.** (2016) Long-lived binding of Sox2 to DNA predicts cell fate in the four-cell mouse embryo. *Cell*, 165(1): 75–87
- White, M.D., Zenker, J., Bissiere, S., Plachta, N.** (2018) Instructions for assembling the early mammalian embryo. *Dev. Cell*, 45(6): 667-679
- Wilder, P.J., Kelly, D., Brigman, K., Peterson, C.L., Nowling, T., Gao, Q.S., McComb, R.D., Capecchi, M.R., Rizzino, A.** (1997) Inactivation of the FGF-4 gene in embryonic stem cells alters the growth and/or the survival of their early differentiated progeny. *Dev Biol.*, 192: 614–629
- Willadsen, S.M.** (1981) The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 65: 165-172
- Yamanaka, Y., Lanner, F., Rossant, J.** (2010) FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*, 137: 715–724
- Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S.** (1999) Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J. Cell Biol.* 145: 1497–1509

Suwińska