



MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ
“MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.”
<http://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/sabed/index>



Farelerde Preimplantasyon Döneminde Trofoektoderm ve İç Hücre Kütlelerinin Oluşumu

Formation of Trophectoderm and Inner Cell Mass in Mouse Preimplantation Development

Duygu Mutluay¹, Hakan Öner¹

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, 15030, BURDUR

Abstract: Preimplantation development in mouse initiates with fertilization and results in the formation of blastocysts, a fluid filled cavity that is released from zona pellucida and implanted into the mother's uterine wall. The early blastocysts consists of two distinct cell lineages, called trophoctoderm (TE) and inner cell mass (ICM). The pluripotent ICM is an undifferentiated mass of cells that will give rise to the embryo proper. TE is the progenitor of trophoblasts, which surrounds the ICM and blastocyst cavity, mediates blastocyst implantation to the uterine wall, and contributes to placentation. In this review, molecular and cellular events that occur during preimplantation development are described. Additionally, some information was given about formation of TE, ICM, blastocyst cavity and cell polarity and transcription factors playing a key role in this process that are essential for implantation and maintaining the pregnancy. Understanding of such mechanisms is important for mammalian evolution and clinical aspects, particularly for developing the human artificial reproductive technology.

Öz: Farede fertilizasyon ile başlayan preimplantasyon dönemi sıvı dolu kaviteye sahip blastosistin zona pellusida'dan kurtularak annenin uterus dokusuna implante olması ile son bulur. Erken blastosist, iç hücre kütle (ICM) ve trofoektoderm (TE) olarak adlandırılan iki farklı hücre kökeninden meydana gelir. Pluripotent özellik gösteren ICM, farklılaşmamış hücrelerden oluşarak embriyoyu meydana getirir. Trofoblastın progenitörü olan trofoektoderm hücreleri ise ICM'i ve blastosist kavitesini sararak, uterus duvarına implantasyona aracılık eder ve plasantasyona katkıda bulunur. Bu derlemede preimplantasyon döneminde meydana gelen moleküler ve hücresel olaylar açıklanmış, implantasyonun gerçekleşmesi ve gebeliğin sürdürülebilmesi için esansiyel olan, TE, ICM, blastosist kavitesinin oluşumu, bu süreçte anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörleri ve hücre polaritesi hakkında bilgi verilmiştir. Bu dönemde yer alan mekanizmaların anlaşılması hem memeli gelişimi hem de klinik açıdan özellikle yapay üreme yöntemlerinin geliştirilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Key words: Embryo development, preimplantation, TE, ICM.

Anahtar sözcükler: Embriyo gelişimi, preimplantasyon, TE, ICM.

Yazışma Adresi: Arş. Gör. Dr. Duygu MUTLUAY
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 15030, Burdur-Türkiye.
E-posta: duygumutluay@mehmetakif.edu.tr **Tel:** 0248 213 2048

Geliş Tarihi: 13.02.2015

Kabul Tarihi: 10.03.2015

Kaynak göstermek için: Mutluay D, Öner H. 2015. Farelerde preimplantasyon döneminde trofoektoderm ve iç hücre kütlelerinin oluşumu. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 3(1): 1-9.

Giriş

Preimplantasyon dönemi, farelerde trofoektoderm (TE) ve iç hücre kitlesinin (ICM) oluştuğu embriyo gelişiminin ilk üç gününde meydana gelen temel morfolojik olayları kapsar. Preimplantasyon dönemi, normalde annenin oviduktunda gerçekleşir, ancak kültür ortamlarında in vitro olarak embriyoların gelişim potansiyeline olumsuz bir etki yapmadan da gerçekleştirilebilir (Marikawa ve Alarcon, 2009; Summers ve Biggers, 2003).

Memelilerde gelişim yumurta ile spermin fertilizasyonu ile başlar, blastomerleri oluşturmak için meydana gelen mitotik hücre bölünmeleri ya da yarıklanmalarla devam eder (Marikawa ve Alarcon, 2012). Mayoz bölünmenin metafaz II evresinde bekleyen döllenmemiş oosit, fertilizasyonun gerçekleşmesi ile mayoz bölünmeye devam eder ve ikinci kutup cisimciğinin salınımıyla mayoz bölünmeyi tamamlar. İlk yarıklanma fertilizasyondan 16-20 saat sonra, bundan sonraki yarıklanmalar ise ortalama 12 saatlik aralıklarla gerçekleşir. İlk yarıklanma sonucu iki blastomerli, ikinci yarıklanma sonucunda da dört blastomerli embriyo meydana gelir (Marikawa ve Alarcon, 2009). İlk üç yarıklanma sonucu morfolojik olarak birbirine benzer toplam sekiz blastomer meydana gelir. Dördüncü yarıklanma öncesi, sekiz hücreli embriyo, sınırları belirli blastomer yapısından, sınırları tam olarak ayırt edilemeyen top benzeri paketlenmiş hücrelerin meydana geldiği kompaksiyon olarak adlandırılan bir hücre küresi oluşturur (Şekil 1). Kompaksiyonla birlikte tüm sekiz blastomerde apikal-bazal kutuplaşma meydana gelir ve bu blastomerlerin çeşitli membran ve sitoplazmik elemanları embriyonun apikal-yüzey ekseninden merkezi-bazal eksenini boyunca kutuplaşma gösterirler (Johnson ve McConnell, 2004; Fleming ve Pickering, 1985; Handyside, 1980).

Dördüncü yarıklanmayla birlikte toplam 16 blastomerden oluşan morula adı verilen bir yapı meydana gelir. Morulayı oluşturan blastomerlerin bir kısmı embriyonun yüzeyine yerleşik şekilde bulunurken diğer kısmı etrafındaki komşu blastomerlerle çevrilmiş şekilde yerleşim gösterir. (Şekil 1). On altı hücreli evrede, eksternal ve internal blastosist sayısı embriyolar arasında farklılık gösterir. Yapılan çalışmalarda ortalama 6-7 internal, 9-10 eksternal blastomer olduğu görülmüştür. Eksternal blastomerler apikal-bazal polariteyi sürdürürken, internal blastomerler polariteden yoksundur (Suwinska ve ark., 2008; Marikawa ve Alarcon, 2009; Johnson ve Ziomek 1981; Fleming, 1987).

Beşinci yarıklanma ile daha fazla sayıda internal ve eksternal blastomer meydana gelir ve 32 hücreli evrede halen morula olarak isimlendirilen embriyo ortalama 12-13 internal ve 19-20 eksternal blastomer içerir (Marikawa ve Alarcon, 2009).

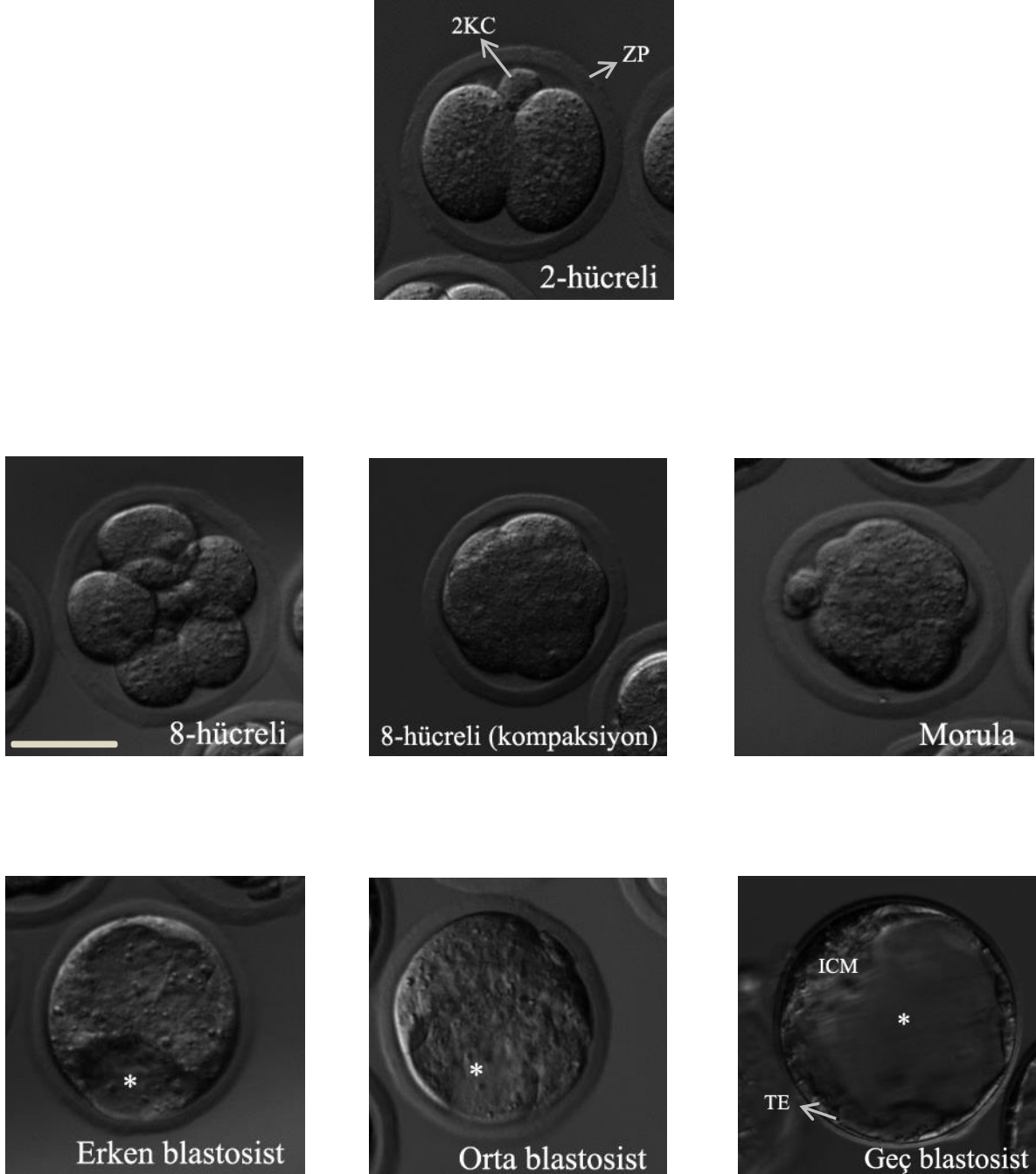
Beşinci yarıklanma sonrası, blastomerler arasında bir ya da birden çok kavite oluşmaya başlar. Bu başlangıçtaki hücreler arası kaviteler, eksternal blastomerlerden ekzositoz yoluyla salınan, hücre içi veziküllerden ya da vakuollerden meydana gelir Kaviteler, tek ve büyük bir kavite oluşturmak üzere sürekli olarak genişler ve birbiri ile birleşir. Bu noktada embriyo özel bir isim alır ve blastosist olarak adlandırılır. Blastosistte eksternal hücreler (trofoektoderm-TE) tüm embriyoyu sararak epidermal morfoloji gösterirken, internal hücreler (iç hücre kitlesi-ICM) tek bir hücre kütlesi şeklinde bir araya gelerek TE hücrelerinin bazal yüzeyine tutunurlar (Şekil 1). TE hücreleri, fiziksel olarak annenin uterusunun endometrium dokusu ile etkileşerek implantasyonu başlatır ve ekstraembryonik dokulara farklılaşarak plasentayı meydana getirir (Marikawa ve Alarcon, 2012). ICM'in ekzantrik lokalizasyonu nedeniyle blastosist farklı morfolojik eksen gösterir; ICM'in konumlandığı yer embriyonik kutup (Em), kavitenin bulunduğu onun karşısındaki yer ise abembriyonik (Ab) kutup olarak adlandırılır (Şekil 2.2). Bu kutuplaşma TE ve ICM hücrelerinin ileri gelişim dönemlerinde farklılaşmaları açısından önemlidir. Örneğin TE hücrelerinin ICM hücreleri ile temasta olduğu kısımdaki hücreler parakrin sinyallere (ICM tarafından oluşturulan Fgf4) cevaben ekstraembryonik ektodermi oluştururlar (Gardner, 1983; Nichols ve ark., 1998; Marikawa ve Alarcon, 2009).

Trofoektoderm Oluşumu ve Epitelizasyon

Blastosistin dış epitel katmanını oluşturan TE, embriyo gelişiminde farklılaşan ve epitel özelliğine sahip olan ilk hücre tipidir. TE hücreleri, embriyonun merkezinde büyük bir kavitenin oluşumuna eşlik eder ve erken blastosist döneminde morfolojik olarak pluripotent iç hücre kitlesinden ayrılır. Trofoblastların progenitörü olan TE hücreleri, blastosistin uterus duvarına implante olmasına eşlik ederken aynı zamanda plasenta oluşumuna katkıda bulunur, bu sırada ICM hücreleri de fetüs'u meydana getirir (Laeno ve ark., 2013).

Fare embriyolarında epitel oluşumu, "geç 8 hücreli evrede" ve sonraki 24 saat içerisinde, ortalama 32 hücreli evrede tamamlanır. Kompaksiyon sırasında öncelikli olarak Ca²⁺ bağlantılı adezyon molekülü E-kaderin molekülü ile hücrelerarası adezyon belirgin biçimde artar (Shirayoshi ve ark., 1983; De Vries ve ark., 2004; Johnson MH ve ark., 1986). Adezyon bağlantı kompleksleri (AJ) içerisinde esas molekül olan E-kaderin, birçok epitel dokuda

hücre-hücre bağlantılarında bulunan protein komplekslerinden biridir (Niessen ve Gottardi, 2008). Fare embriyolarında E-kaderin ekspresyonunun eksikliği AJ'de, sonra da diğer bir epitel bağlantı kompleksi olan sıkı bağlantılarda bozulmaya neden olur (Ohsugi ve ark., 1997; Larue L ve ark., 1994).



Şekil 1. Preimplantasyon dönemi boyunca fare embriyosunda meydana gelen morfolojik değişim gösterilmiştir. 2KC, ikinci kutup cisimciği; ZP, zona pellusida; TE, trofoektoderm; ICM, iç hücre kütesi; (*),blastosist kavitesi. Ölçüm barı, 50 μ m.

Tipik epitel hücrelerinde, hücre membranları yanındaki hücrelere kludin, okludin ve zonula okludens (ZO) proteinleri gibi çeşitli proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan ve sıvı geçirgenliğini engelleyen bir bariyer oluşturan ZO aracılığı ile bağlanırlar (Marikawa ve Alarcon, 2009; Tsukita S ve ark., 2008). Fare embriyolarında, kompaksiyon sırasında bazı ZO komponentleri hücre-hücre sınırlarının apikal kısımlarının yanında lokalize olmaya başlarlar. Ayrıca blastosist kavitesini kapatma yeteneğinde olan olgun ZO yapıları, 32 hücreli evrede tamamlanır (Eckert ve Fleming, 2008; Johnson ve McConnell, 2004). Çeşitli deneysel çalışmalarda ZO bileşenlerinin blastosist kavitesinin oluşumu ve sürdürülmesi için kritik roller oynadığı gösterilmiştir. ZO bileşenleri, ZO-1, ZO-2 ve kludin'i 4/6 içerir ve bunların bulunmaması ya da inhibisyonları sonucunda bozulmuş ya da gecikmiş kavite oluşumu meydana gelir (Marikawa ve Alarcon, 2009; Moriwaki ve ark., 2007; Sheth ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008).

Olgun TE hücreleri apikal mikrovilluslu, polarize olmuş bir epitelin ayırıcı özelliklerini ve polarize olmuş bir dağılım gösteren sıkı ve aderens bağlantılar gibi özel protein komplekslerinin işaretlerini taşır (Yamanaka ve ark., 2006).

Bakılan zamana göre 8 hücreli evrede kompaksiyon sırasında apikal alanın kurulması ile aderens bağlantıların bulunması birbirleri ile uyumlu olarak görülür. Bu sırada hücre adezyon molekülü olan E-kaderin ve aderens bağlantıların esas komponentleri hücre-hücre bağlantı alanlarında önemli ölçüde bulunmaya başlar (Verlhac ve ark., 2000). Bunlara ek olarak *serine/threonine kinase* EMK1 (Par1) bazo-lateral olarak lokalize olur (Vinot ve ark., 2005). Ayrıca bu dönemde bazı proteinler apikal hücre korteksinde küçük bir alanda lokalize olurlar. Bu proteinler, Par3, Par6 ve atipik PKCs (aPKCs)'dir (Pauken ve Capco, 2000; Plusa B ve ark., 2005; Thomas ve ark., 2004; Vinot ve ark., 2005). Geç morula döneminde *tight junction*'lar, *adherens junction*'lara apikal olacak şekilde toplanmaya başlarlar (Sheth ve ark., 1997). Bu sırada birçok apikal protein *tight junction*lar etrafında lokalize olur (Eckert ve ark., 2005; Vinot ve ark., 2005). Par3, Par6 ve aPKC apikal protein komplekslerini oluştururlar (Etienne-Manneville ve Hall, 2003). Bu kompleksin oluşumu mikrotubul organizasyonunu kontrol eder ve *Lethal giant larvae* (Lgl) gibi bazo-lateral proteinleri apikal membranın dışında tutarlar (Plant PJ ve ark., 2003, Yamanaka T ve ark., 2003).

Kompaksiyon sırasında 8 hücreli embriyoda apikal alanlarda, apikal protein toplanması, bazo-lateral proteinlerin apikal membrandan dışlanması sebep olur. Yapılan

çalışmalar, fonksiyonel apikal alanın; polarite, dış hücrelerin oluşumu ve muhtemelen TE kaderi için esas olduğu fikrini desteklemektedir (Yamanaka ve ark., 2006).

Kompaksiyon öncesinde hücreler polarize olmamıştır ve mikrovilluslar hücrenin tüm yüzeyine dağılmış durumdadır. Kompaksiyon sırasında, blastomerler E-kaderin aracılı hücre bağlantılarının kurulması yoluyla birbiri üzerine doğru düzleşirler ve polarize olurlar. Mikrovilluslar ise hücre bağlantı alanlarından kaybolur ve apikal kutbun yüzeyinde kalıcı hale gelir. Bu durum ezrin'in dağılımı ve sitoplazmik komponentlerin (örneğin, kltrin vezikülleri, endozomlar ve mikrofilamentler) asimetrik olarak dağılması ile gösterilmiştir (Louvet ve ark., 1996; Louvet-Vallee ve ark., 2001; Vinot ve ark., 2005). Asetillenmiş mikrotubuller bazal kutupta yer alırken daha dinamik mikrotubuller daha çok miktarda apikalde bulunurlar (Houliston ve Maro, 1989; Vinot ve ark., 2005). Kompaksiyon, embriyoda aktif olarak gözlenen en az iki yolak aracılığı ile yönetilir; biri düzleşme gerektirir ve mikrotubuller olmadan da şekillenebilir, diğeri düzleşmeden bağımsızdır fakat çekirdekler ve hücre yüzeyi arasında mikrotubul aracılı etkileşim içerir (Houliston ve ark., 1989; Vinot ve ark., 2005). Dördüncü yarıklanma sırasında mitotik ipliklerin oryantasyonu rast geledir. Ancak ipliğin oryantasyonuna göre apikal-bazal eksene de bakılarak asimetrik bölünmeler oluşabilir (Johnson ve McConnell, 2004). Mikrovillusların ucunun büyük bir kısmının kalıtımını sağlayan non-adeziv alana sahip olan kardeş hücreler, dış blastomerleri meydana getirirken, mikrovilluslardan yoksun olan tüm yüzeyleri boyunca adeziv olan hücreler de iç hücreleri oluştururlar. Böylece kaderleri farklı olan iki farklı hücre tipi meydana gelmiş olur. Blastosistlerde iç hücre kitlesini meydana getirecek olan internal polarize olmamış hücreler ve TE hücrelerini meydana getirecek olan eksternal polarize olmuş hücreler bulunmaktadır (Fleming, 1987). Bu iki farklı hücre tipinin oluşum süreci embriyonun gelişimi için çok önemlidir. ICM, embriyonun ve bazı ekstra-embriyonik yapıların oluşumuna katkıda bulunurken, TE ekstra-embriyonik yapılara katılır (Gardner, 1983; Vinot ve ark., 2005).

İmplantasyon sırasında geç blastosist döneminde bulunan fare blastosisti ise üç hücre tipi içerir: epiblast (EPI), trofoektoderm ve primitive endoderm (PE). EPI ve PE hücreleri, blastosistin kaviteye bakan yüzünde bulunan ICM hücrelerini meydana getirir. Yapılan çalışmalar, bu üç doku tipinin gelişimin ileri dönemlerinde farklı dokuları meydana getirdiğini göstermiştir. Esas olarak plasentanın fetal kısmını oluşturan TE, trophoblast kökenli tüm yapıları meydana getirir. PE visseral ve pariyetal endodermi meydana getirirken EPI tüm

fetus aynı zamanda amnion, allantois ve ekstraembriyonik mezoderm hücrelerini meydana getirir (Rossant, 2004).

TE ve ICM Oluşumunda Rol Alan Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri, hayvanların embriyonik gelişimi sırasında hücrenin akıbetinin belirlenmesini sağlayan kritik düzenleyicilerdir. Fare blastosistinde, TE ve ICM hücrelerinin oluşumunda esansiyel olarak tanımlanmış birkaç transkripsiyon faktörü vardır. Moleküler olarak TE ve ICM'nin kökeni bu soy-spesifik transkripsiyon faktörleri ile ayırt edilebilir (Okamoto K ve ark., 1990; Rosner ve ark., 1990; Schöler ve ark., 1990). Bunlar, blastosistin TE hücreleri tarafından eksprese edilen *Drosophila caudal* ile ilişkili olan *Cdx-2* (Strumpf ve ark., 2005) ve iki ICM spesifik transkripsiyon proteinleri olan, *POU domain protein Oct-4 (Pou5f1)* ve *homeodomain protein* olan *Nanog*'dur (Chambers ve ark., 2003; Palmieri ve ark., 1994). Blastosist oluşumu sırasında bu faktörler arasındaki ilişkilerin TE ve ICM'in akıbetini güçlendirdiği düşünülmektedir. *Cdx2*, pluripotent özelliğin anahtar düzenleyicisi olan *Oct4*'un ekspresyonunu baskılar böylece ileride meydana gelecek olan TE soyunun ICM'den ayrılmasını sağlar (Laeno ve ark., 2013). *Cdx2*, TE'nin varlığını sürdürebilmesi açısından esansiyel iken, ICM'nin oluşumu ve varlığını sürdürebilmesi için gerekli değildir. Blastosist döneminde, *Cdx2* yalnızca TE hücrelerinden eksprese edilirken, *Oct4 (Pou5f1)* transkripsiyon faktörü güçlü şekilde ICM hücrelerinde eksprese edilir. (Okamoto K ve ark., 1990; Rosner ve ark., 1990; Schöler ve ark., 1990). *Homeodomain* transkripsiyon faktörünü kodlayan *Nanog* ise, ICM ve embriyonik kök hücrelerinde (ES) pluripotent durumun sürdürülmesi için gereklidir ve *Oct4*'un aksine ES hücrelerinden primitif endoderm soyunun meydana gelmesini de engeller (Chambers ve ark., 2003; Kuroda ve ark., 2005; Mitsui ve ark., 2003).

Sonuç

Gelişimsel biyolojideki temel soru döllenmiş yumurta olarak isimlendirilen tek hücreden erişkin vücudun kusursuzca nasıl meydana geldiğidir. Plasentalı memelilerde, embriyogenezis, blastosistin meydana geldiği preimplantasyon gelişimi ile başlar. Blastosist oluşumu implantasyonun meydana gelmesi ve gebeliğin sürdürülebilmesi için esansiyeldir. Bu dönemde yer alan mekanizmaların anlaşılması ve bilinmesi hem memeli gelişimi hem de yapay üreme yöntemlerine başvuran ebeveynlerin çocuk sahibi olabilmeleri açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmaların çokluğu ile in vitro fertilizasyon gibi

yöntemlerde kullanılacak embriyoların yüksek kalitede olmasının başarılı implantasyon ve fetal gelişimi beraberinde getirdiği görülmüştür.

Kaynaklar

1. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113: 643–655.
2. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R, Solter D, Knowles BB. 2004. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development*. 131: 4435–4445.
3. Eckert JJ, Fleming TP. 2008. Tight junction biogenesis during early development. *Biochim Biophys Acta*. 1778: 717–728.
4. Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby-MG, Cameron IT, Fleming TP. 2005. Relative contribution of cell contact pattern, specific PKC isoforms and gap junctional communication in tight junction assembly in the mouse early embryo. *Dev Biol*. 288: 234–247.
5. Etienne-Manneville S, Hall A. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol*. 15: 67–72.
6. Fleming TP, Pickering SJ. 1985. Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during Mouse preimplantation development. *J Embryol Exp Morphol*. 89: 175–208.
7. Fleming TP. 1987. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol*. 119: 520–531.
8. Gardner RL. 1983. Origin and differentiation of extra-embryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol*. 24: 63–133.
9. Houliston E, Maro B. 1989. Posttranslational modification of distinct microtubule subpopulations during cell polarization and differentiation in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Biol*. 108: 543–551.
10. Houliston E, Pickering SJ, Maro B. 1989: Alternative routes for the establishment of surface polarity during compaction of the Mouse embryo. *Dev Biol*. 134: 342–350.
11. Johnson MH, Maro B, Takeichi M. 1986. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J Embryol Exp Morphol*. 93: 239–255.
12. Johnson MH, McConnell JM. 2004. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 15: 583–597.
13. Johnson MH, Ziomek CA. 1981. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*. 24: 71–80.
14. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano SY, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*. 25: 2475–2485.
15. Laeno AMA, Tamashiro DAA, Alarcon VB. 2013. Rho-associated kinase Activity is required for proper morphogenesis of the inner cell mass in the mouse blastocyst. *Biol. Reprod*. 89:122.
16. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 8263–8267
17. Louvet S, Aghion J, Santa-Maria A, Mangeat P, Maro B. 1996. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetric division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol*. 177: 568–579.
18. Louvet-Vallee S, Dard N, Santa-Maria A, Aghion J, Maro B. 2001. A major posttranslational modification of ezrin takes place during epithelial differentiation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 231: 190–200.
19. Marikawa Y, Alarcon VB. 2009. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.*, 76, 1019-32.
20. Marikawa Y, Alarcon VB. 2012. Creation of Trophectoderm, the First epithelium, in Mouse Preimplantation Development. *Results Probl Cell Differ*. 55: 165-84.
21. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113: 631–642
22. Moriwaki K, Tsukita S, Furuse M. 2007. Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*. 312: 509–522.

23. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95: 379–391.
24. Niessen CM, Gottardi CJ. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 1778: 562–571
25. Ohsugi M, Larue L, Schwarz H, Kemler R. 1997. Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. *Dev Biol*. 185: 261–271
26. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*. 60: 461–472
27. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*. 166: 259–267.
28. Pauken CM, Capco DG. 2000. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during Mouse preimplantation development. *Dev Biol*. 223: 411–421.
29. Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, Kulkarni S, Pawson T. 2003. A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol.*, 5, 301–308.
30. Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, Hadjantonakis AK, Moore CA, Papanicolaou N, Papaioannou VE, Glover DM, Zernicka-Goetz M (2005): Down regulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci.*, 118, 505–515.
31. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 345: 686–692.
32. Rossant J. 2004. Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocysts. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 15: 573–581.
33. Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 344: 435–439.
34. Sheth B, Nowak RL, Anderson R, Kwong WY, Papenbrock T, Fleming TP. 2008. Tight junction protein ZO-2 expression and relative function of ZO-1 and ZO-2 during mouse blastocyst formation. *Exp Cell Res*. 314: 3356–3368.
35. Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M. 1983. The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell*. 35: 631–638.
36. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development*. 132: 2093–2102.
37. Summers MC, Biggers JD. 2003. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update*. 9: 557–582.
38. Suwinska A, Czołowska R, Ozdzinski W, Tarkowski AK. 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. *Dev Biol*. 322: 133–144
39. Thomas FC, Sheth B, Eckert JJ, Bazzoni G, Dejana E, Fleming TP. 2004. Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Sci*. 117: 5599–5608.
40. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S. 2008. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, 27: 6930–6938.
41. Verlhac M-H, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. 2000. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol*. 10: 1303–1306.
42. Vinot S, Le T, Ohno S, Pawson T, Maro B, Louvet-Vallee S. 2005. Asymmetric distribution of PAR proteins in the Mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol*. 282: 307–319.
43. Wang H, Ding T, Brown N, Yamamoto Y, Prince LS, Reese J, Paria BC (2008): Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Dev Biol*. 318: 112–125.
44. Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A, Ohno S. 2003. Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol*. 13: 734–743.
45. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. 2006. Cell and Molecular Regulation of the Mouse Blastocyst. *Dev Dyn*. 235: 2301–2314.