

**Embriyoner gelişimde transkripsiyonel ağlar ve hücre sinyalleri**

## Transcriptional networks and cell signals in embryonic development

Eda AÇIKGÖZ Hüseyin AKTUĞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Öz**

Fare blastokistindeki üç germ tabakasının oluşumu, hücrelerin gelişim sürecinin erken dönemindeki davranışlarını, hangi iç ve dış etkenlerin bu süreçte rol oynadığı ve bunlar arasındaki etkileşimleri çalışmak için önemli bir model sistemi sağlamaktadır. Stabil polarize dış epitelin oluşmasıyla birlikte, erken yarıklanma aşamasının iç ve dış hücreleri arasındaki sinyal farklılıkları iç hücre kitlesi (ICM), embriyoblast ve trofoektodermin kurulmasına yol açar. Embriyonik gelişim aşamalarında gerçekleşen hücre polaritesi, hücre pozisyonu, lokal mikroçevre etkileri, transkripsiyonel faktörler ve bunların karşılıklı etkileşimlerini içeren süreçler hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. Bu süre içerisinde fare gelişiminin yavaş ilerlemesi, kültür embriyo yeteneği, canlı hücre görüntüleme araçlarının geliştirilmesi ve gen ekspresyonlarını modifiye edebilme yeteneği bu süreçlerin aydınlatılabilmesini sağlamaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Blastokist, epiblast, germ tabakaları, soy özellikleri.

**Abstract**

*The formation of the three lineages of the mouse blastocyst provides an important model system to study behavior of cells in the early stage of the development process, internal and external factors which play a role in this process and the interaction between them. With the establishment of a stable polarized outer epithelium, the signal differences between the inner and outer cells of the early cleavage stages lead to the establishment of the inner cell mass (embryoblast) and the trophectoderm. Events in the stages of embryonic development including cell polarity, cell position, effects of local microenvironment, transcriptional factors and their interaction processes are involved in determining cell fate. The slow pace of development of the mouse during this time, the ability to culture embryos, the development of tools for live cell imaging and the ability to modify the expression of genes that enable the elucidation of the process.*

**Keywords:** Blastocyst, epiblast, germ layers, lineage specification.

**Giriş**

Memeli blastokist gelişimi, hücresel morfolojiler ve hücre kaderi arasındaki ilişkiyi incelemek için mükemmel bir model sistemi sağlar. Farelerde gelişimin ilk dört günü boyunca, tek hücreli zigot kompakt hücre grubunu kapsayan sıvı dolu epitel vezikülü oluşturmak için bir dizi değişikliğe uğrar. Gelişimin geç blastokist aşamasında, dış epitel daha sonra plasentanın trofoblast tabakalarını ve trofoblast dev hücrelerini oluşturacak olan trofoektodermi oluşturmak için karardır. İç hücre kitlesi içinde, primitif endoderm (PE) ve epiblast (EPI) olmak üzere iki ayrı hücreye ayrımı söz konusudur.

Epiblast hücreleri fetüsün primer germ tabakalarının tümünün ve onun ekstraembriyonik membranlarını oluşturacak olan blastokistin pluripotent hücre hatlarını oluşturmakta iken, primitif endoderm ise temelde ekstraembriyonik yolk kesesinin endoderm tabakasını oluşturmaktadır (1). Kimerik embriyolar kullanarak yapılan kapsamlı soy analizleri ve deneysel çalışmalar uzun yıllar boyunca tam da bu hücre tiplerinin muhtemel kaderlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Tüm hücreler bütün üç hücre tiplerini oluşturabilme yeteneğine sahipken, hücre kaderindeki kısıtlama sekiz hücreli aşamada 48 saatlik zaman periyodunda gerçekleşmektedir. Bu derlemede, embriyo gelişimindeki transkripsiyonel ağlar, hücre sinyalleri altında yatan moleküler mekanizmaların bugün için en güncel ve kapsamlı olanlarından söz edilecektir.

Yazışma Adresi: Eda AÇIKGÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 27.02.2014 Kabul Tarihi: 24.03.2014

## **Blastokist İçinde Köken Özelleşmesi ve Transkripsiyonel Ağın Kontrolü**

Blastokist içindeki köken özelleşmesi için gerekli olan transkripsiyonel faktörlerin düzenleyici etkileşimlerinin tespit edilmesinde son yıllarda dikkate değer ilerlemeler kaydedilmiştir. Pre-implantasyon sırasında hücre kaderinin bilinen aşamalı kısıtlamaları ile uyumlu olarak birçok transkripsiyon faktör (TFs) erken gelişim boyunca geniş bir şekilde ifade edilmekte iken, daha sonrası aşamalarda sadece kökene özgün hale gelmektedir. Örneğin Oct4 faktörünün transkripsiyonu, oositin tüm hücrelerinde belirgin olmakla birlikte embriyonik 3.5 gün sonra sadece iç hücre kitlesi (ICM) ile sınırlı kalmaktadır (2,3). Buna ek olarak embriyonik kök hücrelerdeki Oct4 kaybı trofoblastik kök hücrelere farklılaşmaya yol açmaktadır (4).

Blastokist spesifikasyonunda etkili olduğu gösterilen proteinlerden birisi de oosit kökenli olduğu gösterilen ve bir transkripsiyon faktörü olan Cdx2'dir. Cdx2 ekspresyonu sekiz hücreli aşamada embriyonun çoğu hücrelerinde düşük seviyelerde başlatılır ancak Oct4 ICM ile sınırlandırıldığında geç morula/erken blastokist aşamasında ifadesi sadece dış trofoektoderm (TE) hücreleri ile sınırlandırılır (3,5). Cdx2 mutant embriyolarda, blastokist dış epitelini kaybeder, morfolojik bütünlük bozulur ve TE hücreleri farklılaşamazlar (6). Bu aşamada etkili olduğu gösterilen diğer TFs'ler Tead4, GATA3 ve Eomes'tir. Tead4 mutant embriyolarda, Cdx2 ekspresyonunun tamamen ortadan kalktığı ve embriyoların fonksiyonel TE oluşturmada başarısız oldukları gösterilmiştir (7,8). Neticede, embriyoda Cdx2 ifadesinin yüksek veya düşük olmasına bağlı olarak sırasıyla TE veya ICM yönüne doğru ilerlemesi beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Blastokist oluşumundan önce, Cdx2 ve Eomes gibi TE-spesifik faktörler morulanın dış hücrelerinde sınırlı olmaktadır. Ancak, ICM'nin pluripotent hücrelerinin belirlenmesi için gerekli olduğu bilinen Oct4 (9), Sox2 (10,8) ve Nanog (11,12) yarıklanma süresince her hücrede ifade edilmekte iken, blastokist aşamasından sonra sadece ICM hücrelerinde ifadesi devam etmektedir. Bu kısıtlanma, Cdx2'ye bağlıdır. Cdx2 mutantlarda, Oct4 ve Nanog TE hücrelerinde ifade edilmektedir (5). Böylece blastokist köken spesifikasyonu TE hedeflerinin aktivasyonu ile başlar ve dış kısımdaki hücrelerde ICM kimliği baskılanır. Daha sonra, pluripotent kökenlerindeki Oct4/Sox2/Nanog ile TE hedeflerinin baskılanması Oct4 ve Cdx2 (13,14) genlerinin bilinen otoregülasyon özellikleri ile birlikte köken kimliğinin sürdürülmesi sağlanır.

## **Pre-implantasyon Embriyolarında Morfogenesis, Hücre Sinyali ve Köken Tahsisi Arasındaki İlişki**

Gelişmekte olan embriyodaki hücrelerin pozisyonu (konum) ve/veya hücre polarizasyonu onların ICM veya

TE hücre yapılarına katılma sürecini etkilemektedir. Başlangıçta yarıklanma sırasında, tüm blastomerler morfolojik ve potansiyel olarak aynı özelliklere sahiptir. Ancak, sekiz hücre aşamasında kompaktlaşma ve polarizasyon olayları gerçekleşmektedir (15). E-kaderin bağımlı interselüler adezyon ile birlikte hücreler atipik protein kinaz C (aPKC) (16), polarite protein Par3 (17) ve apikal membran protein ezrin (18) gibi proteinlerce zengin apikal alan kazanırlar. Ancak, Lgl (lethal giant larva homolog) ve PAR polarite protein Par1 gibi moleküller her blastomerin bazolateral bölgesinde lokalize olmaktadır (19). Adherens junction ve daha sonra hücreler arasındaki tight junction bağlantıları polarize epitelyum oluşturmak için blastomerleri apikal ve bazolateral domainlere ayırmaktadır. Hücreler sekizden 16 hücre aşamasına bölündüğünde ve 16-32 hücre aşamasında dış hücreler bu polarize fenotipi sürdürürler ancak, kütle çekimindeki hücreler apikal özelliklerini kaybederler ve morfolojik olarak apolar olurlar. Dış polarize epitel TE oluşturmak için devam ederken, iç kısımda konumlanan apolar hücreler ise ICM oluştururlar. Bu nedenle araştırmacılar embriyodaki hücrelerin konumunun onun kaderini belirlediğini düşünmektedirler. Bu olay, "iç-dış hipotez" veya "konum hipotezi" olarak ifade edilmektedir. Blastomerler mitotik ağın apikal alana paralel veya dik konumlanmasına bağlı olarak simetrik veya asimetric olarak bölünürler. Simetrik bölünmeler neticesinde iki polar hücre oluşmakta iken, asimetric bölünmede ise bir dış polar ve iç apolar hücre oluşur (20). Dış hücrelerde polar fenotipin oluşumu ile Cdx2 ifadesi arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır (3,21). Cdx2 hücrenin kutuplaşarak bölünmesini kontrol altında tutan faktörlerden birisi olup ifadesi büyük oranda 8-16 hücre aşamasında artmaktadır. Cdx2 ekspresyonu ve TE oluşumu transkripsiyon faktörü olan Tead4 ve onun koaktivatör partneri olan Yap1'e bağlı olarak gelişmektedir (7,8). Tead4 ve Yap1 pre-implante embriyoların tüm hücrelerinde ifade edilmekte iken, Yap1 Cdx2 ifadesi ile çakışık olarak gelişmekte olan dış hücrelerin nükleusunda lokalize olmaktadır (22). Yap1 fosforilasyonu Lats1/2 kinaz aktivitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Yap1, sekiz hücreli aşamada tüm hücrelerin nükleusunda ve zayıf olarak da sitoplazmalarında bulunmaktadır. Geç morula aşamasında, embriyonun dış hücrelerinde Lats1/2'nin inaktive olmasına ve Yap1'e bağlanamamasına bağlı olarak nükleus içerisine girmekte ve burada bulunan Tead4'e bağlanmasına bağlı olarak aktif bir kompleks oluşur ve bu oluşan kompleks Cdx2 ifadesinin artmasını sağlamaktadır. İç hücrelerde ise Lats kinaz aktivasyonuna bağlı olarak Yap1'in nükleus içine girmesi engellenir. Yap1'in nükleus içine giremediğinden dolayı iç hücrelerde Cdx2 ifadesinin engellenir. Neticede dış hücrelerde Cdx2 aktivitesi bulunmakta iken, iç hücrelerde bu proteinin aktivitesi baskılanır (1,22).

## **Epiblast (EPI) ve Primitif Endodermin (PrE) Segregasyonu**

Pre-implantasyon fare gelişimi sırasında, ICM, epiblast (EPI) ve primitif endoderm (PrE) olmak üzere iki farklı hücre soyuna farklılanmaktadır. Temelde bu ayırımı Nanog ve Gata6 ekspresyonuna bağlı olarak gelişmektedir (23). Primitif endodermin oluşabilmesi için Gata6, Gata4, Sox17 ve Pdgfra transkripsiyonel faktörlerine sahip olması gerekmektedir (24-27). PrE epitelinin oluşması için Gata6 ekspresyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (1,24,26). ICM içinde hücrelerin içeriye göçü 8-16 hücreli aşamada başlayıp 32-64 hücreli evreye kadar devam etmektedir. 16-32 hücreli evrede Gata6 ekspresyonundaki artışa bağlı olarak hücrelerin çoğunun primitif endoderm hücrelerine dönüştüğü gözlenmiştir. İç hücre kitlesinde EPI ve PrE progenitor hücrelerin oluşumunda FGF sinyalini önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalarda Fgf4'ün reseptör tirozin kinaz (RTK)/Mek yolağının inhibisyonunu veya Grb2'nin inaktivasyonunun PrE farklılanmasını engellediği ve ICM içinde Nanog ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir. Grb2-/- blastokistlerde, ICM hücre sayısı normal olduğu ancak tüm hücrelerin Nanog gibi EPI markerlerini ifade etmekte iken, Gata6 ekspresyonunun olmadığı gösterilmiştir (24).

## **Proksimal-Distal (PD) Eksenlerin Oluşumu**

ICM blastokist içinde bir kenara yakın konumlu olarak yerleşir; embriyonun bu bölümü embriyonik kutup olarak ifade edilmekte iken, bunun karşısındaki kutup ise abembriyo kutup olarak isimlendirilmektedir. Uterus dokusuna implantasyonun ardından, polar trofoektoderm, epiblast ve primitif endoderm bir silindirik embriyo oluşturmak için blastokist kavitesinin içine doğru büyümeye başlar. Blastokistin embriyonik-abembriyonik eksenini silindirik yapının proksimal-distal eksenine haline gelmektedir (1,28,29). Özetlemek gerekirse, pre-implantasyon gelişimde iç hücre kitlesi, polar trofoektoderm ile çevrili olan blastosöl konfigürasyonu embriyonik-abembriyonik eksenleri oluştururken; post-implantasyon embriyonik-abembriyonik eksenler embriyonun proksimal (ektoplasental taraf)-distal (epiblast taraf) oluşturmaktadır.

## **Blastokist İçindeki Bölgeselleştirilmiş Genetik ve Sinyal Aktivitesi**

Epiblast ve primitif endoderm içinde, soy spesifik transkripsiyonel faktörler (Oct4, Nanog, Gata4, Gata6 ve Sox17 gibi) kodlayan genlerin ayrı bölgesel ekspresyonları belirlenmiştir. Bununla birlikte, bireysel olarak hücreler sinyal aktivitelerinin mediyatörleri ya da faktörlerini kodlayan genleri (Pdgfra, Fgf4, Fgfr2, Lefty1, Nodal, Wnt9a ve  $\beta$ -catenin) çeşitli düzeylerde ifade edebilmektedir. Lefty-1 ve Cer-1 salgılayan hücrelerin dışında sinyal aktivitesi ile ilgili epiblast ve primitif

endoderm içindeki hücre lokalizasyonu üzerinde detaylı bilgi bulunmamaktadır (1,28). Lefty1 ve Cer1 ekspresyon eden hücreler başlangıç olarak ICM hücreleri arasında dağılmıştır. Daha sonraki aşamalarda, Lefty1+ (ve Gata6) hücrelerinin ikinci dalgası primitif endoderm ile sınırlı hale gelmektedir (30,31). Primitif endoderm içinde, Lefty1+hücreler epitelin bir tarafında lokalize olmuşlardır. Deneysel olarak gösterilmemekle beraber Lefty1+hücrelerin embriyonun muhtemel anterior tarafında konumlandığı düşünülmektedir (31).

## **Primitif Endoderm Gelişiminin Düzenlenmesi**

ICM'nin luminal yüzeyi üzerinde başlangıçta bir epitel olarak oluşan primitif endoderm peri-implantasyon gelişim sırasında parietal endoderm (mural trofoektoderm luminal yüzey hattı) ve viseral endoderm (ekstra-embriyonik ektoderm ve epiblastı çevreleyen kısım) oluşturmak için genişlemektedir. Viseral endoderm, transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), BMP, Nodal ve epiblastın düzenlenmesi ve farklılaşmasının devam ettiren Wnt sinyal yolağı aktivitelerinin düzenlenmesinde yer aldığı için önemli bir yapıdır (1,28). Ayrıca, bölgeselleşmiş gen ekspresyon alanları ve hücrelerin morfojenetik hareketinin modelini içeren endodermin epitel mimarisindeki değişiklikler vücut ekseninin AP düzenlenmesinde ifade edilen yapısal ve moleküler asimetrisi sırasındaki dinamik bir süreci yansıtmaktadır (28,32). Başlangıçta distal bölgede ve daha sonra pre-gastrulasyon embriyosunun bir tarafındaki viseral endodermin lokal kalınlaşması olarak ortaya çıkan epitelial morfolojideki değişiklikler sırasıyla proksimal-distal eksen ve muhtemel AP vücut eksenlerindeki asimetrisinin oluştuğunun işaretidir.

## **Parietal ve Viseral Endodermin Oluşumu**

PrE hücrelerinin parietal endoderm (PE) ve viseral endoderm (VE)'e ileri gelişiminin nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılamamıştır. Genetik olarak işaretlenmiş E3.4 ve E6.5-7.5 embriyolarından hücre klonal analizler blastosist implantasyonunda, PrE ve VE'nin her ikisinin de PE'yi oluşturmak için birlikte hareket ettiğini ortaya çıkarmıştır (1). Transkripsiyonel faktör Sox17 Gata4 ve Gata6'nın parietal endodermin ileri farklılaşmasında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (34). Viseral endodermin distal kısmının gözle görünür kalınlaşması ile distal viseral endoderm (DVE) oluşur (1). Soy izleme deneyleri Lefty1 ekspresyon eden primitif endoderm hücrelerinin DVE konumlu olan hücrelerin prekürsörleri olabileceğini ortaya koymuştur (1,28). DVE içindeki hücreler daha sonra anterior viseral endodermi (AVE) oluşturmak için bazı sinyallerin etkisi ile göç eder. DVE'nin anterior bölgesine translokasyonu aktif hücre göçünü içermektedir. DVE'deki hücrelerin AVE'ye yöneliminde Nodal ve WNT- $\beta$  katenin aktivitesinin önemli olduğu gösterilmiştir.

## Epiblastın Düzenlenmesi

Primitif çizginin oluşumu embriyogenezin önemli bir kilometre taşıdır. Bu birincil germ tabakalarının ve embriyonun temel vücut planının kurulumu ile sonuçlanan gastrulasyonun morfolojik göstergesidir. Primitif çizgisinin oluşumu ve doğru yerleşimi epiblast ve viseral endoderimde anterior-posterior polaritesinin başlangıç kurulumunu gerektirir (1,28,29).

Primitif çizginin oluşumunun primitif çizgi marker genleri ekprese eden hücrelerin posteriora göçü ile birlikte olduğu ileri sürülmektedir. Ancak, son yapılan bir çalışma gen ifade düzenlemesinin prospektif primitif çizgi hücrelerinin göçsel davranışlarını yansıtmak için gerekli olmadığını göstermektedir. Örneğin, epiblast hücrelerinin posterior hareketi tespit edilmeden önce, T (brachyury) ifadesi posterior epiblasta dönüştürülür (37).

Epiblast ve ekstraembriyonik (ExE) arasındaki karşılıklı etkileşimler primitif çizginin oluşumu için gerekli olan sinyalleri sağlamaktadır. BMP4'ü içeren ExE'den sinyaller primitif çizgi markırların ifadesini indükler

(38,39). Karşılıklı etkileşimlerde, epiblasttaki nodal sinyali ExE içindeki Bmp4 ekspresyonunun bakımını sağlar. AVE içinde nodal aktivitesi ve onun antagonisti arasındaki doğru denge primitif çizgisinin epiblast ve doğru yerleşiminin anterior-posterior düzenlemesi için gereklidir (30,40). Epiblastta erken nodal sinyalinin kaldırılması posterior epiblastı değiştirmek için primitif çizgi gen ekspresyonunun başarısızlığı ile sonuçlanır. Nodal pro-protein yarıklanmasına dirençli embriyoların analizleri primitif çizgi içinde fgf8 ekspresyonunun parçalanmayan nodal proteinin ile indüklenebildiğini göstermektedir (28). DVE ve daha sonrada AVE de üretilen CER1 ve lefty1 nodal antagonistleri nodal sinyalinin etkisini azaltmaktadır. Bu antagonistlerden yoksun embriyolarda, primitif çizginin anterior bölgesinin genişlediği ya da ektopik primitif çizgilerin olduğu gösterilmiştir (40). Primitif çizgi oluşumu  $\beta$ -katenin ve LRP5 (low-density lipoprotein recepto-related protein5) ve LRP6 ile WNT3 sinyali aracılığıyla posterior epiblastın spesifikasyonu gereklidir. WNT3 epiblast içinde nodal ekspresyonunun devamını aktive etmektedir (28).

## Kaynaklar

1. Stephenson RO, Rossant J, Tam PPL. Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(11):a008235.
2. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. 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* 1994;166(1):259-67.
3. Dietrich JE, Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse preimplantation embryo. *Development* 2007;134(23):4219-31.
4. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005;23(5):917-29.
5. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2008;313(2):614-29.
6. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005;132(9):2093-102.
7. Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, et al. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 2007;134(21):3827-36.
8. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, et al. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 2008;125(3-4):270-83.
9. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95(3):379-91.
10. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17(1):126-40.
11. Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007;450(7173):1230-34.
12. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113(5):631-42.
13. Xu F, Li H, Jin, T. Cell type specific autoregulation of the caudal-related homeobox gene Cdx2/3. *J Biol Chem* 1999;274(48):34310-16.
14. Beland M, Pilon N, Houle M, et al. Cdx1 autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol Cell Biol* 2004;24(11):5028-38.
15. Johnson MH, McConnell JM. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15(5):583-97.
16. Pauken CM, Capco DG. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 2000;223(2):411-21.
17. Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, et al. Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Sci* 2005;118(Pt 3):505-15.
18. Louvet S, Aghion J, Santa-Maria A, Mangea P, Maro B. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1996;177(2):568-79.

19. Vinot S, Le T, Ohno S, Pawson T, Maro B, Louvet-Vallee S. Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8- cell stage during compaction. *Dev Biol* 2005; 282(2):307-19.
20. Wodarz A. Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17(5):475-81.
21. Suwinska A, Czolowska R, Ozdzinski W, Tarkowski AK. 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* 2008; 322(1):133-44.
22. Nishioka N, Inoue K, Adachi K, et al. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 2009;16(3):398-410.
23. Frankenberg S, Gerbe F, Bessonard S, et al. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* 2011;21(6):1005-13.
24. Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* 2006;10(5):615-24.
25. Morris SA, Teo RT, Li H, Robson P, Glover DM, Zernicka-Goetz M. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(4):6364-69.
26. Nakan KK, Ji H, Maehr R, et al. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev* 2010;24(3):312-26.
27. Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 2008;135(8):3081-91.
28. Tam PPL, Loebel DAF. Gene function in mouse embryogenesis: Get set for gastrulation. *Nature Reviews Genetics* 2007;8(5): 368-81.
29. Rossant J, Tam PPL. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 2009;136(5):701-13.
30. Torres-Padilla ME, Richardson L, Kolasinska P, Meilhac SM, Luetke-Eversloh MV, Zernicka-Goetz M. The anterior visceral endoderm of the mouse embryo is established from both preimplantation precursor cells and by de novo gene expression after implantation. *Dev Biol* 2007;309(1):97-112.
31. Takaoka K, Yamamoto M, Shiratori H, et al. The mouse embryo autonomously acquires anteriorposterior polarity at implantation. *Dev Cell* 2006;10(4):451-9.
32. Lu CC, Brennan J, Roberston EJ. From fertilization to gastrulation: Axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11(4):384-92.
33. Zernicka-Goetz M. Patterning of the embryo: The first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 2002;219(4):815-29.
34. Futaki S, Hayashi Y, Emoto T, Weber CN, Sekiguchi K. Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. *Mol Cell Biol* 2004;24(23):10492-503.
35. Duncan SA, Nagy A, Chan W. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: Tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 1997;124(2):279-87.
36. Mesnard D, Guzman-Ayala M, Constam DB. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Development* 2006;133(13):2497-505.
37. Rivera-Perez JA, Mager J, Magnuson T. Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev Biol* 2003;261(2):470-87.
38. Donnison M, Beaton A, Davey HW, Broadhurst R, L'Huillier P, Pfeffer PL. Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development* 2005;132(10):2299-308.
39. Perea-Gomez A, Lawson KA, Rhinn M, et al. OTX2 is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo. *Development* 2001;128(5):753-65.
40. Iratni R, Yan YT, Chen C, et al. Inhibition of excess nodal signaling during mouse gastrulation by the transcriptional corepressor DRAP1. *Science* 2002;298(5600):1996-9.