

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PRE VE POSTİMLANTASYON DÖNEMDE FARE EMBRİYO GELİŞİMİNİ
DÜZENLEYEN SİNYAL YOLAKLARININ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Berna SÖZEN

DOKTORA TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PRE VE POSTİMLANTASYON DÖNEMDE FARE EMBRİYO GELİŞİMİNİ
DÜZENLEYEN SİNYAL YOLAKLARININ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Berna SÖZEN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Necdet DEMİR

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Magdalena ZERNICKA-GOETZ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2015-1109 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 28/06/2018

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM
Ege Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR
Yeditepe Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Berna SÖZEN

İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Necdet DEMİR

İmza



TEŐEKKÜR

Teőekkür ve saygının en büyüğünü 2010 senesinde başladığım akademik hayatımın yüksek lisans ve doktora eğitimi süresince yol göstericiliğı, bana olan inancı ve sonsuz desteğı ile hem maddi hem de manevi her zaman yanımda olan sayın danışman hocam Prof. Dr. Necdet Demir'e sunmak isterim.

Doktora tez çalışmalarım esnasında beni ekibine dahil ederek, doktora tezimin eş-danışmanlığını üstlenen, çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen, araştırmaya olan tutkusu ve başarmaktaki ısrarcılığı ile bilimsel vizyonumu değıştiren değıerli hocam Prof. Dr. Magdalena Zernicka-Goetz'e teőekkür ve saygılarımı sunarım.

Cambridge Üniversitesi'nde geçirdiğim 2.5 yıl süresince, çalışmalarım katkıda bulunan, bilimsel ve manevi yardımları için Dr. Andy Cox, Dr. Sarah Harrison, Dr. Marta Shahbazi ve Meng Zhu'ya,

Doktora tez çalışmalarımı, Cambridge Üniversitesi, Fizyoloji Gelişim ve Sinir Bilimleri Bölümü'nde yapabilmem için gerekli desteğı sağlayan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEP),

Cambridge Üniversitesi'nde yürüyen araştırma projelerimize finansal destek sağlayan Wellcome Trust (UK) ve Avrupa Araştırma Konseyi'ne (ERC),

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değıerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değıerli çalışanlarına,

Tüm eğitim yaşamım boyunca sağladıkları imkanlar ve yoğun destekleri için sevgili ailemin tüm fertlerine, sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: İmplantasyon zamanında embriyo, morfogenezin temelini oluşturan ve doku modellenmesini belirleyen kritik bir değişime uğrar. Çalışmanın amacı, embriyonun pre-postimplantasyon geçiş döneminde *in vivo*'da maternal doku içerisinde izlenemeyen morfogenetik yapılanmanın nasıl düzenlendiği sorusuna *in vitro*'da maternal dokular olmaksızın yanıt aramaktır.

Yöntem: Bu tez çalışmasında implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür sistemi kullanılmış ve literatürde ilk kez implantasyon anındaki BMP/Smad-p38MAPK sinyal aracılı hücresel yapılanma araştırılmıştır. Ayrıca, embriyonik ve trofoblast kök hücreleri ile, embriyonik ve ekstraembriyonik doku gelişimleri *in vitro*'da taklit edilmiş, kök-hücre kaynaklı doku ve embriyo-benzeri modeller üzerinde pre-post implantasyon geçiş döneminde gerçekleşen morfogenez araştırılmıştır. RNAi teknolojisi ve moleküler inhibitör uygulamaları kullanılarak canlı mikroskopik görüntülemeler yapılmış, doku spesifik moleküler belirteçler, kantitatif gerçek zamanlı PCR ve konfokal mikroskopi analizleri ile kapsamlı olarak araştırılmıştır.

Bulgular: Smad1/5/8 sinyal inhibisyonunun Eomes ve Elf5 gibi kilit moleküler elemanların ekspresyonunu düşürüp proliferasyonu azaltarak ExE doku devamlılığını etkilediği tespit edilmiştir. Smad-bağımlı BMP sinyal inhibisyonu ayrıca, Epi dokusunda ve embriyonik kök hücrelerde *Acs14*, *Dll3*, *Fgf5* ve *Otx2* ekspresyonlarını arttırarak prematüre pluripotensi faz değişimine neden olduğu ve epiblast dokusunda hücre ölümünü indüklediği bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarında, pre-post implantasyon dönem embriyonik gelişimde ekstraembriyonik doku ve kök hücre sürdürülebilirliği için Smad-bağımlı BMP sinyal mekanizmasının direkt rol oynadığı gözlenmiştir. BMP/Smad inhibisyonu sonucunda meydana gelen moleküler defektler sonucunda yumurta silindiri oluşumunun başarısızlık ile sonuçlandığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: bmp, smad, ekstraembriyonik ektoderm, embriyonik kök hücre, trofoblast kök hücre

ABSTRACT

Objective: At implantation, the embryo undergoes a critical transformation process which requires precise spatiotemporal control of key signalling pathways, important for morphogenesis and cell fate specification. The aim of this study is to use an *in vitro* approach permitting to investigate how the morphogenetic organization of the embryo become established during the transition of pre- to post-implantation which cannot be traced inside of the maternal tissue *in vivo*.

Method: In this study, by using a protocol permitting the embryo development beyond implantation stage *in vitro*, the role of BMP/Smad-p38MAPK signalling events during this pre-to-postimplantation transition was investigated first time in the literature. In addition, we investigated the morphogenetic events of tissue remodelling during pre- to post-implantation transition by recapitulating the tissue formation and generating the embryo-like structures from the embryonic and trophoblast stem cells. Live imaging after using RNAi technology and molecular inhibitor applications were used, and, numerous tissue-specific molecular markers have been extensively explored with qRT-PCR and confocal microscopy analyses.

Results: It has been determined that the inhibition of Smad1/5/8 decreases expression of key molecular elements such as Eomes and Elf5, thereby endangering ExE tissue continuity and decreasing proliferation. Smad-dependent BMP signaling inhibition has also been shown to induce premature pluripotency phase change by increasing expression of *Acsl4*, *Dll3*, *Fgf5*, *Otx2* in epiblast and embryonic stem cells, and, therefore, inducing cell death.

Conclusion: As a result, Smad-dependent BMP signaling mechanisms have been observed to play a direct role in the maintenance of extraembryonic tissue and stem cells during pre-to-post implantation transition. Molecular defects which occurred as a result of BMP/Smad inhibition resulted in the failure of the formation of egg cylinder.

Key words: bmp, smad, extraembryonicectoderm, embryonic stem cells, trophoblast stem cells

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Preimplantasyon embriyo gelişimi ve hücrel farklanmanın transkripsiyonel kontrolü	3
2.2. İmplantasyona giriş ve postimplantasyon embriyo gelişimi	5
2.3. İmplantasyona giriş ve postimplantasyon embriyo gelişimi	8
2.4. Trofoblast ve Ekstra-Embriyonik Ektoderm (ExE) gelişimi	9
2.5. Epiblast morfogenezi ve proamniyotik kavite oluşumu	11
2.6. Gastrulasyona giriş, bilateral simetrinin kırılması ve mezoderm oluşumu	13
2.7. Embriyonik gelişim takibi için time-lapse (zaman atlatmalı) görüntüleme sistemleri	15
2.8. BMP/Smad-p38 MAPK Sinyali	16
2.9. Çalışmanın çıkış noktası, hipotezi ve amacı	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. <i>In Vivo</i> Embriyo eldesi	21
3.2. İmplantasyonu destekleyici <i>in vitro</i> kültür	21
3.3. Embriyo Kültüründe Moleküler İnhibitör Uygulamaları	24
3.4. Embriyonik Gelişim Takibi için Döner-Disk Konfokal Time-Lapse 4D Görüntüleme	25
3.5. Sytox Canlı Hücre Ölümü Görüntüleme	25

3.6. Çalışmada kullanılan yabancı ve transgenik kök hücreler	25
3.7. %0.1 Jelatin Solüsyonu Hazırlanışı	26
3.8. Naif Pluripotent Embryonik Kök Hücre Kültürü ve 3D Matrijel Kültür	26
3.9. Pluripotensi faz değişim analizi için EKH hücre kültüründe inhibitor uygulaması	28
3.10. Trofoblast Kök Hücre Kültürü ve 3D Matrijel Kültür	28
3.11. Kök hücre kültüründe RNAi Uygulaması	30
3.12. EKH ve TKH Ko-Kültürü	30
3.13. Triple İmmünfloresan İşaretleme ve Konfokal Analizler	30
3.14. Konfokal Görüntü Veri Toplama, İşleme ve Nicel Analizler	33
3.15. Kantitatif Real-Time PCR Tekniği	33
3.15.1. Total RNA İzolasyonu	34
3.15.2. Tek Basamak Kantitatif Real-Time PCR Uygulaması	35
3.18. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Peri-implantasyon gelişim potansiyelleri ve embriyonik soy farklanması	38
4.2. BMP/Smad yokluğuna bağlı gelişen bozulmuş ExE ve TKH fenotipleri	43
4.3. BMP/Smad sinyal inhibisyonunun implantasyon sonrası embriyolardaki ExE doku gelişiminden sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi	46
4.4. BMP/Smad sinyal inhibisyonunun trofoblast kök hücre kimliklerinin sürdürülmesine etkisi	49
4.5. İmplantasyonu destekleyici <i>in vitro</i> kültürde BMP sinyali baskılanmış embriyolardaki hücre ölümünün değerlendirilmesi	53
4.6. İmplantasyonu destekleyici <i>in vitro</i> kültürde BMP sinyali baskılanmış embriyolardaki hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi	55
4.7. BMP inhibitörleri varlığında peri-implantasyon epiblast gelişimi, kavitasyon ve embriyonik kök hücre pluripotensi faz değişiminin değerlendirilmesi	57
4.8. Kök-hücre kaynaklı model embriyolarda BMP inhibisyonu sonrası morfogenez	59

5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	71
EKLER	77
EK-1. Harrison SE*, Sozen B*, Christodoulou N, Kyprianou C, Zernicka-Goetz M. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. Science. 2017 Apr 14;356(6334).	
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Fare (A) ve insanda (B) karşılaştırmalı preimplantasyon gelişim süreci	4
Şekil 2.2.	Preimplantasyon dönemde gerçekleşen asimetrik bölünme dalgaları	5
Şekil 2.3.	İmplantasyon anındaki blastosist aşamasında gözlenen embriyonik hücre soyları	6
Şekil 2.4.	İmplantasyon anındaki blastosist ve postimplantasyon yumurta silindiri	7
Şekil 2.5.	Pre-postimplantasyon geçiş aşamaları ve embriyonik tabakaların oluşması	8
Şekil 2.6.	Pluripotensinin iki fazı: naif ve yönlenmiş	9
Şekil 2.7.	Pre-post-implantasyon geçişinde embriyonik dokuların yeniden düzenlenmesi	10
Şekil 2.8.	Peri-implantasyon morfogenez modeli	13
Şekil 2.9.	Gastrulasyona giriş ve vücut eksenlerinin oluşumu	14
Şekil 2.10.	Time-lapse 4D canlı görüntüleme sistemleri ile embriyonik soy takibi	16
Şekil 2.11.	BMP sinyal yolağı	18
Şekil 3.1.	Blastosist eldesi ve E4.5 ile E5.5. günler arası in vitro implantasyon kültür sistemi	24

Şekil 3.2.	Çalışmada kullanılan inhibitörler ve hücre içi etkinlik mekanizmaları	25
Şekil 3.3.	Pluripotensi faz değişimi için kullanılan deney düzeneği	28
Şekil 4. 1.	İmplantasyonu destekleyici <i>in vitro</i> kültürün 0. saatinde elde edilen blastosist aşaması preimplantasyon embriyo ve peri-implantasyon morfogenezini tamamlamış, kültürün 48. saatindeki egg cylinder aşaması post-implantasyon embriyo.	38
Şekil 4.2.	Blastosist aşaması preimplantasyon embriyolardaki aktif Smad-bağımlı ve -bağımsız (p38 MAPK) BMP sinyali ve bu sinyallerin inhibitör uygulaması sonrası yumurta silindiri aşamasındaki postimplantasyon embriyolarda baskılanması.	40
Şekil 4.3.	Smad-bağımlı ve -bağımsız BMP inhibisyonunun embriyonik soy gelişimi üzerine etkisi.	42
Şekil 4.4.	BMP sinyal inhibisyonu sonrasında ExE soyunda ve TKH organizasyonunda gözlenen fenotip bozulmaları.	44
Şekil 4.5.	BMP sinyal inhibisyonunun implantasyon sonrası embriyolardaki ExE doku gelişiminden sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi.	48
Şekil 4.6.	TKH kültüründe <i>Smad5</i> siRNA transfeksiyonu ile BMP/Smad yolağının susturulmasının TKH belirteç ekspresyonlarına etkisi.	50
Şekil 4.7.	BMP sinyal inhibisyonunun TKH devamlılığında sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi.	52
Şekil 4. 8.	BMP sinyali baskılanmış pre-post geçiş dönemindeki embriyolarda hücre ölümünün değerlendirilmesi.	54

- Şekil 4. 9.** Kök hücre-kaynaklı doku benzeri sferoidlerde ve *in vitro* 56
kültürde gelişmiş implantasyon sonrası embriyolarda
proliferasyon değerlendirmesi
- Şekil 4. 10.** BMP/Smad inhibisyonundan sonra EKH sferoidlerinde ve Epi 60
soyunda artmış hücre farklanması.
- Şekil 4. 11.** Kök-hücre kaynaklı model embriyolarda gerçekleşen 62
morfogenezde BMP sinyal inhibisyonunun etkisi.



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	IVC1 medyumunun içeriği ve içerdiği maddelerin kullanım amaçları	22
Tablo 3.2.	IVC2 medyumunun içeriği ve içerdiği maddelerin kullanım amaçları	23
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan inhibitör molekülleri	24
Tablo 3.4.	İmmünoforesan işaretlemede çalışılan primer antikorlar ve kullanım amaçları	32
Tablo 3.5.	RNA-to-CT tek basamak qPCR için kullanılan içerikler ve konsantrasyonları	36
Tablo 3.6.	RNA-to-CT tek basamak qPCR siklus amplifikasyonu	36
Tablo 3.7.	Çalışmada kullanılan qPCR primer dizileri	36

SİMGELER ve KISALTMALAR

BMP	: Kemik Morfogenetik Proteinleri (Bone Morphogenetic Proteins)
cDNA	: Komplementer DNA
CSAİD	: Sitokin Baskılayıcı Anti İnflamatuar İlaç
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
DM	: Dorsomorphin Dihydrochloride
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleic Acid
EC	: Embriyonik Cisimcikler
EGA	: Embriyonik Genom Aktivasyonu
EKH	: Embriyonik Kök Hücreler
ExE	: Ekstraembriyonik Ektoderm
Epi	: Epiblast
EpiKH	: Epiblast Kök Hücreleri
ESM	: Ekstraselüler Matriks
FCS	: Fetal Dana Serumu
FGF4	: Fibroblast Büyüme Faktörü-4
İHK	: İç Hücre Kitlesi
KSR	: KnockOut Serum Replacement

LIF	: Leukaemia Inhibitory Factor
MAPK	: Mitogenle-Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MEF	: Mouse Embriyonik Fibroblast
mRNA	: Messenger RNA
PaE	: Parietal Endoderm
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PE	: Primitif Endoderm
PFA	: Paraformaldehit
qRT-PCR	: Quantitative Real-Time- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: Riboksinükleik Asit
RNAi	: RNA interferaz
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
TE	: Trofoektoderm
TGC	: Trofoblast Dev Hücreleri
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörleri (Transforming Growth Factors)
TKH	: Trofoblast Kök Hücreler
VE	: Viseral Endoderm

1. GİRİŞ

Fertilizasyonun dördüncü gününden sonra (E4.5), fare blastosistleri uterus içerisine implantasyona hazır hale gelir ve postimplantasyon yumurta silindiri olarak adlandırılan karakteristik embriyo mimarisini oluşturabilmek için bir seri morfogenetik değişiklikten geçer. Bu değişiklikler, blastosistte amorf hücre topluluğu yapısında olan epiblast (Epi) tabakasının pro-amniyotik kaviteyi çevreleyen kupa şekilli polarize bir epitele yeniden organize olması ve postimplantasyon yumurta silindirinin proksimal bölgesinde yer alması ile; blastosistin polar trofoektoderm (TE) tabakasının postimplantasyon yumurta silindirinin distal bölgesinde yer alan ekstraembriyonik ektoderm (ExE) tabakasını oluşturması ile karakterizedir. Her iki doku, blastosistin primitif endoderm (PE) bölgesinden köken alan viseral endoderm (VE) ile çevrelenmiştir (Bedzhov, Graham ve ark. 2014). Embriyonik doku olan Epi, ileride oluşacak embriyoya kaynaklık ederken, diğer iki ekstra-embriyonik doku (ExE ve VE) plasenta ve yolk kesesinin yapısına katılır. Pre-post implantasyon geçiş dönemi olan ve peri-implantasyon gelişim olarak adlandırılan dönemde ortaya çıkan bu yeniden düzenlenme, gelecekteki embriyoyu oluşturacak dokuların modellenmesinin yani morfogenezin temelini oluşturmaktadır.

Bu morfogenetik değişimler sırasında embriyo, gelişimine devam edebilmek için embriyonik ve ekstra-embriyonik dokularında yer alan kök hücre kaynaklarını korumak zorundadır (Boroviak, Loos ve ark. 2014, Kunath, Strumpf ve ark. 2004). Gelişimin erken döneminde Epi tabakası embriyonik kök hücrelere (EKH) kaynaklık ederken, polar TE ve ExE tabakası trofoblast kök hücrelere (TKH) kaynaklık eder. Bu kök hücreler, erken embriyo içerisinde sadece geçici olarak yer almasına ve gelişim boyunca diğer somatik hücrelere farklanmasına karşın, erken gelişim aşamalarında devamlılıklarını ve kök hücre özelliklerini yitirmeleri durumunda soy/doku farklanmasında başarısızlıklara neden olarak ilerleyen embriyonik gelişimi tehlikeye atabilirler.

Kemik Morfogenetik Proteinleri (Bone Morphogenetic Proteins; BMPs) sinyal molekülleri Transforme Edici Büyüme Faktörleri-beta (Transforming Growth Factors; TGF-beta) sinyal ailesinin bir üyesi olup sinyallerini tip I ve II serin/treonin kinaz reseptörleri aracılığı ile hücrelere aktarmaktadır. (Heldin, Miyazono ve ark. 1997,

Massague and Wotton 2000). BMP reseptörlerine ligand bağlanması ile fosforilasyonları indüklenerek, birbirinden bağımsız iki alt yolağı harekete geçirir: Smad1/5/9 aracılı kanonikal yolak (Smad-bağımlı) ve p38 MAPK aracılı kanonikal olmayan yolak (Smad-bağımsız) (Miyazono, Kamiya ve ark. 2010). Daha önceki çalışmalarda BMP sinyali bozulmuş veya mutant embriyoların postimplantasyon aşamalara geçebildikleri ancak, gastrulasyona ulaşamadıkları ve E8.5 aşamasında öldüklerini gösterilmiştir (Beppu, Kawabata ve ark. 2000, Chu, Dunn ve ark. 2004, Lawson, Dunn ve ark. 1999, Sirard, de la Pompa ve ark. 1998). Ancak blastosistin implantasyonu ile birlikte gerçekleşen hücresel yeniden yapılanma ve embriyonik kök hücrelerin morfogenez için kaderlerini yönlendiren sinyal araçlarına ilişkin bilgiler hala çok yetersizdir. Maternal doku içerisine gömülmüş olan embriyodaki doku modellenmesini ve yeniden yapılanmayı takip etmekteki güçlükler literatürdeki bu bilgi eksikliğinin temel nedenini oluşturmaktadır.

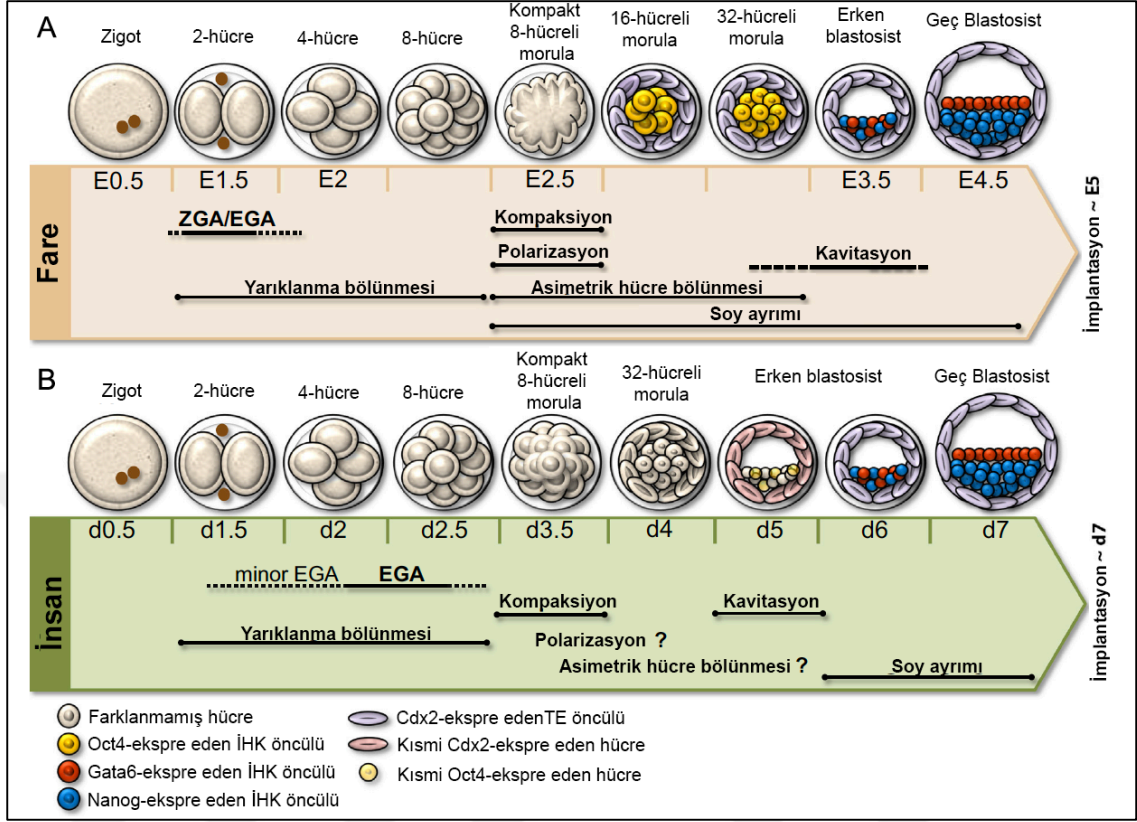
2. GENEL BİLGİLER

2.1.Preimplantasyon embriyo gelişimi ve hücrel farklanmanın transkripsiyonel kontrolü

Embriyonik hayatın fertilizasyon ve implantasyon arasındaki dönemi olan preimplantasyon gelişim memelilere özgü ve tüm memelilerde özdeş olup, başarılı bir implantasyon ve gebeliğin devamlılığı için hayati önem taşımaktadır. İnsanda yaklaşık bir hafta, farede ise 4,5 gün süren preimplantasyon gelişim dönemi sırasıyla, yüksek mitotik aktiviteye sahip olan embriyonun bir seri yarıklanma geçirmesi, embriyonik genom aktivasyonu (EGA), tıkızlaşma (kompaksiyon), kavitasyon (blastosöl boşluğu oluşumu) ve sonunda zona pellusidadan çıkarak (hatching) endometriyuma implantasyonu ile karakterizedir (Şekil 2.1) (Sozen, Can ve ark. 2014). Sekiz-hücreli embriyonik aşamada tıkızlaşmanın tamamlanması ile beraber embriyonun sahip olduğu hücreler birbirinin eşi olmaktan çıkar, gelişen embriyoyu oluşturmak için farklı kimlikler kazanmaya başlar (Zernicka-Goetz, Morris ve ark. 2009). Fertilizasyon sonrası oluşan hücrel taslağın kırılması ve böylece erken embriyonik dönemdeki hücre kimliklerinin oluşturulmasından sorumlu transkripsiyonel programları düzenleyen faktörler, gelişimsel biyolojinin temel sorusudur ve son yıllarda oldukça yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

Tıkızlaşma sırasında dışarıyla temas halinde kalan trofoektoderm (TE) öncülü olan dış blastomerlerde Cdx2, Tead4 ve Eomes gibi transkripsiyon faktörlerinin epitelyal özelleşmeyi tetiklemek üzere ekspresyonu artarken (Nishioka, Yamamoto ve ark. 2008, Strumpf, Mao ve ark. 2005), iç hücre kitlesi (İHK) öncülü olan içerideki blastomerler Oct4, Sox2 ve Nanog gibi pluripotansi faktörlerini ekspre eder ve farklanmaya karşı adeta direnirler (Şekil 2.1) (Avilion, Nicolis ve ark. 2003, Mitsui, Tokuzawa ve ark. 2003).

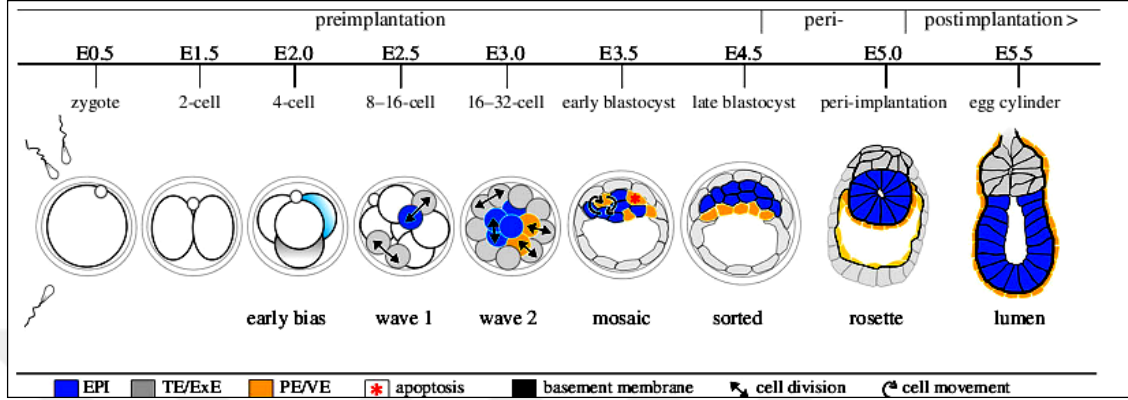
İkinci soy ayrımı olan pluripotent epiblast (Epi) ve primitif endoderm (PE) farklanmasının da bir seri transkripsiyon faktörünün kontrolü altında olduğu tanımlanmıştır. Gata4, Gata6 ve Sox17 farklanmayı PE yönünde yönlendirirken, Nanog, Oct3/4, Sox2 ve Sall4 pluripotansinin devamından sorumludur ve Epi yönünde soy ayrımını tetikler (Şekil 2.1) (Sozen, Can ve ark. 2014).



Şekil 2.1. Fare (A) ve insanda (B) karşılaştırmalı preimplantasyon gelişim süreci (Sozen, Can ve ark. 2014).

Çeşitli yıllarda yapılan invazif olmayan time-lapse soy takibi çalışmalarında, blastomerlerin geçirdiği üç farklı asimetrik bölünme dalgasının farklı oranlarda embriyonik soy oluşumuna katkıda bulunduğu açıklanmıştır (Bischoff, Parfitt ve ark. 2008, Morris, Teo ve ark. 2010, Zernicka-Goetz, Morris ve ark. 2009). Asimetrik bölünmelerin gerçekleşmesi ile beraber hücrel farklanmalar da başlar. Birinci majör dalga 8-16 hücre değişiminin olduğu dördüncü yarıklanma bölünmesinde gözlenirken, ikinci majör dalga ise 16-32 hücre değişiminin olduğu beşinci yarıklanma bölünmesinde gözlenmiştir (Şekil 2.2). Üçüncü minör dalga ise 64 hücreli embriyonik aşamadan sonra, gelişen blastosistin İHK hücre tabakasında gözlenir. Asimetrik hücre bölünmeleri sonucunda, hücre içerisindeki transkripsiyonel regülatörler de, progenitor hücrelerde asimetrik olarak dağılmaktadır. Transkripsiyonel regülatörlerin dağıldığı hücre içerisindeki amplifikasyonu ve gen ekspresyon ağına katılması sonucunda, prekürsör hücreler spesifik hücre soylarına farklanma süreçlerini tamamlarlar (commitment). Doğru soy ayrımı için spesifik transkripsiyonel ağın doğru kurulmuş olması gerekmektedir. Sonuç olarak TE, PE ve Epi progenitorlerinin orjinleri rastgele değildir, onları yaratan

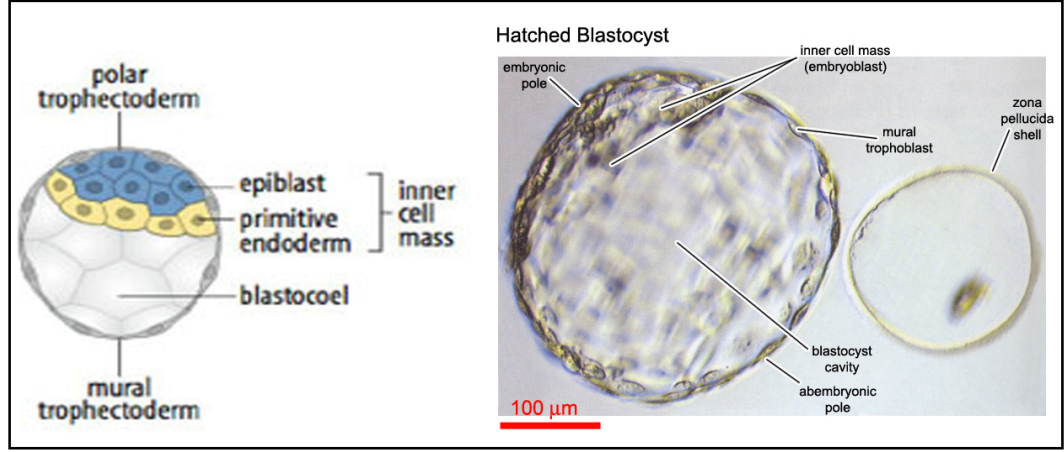
asimetrik bölünme dalgalarıdır (Bedzhov, Graham ve ark. 2014, Morris, Teo ve ark. 2010).



Şekil 2.2. Preimplantasyon dönemde gerçekleşen asimetrik bölünme dalgaları. Embriyonik ve ekstraembriyonik hücreler preimplantasyon dönemde ortaya çıkan iki asimetrik bölünme dalgası ile özelleşir. Her ardışık asimetrik bölünme dalgası sonrası TE ve İHK, İHK hücrelerinden de baskın olarak ya Epi ya da PE oluşur. ExE (ekstraembriyonik ektoderm); PE (primitif endoderm); VE (viseral endoderm) (Bedzhov, Graham ve ark. 2014).

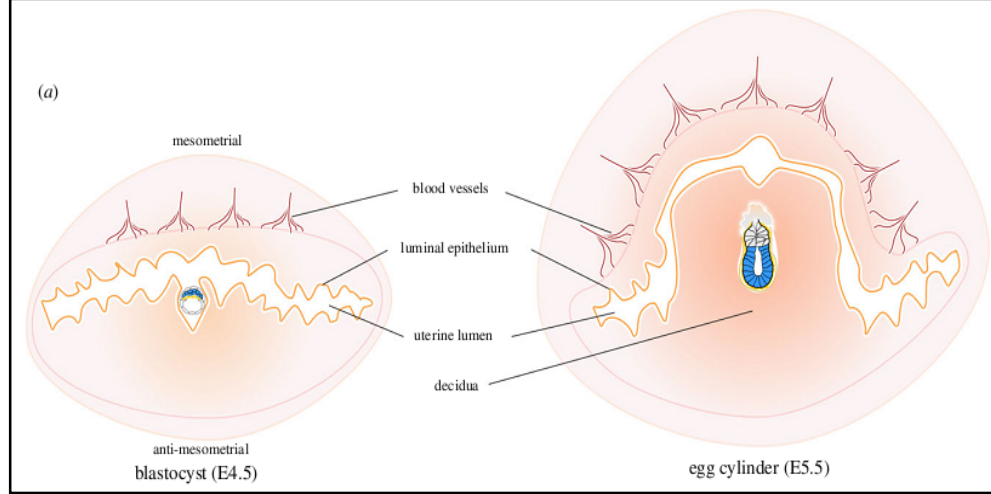
2.2. İmplantasyona giriş ve postimplantasyon embriyo gelişimi

İmplantasyon anında (E4.5-E4.75) embriyoda üç hücre tabakası gözlenir: adeta bir epitelyal örtü gibi embriyoyu dıştan çevreleyen TE, blastosöl kavitesine bakan PE ve pluripotansi özelliğini koruyan Epi (Şekil 2.3) (Sozen, Can ve ark. 2014). Dışarıdaki TE hücreleri de iki kompartmandan oluşur; Epi ile doğrudan temas halinde olan polar TE ve blastosölü çevreleyen mural TE (Şekil 2.3). Polar TE tarafından çevrelenen İHK tabakasının olduğu bölge embriyonik kutup olarak tanımlanırken, mural TE hücrelerinin olduğu karşı kutup ise abembriyonik kutup olarak isimlendirilir (Şekil 2.3).



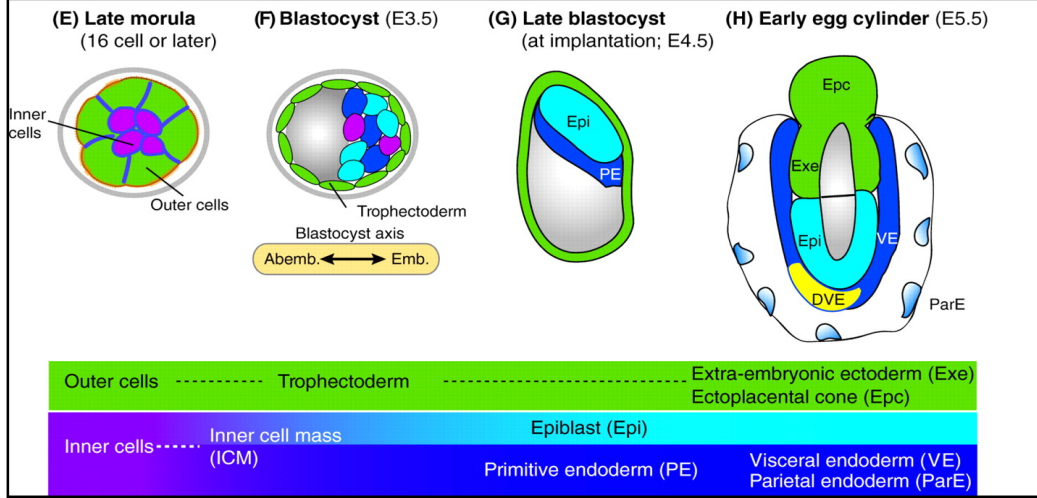
Şekil 2.3. İmplantasyon anındaki blastosist aşamasında gözlenen embriyonik hücre soyları.

Preimplantasyon süresince embriyoyu çevreleyerek ektopik implantasyonu engelleyen ve zona pellucida olarak adlandırılan glikoprotein örtü, abembriyonik kutuptaki mural TE hücrelerinin proteolitik etkinliği ile yırtılır ve böylece oluşan üç farklı hücre soyu ile birlikte gelişmekte olan blastosist zona içerisinden çıkmaya başlar. Sadece, luminal epitele bağlanacak mural TE tabakası zona pellucidadan kurtulduktan sonra implantasyon başlar (Bedzhov, Graham ve ark. 2014). Bu olay, implantasyon penceresi olarak adlandırılan uterin reseptivitenin olduğu kısıtlı zaman içerisinde gerçekleşir. Uterin reseptivite süreci embriyo gelişimi ile uyumlu bir şekilde devam eder ve iki steroid hormondan etkilenir; ovaryal östrojen ve progesteron. Mural TE invazif özellikler kazanır ve bağlanma bölgesindeki luminal epitelde apoptozisi indükler, böylece embriyonun stroma içerisine penetrasyonu indüklenir. Endometriyal stroma içerisindeki hücreler, embriyoyu çevreleyen ve desiduayı oluşturan destekleyici poliploid hücreler olarak farklılaşmaya başlarlar. Mural TE tabakası maternal doku ile temas eden ilk embriyonik tabakadır ve temasın gerçekleşmesinin hemen sonrasında trofoblast dev hücrelerine (TE giant cells; TGCs) farklılaşır. TGC'ler uterin stroma (endometriyum) içerisine invaze olarak implantasyonu başlatır ve desidual hücre farklılaşmasını desteklemek için progesteron ve tip 1 interferon gibi faktörler salgılar (Bany and Cross 2006). İmplantasyon anına kadar serbestçe yüzen blastosist, implantasyonun başlaması ile maternal doku tarafından adeta yutulur ve görüntülenemez hale gelir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İmplantasyon anındaki blastosist ve postimplantasyon yumurta silindiri. E4.5. günde zona pellusida örtüsünden çıkan blastosist endometriyum luminal epiteline invaze olmaya başlar. Devam eden 24-48 saatlik süreçte embriyo yoğun proliferasyonlar sonrası önemli morfojenetik dönüşümler geçirir ve önce yumurta silindiriformolojisi oluşur (E5.5), sonra da embriyonik bilaminar simetri kırılır (E6.5). Kolayca manipüle edilebilen preimplantasyon dönemin aksine, implantasyon zamanı maternal doku içerisine gömülen embriyonun manipülasyonu ve gözlemlenebilirliği neredeyse imkansız hale gelir (Bedzhov, Graham ve ark. 2014).

E4.5 ve E5.5. günler arasında, sadece 24 saatlik bir süreçte, fare blastosistleri çok yoğun proliferasyonlar sonrası önemli hücresel ve genetik değişimler geçirerek yeni bir morfoloji kazanırlar. Embriyonun kazandığı bu şekil, yumurta silindiri (egg cylinder) olarak adlandırılır (Bedzhov, Graham ve ark. 2014). Bu dönemde, PE hücre tabakası mural TE tabakası üzerinden göç ederek parietal endodermi (PaE) oluşturur. PaE ve mural TE arasında Reichert membranı olarak isimlendirilen bir bazal membran şekillenir. Polar TE tabakası genişler ve ekstraembriyonik ektoderm (ExE) tabakasına farklanır (Rossant and Tam 2009). ExE tabakası, sonradan plasentanın embriyonik kısmını oluşturacak multipotent trofoblast progenitörlerinin kaynağıdır. ExE ve EPI tabakası proliferasyon yeteneğindedir ve PE tabakasından köken alan bir diğer tabaka olan viseral endoderm (VE) tarafından çevrelenmeye başlarlar. İşte tüm bu süreçler, embriyonik simetrisinin kırılması ve mesoderm oluşumu ile sonuçlanan gastrulasyona hazırlık (pre-gastrulasyon) süreçleridir (Şekil 2.5) (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014, Skreb, Solter ve ark. 1991).

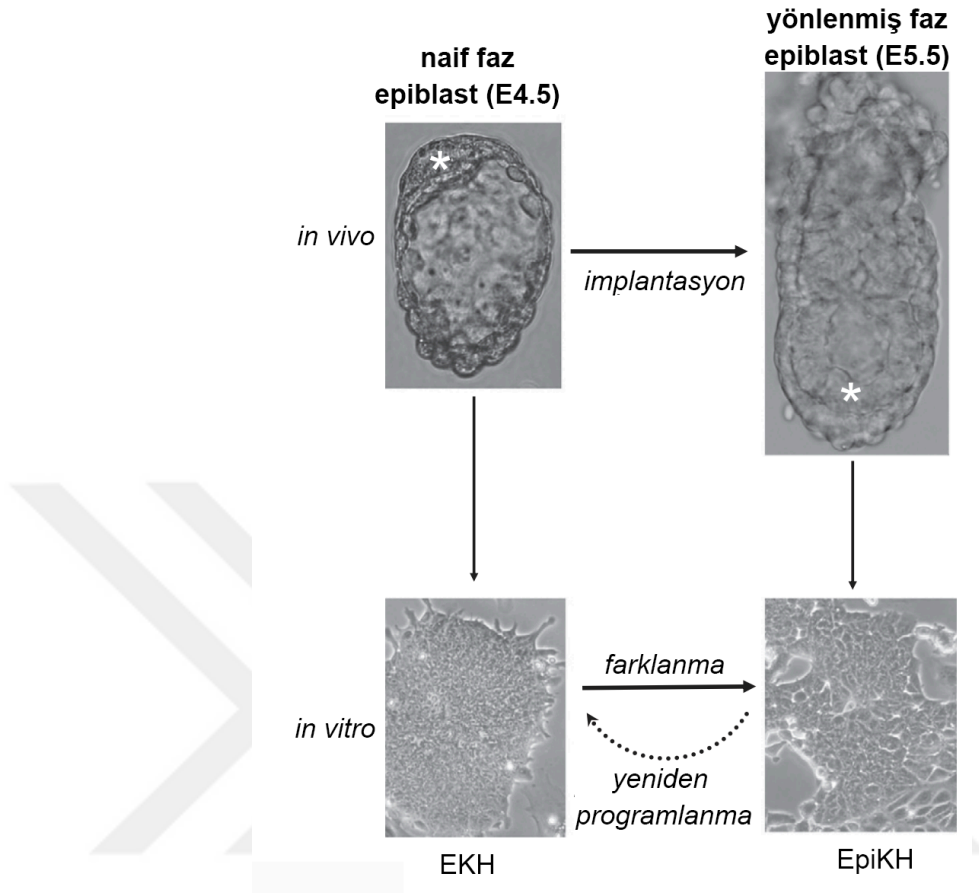


Şekil 2.5. Pre-post-implantasyon geçiş aşamaları ve embriyonik tabakaların oluşması. Embriyo preimplantasyonun 4.75. gününde (E4.75) implantasyon aşamasına girer. E5.0 ile E5.5. günler arasında embriyonik disk oluşumu gerçekleşir (Rossant and Tam 2009).

2.3. Embriyonik pluripotensinin değişimi: naif ve yönlenmiş faz

Pluripotensi, gelişen bir embriyonun pre ve erken post-implantasyon safhalarında var olan, canlıyı oluşturan özelleşmiş tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğindeki henüz farklılaşmamış hücreler için kullanılan bir tanımlamadır.

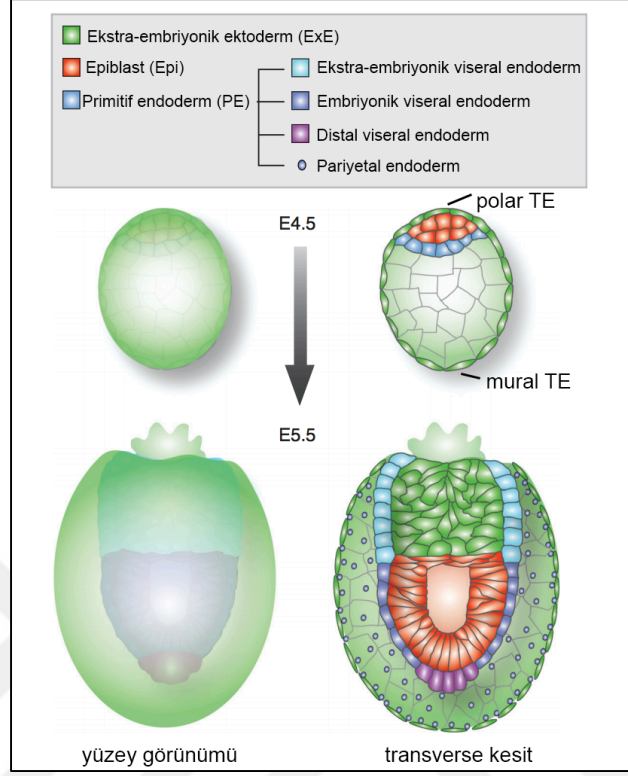
Pre-postimplantasyon geçiş döneminde embriyonun epiblast tabakasında kurulmuş olan pluripotensi faz değiştirir. E4.5. gündeki henüz implante olmamış, serbest blastosistin epiblast tabakasındaki pluripotensi naif faz olarak tanımlanırken, E5.5. güne gelindiğinde embriyonik diskteki epiblast tabakasındaki pluripotensi yönlenmiş faz olarak tanımlanır (Şekil 2.6) (Shahbazi, Scialdone ve ark. 2017). Naif pluripotensi, E4.5. günde embriyonik kök hücre kaynağı olan küresel şekilli epiblastın yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olduğu fazdır. İşlenmiş pluripotensi ise, E5.5. günde epiblastın kupa-şekilli bir epitele dönüşmesi ve ekstraembriyonik uyarılara cevap olarak soy ayrımı için özelleşmesi ile karakterizedir. Gelişen embriyonun epiblast tabakasında gözlenen bu değişimi kontrol eden sinyal mekanizmaları bilinmemektedir.



Şekil 2.6. Pluripotensinin iki fazı: naif ve yölenmiş. Naif faz olgun bir blastosistin epiblast tabakası (E4.5; beyaz yıldız) içerisinde kurulurken, bu faz aynı zamanda *in vitro* ortamdaki embriyonik kök hücreler (EKH)'de de muhafaza edilir. İmplantasyondan hemen sonra epiblast kupa-şekilli bir epitele dönüşür (E5.5; beyaz yıldız) ve naif pluripotensi ekstra-embriyonik kaynaklı uyarılara cevap olarak soy farklılaşmasına yönelmek üzere yölenmiş faza değişir. Epiblast kök hücreleri (EpiKH) *in vitro*'da yölenmiş pluripotensinin karşılığıdır. EKH'ler aktivin ve Fgf gibi uyarılara maruz bırakılırsa EpiKH'lere farklılaştırılabilir, ancak ters geçiş Klf4 veya diğer yeniden programlanma faktörlerini gerektirir (Nichols and Smith 2009).

2.4. Trofoblast ve Ekstra-Embriyonik Ektoderm (ExE) gelişimi

Blastosist aşamadaki bir embriyonun TE tabakası iki alt hücre grubuna ayrılır; polar ve mural TE. Polar TE, Epi tabakasına bitişik olan kısımdır ve implantasyon anı ve sonrasında ektoplasental koni ile ExE tabakasını, sonradan ise plasental yapıları oluşturur. Mural TE ise başlangıçta blastosöl boşluğunu çevreleyen, sonradan ise pariyetal yolk kesesinin dış yüzünü oluşturan kısımdır (Şekil 2.7) (Rivera-Perez and Hadjantonakis 2014).



Şekil 2.7. Pre-post implantasyon geçişinde embriyonik dokuların yeniden organizasyonu (Rivera-Perez and Hadjantonakis 2014).

Yapılan pek çok çalışmada ExE dokusunun çeşitli sinyal molekülleri için kaynak olduğu ve böylece proksimal Epi hücrelerini etkilediği gösterilmiştir. ExE dokusu Bmp4 için kaynaktır. Bmp4 mutant embriyolar gastrulasyon hataları gösterirler ve primordiyal germ hücresi üretemediği bilinmektedir (Winnier, Blessing ve ark. 1995). ExE kaynaklı olduğu bilinen bir diğer önemli sinyal yolağı ise Nodal sinyalidir. ExE tabakası Furin ve Pace4 gibi fonksiyonel Nodal sinyalinde rolü olan molekülleri ekspre eder. Her iki gen üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarında Epi tabakasındaki Nodal sinyalinin kurulamadığı ve bunun sonucunda embriyonun gastrulasyona giriş yapamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle Epi kaynaklı Nodal sinyalinin ExE üzerinde etkili olarak Bmp4 ekspresyonunu indüklediği, ExE kaynaklı Bmp4'ün de Epi üzerine geri dönerek Wnt3 gibi primitif çizgi belirteçlerini aktive ettiği bir geri bildirim döngüsü oluşumu açıklanmıştır (Ben-Haim, Lu ve ark. 2006).

Blastosistin TE tabakası veya yumurta silindiri embriyosunun ExE tabakası aynı zamanda önemli bir ekstra-embriyonik kök hücre grubu için de kaynaklık etmektedir. Trofoblast

kök hücreleri (TKH), blastosistin polar TE tabakasından veya postimplantasyon E8.5 güne kadarki ExE tabakasından izole edilebilirler (Tanaka, Kunath ve ark. 1998). TKH'lerin *in vitro* ortamda proliferasyonu ve kendini yenilemeleri Fgf4 ve embriyonik fibroblast koşullanmış medyumların varlığına bağlıdır (Tanaka, Kunath ve ark. 1998). Koşullanmış medyum yerine, Aktivin veya TGFb kullanılabilir ancak bu faktörler embriyoda TKH devamlılığında etkin değildir. *In vivo*'da Fgf4 ve Nodal sinyalinin ExE ve Epi dokularındaki karşılıklı iletişimi postimplantasyon dönem yumurta silindiri embriyosunun gelişimi için esastır. Epi hücrelerinden üretilen Fgf4, TE hücreleri üzerindeki Fgf2'ye bağlanır; Fgf sinyalindeki anahtar sinyal elemanlarının kaybı sadece PE farklanmasını değil, aynı zamanda TE devamlılığını da olumsuz etkiler (Arman, Haffner-Krausz ve ark. 1998).

Multipotent TE öncüllerinin devamlılığı için esas olan genler de Fgf sinyali bağımlıdır. Örneğin; membran-bağımlı kenetleme proteini Frs2a, Fgf4 uyarımı bağımlı olarak fosforillenir ve sonrasında Fgf2'nin Erk yolağını aktive etmesi ile Cdx2 ekspresyonu başlatılır. Cdx2 sırasıyla yanıt verici arttırıcı element olan Bmp4 promoter bölgesine bağlanır ve Bmp4 ekspresyonu başlar (Murohashi, Nakamura ve ark. 2010). ExE dokusundan üretilen Bmp4'ün doğru postimplantasyon Epi gelişimi için esas olduğu bilinmektedir (Winnier, Blessing ve ark. 1995). Bu nedenle, postimplantasyon yumurta silindiri embriyosunda proksimal ve distal bölgeler arasında gerçekleşen Fgf4 sinyali direkt ve indirekt olarak embriyonik (Epi dokusu) ve ekstra-embriyonik (ExE dokusu) hücre soylarının devamlılığı ve farklanması için düzenleyici görev görmektedir.

2.5. Epiblast morfogenezi ve proamniyotik kavite oluşumu

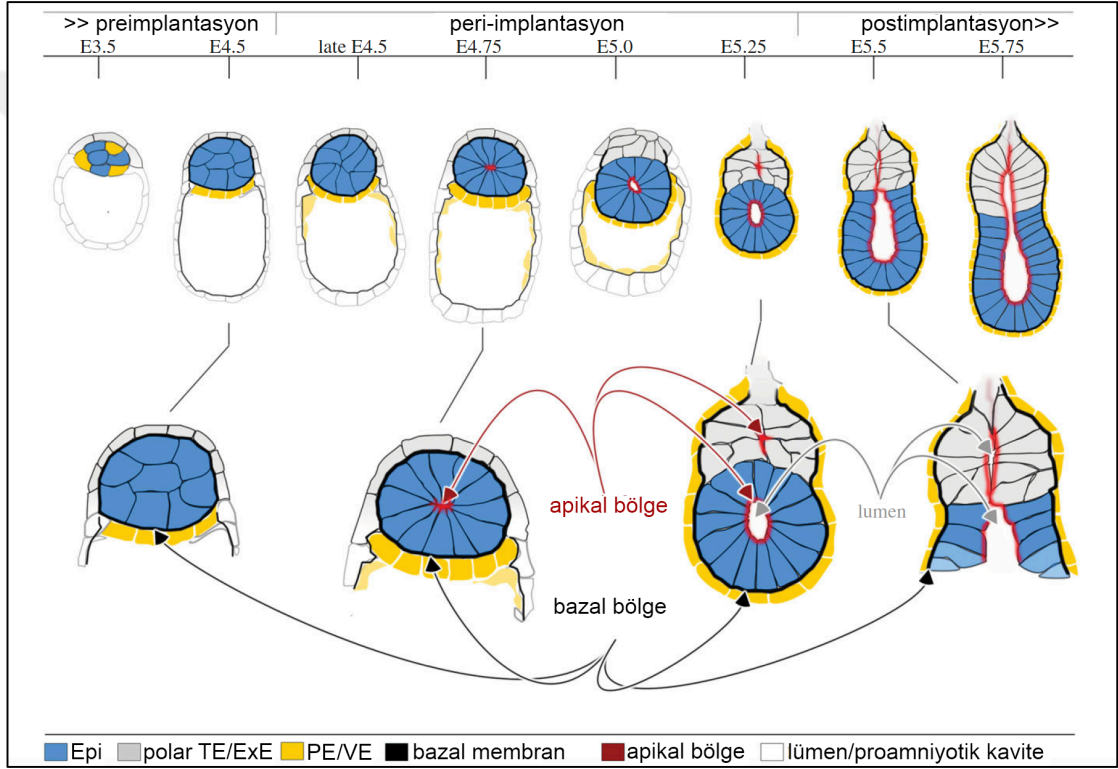
Epi dokusunun peri-implantasyon aşamasındaki tüm embriyonik yapıları etkileyen yeniden organizasyonu, polarize olmamış sıkı hücreler kümesi morfolojisinden, kupa-şekilli ve pro-amniyotik kavite ile çevrelenmiş polarize epitele yeniden şekillenmesini gerektirir. Bu yeni organizasyonun ortaya çıkışı ile pluripotent fazını değiştiren Epi doku özelleşmesi ve ileride embriyonun tümünü oluşturacak olan germ yapraklarının ortaya çıkışı için eşsiz bir kaynak oluşturur.

Proamniyotik kavite oluşumu için iki temel yaklaşım gelişmiştir: **boşluk açılımı** ve **kavitasyon**. Kavitasyon anlayışına göre, programlı hücre ölümü yani apoptoz İHK

içerisindeki solid hücre kordonunu yok eder ve ortada boş bir alan oluşturur. Boşluk açılımı anlayışı ise, kavitasyonun aksine, apoptozu gerektirmez. Bunun yerine hücrelerin ışımsal polarizasyonu ve apikal membranların ayrılması ile merkezi bir lümen oluşumunu içerir (Bedzhov, Graham ve ark. 2014). EKH'lerin kültürü ile oluşturulan Embriyonik Cisimcikler (EC) son yıllarda *in vitro* ortamda embriyonik gelişimin pek çok aşamasını taklit edebilmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sistemler kavite oluşumu için apoptozun gerekli olduğunu düşündürmektedir (Coucouvanis and Martin 1995). Bu modeller oldukça yararlı olmasına karşın, doğru bir embriyonik organizasyondan yoksundurlar ve bu nedenle *in vivo*'da gerçekleşen fizyolojik süreçleri doğru olarak taklit edemeyebilirler. Bu farklılıklardan ilki hücre sayısıdır. EC'ler *in vitro* kültürün ilk gününden itibaren bir kaç yüz hücreden oluşmalarına karşın, implantasyon dönem embriyosunun Epi tabakası sadece 8-10 hücreden oluşmaktadır (Bedzhov, Graham ve ark. 2014). İkinci farklılık ise zamanlamadır. Kavitasyon ve polarize epitelin oluşumu EC'lerde bir kaç günü içeren yavaş bir süreç iken, *in vivo*'da bu süreç E4.5-E5.5 arasındaki 24 saatlik bir dönemi kapsar (Li, Edgar ve ark. 2003).

Pluripotent Epi hücrelerinin kendiliğinden organize olma özelliklerinin keşfedilmesi ile birlikte blastosistin yumurta silindirine dönüşümünü açıklayan yeni bir model ortaya çıkmıştır (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Literatürde ilk kez Epi hücre tabakasının peri-implantasyon zamanında nasıl yeniden organize olduğunu anlamak amacı ile Zernicka-Goetz M. laboratuvarında implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür ortamı tasarlanmıştır (Bedzhov, Leung ve ark. 2014). Tasarlanan sistemin en önemli özelliği optik ışık geçirgen olması ve time-lapse ile görüntülenebilir özellik taşımasıdır (Bedzhov, Leung ve ark. 2014). Pre ve postimplantasyon geçiş dönemindeki morfojenetik basamakları adım adım ortaya çıkaran bu çalışmalarda, kullanılan çeşitli genetik belirteçler ile Epi tabakasının nasıl yeniden organize olduğu belirlenmiştir. Buna göre, preimplantasyondaki soy ayrımını takiben (E3.5-E4.5), ekstraembriyonik hücre soyu ekstraselüler matriks (ESM) proteinleri salgılayarak Epi tabakasını çevreleyecek bir bazal membran oluşturur. Bu bazal membran, ESM bileşenlerinin Epi yüzeyindeki integrin reseptörleri tarafından algılanan bir mikroçevre yaratır (Şekil 2.8). Bu mikroçevre, peri-implantasyon dönemi boyunca (geç E4.5-E5.0), Epi hücrelerinin apikal-bazal oryantasyonunu ve polarizasyonunu sağlar (Şekil 2.8). Polarizasyondan sorumlu Par

protein komplekslerinin hücre apikal yüzeyinde toplanması ile Epi hücrelerinin ışınsal bir düzende yeni şekillerini kazanması gerçekleşir (Şekil 2.8) (Bedzhov, Graham ve ark. 2014, Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014) ve merkezi bir lümen açılır (E5.0-E5.25) (Şekil 2.8). Postimplantasyon yumurta silindiri uzamaya devam ettikçe, lümen de genişler ve proximal bölgedeki ExE içerisindeki intramembranöz boşluklar ile birleşerek proamniyonik kavite oluşumunu gerçekleştirir (E5.5-E5.75) (Şekil 2.8) (Bedzhov, Graham ve ark. 2014, Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014, Harrison, Sozen ve ark. 2017).

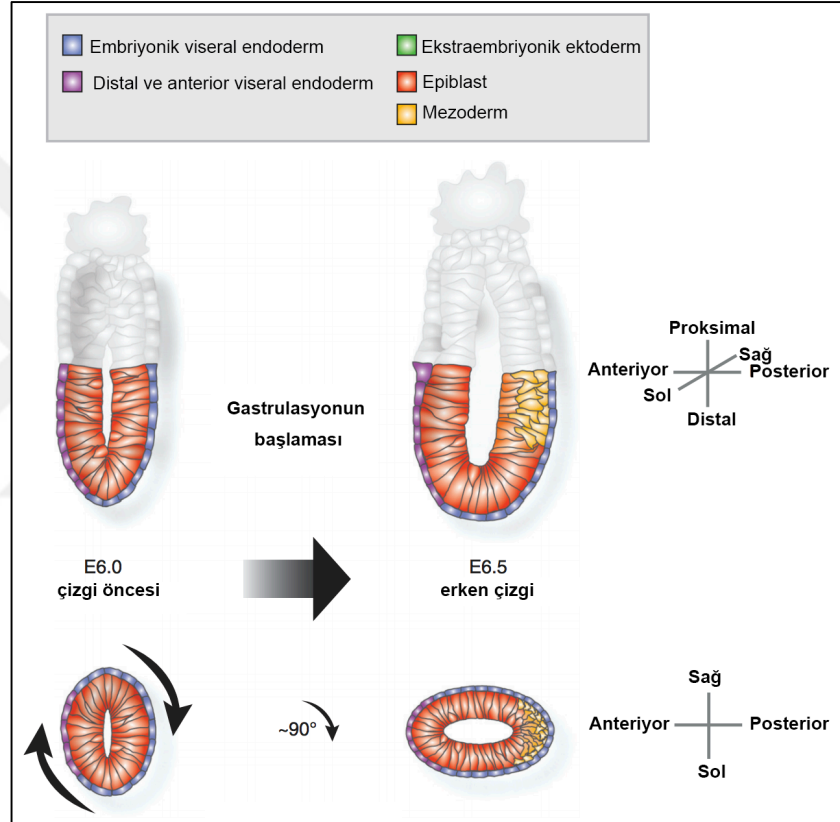


Şekil 2.8. Peri-implantasyon morfogenez modeli (Bedzhov, Graham ve ark. 2014).

2.6. Gastrulasyona giriş, bilateral simetrinin kırılması ve mezoderm oluşumu

Farede E4.5 ile E5.5 arasında gerçekleşen ve blastosistin implantasyonu sonrası uterin doku içerisinde yumurta silindire dönüşmesini içeren morfogenetik olaylar, gastrulasyona hazırlık aşamalarıdır ve bu dönemde doğru soy ayrılması, devamında gelişecek morfogenez için hayati öneme sahiptir. Bilindiği gibi, epiblast tabakası gelecekteki embrioyu oluşturacak üç germ yaprağının kaynağıdır. E6.0-6.5 zamanında gastrulasyonun gerçekleşmesi ile Epi tabakasından germ hücre serisi ve somatik hücre serisi (ektoderm, endoderm, mezoderm) gelişmektedir.

Epi hücrelerinin epitelyal-mezenşimal dönüşüme uğradıkları bölgede primitif çizginin oluşması ile gastrulasyon başlar. Farede primitif çizgi ilk olarak, proksimal epiblast bölgesinde, embriyonik/ekstraembriyonik sınırdan ortaya çıkar. Primitif çizginin pozisyonu embriyonun posterior bölgesini belirler ve bu bölgeden mezoderm ve endoderm germ yaprağı oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.9) (Rivera-Perez and Hadjantonakis 2014).

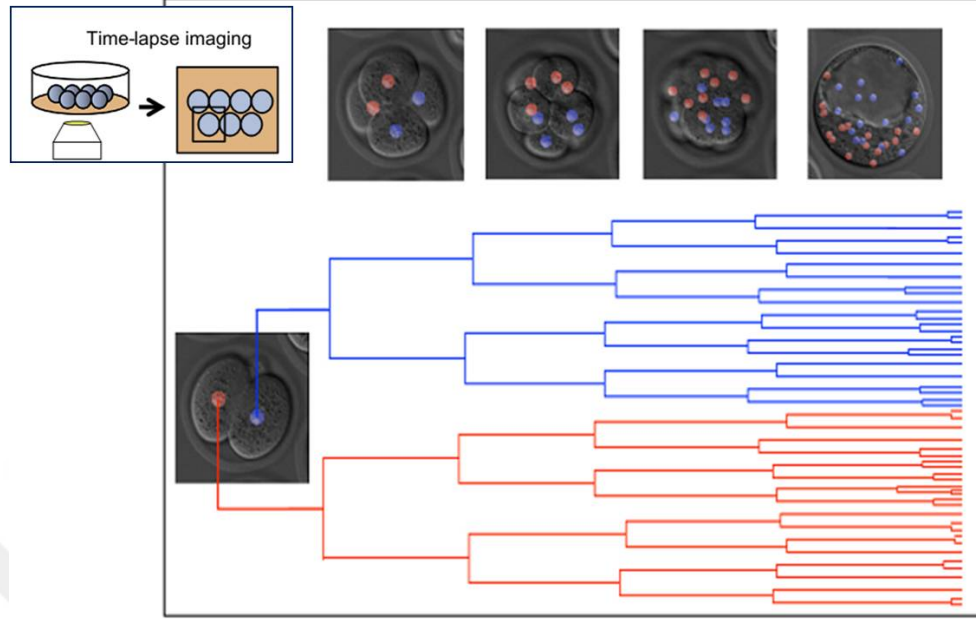


Şekil 2.9. Gastrulasyona giriş ve vücut akslarının oluşumu (Rivera-Perez and Hadjantonakis 2014).

E6.5'te posteriyor epiblast bölgesinde morfolojik olarak görülmeye başlayan primitif çizgi oluşumu, moleküler düzeyde E5.75 aşamasında tespit edilebilmektedir. Buna göre, en erken moleküler belirteç olan Wnt3 ekspresyonu posteriyor epiblast bölgesinde T-box transkripsiyon faktörü olan Brachyury ekspresyonunu indükler. Bu iki moleküler belirteç mezoderm oluşumunun en erken safhalarını gösterir (Rivera-Perez and Hadjantonakis 2014).

2.7. Embriyonik gelişim takibi için time-lapse (zaman atlatmalı) görüntüleme sistemleri

Son yıllarda önemi gittikçe artan üç boyutlu canlı hücre görüntüleme sistemleri, erken embriyo gelişim süresince embriyoların takip edilmesine imkan veren bir teknolojidir. Bu teknoloji ile bütün hücrelerin ve her bir nükleusun 4D koordinatları, hücre bölünme eksenlerinin yönü, hücre siklusu uzunlukları, blastomerlerin mitoz zamanları canlı olarak istenilen zaman aralıkları ile kaydedilebilmektedir. Böylece tek bir blastomerden köken alan hücreleri hiç gözden kaybetmeden 2-hücreli embriyonik aşamadan blastosist içerisinde konumlanana kadar takip edilebilmesine imkan vermektedir (Şekil 2.10). Bütün hücrelerin bölünme oryantasyonlarının takip edilmesi, simetrik/asimetrik bölünmeler arasındaki ilişkiyi ve bu bölünmelerin embriyonun içindeki/dışındaki hücre nesillerine nasıl katkıda bulunduğunu ortaya çıkarmaktadır (Şekil 2.10). Floresan işaretli ajanlar ve vital boyalar ile kombine edilen time-lapse görüntüleme çalışmaları sayesinde, erken embriyo hücre kaderlerinin belirlenmesine ilişkin önemli hücresel ve moleküler mekanizmalar açıklanmıştır ve devam eden çalışmalar ile mevcut bilgilerimiz sürekli güncellenmektedir (Piotrowska-Nitsche and Zernicka-Goetz 2005, Plachta, Bollenbach ve ark. 2011, Tabansky, Lenarcic ve ark. 2013, Torres-Padilla, Parfitt ve ark. 2007). Time-lapse görüntüleme sistemleri invazif olmaması nedeni ile embriyonik gelişim üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi bulunmamaktadır. Bu nedenle klinikte, IVF laboratuvarlarında da gelişimi takip etmek için tercih edilen bir teknolojidir.



Şekil 2.10. Time-lapse 4D canlı görüntüleme sistemleri ile embriyonik soy takibi. Bu sistem ile tek bir blastomerdan blastosist aşamasına kadar gelişen embriyonik soyların gelişim süresince takibi ve analizleri gerçekleştirilebilmektedir (Bischoff, Parfitt ve ark. 2008).

2.8. BMP/Smad-p38 MAPK Sinyali

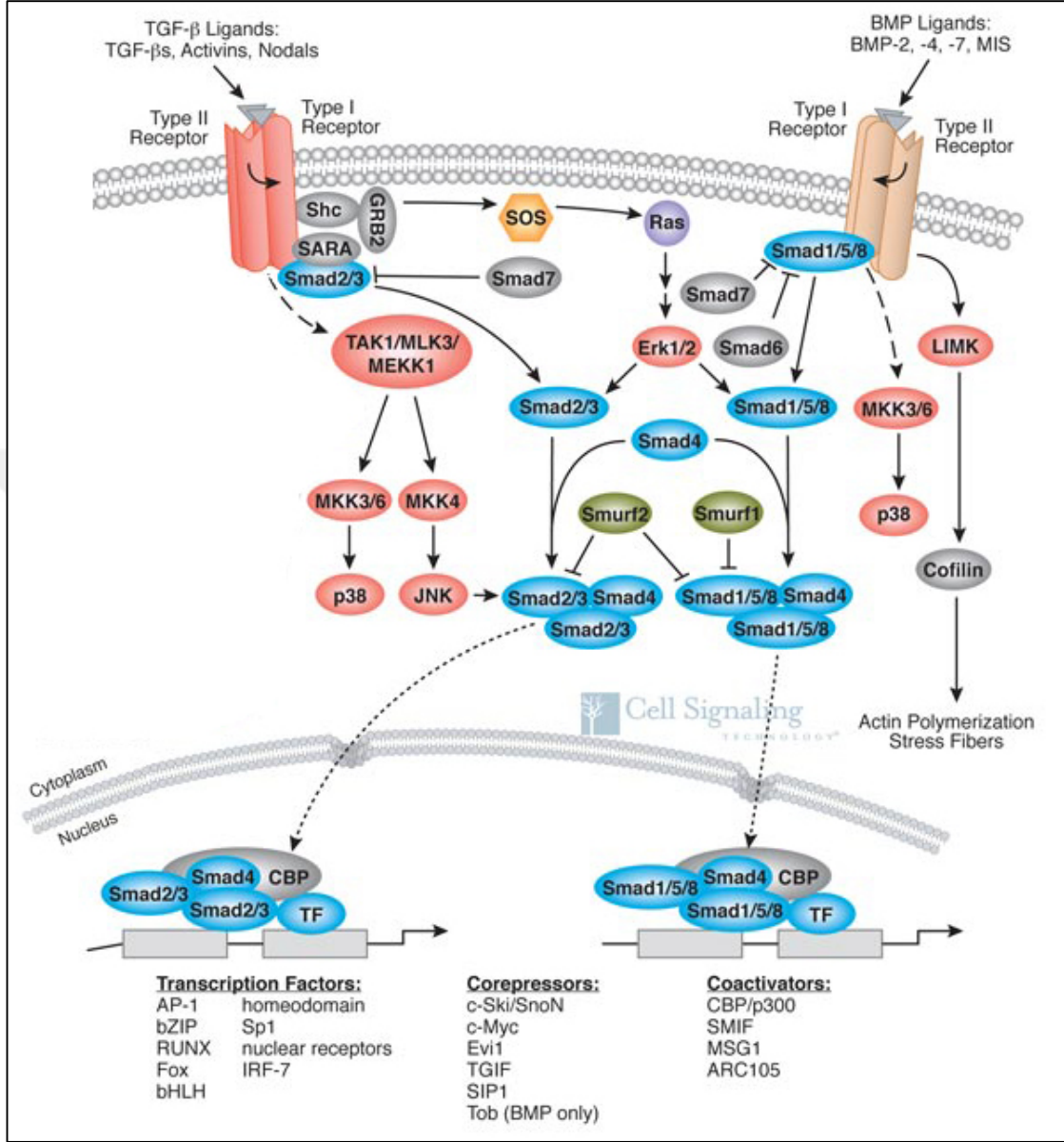
Transforme edici Büyüme Faktörü β (Transforming Growth Factor β ; TGF β) süperailisine ait olan Kemik Morfogenetik Protein (Bone Morphogenetic Protein; BMP) sinyal yolağı hücre proliferasyonu, farklanması, apoptoz gibi önemli hücresel süreçlerde rol alarak embriyonik gelişim ve patern oluşumunda hayati görevler üstlenmektedir. BMP sinyalleri ayrıca dokunun yeniden modellenmesi ve rejenerasyonu süreçlerine de dahil olur ve kök hücre nişinin devamlılığını sağlayarak yetişkin homeostasını sürdürür (Aubin, Davy ve ark. 2004). BMP ailesine ait yirmiden fazla alt basamak tipi tanımlanmıştır. BMP sinyali ile etkileşerek bu yolağın aktarımına dahil olan, tanımlanmış iki farklı sinyal yolağı bulunmaktadır;

- 1) Klasik BMP sinyali olarak tanımlanan **BMP-Smad yolağı**, R-Smad (reseptör ile aktifleştirilmiş Smad'lar) olarak tanımlanan Smad1, Smad5 veya Smad8'in BMP reseptör-tip-1 aracılı fosforilasyonu ile hücre içerisinde görev yapar. Fosforile olmuş iki R-Smad, sitoplazma içerisindeki Smad4 ile heterodimerik kompleks oluşturur. Smad-heterodimerik-kompleks nükleus içerisine geçer ve burada diğer transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek hedef genin ekspresyonunu düzenler.

2) Klasik BMP sinyaline paralel olan **BMP-p38 MAPK yolağı** ise, TGF β aracılığı ile, MAPK sinyalleri üzerinden gerçekleşir.

Hücre içi BMP sinyalinin iletim basamaklarında, bir diğer internal sinyal mekanizması olan MAPK (özellikle p38 MAPK) sinyali ile etkileşimi bulunmaktadır. BMP üst yolağı tarafından aktarılan sinyal, MAPK aracılığı ile R-Smad'ların ayrımsal fosforilasyonunu gerçekleştirir. Smad1, 2, 3, 5, 8 dahil olmak üzere tüm R-Smad'larda MAPK konsensus motif bölgeleri (S187A, S195A, S206A ve S214A) bulunur. Böylece BMP sinyalinin hücre içerisindeki aktarımı gerçekleşir (Aubin, Davy ve ark. 2004, Qi, Li ve ark. 2004). Smad'ları kontrol eden BMP-MAPK sinyallerinin karşılıklı etkileşiminin implantasyon öncesi gelişim için oldukça önemli olduğu bilinmektedir ancak peri-implantasyon aşamalarındaki rolleri henüz aydınlatılamamıştır.

Çeşitli yıllarda yapılan çalışmalarda Smad4 ve Bmpr2 mutant embriyoların postimplantasyon gelişime geçtikleri fakat extra-embriyonik yapılarda anormallikler gösterdikleri ve gastrulasyona giremedikleri gösterilmiştir (Chu, Dunn ve ark. 2004, Lawson, Dunn ve ark. 1999, Winnier, Blessing ve ark. 1995). Ancak E4.5 sonrası embriyonik gelişimdeki hücrel farklanmada Bmpr2 ve Smad4'ün spesifik rolleri bilinmemektedir. Bu rollerin araştırılabilmesi için implantasyon anını ve sonrasını canlı takip edilebilecek görüntüleme sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.11. BMP sinyal yolağı (<https://www.cellsignal.com/contents/science/cst-pathways/science-pathways>)

2.9. Çalışmanın çıkış noktası, hipotezi ve amacı

Preimplantasyon gelişimde embriyonik hücre soylarının ortaya çıkışı ve doğru tabakalanmasını kontrol eden moleküler mekanizmalar, canlı görüntüleme analizleri ile pek çok çalışmada açıklanmıştır. Ancak embriyonik soy oluşumu sadece preimplantasyonla sınırlı değildir. Pre-postimplantasyon geçişi yani blastosistin uterin doku ile temasını içeren peri-implantasyon ve devamındaki gelişimsel aşamalara ilişkin araştırmalar ve morfojenetik süreçleri yönlendiren sinyal mekanizmalarına ilişkin bilgiler

yetersizdir. İmplantasyon ve devamında morfogenezi yönlendiren sinyaller ile ilgili literatürdeki bu bilgi yetersizliğinin en önemli nedeni ise, uterus içerisinde serbestçe yüzen blastosistin implantasyon zamanında maternal doku tarafından adeta yutulması ve görüntülenemez hale gelmesidir. Peri ve post-implantasyon dönemde maternal doku içerisindeki embriyonun gerek hassasiyeti, gerekse de çok küçük boyutları nedeniyle, doğrudan manipasyonu ve gözlemlenebilirliği teknik açıdan zorluklar yaratmaktadır.

Zernicka-Goetz ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada ilk kez blastosistin postimplantasyon yumurta silindirine dönüşüm aşamalarının ana morfolojik basamakları canlı görüntülemeler ile incelenmiştir (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Zernicka-Goetz ve arkadaşları ilk kez embriyonik gelişimin blastosist aşamasından sonrasını görüntüleyebilmek için, time-lapse canlı görüntüleme sistemi ile kombine edilmiş implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür sistemini başarılı bir şekilde tasarlamış ve uygulamışlardır (Bedzhov, Leung ve ark. 2014, Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014).

Bununla birlikte, son yıllarda hız kazanan kök-hücre kaynaklı *in vitro* yapay gelişim ortamları ile, maternal doku içerisinde gözlenebilirliği olmayan embriyonik gelişimin ilk safhalarını araştırabilmek için yeni bir araştırma platformu ortaya çıkmıştır. Embriyo benzeri yapılar oluşturabilmek için yalnızca EKH'yi kullanarak daha önceki yıllarda bazı çalışmalar gerçekleştirilmiş; fakat bu girişimlerin başarısı sınırlı olmuştur. Embriyonumsu cisimler veya mikro-desenli koloniler olarak adlandırılan bu yapılar, hücre dışı uyarıların etkisiyle embriyonik soy oluşumuyla ilişkili gen ifadelerini başlatabilmesine rağmen, devamındaki embriyogenez aşamalarını tamamlayamadıkları için blastosist aşaması sonrası embriyonun karakteristik morfolojisini oluşturamamaktadır (van den Brink, Baillie-Johnson ve ark. 2014, Warmflash, Sorre ve ark. 2014). Bununla birlikte, Harrison, Sozen ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada EKH ve TKH'lerin üç boyutlu ekstraselüler matrix içerisinde birlikte kültüre edilmesi ile oluşan peri ve post implantasyon embriyo gelişimini taklit edebilen kök hücre kaynaklı model embriyolar literatüre kazandırılmıştır (Harrison, Sozen ve ark. 2017).

Hipotez: Pre-post implantasyon embriyo gelişiminde doğru morfogenez embriyonik ve ekstraembriyonik hücre/dokuların birlikteliğini gerektirir; hücre içi BMP/Smad-p38

MAPK sinyal yolağı bu süreçleri ve kök hücre kimliklerinin korunmasını kontrol ederek pregastrulasyonu düzenler.

Tez projesinin amacı: Bu çalışmanın amacı, farede E4.5 ve E5.5 günler arasında gerçekteştiği bilinen ve *in vivo*'da maternal doku içerisinde izlenemeyen morfogenetik yapılanmanın nasıl düzenlendiği sorusuna *in vitro*'da yanıt aramaktır. Bu soruya yanıt aramak ve hücre içi sinyal yolağı iletimlerinin, pre-post implantasyon geçiş döneminde morfogenezdaki rolünü detaylı olarak aydınlatmak için; RNAi teknolojisi ve moleküler inhibitörler ile oluşturulan knock-down embriyolarda ve bu embriyolardan elde edilen embriyonik kök hücrelerde hücre farklanmasının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *In Vivo* Embriyo eldesi

Fareler: 4-6 haftalık C57xB16 ırkı dişi farelerden elde edilen F1 döllerini su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12 saatlik periyodlarla aydınlık/karanlık sikluslarında muhafaza edildi. Çiftleşme sabahında vajinal plak kontrolü yapılan ve plak belirlenen fareler fertilizasyonun 0.5. gününde kabul edildi.

Çalışmada kullanılan transgenik fareler:

1. CAG-GFP membran habercisi transgenik fareler (kaynak: M. Zernicka-Goetz lab, University of Cambridge)
2. T/Brachyury-GFP mezoderm habercisi transgenik fareler (kaynak: A. Martinez-Arias lab, University of Cambridge)

Preimplantasyon embriyo eldesi: Vajinal plak kontrolü yapılarak gebeliğin pozitif olduğu varsayılan dişi fareler 96 saatin sonunda (E4.5) servikal dislokasyon ile öldürüldü. Farelerin uterin boynuzları çıkarılarak M2 medyumunu (Sigma-Aldrich, cat. no. M7167) içerisine alındı, stereo mikroskop altında yıkandı. E4.5. günde olduğu belirlenen geç blastosist aşamasındaki embriyolar toplandı ve her bir grup için eşit sayıda olacak şekilde deney gruplarına ait kültür ortamlarına aktarıldı.

Postimplantasyon embriyo eldesi: Postimplantasyon dönem embriyo eldesi için, vajinal plak takibinin ardından istenilen embriyonik gündeki (çalışmada E5.0-E6.5 aralığı kullanılmıştır) dişi fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü. Uterusları çıkarılarak implantasyon bölgeleri stereo mikroskop altında diseke edildi. Ardından her bir implantasyon bölgesine desidual diseksiyon yapılarak embriyolar çıkartıldı. Kontrol grupları için diseksiyon yapılan embriyolar direkt fikse edilirken, post-implantasyon kültür için toplanan embriyolar istenilen kültür ortamlarına aktarıldı.

3.2. İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültür

Kültür için, embriyonun tutunmasını destekleyen ve görüntüleme uyumlu, materyal olarak cama benzer optik özellikli ışık geçirgen plastik petri kapları

kullanılmıştır (ibiTreat optical-grade plastic μ -plates; Ibidi). Bu petri kaplarının alt kısmındaki ince plastik bölgesi, medyum ve gaz alışverişine izin verecek özelliktedir.

E4.5 günde, zona pelusida içermeyen blastosistlerin ilk ekimi için IVC1 medyumunu kullanılmıştır. Bu medyumun özelliği TE farklanmasını ve petri üzerine tutunmasını indükleyici olmasıdır. IVC1 medyumunun içeriği ve içerdiği maddelerin kullanım amacı Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. IVC1 medyumunun içeriği ve içerdiği maddelerin kullanım amaçları. IVC1 medyumuna embriyonun ekimini takiben 24-36. saatler arasında blastosist petri yüzeyine tutunmakta ve TE tabakası dev hücelere farklanmaktadır.

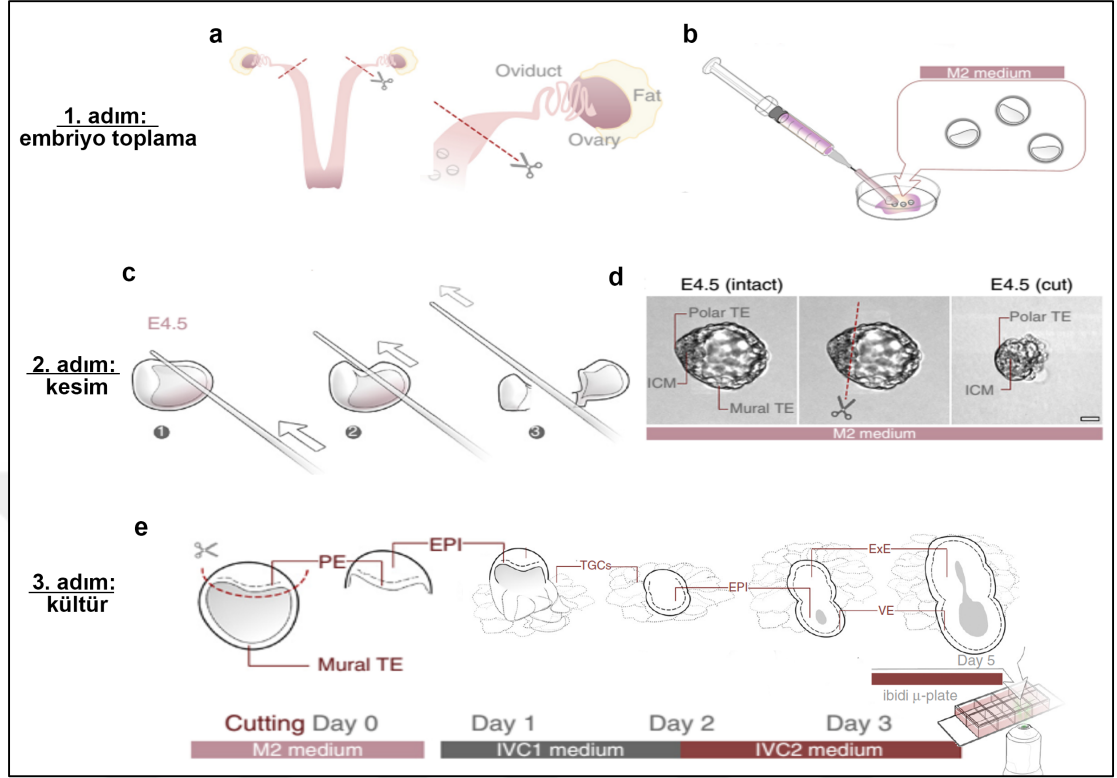
IVC1 medyum içeriği	Kullanım amacı
Advanced DMEM/F12 (Life Technologies12634-010)	Bazal besin desteği
% 20FCS (fetal dana serumu) (Life Technologies10270-106)	İmplantasyondaki hücrel proliferasyon ve TE farklanması için gerekli serum desteği
2 mM L-glutamin (Life Technologies35050-038)	Uterin reseptivite ve implantasyon penceresinin devamlılığı için
1 mM sodyum piruvat (Life Technologies11360039)	Enerji kaynağı
penisilin (25 units/ml) /streptomisin (25 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific15140122)	Kontaminasyonu engellemek için
1x ITS-X (belirli hücre soylarının proliferasyonunu indükleyici yönde ilave morfogenetik veya farmakolojik ajan içermeyen medyum) (Life Technologies, 51500-056)	Bazal besin desteği
8 nM β -östradiol (Sigma-Aldrich, E8875)	Uterin reseptivite ve implantasyon penceresinin devamlılığı için
200 ng/ml progesteron (Sigma-Aldrich, P0130)	Uterin reseptivite ve implantasyon penceresinin devamlılığı için
25 mM N-asetil- L-sistein (Sigma-Aldrich, A7250)	Oksidatif stresi minimize etmek için

İmplantasyonun devamı ve embriyonik diskin oluşumu için IVC2 medyumunu kullanılmıştır. Bu medyumun özelliği uterin dokuyu taklit edebilmesi ve blastosist implantasyonuna devam edebilmesidir. IVC2 medyumunun içeriği ve içerdiği maddelerin kullanım amacı Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. IVC2 medyumunun içeriği ve içerdiği maddelerin kullanım amaçları. IVC2 medyumuna embriyonun ekimini takiben 24-36. saatler arasında yumurta silindiri oluşmaktadır.

IVC2 medyum içeriği	Kullanım amacı
Advanced DMEM/F12 (Life Technologies12634-010)	Bazal besin desteği
% 30 KSR (KnockOut Serum Replacement) (belirli hücre soylarının proliferasyonunu indükleyici yönde ilave morfogenetik veya farmakolojik ajan içermeyen) (Life Technologies, 10828010)	Bazal besin desteği
2 mM L-glutamin (Life Technologies35050-038)	Uterin reseptivite ve implantasyon penceresinin devamlılığı için
1 mM sodyum piruvat (Life Technologies11360039)	Enerji kaynağı
penisilin (25 units/ml) /streptomisin (25 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific15140122)	Kontaminasyonu engellemek için
1x ITS-X (belirli hücre soylarının proliferasyonunu indükleyici yönde ilave morfogenetik veya farmakolojik ajan içermeyen medyum) (Life Technologies, 51500-056)	Bazal besin desteği
8 nM β -östradiol (Sigma-Aldrich, E8875)	Uterin reseptivite ve implantasyon penceresinin devamlılığı için
200 ng/ml progesterone (Sigma-Aldrich, P0130)	Uterin reseptivite ve implantasyon penceresinin devamlılığı için
25 mM N-asetil-L-sistein (Sigma-Aldrich, A7250)	Oksidatif stresi minimize etmek için

Embriyoların ve izole hücre soylarının kültürü 37 °C, %95 nem, %5 CO₂ koşullarına sahip inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Oluşturulacak *in vitro* kültür ortamı deney düzeneği Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Blastosist eldesi ve E4.5 ile E5.5. günler arası in vitro implantasyon kültür sistemi. **a)** Dış farelerdeki üreme sistemi. Kırmızı çizgiler uterusu diseksiyon yapılan bölgelerini belirtmektedir. **b)** E4.5 Blastosist aşamasındaki embriyonun uterusu eldesi. **c)** Mikrocerrahi ile mural TE tabakasının kesilmesi **d)** E4.5 aşamasındaki intakt blastosist ve mikrocerrahi kesim sonrası mural TE uzaklaştırılmış, kültüre edilecek polar TE ve İKH tabakası. Ölçek: 30 µm. **e)** İn vitro kültürde blastosist – yumurta silindiri geçişinin örnek çizimi, embriyonik ve ekstraembriyonik hücre soyları ile birlikte belirtilmiştir (Bedzhov, Leung ve ark. 2014).

3.3.Embriyo Kültüründe Moleküler İnhibitör Uygulamaları

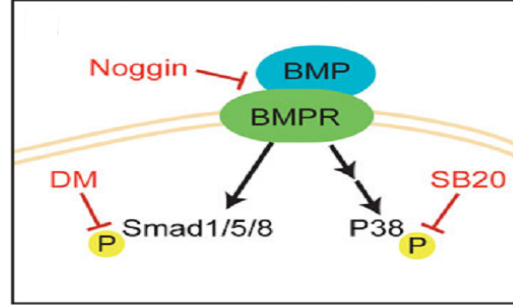
Çalışmada kullanılan inhibitör molekülleri, çözen maddeleri ve amaçları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan inhibitör molekülleri

İnhibitör molekülü	Çözen	Etkinlik
Fare recombinant Noggin (R&D systems, 1967-NG-025)	PBS	BMPR'e tutunarak tüm BMP yolağını bloklar.
Dorsomorphin dihydrochloride (Tocris, 3093)	DMSO (Sigma D2650)	Kanonikal BMP/Smad yolağı seçici inhibitörü
SB203580 (CSAID™) (Calbiochem 559389)	DMSO (Sigma D2650)	p38 MAPK seçici inhibitörü

Uygulamadan önce, stok inhibitörler, önerilen çözücüleri içerisinde, uygun stok konsantrasyonlarda çözüldü. Stok çözelti alikatlara ayrıldı ve -20°C'de kullanıma kadar muhafaza edildi. Embriyo kültür medyumlarının hazırlanacağı gün oda sıcaklığına getirilen alikatlardan, istenilen final konsantrasyonları içerecek şekilde kültür

medyumları içerisine eklendi. Kullanılan final konsantrasyonlar sonuçlarda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan inhibitörler ve hücre içi etkinlik mekanizmaları.

3.4. Embriyonik Gelişim Takibi için Döner-Disk Konfokal Time-Lapse 4D

Görüntüleme

In vitro kültür süresince yapılacak konfokal time lapse görüntüleme ile her 15 veya 30 dakikada bir, embriyoların ve izole ICM hücre soylarının 100µm’lik alandaki görüntüsü, 8µm z-düzlem (z-plane) dilimleri ile görüntülenmiştir. Bu amaç için, hızlı bir görüntü elde etme ve uzun süreli kesintisiz görüntüleme sağlayan bir dört renkli, çok-bölgeli, mikro mercekli döner-disk konfokal mikroskop (spinning-disc microscope system) (Intelligent Imaging Innovations) kullanılmıştır. Elde edilen görüntüler Slidebook 5.0 (Intelligent Imaging Innovations) ve Imaris (Bitplane) yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.5. Sytox Canlı Hücre Ölümü Görüntüleme

Gelişen embriyolardaki hücre ölümü değerlendirilmesi için SYTOX Orange nükleik asit boyası (Thermo Fisher Scientific S11368) kullanılmıştır. Ticari olarak hazır bir solüsyon olan SYTOX Orange nükleik asit boyası, 1:10000 dilüsyon oranında embriyo kültür medyumlarına (IVC1 ve IVC2) eklenmiş, embriyoların *in vitro* kültür süresince gelişimleri time-lapse görüntüleri mikro mercekli döner-disk konfokal mikroskopla alınarak değerlendirilmiştir.

3.6. Çalışmada kullanılan yabancı ve transgenik kök hücreler

Bu çalışmada planlanan deneye göre farklı kaynaklardan hazır alınan fare embriyonik ve trofoblast kök hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan kök hücre hatları şu şekildedir;

1. E14 veya 129 yabancı tip EKH hattı (kaynak: M. Zernicka-Goetz lab, University of Cambridge)
2. CAG-GFP membran habercisi EKH hattı (kaynak: M. Zernicka-Goetz lab, University of Cambridge)
3. T/Brachyury-GFP mezoderm habercisi EKH hattı (kaynak: A. Martinez-Arias lab, University of Cambridge)
4. Yabancı tip TKH hattı (kaynak: J. Nichols lab, Stem Cell Institute, University of Cambridge)
5. EGFP sitoplazmik haberci TKH hattı (kaynak: P. Rugg-Gunn lab, Babraham Institute, University of Cambridge)

3.7.%0.1 Jelatin Solüsyonu Hazırlanışı

EKH kültürü sırasında kullanılan hücre kültür kapları %0.1'lik jelatin (Sigma-Aldrich G7765) ile kaplanmıştır. EKH kültürü jelatin ile kaplanmış kuyucuklarda, TKH kültürü için ise jelatin ile kaplanmış kuyucuklara daha sonra mitotik aktivitesi durdurulmuş destek hücreleri ekimi yapılmıştır.

- %0.1'lik jelatin solüsyonu eldesi için, %2'lik (20X) stok jelatin solüsyonu steril distile su ile % 0.1 oranında seyreltilir.
- Seyreltilmiş solüsyon kültür kuyucukları içerisine, tüm kuyucuğu kaplayacak miktarda eklenir.
- Kültür kuyucukları içerisine konulan jelatin solüsyonu en az 20 dakika oda sıcaklığında veya 5 dakika inkübatörde inkübe edilir.
- Solüsyon kullanımdan hemen önce aspire edilmeli, kuyucuklar kurumaya bırakılmamalıdır.
- 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki jelatin solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra ortalama $\sim 1.5 \times 10^5$ EKH ve $\sim 2.5 \times 10^5$ TKH ekimi yapılır.

3.8. Naif Pluripotent Embryonik Kök Hücre Kültürü ve 3D Matrijel Kültür

Çalışmada E3.5. gündeki blastosistlerin İHK hücre soyundan izole edilmiş naif pluripotent EKH'ler, TE/ExE tabakası kaynaklı sinyaller olmaksızın İHK/Epi hücrelerinin kaderlerini takip etmek amacıyla kullanılmıştır. Embryonik kök hücreler standart koşullar

altında (2i LIF kültürü) kültüre edilmişlerdir. Kullanılan EKH kültür ortamı içeriği şu şekildedir;

- Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific 31053028) containing %15 FBS (Life Technologies10270-106),
- 2 mM L-glutamine (Life Technologies35050-038),
- 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies11360039)
- penicillin 50 units/ml/streptomycin 50 mg/ml (Thermo Fisher Scientific15140122)
- 1 x NEAA (Life Technologies 11140035)
- 100 mM 2-ME (Life Technologies 31350-010) supplemented with PD0325901 (1uM) (Stemgent 04-0006), CHIR99021 (3uM) (Stemgent 04-0004) (2i) and leukaemia inhibitory factor (0.1mM, LIF)(Stemfactor, Cat. No. 03-0011).

Medyum her gün yenilenmiş, gün aşırı hücreler tripsinize (Gibco-Life Technologies 25300054) edilerek uygun konsantrasyonda pasajlanmıştır. Embriyonik kök hücrelerin pasajlanması şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- EKH %80 doluluk oranına ulaşıldığında pasajlamak için hazırdır. Kuyucuk 1X PBS ile yıkanır.
- %0.05 tripsin-EDTA ile 5 dakika 37°C'de inkübe edilir.
- Tripsin reaksiyonu DMEM-%15 FBS medyumunu ile nörtalize edilir. Pipetleme yöntemi ile kuyucuk içerisindeki tüm hücre süspansiyonu 15 ml falkon tüp içerisine toplanır.
- Hücre süspansiyonu 5 dakika/1000g'de santrifüj edilir.
- Pellet EKH medyumunu içerisinde yeniden süspansiye edilir. Hücre süspansiyonu 1/10 oranında dilüe olacak şekilde, önceden jelatin ile kaplanmış 6-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2 ml EKH medyumunu içerisinde ekimi yapılır.

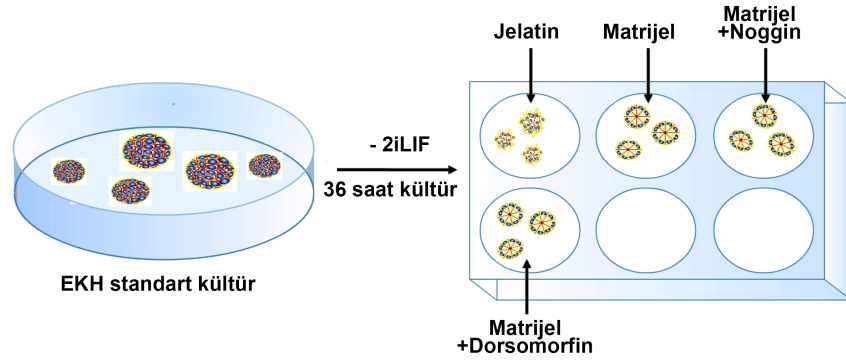
Matrijel 3D kültür için Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2014 protokolü kullanılmıştır. Buna göre, hücreler PBS ile yıkanmış, 10 dakika 37°C'de %0.05 trypsin-EDTA ile inkübe edilmiştir. 5 dakika/1000g'de santrifürünün ardından hücre pelleti tekrar PBS ile yıkanmış ve yeniden pellet haline getirilmiştir. Oluşan pellet içerisinde ekstraselüler matrix

elemanlarını barındıran matrijel (BD, 356230) içerisinde pipetlenerek single cell süspansiyonu haline getirilmiş ve ibiTreat 8-well plate üzerinde (ibiTreat microscopy plasticm-plates (Ibidi)) damlacık ekimi yapılmıştır. Matrijelin solidifikasyonu için 3dk bekleddikten sonra plate N2B27 medyumunu (Thermo Fisher Scientific ME100137L1) ile kaplanmış ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.9. Pluripotensi faz değışim analizi için EKH hücre kültüründe inhibitor uygulaması

Pre-postimplantasyon geçiş döneminde embriyonun epiblast tabakasında kurulmuş olan pluripotansinin naif fazdan, yönlmiş faza geçişinde BMP sinyalinin etkisini değerlendirmek amacı ile EKH kültüründe inhibitor uygulamaları yapılmıştır. Standart kültürden 2i-LIF'in uzaklaştırılması sonucunda EKH'lerin farklanmaya gittiği bilinmektedir (Boroviak, Loos ve ark. 2014). Bu nedenle deney düzeneği hiç bir grupta 2i-LIF içermeyecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.2.). Gruplar şu şekildedir;

1. **Kontrol:** standart jelatin üzerinde EKH ekimi
2. **Kontrol:**3D Matrijel üzerine EKH ekimi
3. **Noggin:** 3D Matrijel üzerine EKH ekimi ve Noggin (500ng/ml⁻¹) uygulaması
4. **Dorsomorfin:** 3D Matrijel üzerine EKH ekimi ve Dorsomorphin(1µM/mL) uygulaması



Şekil 3.3. Pluripotensi faz değışimi için kullanılan deney düzeneği.

3.10. Trofoblast Kök Hücre Kültürü ve 3D Matrijel Kültür

Çalışmada E3.5. gündeki blastosistlerin polar TE hücre soyundan izole edilmiş TKH'ler Epi tabakası kaynaklı sinyaller olmaksızın TE/ExE hücrelerinin kaderlerini takip etmek

amacıyla kullanılmıştır. Trofoblastik kök hücreler standart koşullar altında TKH medyumu ile kültüre edilmişlerdir. Kullanılan TKH kültür ortamı içeriği şu şekildedir;

- RPM media (Sigma Aldrich, M3817) %15 FCS (Life Technologies10270-106),
- 1 mM heparin (Sigma Cat. No. H3149),
- 1 mM FGF4 recombinant protein (Peprotech Cat. No. 100-31)

TKH ekimi için mitotik aktivitesi baskılanmış mouse embriyonik fibroblast (MEF) (MTI-GlobalStem GSC-6001) ile kaplanmış 6-well plate kullanılmıştır. TKH pasajlanması şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- TKH %80 doluluk oranına ulaşıldığında pasajlamak için hazırdır. Kuyucuk 1X PBS ile yıkanır.
- %0.05 tripsin-EDTA ile 5 dakika 37°C'de inkübe edilir.
- Tripsin reaksiyonu DMEM-%15 FCS medyumu ile nörtalize edilir. Pipetleme yöntemi ile kuyucuk içerisindeki tüm hücre süspansiyonu 15 ml falkon tüp içerisine toplanır.
- Hücre süspansiyonu 5 dakika/1000g'de santrifüj edilir.
- Pellet TKH medyumu içerisinde yeniden süspansiyon edilir. Hücre süspansiyonu 1/10 oranında dilüe olacak şekilde, önceden jelatin ile kaplanmış 6-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2 ml TKH medyumu içerisinde ekimi yapılır.

Matrijel 3D kültür için Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2014 protokolü kullanılmıştır. Buna göre, hücreler PBS ile yıkanmış, 10 dakika 37°C'de %0.05 trypsin-EDTA ile inkübe edilmiştir. 5 dakika/1,000 rpm santrifüjün ardından hücre pelleti standart TKH medyumu ile yıkanmış ve yeniden pellet haline getirilmiştir. Oluşan pellet içerisinde ekstraselüler matrix elemanlarını barındıran matrijel (BD, 356230) içerisinde pipetlenerek single cell süspansiyonu haline getirilmiş ve ibiTreat 8-well plate içerisinde (ibiTreat microscopy plasticm-plates (Ibidi)) damlacık ekimi yapılmıştır. Matrijelin solidifikasyonu için 3dk bekleddikten sonra kuyucuklar TKH medyumu ile kaplanmış ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.11. Kök hücre kültüründe RNAi Uygulaması

siRNA transfeksiyonu için kültür ortamında LipofectAMINE RNAiMAX (Thermofisher 13778075) uygulaması yapılmıştır. Kullanılan siRNA molekülünün baz dizisi şu şekildedir; siSmad5 5'-ACGTCATACATTTACATTTAA-3'. Transfekte edilen TKH'ler 36 saat 37°C ve %5 CO2'de standart olarak kültüre edilmiştir. Tüm gruplar 36 saatin sonunda qPCR reaksiyonları için toplanmıştır. Total RNA izolasyonu ve qPCR basamakları aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır. Gen susturmanın kontrolü için önce hedef gen test edilmiştir. Araştırılan diğer tüm genlerin göreceli mRNA seviyeleri için $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılmış, internal control olarak Gapdh seçilmiştir.

3.12. EKH ve TKH Ko-Kültürü

Kök hücre kaynaklı embriyo benzeri yapılar oluşturmak amacı ile yapılan EKH ve TKH ko-kültürü için Harrison&Sozen, 2017 protokolü kullanılmıştır (Harrison, Sozen ve ark. 2017).

- EKH ve TKH yukarıda anlatıldığı gibi pasajlanır.
- Hemasitometre kullanılarak ~3-5.000 EKH ve 3-5.000 TKH sayımı yapılarak iki hücre tipi 1:1 oranda olacak şekilde karıştırıldı.
- Karışım hücre süspansiyonu 5 dakika/1000g'de santrifüj edildi.
- Oluşan pellet içerisinde ekstraselüler matrix elemanlarını barındıran matrijel (BD, 356230) içerisinde pipetlenerek single cell süspansiyonu haline getirilmiş ve ibiTreat 8-well plate içerisinde (ibiTreat microscopy plasticm-plates (Ibidi)) damlacık ekimi yapıldı.
- Matrijelin solidifikasyonu için 3 dakika bekledikten kuyucuklar 1:1 oranda karıştırılan N2B27 ve TKH medyumuna içerisinde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.13. Triple İmmünfloresan İşaretleme ve Konfokal Analizler

Kültür sonunda yumurta silindiri oluşumu gözlenen embriyolar (E5.5) ve PBS içerisinde hazırlanmış %4'lük paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi. Hücresel permeabilizasyon, PBS'te hazırlanmış 0.1M glisin, %0.3 Triton X-100 içeren solusyonda 10 dakika yapıldı. Daha sonra embriyolar %10 FBS/PBS içerisinde hazırlanan primer antikolar ile gece

boyu oda ısısında inkübe edildi. Uygun floresan işareti taşıyan ve PBS içerisinde hazırlanmış sekonder antikolar oda ısısında 1 saat uygulandı. Nüklear boyanma için DAPI kullanıldı ve PBS damlacıkları içerisinde alınan embriyolar incelemeye hazır hale getirildi. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikolar Tablo 3.4’te verilmiştir.

Kullanılan Solüsyonlar ve hazırlanışları:

- **%4 Paraformaldehit Solüsyonu**

8 gr paraformaldehit 200 ml bidistile su içerisinde eklenerek manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica F20520162) çözünene kadar karıştırıldı, çözünmesi için içerisinde NaOH eklendi. Berrak çözelti oluştuktan sonra 1 tablet PBS eklendi (1X PBS). pH=6.4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra solüsyon eşit hacimlere bölündü ve -20°C’de muhafaza edildi.

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz)**

1 tablet PBS (Sigma P4417) 200 ml bidistile su içerisinde çözülerek 1X PBS hazırlandı.

- **Permeabilizasyon Solüsyonu**

30 µl Triton X-100 (Sigma T9284) ve 100 µl 1M Glisin 1000 ml PBS içerisinde çözüldü.

- **Bloklama ve Antikor Diluent Solüsyonu**

10 µl Tween 20 (Sigma P1379) ile 100 µl FBS (Life Technologies 10270-106), 1000 ml PBS içerisinde çözüldü.

- **DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride)**

Nüklear boyanma için DAPI (Sigma D8417) 1:500 konsantrasyonda 1X PBS içerisinde hazırlandı.

Gözlem:

- **Leica Sp5 Konfokal Mikroskop**
- **Leica Sp8 Konfokal Mikroskop**

Tablo 3.4. İmmünoforesan işaretlemelerde çalışılan primer antikorlar ve kullanım amaçları.

Antikor (Tür)	Firma	Katalog Numarası	Kullanım amacı	Çalışılan Dilüsyon
Oct 3/4 (fare)	Santa cruz	sc-5279	Epi belirteci	1:200
Tbr2/Eomes (tavşan)	Abcam	ab23345	ExE/VE Belirteci (extraembriyonik dokular)	1:400
aPKC (tavşan)	Santa cruz	sc-17781	Apikal polarite belirteci	1:200
Podocalyxin (rat)	R&D systems	MAB1556	Polarizasyon ile oluşmuş kavite belirteci	1:400
Cdx2 (fare)	Launch diagnostics	MU392-UC	TE/ExE belirteci	1:200
GFP (rat)	Nacalai biochemicals	04404-84	Yeşil flouresan habercisi	1:2000
Tfap2c (tavşan)	Santa cruz	sc-8977	ExE belirteci	1:200
Elf5 (keçi)	Santa cruz	sc-9645	ExE belirteci	1:100
H3S10-P (tavşan)	Milliopore	05-636	Mitoz belirteci	1:500
Phospho-p38 MAPK (tavşan)	Cell signalling technologies	4511P	Aktif p38 MAPK sinyal belirteci	1:200
Phospho-SMAD 1/5/9(tavşan)	Cell signalling technologies	13820P	Aktif BMP/Smad sinyal belirteci	1:100
Gata4 (keçi)	Santa cruz	sc-1237	PE/VE belirteci	1:200
Cleaved caspase-3 (tavşan)	Cell signalling technologies	#9664	Apoptoz belirteci	1:200
F-actin (Phalloidin 488)	Life Technologies (Thermofisher scientific)	A12379	Hücre membran işaretleyicisi	1:1000
Alexa 488 (Eşek anti-rat)	Life Technologies (Thermofisher scientific)	A21208	Sekonder antikor	1:500

Tablo 3.4. (Devamı) İmmünofloresan işaretlemelerde çalışılan primer antikorlar ve kullanım amaçları.

Alexa 568 (Eşek anti- fare)	Life Technologies (ThermoFisher scientific)	A10037	Sekonder antikör	1:500
Alexa 647 (Eşek anti- tavşan)	Life Technologies (ThermoFisher scientific)	A31573	Sekonder antikör	1:500
Alexa 647 (Eşek anti- keçi)	Life Technologies (ThermoFisher scientific)	A21447	Sekonder antikör	1:500

3.14. Konfokal görüntü veri toplama, işleme ve nicel analizler

Fixe edilmiş ve triple immünfloresan ile işaretlenmiş örneklerin konfokal görüntüler invert Leica Sp5 veya Sp8 konfokal mikroskopta Leica Fluotar VISIR 0.95 NA 25x water objektif kullanılarak yapıldı. Floroforlar için kullanılan lazerler şu şekildedir;

1. 405-nm diode laser (DAPI)
2. 488-nm argon laser (GFP)
3. 543-nm HeNe laser (Alexa Fluor-543/555)
4. 633-nm HeNe laser (Alexa Fluor-633/647)

Konfokal görüntüler için total embriyolardan Z-düzleminde 0.5-1.2 µm'lik görüntü kesitleri alındı ve bir embriyoya ait tüm Z-kesitleri birleştirilerek 3D görüntüleri ortaya çıkarıldı. Ham data Image J Fiji yazılımı ile işlendi ve Photoshop CC 2017 (Adobe) programında bir araya getirildi. İmmünfloresan sinyal yoğunluğu grafikleri için nicelleştirmeler ve floresan sinyalin dijital ölçümleri Image J Fiji yazılımında 'measure' fonksiyonu kullanılarak yapıldı.

3.15. Kantitatif Real-Time PCR Tekniği

Çalışmada qRT-PCR (quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction), tekniği, deney gruplarındaki hücre soyuna özgü gen ekspresyonlarını mRNA düzeyinde kantitatif düzeyde değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Örnek toplama amaçlanan deneye göre şu şekilde yapılmıştır;

Embriyo: Implantasyonu destekleyici kültür sonrası 48. saatte yumurta silindiri oluşumu gözlenen embriyolar VE tabakasının uzaklaştırılması için Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, Hank's Balanced Salt Solution içerisinde 10 dakika muamele edildi. Stereo mikroskop altında VE tabakası uzaklaştırıldığı gözlenen embriyolar Epi/ExE sınırından mikrocerrahi ile kesildi. Epi ve ExE dokuları ayrı ayrı toplanarak lysis buffer içerisinde RNA izolasyonuna kadar -80 derecede muhafaza edildi. Her bir embriyodan alınan doku örneği bireysel olarak muhafaza edilmiş, farklı embriyo örnekleri pool edilmemiştir.

Kök hücre: Kültür ortamındaki inhibitor veya siRNA uygulaması sonrası embriyonik veya trofoblast kök hücreleri önce yukarıda anlatıldığı gibi tripsinize edildi. Hücreler santrifüjle çöktürüldü, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti lysis buffer içerisine alındı. Örnekler RNA izolasyonuna kadar -80 derecede muhafaza edildi. Her bir kuyucuktan gelen örnek bireysel olarak muhafaza edilmiş, farklı kuyucuk örnekleri pool edilmemiştir.

Kök hücre kaynaklı embriyo benzeri yapılar: Flouresan mikroskop altında CAG-GFP (membran habercisi) pozitif EKH ve yabancı tip TKH olarak iki belirgin kompartmandan oluştuğu belirlenen ve embriyonik yumurta silindiri morfolojisine sahip olan embriyo-benzeri yapılar, ağız pipeti yardımı ile matrijel içerisinden çıkartıldı. Stereo mikroskop altında EKH/TKH sınırından mikrocerrahi ile kesildi. EKH ve TKH kompartmanları ayrı ayrı toplanarak lysis buffer içerisinde RNA izolasyonuna kadar -80 derecede muhafaza edildi. Her bir kök hücre kaynaklı embriyo benzeri yapıdan alınan kompartman örneği bireysel olarak muhafaza edilmiş, farklı örnekler pool edilmemiştir.

3.15.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Arcturus Pico Pure RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, KIT0214) kullanılarak yapılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre izolasyon basamakları şu şekildedir;

1. Örnekleri içeren tüpler lysis buffer içerisinde 42°C'de 30 dakika pre-inkübe edilir.
2. Tüpler 800g'de 2 dakika santrifüj edilir.

3. RNA pürifikasyonu için önce filtreli-kolon tüplerine 250 µL Conditioning buffer (CB) eklenerek yıkanır. Sonra lysis buffer-örnek karışımına 20 µL %70 alkol eklenir ve toplam örnek filtreli-kolon tüplerine aktarılır.
4. Tüpler önce 700g'de 2 dakika, hemen ardından 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilir.
5. Tüpler 50-100 µL Wash Buffer 1 (W1) ile yıkanır. Önce 700g'de 2 dakika, hemen ardından 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilir.
6. Tüpler 50-100 µL Wash Buffer 2 (W2) ile yıkanır. Önce 700g'de 2 dakika, hemen ardından 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilir.
7. İkinci yıkama basamağı bir kez daha tekrar edilir.
8. Filtreli-kolon tüplerine tutunmuş toplama tüpleri atılır ve yenisi takılır.
9. Bu aşamaya kadar filtreye tutunmuş RNA'in ekstraksiyonu için, 10 µL RNase free water filtrenin tam ortasına denk gelecek şekilde konulur, 1 dk oda ısısında beklenir, 16.000g'de 2 dakika santrifüj edilir.
10. Son basamak bir kez daha tekrar edilir, toplamda 20 µL RNA toplama tüpünde elde edilir ve -80 derecede ileri işlemlere kadar muhafaza edilir.

3.15.2. Tek Basamak Kantitatif Real-Time PCR Uygulaması

Bu çalışmada izoletotal RNA'den tek basamak kantitatif Real-Time PCR uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Life Technologies) kiti ve bu kit ile uyumlu Step One Plus Real-time PCR (Applied Biosystems) cihazı kullanılmıştır.

Her bir tüp için hazırlanacak olan temel karışım ve siklus amplifikasyonu aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Her tüpe koyulacak olan temel karışımın aynı içerik ve homojenitede olmasını sağlamak açısından örnek sayısına göre ana bir karışım hazırlanıp, 96-kuyucuklu PCR kabının her bir kuyucuğuna bu karışımdan 15µl aktarılmıştır.

Tablo 3.5. RNA-to-CT tek basamak qPCR için kullanılan içerikler ve konsantrasyonları.

Reaktantlar	Hacim (µl) (tek kuyucuk için)
Power SYBR green RT-PCR mix	7.5
Primer mix	0.9
RT enzim mix	0.12
RNA template	0.2-0.5 arasında örneğe göre değişebilir
Rnase-free water	15'e kadar örneğe göre değişebilir
Total volüm	15

Tablo 3.6. RNA-to-CT tek basamak qPCR siklusamplifikasyonu

Aşama	Basamak	Sıcaklık	Süre
Holding	Reverse transkripsiyon	48°C	30 dakika
Holding	AmpliTaq Gold DNA Polymeraz, UP'nin aktivasyonu	95°C	10 dakika
Siklus (45 siklus)	Denatürasyon	95°C	15 saniye
	Anneal-Uzama	60°C	1 dakika
Melt curve	Denatürasyon	95°C	15 saniye
	Anneal	60°C	15 saniye
	Denatürasyon	95°C	15 saniye

Çalışmada her hücrede belirli düzeyde eksprese olduğu bilinen house-keeping bir gen olan GAPDH ekspresyonu temel alınmıştır. Araştırılan her gen için verilen eşik değerleri (ct değerleri) $2[-\Delta\Delta C(T)] (2^{-\Delta\Delta CT})$ metodunda kullanılarak bu genlerin görece ekspresyonları hesaplanmıştır.

Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan qPCR primer dizileri

Gen	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Cdx2</i>	<i>AGTGAGCTGGCTGCCACACT</i>	<i>GCTGCTGCTGCTTCTTCTTGA</i>
<i>Eomes</i>	<i>TCGCTGTGACGGCCTACCAA</i>	<i>AGGGGAATCCGTGGGAGATGGA</i>
<i>Elf5</i>	<i>ATTCGCTCGCAAGGTTACTCC</i>	<i>GGATGCCACAGTTCTCTTCAGG</i>
<i>Id1</i>	<i>CCTAGCTGTTGCTGAAGGC</i>	<i>CTCCGACAGACCAAGTACCAC</i>
<i>Gata3</i>	<i>GGGTTCCGATGTAAGTCGAG</i>	<i>CCACAGTGGGGTAGAGGTTG</i>
<i>Bmp4</i>	<i>TCTAGAGGTCCCCAGAAGCA</i>	<i>AGGAATCATGGTGTCTTGACAGA</i>
<i>Gapdh</i>	<i>CGTATTGGGCGCCTGGTCAC</i>	<i>ATGATGACCCTTTTGGCTCC</i>
<i>Id2</i>	<i>TCCGGTGAGGTCCGTTAGG</i>	<i>CAGACTCATCGGGTCGTCC</i>

Tablo 3.7. (Devamı) Çalışmada kullanılan qPCR primer dizileri

Tfap2c	TGCCACGTCACTCTCCTCA	TCCGTCCCCAAGATGTGGT
Id3	CTGTCGGAACGTAGCCTGG	GTGGTTCATGTTCGTCCTCAAGAG
Acs14	CCTGAGGGGCTTGAAATTC	GTTGGTCTACTTGGAGGAACG
Dll3	GCTGGTGTCTTCGAGCTACAA	TGCTCCGTATAGACCGGGAC
Fgf5	AACTCCATGCAAGTGCCAAAT	CGGACGCATAGGTATTATAGCTG
Otx2	TATCTAAAGCAACCGCCTTACG	GCCCTAGTAAATGTCTCCTCTC
Bmpr1a	GCGAACTATTGCCAAACAG	GAGGTGGCACAGACCACAAG
Bmpr1b	GACACTCCCATTCCCTCATC	GCTATTGTCCCTTGGACCAG
BmprII	AATCAAGAACGGCTGTGTGCA	CATGCTGTGAAGACCCTGTTT
Smad1	AGCCAACAGCCACCCGT	GCAACTGCCTGAACATCTCCT
Smad5	GCTGAACCCCATTTCTTCTG	CGTCCAGGTTAAGATCAATGC
Smad8	TCCAGCAGTCTCTCTGTCCG	GTGCTGGGGTTCCTCGTAG
Smad4	CACTGCCTTCAAAAGATCAAAAT TAC	TGGTGTATTTGTTATGAGCATATTG TCCAT

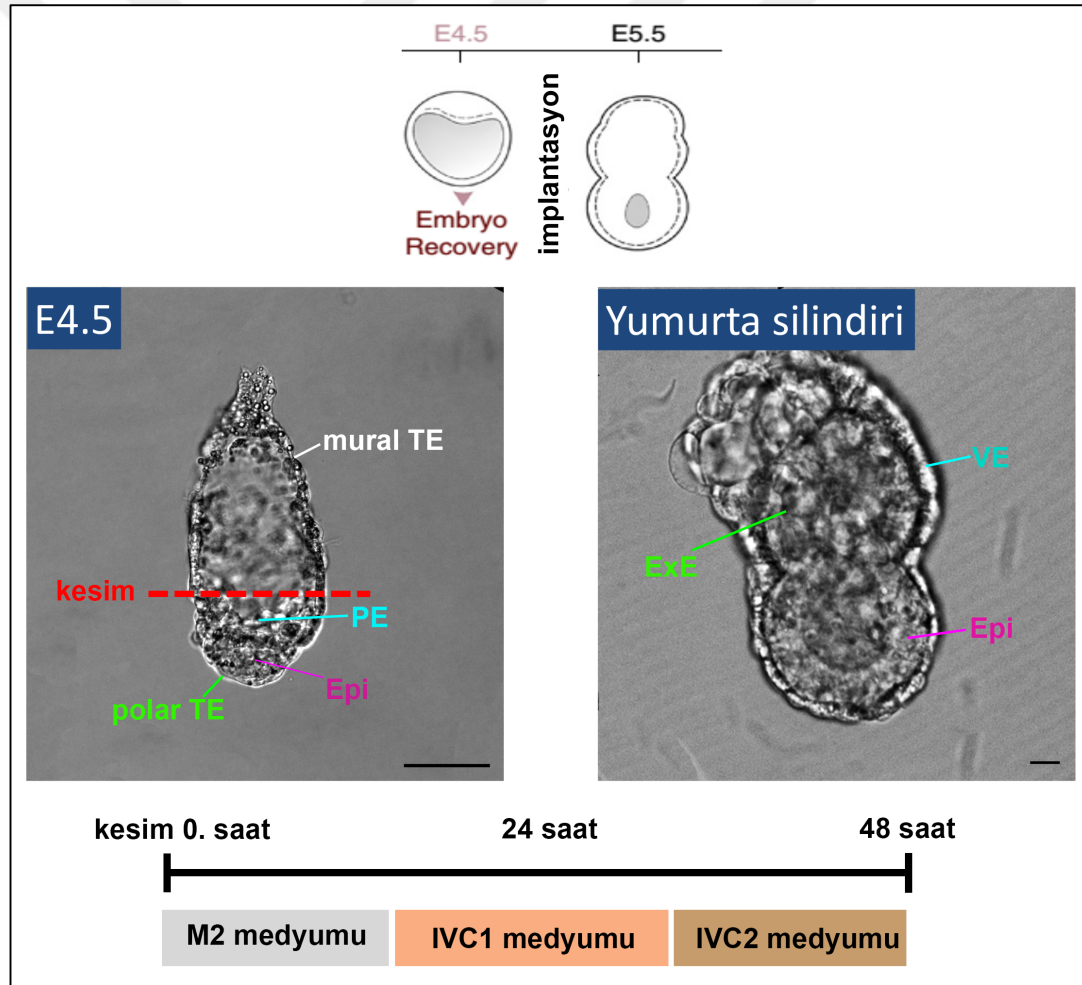
3.16. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki tüm verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 7.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin önce normal dağılımları kontrol edilmiştir. İkili grupların karşılaştırılması için t-testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılması için One Way Anova testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Grafiklerdeki hata payları standart hataları (SEM) göstermektedir. Deneysel tekrar ve gruplardaki örnek sayıları figür altı açıklamalarda belirtilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Peri-implantasyon gelişim potansiyelleri ve embriyonik soy farklanması

Deney sürecince toplamda 48 saatlik kültür uygulaması yapılmıştır. E4.5 günde elde edilen blastosistler kültürün başlangıç saati (0. saat) olarak belirlenmiştir. İmplantasyonu destekleyici kültür ortamında 48. saatin sonunda postimplantasyon yumurta silindiri aşamasına gelişen embriyolar (*in vivo*'da E5.5 aşamasına karşılık gelir) incelenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültürün 0. saatinde blastosist aşaması preimplantasyon embriyo (sol) ve peri-implantasyon morfogenezini tamamlamış, kültürün 48. saatindeki yumurta silindiri aşamasına ulaşmış post-implantasyon embriyo (sağ). Mural TE'nin uzaklaştırılması için belirlenen kesim bölgesi kırmızı kesikli çizgiler ile gösterilmiştir. Blastosist hücre soyları ve bu soylardan gelişen tabakalar aynı renklerde işaret edilmiştir. Ölçek=50 µm.

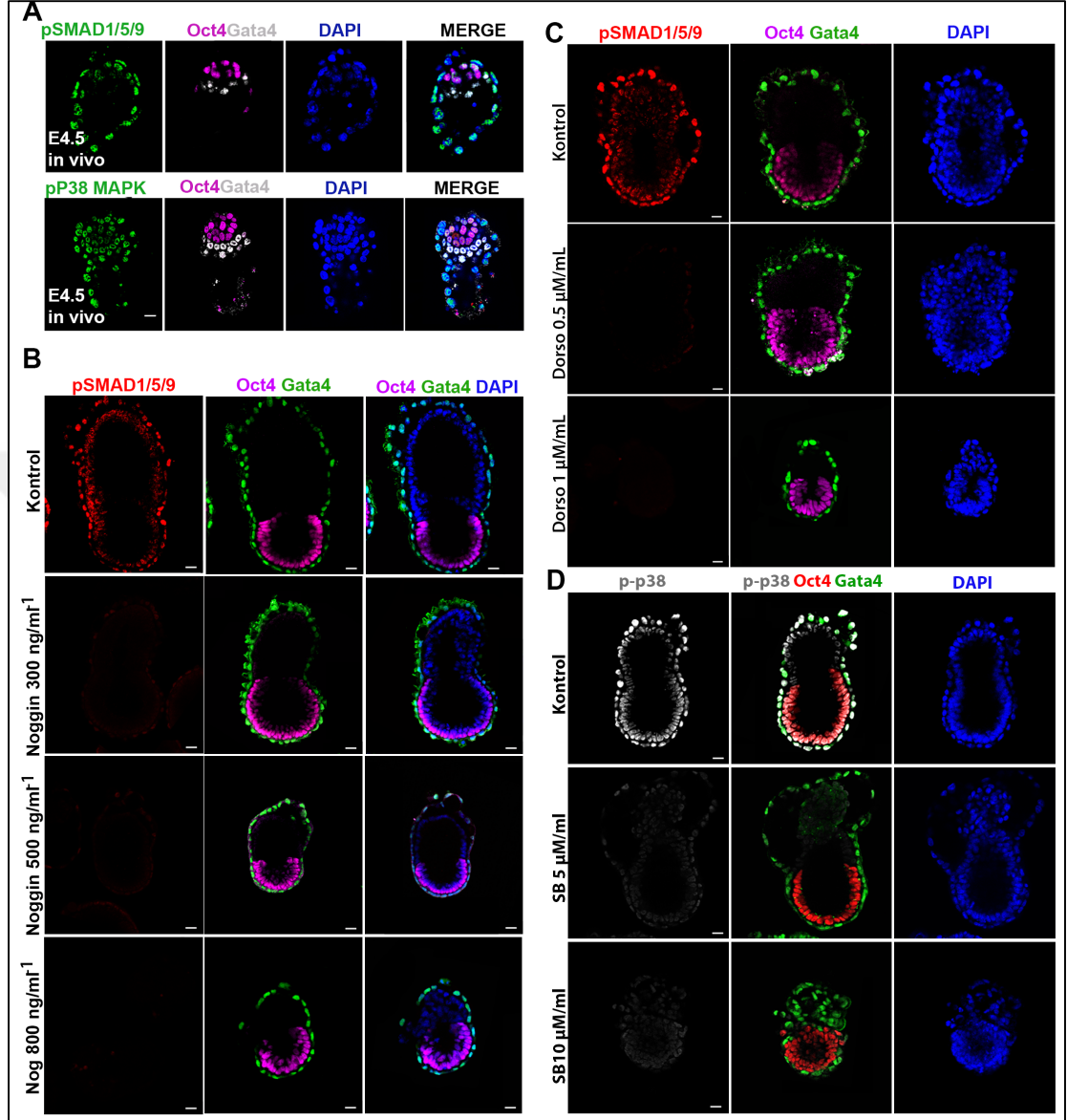
BMP sinyalleşmesinin peri-implantasyon gelişiminde bir rol oynayıp oynamadığını belirlemek için, BMP sinyalini baskılayan üç farklı inhibitörün varlığında preimplantasyon blastosist aşamasından postimplantasyon yumurta silindiri aşamasına ulaşana kadar fare embriyoları 48 saat kültüre edildi. Kanonikal (Smad-bağımlı) BMP yollarını engellemek için, hem BMP ligand antagonisti olan Noggin, hem de ve Smad1/5/9 fosforilasyonunu seçici olarak inhibe eden için küçük molekülü bir kimyasal inhibitör olan Dorsomorphin kullanıldı. Kanonikal olmayan (Smad-bağımsız) BMP sinyal yolağını bloke etmek için p38 MAPK fosforilasyonunu selektif olarak inhibe eden SB203580'i kullandık.

İlk olarak, hem kanonikal hem de kanonikal olmayan BMP sinyalinin kontrol embriyolarında aktif olduğunu p-Smad1/5/9 ve p-p38 MAPK proteinlerinin ekspresyonu ile doğruladık (Şekil 4.2.A). Buna göre, p-Smad1/5/9 TE tabakasında ekspre olurken, p-p38 MAPK tüm embriyonik tabakalarda ekspre olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.A).

Daha sonra, çalışmada kullanılan inhibitör moleküllerinin ve seçilen tüm dozlarının etkinliğinin doğrulanması için, SMAD1/5/9 ve p38 MAPK proteininin fosforilasyonları, *in vitro* kültürde yumurta silindiri evresine ulaşan postimplantasyon embriyolarda değerlendirildi. İmmün-işaretleme sonrası yapılan fosforilasyon değerlendirmeleri sonucunda, inhibitör uygulaması sonrası yumurta silindiri aşamasına ulaşmış postimplantasyon embriyolarda hedeflenen proteinlerin fosforile ekspresyonunu kaybettiğini teyit ettik (Şekil 4.2.B-C-D).

Bu sonuçlar, implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür süresince uygulanan inhibitör molekülleri ile muamelenin embriyolardaki Smad-bağımlı ve -bağımsız sinyal yollarının aktivitesini başarılı bir şekilde baskılandığını doğrulamıştır.

Çalışmanın deneysel modeli ve pre-post implantasyon embriyo gelişimi Şekil 4.3. A'da resmedilmiştir.

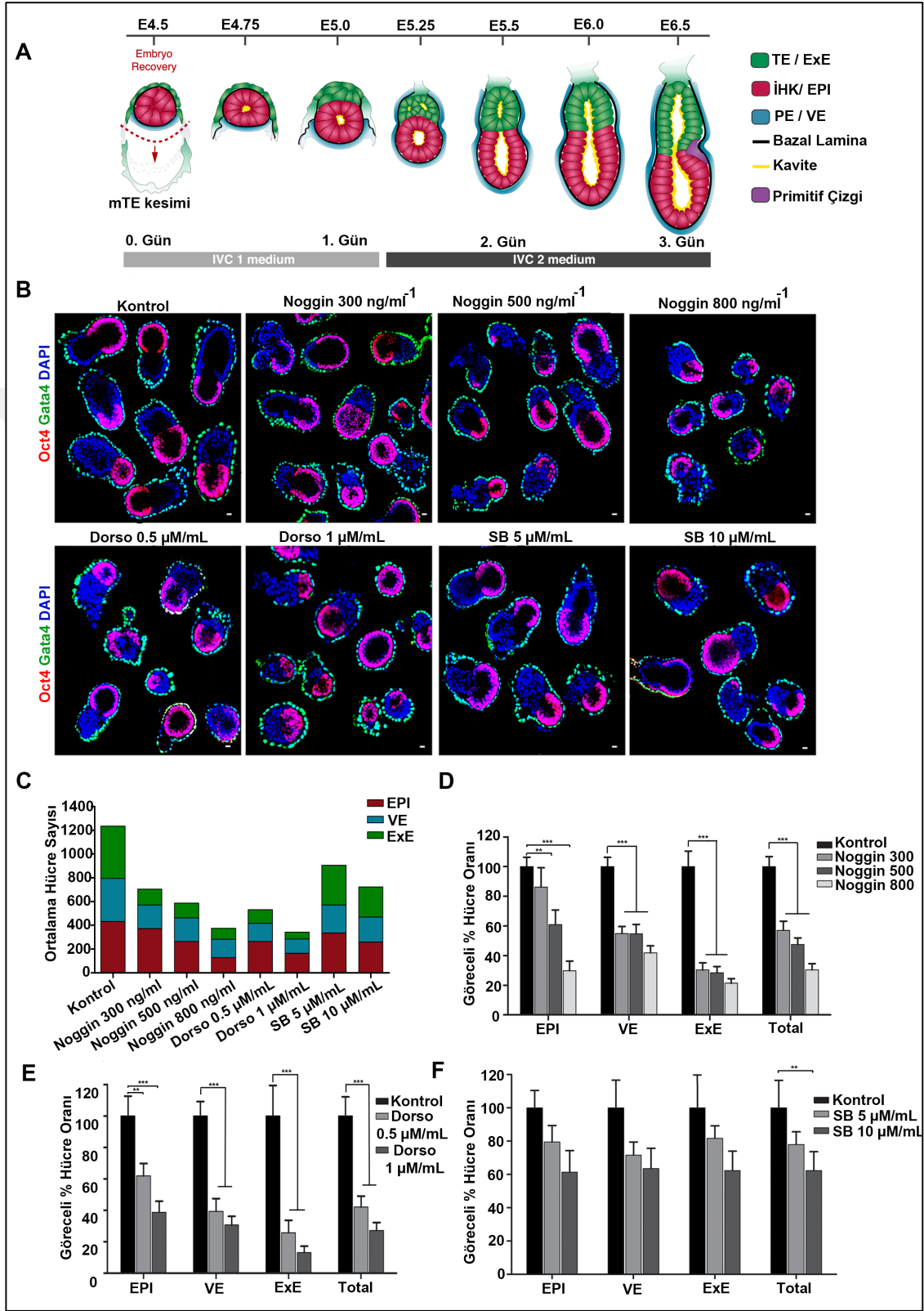


Şekil 4.2. Blastosist aşaması preimplantasyon embriyolardaki aktif Smad-bağımlı ve -bağımsız (p38 MAPK) BMP sinyali (A) ve bu sinyallerin inhibitör uygulaması sonrası yumurta silindiri aşamasındaki postimplantasyon embriyolarda baskılanması (B-C-D). Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, Epi; Gata4, PE veya VE. Her grupta n= 10. Ölçek=20 µm.

Çalışmada her bir inhibitör molekülü farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve embriyoların gelişim potansiyelleri ile embryoda yer alan hücre soylarına farklılaşma kapasiteleri kıyaslanmıştır. BMP aktivitesinin baskılanmasından sonra, embriyoların belirgin morfolojik anormallikler geliştirdiği gözlenmiştir. Özellikle, Noggin ve Dorsomorphin ile uygulanan grupta, embriyoların, kontrol muadillerine göre daha küçük boyutlarda olduğu ve daha az hücre içerdiği, ExE dokusunun zayıf gelişiminin

sergilediği incelendi (Şekil 4.3.B). Epi gelişiminin ise, hem Noggin hem de Dorsomorphin uygulamalarının sadece yüksek dozlarında etkilendiği görülmüştür (Şekil 4.3.B).

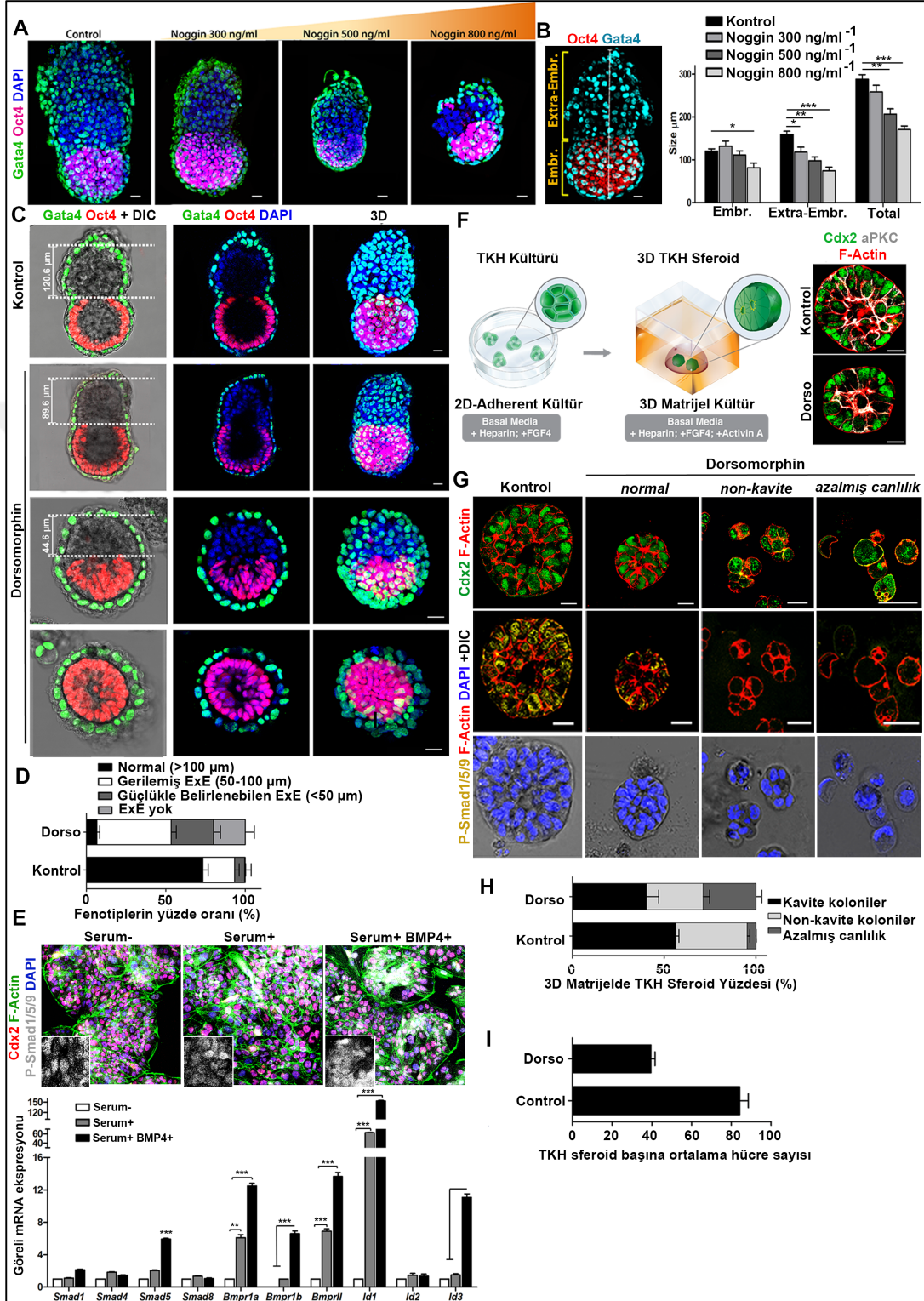
Yapılan gelişim takibi gözlemleri sonucunda, blastosistlerin BMP inhibisyonu varlığında yumurta silindirene gelişim zamanında oluşturdukları hücre soylarının yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu amaçla soya özgü belirteçlerin ekspresyonu temel alınarak hücre sayımları yapılmış, embriyodaki her bir dokunun gelişimi belirlenmiştir. Epi için Oct4; VE için Gata4 ekspresyonu temel alınmış, DAPI temel alınarak yapılan total hücre sayımının ardından ExE soyundaki hücre sayısı hesaplanmıştır. BMP inhibisyonu sonrası embriyoların embryonik ve ekstraembryonik dokularındaki hücre sayıları ImageJ yazılımı ile değerlendirilmiştir. Buna göre, kanonikal BMP sinyal inhibitörlerinin, tüm soylardaki hücre sayısında doz-bağımlı olarak önemli bir azalmaya neden olduğu, ancak en çok dikkati çekenin, ExE ve VE soylarının kontrol embriyoara göre gösterdiği belirgin azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.C-D-E). 300ng/ml⁻¹ dozundaki Noggin uygulamasının kontrole göre %45 daha az VE, %63 daha az ExE oluşumuna neden olduğu; 500ng/ml⁻¹ dozundaki Noggin uygulamasının kontrole göre %45 daha az VE, %71 daha az ExE oluşumuna neden olduğu; 800ng/ml⁻¹ dozundaki Noggin uygulamasının kontrole göre %58 daha az VE, %79 daha az ExE oluşumuna neden olduğu; 0.5µM/mL dozundaki Dorsomorphin uygulamasının kontrole göre %60 daha az VE, %74 daha az ExE oluşumuna neden olduğu; 1µM/mL dozundaki Dorsomorphin uygulamasının kontrole göre %69 daha az VE, %86 daha az ExE oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.C-D-E). Hücre sayıları SB203580 uygulamasından sonra da azalmış olsa da, şiddetli ve anlamlı değildi (Şekil 4.3.F).



Şekil 4.3. Smad-bağımlı ve -bağımsız BMP inhibisyonunun embriyonik soy gelişimi üzerine etkisi. **A.** Peri-implantasyon kültürü ve gelişimi için protokol. Şekil üzerindeki zaman ölçeği, *in vivo*'daki doğal embriyo gelişimine eşdeğer gelişimsel zamanlamaları göstermektedir. **B.** Çalışmada kullanılan her bir koşul altında *in vitro* kültürlenmiş embriyoların morfolojik görünüşleri. Epi, Oct4; VE, Gata4 immünofloresan belirteçleri ile işaretlenmiştir. Ölçek=20 µm. **C.** 48 saatte sonra *in vitro* kültürde gelişmiş yumurta silindiri aşamasındaki postimplantasyon embriyolarında gözlenen her soy için (Epi-VE-ExE) toplam hücre sayım sonuçları. **D.** Çalışılan Noggin dozlarında (300ng/ml⁻¹, n=25; 500 ng/ml⁻¹, n=32; 800 ng/ml⁻¹, n=22) *in vitro* kültür sonrasında, kontrol embriyolar (n = 30) ile kıyaslama sonrası elde edilen her bir hücre soyundaki göreceli hücre yüzdesi. **E.** Çalışılan Dorsomorfin dozlarında (0.5 µM/mL, n=29; 1 µM/mL, n=36) *in vitro* kültür sonrasında, kontrol embriyolar (n=30) ile kıyaslama sonrası elde edilen her bir hücre soyundaki göreceli hücre yüzdesi. **F.** Çalışılan SB203580 dozlarında (5 µM/mL, n=34; 1 µM/mL, n=36) *in vitro* kültür sonrasında, kontrol embriyolar (n=30) ile kıyaslama sonrası elde edilen her bir hücre soyundaki göreceli hücre yüzdesi. **P* <0.05, ***P* <0.01, ****P* = 0.001 (Student's t-test). Hata çubukları = SEM.

4.2. BMP/Smad yokluğuna bağlı gelişen bozulmuş ExE ve TKH fenotipleri

İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültür sonrasında gelişen yumurta silindiri aşamasındaki postimplantasyon embriyolarında ExE doku hacminin dikkatlice incelenmesi, Noggin (Şekil 4.4.A, B) ve Dorsomorfin (Şekil 4.4.C, D) uygulaması sonrasında ExE kompartmanının boyutlarında belirgin bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Dorsomorphin ile kültür uygulaması sonrasında, ExE doku boyutları tarafından değerlendirilen postimplantasyon embriyolarda üç esas fenotip gözlemlenmiştir: (i) gerilemiş ExE bölgesi (50-100 µm arasında; %45 görülme sıklığında), (ii) güçlükle tanımlanabilen ExE bölgesi (50 µm'den az, %35 görülme sıklığında), ve (iii) hiç ExE bölgesi içermeyen (0 µm, %20 görülme sıklığında) (Şekil 4.4.C, D). Üçüncü kategorideki embriyoların, sadece Epi ve çevreleyen VE kompartmanlarından oluştuğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.4.C, D).



Şekil 4.4. BMP sinyal inhibisyonu sonrasında ExE soyunda ve TKH organizasyonunda gözlenen fenotip bozulmaları. **A.** Noggin doz uygulamalarından sonra gözlenen yumurta silindiri aşaması postimplantasyon embriyo fenotipleri. Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, Epi; Gata4, VE. Ölçek = 20µm. **B.** Noggin doz uygulamalarından sonra embriyonik ve extraembriyonik kompartmanlarda yapılan ölçümler sonucu gözlenen doku boyutları. Soldaki immünboyanma fotoğrafında *in vitro* kültür sonrası gelişmiş örnek bir yumurta silindiri aşaması postimplantasyon embriyo ve embriyonik/extraembriyonik kompartmanları

gösterilmiştir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P = 0.001$ (One-Way Anova). Hata çubukları = SEM. **C.** Dorsomorfün uygulaması sonra gözlenen yumurta silindiri aşaması postimplantasyon embriyolardaki ExE dokusu fenotipleri. Beyaz kesik çizgiler, ölçümün yapıldığı ExE bölmesini işaretler. Ölçümler Imaris yazılımı ile yapılmıştır. Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, Epi; Gata4, VE. Ölçek çubukları = 20 μm . **D.** *In vitro* kültür ile kontrol ve dorsomorfün koşullarında gelişmiş implantasyon sonrası embriyoların ExE bölgesinde tespit edilen her fenotipinin yüzdeleri. **E.** 2D-tek tabakalı kültür koşullarında yetiştirilen TKH'lerdeki BMP aktivitesi. TKH'ler serumsuz (serum-) veya serum içeren (serum+) veya Bmp4'ün indüklendiği (serum+ Bmp4+) koşullar altında kültüre edildi. TKH'lerde P-Smad1/5/9 ekspresyonu her üç durumda da doğrulandı ve Bmp4 indüksiyonu ile arttığı gözlemlendi. BMP sinyal yolağı üyelerinin TKH'lerdeki ekspresyonunun qRT-PCR analizi (altta). Smad aktivitesinin serum desteğine bağlı olmadığı doğrulanmış, serum içeren veya içermeyen koşullar altında R-Smad üyeleri (1, 5, 8) için herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ayrıca, BMPR ve Id genleri, BMP4 indüksiyonu ve daha az bir ölçüde olsa da, serum tarafından indüklenmiştir. ** $P < 0.01$, *** $P = 0.001$ (Student t-testi) (3 ayrı deney). Hata çubukları = SEM. Ölçek çubukları = 20 μm . **F.** Matrijel 3D gömülü TKH kültürü için protokol şeması. Kontrol ve dorsomorfün (0.1 $\mu\text{M}/\text{mL}$) gruplarında kültürün 48. saatinde polarize TKH yapısının bir örneği (sağda). Polarizasyon aPKC belirteci ile tespit edilmiştir. **G.** Dorsomorfün uygulamasından sonra (0.1 $\mu\text{M}/\text{mL}$; n=50) TKH sferoid yapılarının fenotipleri: normal kavite ve azalmış hücre sayısı; kavite olmayan ve zayıf organize yapılar; ve azalmış canlılık. Ölçek çubukları = 50 μm . **H.** TKH sferoidlerinde gözlenen her fenotipinin yüzdesi **I.** Dorsomorfün uygulamasından 72 saat sonra ve TKH sferoidleri başına tespit edilen hücre sayısı. Hata çubukları = SEM.

Hem blastosist aşaması preimplantasyon embriyorda bulunan TE tabakası, hem de yumurta silindiri aşamasındaki ExE tabakası, bu dokulardan izole edilebilen ve *in vitro* olarak yetiştirilebilen trofoblast kök hücrelerini (TKH) içerir (Tanaka, Kunath ve ark. 1998; Uy, Downs ve ark. 2002). Bu dokuların her ikisinin de proliferatif potansiyeli, TKH'lerin sürdürülebilir popülasyonuna bağlıdır ve bu kök hücrelerin sürdürülmesinde meydana gelebilecek başarısızlığın ExE doku oluşumunu etkilemesi beklenir (Tanaka, Kunath ve ark. 1998). Bu bilgilerden ve ilk sonuçlarımızda gözlediğimiz ExE doku harabiyetinden dolayı, BMP'nin yokluğunun kök hücre organizasyonunu etkileyip etkilemeyeceğini araştırdık. İlk olarak, TKH'lerdeki aktif BMP sinyalini immünfloresan işaretleme ve qRT-PCR ile doğruladık (Şekil 4.4.E). Ek olarak, hücre içi BMP sinyalinin serum ve Bmp4 indüksiyonu ile arttığı bilindiği için, TKH'lerdeki BMP sinyalinin de bu uyarılara cevap verir nitelikte olduğunu doğrulandı (Şekil 4.4.E). Buna göre, Smad1/5/9 fosforilasyonu protein düzeyinde; Smad ailesi elemanları olan *Smad1*, *Smad4*, *Smad5*, *Smad8*, BMP hücre yüzeyi reseptörleri olan *Bmpr1a*, *Bmpr1b*, *Bmpr2* ve BMP sinyali alt basamak hedefleri olan *Id1*, *Id2*, *Id3* genlerinin TKH'lerdeki varlığı mRNA düzeyinde tespit edilmiştir (Şekil 4.4.E).

Bu bulgulardan sonra, sadece TKH kullanarak, ExE doku gelişimini *in vitro* modellemek amacı ile, TKH'leri Matrijel'de (normal olarak embriyoda sağlanan ve ExE bölmesini çevreleyen bazal membranı taklit etmek için), TKH kültürü için gerekli koşulları

sağlayacak şekilde (Tanaka, Kunath ve ark. 1998; Ohinata ve Tsukiyama 2014) gömüldü 72 saat boyunca kültüre edildi (Şekil 4.4.F). Deney sonucunda öncelikle oluşturulan ExE modelinin doğrulanması için membran belirteci F-Aktin'in üç boyutlu TKH sferoid oluşumunu işaretlediği; polarite belirteci aPKC'nin TKH sferoidlerinde kavite oluşumuna bağlı olarak hücrelerin apikal yüzeylerinde ekspre olduğu; ExE soy belirteci Cdx2'nin ekspresyonunun sürdürüldüğü teyid edilmiştir (Şekil 4.4.F). Bu özellikler Dorsomorfin uygulanan grupta devam etse dahi, TKH sferoid boyutunun kontrole göre azalmış olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.4.F). TKH ile oluşturulan ExE gelişim modelinde 50 ng/ml⁻¹ Noggin; ya da 0.1 µM/mL Dorsomorfin; ya da 0.5 µM/mL SB203580 inhibitörleri varlığında yapılan kültür sonucunda, BMP/Smad sinyalinin inhibe edilmesi sonucunda oluşan TKH sferoid organizasyonunun değişken olduğu ve daha önce BMP/Smad sinyali inhibe edilmiş yumurta silindiri aşaması embriyolarındaki ExE dokusunda gözlemlediğimiz fenotiplerini yansıttığını bulduk (Şekil 4.4.G). Dorsomorfin gruplarında spesifik olarak gözlenen üç esas fenotip tipleri şu şekildedir; (i) %40 oranında normal kavite gösteren fakat hücre sayısı azalmış, (ii) %30 oranında kavite olamayan ve zayıf organizasyon gösteren, (iii) %30 oranında ölmekte olan hücreler içeren (piknotik ve parçalanmış hücre çekirdeği ile tanımlanmıştır) TKH sferoid fenotipleri gözlenmiştir (Şekil 4.4.G, H, I).

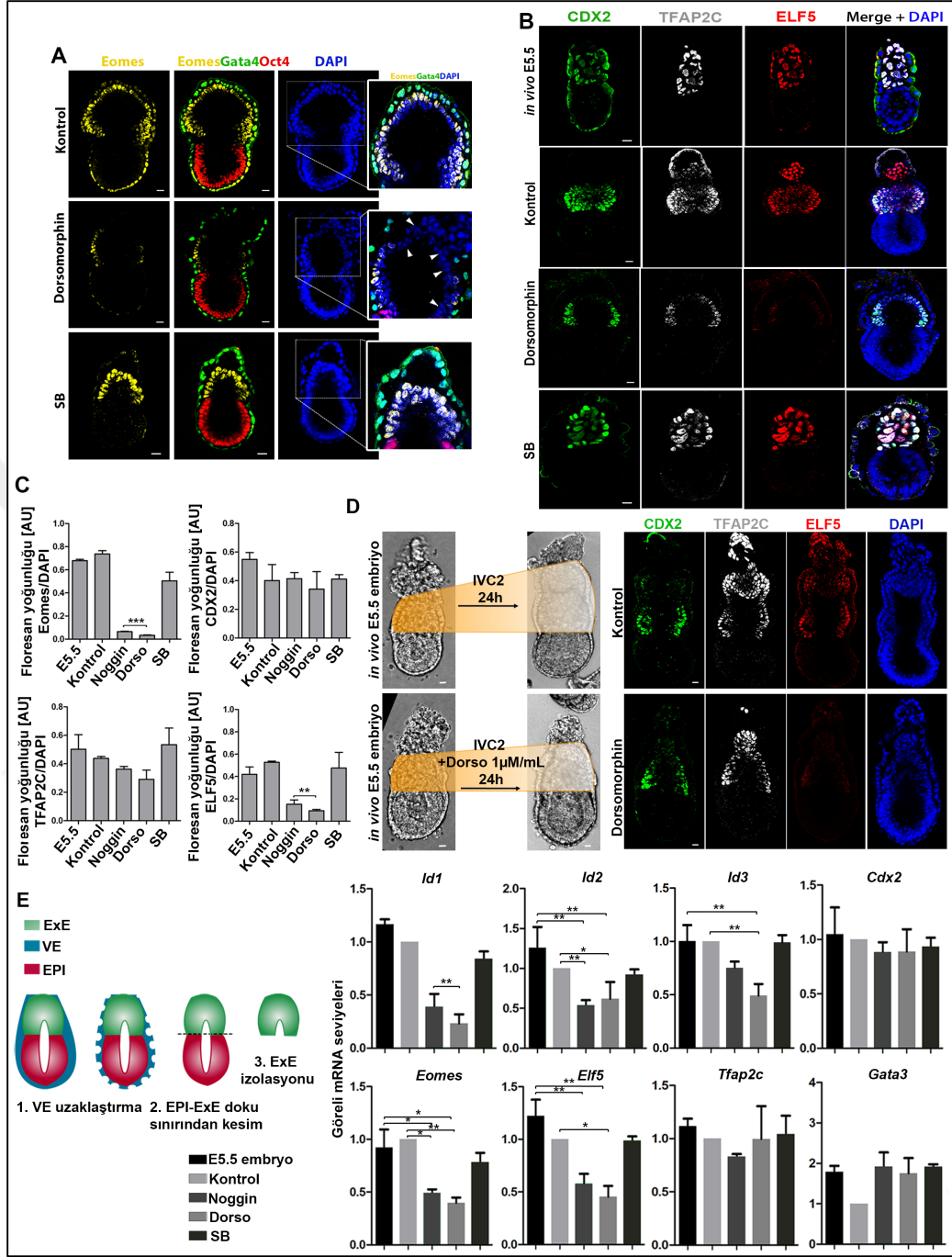
TKH sferoidlerinde tespit edilen fenotipler, BMP/Smad sinyal yolağı inhibisyonunu takiben implantasyon sonrası embriyoların ExE bölmesinde (Şekil 4.4.C, D) gözlenenler benzer olduğu ve böylece, TKH sferoid yönteminin ExE doku oluşumunu taklit etmek için bir *in vitro* model sağladığını göstermiştir. Tüm bu sonuçlar, pre-post implantasyon geçişte ve özellikle de ekstraembriyonik soyun gelişiminde Smad-bağımlı BMP sinyalinin önemli katılımını göstermektedir.

4.3. BMP/Smad sinyal inhibisyonunun implantasyon sonrası embriyolardaki ExE doku gelişiminden sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi

Azalmış hücre sayısı ve değişmiş fenotipler ile ilgili bulgularımız, BMP sinyal yolağı inhibisyonu sonrasında, ExE soy oluşumundan sorumlu moleküler belirteçlerin ekspresyonunu araştırmak için bizi yönlendirmiştir. Eomes, ExE spesifikasyonu için kritik olan bir transkripsiyon faktörü olduğu için, öncelikle Eomes ekspresyonunu pre-post

implantasyon geçiş süresince *in vitro* kültürde geliştirilmiş, kontrol ve BMP-inhibe edilmiş implantasyon sonrası yumurta silindiri aşamasındaki embriyolarda değerlendirdik. 48 saatlik Dorsomorfin uygulamasının ardından ExE soyundaki Eomes ekspresyonunun kontrol embriyolara göre ciddi şekilde gerilediği, ancak SB203580 uygulaması sonrası değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.5.A). Ayrıca, BMP inhibe edilmiş implantasyon sonrası embriyolarda Cdx2, Tfp2c ve Elf5 dahil olmak üzere, ExE formasyonundan sorumlu olduğu bilinen diğer transkripsiyon faktörlerini de analiz ettik. Buna göre, Cdx2 ekspresyonunun hiçbir tedaviden hiçbir zaman etkilenmediği; sadece Dorsomorfin uygulamasından sonra Tfp2c ekspresyonunun kısmen azaldığı; Elf5 ekspresyonunun ise belirgin bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.5.B). İmmünfloresan işaretlemeler sonucu gözlenen bu bulgular, Image J yazılımı kullanılarak floresan sinyal yoğunluğu ölçülmüş ve nicelleştirilmiştir (Şekil 4.5.C). Aynı sonuç, *in vivo* implantasyon sonrası E5.5 aşamasında desidual diseksiyon ile elde edilen ve 24 saat süresince *in vitro* kültüre edilen dorsomorfin uygulanmış grupta da elde edilmiştir (Şekil 4.5.D). Buna göre, dorsomorfin uygulaması sonucu ExE dokusunun kontrole göre az gelişim gösterdiği; Elf5 ekspresyonunu ise kaybettiği bulunmuştur (Şekil 4.5.D).

Son olarak, ExE doku kimliğinin kazanılmasından sorumlu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerini qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, öncelikle, kontrol ve inhibitör uygulanmış gruplarda implantasyonu destekleyi *in vitro* kültür ile postimplantasyon aşamasına ulaşmış yumurta silindiri morfolojisindeki embriyoların ExE kompartmanları izole edildi (Şekil 4.5.E; ayrıca bkz. yöntem). ExE kompartmanlarındaki Smad yolağı alt basamak substratları olan *Id1*, *Id2*, *Id3* genlerinin mRNA seviyelerinin Noggin ve Dorsomorfin gruplarında anlamlı olarak azaldığı gözlendi (Şekil 4.5.E). *Cdx2*, *Tfp2c*, *Gata3* mRNA ekspresyonlarının Smad-bağımlı veya –bağımsız sinyal inhibisyonundan etkilenmediği bulundu. Buna karşın, *Eomes* ve *Elf5* mRNA ekspresyon seviyelerinin ise, hem Noggin hem de Dorsomorfin uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azaldığı incelenmiştir (Şekil 4.5.E).



Şekil 4.5. BMP sinyal inhibisyonunun implantasyon sonrası embriyolardaki ExE doku gelişiminden sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi. **A.** Kontrol, Dorsomorfın (1 µM/mL, n=10) ve SB203580 (5 µM/mL; n=8) gruplarında kültürün 48. saatindeki Eomes protein ekspresyonu. Oklar ExE dokusunda Eomes ekspresyon kaybını işaret etmektedir. Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, Epi, Gata4, VE. Ölçek=20µm. **B.** Aynı koşullarda kültüre edilen implantasyon sonrası embriyolarda ExE oluşumundan sorumlu transkripsiyon faktörlerinin (Cdx2, Tfpap2c, Elf5) ekspresyonu. **C.** İmmüno Floresan sinyal yoğunluğu nicel grafikleri. Floresans yoğunluğu, her bir embriyo için 6 farklı Z-düzleminde ölçüldü, daha sonra DNA-kanalına (DAPI) normalize edildi ve ortalama alındı. ANOVA testi, ** P < 0.01, *** P = 0.001 (ANOVA, Tukey testi), grup başına n = 6. Hata Çubukları = SEM. **D.** E5.5 aşamada elde edilmiş ve 24 saat kültür sonrasında kontrol ve dorsomorfın gruplarında gözlenen Cdx2, Tfpap2c, Elf5 protein ekspresyonu. Sol panelde, turuncu vurgulanmış ana hatlar, 0-24 saat aralığındaki ExE gelişimini işaret eder. Ölçek=50µm.

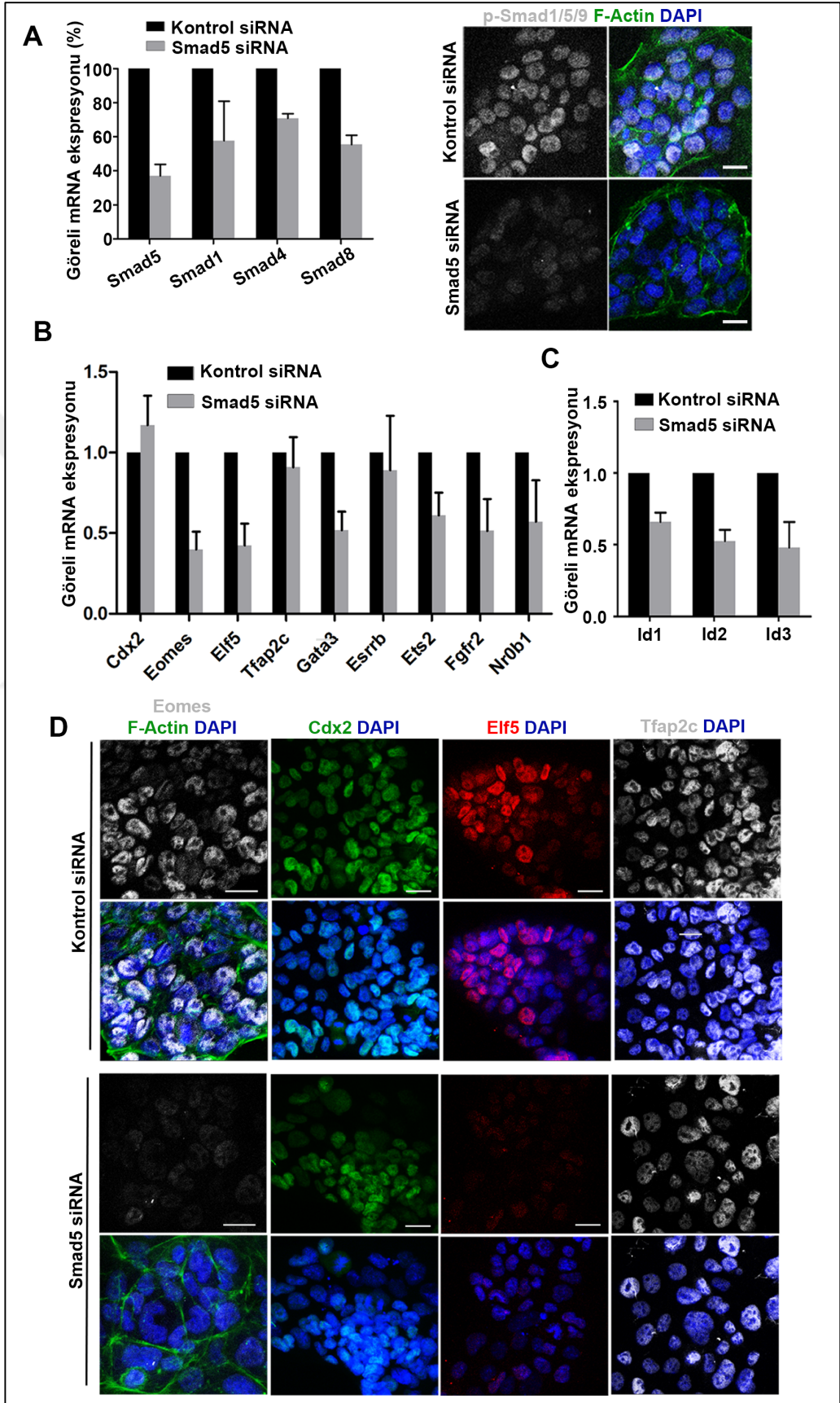
E. İmplantasyon sonrası embriyolarda ExE belirteçleri ve Id genlerinin qRT-PCR analizi. Soldaki çizim qRT-PCR analizi için ExE izolasyonunu göstermektedir. * P <0.05, ** P <0.01, *** P = 0.001 (ANOVA, Tukey testi). Hata çubukları = SEM. (Grup başına n = 5).

4.4. BMP/Smad sinyal inhibisyonunun trofoblast kök hücre kimliklerinin sürdürülmesine etkisi

ExE dokusunda ekspresyon seviyeleri değiştiği gözlenen Cdx2-Eomes-Elf5, aynı zamanda TKH kimliğini koruyan temel transkripsiyon faktörleri olduğundan (Latos and Hemberger 2014, Latos, Sienerth ve ark. 2015, Lee, Gardner ve ark. 2016), bu sonuçlar BMP/Smad sinyal inhibisyonu altında kök hücre devamlılığında bir başarısızlık olduğunu düşündürmektedir. Bu hipotezi spesifik olarak araştırabilmek için, RNAi teknolojisi kullanarak TKH'lerde ekspre olan *Smad5* genini susturduk ve bu koşullar altında gelişen TKH'lerde kök hücre kimliklerinin korunmasından sorumlu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon değişimlerini analiz ettik. Hücre yüzeylerindeki BMP reseptörlerine ligand bağlanması ile fosforilasyonunun ardından R-Smad'lar olarak bilinen Smad1, -5 ve -8, Smad4 ile kompleks oluşturur ve bu kompleks nükleusa geçerek sinyal yolağının aktivitesini devam ettirir. Herhangi bir R-Smad elemanının fonsiyonel olarak bozulması, tüm Smad-bağımlı sinyali yok eder (Nishimura, Hata ve ark. 2003). Bu nedenle, Smad yolağının fonksiyonel susturulması için çalışmada Smad5 siRNA kullanılmıştır.

TKH kültüründe siRNA uygulaması sonrasında ilk olarak, qRT-PCR ile genin susturulması doğrulanmıştır (Şekil 4.6.A). *Smad5*'in susturulmasını takiben, diğer R-Smad kompleksi üyeleri de daha az eksprese edildiği ve p-SMAD1/5/9 proteininin de ekspresyonun TKH hücre kültüründe kaybedildiği teyid edildi (Şekil 4.6.A). Önemli olarak, TKH belirteçleri olan *Eomes*, *Elf5*, *Gata3*, *Ets2*, *Fgfr2* ve *Nr0b1*'nin ekspresyon seviyeleri, kontrol siRNA ile transfekte edilmiş TKH'ler ile karşılaştırıldığında, Smad yolağı susturulmuş grupta azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.6.B). Ayrıca *Smad5* siRNA ile transfeksiyon sonrasında *Id1*, -2 ve -3 genlerinin ekspresyon seviyeleri de gerilemiştir (Şekil 4.6.C).

Gen düzeyinde gözlenen bu sonuçları protein düzeyinde doğrulamak amacı ile yapılan immünfloresan işaretlemelerde *Eomes* ve *Elf5* ekspresyonunun *Smad5* siRNA transfeksiyonu sonrası baskılandığı; *Cdx2* ve *Tfap2c* ekspresyonunun ise etkilenmediği görülmüştür (Şekil 4.6.D).

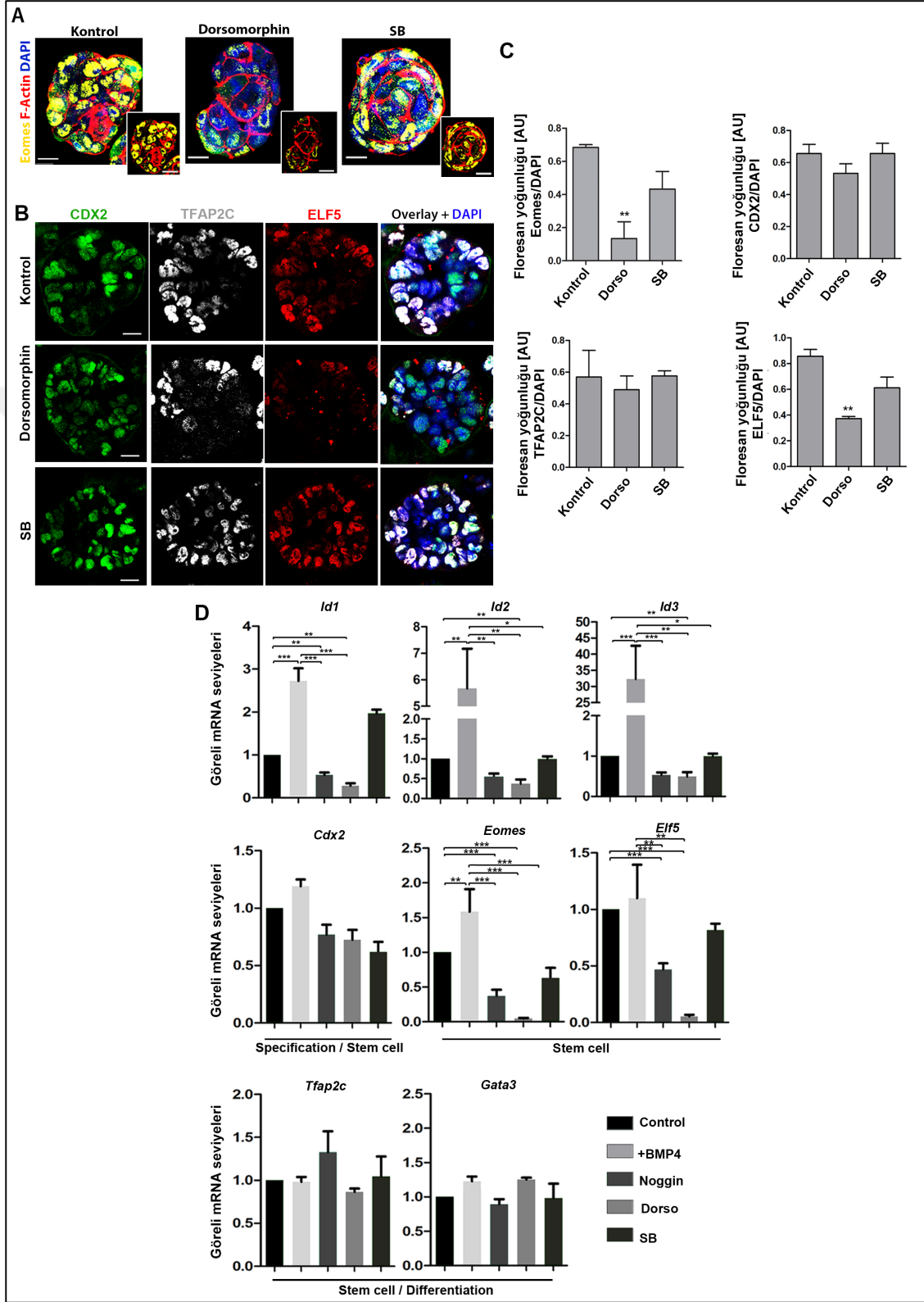


Şekil 4.6. TKH kültüründe *Smad5* siRNA transfeksiyonu ile BMP/Smad yolağının susturulmasının TKH belirteç ekspresyonlarına etkisi. **A.** *Smad5* siRNA transfeksiyonu sonrası *Smad5*, *Smad1*, *Smad4* ve *Smad8*'in görel mRNA ekspresyon yüzdeleri (sol) ve p-SMAD1/5/9 protein ekspresyon kaybı (sağ). Hata Çubukları = SEM. n=2 deneysel tekrar. **B.** *Smad5* siRNA transfeksiyonu sonrası TKH belirteçlerinden *Cdx2*, *Eomes*, *Elf5*, *Tfap2c*, *Gata3*, *Esrrb*, *Ets2*, *Fgfr2* ve *Nr0b1*'nin görel mRNA ekspresyon seviyeleri. Hata Çubukları = SEM. n=2 deneysel tekrar. **C.** *Smad5* siRNA transfeksiyonu sonrası *Id1*, *Id-2* ve *Id-3*'in görel mRNA ekspresyon seviyeleri. Hata Çubukları = SEM. n=2 deneysel tekrar. **D.** *Smad5* siRNA transfeksiyonu sonrası TKH belirteçlerinden *Cdx2*, *Eomes*, *Elf5* ve *Tfap2c*'nin protein ekspresyonları.

Son olarak, Matrijel'de yetiştirilen TKH ile oluşturulan ExE gelişim modelinde bu anahtar transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeylerini BMP inhibitörleri varlığında araştırdık. Sadece Dorsomorfin uygulamasından sonra, TKH sferoidlerinin *Eomes* ve *Elf5* protein ekspresyonunu kaybettiği, *Cdx2* veya *Tfap2c* proteinlerinin varlığını ise sürdürdüğünü gözlemlendi (Şekil 4.7.A, B). Floresan sinyal yoğunluğu ölçümü ve nicelleştirmelerinde bu iki proteinin ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı teyid edilmiştir (Şekil 4.7.C).

TKH kimliğinin kazanılmasından sorumlu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR ile analizi sonucunda, öncelikle Smad yolağı alt basamak substratları olan *Id1*, *Id2*, *Id3* genlerinin mRNA seviyelerinin Noggin ve Dorsomorfin gruplarında anlamlı olarak azaldığı; *Cdx2*, *Tfap2c*, *Gata3* mRNA ekspresyonlarının Smad-bağımlı veya -bağımsız sinyal inhibisyonundan etkilenmediği; *Eomes* ve *Elf5* mRNA ekspresyon seviyelerinin ise, hem Noggin hem de Dorsomorfin uygulanmış gruplarda anlamlı derecede azaldığı incelenmiştir (Şekil 4.7.D).

Sonuç olarak, BMP/Smad yolağı baskılanmış TKH'lerde gözlenen tüm bu bulgular, BMP/Smad yolağı baskılanmış implantasyon sonrası embriyolarda ExE soyunda gözlemlenen bulgular ile tutarlı bulunmuştur.



Şekil 4.7. BMP sinyal inhibisyonunun TKH devamlılığında sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi. **A.** 3D-Matrijel içerisinde geliştirilmiş TKH sferoidlerinde 48 saat Dorsomorphin (0.1µM/mL; n=24) ve SB203580 (1µM/mL; n=22) uygulamalarının ardından Eomes ve **B.** Cxd2, Tfp2c, Elf5 protein

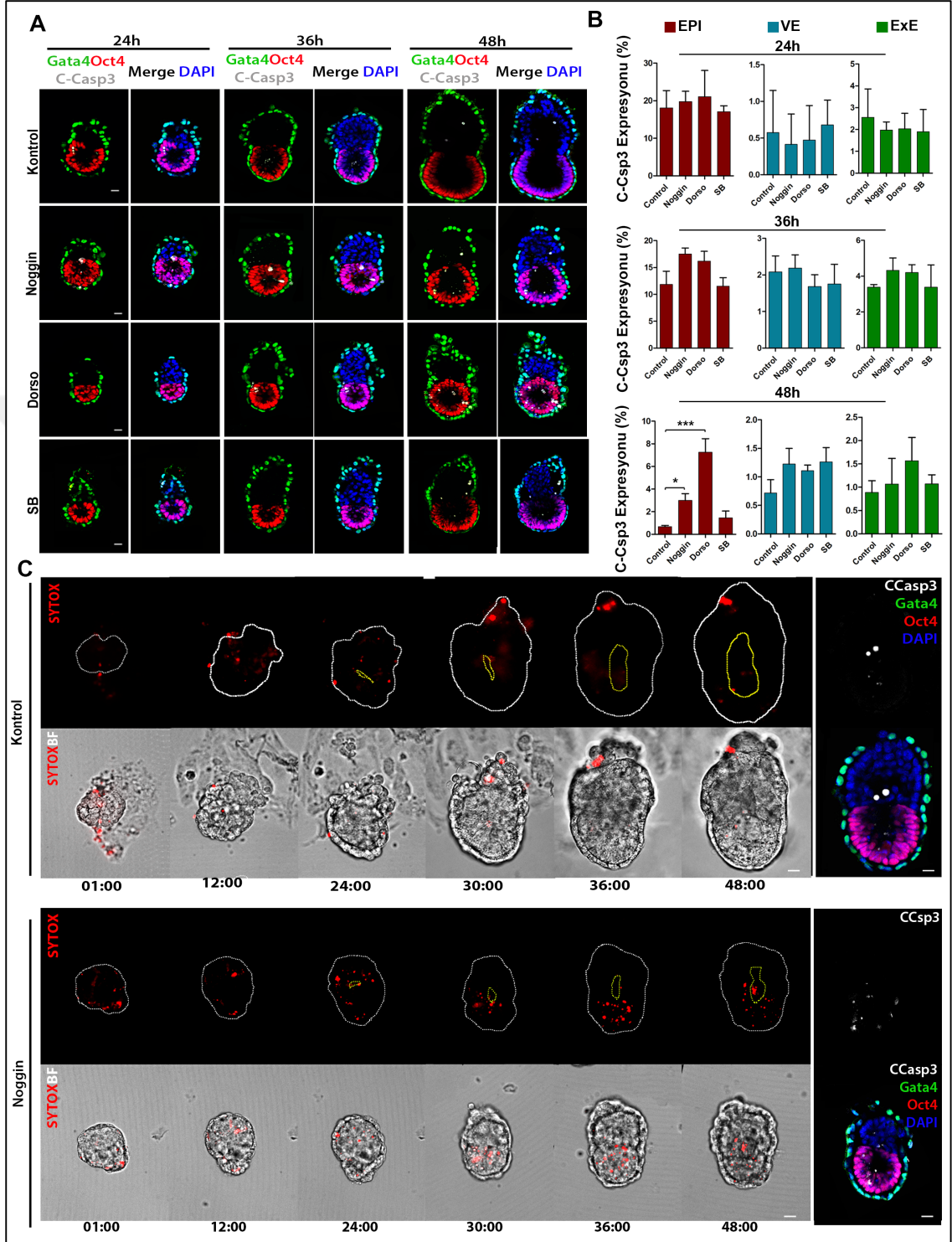
ekspresyonları. Ölçek = 20µm. C. İmmüno floresan sinyal yoğunluğu nicel grafikleri. Floresan yoğunluğu, her bir TKH sferoidi için 6 farklı Z-düzleminde ölçüldü, daha sonra DNA-kanalına (DAPI) normalize edildi ve ortalama alındı. ANOVA testi, ** P <0.01, *** P = 0.001 (ANOVA, Tukey testi), grup başına n = 6. Hata Çubukları = SEM. D. qRT-PCR analiz sonuçları. ** P <0.01, *** P = 0.001 (ANOVA, Tukey testi) (n= 3 deneysel tekrar).

4.5. İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültürde BMP sinyali baskılanmış embriyolardaki hücre ölümünün değerlendirilmesi

Tespit edilen gen transkripsiyonundaki bu değişikliklerin hücre fonksiyonlarını nasıl etkilediğini görmek için, BMP inhibisyonlu embriyolarda önce hücre ölümünü ve ardından proliferasyonu izledik.

İlk olarak, embriyolar, 24 veya 36 veya 48 saat boyunca 500ng/ml⁻¹ dozunda Noggin, 1µM/mL dozunda Dorsomorfin veya 10µM/mL dozunda SB203580 varlığında implantasyon öncesi blastosist aşamasından, implantasyon sonrası yumurta silindiri aşamasına kadar kültüre edildi ve apoptoz yolağı son belirteci olan cleaved-kaspaz-3'ün ekspresyonu açısından incelendi (Şekil 4.8.A). Tüm gruplarda 24 saat veya 36 saat uygulama sonrası cleaved-kaspaz-3 ekspresyonu açısından fark bulunmazken, 48 saat sonrasında artmış cleaved-kaspaz-3 ekspresyonu dikkati çekmiştir (Şekil 4.8.A). Soy belirteçleri ile ortak yapılan apoptotik hücre sayımı değerlendirmesi sonrasında, özellikle, apoptozdaki en önemli artışın Epi soyunda olduğu (kontrol embriyoları ile karşılaştırıldığında; Noggin için 4.4-kat, Dorsomorphin için 10.6-kat, SB203580 için 2.2-kat) bulunmuştur (Şekil 4.8.B).

Daha sonra hücrelerde gerçekleşen ölümün gerçek zamanlı olarak incelenebilmesi için kırmızı bir floresan hücre ölüm habercisi olan SYTOX'un varlığında, pre-post implantasyon gelişim dönemindeki embriyolar *in vitro* kültür süresince time-lapse ile görüntülendi (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Gerçek zamanlı görüntülemeler sonucunda SYTOX-pozitif hücrelerin, Noggin uygulamasından sonra gelişmekte olan yumurta silindirinin Epi kompartmanında yoğunlaştığını gözlemledik (Şekil 4.8.C).



Şekil 4. 8. BMP sinyali baskılanmış pre-post geçişi dönemindeki embriyolarda hücre ölümünün değerlendirilmesi. **A.** Noggin (500ng/ml^{-1}), Dorsomorfin ($1\mu\text{M/mL}$) veya SB203580 ($5\mu\text{M/mL}$) varlığında peri-implantasyon gelişim sırasında 24 saat, 36 saat ve 48 saatte incelenen Cleaved-kaspaz-3 ekspresyonu. Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, Epi; Gata4, VE. Ölçek = $20\mu\text{m}$. **B.** Kontrol ve inhibitör uygulamaları sonrası 24 (üst), 36 (ortada), 48 saat (altta) her soyda tespit edilen cleaved-kaspaz-3 ekspresyonu için pozitif hücre yüzdesini gösteren miktarlar (grup başına en az 6 embriyo) * $P < 0.05$, *** $P = 0.001$ (ANOVA, Tukey testi). Hata çubukları = SEM. **C.** İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültür süresince time-lapse canlı

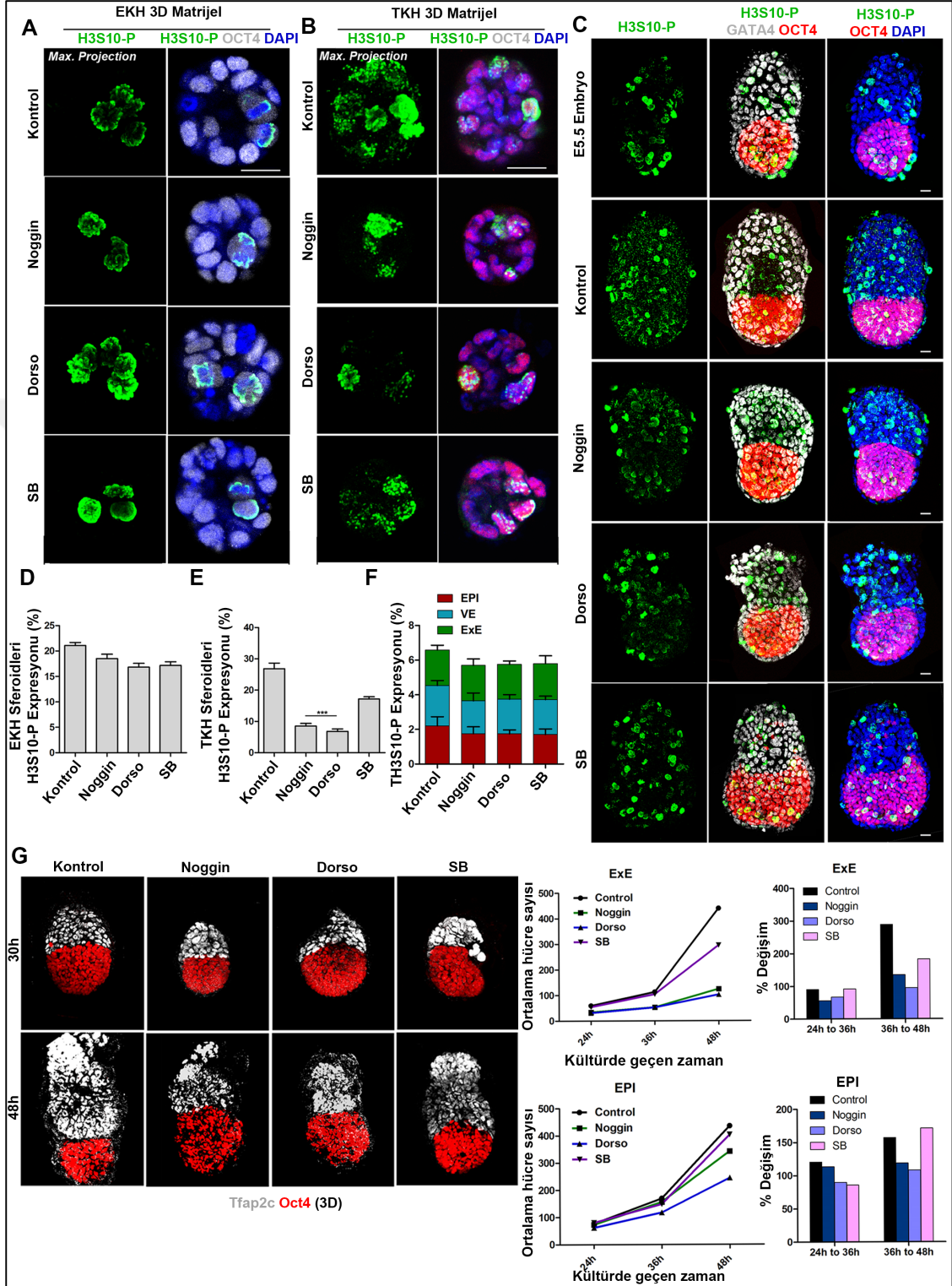
görüntüleme. Ölmekte olan hücreler, bir kırmızı hücre ölüm habercisi olan SYTOX ile işaretlenmiştir (kontrol n=11; Dorsomorfin n=13). Beyaz kesikli çizgiler embriyonun dış sınırını, sarı kesikli çizgiler ortaya çıkan proamniyotik kavitenin yerini işaretler. Canlı görüntüleme sonucunda embriyo fikse edilmiş ve Oct4, Gata4 soy belirteçleri ile Cleaved-Kaspaz-3 için immünboyanmıştır (en sağ). Ölçek= 20µm.

Sonuç olarak, hem apoptoz hem de canlı hücre ölüm analizleri, BMP inhibisyonunun Epi soyunda hücre ölümüne yol açtığını ve Epi soy gelişimi için sağkalım rolünü ortaya koyduğunu göstermektedir.

4.6. İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültürde BMP sinyali baskılanmış embriyolardaki hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi

Kök hücrelerin kayda değer proliferatif kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Proliferasyon düzensizliği veya kaybı sonuçta kök hücre tükenmesine yol açar (Orford and Scadden 2008).

ExE soyundaki kök hücrelerin BMP/Smad sinyal inhibisyonundan sonra kök hücre kimliğini yitirdikleri gözlemimize bağlı olarak, sırasıyla Epi ve ExE gelişimini taklit eden *in vitro* bir model olarak Matrigel'de yetiştirilen EKH ve TKH sferoidlerinde proliferasyonu araştırdık. 48 saat süreyle inhibitörlerle muamele edilen EKH ve TKH sferoidleri, bir proliferasyon belirteci olan Phospho-Histone-H3 (H3S10-P) proteininin ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir (Chadee, Hendzel ve ark. 1999, Strahl and Allis 2000). Buna göre, EKH yapılarında hiçbir değişiklik gözlenmezken, BMP/Smad inhibitör uygulaması sonrasında TKH yapılarında H3S10-P ekspre edilen hücrelerde önemli bir azalma saptandı (Şekil 4.9.A, B, D, E). H3S10-P ekspresyonu aynı zamanda, implantasyon sonrası embriyolarda da değerlendirildi (Şekil 4.9.C).



Şekil 4. 9. Kök hücre-kaynaklı doku benzeri sferoidlerde ve *in vitro* kültürde gelişmiş implantasyon sonrası embriyolarda proliferasyon değerlendirmesi. **A.** Kontrol, Noggin (150ng/ml^{-1}), Dorsomorfin ($0.5\mu\text{M/ml}$) veya SB203580 ($1\mu\text{M/ml}$) varlığında EKH sferoidlerindeki H3S10-P ekspresyonu. **B.** Kontrol, Noggin (50ng/ml^{-1}), Dorsomorfin ($0.1\mu\text{M/ml}$) veya SB203580 ($1\mu\text{M/ml}$) varlığında TKH sferoidlerindeki H3S10-P ekspresyonu. **C.** *In vivo* desidual diskseksiyon ile elde edilmiş E5.5 embriyo, *in vitro* kültür kontrol, Noggin

(500ng/ml⁻¹), Dorsomorfin (1µM/mL) veya SB203580 (5µM/mL) varlığında implantasyon sonrası embriyolarda H3S10-P ekspresyonu. Ölçek=20µm **D.** EKH ve **E.** TKH sferoidlerinde H3S10-P ekspresyonu için pozitif hücre yüzdesi. Deney grubu başına en az 20 sferoid analiz edilmiştir. **P <0.01 (Student-t testi). Hata Çubukları = SEM. **F.** İmplantasyon sonrası embriyolarda her soydaki H3S10-P ekspresyonu için pozitif hücre yüzdesi. Kontrol (n = 9), Noggin (500ng/ml⁻¹, n = 10), dorsomorfin (1µM/mL, n = 10), SB203580 (5µM/mL, n = 9). Hata Çubukları = SEM. **G.** Kültürün 30 ve 48. saatlerindeki örnek 3D embriyo morfolojileri. Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, Epi; Tfp2c, ExE. Sol taraftaki grafikler Epi ve ExE kompartmanlarındaki hücre sayısının zamana bağlı değişim analiz sonuçlarını göstermektedir.

Kontrol ve inhibitör uygulanmış gruplardan edilen embriyolardaki soylar arasında H3S10-P ekspre eden hücrelerin ortalama yüzdesi açısından bir fark saptanmamasına karşın (Şekil 4.9.F), önceki bulgularımızda gözlenen ExE dokusu hücre sayısındaki belirgin azalma ve anlamlı olmayan hücre ölümü, süresi uzamış hücre döngüsünü ve buna bağımlı gerilemiş gelişimi önermekte idi. Bu nedenle, ExE ve Epi kompartmanlarındaki zamana bağlı hücre sayısındaki artış analiz edilmiştir (Şekil 4.9.G). Bu amaçla Tfp2c, ExE belirteci olarak; Oct4, Epi belirteci olarak kullanılmış ve implantasyonu destekleyici *in vitro* kültürün 24, 36 ve 48. saatlerinde her bir kompartmandaki hücre sayısı Image J yazılımı ile sayılmıştır. Daha sonra her bir kompartmandaki ortalama hücre sayıları ve zamana bağımlı % değişimleri hesaplanmıştır (Şekil 4.9.G). Analiz sonucunda, Epi kompartmanında zamana bağlı normal hücre sayısal artışı tespit edilirken; ExE kompartmanında 24-36 saat aralığında gözlenen normal artış, 36-48 saat aralığında Noggin ve Dorsomorfin muamelesi sonrası dramatik bir şekilde durakladığı ve kontrol ile SB203580 uygulaması yapılan embriyolara göre çok geri kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.9.G).

4.7. BMP inhibitörleri varlığında peri-implantasyon epiblast gelişimi, kavitasyon ve embriyonik kök hücre pluripotansi faz değişiminin değerlendirilmesi

BMP/Smad sinyal inhibisyonunun pre-post implantasyon geçişindeki embriyolarda Epi tabakasındaki hücre ölümünü arttırdığına yönelik bulgularımız, Epi oluşum sürecini daha fazla araştırmamıza temel oluşturdu. Öncelikle, implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür süresince time-lapse görüntüleme analizleri ile Epi gelişimi ve kavitasyon oluşumu canlı ve doğrudan gözlendi (Şekil 4.10.A). Epi tabakası ve kavitasyonun izlenebilir olması için CAG-GFP membran habercisi transgenik farelerden elde edilmiş embriyolar kullanıldı. Doğrudan ve canlı gözlemler sonucunda, kontrol embriyolarında kültürün 24. saatte oluşmaya başlayan Epi kavitesinin 48. saatte kadar genişlemeye devam ettiği, postimplantasyon yumurta silindiri embriyosunun morfolojisine uyumlu olarak elonge

olduğu ve normal gelişmiş ExE kaviteleri ile birleşerek proamniyonik kaviteyi oluşturduğu gözlendi (şekil 4.10.A). Ancak, Dorsomorfin uygulanmış embriyolarda, 24. saatte kavite oluşum başlangıcı izlenmesine karşın, gerilemiş embriyo gelişimi ve ExE doku kaybına bağlı yumurta silindiri morfolojisinin kazanılamaması, kavitenin ekspansiyon olmaması ve proamniyotik kavite oluşumunun izlenememesi dikkati çekmiştir (şekil 4.10.A).

Daha sonra, pre-post implantasyon geçişinde Epi doku kimliğinin kazanılmasından sorumlu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerini qRT-PCR ile analiz ettik. Normal bir pre-post implantasyon geçişinde, blastosistin Epi tabakasındaki naif fazdaki pluripotensi kimliği, yumurta silindiri embriyosunun Epi tabakasındaki yönlenmiş fazdaki pluripotensi kimliği ile yer değiştirir. Bu amaçla, öncelikle, kontrol ve inhibitör uygulanmış gruplarda implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür ile postimplantasyon aşamasına ulaşmış yumurta silindiri morfolojisindeki embriyoların Epi kompartmanları izole edildi (şekil 4.10.B; aynıca bkz. yöntem). Epi kompartmanlarındaki Smad yolağı alt basamak substratları olan *Id1*, *Id2*, *Id3* genlerinin mRNA seviyelerinin Noggin ve Dorsomorfin gruplarında anlamlı olarak azaldığı teyid edildi (şekil 4.10.B). İşlenmiş faz pluripotensi belirteç genleri olan *Acs14*, *Dll3*, *Fgf5* ve *Otx2* mRNA ekspresyonlarının Smad-bağımlı sinyal inhibisyonunda, kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede arttığı bulundu (şekil 4.10.B).

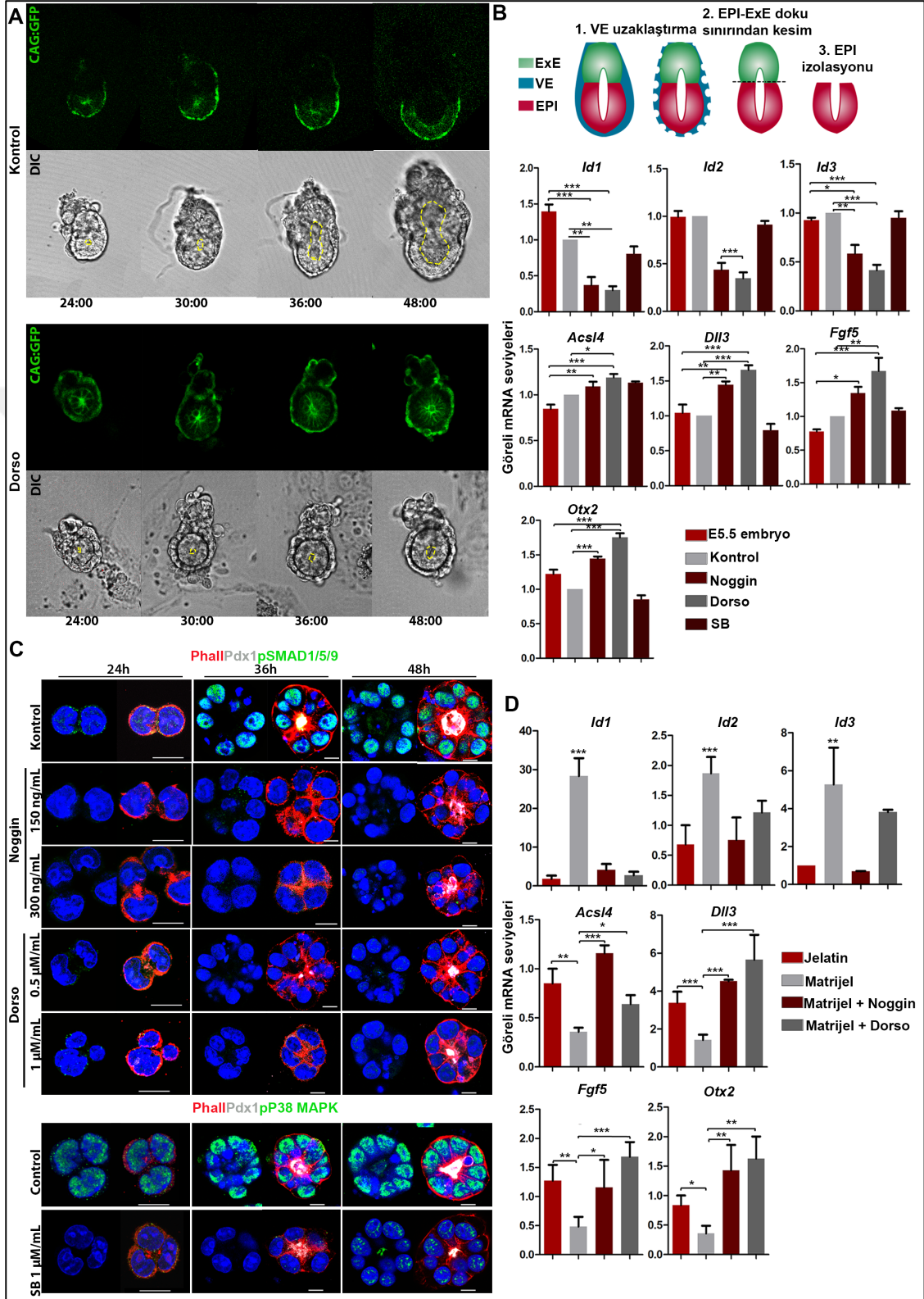
Embriyolarda gözlenen bu bulgulardan sonra Matrigel'de yetiştirilen EKH sferoidlerini, doğal bir Epi dokusunun *in vitro* pre-post implantasyon yapay geçiş modeli olarak inceledik. Matrigel'de 24, 36 ve 48 saat boyunca yetiştirilen EKH sferoidlerinin spontan organizasyonu ve lmenogenezi, polarizasyon ve lümen oluşumu için bir belirteç olan Podokalaksin ekspresyonu varlığı ile analiz edildi (şekil 4.10.C). BMP inhibisyonundan sonra, tüm EKH yapıları, kontrollere benzer şekilde polarize bir organizasyon gösterdi (şekil 4.10.C) ve kavite oluşumunun BMP sinyal inhibisyonundan etkilenmediği tespit edildi (şekil 4.10.C). Daha sonra, EKH sferoidlerinde naiften yönlenmiş pluripotensiye geçiş ile ilişkili genleri analiz ettik. Literatürde daha önceden bildirildiği gibi (Boroviak, Loos ve ark. 2014) standart 2D-jelatin ile kaplanmış kültür koşulları 2i-LIF yokuluğunda, EKH farklanmasını ve yönlenmiş faza geçişi dramatik bir şekilde arttırdığı teyid edildi.

3D-matrijel ile kaplanmış kültür koşullarının ise 2i-LIF yokuluğunda naif-yönlendirilmiş pluripotensi faz geçişini sadece Smad-bağımlı BMP sinyalinin bloklanması dahilinde arttırdığı belirlendi (Şekil 4.10.D). İşlenmiş pluripotensi belirteç genlerinden *Acs14*, *Dll3*, *Fgf5* ve *Otx2* mRNA ekspresyonlarının Smad-bağımlı sinyal inhibisyonunda, kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede arttığı bulundu (Şekil 4.10.D).

4.8. Kök-hücre kaynaklı model embriyolarda BMP inhibisyonu sonrası morfogenez

Bu çalışmada, implantasyon aşaması zamanındaki ve sonrasındaki embriyonik/ekstraembriyonik etkileşimlerin esas olduğu erken embriyogenez basamaklarını iki farklı kök hücre tipi kullanarak *in vitro* ortamda taklit edilmesi amacı ile matrijel içersinde EKH ve TKH ko-kültür tekniği kullanılmıştır (Harrison, Sozen ve ark. 2017).

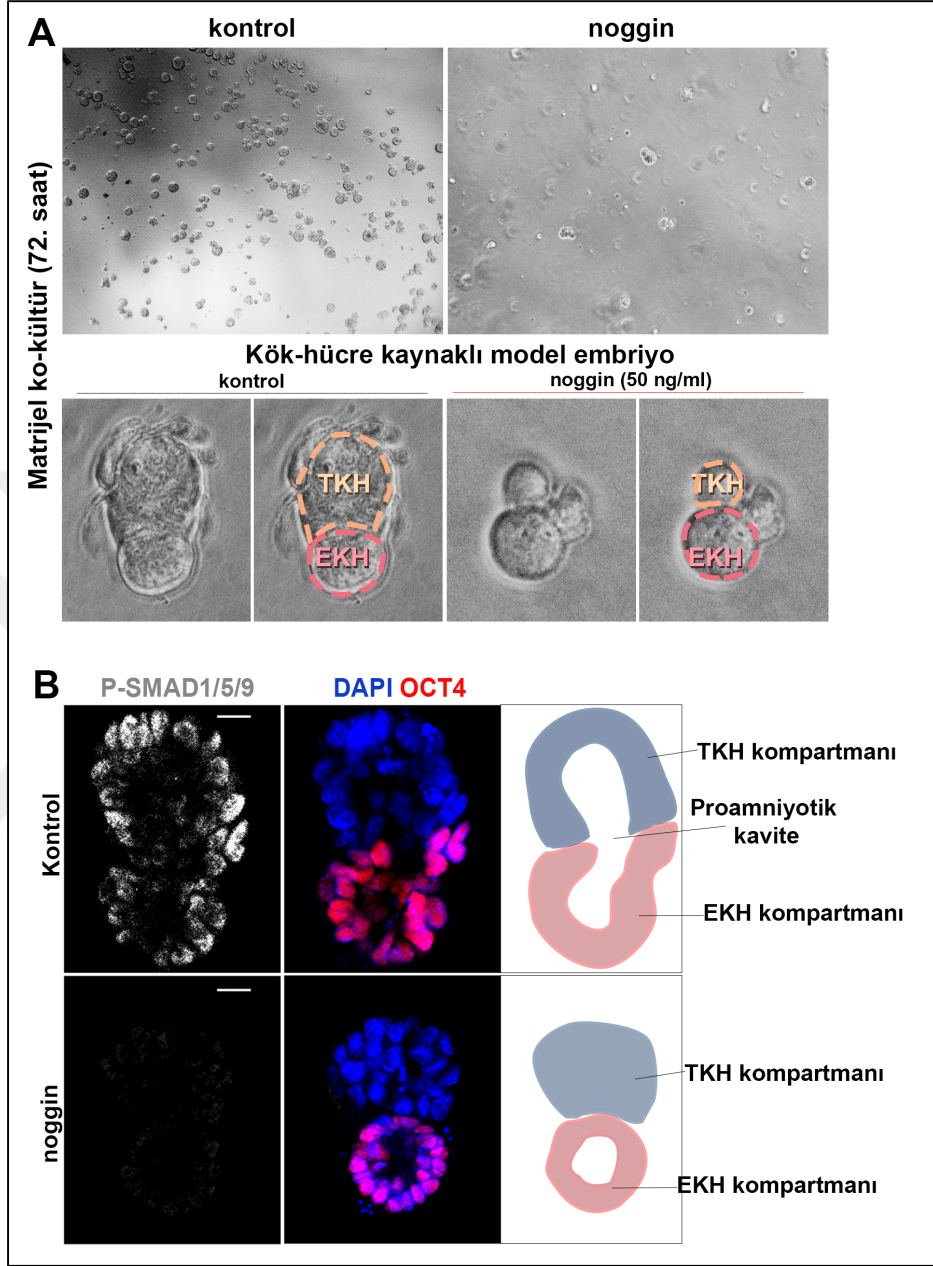
İmplantasyonu destekleyi *in vitro* kültürde pre-post implantasyon geçişindeki embriyolarda BMP inhibisyonu sonrasında gözlenen morfolojik değişikliklerin oluşturulan kök-hücre kaynaklı embriyo modelinde de test edilmesi için, EKH-THK ko-kültüründe BMP inhibisyon uygulaması yapılmıştır. 50 ng/ml⁻¹ dozunda Noggin uygulamasının ardından matrijel ko-kültüründe 72 saat sonra gözlenen azalmış sferoid varlığı dikkati çekmiştir. (Şekil 4. 11.A). Kültür ortamına yapılan detaylı incelemeler sonucunda, Bmp inhibisyonu sonrasında, EKH-THK birlikteliği ile oluşmuş kök-hücre kaynaklı model embriyoların EKH-kaynaklı embriyonik kompartmanında göze çarpan bir boyut farklılığı incelenmezken, THK-kaynaklı ekstraembriyonik kompartmandaki belirgin azalmış boyutlar dikkati çekmiştir (Şekil 4. 11.A). Bu mikroskopik incelemenin moleküler olarak doğrulanması için immunofloresan işaretleme analizi yapılmıştır. Buna göre öncelikle hücre içi BMP sinyalinin etkin bir şekilde inhibe edildiği P-Smad1/5/9 proteininin ekspresyon kaybı ile doğrulanmıştır (Şekil 4. 11.B). Noggin uygulanmış gruplarda azalmış kompartman boyutları ve THK-kaynaklı ekstraembriyonik kompartmanda kavitenin oluşmamasına bağlı olarak proamniyotik kavitenin şekillenememesi dikkati çekmiştir (Şekil 4. 11.B).



Şekil 4. 10. BMP/Smad inhibisyonundan sonra EKH sferoidlerinde ve Epi soyunda artmış hücre farklılığı. **A.** İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültür süresince time-lapse canlı görüntüleme. Kaviteyi gözlemleyebilmek amacı ile CAG-GFP membran habercisi transgenik embriyolar

kullanılmıştır. Sarı kesikli çizgiler gözlenen kaviteyi işaretler. **B.** İmplantasyon sonrası embriyolarda yönlenmiş pluripotensi belirteçleri ve Id genlerinin Epi dokusundaki ekspresyon seviyesini belirlemek için yapılan qRT-PCR analizi. Soldaki çizim qRT-PCR analizi için Epi izolasyonunu göstermektedir. *P <0.05, **P <0.01, ***P = 0.001 (ANOVA, Tukey testi). Hata çubukları = SEM. (grup başına n = 5). **C.** 3D-Matrijel içerisinde geliştirilmiş EKH sferoidlerinde 24, 36 ve 48 saat Noggin, Dorsomorphin ve SB203580 uygulamalarının ardından kavite oluşumunun Podogalaksin ekspresyonu ile incelenmesi. Kavite oluşumun BMP inhibitör uygulamalarından etkilenmediği tespit edilmiştir. **D.** EKH'lerde modellenen pluripotensi faz değişiminin qRT-PCR analiz sonuçları. *P <0.05, ** P <0.01, *** P = 0.001 (ANOVA, Tukey testi) Hata Çubukları = SEM. (n= 3 deneysel tekrar).





Şekil 4. 11. Kök-hücre kaynaklı model embriyolarda gerçekleşen morfogenezde BMP sinyal inhibisyonunun etkisi. **A.** Kök-hücre kaynaklı model embriyo üretimi için oluşturulan matrijel ortamının 72. saatinde, kontrol ve noggin uygulanmış grupların küçük büyütme fotoğrafları (üst panel). Kontrol ve noggin grubunda gözlenen kök-hücre kaynaklı model embriyo, ko-kültürün 72. saati (alt panel). TKH kompartmanında gözlenen azalmış boyutlar dikkat çekicidir. **B.** Kontrol ve noggin grubundan elde edilmiş kök-hücre kaynaklı model embriyo, ko-kültürün 72. saati. Kullanılan soy belirteçleri: Oct4, EKH-kaynaklı embriyonik kompartman.

5. TARTIŞMA

Embriyonik hayatın fertilizasyon ve implantasyon arasındaki yaklaşık 1 haftalık dönemi olan preimplantasyon gelişim memelilere özgü ve tüm memelilerde özdeş olup, başarılı bir implantasyon ve gebeliğin devamlılığı için hayati önem taşımaktadır. Embriyonik hayatın ikinci haftasına geçişte, gelişen embriyonun uterus dokuları ile etkileşimi ve devamında uterin doku içerisine invazyonunu kapsayan implantasyon süreci başlar. Yapılan çalışmalarda, insan embriyolarının yalnızca %40'ının başarılı bir şekilde uterusu implante olduğu belirlenmiştir (Edwards 1997). İmplantasyon zamanında, küresel morfolojideki hücreler topluluğu olan blastosist evresindeki embriyonun, karmaşık zaman-mekansal morfolojik ve genetik dönüşümleri ile yumurta silindiri olarak adlandırılan implantasyon sonrası embriyonik morfoloji oluşur. Doğru embriyonik morfogenezi için temel oluşturan bu geçiş sırasında hücre yeniden organizasyon ve hücre içi sinyal yollarının kontrol mekanizmaları, uterus dokuları içerisine gömülmede olan embriyoya erişimin olmaması nedeni ile büyük ölçüde araştırılmamıştır. Ayrıca, implantasyon ve erken postimplantasyon dönemindeki embriyonun çok küçük boyutları, hassasiyeti ve sayıca yetersizliği araştırmalar açısından günümüze kadar süregelen limitasyonlar olmuştur.

Bu tez çalışması ile, literatürde ilk kez, maternal dokular olmaksızın implantasyon aşamasının ötesinde embriyonik gelişime izin veren bir *in vitro* protokol kullanılarak (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014), implantasyon sonrası morfogenetik geçiş sırasındaki sinyal olaylarında BMP yolağının rolü incelenmiştir. BMP sinyalinin kanonik ve kanonik olmayan mekanizmalarını değerlendirerek, fare embriyosunun erken implantasyon sonrası gelişimi sırasında ekstraembriyonik ektoderm dokusunun doğru özelleşmesi için Smad bağımlı BMP sinyalizasyonunun gerekli olduğu açıklanmıştır. Yapılan delaylı analizler, ekstraembriyonik soylarda kök hücre kimliklerinin korunabilmesi ve devamlılığının sağlanabilmesi için, embriyonik soylarda ise doğru zamansal pluripotensi değişiminin gerçekleşebilmesi için hücre içi BMP/Smad sinyal kontrolünün gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Literatürde yer alan önceki yıllara ait çalışmalarda, Smad4 ve Bmpr2 genleri silinmiş BMP mutant embriyolarının postimplantasyon evrelerinde daha az boyut ve doku düzensizliği gösterdiği açıklanmıştır (Sirard, de la Pompa ve ark. 1998; Chu, Dunn ve ark. 2004). BMP mutant embriyolarda E6.0 ve E.6.5 dönemlerini kapsayan pregastrulasyon aşamalarında defektler ve gastrulasyon zamanında (E7.5-E8.0 aralığında) embriyonik letalite görülmüştür (Chu, Dunn ve ark. 2004, Lawson, Dunn ve ark. 1999, Winnier, Blessing ve ark. 1995). BMP mutant embriyolarda gözlenen bu gelişimsel kusurların altında yatan hüresel etkileşimler ise günümüze kadar araştırılmamış ve eksik kalmıştır. E4.5-E5.5 aralığının incelendiği araştırmamız, pre-post implantasyon geçişte BMP/Smad sinyallesinin kaybının, ExE soy farklılaşması ve doku gelişimi için kilit moleküler elemanlar olan Eomes ve Elf5 ekspresyonlarını hem gen hem de protein düzeyinde azattığını göstermiştir.

Kök hücrelerin kayda değer proliferatif kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Kök hücre işlevselliğindeki bozulma veya proliferasyon kaybı, kök hücre tükenmesine yol açar (Orford and Scadden 2008). Yapılan çalışmalarda polar TE ve ExE embriyonik soylarının proliferatif potansiyelinin, doku içerisinde yer alan TKH popülasyonuna bağlı olduğu ve implantasyondan sonra bu kök hücrelerin kaybının ExE doku oluşumunu etkilemesi beklendiği bildirilmiştir (Tanaka, Kunath ve ark. 1998). Bu nedenle, literatürdeki bu önerme ile uyumlu olarak, çalışmamızda hem embriyonik dokularda, hem de embriyo kaynaklı kök hücrelerde BMP sinyal yokluğundaki proliferatif kapasite araştırılmıştır. Bu amaçla, bir proliferasyon belirteci olarak H3S10-P protein ekspresyonu değerlendirilmiştir. Bu moleküler belirtecin kromozomlar hücre siklusunun profaz fazı sırasında yoğunlaştığı zaman serin-10 üzerindeki fosforile-histon-H3'ü tanıdığı daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Chadee, Hendzel ve ark. 1999, Strahl and Allis 2000).

Normal bir embriyonik gelişimde, implantasyonun ilk aşamalarından itibaren gelişen embriyonun Epi ve ExE dokuları, bu dokuları dışarıdan saran tek tabaka viseral endoderm (VE) tarafından üretilen bazal membran ile çevrelenmiştir (Bedzhov, Graham ve ark. 2014). Bu bazal membran, gelişim sırasında Epi ve ExE dokuları için ekstraselüler matrix sinyallerini sağlayarak, doku olgunlaşması, polarizasyonu gibi doku ve dolayısı ile

embriyo gelişiminin devamlılığını sürdürmektedir. Ticari olarak elde edilebilen Matrijel Matriks, Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomasından çıkarılan bir çözülmüş bazal membran preparasyonu olup, laminin (ana bileşen), kolajen IV, heparin sülfat proteoglikanlar, entaktin/nidogen ve bir dizi büyüme faktörü gibi ekstraselüler matrix proteinleri açısından zengindir. Matrijel Matriks, *in vitro*'da eşsiz bir bazal membran oluşumu sağladığı için hücre ve doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

2014 yılında yapılan bir çalışmada, blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücrelerin (EKH) matrijel matriks içerisine gömülmeleri sonrasında 24-48 saat içerisinde kendi kendilerine organize oldukları, hücresel polarizasyon vasıtası ile kavitasyona gittikleri tespit edilmiştir (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Bu çalışmada, matrijel matriks içerisindeki EKH'lerin kendiliğinden düzenlenmesinin, pre-post implantasyon geçişindeki bir embriyonun Epi dokusunda gözlenen morfolojik düzenlenme ile eşdeğer nitelikte olduğu belirlenmiştir (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Böylece, EKH'ler vasıtası ile üç boyutlu matrijel matriks içerisinde periimplantasyon Epi doku modelinin oluşumu ortaya konulmuştur. Biz de bu çalışma kapsamında benzer yaklaşımı kullanarak, ExE doku gelişimini *in vitro* ortamda taklit edebilmek amacı ile, trofoblast kök hücrelerin (TKH) matrijel matriks içerisindeki ExE modellerini oluşturduk. Bu yaklaşım aynı zamanda Epi kaynaklı sinyaller olmaksızın BMP sinyal aracılı ExE gelişimini test etmemizi mümkün kılarak, *in vitro* geliştirilmiş embriyolarda gözlemlediğimiz ExE doku anomalisini daha etkin bir şekilde araştırmamıza izin verdi.

TKH aracılı ExE doku modeli üzerinde yaptığımız incelemeler fare embriyonik gelişimi sırasında BMP/Smad sinyalizasyonu için yeni bir rolü ortaya koymaktadır. Buna göre, embriyolarda gözlemlediğimiz bulgulara uyumlu olarak, BMP sinyal yokluğunda Eomes ve Elf5 ekspresyonları TKH sferoidlerinde hem gen hem de protein düzeyinde azalmıştır. Bununla birlikte *Gata3*, *Ets2*, *Fgfr2* ve *Nr0b1* genlerinin ekspresyonları da standart TKH kültüründe BMP/Smad sinyal inhibisyonuna bağımlı olarak azalmıştır. Tüm bu sonuçlar, Smad-bağımlı sinyal kaybı sonucunda, ekstraembriyonik kök hücre kimliği için gerekli olan temel transkripsiyon faktörlerinin yanlış yönlendirilmesinin yapıldığını ortaya

çıkarmaktadır. Kök hücre devamlılığının bozulmasının sonucu olarak, TKH proliferasyon kapasitesinin de azaldığı tespit edilmiştir. TKH aracılı ExE doku modeline ilişkin bu orijinal bulgular ilk kez çalışmamız ile ortaya konulmuştur.

Yapılan apoptoz-aracılı ve apoptoz-bağımsız hücre ölümü analizleri sonucunda BMP/Smad ExE dokusunun ölüme gitmediği, bunun aksine Epi dokusunda sağ kalımın azaltıldığı tespit edilmiştir. Bu değerlendirmenin yapılabilmesi için hem immün-işaretleme tekniği kullanılmış hem de pre-post geçişi süresince embriyoların gelişimlerinin canlı ve direkt incelenmiştir. ExE dokusunun ölüme gitmediğinin tespit edilmesi sonrasında, BMP/Smad inhibisyonuna bağlı ExE dokusundaki hücre sayısının azalma nedenine cevap arayabilmek için, proliferasyon analizleri yapılmıştır. İlginç bir şekilde H3S10-P protein ekspresyonu kontrol ve inhibitör gruplarında farklı bulunmamıştır. Ancak, yapılan zamana bağlı hücre sayısındaki değişim analizi, ExE dokusunda yer alan hücre sayısının zamana bağlı artış göstermediğini yada çok az artış gösterdiğini ortaya çıkarmış, böylece uzamış hücre döngüsünü ve buna bağımlı gerilemiş gelişimi önermiştir. Deneysel bulgularımız doğrultusundaki önermemize göre, hücreler mitoz fazında olduğu sürece H3S10-P proteinini ekspre etmeye devam edecek, ancak, uzamış hücre siklus zamanlamasına bağlı olarak kontrol gruplarından daha az mitoz geçireceklerinden sonuçta dokuda yer alan hücre sayısı azalacaktır.

BMP/Smad inhibisyonuna bağlı ExE dokusunda fenotip değişikliklerine götüren sebepleri ortaya çıkarmamızın ardından, Epi dokusundaki sağ kalımı azaltan hücresel mekanizmaları da çalışmamızda inceledik. 2014 yılında gösterilmiş olan EKH aracılı Epi doku modelini kullandık (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Yine daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda EKH'lerin standart 2i-LIF koşullarında kültürde tutulmaya devam edildiği sürece naif pluripotensi fazından çıkamadığı, ancak ortamdaki 2i-LIF'in çekildiği zaman yönlendirilmiş pluripotensi faza geçtiği ve hızlıca daha ileri somatik hücre farklanmalarına gittiği gösterilmiştir (Boroviak, Loos ve ark. 2014). Ancak burada esas olan nokta, kök hücrelerin embriyolarda olduğu gibi zaman-mekansal olarak pluripotensi faz değişimini gerçekleştirebilmeleridir. Standart EKH kültüründen 2i-LIF'in çekilmesi her ne kadar hücreleri faz değişimine yönlendirse de, bu değişim normal bir embriyoda olduğundan çok daha hızlı ve düzensiz olmaktadır. Bu nedenle 2014 yılında Bedzhov ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmada, standart jelatin yerine matrijel kaplanmış kültür ortamında EKH kültüründen 2i-LIF'in uzaklaştırılması sonucunda EKH'leri normal embriyonik gelişime uyumlu olarak pluripotensi faz değişimine yönlendirdiği gösterilmiştir (Bedzhov and Zernicka-Goetz 2014). Önceki yıllarda açıklanmış bu bilgilerin ışığında, pluripotensi faz değişimine bağlı olarak hücrel farklanmayı araştırdık. Deneysel bulgularımıza göre, BMP/Smad inhibisyonuna bağlı olarak EKH aracılı Epi doku modelinde prematüre faz değişiminin indüklendiği tespit edilmiştir. Naif fazdan, yönlenmiş faza geçişin kontrolsüz hızlanması, hücrel farklanmanın zamansız gerçekleştiğini önermektedir. BMP/Smad inhibisyonuna bağlı tespit edilen artmış hücrel ölümün, prematüre pluripotensi faz değişiminden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Embriyonik Epi dokusunda hücre ölümünü arttırdığı bilinen polarizasyon ve kavitasyon süreçlerinde yaşanabilecek anormallikleri (Shahbazi, Scialdone ve ark. 2017) de test edebilmek amacı ile yapılan polarizasyon-aracılı kavitasyon değerlendirmelerinde ise, hiç bir BMP sinyal yolağı aktivitesine bağımlı olmaksızın, hem embriyolarda hem de EKH aracılı Epi doku modelinde, normal kavite oluşumunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hatalı polarite ve kavizasyon süreçlerinden kaynaklanabilecek sebeplerin elimine edilmesi, pluripotensi faz değişimine yönelik kurduğumuz ikincil Epi doku hasarı hipotezimizi güçlendirmiştir.

İmplantasyonu destekleyici *in vitro* kültürde geliştirilen embriyolar üzerinde ve kök-hücre kaynaklı tekil doku modelleri üzerinde BMP sinyal-aracılı hücrel düzenlenmenin incelenmesinin ardından, bu tez çalışmasında Harrison & Sozen 2017 protokolü kullanılarak kök-hücre kaynaklı embriyo benzeri yapılar geliştirilmiş ve BMP sinyaline bağlı embriyo gelişiminin uzaysal ve zamansal (spatio-temporal) değişimleri incelenmiştir (Harrison, Sozen ve ark. 2017). Kök hücre-kaynaklı model embriyolarda BMP/Smad inhibisyonuna bağlı olarak gözlenen TKH-kaynaklı ExE kompartmanındaki azalmış doku boyutları, diğer deneysel bulgularımız ile örtüşmekte ve onları desteklemektedir. Kök hücre modellemelerine bağlı literatürde yapılan embriyo veya doku benzeri sistemlerinin hiçbirinde implantasyon ve sonrası embriyonik gelişim

gerçekçi olarak taklit edilemediği ve sinyal etkileşimleri araştırılmadığı için, çalışmamız bu açıdan bir ilktir.

Çalışmamızın, implantasyon zamanında gerçekleşen embriyogenezin anlaşılmasına ve embriyonik ve ekstraembriyonik kaynaklı kök hücrelerin gelişimsel orjini ve potansiyelinin açıklanmasına katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez projesi çalışmasında, farede E4.5 ve E5.5 günler arasında gerçekleştiği bilinen ve *in vivo*'da maternal doku içerisinde izlenemeyen morfogenetik yapılanmanın nasıl düzenlendiği sorusuna *in vitro*'da oluşturulan yeni bir yaklaşım ile, pre-post implantasyon geçiş döneminde meydana gelen morfogenez sırasındaki sinyal olaylarında BMP yolağının muhtemel rolleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1. Çalışmada kullanılan implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür sistemi, *in vivo* çalışmaları sınırlandıran implantasyon zamanı embriyo erişilemezliği için yeni bir çözüm üreterek, implantasyon zamanı embriyonik gelişimde gerçekleşen morfogenetik yapılanmadaki BMP sinyal yolağının rolünü açıklamıştır.
2. Literatürde var olan BMP mutant embriyoların gastrulasyon zamanı gözlenen embriyonik letalitenin altında yatan temel sebebin, hem embriyonik hem de ekstra embriyonik soylardaki kök hücre popülasyonlarındaki meydana gelen moleküler defektler sonucu anormal doku özelleşmesi ve sonuçta yumurta silindiri oluşumunun başarısızlığı ile sonuçlandığı ortaya konulmuştur.
3. *In vivo* çalışmalarda incelenen embriyonik fenotipler ovidukt ve uterusdaki maternal faktörlerin ve parakrin sinyallerin etkisi ile maskelenmiş olabileceğinden, çalışmamızda kullanılan implantasyonu destekleyici *in vitro* kültür sistemi, ayrıca, erken embriyogenezin kontrol edilmesinde yalnız embriyo-kaynaklı iç sinyal faktörlerinin oynadığı kapsamlı rolü belirlememize olanak sağlamıştır.
4. Süperovülasyon uygulamaları ile çok sayıda elde edilebilen ve araştırılabilen preimplantasyon dönem embriyoların aksine, peri ve postimplantasyon dönem embriyolar sınırlı sayıda elde edilebilirler. Buna karşılık, embriyonik veya ekstraembriyonik kök hücreler süresiz olarak yenilenebilir özelliktedirler. Bu nedenle, çalışmamızda geliştirdiğimiz kök-hücre kaynaklı model embriyo sistemi erken embriyoloji araştırmaları için eşsiz bir platform oluşturmaktadır.

5. İlerleyen süreçlerde, BMP/Smad aracılı sinyal yolağının alt basamak hedefleri olan ve daha önce sadece embriyonik kök hücrelerde etki mekanizması gösterilmiş olan Id gen ailesinin genetik mutasyonları ile oluşturulacak model embriyolarda, bu tez projesinde incelenen fenotiplerin Id genleri kontrolünde olup olmadığı araştırılabilir.



KAYNAKLAR

Arman, E., R. Haffner-Krausz, Y. Chen, J. K. Heath and P. Lonai Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998.95(9): 5082-5087.

Aubin, J., A. Davy and P. Soriano In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev* 2004.18(12): 1482-1494.

Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian and R. Lovell-Badge Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003.17(1): 126-140.

Bany, B. M. and J. C. Cross Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Dev Biol* 2006.294(2): 445-456.

Bedzhov, I., S. J. Graham, C. Y. Leung and M. Zernicka-Goetz Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014.369(1657).

Bedzhov, I., C. Y. Leung, M. Bialecka and M. Zernicka-Goetz In vitro culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. *Nat Protoc* 2014.9(12): 2732-2739.

Bedzhov, I. and M. Zernicka-Goetz Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell* 2014.156(5): 1032-1044.

Ben-Haim, N., C. Lu, M. Guzman-Ayala, L. Pescatore, D. Mesnard, M. Bischofberger, F. Naef, E. J. Robertson and D. B. Constam The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4. *Dev Cell* 2006.11(3): 313-323.

Beppu, H., M. Kawabata, T. Hamamoto, A. Chytil, O. Minowa, T. Noda and K. Miyazono BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* 2000.221(1): 249-258.

Bischoff, M., D. E. Parfitt and M. Zernicka-Goetz Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development* 2008.135(5): 953-962.

Boroviak, T., R. Loos, P. Bertone, A. Smith and J. Nichols The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* 2014.16(6): 516-528.

Chadee, D. N., M. J. Hendzel, C. P. Tyliński, C. D. Allis, D. P. Bazett-Jones, J. A. Wright and J. R. Davie Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 1999.274(35): 24914-24920.

Chu, G. C., N. R. Dunn, D. C. Anderson, L. Oxburgh and E. J. Robertson Differential requirements for Smad4 in TGFbeta-dependent patterning of the early mouse embryo. *Development* 2004.131(15): 3501-3512.

Coucouvanis, E. and G. R. Martin Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* (1995).83(2): 279-287.

Edwards, R. G. Recent scientific and medical advances in assisted human conception. *Int J Dev Biol* 1997.41(2): 255-262.

Harrison, S. E., B. Sozen, N. Christodoulou, C. Kyprianou and M. Zernicka-Goetz Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science* 2017.356(6334).

Heldin, C. H., K. Miyazono and P. ten Dijke TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997.390(6659): 465-471.

Kunath, T., D. Strumpf and J. Rossant Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review. *Placenta* 2004.25 Suppl A: S32-38.

Latos, P. A. and M. Hemberger Review: the transcriptional and signalling networks of mouse trophoblast stem cells. *Placenta* 2014.35 Suppl: S81-85.

Latos, P. A., A. R. Sienerth, A. Murray, C. E. Senner, M. Muto, M. Ikawa, D. Oxley, S. Burge, B. J. Cox and M. Hemberger Elf5-centered transcription factor hub controls trophoblast stem cell self-renewal and differentiation through stoichiometry-sensitive shifts in target gene networks. *Genes Dev* 2015.29(23): 2435-2448.

Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving and B. L. Hogan Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999.13(4): 424-436.

Lee, C. Q., L. Gardner, M. Turco, N. Zhao, M. J. Murray, N. Coleman, J. Rossant, M. Hemberger and A. Moffett What Is Trophoblast? A Combination of Criteria Define Human First-Trimester Trophoblast. *Stem Cell Reports* 2016.6(2): 257-272.

Li, S., D. Edgar, R. Fassler, W. Wadsworth and P. D. Yurchenco The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* 2003.4(5): 613-624.

Massague, J. and D. Wotton Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000.19(8): 1745-1754.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003.113(5): 631-642.

Miyazono, K., Y. Kamiya and M. Morikawa Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010.147(1): 35-51.

Morris, S. A., R. T. Teo, H. Li, P. Robson, D. M. Glover and M. Zernicka-Goetz Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010.107(14): 6364-6369.

Murohashi, M., T. Nakamura, S. Tanaka, T. Ichise, N. Yoshida, T. Yamamoto, M. Shibuya, J. Schlessinger and N. Gotoh An FGF4-FRS2alpha-Cdx2 axis in trophoblast stem cells induces Bmp4 to regulate proper growth of early mouse embryos. *Stem Cells* 2010.28(1): 113-121.

Nichols, J. and A. Smith Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009.4(6): 487-492.

Nishimura, R., K. Hata, F. Ikeda, T. Matsubara, K. Yamashita, F. Ichida and T. Yoneda The role of Smads in BMP signaling. *Front Biosci* 2003.8: s275-284.

Nishioka, N., S. Yamamoto, H. Kiyonari, H. Sato, A. Sawada, M. Ota, K. Nakao and H. Sasaki Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 2008.125(3-4): 270-283.

Orford, K. W. and D. T. Scadden Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 2008.9(2): 115-128.

Piotrowska-Nitsche, K. and M. Zernicka-Goetz Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech Dev* 2005.122(4): 487-500.

Plachta, N., T. Bollenbach, S. Pease, S. E. Fraser and P. Pantazis Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat Cell Biol* 2011.13(2): 117-123.

Qi, X., T. G. Li, J. Hao, J. Hu, J. Wang, H. Simmons, S. Miura, Y. Mishina and G. Q. Zhao BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004.101(16): 6027-6032.

Rivera-Perez, J. A. and A. K. Hadjantonakis The Dynamics of Morphogenesis in the Early Mouse Embryo. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014.7(11).

Rossant, J. and P. P. Tam Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 2009.136(5): 701-713.

Shahbazi, M. N., A. Scialdone, N. Skorupska, A. Weberling, G. Recher, M. Zhu, A. Jedrusik, L. G. Devito, L. Noli, I. C. Macaulay, C. Buecker, Y. Khalaf, D. Ilic, T. Voet, J. C. Marioni and M. Zernicka-Goetz Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos. *Nature* 2017.552(7684): 239-243.

Sirard, C., J. L. de la Pompa, A. Elia, A. Itie, C. Mirtsos, A. Cheung, S. Hahn, A. Wakeham, L. Schwartz, S. E. Kern, J. Rossant and T. W. Mak The tumor suppressor gene *Smad4/Dpc4* is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev* 1998.12(1): 107-119.

Skreb, N., D. Solter and I. Damjanov Developmental biology of the murine egg cylinder. *Int J Dev Biol* 1991.35(3): 161-176.

Sozen, B., A. Can and N. Demir Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. *Dev Biol* 2014.395(1): 73-83.

Strahl, B. D. and C. D. Allis The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000.403(6765): 41-45.

Strumpf, D., C. A. Mao, Y. Yamanaka, A. Ralston, K. Chawengsaksophak, F. Beck and J. Rossant *Cdx2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development* 2005.132(9): 2093-2102.

Tabansky, I., A. Lenarcic, R. W. Draft, K. Loulier, D. B. Keskin, J. Rosains, J. Rivera-Feliciano, J. W. Lichtman, J. Livet, J. N. Stern, J. R. Sanes and K. Eggan Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Curr Biol* 2013.23(1): 21-31.

Tanaka, S., T. Kunath, A. K. Hadjantonakis, A. Nagy and J. Rossant Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998.282(5396): 2072-2075.

Torres-Padilla, M. E., D. E. Parfitt, T. Kouzarides and M. Zernicka-Goetz Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007.445(7124): 214-218.

van den Brink, S. C., P. Baillie-Johnson, T. Balayo, A. K. Hadjantonakis, S. Nowotschin, D. A. Turner and A. Martinez Arias Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development* 2014.141(22): 4231-4242.

Warmflash, A., B. Sorre, F. Etoc, E. D. Siggia and A. H. Brivanlou A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat Methods* 2014.11(8): 847-854.

Winnier, G., M. Blessing, P. A. Labosky and B. L. Hogan Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995.9(17): 2105-2116.

Zernicka-Goetz, M., S. A. Morris and A. W. Bruce Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat Rev Genet* 2009.10(7): 467-477.

RESEARCH ARTICLE SUMMARY

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Sarah Ellys Harrison,* Berna Sozen,* Neophytos Christodoulou, Christos Kyprianou, Magdalena Zernicka-Goetz†

INTRODUCTION: Early mammalian development requires the formation of embryonic and extraembryonic tissues and a highly coordinated partnership between them. This close partnership is a prerequisite for successful construction of embryo architecture, with the embryonic tissue generating cells of the embryo proper and the extraembryonic tissues, trophoblast, and primitive endoderm forming the placenta and the yolk sac. Each of these components and the interactions between them are critical for embryonic development to birth. Embryonic stem cells (ESCs) in culture have the potential to participate in development when introduced into the early

embryo. However, when cultured in vitro on their own, they do not recapitulate the spatial and temporal events of early embryogenesis.

RATIONALE: We hypothesized that in order to faithfully model with stem cells the morphogenetic steps involved in mammalian embryogenesis, we would need to establish a developmental dialogue between ESCs and extraembryonic trophoblast stem cells (TSCs) in a three-dimensional (3D) extracellular matrix (ECM) scaffold, to potentially substitute for the basement membrane normally provided by the primitive endoderm.

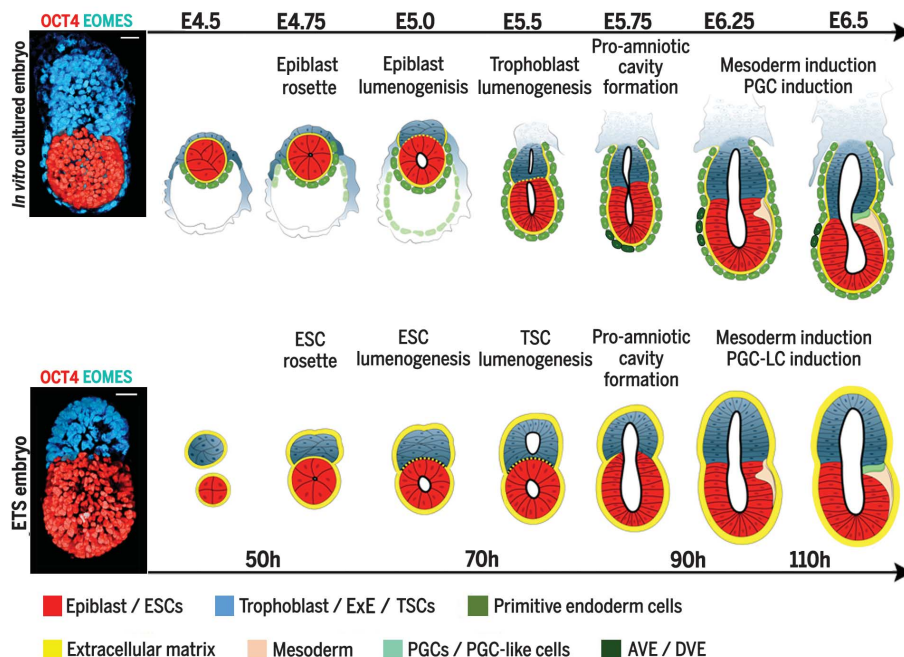
RESULTS: We combined embryonic and extraembryonic stem cells in vitro on such a 3D matrix and found that these cells were capable of self-assembly into a structure whose development and architecture were similar to that of the natural embryo, leading us to name them in vitro ESC and TSC stem cell-embryos (ETS-embryos). By building ETS-embryos from genetically modified stem cells and using specific inhibitors, we identify morphogenetic events and signaling pathways involved in these early developmental stages. Furthermore, we show that in vitro stem cell embryogenesis can be broken down into a sequence of key steps from implanta-

ON OUR WEBSITE

Read the full article at <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal1810>

tion stage to germ layer specification. First is the self-organization of ESCs, which leads to polarization and lumenogenesis of ESC-derived embryonic compartment, followed by cavitation in the TSC-derived extraembryonic compartment. Second is the unification of embryonic and extraembryonic cavities into the equivalent of the embryo's proamniotic cavity. Third is the requirement for a dialogue between embryonic and extraembryonic compartments, involving Nodal signaling, that builds characteristic embryo architecture. Fourth is the patterning of the embryonic compartment, revealed by the localized expression of mesoderm markers at the boundary between embryonic and extraembryonic compartments that, as in the natural embryo, is preceded by and dependent upon Wnt signaling. Fifth is the specification of a small cluster of PGC-like cells at the embryonic and extraembryonic boundary in a bone morphogenetic protein (BMP) signaling-dependent manner. Remarkably, such events in in vitro stem cell embryogenesis occur with very similar spatial and temporal dynamics to those taking place in natural embryogenesis.

CONCLUSION: In this work, we demonstrate that establishing a close cross-talk between embryonic and extraembryonic stem cells in a 3D ECM scaffold is necessary and sufficient for the self-assembly of a structure that recapitulates many of the key spatial and temporal steps of early mammalian embryogenesis. This in vitro ETS-embryo models embryonic architecture and patterning more accurately than has been possible before using ESCs alone. They also provide a simplified platform to dissect the physical, cellular, and molecular mechanisms mediating the critical cross-talk between embryonic and extraembryonic cells during development, and hence are a powerful tool for the future study of mammalian embryogenesis. ■



In vitro stem cell-embryos model mouse embryo development from implantation to gastrulation. (Left) 3D rendered natural and ETS-embryos. Red, Oct4; cyan, Eomes. (Right) Parallel development of natural and ETS-embryos. Red, ESC/epiblast; blue, TSC/trophoblast/extraembryonic ectoderm cells; green, primitive endoderm/visceral endoderm cells; dark green, distal/anterior visceral endoderm (DVE/AVE); beige, mesoderm cells; pale green, primordial germ cells; yellow line, basement membrane /ECM. Scale bars represent 30 μ m.

The list of author affiliations is available in the full article online.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: mzg@mole.bio.cam.ac.uk
Cite this article as S. E. Harrison *et al.*, *Science* **356**, eaal1810 (2017). DOI: [10.1126/science.aal1810](https://doi.org/10.1126/science.aal1810)

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Sarah Ellys Harrison,^{1*} Berna Sozen,^{1,2*} Neophytos Christodoulou,¹ Christos Kyprianou,¹ Magdalena Zernicka-Goetz^{1†}

Mammalian embryogenesis requires intricate interactions between embryonic and extraembryonic tissues to orchestrate and coordinate morphogenesis with changes in developmental potential. Here, we combined mouse embryonic stem cells (ESCs) and extraembryonic trophoblast stem cells (TSCs) in a three-dimensional scaffold to generate structures whose morphogenesis is markedly similar to that of natural embryos. By using genetically modified stem cells and specific inhibitors, we show that embryogenesis of ESC- and TSC-derived embryos—ETS-embryos—depends on cross-talk involving Nodal signaling. When ETS-embryos develop, they spontaneously initiate expression of mesoderm and primordial germ cell markers asymmetrically on the embryonic and extraembryonic border, in response to Wnt and BMP signaling. Our study demonstrates the ability of distinct stem cell types to self-assemble in vitro to generate embryos whose morphogenesis, architecture, and constituent cell types resemble those of natural embryos.

Early mammalian development requires the formation of embryonic and extraembryonic tissues and their cooperative interactions. As a result of this partnership, the embryonic tissue, epiblast, will become patterned to generate cells of the future organism. Concomitantly, the extraembryonic tissues, the trophoblast and primitive endoderm, will form the placenta and the yolk sac. These embryonic and extraembryonic tissues become defined before the embryo implants into the uterus as a result of cellular heterogeneity, polarization, and position, culminating in a blastocyst structure with three distinct cell lineages (1).

As the embryo implants, the relatively simple architecture of the blastocyst becomes reorganized in a progressive sequence of spatial and temporal morphogenetic steps into the much more complex architecture of the so-called “egg cylinder” (Fig. 1A, top) (2, 3). This remodeling is triggered by dialog between embryonic and extraembryonic tissues that initiates integrin-mediated signaling, leading the embryonic epiblast cells to polarize, adopt a rosette-like configuration, and then undertake lumenogenesis (4). This architectural reorganization of the epiblast is followed by development of the trophoblast into extraembryonic ectoderm (ExE) that also forms a cavity. Finally, both embryonic and extraembryonic cavities unite to

form a single proamniotic cavity, and the embryo visibly breaks its symmetry to initiate mesoderm and primordial germ cell induction (Fig. 1A, top). This key symmetry-breaking event occurs at the boundary between embryonic and extraembryonic tissues and involves Nodal, Wnt, and bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathways (5–8).

As the embryo grows from the blastocyst into the elongated structure of the egg cylinder, the primitive endoderm develops into the visceral endoderm (VE), which becomes regionalized. The distal part of the VE (the distal VE, DVE) expresses inhibitors of the Nodal and Wnt signaling pathways and migrates anteriorly (anterior VE, AVE) to pattern the anterior epiblast (9–11). At the posterior, a BMP4 signal from the ExE induces the activity of Wnt and Nodal in the adjacent epiblast. Nodal feeds back positively on BMP, which in turn reinforces Wnt, in a self-sustaining interaction loop (12–14). This specifies posterior identity and therefore defines the location for primitive streak formation and mesoderm induction.

Preimplantation epiblast cells have been established as ESCs that can be maintained indefinitely in culture (15, 16). ESCs retain pluripotency and have the ability to be directed to develop into organoids that present an invaluable system to recapitulate many aspects of organ formation in vitro (17–22). Embryoid bodies or micropatterned colonies developed from ESCs are also a valuable model for development, as they can be induced to express genes associated with specification of embryonic lineages by using external stimuli (23–26). However, although such gene expression can be polarized, the structures formed do not follow the spatial-temporal events

of embryogenesis and ultimately do not acquire the characteristic architecture of a postimplantation embryo. We hypothesized that this is because in these systems, ESCs develop with a drastically different number and spatial organization of cells and, in addition, lack signals from the extraembryonic tissues that guide embryo development upon implantation. Here we test this hypothesis by taking advantage of our recent understanding of the steps involved in the embryonic-extraembryonic interactions during implantation and early postimplantation development (4) and trying to mimic them in stem cells developing in vitro.

Experimental strategy

Our strategy was to attempt to use embryonic and extraembryonic stem cells to replicate the spatial and temporal sequence of events of mouse embryogenesis in vitro (4). To achieve this, we used single ESCs and small clumps of TSCs (27) and developed a culture system that would enable their interaction within a three-dimensional (3D) scaffold of extracellular matrix (ECM) in a medium whose composition (see materials and methods) allows ESCs and TSCs to codevelop, which we created for this purpose (Fig. 1A, bottom). We hypothesized that a 3D scaffold of ECM in Matrigel would be able to substitute for the primitive endoderm by providing ECM essential for epiblast polarization and lumenogenesis. We found that in these culture conditions, ESCs and TSCs developed into an elongated cylindrical architecture typical of the postimplantation mouse embryo (Fig. 1, B and C, and fig. S1a). Careful examination of morphology, size, cell numbers, and expression of lineage markers revealed discrete ESC- and TSC-derived compartments within a single cylindrical structure with a central cavity that was markedly similar to that of postimplantation embryos developing either in vitro or in vivo (Fig. 1, B to G, and fig. S1, b and c). By determining the expression of a typical primitive endoderm marker, *Gata4*, we confirmed that the formation of these embryo-like structures did not involve the presence of primitive endoderm (Fig. 1H).

Development of these ESC- and TSC-derived structures was highly reproducible: In a typical 3D culture, 22% of all structures comprised both ESCs and TSCs; 61% were built only from ESCs and 17% only from TSCs (Fig. 1, I and J; $n = 400$). Of all structures comprising ESCs and TSCs, most (92.68%, $n = 88$) had the characteristic cylindrical architecture with single adjoining ESC and TSC compartments, whereas the remaining 7.32% had two ESC compartments occupying polar positions in relation to a single TSC compartment (Fig. 1K). These results indicate that ESCs and TSCs cultured in a 3D scaffold of ECM have the ability to self-assemble an embryo architecture, leading us to term these ESC- and TSC-derived embryos, “ETS-embryos.”

Proamniotic cavity formation in ETS-embryogenesis

The first critical morphogenetic event in postimplantation embryogenesis is pro-amniotic cavity

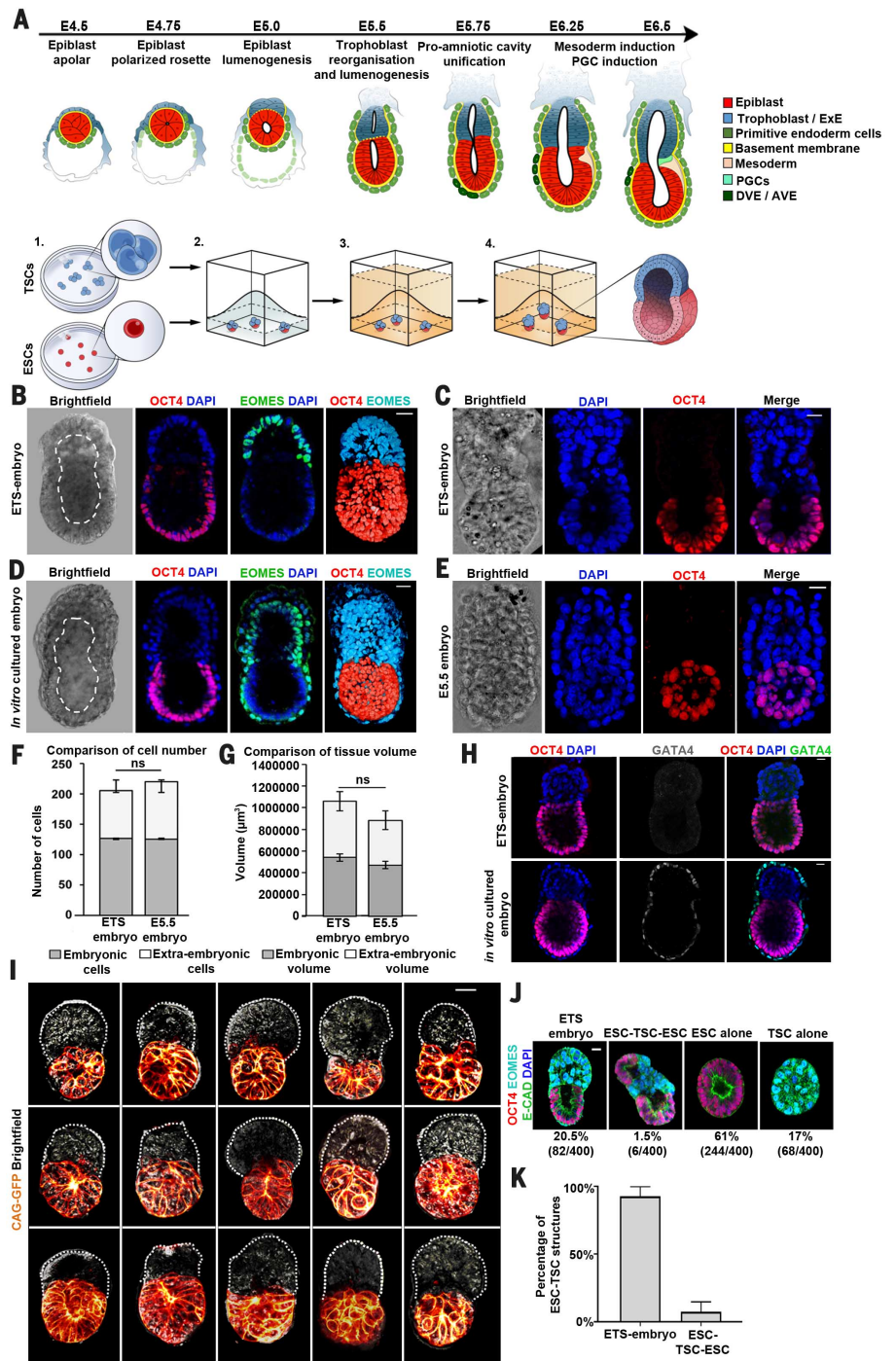
¹Mammalian Embryo and Stem Cell Group, University of Cambridge, Department of Physiology, Development and Neuroscience, Downing Street, Cambridge CB2 3DY, UK.

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, 07070, Turkey.

*These authors contributed equally to this work. †Corresponding author. Email: mzg@mole.bio.cam.ac.uk

Fig. 1. Self-assembly of ESCs and TSCs into an ETS-embryo.

(A) Top: Development of the mouse embryo from the preimplantation blastocyst to post-implantation egg cylinder and mesoderm specification. Red cells, epiblast; dark blue cells, trophoblast/extraembryonic ectoderm; green cells, primitive endoderm/visceral endoderm cells; dark green cells, distal/anterior visceral endoderm; beige cells, mesodermal cells; pale green cells, primordial germ cells; yellow line, basement membrane. Bottom: Scheme of protocol to generate ETS-embryos. ESCs and TSCs cultured in standard conditions (1). Single ESCs and small clumps of TSCs suspended in 3D ECM of Matrigel, plated in drops and allowed to solidify (2), before culturing in ETS-embryo medium established for this purpose [(3); materials and methods]. Embryo-like structures emerge within 96 hours (4). **(B)** ETS-embryo of size ~100 μm by 200 μm after 96 hours of culture stained to reveal Oct4 (red) and Eomes (green), embryonic and extraembryonic markers, respectively; DNA, blue. White dashed line highlights cavity. Bar, 30 μm; n = 20. Rightmost panel: 3D rendering of same ETS-embryo: red, Oct4; cyan, Eomes. **(C)** ETS-embryo: Oct4, red; DNA, blue. Bar, 20 μm; n = 20. **(D)** Embryo cultured in vitro for 48 hours from the blastocyst stage: Oct4, red; Eomes, green; DNA, blue. White line highlights cavity. Bar, 30 μm; n = 20. Rightmost panel: 3D rendering of same in vitro-cultured embryo: Oct4, red; Eomes, cyan. **(E)** Postimplantation embryo recovered at E5.5: Oct4, red; DNA, blue. Bar, 20 μm; n = 20. **(F)** The number of cells in ETS-embryos after 96 hours is similar to that of natural embryos (cultured for 48 hours from the late blastocyst stage; equivalent to E5.5 embryos) in embryonic and extraembryonic compartments (Student's *t* test, n = 20 per group, two separate experiments; not significant). Error bars, SEM. **(G)** Mean tissue volumes of embryonic and extraembryonic parts are similar for ETS-embryos after 96 hours and natural embryos cultured for 48 hours in vitro from the late blastocyst stage (equivalent to E5.5 embryos). Student's *t* test, n = 20 per group, two separate experiments; not significant. Error bars, SEM. The volume occupied by the visceral endoderm was excluded from quantification in natural embryos. See materials and methods for calculation of the volume. **(H)** Upper panels: ETS-embryo stained to reveal Oct4 (red), DNA (blue), and Gata4 (gray or green). Bar, 20 μm. n = 10. Lower panels: In vitro-cultured embryo for 48 hours from the late blastocyst stage: Oct4, red; DNA, blue; Gata4, gray or green. n = 30. Bar, 20 μm. **(I)** Examples of live ETS-embryos generated from one single typical experiment using CAG-GFP ESCs (60) to mark embryonic compartment and wild-type TSCs after 96 hours. Orange, CAG-GFP; black, brightfield. Brightfield was false-colored with the "edges" "look-up-table" function in Fiji software. White dotted line marks the outside of the TSC compartment for clarity. Bar, 20 μm. **(J)** Frequency of ETS-embryos, "twin" (ESC-TSC-ESC) structures, and individual TSC or ESC structures in a representative experiment. Red, Oct4; green, E-cadherin; cyan, Eomes; blue, DNA. Bar, 20 μm. A total of 100 structures counted per experiment; four separate experiments. **(K)** Proportion of ESC- and TSC-structures that form ETS-embryos versus "twin structures." n = 88; four separate experiments. Error bars, SEM.



formation. We therefore wished to determine whether a similar morphogenetic event could take place in ETS-embryos. Recently, it has been discovered that during mammalian embryogenesis, the embryonic cavity forms not through cell death, as previously thought, but through apical

cellular constriction followed by lumenogenesis (4, 28). To gain insight into the cavitation of ETS-embryos, we examined the localization of a cell adhesion marker (E-cadherin) at sequential time points in development (Fig. 2, A to C, and fig. S2). After 72 hours of plating, only a single cavity

could be detected in ETS-embryos, and it was present in the ESC-compartment (Fig. 2A). By 84 hours, one or more small additional cavities developed within the TSC-compartment (Fig. 2B and fig.S2). Finally, by 96 hours, the cavities in ESC and TSC compartments united into a single

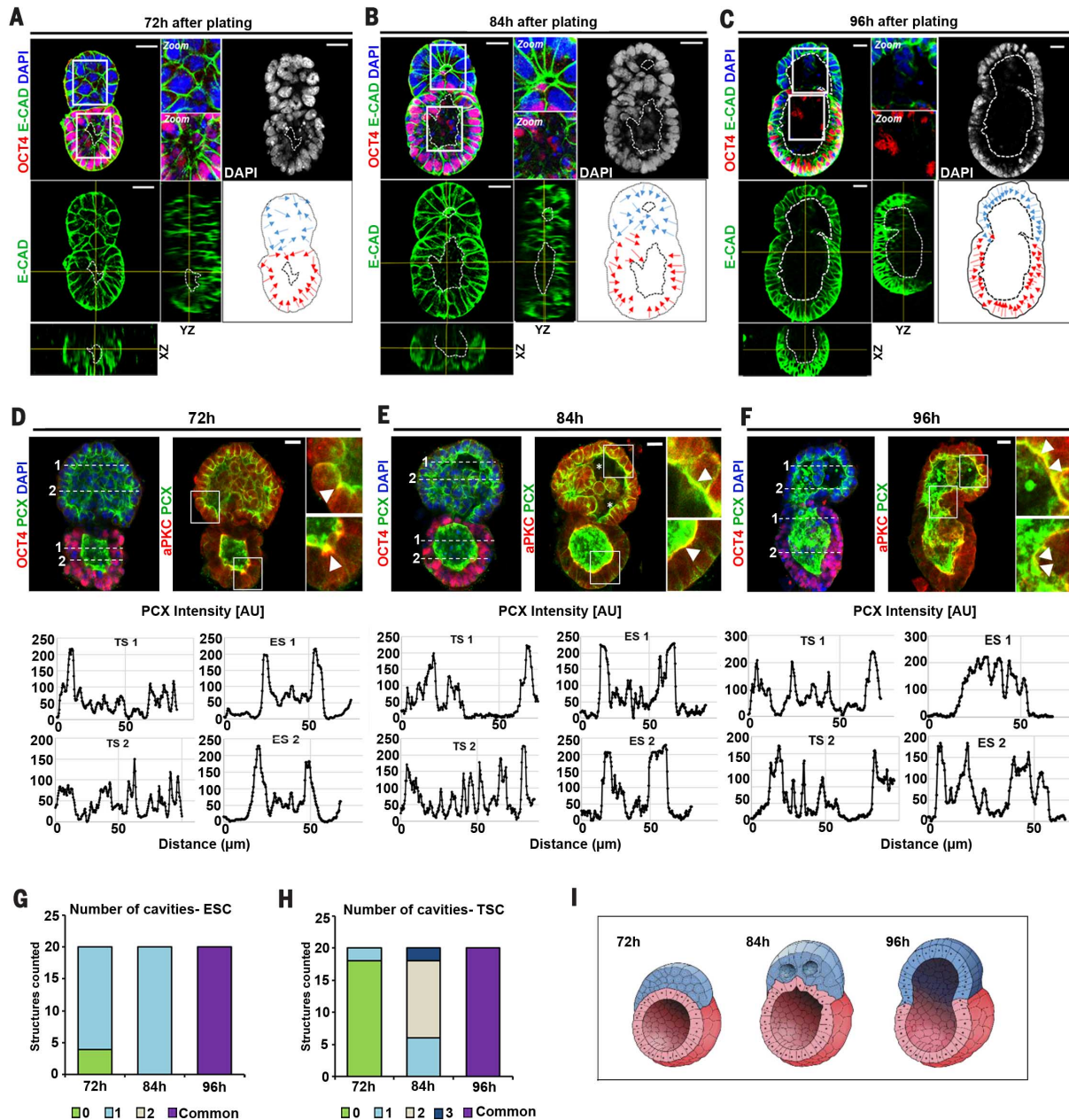


Fig. 2. Morphogenetic steps leading to cavitation of ETS-embryos are similar to those of natural embryos. (A to C) ETS-embryos after 72, 84, and 96 hours showing progression of cavitation. Oct4, red; E-cadherin, green; DNA, blue or gray. Orthogonal views are shown for E-cadherin staining at each time point. Zoomed fields highlight cavitated areas at each time point; white or black dotted lines highlight cavities. Lower right panel for each time point shows orientation of nuclei in ESC compartments (red) and TSC compartments (blue)—nuclei become aligned to cavities; $n = 20$ ETS-embryos per time point, at least two separate experiments per time point. Bar, 20 μm . (D to F) ETS-embryos at three successive time points during cavitation and intensity scans of PCX along the indicated numerically labeled dashed white lines taken

at middle z plane. PCX accumulates on the apical sides of cells (marked by aPKC) facing a lumen, so the presence of a cavity is indicated by two strong peaks in the intensity profile. y axis: PCX fluorescence intensity. Staining indicates Oct4/aPKC (red), PCX (green), and DNA (blue). Bar, 20 μm . $n = 30$, three separate experiments. Zoomed images indicate colocalization of aPKC and PCX (white arrowheads). Asterisks indicate small cavities in the TSC compartment at 84 hours. (G and H) Quantification of number of cavities in respective ESC- and TSC-compartments of ETS-embryos at 72, 84, and 96 hours. $n = 20$ ETS-embryos analyzed per time point. (I) Schematics depicting “ETS-embryo” morphology during cavitation process at 72, 84, and 96 hours (red, embryonic compartment; blue, extraembryonic compartment).

large cavity (Fig. 2C and fig. S2). These observations demonstrate that a cavity first forms in the ESC-derived embryonic compartment, ahead of cavitation in the TSC-derived extraembryonic compartment, and they finally become united into a single cavity spanning the whole cylindrical

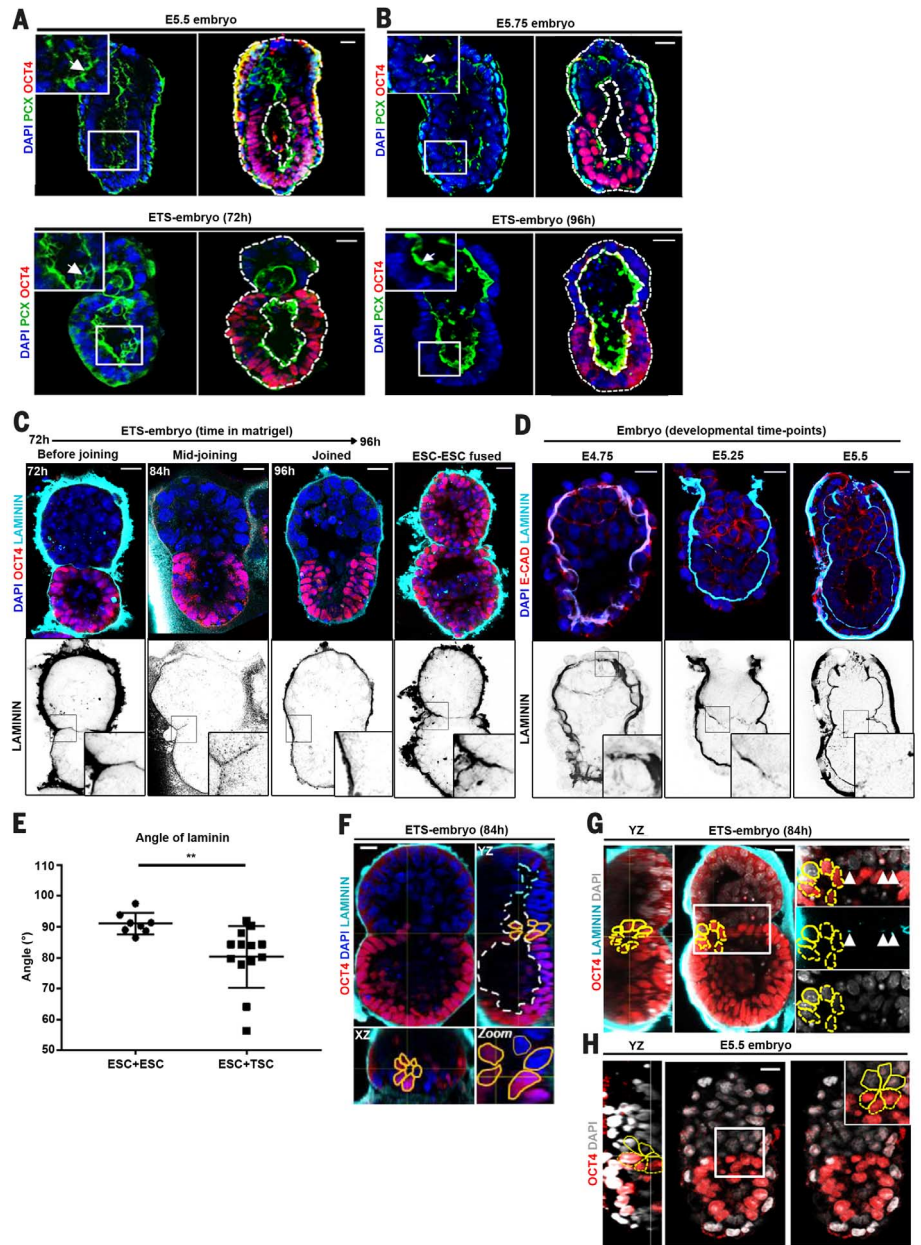
structure by 96 hours after stem cell plating (Fig. 2C).

To support these observations, we also examined the distribution of the transmembrane protein Podocalyxin (PCX) together with a marker of apical polarity, atypical protein kinase C (aPKC)

(Fig. 2, D to F), in the ESC and TSC compartments of ETS-embryos as their development progressed. PCX is a negatively charged sialomucin that accumulates on the apical sides of epiblast cells during proamniotic cavity formation (4). In agreement with these observations in embryos, we

Fig. 3. Morphogenetic rearrangement during cavity unification between embryonic and extraembryonic compartments. (A and B) Embryos at E5.5 and E5.75 (upper panels) and ETS-embryos at 72 and 96 hours (lower panels) stained to reveal Oct4 (red), PCX (green), and DNA (blue). Zoomed insets and white arrows highlight cavities; white dashed lines trace outlines of embryo and cavity in respective embryonic or ESC compartments or the common cavity at the later stage. Bar, 20 μm .

(C). ETS-embryos during cavitation showing (upper panel) Oct4 (red), DNA (blue), and laminin (cyan). Lower panel shows the laminin staining inverted for better contrast. Black boxes indicate the region of the zoomed inset. Bar, 20 μm ; $n = 20$, two separate experiments. Right-most panel shows two fused ESC-structures after 84 hours. Inset shows residual laminin that is not broken down between the fusing compartments. $n = 8$, two separate experiments. **(D)** Peri-implantation embryos showing breakdown of basement membrane between embryonic and extraembryonic compartments; upper panel: E-cadherin (red), DNA (blue), laminin (cyan). Lower panel shows the laminin staining inverted for better contrast. Black boxes indicate the region of the zoomed inset. Bar, 20 μm . $n = 10$ per stage, two separate experiments. **(E)** Laminin is not displaced from the horizontal in ESC-ESC structures ($n = 8$, mean angular displacement $\Theta = 91.05^\circ$; pooled from two separate experiments) compared with ETS-embryos ($n = 13$, mean angular displacement $\Theta = 80.3^\circ$; pooled from two separate experiments). Student's *t* test, $P < 0.01$, error bars = SEM. For a description of measurement of angular displacement, see materials and methods. **(F)** ETS-embryo during cavitation after 84 hours of culture stained to reveal Oct4 (red), laminin (cyan), DNA (blue). XZ and YZ orthogonal views also shown. Yellow line outlines cells in chimeric arrangements; white dashed lines trace outline of the cavity. Bar, 20 μm . $n = 15$, two separate experiments. **(G)** Another example of a ETS-embryo during cavitation at 84 hours. Oct4, red; laminin, cyan; DNA, gray. YZ orthogonal view also shown. White arrowheads indicate residual laminin. Yellow lines trace chimeric arrangements of embryonic (dotted) and extraembryonic (solid) cells at boundary; $n = 15$, two separate experiments. Bar, 20 μm . **(H)** E5.5 embryo. Oct4, red; DNA, gray. YZ orthogonal view also shown. Inset highlights chimeric cell arrangement at the boundary (yellow dotted line, embryonic cells; yellow solid line, extraembryonic cells), $n = 10$. Bar, 20 μm .



detected the accumulation of PCX along the apical sides of the cells in the ESC compartment when a single lumen was present at 72 hours (Fig. 2, D and G). By contrast, no such accumulation around a cavity was evident in the TSC compartment at this stage (Fig. 2, D and G). By 84 hours, PCX was also seen to accumulate on the apical sides of cells in the TSC compartment as multiple individual cavities emerged in this compartment (Fig. 2, E and H). After 96 hours of development, these ESC and TSC cavities had unified and PCX lined a central, common cavity and was concentrated at the apical sides of cells in both compartments (Fig. 2I, F to I). This sequence of events is similar to proamniotic cavity

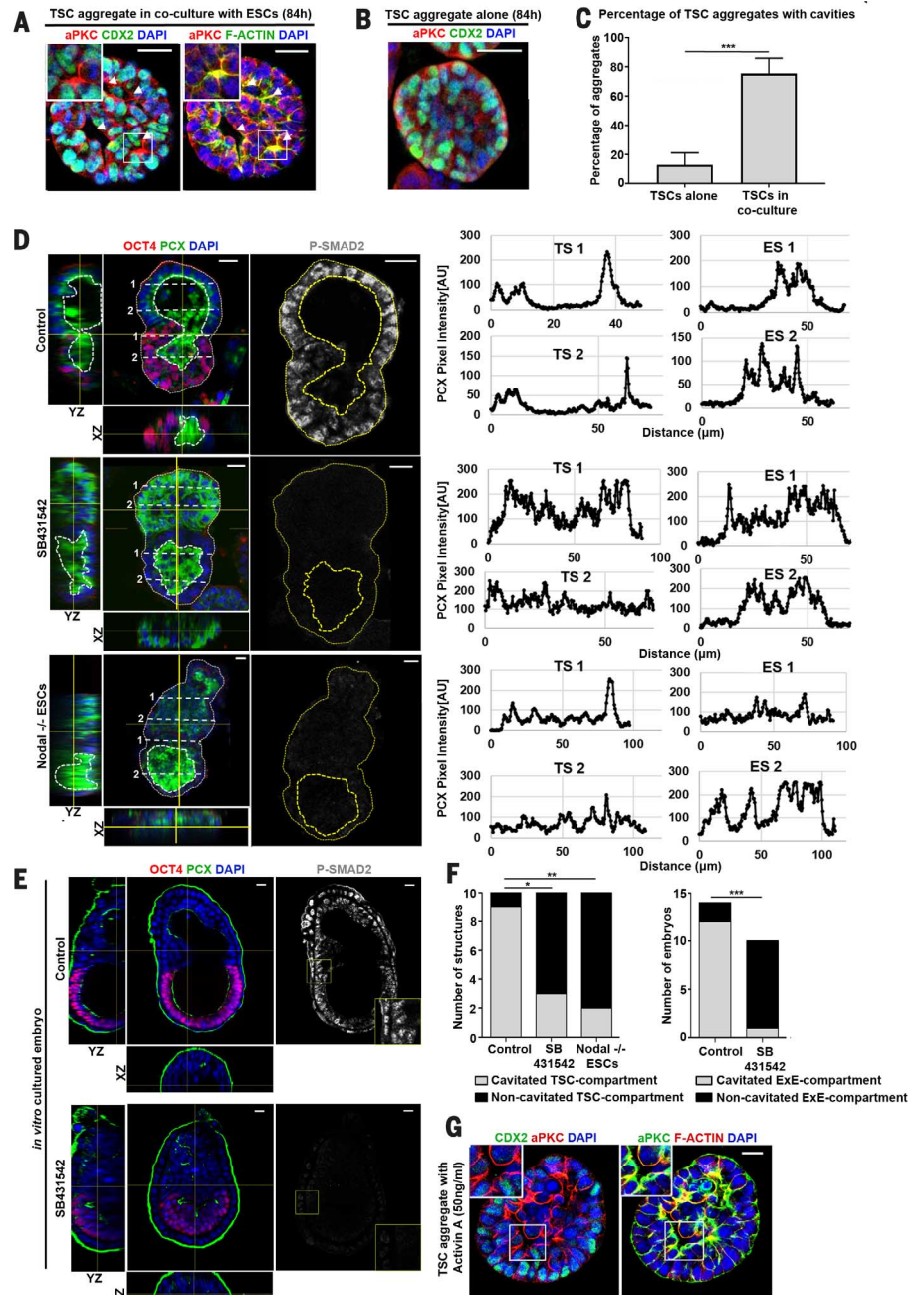
formation during natural embryogenesis (4, 28). We observed a mean of two dying cells per ESC and TSC compartment, which is similar to the incidence of cell death that we could detect in natural embryos (fig. S3, a to e). The site of cell death in ETS-embryos had no relationship to the ESC or TSC cavitation or ESC-TSC border, suggesting that apoptosis is not a likely driver behind cavity formation and unification, similar to what occurs in natural embryogenesis (fig. S3, a to e).

How the embryonic and extraembryonic cavities unite during embryo development is currently unknown (4). Encouraged by our finding of a similar distribution of PCX during natural and ETS-embryogenesis at the time of cavity

formation and unification (Fig. 3, A and B), we sought to use the ETS-embryo model to gain insight into how a cavity might develop at the embryonic-extraembryonic interface. Before a continuous cavity formed, the shapes of TSCs at the ESC-TSC border differed noticeably from the columnar morphology of nonborder cells (fig. S4, a and b). Before cavities merged together, a basement membrane (marked by laminin staining) between the compartments was detectable (Fig. 3C, 72 hours, left). This distribution of laminin was similar to that of the basement membrane present between embryonic and extraembryonic compartments of the embryonic day 4.75 (E4.75) embryo (Fig. 3D, left and inset). As ETS-embryos

Fig. 4. Cavitation of the TSC compartment requires Nodal/Activin signaling.

(A) TSC aggregate at 84 hours in coculture but not in contact with ESCs. Cdx2, green; DNA, blue; aPKC, red (left panel) and F-actin, green; DNA, blue; aPKC, red (right panel). White arrowheads indicate cavities. Zoomed inset displays a small cavity opening at a point of aPKC and F-actin enrichment. Bar, 30 μm . $n = 20$, two separate experiments. **(B)** Sole TSC aggregate in 3D Matrigel at 84 hours. Cdx2, green; DNA, blue; aPKC, red. No cavities could be detected and aPKC is not polarized. $n = 20$ structures analyzed that all displayed this morphology, two separate experiments. Bar, 30 μm . **(C)** Quantitation of cavitation in TSC-aggregates cultured either alone or in the presence of ESCs for 84 hours. $n = 10$ structures counted per condition per experiment; two separate experiments. Student's t test, $P < 0.001$. **(D)** ETS-embryos built from either control or *Nodal*^{-/-} ESCs or cultured in 10 μM SB431542 for 96 hours: Oct4, red; PCX, green; DNA, blue; P-SMAD2, gray. Bar, 20 μm . White and yellow dashed lines highlight outline of ETS-embryo and cavity. XZ and YZ orthogonal views highlight cavity where present. Fluorescence traces are of PCX intensity along region indicated by the numbered dotted lines in the ESC and TSC compartments. $n = 10$. **(E)** Embryos recovered at E5.0 and cultured *in vitro* for 36 hours in control (dimethyl sulfoxide; $n = 14$, three separate experiments) or in the presence of SB431542 (10 μM ; $n = 10$, three separate experiments). Oct4, red; PCX, green; DNA, blue; P-SMAD2, gray. Inset highlights P-SMAD2 staining in the extraembryonic ectoderm in each case. Bar, 50 μm . **(F)** Left panel: Quantification showing the number of ETS-embryos with cavitated TSC compartments after 96 hours in culture in control, SB431542, and *Nodal*^{-/-} ESC conditions. $n = 10$ per group, two separate experiments. Count data are presented as a bar chart, and a contingency table was used to perform the statistical test. Fisher's exact test, $P < 0.05$. Right panel: Quantification showing the number of embryos with cavitated extraembryonic compartments when recovered at E5.0 and cultured for 36 hours in control ($n = 14$) or SB431542 ($n = 10$) conditions, two separate experiments. Count data are presented as a bar chart, and a contingency table was used to perform the statistical test. Fisher's exact test, $P < 0.001$. **(G)** TSC aggregate cultured in Activin A (50 ng/ml) for 72 hours. (Left panel) Cdx2, green; DNA, blue; aPKC, red. (Right panel) F-actin, green; DNA, blue; aPKC, red. Zoomed inset displays small cavity opening where aPKC and F-actin are enriched. Bar, 50 μm . $n = 20$, three separate experiments.



underwent cavitation, the laminin boundary became broken (Fig. 3C, 84 hours; Fig. 3E), which mirrored the breakdown of the basement membrane during egg cylinder morphogenesis *in vivo* (Fig. 3D, middle). In both the ETS-embryo and the natural embryo, full expansion of the cavity across embryonic and extraembryonic compartments led to the complete disappearance of the basement membrane between compartments (Fig. 3C, 96 hours, and Fig. 3D, right). During ETS-embryogenesis, the laminin boundary was displaced toward the TSC compartment, whereas when two structures consisted of only ESCs fused

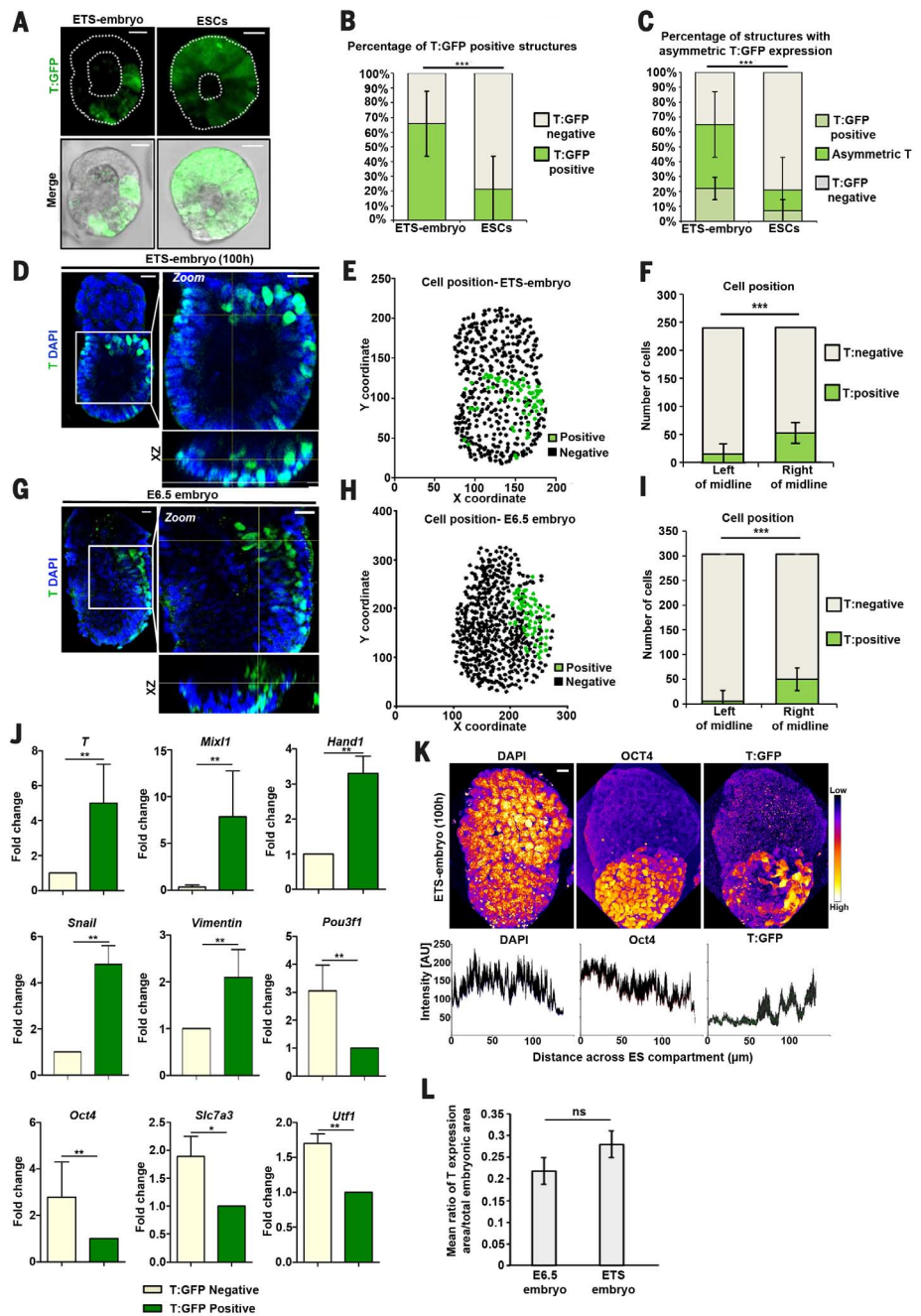
together, laminin was not displaced in any particular direction, suggesting that laminin displacement toward the extraembryonic compartment is a characteristic of the ESC-TSC junction (Fig. 3C, far right, and Fig. 3E). Concomitant with laminin displacement, we also noted formation of rosette-like chimeric cell arrangements comprising both ESCs and TSCs during cavitation of ETS-embryos (Fig. 3, F and G). We found that epiblast and ExE cells adopt very similar cell arrangements at the boundary between compartments in natural embryos (Fig. 3H), which might be involved in the unification of cavities during proamniotic

cavity formation. These results reveal the sequence of events leading to embryonic and extraembryonic cavity unification during ETS-embryogenesis and suggest that similar cell rearrangements occur in natural embryogenesis, to facilitate morphogenesis, as also proposed in other models of epithelialization and branching (29).

Role of Nodal signaling during ETS-embryogenesis

Although TSCs developing together with ESCs cavitate, the great majority of TSCs developing on their own do not cavitate within the same

Fig. 5. ETS-embryos develop to express mesoderm markers. (A) *T/Brachyury:GFP*-expressing ESCs (green) growing alone (right) or as part of a ETS-embryo (left) in Matrigel. Bar, 20 μ m; white dotted lines outline each structure and its cavity. $n = 100$ “ETS-embryos,” four experiments; $n = 65$ ESC-alone structures, four experiments. (B) Proportion of ETS-embryos expressing *T:GFP* at 96 hours is significantly higher in comparison to ESCs-alone structures. Fisher’s exact test, $P < 0.001$, $n = 108$: 64 ETS-embryos and 44 ESC-alone structures counted in two separate experiments. Error bars, SEM. (C) Proportion of *T/Brachyury* expressing ETS-embryos or structures comprising only ESCs with asymmetric domain of *T/Brachyury* expression with respect to the long axis (equivalent to the midline) of the structure (materials and methods). Student’s *t* test, $P < 0.001$, $n = 100$ ETS-embryos and $n = 100$ structures comprising only ESCs per experiment. Mean of four separate experiments; error bars, SEM. (D to F) Quantitative assessment of endogenous *T* asymmetry in a ETS-embryo at 100 hours (D) revealing *T* (green) and DNA (blue). Zoomed inset highlights *T/Brachyury*-expressing region; XZ panel highlights asymmetry in *T/Brachyury* to one side of structure. Bar, 20 μ m. Projection of all cell coordinates in 2D (E): black points, T-negative cells; green points, T-positive cells. Proportion of T-positive versus T-negative cells around mid-line, equivalent to the long axis of each structure [(F); materials and methods]. Fisher’s exact test, $P < 0.001$. Error bars, SEM. (G to I) Quantitative assessment of *T* asymmetry in E6.5 natural embryo (G) revealing *T* (green) and DNA (blue). Zoomed inset highlights *T/Brachyury*-expressing region; XZ panel, asymmetry in *T/Brachyury*. Bar, 20 μ m. Projection of cell coordinates (H) as in (E). Proportion of T-positive versus T-negative cells around mid-line, long axis of each structure (I). Fisher’s exact test, $P < 0.001$. Error bars, SEM. (J) RT-qPCR analysis of the expression of mesodermal markers (*T*, *Mixl1*, and *Hand1*), epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers (*Snai1* and *Vimentin*), and markers known to be increased in the region opposite to the mesoderm region of the E6.5 embryo (*Pou3f1*, *Oct4*, *Slc7a3*, and *Utf1*) in T:GFP-positive cells of an ETS-embryo (collected after 100 hours in culture) compared with T:GFP-negative cells from the ESC compartment of the same structure. Mesodermal and EMT marker expression was significantly increased in T:GFP-positive cells, whereas cell markers known to be elevated in the region opposite the mesoderm region were significantly decreased. Student’s *t* test, $P < 0.05$. $n = 4$ biological replicates. Error bars, SEM. For *Mixl1*, gene expression in some samples of T:GFP-negative cells were undetermined, and so were accepted as zero. (K) Top: An ETS-embryo after 100 hours immunostained to reveal DNA (left), Oct4 (middle), and T:GFP (right). Images are maximum projections and are false-colored with the “fire” “look-up table” function in Fiji software to highlight intensity gradients. Bar, 20 μ m. Bottom: mean intensity profiles for immunofluorescence stainings plotted as the mean \pm SEM for eight different cross sections of the embryonic compartment of the ETS-embryo shown. (L) Comparable size of *T* expression in ETS-embryos and E6.5 embryos. $n = 10$ per group, mean ratio of areas of mesodermal domain/total epiblast in E6.5 embryo. Student’s *t* test, not significant; error bars, SEM. For a description of how the ratio was measured and calculated, see materials and methods.



frame of time (Fig. 4, A to C), suggesting that the ESC compartment might signal to promote development of the TSC compartment. One candidate for such signaling would be Nodal/Activin, which is known to be secreted by ESCs (30) and to be essential for early postimplantation development (5, 31, 32). Moreover, Nodal/

Activin signaling is required for TSC renewal in culture, and in conventional culture conditions is provided by mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder cells or exogenously in the medium (33–35). Because our culture conditions contain neither of these components, we hypothesized that the ESC compartment might be

providing the Nodal/Activin signal required for development of TSCs into the extraembryonic compartment. Because the earliest role of Nodal signaling is difficult to probe in Nodal knockout embryos owing to the presence of Nodal protein in the reproductive tract (36), we used ETS-embryogenesis to gain insight into the role of

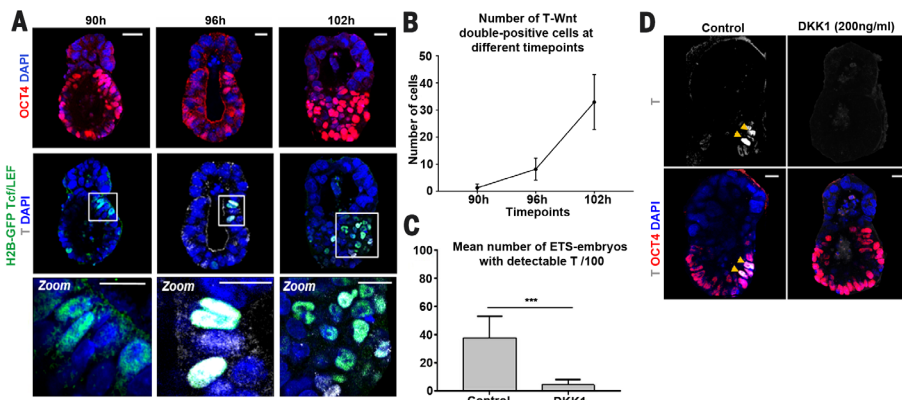


Fig. 6. ETS-embryos express mesoderm markers in response to Wnt signaling. (A) ETS-embryos expressing the Wnt reporter H2B-GFP:Tcf/LEF and *T/Brachyury* at 90, 96, and 102 hours of culture. Oct4, red; DNA, blue; H2B-GFP:Tcf/LEF, green; *T/Brachyury*, white. Bar, 20 μ m. Inset (bar, 10 μ m) highlights cells coexpressing Wnt reporter and *T/Brachyury*. $n = 15$ per time point. (B) Quantification of mean number of Wnt/*Brachyury* coexpressing cells detected in the ESC compartment of ETS-embryos with time. The number of cells is significantly different in each group (ANOVA test, $P < 0.01$). $n = 15$ per time point, three separate experiments. Error bars, SEM. (C) Proportion of ETS-embryos expressing *T/Brachyury* is reduced in presence of DKK1 (200 ng/ml) compared to controls. Student's t test, $P < 0.001$, $n = 400$, four separate experiments. (D) Representative ETS-embryos cultured in DKK1 (200 ng/ml) and control conditions for 96 hours. Oct4, red; DNA, blue; *T/Brachyury*, white. Yellow arrows indicate *T/Brachyury*-positive cells in control conditions, undetectable in DKK1 conditions. Bar, 20 μ m.

Nodal/Activin in the process of building the embryo-like structure. We generated ETS-embryos in the presence of the Activin/TGF- β (transforming growth factor- β) receptor inhibitor, SB431542 (37), which was added to the culture 48 hours after cell plating (Fig. 4D, middle). We verified the inhibition of the Nodal/Activin pathway by assessing phosphorylation of SMAD2 (Fig. 4D, middle), and analyzed PCX staining intensity profiles in different compartments of ETS-embryos to verify cavitation. Although a significant majority of control ETS-embryos developed a cavity in the TSC compartment, in the presence of 10 μ M SB431542, the TSC compartment failed to cavitate in a significant majority of ETS-embryos (90% versus 30%, $P < 0.01$, Fisher's exact test; $n = 10$ in both groups, Fig. 4, D and F, left), whereas cavitation within the ESC compartment was unaffected, although we noted a reduction in Oct4 expression (Fig. 4D, middle). To further dissect the role of Nodal/Activin signaling in the development of the TSC compartment, we generated ETS-embryos using tamoxifen inducible-knockout Nodal ESCs (38). Similar to the effect of SB431542 treatment, we found that the TSC compartment failed to cavitate in the majority (80%, $P < 0.05$, Fisher's exact test; $n = 10$) of Nodal^{-/-} ESC ETS-embryos (Fig. 4D, bottom, and Fig. 4F, left). Because these results indicated a role of the embryonic compartment and Nodal/Activin signaling in the development of the extraembryonic compartment, we wished to test whether this might also be so in natural embryos. We recovered embryos just before cavitation in the ExE, at E5.0, and cultured them for 36 hours in the presence of 10 μ M SB431542 (Fig. 4E bottom). We found that as with ETS-embryos, the ExE in the majority (90%, $P < 0.05$, Fisher's exact test; $n = 10$) of

SB431542-treated embryos failed to cavitate, whereas the majority of control embryos cavitated (85%, $P < 0.05$, Fisher's exact test; $n = 14$) (Fig. 4E and 4F, right). Cavitation within the embryonic compartment was unaffected, although there was a reduction in Oct4 expression (Fig. 4E), similar to what we observed in ETS-embryos (Fig. 4D). In agreement with these data, addition of exogenous Activin to TSCs cultured without ESCs allowed cavitation (Fig. 4G; 70%, $P < 0.001$, Fisher's exact test; $n = 20$). Together, these experiments suggest a role of the embryonic compartment, and specifically Nodal/Activin signaling, in supporting the development of the extraembryonic compartment in ETS- and natural embryos developing through early postimplantation stages.

Generation of regionalized mesoderm during ETS-embryogenesis

Once the proamniotic cavity has formed, the next major developmental step is the breaking of the embryo's symmetry to specify the site of germ layer formation. In natural embryogenesis, this is known to involve cooperation between the trophectoderm-derived ExE, which signals development of posterior structures, and the primitive endoderm-derived DVE and AVE, which repress posterior signals (2). To determine whether ETS-embryos, which lack DVE and AVE, could initiate an asymmetric expression of germ layer markers, we examined whether they can progress in their development to express *T/Brachyury*, a mesoderm marker (39, 40). In these experiments, we used ESCs that express a *T:GFP* reporter to monitor *T/Brachyury* expression (41). We found that from 96 hours of development, the ETS-embryos expressed *T:GFP*, in a domain that was confined to one side of the ESC compartment extending

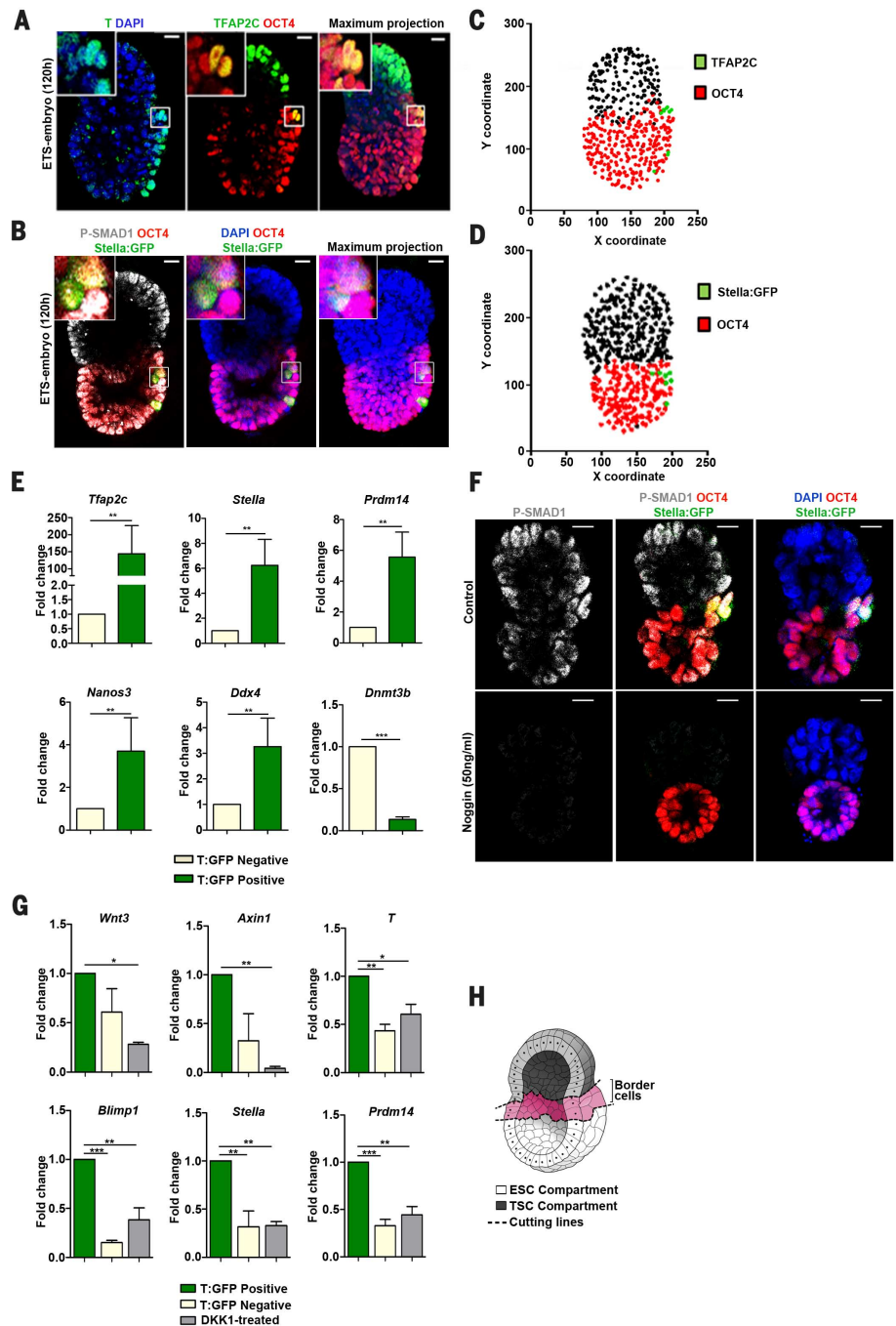
from the boundary with the TSC compartment (Fig. 5A). To address whether this induction of *T:GFP* expression in the ESC compartment was promoted by the neighboring TSC compartment, we also generated structures comprising ESCs only and let them develop under the same conditions and for the same period of time. A significantly higher proportion of ETS-embryos expressed *T:GFP* than the structures composed of only ESCs (Fig. 5, A and B). We also observed that a significantly higher proportion of ESCs developing together with TSCs during ETS-embryogenesis expressed *T:GFP* asymmetrically in comparison to structures composed of only ESCs (Fig. 5C). To quantitatively assess the asymmetry of *T* expression in relation to the axes of the whole structure, we plotted the coordinates of every single cell expressing *T* upon a projection of all cells in the structure and used Fisher's exact test to determine whether a cell's position was related to its propensity to express *T* (Fig. 5, D to F). As a proof-of-principle, we performed similar analyses on E6.5 embryos recovered from the mother (Fig. 5, G to I). Such measurements in both ETS- and natural embryos revealed highly regionalized induction of *T* expression. To confirm the identity of *T*-expressing cells as mesoderm lineage, we analyzed the expression level of another two mesodermal markers, *Mixl1* and *Hand1*. We found significantly increased expression of transcripts of both of these markers, as well as *T*, in *T:GFP*-positive cells when compared to *T:GFP*-negative ESCs at the opposite side of the ETS-embryo (Fig. 5J, top row). These *T:GFP*-positive cells also expressed elevated levels of the transcription factor *Snail* and the intermediate filament protein *Vimentin*, which are both expressed in mesenchymal cells, suggesting that cells in the mesodermal region were undergoing cellular changes comparable to those of cells initiating mesoderm formation in the E6.5 embryo (Fig. 5J, middle).

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of cells in the ESC compartment opposite the mesodermal region revealed that they expressed markers known to be expressed in the region opposite mesoderm specification in the E6.5 embryo (Fig. 5J, bottom) (42, 43). We also observed an opposing gradient of expression of Oct4 and *T:GFP* across the embryonic compartment (Fig. 5K), as is known to occur from anterior to posterior in the embryo (44). Additionally, the mesodermal region that became specified in ETS-embryos occupied a similar proportion of the ESC-derived embryonic compartment when compared with natural embryos of a comparable stage (Fig. 5L). These results indicate that the TSC compartment can induce regionalized expression of mesoderm markers in a manner mimicking that of the ExE in the embryo.

In normal embryogenesis, Wnt3 expression precedes the induction of mesoderm (6). To test whether Wnt signaling might also be required to initiate expression of mesoderm markers in the ETS-embryogenesis, we generated ETS-embryos using H2B-GFP:Tcf/LEF reporter ESCs (45) and monitored Wnt signaling activity. After 90 hours,

Fig. 7. ETS-embryos express primordial germ cell (PGC) markers in response to BMP signaling.

(A) ETS-embryo at 120 hours showing asymmetric expression of mesoderm and PGCs markers. Oct4, red; T/Brachyury, green; Tfap2c, green; and DNA, blue. Insets highlight the Oct4-Tfap2c double-positive cells, which occupy the boundary in the T/Brachyury-positive region. Bar, 20 μ m. $n = 13$, two separate experiments. Maximum projection shows merge of Tfap2c-Oct4-DAPI. (B) ETS-embryo at 120 hours expressing Stella:GFP (green) concomitantly with p-SMAD1 (gray). Oct4, red; DNA, blue. Bar, 20 μ m. $n = 15$, three separate experiments. Insets highlight Stella:GFP-positive cells in ESC compartment. Maximum projection shows merge of Stella:GFP-Oct4-DAPI. (C) Projected cell coordinates for the same ETS-embryo as in (A): black points, Oct4- and Tfap2c-negative cells; red points, Oct4-positive, Tfap2c-negative cells; green points, Oct4 and Tfap2c double-positive cells. (D) Projected cell coordinates for the same ETS-embryo as in (B). Black points, Stella:GFP- and Oct4-negative cells; red points, Oct4-positive and Stella:GFP-negative cells; green points, Oct4- and Stella:GFP-positive cells. (E) RT-qPCR analysis of the expression of PGC markers in ETS-embryo. *Tfap2c*, *Stella*, *Prdm14*, *Nanos3*, *Ddx4*, and *Dnmt3b* in T:GFP-positive and T:GFP-negative cells from the same ETS-embryos collected after 120 hours in culture. Expression of PGC markers is significantly increased in T:GFP-positive cells, Student's *t* test, $P < 0.05$. $n = 5$ biological replicates. Error bars, SEM. (F) ETS-embryos at 96 hours cultured in control conditions or with BMP antagonist Noggin (50 ng/ml). Oct4, red; DNA, blue; P-SMAD1, gray; Stella:GFP, green. Bar, 20 μ m. $n = 15$, two separate experiments. (G) RT-qPCR analysis of the expression of PGC markers in "border cells" collected from ETS-embryos in the presence of DKK1 (200 ng/ml) versus T:GFP-positive or -negative cells collected from ETS-embryos in control conditions (collected after 120 hours in culture). Expression of PGC markers (*Blimp1*, *Stella*, and *Prdm14*) is significantly increased in T:GFP-positive cells in control conditions, but this effect is abrogated when DKK1 is introduced into culture conditions. ANOVA followed by Tukey test. $P < 0.05$. $n = 4$ biological replicates. Error bars, SEM. We confirmed inhibition of the Wnt pathway by DKK1 by analysis of the expression of *Axin1*, *Wnt3*, and *T* in all samples. (H) Schematic representation of a ETS-embryo (ESC compartment in white and TSC compartment in gray) to illustrate where "border cells" were dissected from in DKK1-treated samples for RT-qPCR analysis.



localized expression of H2B-GFP:Tcf/LEF could be detected at the ESC-TSC boundary, but *T/Brachyury* was not expressed at that time (Fig. 6A, left). However, when we cultured ETS-embryos for an additional 6 hours, expression of H2B-GFP:Tcf/LEF colocalized with expression of *T/Brachyury* (Fig. 6A, center). This domain of *T/Brachyury* and H2B-GFP:Tcf/LEF-expressing cells increased in number and size over the next 6 hours (Fig. 6A, right, and B), indicating that canonical Wnt signaling precedes mesodermal specification. To determine whether Wnt signaling is also essential for mesodermal speci-

fication, we generated ETS-embryos and then let them develop in the presence of the canonical Wnt antagonist Dickkopf-related protein-1 (DKK1) (46), which was added after 48 hours of culture. In contrast to controls, the proportion of ETS-embryos specifying mesoderm was significantly reduced after 96 hours (38% of controls expressed T, whereas only 4% of structures treated with DKK1 did so, Student's *t* test, $P < 0.001$, $n = 100$; Fig. 6, C and D). These results indicate that Wnt signaling is crucial to induce the expression of mesoderm markers during ETS-embryogenesis, as is the case in natural embryogenesis.

Specification of primordial germ cell-like cells in ETS-embryogenesis

The next major step in embryogenesis is the specification of primordial germ cells (PGCs). In vivo, PGCs are specified at the boundary between embryonic and extraembryonic compartments, at the proximal end of the mesodermal domain (47). To test whether ETS-embryogenesis can lead to PGC-like cell specification, we generated ETS-embryos and let them develop beyond mesoderm specification. We then examined expression of several markers, including *Stella*, *Prdm14*, *Tfap2c* (*AP2 γ*), *Nanos3*, *Ddx4*, and *Dnmt3b*

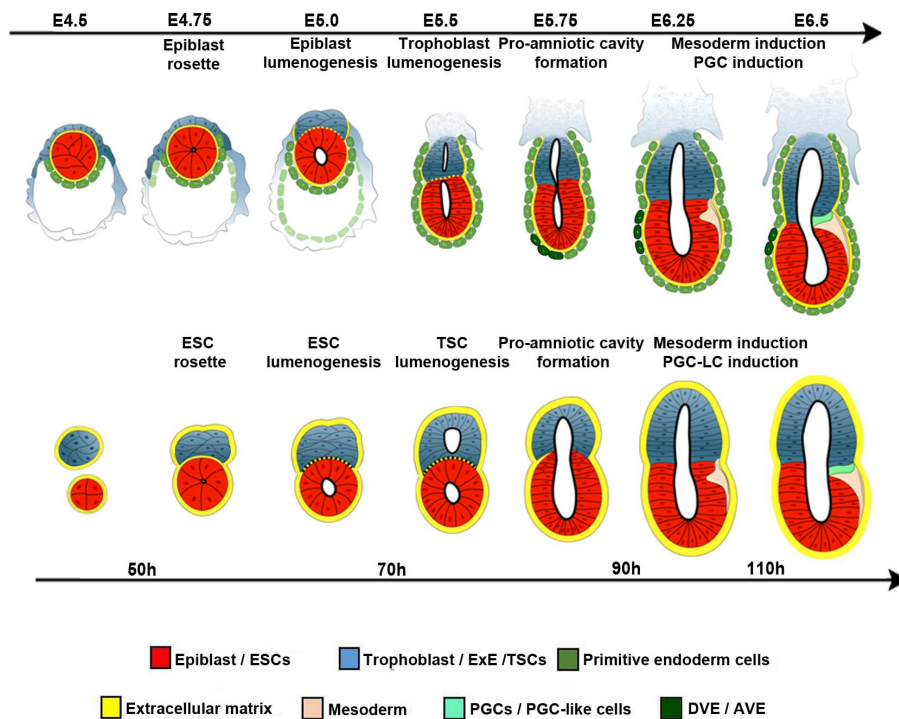


Fig. 8. ETS-embryos as a simplified model of embryo development from the blastocyst stage until mesoderm specification postimplantation. Comparison of development of natural and “ETS-embryos” mouse embryos. Red cells, ESC/epiblast; dark blue cells, TSC/trophectoderm/xtraembryonic ectoderm cells; beige cells, mesoderm cells; pale green cells, primordial germ cells; yellow line, basement membrane/ECM. In the embryo, green cells are primitive endoderm/visceral endoderm cells; dark green cells, distal/anterior visceral endoderm. The ETS-embryo is surrounded by ECM in a manner similar to that of basement membrane of visceral endoderm in natural embryo. Mesoderm-expression domain is similarly positioned and occupies similar area of the embryonic compartment in both ETS-embryos and natural embryos.

(48). After 120 hours in culture, we could identify a small cluster of *Tfap2c*-*Oct4* double-positive cells in the ESC compartment, at the ESC-TSC boundary, where *T* was expressed (Fig. 7A). The location of this site is similar to that of PGC formation in vivo (47, 48). To confirm this result, we next generated ETS-embryos using ESCs that express GFP-tagged *Stella* (*Stella:GFP*) (49). In accord with our earlier observations, we found a small domain of *Stella:GFP* expression after 120 hours in culture (Fig. 7B). To investigate the precise location of these putative-PGC-like cells, we plotted the coordinates of every single cell expressing either of these two PGC markers upon a projection of all cells in the structure. This revealed an average of five *Tfap2c*-*Oct4* double-positive and five *Stella:GFP* cells at the boundary between the ESC and TSC compartments (Fig. 7, C and D). The precise location of *Stella:GFP*-positive cells at the boundary between compartments contrasted to that of *Stella:GFP* expression in structures consisting of ESCs alone, which was distributed in a disorganized manner (fig. S5, a and b). To further investigate gene expression characteristic of PGCs, we collected *T:GFP*-positive and -negative cells from the ETS-embryos (at the boundary with the extraembryonic compartment) and performed RT-qPCR analysis. This revealed,

as expected for PGCs, up-regulated expression of all PGC-marker genes examined—*Tfap2c*, *Stella*, *Prdm14*, *Nanos3*, and *Ddx4*—and down-regulation of *Dnmt3b* when compared with *T:GFP*-negative cells outside this region (Fig. 7E). These results indicate that ETS-embryos have the potential to specify PGC-like cells at the boundary between embryonic and extraembryonic compartments, as natural embryos.

Specification of PGCs during embryogenesis is induced by BMP signaling from the extra-embryonic compartment (47). We therefore hypothesized that BMP signaling might play a similar role in the ETS-embryo model. To test this hypothesis, we first confirmed phosphorylation of SMAD1 in ETS-embryos, as in natural embryos, indicating their competence to specify PGCs (Fig. 7B; Fig. 7F, top; and fig. S6, a and b). We then used ETS-embryogenesis to generate ETS-embryos and let them develop in the presence of *Noggin*, known to inhibit BMP signaling (50), which we confirmed (Fig. 7G). Upon BMP inhibition, a significant majority of ETS-embryos (93%, $n = 15$) failed to express *Stella:GFP*, in contrast to control ETS-embryos (60%, $P < 0.005$, Fisher’s exact test, $n = 15$; fig. S6c). Finally, we wished to examine whether Wnt signaling is also necessary for induction of expression of PGCs markers during

ETS-embryogenesis. To this end, we generated ETS-embryos and treated them with DKK1 (200 ng/ml) after 48 hours of culture. This treatment significantly down-regulated expression of PGC marker genes and *T* in ESC-derived embryonic compartment on the boundary with the TSC-derived compartment, which would undergo PGC specification in control ETS embryos IVEs (Fig. 7, G and H). We verified that the Wnt signaling pathway was down-regulated by analyzing the expression of *Axin1* and *Wnt3* (Fig. 7G). These results indicate that after the induction of expression of mesoderm markers, ETS-embryogenesis progresses to induce expression of PGC markers in a manner similar to that of natural embryogenesis.

Discussion

At the onset of our study, we hypothesized that development of a stem cell model of mammalian embryogenesis might require mimicking the complex spatiotemporal sequence of morphogenetic steps occurring during natural embryogenesis. Our recent work allowed us to reveal the sequence of these morphogenetic steps at the time of implantation and early postimplantation development (3, 4). Here we take advantage of this knowledge and show that by fostering close interactions between embryonic and extraembryonic stem cells in a 3D scaffold of ECM and medium in which they can codevelop, ESCs and TSCs self-assemble into a structure whose development and architecture are very similar to those of the natural embryo. This in vitro embryogenesis can be broken down into a sequence of five key steps in the development of mammalian embryos from implantation stage to germ layer specification: (i) the spontaneous self-organization leading first to polarization and then epithelization and lumenogenesis in the embryonic (ESC) compartment and then cavitation in the extra-embryonic (TSC) compartment; (ii) the unification of embryonic and extraembryonic cavities into the equivalent of the embryo’s proamniotic cavity; (iii) the cross-talk between embryonic and extraembryonic compartments, involving Nodal signaling, that builds characteristic embryo architecture; (iv) the self-organization of embryonic and extraembryonic compartments, resulting in asymmetric induction of the localized expression of mesoderm markers at the compartment boundary in a Wnt-dependent manner; and (v) the provision of BMP signaling to specify the PGC-like cells, equivalent to their formation in the embryo. These morphogenetic events follow similar spatiotemporal dynamics during ETS-embryogenesis to those taking place in natural embryogenesis (Fig. 8).

Our studies demonstrate that stem cell-derived ETS-embryos can mimic formation of the embryo’s structure and gene expression pattern more accurately than has been possible before with structures derived from ESCs only, such as embryoid bodies (23–26). There are three critical differences between the ETS-embryos we describe here and embryoid bodies: The former are built from fewer starting numbers of cells to closely resemble cell numbers in the implanting embryo; they are cultured in a 3D scaffold of ECM as epiblast

cells within the embryo; and the ESCs develop in coordination with TSCs as epiblast cells with trophectoderm cells within the embryo. Our previous studies showed that a small number of ESCs cultured in ECM could organize themselves into a rosette that undergoes lumenogenesis in a manner resembling that of the natural embryogenesis (4). We show here that these ESC-derived rosettes can develop further to spontaneously—i.e., without provision of a specific external signal—induce mesoderm gene expression. However, we also now show that achieving robust mesoderm induction that respects the embryo's architecture is fostered by the addition of interactions with extraembryonic stem cells.

These results point to a remarkable ability of ESCs to pattern through their interactions with TSCs alone, without a requirement for primitive endoderm-derived structures. This might be because we partially substitute for the primitive endoderm function by providing ECM in the 3D scaffold. In agreement with this hypothesis, we have recently shown that ECM proteins can substitute for primitive endoderm to induce epiblast remodeling at the time of implantation (4). However, the induction of asymmetric expression of mesoderm and PGC markers during ETS-embryogenesis was surprising because during natural embryogenesis, primitive endoderm-derived DVE and AVE provide inhibitors to restrict posterior gene expression upon their migration anteriorly (8–11). The lack of noticeable asymmetry in pSMAD2 in ETS-embryos could be due to the absence of DVE and AVE; nevertheless, our results demonstrate that without the localized provision of antagonists, ETS-embryos break symmetry to induce regionalized, asymmetric expression of mesoderm and PGC markers. We hypothesize that this is either due to a random event or an earlier asymmetric morphogenetic step such as the cell rearrangements that occur during the cavity fusion. Indeed, such rearrangements could potentially reposition signaling receptors to sense and transduce signals from the neighboring compartment not entirely symmetrically. Regardless of the route by which this is achieved, we further hypothesize that secretion of an inhibitory signal might act to restrict mesoderm gene expression in adjacent regions. It will be interesting to further elucidate this process in future and to determine whether incorporating primitive endoderm stem cells (51, 52) into the ETS-embryogenesis model would extend the developmental potential of this model.

In conclusion, we demonstrate that enabling cross-talk between embryonic and extraembryonic stem cells in a 3D ECM scaffold is sufficient to trigger self-organization recapitulating spatiotemporal events that lead to construction of embryo architecture and patterning. This stem cell model of mammalian embryogenesis, in combination with genetic manipulations, might provide a potentially powerful platform to dissect physical and molecular mechanisms that mediate this critical cross-talk during natural embryogenesis.

Materials and Methods

Embryo recovery and culture

Six-week old F₁ female (CBAx57BL/6) mice were naturally mated and sacrificed at midnight (E5.0) or midday (E5.5) after 5 days postcoitum. The uterus was recovered and embryos were dissected from deciduae in M2 medium and cultured as described previously (53). Blastocysts were recovered from the mother at E4.5 by uterine flushing. Recovered blastocysts had their mural trophectoderm dissected away, before plating in μ -plates (Ibidi) and cultured in IVC1 and IVC2 media (Cell Guidance Systems).

Embryo immunostaining

Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, washed twice in PBT [phosphate-buffered saline (PBS) plus 0.05% Tween-20] and permeabilized for 15 min at room temperature in 0.3% Triton-X-100, 0.1% glycin. Primary antibody incubation was performed overnight at 4°C in blocking buffer [PBS plus 10% fetal bovine serum (FBS), 1% Tween-20]. The next day, embryos were washed twice in PBT, then incubated overnight in secondary antibody in blocking buffer at 4°C. On the third day, embryos were washed twice in PBT and incubated for 1 hour at room temperature in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) plus PBT (5 mg/ml). Embryos were mounted in DAPI plus PBT before confocal imaging. For antibodies used, see table S1.

Cell culture

ESCs were cultured at 37°C and 5% CO₂ on gelatinized tissue-culture-grade plates and passaged once they reached confluency. Cells were cultured in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) with 15% FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and 1% penicillin-streptomycin supplemented with PD0325901 (1 μ M), CHIR99021 (3 μ M) (2i), and leukemia inhibitory factor (0.1 mM, LIF).

TSCs were cultured at 37°C and 5% CO₂, in RPMI 1640 (Sigma) with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM 2-ME, 1 mM sodium pyruvate, and 1% penicillin-streptomycin, plus FGF4 (Peprotech) and heparin (Sigma) in the presence of inactivated DR4 MEFs (54). Cells were passaged at 80% confluency.

Cell lines used in the study

All experiments were performed using E14 or 129 mouse ESCs, CAG-GFP ESCs (55), inducible Nodal knockout ESCs (38), T:GFP ESCs (41), H2B-GFP:Tcf/LEF ESCs (45), Stella:GFP ESCs (49), and wild-type TSCs.

"3D embedded" culture

ESC colonies were dissociated to single cells, and TSC colonies dissociated into small clumps by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37°C. Cells were pelleted by centrifugation for 5 min/1000 rpm, washed with PBS, and repelleted. This was repeated twice, then ESC and TSC suspensions were mixed and repelleted. The pellet was resuspended in Matrigel (BD, 356230). The cell suspension was plated on μ -plates (Ibidi)

and incubated at 37°C until the Matrigel solidified. Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂. ETS-embryo medium was as follows: 50% RPMI, 25% DMEM F-12, and 25% Neurobasal A supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM 2ME, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.25 \times N2 supplement, 0.5 \times B27 supplement, or SOS supplement (Cell Guidance Systems Ltd, Cambridge) FGF4 (12.5 ng/ml) and heparin (Sigma) 500 ng/ml (ETS-Embryo medium, ETM, Cell Guidance Systems Ltd., Cambridge). For some experiments, cells were plated by using a 3D "on top" protocol (56).

Cell immunostaining

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, then rinsed twice in PBS. Permeabilization was performed with 0.3% Triton-X-100, 0.1% glycin in PBS for 10 min at room temperature. Primary antibody incubation was performed overnight in blocking buffer (as above) at 4°C. The next day, cells were washed twice in PBS, then incubated overnight in secondary antibody in blocking buffer (as above) at 4°C. DAPI in PBS (5 mg/ml) was added before confocal imaging. For antibodies used, see table S1.

Imaging, processing, and analysis

All images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope, using a 40 \times oil-immersion objective. All analyses were carried out using open-source image analysis software "Fiji" or "Bioemergences" software (57).

Estimation of tissue volume

Tissue volume for ETS-embryos and natural embryos was estimated under the assumption that both ETS-embryos and natural embryos were approximately cylinder shaped. The length and radius of each compartment were measured with image analysis software, then the volume of the cylinder was calculated from these measurements as $V = \pi r^2 l$.

Assessment of cells at the embryonic-extraembryonic boundary

Cells were classified as lying on the embryonic-extraembryonic boundary if they had "nearest neighbor" cells within a 20- μ m linear distance that were both an ESC and a TSC.

Measurement of laminin displacement angle

Using image analysis software, a line was drawn from ESC compartment to TSC compartment at the middle Z-section of a confocal acquisition of a ETS-embryos. A second line across the boundary was drawn perpendicular. The angle of laminin displacement was then measured relative to these lines. Laminin adjacent to the boundary would therefore have an angle of 90°. Θ is equal to the angle of the laminin extending into the TSC compartment ($\Theta < 90^\circ$).

Assessment of asymmetric gene expression

A line corresponding to the long axis, equivalent to the "midline" of a ETS-embryo (perpendicular

- type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **62**, 65–74 (2002). doi: [10.1124/mol.62.1.65](https://doi.org/10.1124/mol.62.1.65); pmid: 12065756
38. Q. Wu *et al.*, Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. *Development* **140**, 291–300 (2013). doi: [10.1242/dev.087882](https://doi.org/10.1242/dev.087882); pmid: 23221368
39. B. G. Herrmann, Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development* **113**, 913–917 (1991). pmid: 1821859
40. D. G. Wilkinson, S. Bhatt, B. G. Herrmann, Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* **343**, 657–659 (1990). pmid: 1689462
41. H. J. Fehling *et al.*, Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* **130**, 4217–4227 (2003). doi: [10.1242/dev.00589](https://doi.org/10.1242/dev.00589); pmid: 12874139
42. A. Scialdone *et al.*, Resolving early mesoderm diversification through single-cell expression profiling. *Nature* **535**, 289–293 (2016). doi: [10.1038/nature18633](https://doi.org/10.1038/nature18633); pmid: 27383781
43. G. Peng *et al.*, Spatial transcriptome for the molecular annotation of lineage fates and cell identity in mid-gastrula mouse embryo. *Dev. Cell* **36**, 681–697 (2016). doi: [10.1016/j.devcel.2016.02.020](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.020); pmid: 27003939
44. H. R. Schöler, G. R. Dressler, R. Balling, H. Rohdewohld, P. Gruss, Oct-4: A germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* **9**, 2185–2195 (1990). pmid: 2357966
45. A. Ferrer-Vaquer *et al.*, A sensitive and bright single-cell resolution live imaging reporter of Wnt/B-catenin signaling in the mouse. *BMC Dev. Biol.* **10**, 121 (2010). doi: [10.1186/1471-213X-10-121](https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-121); pmid: 21176145
46. A. Niida *et al.*, DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* **23**, 8520–8526 (2004). doi: [10.1038/sj.onc.1207892](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207892); pmid: 15378020
47. K. A. Lawson *et al.*, Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* **13**, 424–436 (1999). doi: [10.1101/gad.13.4.424](https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424); pmid: 10049358
48. U. Günesdogan, E. Magnúsdóttir, M. A. Surani, Primordial germ cell specification: A context-dependent cellular differentiation event. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **369**, 20130543 (2014). doi: [10.1098/rstb.2013.0543](https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0543); pmid: 25349452
49. B. Payer *et al.*, Generation of stella-GFP transgenic mice: A novel tool to study germ cell development. *Genesis* **44**, 75–83 (2006). doi: [10.1002/gene.20187](https://doi.org/10.1002/gene.20187); pmid: 16437550
50. L. B. Zimmerman, J. M. De Jesús-Escobar, R. M. Harland, The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599–606 (1996). doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)80133-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80133-6); pmid: 8752214
51. T. Kunath *et al.*, Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* **132**, 1649–1661 (2005). doi: [10.1242/dev.01715](https://doi.org/10.1242/dev.01715); pmid: 15753215
52. K. K. Niakan, N. Schrode, L. T. Y. Cho, A.-K. Hadjantonakis, Derivation of extraembryonic endoderm stem (XEN) cells from mouse embryos and embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* **8**, 1028–1041 (2013). doi: [10.1038/nprot.2013.049](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.049); pmid: 23640167
53. I. Bedzhov, C. Y. Leung, M. Bialecka, M. Zernicka-Goetz, *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. *Nat. Protoc.* **9**, 2732–2739 (2014). doi: [10.1038/nprot.2014.186](https://doi.org/10.1038/nprot.2014.186); pmid: 25356584
54. S. Tanaka, Derivation and culture of mouse trophoblast stem cells *in vitro*. *Methods Mol. Biol.* **329**, 35–44 (2006). pmid: 16845982
55. J. M. Rhee *et al.*, *In vivo* imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis* **44**, 202–218 (2006). doi: [10.1002/dvg.20203](https://doi.org/10.1002/dvg.20203); pmid: 16604528
56. G. Y. Lee, P. A. Kenny, E. H. Lee, M. J. Bissell, Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat. Methods* **4**, 359–365 (2007). doi: [10.1038/nmeth1015](https://doi.org/10.1038/nmeth1015); pmid: 17396127
57. E. Faure *et al.*, A workflow to process 3D+time microscopy images of developing organisms and reconstruct their cell lineage. *Nat. Commun.* **7**, 8674 (2016). pmid: 26912388
58. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org/.
59. GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA; www.graphpad.com.
60. J. M. Rhee *et al.*, *In vivo* imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis* **44**, 202–218 (2006). doi: [10.1002/dvg.20203](https://doi.org/10.1002/dvg.20203); pmid: 16604528

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to D. Glover, M. Shahbazi, S. Vuoristo, and F. Antonica for helpful feedback on the manuscript; A. Hupalowska for drawing models (Figs. 1A, 2I, and 8) and G. Recher for 3D rendering (Fig. 1, B and D); the creators of the “Bioemergences” platform for providing image analysis tools; and V. Kuskoff, A. Surani, and B. Herrmann for providing T:GFP ESCs and Stella:GFP ESCs. We are grateful to the Wellcome Trust and ERC for supporting this work. S.E.H. and C.K. are both supported by Biotechnology and Biological Sciences Research Council doctoral training partnership studentships. B.S. is supported by the International Research Fellowship Program 2214/A from Scientific and Technological Research Council of Turkey, and M.Z.-G. by the Wellcome Trust. S.E.H. served as an intern in the Cambridge, UK, office of Science/AAAS. M.Z.-G. and S.E.H. are inventors on a patent application (1615343.9) submitted by Cell Guidance Systems, in which the University of Cambridge and the Wellcome Trust are beneficiaries, that covers the method and medium composition used to generate “stem cell-derived embryos.” S.E.H. and B.S. carried out experiments and data analysis on ETS-embryos. N.C. and C.K. carried out experiments on natural embryos. M.Z.-G. conceived and supervised the study and wrote the paper with the help of S.E.H. and B.S.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencemag.org/content/356/6334/eaal1810/suppl/DC1
Figs. S1 to S6
Tables S1 and S2

9 October 2016; accepted 17 February 2017
Published online 2 March 2017
10.1126/science.aal1810



Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Sarah Ellys Harrison, Berna Sozen, Neophytos Christodoulou, Christos Kyprianou and Magdalena Zernicka-Goetz (March 2, 2017)

Science **356** (6334), . [doi: 10.1126/science.aal1810] originally published online March 2, 2017

Editor's Summary

In vitro embryogenesis

Pluripotent embryonic stem cells (ESCs) can differentiate into any adult cell type; however, aggregates of these cells do not mimic embryonic architecture when grown in culture. To see whether mouse ESCs and their extraembryonic counterparts, trophoblast stem cells (TSCs), can recapitulate normal development, Harrison *et al.* combined ESCs and TSCs in an extracellular matrix culture (see the Perspective by Pera). The resultant "ETS-embryos" displayed considerable resemblance to normal embryos, even specifying mesoderm and primordial germ cells at the boundary between embryonic and extraembryonic compartments. These ETS-embryos are a genetically tractable tool for studying mammalian embryogenesis.

Science, this issue p. eaal1810; see also p. 137

This copy is for your personal, non-commercial use only.

Article Tools Visit the online version of this article to access the personalization and article tools:
<http://science.sciencemag.org/content/356/6334/eaal1810>

Permissions Obtain information about reproducing this article:
<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

Science (print ISSN 0036-8075; online ISSN 1095-9203) is published weekly, except the last week in December, by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. Copyright 2016 by the American Association for the Advancement of Science; all rights reserved. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Berna	Uyruğu	T.C
Soyadı	Sözen	Tel no	05069047997
Doğum tarihi	29.04.1987	e-posta	sozenberna@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Lisesi	2005
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2013
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2018

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.	2012-2018
Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD. İnfertilite Merkezi	2015-2015
Research Assistant	Cambridge Üniversitesi Fizyoloji, Gelişim ve Sinir Bilimleri Bölümü	2018-2018
Research Associate	Cambridge Üniversitesi Fizyoloji, Gelişim ve Sinir Bilimleri Bölümü	2018-devam ediyor

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İNGİLİZCE	ÜDS	87.5 / 100
İNGİLİZCE	KPDS	78 / 100
İNGİLİZCE	IELTS	7.0 / 9

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Regulation and dynamics of lineage segregation and morphogenesis during development of the early mouse embryo	Wellcome Trust (UK)	01.04.2013- 31.03.2018
Self-organising capacity of stem cells during implantation and early post-implantation development: implications for human development.	European Research Council (ERC)	21.12.2015 – 31.12.2020
Role of signalling of the pre- to post-implantation development in the mouse embryo.	Akdeniz Üniversitesi BAP	15.02.2015-15.10.2018
Hiperglisemik Koşulların Peri Ve Postimplantasyon Fare Embriyo Gelişimine Etkisi	TÜBİTAK	2018 – devam ediyor
Hiperglisemik Koşulların Fare Preimplantasyon Embriyolarındaki Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisinin In Vitro ve In Vivo Araştırılması	TÜBİTAK	15.02.2014-15.02.2015
Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişiminde P38 Mapk Sinyal Aracılı Hücre Farklanmasının Değerlendirilmesi	TÜBİTAK	15.07.2013-15.07.2014
Ratlarda Galaktozemi Toksikitesi ile İndüklenmiş Ovaryal Yetmezlik Modelinde Dehidroepiandrostenedion (DHEA) Desteği Ovaryan Morfolojiyi Geliştirir mi?	Akdeniz Üniversitesi BAP	15.10.2013-15.10.2014
İnsan Testis Dokusunda Epab ve Pabpc1 Transkriptlerinin Hücresel Yerleşimleri ve	TÜBİTAK	15.11.2012-15.07.2014

Spermatogenik Hücrelerdeki Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi		
Preimplantif dönem fare embriyo gelişiminde p38 MAPK aracılı GLUT ekspresyonunun değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	05.10.2011-04.05.2013
Testiste, Epabp (Embriyonik Poli(A) Bağlanma Proteini) Gen Ekspresyon Dağılımının Rna in situ Hibridizasyon Yöntemi Ile Belirlenmesi"	TÜBİTAK	01.12.2009-01.09.2010

Burslar-Ödüller:

1. Wellcome Trust, Aralık 2016 (ziyaretçi araştırmacı desteği, toplamda 11 ay, Cambridge Üniversitesi, Birleşik Krallık/İngiltere)
2. 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı, TÜBİTAK-BİDEP, Ekim 2015 (1 yıllık doktora araştırma bursu, Cambridge Üniversitesi, Birleşik Krallık/İngiltere)
3. **Sözen B**, "Prof. Dr. Türkan Erbenği Araştırma Ödülü, 22. Elektron Mikroskopi Kongresi - Türk Elektron Mikroskopi Derneği, Eylül 2015
4. **Sözen B**, "Poster Bildirisi Birincilik Ödülü, 5. Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Derneği Kongresi, Kasım 2015
5. **Sözen B**, "Sözel Bildiri İkincilik Ödülü, 6. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi (TSRM2014), Ekim 2014
6. MSc. Intern, European Commission Education & Training, Şubat 2012 (6 aylık yüksek lisans araştırma bursu, Southampton Üniversitesi, Birleşik Krallık/İngiltere)
7. **Sözen B**, "En iyi poster ödülü, Klinik Embriyoloji Derneği, Eylül 2011
8. **Sözen B**, "Prof. Dr. Üveis Maskar Poster Ödülü, 20. Elektron Mikroskopi Kongresi - Türk Elektron Mikroskopi Derneği, Ekim 2011

Yayınlar ve Bildiriler:

Journal Articles

1. Harrison SE*, **Sozen B***, Christodoulou N, Kyprianou C, Zernicka-Goetz M. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. **Science**. 2017 Apr 14;356(6334). (PMID:[28254784](#)) *Co-first authorship.
2. **Sozen B**, Pehlivanoglu S, Demir N. Differential expression pattern of Twist1 in mouse preimplantation embryos suggests its multiple roles during early development. **J. Assist. Reprod. Genet.** 2016 Nov;33(11):1533-1540 (PMID: [27544279](#))
3. Ozturk S, Yaba-Ucar A, **Sozen B**, Mutlu D, Demir N. Superovulation alters embryonic poly(A)-binding protein (Epab) and poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1 (Pabpc1) gene expression in mouse oocytes and early embryos. **Reprod. Fertil. Dev.** 2016 Mar;28(3):375-83. (PMID: [#25034140](#))
4. Ozturk S, **Sozen B**, Uysal F, Bassorgun IC, Usta MF, Akkoyunlu G, Demir N. The poly(A)-binding protein genes, EPAB, PABPC1, and PABPC3 are differentially expressed in infertile men with non-obstructive azoospermia. **J. Assist. Reprod. Genet.** 2016 Mar;33(3):335-348. (PMID:[26843391](#))
5. **Sozen B**, Ozturk S, Yaba A, Demir N. The p38 MAPK signalling pathway is required for glucose metabolism, lineage specification and embryo survival during mouse preimplantation development. **Mech. Dev.** 2015 Nov; 138, 3:375-98 (PMID: [26025760](#))
6. Tepekoy F, Ozturk S, **Sozen B**, Ozay RS, Akkoyunlu G, Demir N. CD90 and CD105 expression in the mouse ovary and testis at different stages of postnatal development. **Reprod. Biol.** 2015 Dec;15(4):195-204. (PMID: [26679159](#))
7. Basar M, Bozkurt I, Guzeloglu-Kayisli O, **Sozen B**, Tekmen I, Schatz F, Arici A, Lockwood CJ, Kayisli UA. Unfolded protein response prevents blastocyst formation during preimplantation embryo development in vitro. **Fertil. Steril.** 2014 Dec;102(6):177-84. (PMID: [#25305729](#))
8. **Sozen B**, Can A, Demir N. Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. **Dev. Biol.** 2014 Nov 1;395(1):73-83. (PMID: [#25176042](#))

9. Ozturk S, **Sozen B**, Demir N., Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. **Mol. Hum. Reprod.** 2014 Jan;20(1):15-30. (PMID: [#23928157](#))
10. Ozturk S, **Sozen B**, Demir N. Epab and Pabpc1 are differentially expressed in the postnatal mouse ovaries. **J. Assist. Reprod. Genet.** 2014 Jan;32(1):137-46. (PMID: [#25370180](#))
11. Ozturk S, Guzeloglu-Kayisli O, Demir N, **Sozen B**, Ilbay O, Lalioti MD, Seli E. Epab and Pabpc1 Are Differentially Expressed During Male Germ Cell Development. **Reprod. Sci.** 2012 Jul; 00(0) 1-12 (PMID: [#22814100](#))
12. Tanriover G, **Sozen B**, Seker A, Kilic T, Gunel M, Demir N. Ultrastructural analysis of vascular features in cerebral cavernous malformations. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 2012 Jul; PMID: 22776801 (PMID: [#22776801](#))
13. Tanriover G, **Sozen B**, Gunel M, Demir N. CCM2 expression during prenatal development and adult human neocortex. **Int. J. Dev. Neurosci.** 2011 Aug;29(5):509-14 (PMID: [#21569831](#))

Papers presented at international academic conferences/symposia (selected)

1. **Sozen B.**, Ozturk S., Yaba-Ucar A., Demir N. P38 MAPK signal activity is critical for GLUT1 and GLUT4 expressions, maintaining pluripotency and survival of early mouse embryos (Poster Presentation). 29th Annual Meeting of *European Society of Human Reproduction and Embryology*, **7-10 July 2013, London-UK.** *Reproduction*, Vol:28 Suppl:1, page:i169, 2013 (P-129).
2. Demir N., Ozturk S., **Sozen B.** *Epab* and *Pabpc1* genes exhibit different expressions and cellular localizations in postnatal mouse ovaries (Poster Presentation). 29th Annual Meeting of *European Society of Human Reproduction and Embryology*, **7-10 July 2013, London-UK.** *Reproduction*, Vol:28 Suppl:1, page:i303, 2013 (P-447).
3. Ozturk S., **Sozen B.**, Yaba-Ucar A., Mutlu D., Demir N. Superovulation influences *Epab* and *Pabpc1* gene expressions in mouse oocytes and early

- preimplantation embryos (Poster Presentation). 29th Annual Meeting of *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 7-10 July 2013, London-UK. *Reproduction*, Vol:28 Suppl:1, page:i350, 2013 (P-558).
4. Ozturk S, Ozlem Guzeloglu-Kayisli O, **Sozen B**, Demir N, Ilbay O, Lalioti MD, Seli E. *Egab* and *Pabpc1* are differentially expressed during male germ cell development (Oral Presentation). 28th Annual Meeting of *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 1-4 July 2012, Istanbul-Turkey. *Reproduction*, Vol:27 Suppl:1, page:i113, 2012 (O288).
 5. **Sozen B.**, Ozturk S, Yaba A, Mutlu D, Demir N. The effect of *Egab* gene expression on superovulated mouse oocyte and earl embryos. IIth international congress of society of clinical embryology. (Poster presentation) 09, Page 17, **September 23-25, 2011, Dalaman-Mugla/Turkey.**

Papers presented at national academic conferences/symposia (selected)

1. **Sozen B.**, Okan A., Demir N. Investigation of endoplasmic reticulum stress in mouse blastocysts exposed to *in vitro* hyperglisemia (Oral Presentation O-152). 22th National Congress of Electron Microscopy. September 2-4, 2015, Sabanci University Campus-Istanbul, Turkey.
2. **Sozen B.**, Ozturk S., Yaba-Ucar A., Demir N. The p38 MAPK signalling is critical for glucose metabolism, lineage specification and embryo survival during mouse preimplantation development (Oral Presentation O-19). 6th Biannual Meeting of the Turkish Society of Reproductive Medicine. November 6–9, 2014. Belek-Antalya, Turkey
3. Okan A., **Sozen B.**, Demir N. Endoplasmic reticulum stres-related protein expression in mouse blastocysts exposed to *in vitro* hyperglisemia. (Poster Presentation P-113). 6th Biannual Meeting of the Turkish Society of Reproductive Medicine. November 6–9, 2014. Belek-Antalya, Turkey.
4. **Sozen B.**, Ozekinci M., Gunduz T., Demir N., Erman-Akar M. Assessment of ovarian morphology and apoptotic response in intrauterine galactose toxicity induced

premature ovarian failure model. (Poster Presentation P-76)12th Annual Meeting of National Histology and Embryology Congress, May 27-30, 2014, Ankara-Turkey.

5. **Sozen B.**, Ozturk S., Demir N. Expression and cellular distribution of p38 MAPK pathway proteins in postnatal mouse ovary. (Poster Presentation P-89) 21th National Congress of Electron Microscopy, May 28-31, 2013 Mersin-Turkey.
6. **Sozen B.**, Ozturk S, Uçar Y.A, Demir N. Expression of glucose transporter-1 and 4 (GLUT1/GLUT4) via p38 MAPK signaling activity in mouse blastocysts. (Poster Presentation P-13) 5th Biannual Meeting of the Turkish Society of Reproductive Medicine. September, 27-30, 2012, Cesme-İzmir.
7. Ozturk S, **Sozen B.**, Ozay R.S, Demir N. *Epab* ve *Pabpc1* gene expressions in postnatal mouse ovary. (Poster Presentation P-135) 5th Biannual Meeting of the Turkish Society of Reproductive Medicine. September, 27-30, 2012, Cesme-İzmir.

Scientific Magazine Articles

1. **Sozen B.** Kök Hücre E-Bülteni: ISSN: 2148-9815. No:19, May-June 2017. (Perspective article in Turkish)
2. **Sozen B.** Herkese Bilim Teknoloji: ISSN: 2458-9756. No:50, 10 March 2017. (Perspective article in Turkish)
3. **Sozen B.** Bezelye Populer Genetik Dergisi: ISSN: 2587-0173. No:4, 24 April 2018. In press. (Perspective article in Turkish)