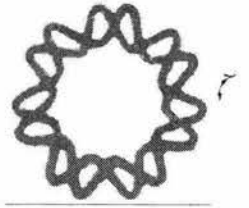




00591



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS FENOTÍPICO DE EMBRIONES DE RATÓN CON  
EXPRESIÓN UBICUA DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL OCT4**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA

**Q.F.B. VERÓNICA RAMOS MEJÍA**

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la supervisión de la Dra. Hilda Lomelí Buyoli.

Revisores: Dra. Susana Castro Obregón.  
Dra. Martha V. Vázquez Laslop.  
Dra. Rosa Ma. Uribe Villegas.  
Dr. Enrique A. Reynaud Garza.  
Dr. Jesús Chimal Monroy.  
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Durante el desarrollo de la presente tesis conté con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Verónica Ramos Mejía

FECHA: 07/10/04

FIRMA: 

Quiero dedicar esta tesis a:

Tacho,

mi compañero de vida, por el amor que compartimos.

Boli,

mi madre, por su incondicional amor y apoyo.

mi familia, especialmente a mis sobrinos

Daniel, Leonardo, Ariel, Tania, Rodrigo, Sofía y Ariadna,

esperando que encuentren el gusto por el conocimiento.

Quiero agradecer:

En primer lugar a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado todas las facilidades para desarrollarme profesionalmente.

A la Dra. Hilda Lomelí Buyoli, por todo el apoyo, consejos, críticas y orientación que me ha dado durante todos estos años.

A la Dra. Diana Escalante Alcalde y el Dr. Enrique Salas Vidal, por sus asesorías y sobretodo por la pasión que transmiten por el estudio de la biología del desarrollo.

Al Dr. Mario Zurita Ortega y el Dr. Horacio Merchant Larios, por los consejos que me han dado durante la realización de mi proyecto de doctorado.

A mis amigos y compañeros del IBT: Laurita, Rayo, Denhi, Claus, Mariana, Lucy, Mario, Enrique S., Roxana, Leda, Jesús, Miguel, Toño, Tak, Conchita, Gise, Nacho, Chris, Enrique R., Jannet, Francisco, Lily, Gustavo, Jose Luis, Angel, Louis, Irma, Nora, Norma, Erika, Rodrigo, Leoncio, David, Rocio H., Rocio R., Javier, Shaday, Hector, Beto y Jorge.

Muy especialmente a mi hermana Aurora, por la orientación y el gran apoyo que me ha brindado durante mis estudios profesionales.

## Abreviaturas:

<b>AR:</b>	ácido retinóico.
<b><i>β-gal:</i></b>	<i>β-galactosidasa.</i>
<b><i>β-geo:</i></b>	<i>β-galactosidasa-neomicina.</i>
<b>CGP:</b>	células germinales primordiales.
<b>CEA:</b>	cresta ectodérmica apical.
<b>CNA:</b>	cresta neural anterior.
<b>Die:</b>	diencéfalo.
<b>DNA:</b>	desoxirribonucleic acid.
<b>E:</b>	día embrionario.
<b>EC:</b>	embryonal carcinomal cells.
<b>EG:</b>	embryonic germ cells.
<b><i>En1:</i></b>	<i>engrailed1.</i>
<b>ES:</b>	embryonic stem cells.
<b>FATN:</b>	fosfatasa alcalina tejido no específica.
<b><i>Gbx2:</i></b>	<i>gastrulation brain homeobox 2.</i>
<b>GCh:</b>	gonadotropina coriónica humana.
<b>HMG:</b>	high mobility group.
<b>IFN τ:</b>	interferón tau.
<b>LIF:</b>	leukemia inhibitory factor.
<b>MCI:</b>	masa celular interna.
<b>Mes:</b>	mesencéfalo.
<b>MPS:</b>	mesodermo presomítico.
<b><i>Fgf :</i></b>	<i>fibroblast growth factor</i>
<b>OI:</b>	Organizador del Istmo.
<b><i>Opn:</i></b>	<i>osteopontina.</i>
<b><i>Otx:</i></b>	<i>orthodenticle homologue 2.</i>
<b><i>Pax2:</i></b>	<i>paired box 2.</i>
<b>pb:</b>	pares de bases.
<b>Ra:</b>	romboencéfalo anterior.
<b>Región mes/met:</b>	mesencéfalo + metencéfalo anterior.
<b>RNA:</b>	ribonucleic acid.
<b>Spg:</b>	spiel-onhe-grenzen.
<b>Tel:</b>	telencéfalo.
<b><i>Utf1:</i></b>	<i>undifferentiated transcription factor 1.</i>
<b>ZAP:</b>	zona de actividad polarizante.
<b>ZI:</b>	zona limitants.
<b>ZP:</b>	zona de progresión.

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. <i>Oct-4</i> .....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Expresión.....	5
1.3 Regulación.....	7
1.4 Blancos y cofactores.....	8
1.5 Función de Oct4: pluripotencialidad vs. diferenciación.....	9
1.5.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	10
1.5.2 Estudios <i>in vivo</i> .....	12
2. El organizador del Istmo.....	13
2.1 Establecimiento y mantenimiento.....	13
2.2 <i>Otx2/Gbx2</i> .....	15
2.3 <i>Pax2</i> .....	16
2.4 <i>Fgf8</i> .....	16
2.5 <i>En1/2</i> .....	17
2.6 <i>Wnt1</i> .....	17
3. Somitogénesis.....	18
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	22
<b>ANTECEDENTES</b> .....	23
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	24
1. Animales.....	24
1.1 Líneas transgénicas.....	24
1.2 Obtención de embriones con sobreexpresión de <i>Oct-4</i> .....	25
2. Genotipificación.....	26
3. Hibridación <i>in situ</i> .....	27
4. Inmunodetección en membrana.....	29
5. Histología.....	31
6. Detección de muerte celular.....	31
7. Microscopía electrónica de barrido.....	31
8. Tinción de cartílago.....	32
9. Tinción con X-gal.....	32
<b>RESULTADOS</b> .....	33



1.	Obtención de embriones con expresión ubicua de <i>Oct4</i> .....	33
1.1	Línea transgénica <i>FATN<sup>Cre</sup></i> .....	33
1.2	Líneas transgénicas <i>Oct4-loxP</i> .....	33
1.3	Dobles transgénicos <i>FATN<sup>Cre</sup>/Oct4-loxP7</i> .....	34
1.4	Embriones con expresión ubicua de <i>Oct4</i> .....	34
2.	Fenotipo de los embriones <i>tgO7</i> .....	38
2.1	La sobreexpresión de <i>Oct4</i> en el organizador del Istmo.....	43
2.2	Efecto sobre la expresión de <i>Fgf8</i> .....	46
2.3	Análisis de la expresión ectópica de <i>Oct4</i> en el cerebro.....	48
2.3.1	Reducción del tamaño de la cabeza .....	48
2.3.2	Aumento en la muerte celular.....	50
	<b>PUBLICACIONES</b> .....	52
	<b>DISCUSION</b> .....	53
1.	El organizador del istmo en embriones <i>tgO7</i> .....	55
2.	La expresión de <i>Fgf8</i> se altera en los embriones <i>tgO7</i> .....	57
3.	Reducción de las regiones anteriores del cerebro en embriones <i>tgO7</i> ....	57
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	59
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	60
	<b>APENDICES</b> .....	61
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	69

## ABSTRACT

OCT4 is a transcription factor that has been associated with pluripotency and fate determination in the initial cell lineages of mammals. On the other hand *Pou2*, the ortholog of *Oct4* in zebrafish, serves additional later functions during brain development acting as a differentiation switch. In mice, *Oct4* is expressed throughout the neural plate of embryos until E8.0. In this study, we produced transgenic mouse embryos that ubiquitously express *Oct4* and analysed the consequences during development. We show that at E8.0, a higher dosage of *Oct4* in the neuroectoderm is sufficient to transiently alter mid-hindbrain patterning and produced a strong up-regulation of *Pax2*, indicating that *Oct4* can regulate this gene *in vivo*. After E9.5, ectopic *Oct4* in this region produced cell death and affected the development of the forebrain, suggesting that at these later stages, *Oct4* down-regulation is necessary for normal development to proceed.

The phenotype of the transgenic embryos was also accompanied with an increase of *Fgf8* expression in several of its endogenous domains, suggesting the possibility that *Oct4* can participate in the regulation of expression of this ligand.

Our observations support the hypothesis that *Oct4*, like zebrafish *Pou2*, has a conserved function during early brain patterning in mouse.

## RESUMEN

El factor transcripcional OCT4 se expresa en células pluripotentes del embrión temprano y la línea germinal de ratón. En líneas celulares pluripotentes, la expresión de *Oct4* se apaga cuando estas son inducidas a diferenciar. Los ratones nulos para *Oct4* mueren muy temprano en el desarrollo, debido a que no se forma la población de células pluripotentes que da lugar a todos los tejidos embrionarios. En el embrión del pez cebra, *Pou2* el ortólogo de *Oct4*, además de participar en la proliferación de células pluripotentes, está involucrado en la regionalización del cerebro medio y posterior, mediada por el organizador del Istmo (OI). En el presente trabajo se analizó el efecto de expresar ubicuamente *Oct4* en ratones transgénicos. Dado que *Oct4* se expresa normalmente en el neuroectodermo hasta el día embrionario 8 (E8), nos enfocamos a caracterizar el efecto de su sobreexpresión en el neuroectodermo, particularmente en el OI. Nuestros resultados muestran que al incrementar el nivel de expresión de *Oct4* en etapas tempranas del desarrollo (hasta E8.5), se incrementa de manera importante la expresión inicial de *Pax2*, que es el primer marcador del OI. Para E9.0, *Oct4* ya no se expresa en el neuroectodermo. En esta etapa, la expresión ectópica de *Oct4* causa un incremento significativo en la muerte celular en el cerebro anterior y medio.

Por último, nuestro análisis revela una posible interacción de OCT4 con la molécula secretable FGF8, ya que la expresión de *Oct4* en los embriones transgénicos altera la expresión de *Fgf8* en sus dominios de expresión endógenos.

## INTRODUCCION

### 1 OCT4

OCT4 es un factor transcripcional que esta involucrado en el establecimiento de la pluripotencialidad celular. En el ratón se expresa en las células pluripotentes del embrión temprano y en la línea germinal. Sin embargo, estudios *in vitro* revelan que al incrementar o disminuir lo niveles de expresión de *Oct4*, las células pluripotentes diferencian a mesendodermo o trofoectodermo respectivamente, lo que sugiere que también puede participar en la diferenciación celular. Debido a que el ratón nulo para *Oct4* muere en el periodo de pre-implantación, no es posible determinar si tiene alguna otra función además del mantenimiento de la pluripotencialidad. En el presente trabajo generamos un modelo experimental en el que *Oct4* se expresa ubicuamente durante el desarrollo embrionario de ratón. Con dicho modelo analizamos el efecto incrementar la expresión de *Oct4 in vivo*. Nuestros resultados revelan posibles nuevas funciones para este factor transcripcional durante el desarrollo embrionario de ratón.

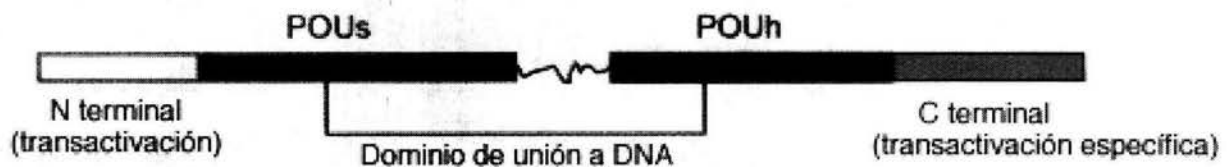
#### 1.1 Generalidades

*Oct4*, también conocido como *Oct3* u *Oct3/4*, es miembro de la familia de factores transcripcionales "POU", que debe su nombre a los primeros miembros que se identificaron: *Pit1*, *Oct1* y *Oct2* en mamífero, y la proteína codificada por el gen *unc 86* en *Caenorhabditis elegans*. Estos factores transcripcionales se caracterizan por contener un motivo POU de unión a DNA. Dicho dominio se divide en dos subdominios, el dominio POU específico (POUs) de 75 aminoácidos y el homeodominio (POUh) de 60 aminoácidos, los cuales están conectados por un adaptador de tamaño variable (15 a 56 aminoácidos) (Okamoto *et.al.*, 1990; Rosner *et.al.* 1990; Schöler *et.al.*, 1990b; Ryan y Rosenfeld, 1997). Las proteínas POU pueden activar la transcripción de genes que contienen la secuencia octamérica consenso, ATGCAAAT, en sus regiones reguladoras. Son capaces de formar homodímeros

o heterodímeros uniéndose a secuencias octaméricas que pueden variar con respecto al consenso, tales como el elemento PORE (Palindromic-Oct-Regulatory-Element: ATTTGAAATGCAAAT) y el MORE (More PORE: ATGCATATGCAT) (Tomilin *et.al.*, 2000).

Además del dominio POU, OCT4 tiene un dominio amino y un carboxilo terminal, los cuales pueden actuar como transactivadores (Fig.1) (Schöler, 1991). La actividad transactivadora del dominio carboxilo terminal esta regulada por fosforilación, lo que la hace tejido específica (Vigano y Staudt, 1996; Brehm *et.al.*, 1997).

*Oct4* se expresa en líneas celulares pluripotentes, las células de carcinoma embrionario o EC (embryonal carcinomal cells), las células tallo o ES (embryonic stem cells) y las células EG (embryonic germ cells), y su expresión se apaga cuando las células son inducidas a diferenciar con ácido retinóico (AR) (Okamoto *et.al.*, 1990; Rosner *et al.* 1990; Schöler *et.al.*, 1990b; Schöler, 1991; Yeom *et.al.*, 1996). Inicialmente su cDNA fue clonado independientemente como *Oct3* (Okamoto *et.al.*, 1990; Rosner *et.al.*, 1990) y *Oct4* (Schöler *et.al.*, 1990b). Sin embargo, *Oct3* y *Oct4* son producto de un mismo RNAm con dos sitios de inicio de la traducción alternativos: el primero genera una proteína de 352 aminoácidos conocida como OCT4 y el segundo otra de 325 conocida como OCT3. El gen de *Oct4* se encuentra en el cromosoma 17 de ratón, denominado *Pou5f1* (Mouse Genome Informatics), y contiene 5 exones que codifican para un mensajero de 1.5 Kb. (Schöler *et.al.*, 1990a; Schöler *et.al.*, 1990b; Okamoto *et.al.*, 1990).



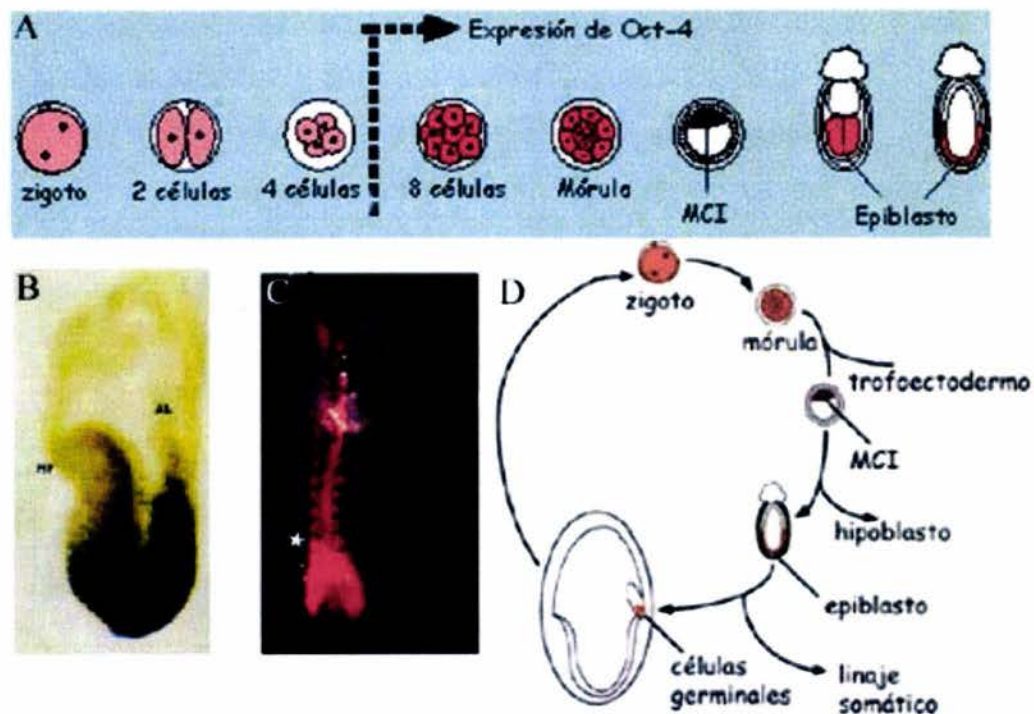
**FIGURA 1.** *Oct4* tiene 3 dominios, 2 de transactivación y el dominio POU de unión al DNA (modificado de Pan *et.al.*,2002).

## 1.2 Expresión

El RNAm y la proteína OCT4 se encuentran en bajos niveles en el ovocito sin fecundar, una vez fecundado la proteína se localiza preferentemente en el pronúcleo. Cuando se inicia la transcripción en el cigoto (estadio de 4-8 células), *Oct4* se expresa en todas las células del embrión hasta el estadio de mórula y la proteína se localiza principalmente en los núcleos. El estadio de blastocisto, OCT4 se expresa en los núcleos de las células pluripotentes de la masa celular interna (MCI) mientras que desaparece de las células diferenciadas del trofoectodermo (Fig.2A) (Rosner *et.al.*, 1990; Schöler *et.al.*, 1990b; Palmieri *et.al.*, 1994). Durante la implantación, las células de la MCI vecinas de la cavidad del blastocele se organizan como un epitelio y forman el endodermo primitivo o hipoblasto. En dichas células, si bien los niveles del RNAm de *Oct4* disminuyen (Rosner *et.al.*, 1990; Schöler *et.al.*, 1990b), los niveles de la proteína se incrementan con respecto al resto de las células de la MCI, justo antes de que el hipoblasto diferencie en endodermo parietal/visceral (Palmieri *et.al.*, 1994). Después de la implantación, *Oct4* se expresa en el epiblasto, y conforme avanza la gastrulación deja de expresarse gradualmente a partir de la región anterior del embrión (Fig.2B). Para el día embrionario 8 (E8) su expresión se mantiene en el neuroectodermo, aunque a un nivel más bajo que en las células germinales primordiales (CGP), que desde su origen (aproximadamente en E7.25) tienen un alto nivel de expresión de *Oct4* (Rosner *et.al.*, 1990; Schöler *et.al.*, 1990b). En E9, *Oct4* se expresa en el mesodermo presomítico y las somitas (Fig.2C) (Yeom *et.al.*, 1996). Para E9.25 las únicas células que expresan *Oct4* son las CGP (Yeom *et.al.*, 1996). Durante el desarrollo de la línea germinal, *Oct4* se expresa en las CGP durante su etapa migratoria y proliferativa en ambos sexos. En E13.5 las CGP se establecen en la gónada embrionaria. En los machos, las células germinales entran en reposo mitótico, en el cual permanecen hasta después del nacimiento, período durante el cual expresan bajos niveles de *Oct4*. Después del nacimiento, las células reinician la mitosis y dejan de expresar *Oct4*. En las hembras, las células germinales inician la meiosis a partir de E13.5.

La expresión de *Oct4* desaparece en E16.5, cuando todas las células germinales se encuentran en cigoteno/paquiteno de la profase I de la meiosis. Después del nacimiento, *Oct4* vuelve a expresarse en los últimos estadios de diferenciación de la línea germinal de hembras y la proteína se detecta a un nivel bajo en el citoplasma de los ovocitos maduros (Pesce *et.al.*, 1998b).

Una característica común de todas las células que expresan *Oct4*, tanto en líneas celulares como en el embrión temprano, es su capacidad de diferenciar a diversos tipos celulares, es decir son células pluripotentes. Por esta razón se considera a *Oct4* como un marcador del “ciclo totipotencial del ratón” (Yeom *et.al.*, 1996). En esta hipótesis se propone que las células que pierden la expresión de *Oct4* durante el desarrollo diferencian a linajes somáticos, mientras que las que mantienen su expresión, mantienen también su potencialidad y competencia que les permite diferenciar en células germinales (Fig.2D).

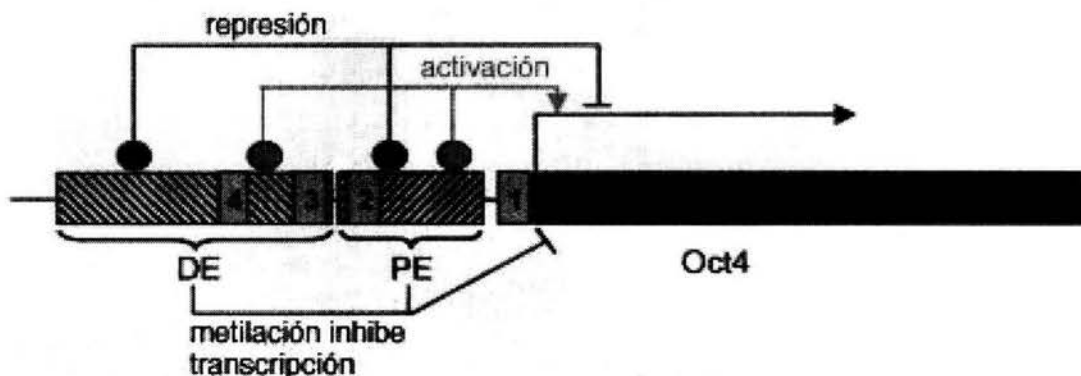


**FIGURA 2.** Expresión de *Oct4* en el desarrollo embrionario de ratón. (A) Expresión de *Oct4* en embriones de E0 a E6 (modificado de Pesca *et.al.*, 1998b). (B) Para el E7.5 la expresión de *Oct4* empieza a apagarse de manera antero-posterior. (C) Expresión de *Oct4* en el MPS y las somitas en embriones en E9. (D) Ciclo totipotencial del ratón, la expresión de *Oct4* se muestra en rojo (B,C y D modificados de Yeom *et.al.*, 1996).

### 1.3 Regulación

La región reguladora de *Oct4* consiste en un promotor mínimo y dos elementos “enhancers” que regulan su expresión durante el desarrollo embrionario. El promotor no tiene caja TATA, pero cuenta con sitios de unión para los factores transcripcionales *Sp1/Sp3* 30 pares de bases (pb) arriba del sitio de inicio de la transcripción. Dicho elemento es requerido para reclutar la maquinaria basal de transcripción (Pesce *et.al.*, 1998a). Los dos “enhancers” que se han identificado dirigen la expresión de *Oct4* en diferentes etapas del desarrollo embrionario y en diferentes líneas celulares. El enhancer proximal (EP) que se localiza 1.2 kilobases (Kb) arriba del sitio de inicio de la transcripción, dirige la expresión al epiblasto y es el elemento activo en las EC. El enhancer distal (ED) se encuentra 2 Kb arriba del inicio de la transcripción y es responsable de la expresión de *Oct4* en la mórula, MCI, en la línea germinal y en las ES (Fig.3) (Yeom *et.al.*, 1996).

Otro mecanismo para regular la expresión de *Oct4* es la metilación del gen. Se ha demostrado que la metilación de secuencias en *cis* río arriba del sitio de inicio de la transcripción inhibe la expresión de *Oct4* tanto *in vitro* como *in vivo* (Gidekel y Bergman, 2002). *In vivo*, *Oct4* permanece sin metilar hasta E6.5, pero a partir de este estadio comienza la metilación de su región reguladora, siendo el enhacer proximal el más metilado (Gidekel y Bergman, 2002).



**FIGURA 3.** Regulación de la expresión del gen de *Oct4*. Los sitios potenciales de unión a reguladores positivos y negativos de su transcripción en el enhancer proximal (PE) y el distal (DE) están señalados. Existen 4 sitios muy conservados entre los promotores de *Oct4* en ratón, bovino y humano que están representados con los números del 1 al 4.



#### 1.4 Blancos y cofactores

OCT4 puede ser activador o represor de la transcripción, dependiendo del gen blanco y de su asociación con cofactores. Entre las moléculas que se expresan en células pluripotentes cuya expresión es activada por OCT4 encontramos al factor de crecimiento fibroblástico *Fgf4*, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF $\alpha$ R) y los factores transcripcionales *Utf1* (*Undifferentiated transcription factor 1*), *Sox2* y *Rex-1*. (Yuan *et.al.*, 1995; Nishimoto *et.al.*, 1999; Tomioka *et.al.*, 2002; Kraft *et.al.*, 1996).

OCT4 forma un heterodímero con SOX2, un factor transcripcional con dominio HMG (High Mobility Group). *In vitro* se ha demostrado que dicho heterodímero se une a la región reguladora de los genes de *Fgf4*, *Utf1* y *Sox2*, y activa su transcripción (Yuan *et.al.*, 1995; Nishimoto *et.al.*, 1999; Tomioka *et.al.*, 2002).

*In vivo*, tanto *Oct4* como *Fgf4* se expresan en la MCI del blastocisto. La expresión de *Fgf4* en la MCI depende de OCT4, pues al eliminar el sitio de unión de OCT4 de la región reguladora de *Fgf4* se pierde la expresión de este último en las células de la MCI (Fraidenraich *et.al.*, 1998). Además el ratón nulo para *Oct4* no expresa *Fgf4* (Nichols *et.al.*, 1998).

En células EC, OCT4 forma un heterodímero con ROX1, el cual se une a la región reguladora del gen de *Rex-1* y activa su transcripción. Sin embargo, la función de OCT4 sobre *Rex1* depende de su nivel de expresión, ya que el incremento en la expresión de *Oct4* resulta en la represión de *Rex1* sin necesidad de un co-factor. (Palmieri *et.al.*, 1994; Ben-Shushan *et.al.*, 1998).

En células EC se identificaron por hibridación substractiva algunos candidatos de genes activados por OCT4. Entre estos se encuentran el transportador de glucosa *Glut-3*, *Otx-2*, *Lefty-1/Ebaf*, *Upp/383* (uridine phosphorylase) y *Tera/226* (Saijoh *et.al.*, 1996; Niwa *et.al.*, 2000).

Al inducir la diferenciación de una línea celular de EC se encontró que hay un incremento transitorio de la expresión de *Oct4* acompañado del aumento de expresión de *Osteopontina* (*Opn*), un gen que codifica para una molécula de matriz extracelular involucrada en la diferenciación del endodermo primitivo. En

el primer intrón de este gen se identificó una secuencia PORE a la cual OCT4 se une como homodímero y activa la expresión de *Opn* (Botquin *et.al.*, 1998). Por el contrario, cuando OCT4 forma un heterodímero con SOX2 actúa como un represor de *Opn* (Botquin *et.al.*, 1998). Este ejemplo hace evidente que los cofactores son un elemento importante para determinar el efecto regulador de OCT4 en sus genes blancos.

Algunas moléculas que se expresan en el trofoectodermo son blancos reprimidos por OCT4, como por ejemplo la gonadotropina coriónica humana (GCh) y el interferón tau (*Ifn $\tau$* ). GCh es una hormona que durante el embarazo previene la regresión del cuerpo lúteo. En células EC, OCT4 actúa como represor de la expresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la GCh (Liu *et.al.*, 1997). OCT4 es capaz de interactuar con el dominio de unión a DNA de algunos factores transcripcionales e impedir que éstos activen a sus genes blanco. Tal es el caso de *Ifn $\tau$* , *FoxA1* y *FoxA2*. La transcripción de *Ifn $\tau$* , que normalmente es activada por el factor transcripcional ETS2, es reprimida cuando OCT4 se asocia a ETS2 formando un co-represor (Ezashi *et.al.*,2001). De igual forma, la expresión de *FoxA1* y *FoxA2* (factores transcripcionales asociados a la diferenciación temprana de endodermo) normalmente es activada por FOXD3. Al unirse OCT4 a FOXD3, inhibe la expresión de *FoxA1* y *FoxA2* (Guo *et.al.*, 2002). Existe evidencia de otros genes que se expresan en trofoectodermo, como *Cdx2* y *Hand1*, que pueden ser reprimidos directa o indirectamente por OCT4 (Niwa *et.al.*,2000).

### **1.5 Función de Oct4 : pluripotencialidad vs diferenciación.**

Como ya he mencionado, *Oct4* es considerado un marcador del “ciclo totipotencial del ratón” (Yeom *et.al.*,1996). El cigoto es una célula totipotente ya que puede generar todos los tipos celulares en un organismo. Sin embargo, las células pierden potencial diferenciativo conforme avanza el desarrollo. Las células de la MCI y del epiblasto son pluripotentes, ya que si bien pueden generar todos los tipos celulares embrionarios, han perdido la potencialidad de generar tejidos extraembrionarios. *In vivo*, grupos de células pluripotentes se

autorenuevan y dan lugar a una población proliferativa progenitora de la cual se generan células diferenciadas.

Poco se sabe a nivel molecular sobre cuales son los requerimientos de las células para preservar la pluripotencialidad, los datos que se tienen provienen principalmente del estudio de líneas celulares pluripotentes, tales como las células ES, las células EC y las células EG. Dichas líneas celulares presentan las siguientes características: 1) llevan a cabo divisiones simétricas de autorenovación, 2) tienen la capacidad de diferenciar en células de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo y 3) pueden integrarse a embriones tempranos (blastocistos) contribuyendo en la formación de todos los tipos celulares, incluyendo las CGPs.

Hasta el momento se conocen tres vías que participan en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular: *Oct4*, *gp130/Stat3* y *Nanog*. Si bien ninguna de estas vías es indispensable, debe haber un balance entre las señales de éstas para mantener la pluripotencialidad celular (Niwa, 2001, Chambers et.al., 2003).

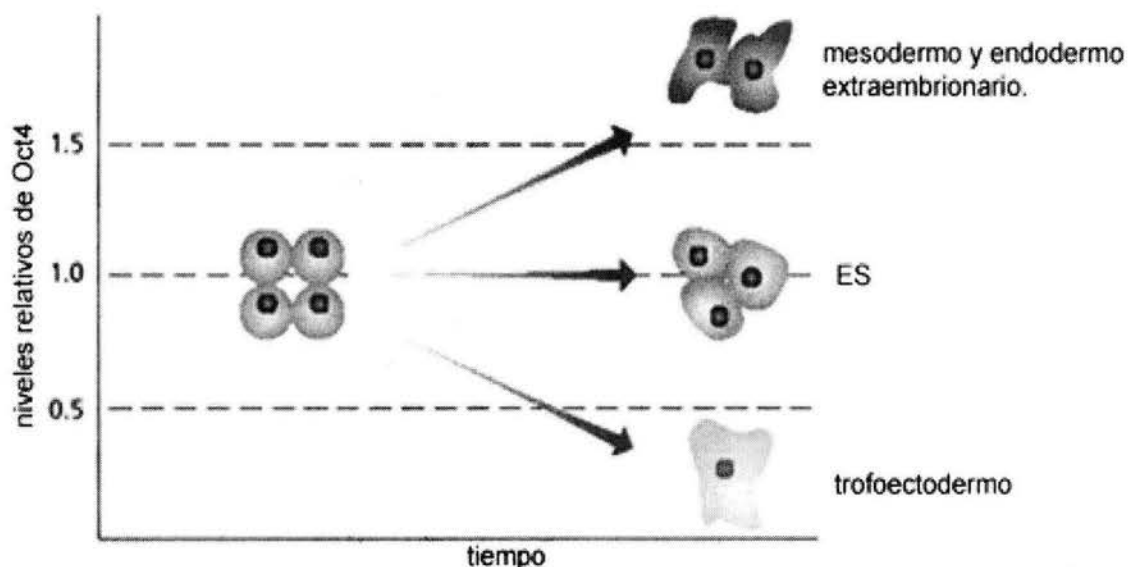
*Oct4* interviene en el mantenimiento de la potencialidad en el embrión temprano, y también hay evidencias de su participación en la determinación hacia diferentes destinos celulares de células que provienen de poblaciones pluripotentes. Dichas evidencias provienen de estudios realizados *in vitro* e *in vivo* y se presentan a continuación.

### **1.5.1. Estudios *in vitro***

En un trabajo realizado por Niwa (Niwa *et.al.*, 2000) se analizó el efecto de alterar en células ES los niveles de expresión de *Oct4* por medio de un promotor inducible por tetraciclina (el transgen se activa en ausencia de tetraciclina). En dicho estudio se determinó que los niveles de expresión de *Oct4* regulan distintos destinos celulares en ES (Fig.4). En células ES, existe un nivel crítico de expresión de *Oct4* para que éstas mantengan su pluripotencialidad, al incrementar al menos un 50% la expresión endógena de *Oct4* las células diferencian, expresando *T (brachyury)*, un marcador mesodérmico, y *Gata 4*, un

marcador de endodermo parietal/visceral. En contraste, al reducir un 50% la expresión endógena de *Oct4* las células ES diferencian hacia trofoectodermo, adquiriendo en un inicio marcadores de trofoblastos proliferativos: *Cdx-2*, *Hand1*, *Esrrb*, *Mash2* y *Tppb*; y posteriormente marcadores de trofoblastos maduros como *Pl1*. También se analizó el efecto de incrementar la expresión de *Oct-4* sobre la regulación de sus blancos y encontraron que se incrementó un poco la expresión de *Otx1* y *Ebaf*, la expresión de *Fgf4* no se alteró, y se reprimió la expresión de *Upp* y *Rex-1*. Un dato importante que se obtuvo en este estudio es que, en ausencia de LIF, mantener la expresión de *Oct4* en ES no es suficiente para mantener la pluripotencialidad.

En este mismo sentido, en ausencia de LIF y SFB, mantener la expresión de *Oct4* en células ES causa su diferenciación hacia células tipo neuroectodermo, que expresan los marcadores *Sox2*, *Otx1* y *Emx2*; y que posteriormente son capaces de diferenciar hacia neuronas (Shimozaki *et.al.*, 2003). Se propone que *Oct4* pudiera estar actuando mediante la activación del factor de transcripción *Sox2*, el cual es indispensable para la diferenciación del neuroectodermo.



**FIGURA 4.** Alterar los niveles de expresión de *Oct4* produce la diferenciación de las ES (modificado de Niwa *et.al.*, 2000).

En células ES se disminuyó la expresión de *Oct4* por medio de RNA de interferencia. En este estudio, al disminuir los niveles de *Oct4* las células ES diferenciaron hacia destinos endodérmicos y trofoblásticos (Hay *et.al.*, 2004).

### **1.5.2 Estudios *in vivo***

#### **El ratón nulo para *Oct-4*.**

Como una aproximación para entender la función *in vivo* de *Oct4* se generó un ratón nulo en el que los exones 2 al 5, correspondientes al sitio de unión a DNA y la región carboxilo terminal de *Oct4*, fueron reemplazados por la secuencia de  *$\beta$ -geo*. Los embriones nulos para *Oct-4* se desarrollaron hasta formar una mórula compacta y generaron una estructura parecida a un blastocisto, cuyas células internas fueron incapaces de formar la MCI. En su lugar las células adquirieron morfología y marcadores del linaje trofoblástico, como *H19* y *Mash2*. Es decir, los embriones nulos para *Oct-4* fueron incapaces de formar la MCI, la población de células pluripotentes que da lugar a todos los tejidos embrionarios (Nichols *et.al.*, 1998).

#### ***Pou2*: ortólogo de *Oct-4* en el pez cebra.**

Una de las ventajas en el estudio del pez cebra es el análisis genético que se puede realizar en bancos de mutantes generados a través de inserciones retrovirales o por mutagénesis química. En búsqueda de mutantes con fenotipos en el desarrollo embrionario se encontró una mutación que llamaron *spiel-onhe-grenzen* (*spg*). Los embriones mutantes *spg* presentan fenotipos que van desde la reducción del cerebelo hasta la desaparición completa del organizador del istmo (OI, estructura involucrada en la formación del cerebro medio y posterior que se describirá más adelante), vesículas óticas pequeñas y malformadas, además de colas mas pequeñas y curvadas anormalmente. En este mutante la inserción retroviral interrumpe el dominio POU del gen *pou2*. En el estadio de pregástrula, las células pluripotentes del mutante *spg* detienen la división celular, lo cual podría ser equivalente al efecto del ratón nulo para *Oct4* en el estadio de blastocisto. En una etapa posterior del desarrollo, durante la

morfogénesis del cerebro, la pérdida de función de *pou2* afecta el establecimiento del OI. Aunque no se ha descrito la función de *Oct4* durante el establecimiento del cerebro en ratón, el cDNA de *Oct4* murino es capaz de rescatar el fenotipo de los mutantes *spg*. Este dato, aunado a que *pou2* pertenece a la clase V de la familia de factores transcripcionales POU, la misma clase a la que pertenece *Oct4*, y que su localización cromosómica es muy parecida a la de *Oct4* en ratón, permitió establecer que *pou2* es el ortólogo de *Oct-4* en el pez cebra (Burgess *et.al.*,2002; Reim y Brand, 2002). Otro fenotipo de los mutantes *spg* es su incapacidad a responder al factor de crecimiento fibroblástico 8 (*Fgf8*). Dado que FGF8 es una molécula que puede mimetizar la función del OI en el establecimiento del cerebro medio y posterior, se analizó si éste era capaz de rescatar el fenotipo en el cerebro medio y posterior de los mutantes *spg*. Así se dieron cuenta que *Fgf8* inicia su expresión normalmente, pero al fin de la gastrulación se apaga en los mutantes. Además los mutantes son incapaces de responder a perlas impregnadas con FGF8, a pesar de que expresan el receptor (FgfR1) y de que la vía de de trasducción de Fgfs ( la vía de las MAP cinasas) parece normal. Lo anterior sugiere que *pou2* hace a las células competentes para responder a *Fgf8* (Reim y Brand, 2002).

## **2 El organizador del Istmo**

### **2.1 Establecimiento y mantenimiento del Organizador del Istmo.**

El sistema nervioso central (SNC) se origina a partir del endodermo en el embrión gastrulante. Una combinación de señales provenientes del nodo, el ectodermo-no-neural y el mesendodermo axial, inducen la formación de la placa neural y su regionalización en el eje antero-posterior. En la neurulación, la placa neural se cierra dando lugar al tubo neural. En esta etapa, el tubo neural se divide en tres vesículas: cerebro anterior o prosencéfalo, cerebro medio o mesencéfalo y cerebro posterior o romboencéfalo. Posteriormente, la regionalización en el eje antero-posterior de estas vesículas se perfecciona gracias a la acción regiones organizadoras secundarias, tales como la cresta neural anterior (CNA) y el organizador del istmo (OI). El OI se localiza en la

frontera del cerebro medio y el posterior, y es responsable del desarrollo de todos los tipos celulares y núcleos neuronales del mesencéfalo, así como del cerebelo en el romboencéfalo. La región se denomina mes/met, ya que comprende el mesencéfalo y el metencéfalo anterior (región anterior del romboencéfalo).

La actividad organizadora del OI se demostró en pollo mediante trasplantes. Si se transplanta el OI en el diencéfalo se forma un cerebro medio ectópico. Si se transplanta el OI en el cerebro posterior llevan a la formación de un cerebelo ectópico. A nivel molecular, la actividad organizadora del OI parece ser mediada por el factor secretable FGF8 (Crossley *et.al.*,1996).

Durante el desarrollo del OI se pueden distinguir dos etapas: la de establecimiento y la de mantenimiento. En la fase de establecimiento, aproximadamente en E7.5, la expresión complementaria de los factores de transcripción, *Otx2* (*orthodenticle homologue 2*) en el cerebro anterior y medio, y *Gbx2* (*gastrulation brain homeobox 2*) en el cerebro posterior, delimita la región en la que se formará el OI. Un poco después, alrededor de esta frontera se activa independientemente la expresión de *Pax2*, *En*, *Wnt1* y *Fgf8*. En la fase de mantenimiento la expresión de las moléculas en el OI se vuelve interdependiente, estableciéndose circuitos de autoregulación positiva y negativa (Fig.5) (Rhinn y Brand, 2001).

En el establecimiento del OI, el factor de transcripción *Pax2* (*paired box 2*) es el primero que aparece sobre la interfase *Otx2/Gbx2* (Rowitch y McMahon, 1995). Al inicio de la gastrulación (en estadio de 1 somita) la molécula secretable *Wnt1* comienza a expresarse en el OI, únicamente en la población de células que expresan *Otx2* (Bally-Cuif *et.al.*,1995); al mismo tiempo que el factor transcripcional *En1* (*engrailed1*) se expresa en toda la región mes/met (Davis y Joyner, 1988). En el estadio de 3-5 somitas comienza la expresión de *En2*, *Pax5* y *Fgf8*, pero mientras *En2* y *Pax5* se expresan alrededor de la frontera *Otx2/Gbx2* (Davis y Joyner, 1988; Asano y Gruss,1992), *Fgf8* se expresa solo en la región positiva para *Gbx2* (Crossley y Martin,1995) (Fig.5). Es importante

señalar que hasta el momento se desconocen las señales que activan la expresión de *Pax2*, *Wnt1* y *Fgf8* en esta región.

En la fase de mantenimiento, la expresión estable de cada uno de los factores: *Fgf8*, *Wnt1*, *En1*, *En 2*, *Pax2* y *Pax5*, es dependiente de la expresión de los otros. Además existen al menos dos reguladores negativos que restringen la expresión de las moléculas en el OI: *Sprouty* y *Grg4*. FGF8 induce la expresión de *Sprouty*, el cual es capaz de inhibir la vía de señalización de Fgf. El inhibidor transcripcional *Grg4* se expresa en la región mes/met, es capaz de inhibir la expresión de *En* y antagonizar la actividad de *Pax5* (Wurst y Bally-Cuif,2001; Rhinn y Brand,2001).

## 2.2 *Otx2* / *Gbx2*

El ratón nulo para *Otx2* tiene un fenotipo muy severo ya que no desarrolla cerebro. Mutantes nulos para *Otx1* heterocigos para *Otx2* (*Otx1*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup>), no tienen mesencéfalo y en su lugar tienen expandido el metencéfalo, al mismo tiempo que la expresión de *Fgf8*, *Gbx2* y *Wnt1* aparece en una posición más rostral que en la situación silvestre. Dirigir con el promotor de *En1* la expresión de *Otx2* a una posición más caudal hace que la expresión de los marcadores del OI sea más caudal. Por su parte, el ratón nulo para *Gbx2* carece de cerebelo, de los rombómeros 1-3, y el mesencéfalo posterior se extiende a una posición más caudal. De igual manera, la expresión *Wnt1* y *Otx2* se hace más caudal y se sobrelapa con la expresión *Fgf8*. Por otro lado, la expresión de *Gbx2* bajo el promotor de *Wnt1*, reprime a *Otx2* e induce a *Fgf8*, *Otx2* y *Wnt1* en una región más rostral. Experimentos de expresión ectópica corroboran los datos obtenidos por los mutantes y han permitido establecer que *Otx2* y *Gbx2* no son necesarios para inducir la expresión de los marcadores del OI, sino que mas bien controlan su posición. Se ha propuesto que la expresión asimétrica de *Otx2* y *Gbx2* da a las células una competencia diferencial para responder a las señales que emanan del OI (Wurst y Cuif,2001; Liu y Joyner, 2001; Rhinn y Brand, 2001).



### 2.3 Pax2.

*Pax2* se activa inicialmente sobre la frontera de expresión de *Otx2* y *Gbx2*, y su dominio de expresión se define posteriormente, durante la somitogénesis, a un estrecho anillo centrado en el OI (Rowitch y McMahon, 1995). En la misma región se activa secuencialmente la expresión de *Pax5* y *Pax8* (Rowitch y McMahon, 1995). La activación secuencial de los genes *Pax 2/5/8* en el MHB es un evento conservado en todos los vertebrados (Pfeffer *et. al.*, 1998). Las mutaciones en *Pax2* resultan en la pérdida del cerebro medio y cerebelo, tanto en pez cebra (Lun y Brand, 1998) como en ratones. *Pax2* es capaz de activar la expresión de *Pax5*, *Pax8*, *En2* y *Fgf8* en el OI (Pfeffer *et. al.*; 1998 Ye *et al.*, 2001; Song y Joyner, 2000; Ye *et. al.*, 2001). La región reguladora de *Pax2* contiene 3 enhancers que se requieren para su expresión en el OI durante diferentes momentos del desarrollo. El enhancer intermedio dirige la expresión inicial de *Pax2* (a partir de E7.5), contiene sitios de unión para proteínas con dominio POU, y es capaz de unir con alta afinidad *Oct1* y *Oct4* (Pfeffer *et.al.*,2002).

### 2.4 Fgf8

*Fgf8* es una molécula secretable que durante el desarrollo embrionario participa en la gastrulación, la simetría izquierda-derecha, en el establecimiento y desarrollo del corazón, la inducción y desarrollo de las extremidades, el oído, el telencéfalo y el organizador del istmo entre otros (Meyers *et al.*, 1998; Sun *et al.*,1999; Moon y Capecchi, 2000; Reifers *et al.*, 2000; Dubrulle *et al.*, 2001). En embriones en E9 se expresa en el ectodermo apical de las extremidades en desarrollo, el surco primitivo, el primordio de la cola, el ectodermo del primordio facial y el organizador del istmo (Crossley y Martin, 1995). El ratón nulo para *Fgf8* es letal en la gastrulación , pero un mutante de un alelo hipomórfico que sobrevive a la gastrulación no tiene mesencéfalo ni cerebelo (Meyers *et.al.*, 1998). Una mutación puntual en *Fgf8* en el mutante *ace* (*acerebellar*) del pez cebra, genera una proteína truncada que produce un fenotipo severo en donde no se desarrolla el OI ni el cerebelo. Dicha mutante muestra la expresión inicial de *eng*, *wnt1* y *pax2.1*, pero se pierde conforme la gastrulación avanza (Brand

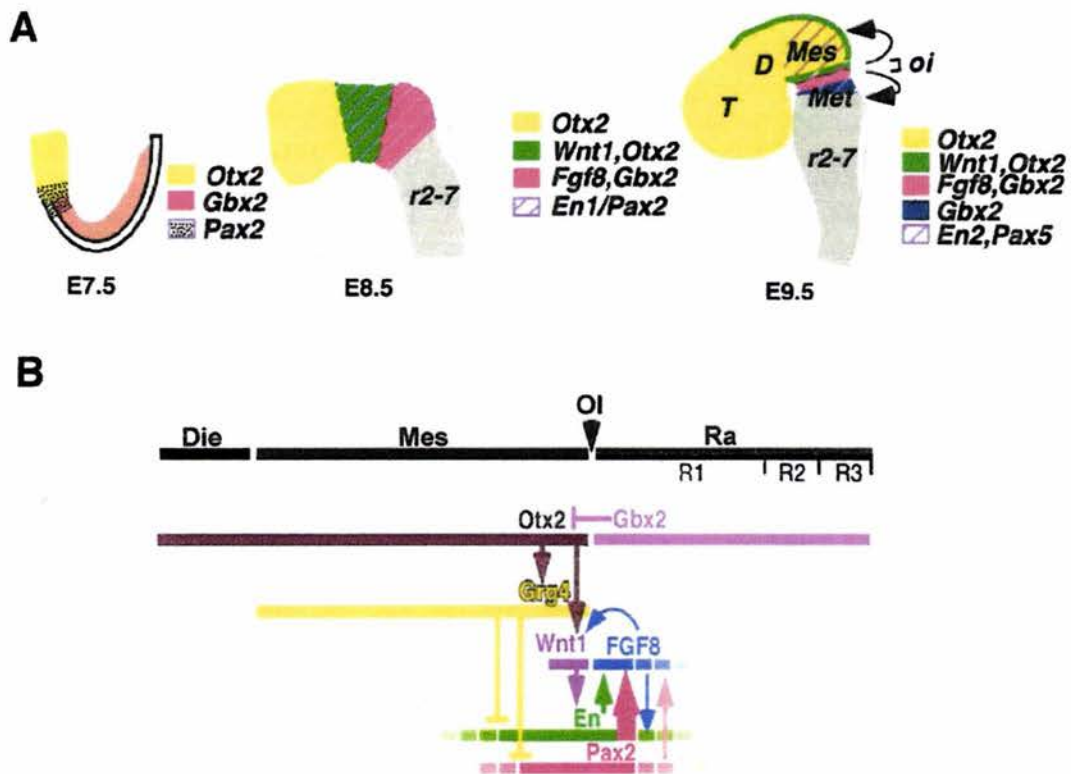
*et.al.*, 1996). Los fenotipos presentados tanto en ratón como en el pez cebra indican que *Fgf8* tiene una función conservada en el desarrollo de la región mes/met. Al implantar perlas saturadas con la proteína FGF8 en diferentes regiones del cerebro de pollo, se induce la expresión ectópica de marcadores del OI al mismo tiempo que se desarrollan estructuras mesencefálicas y del cerebelo, sin embargo no todas las regiones del cerebro son competentes para responder a la señal de *Fgf8* (Wurst y Cuif,2001; Liu y Joyner, 2001). Además, se ha propuesto que mantener la expresión de *Fgf8* es esencial para la sobrevivencia celular en la región mes/met, y que la delección de dicha región en los mutantes nulos para *Wnt1*, *En1/2* y *Pax2/5* se debe a la muerte celular extensiva que se produce por la pérdida de la expresión de *Fgf8* (Chi *et.al.*, 2003). En otra región del cerebro de ratón, el telencéfalo, se ha demostrado que aumentar o disminuir los niveles de expresión de *Fgf8* con respecto a su nivel basal produce apoptosis (Storm *et.al.*,2003).

## **2.5 En1/2.**

La mutante nula para *En1* carece de cerebelo y casi todo el mesencéfalo. La mutante nula de *En2* es viable y muestra un leve fenotipo en el cerebelo. Sin embargo, el cDNA de *En2* rescata el fenotipo del cerebelo y el mesencéfalo de la mutante de *En1*. Mutantes dobles *En1/2* tienen un fenotipo más severo en la región mes/mes que las mutantes sencillas, en donde se vió que la activación inicial de *Fgf8*, *Wnt1* y *Pax5* no requieren de En. Como las proteínas En son represores transcripcionales, se propone que al menos parte de su función sea establecer los límites del OI mediante la represión de los genes del cerebro anterior, específicamente *Pax6* (revisado en Liu y Joyner, 2001).

## **2.6 Wnt1**

Los embriones mutantes nulos para *Wnt1* no desarrollan mesencéfalo ni cerebelo (McMahon y Bradley,1990). Al parecer *Wnt1* actúa como mitógeno y mantiene la expresión de *En1*, pero no puede mimetizar la función del organizador (Liu y Joyner, 2001).



**FIGURA 5.** Expresión de los marcadores del OI durante el desarrollo embrionario. En (A) se muestra la región donde se expresa cada una de las moléculas desde la etapa de establecimiento del OI (E7.5) hasta la de mantenimiento (E9.5). En (B) se muestra la interacción entre estas moléculas (modificado de Liu y Joyner, 2001).

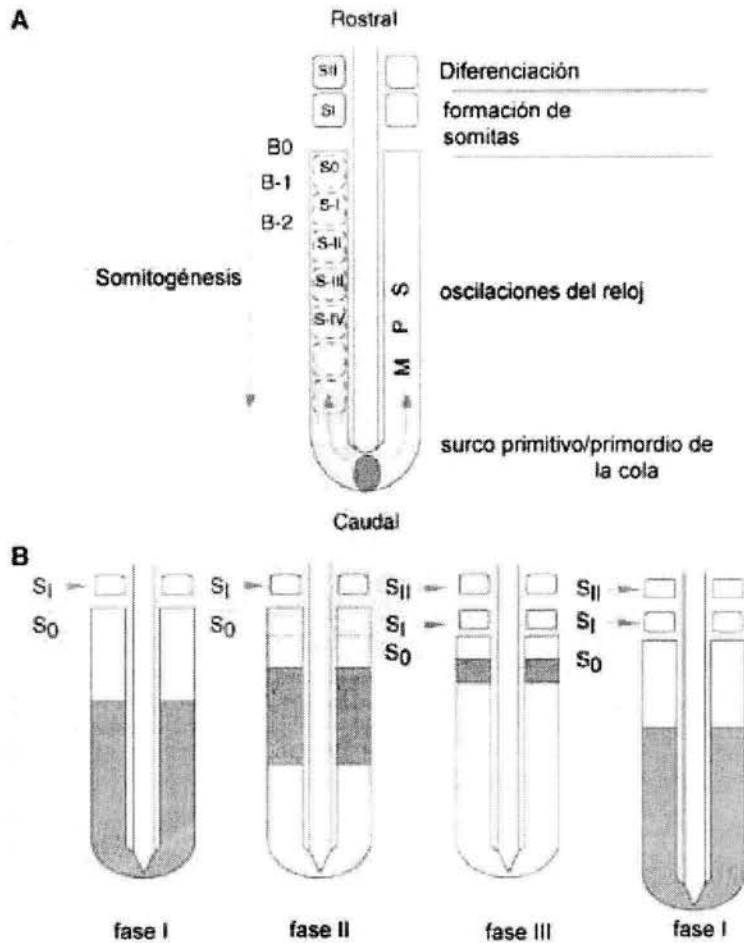
### 3 Somitogénesis.

Durante la gastrulación, las células del epiblasto pasan por el surco primitivo y emergen con una nueva identidad, formando parte de alguna de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo o ectodermo. Para el E10, el primordio de la cola ("tailbud") reemplaza al surco primitivo en la generación del nuevo tejido; contiene una población pluripotente que sostiene el desarrollo de la cola, y además si se extirpa esta región, se detiene la somitogénesis y la elongación axial (Hirsinger *et al.*, 2000; Pourquié, 2001).

El mesodermo paraxial da lugar a los somitas, bloques de células mesodérmicas que se forman en ambos lados del tubo neural; los cuales son

estructuras transitorias importantes en el establecimiento de los segmentos corporales en los vertebrados. Las somitas generan los huesos y cartílago de vértebras y costillas, músculo esquelético de la espalda, de la pared corporal y las extremidades, y dermis en la espalda del embrión. Su formación comienza cuando grupos de células en la región más anterior del mesodermo presomítico (MPS) se organizan en estructuras llamadas somitómeros. Los somitómeros se compactan y se unen por la formación de un epitelio, separándose del MPS para formar nuevas somitas. Conforme las somitas se separan, empiezan a diferenciar en respuesta a señales de los tejidos adyacentes. Cada somita se subdivide en un dominio rostral y un dominio caudal, y cada compartimento se fusiona con el de la somita vecina para dar lugar a una vértebra. El número de somitas es un buen indicador del desarrollo embrionario y es fijo para cada especie, por ejemplo el ratón tiene un total de 65 somitas (Saga y Takeda, 2001; Dale y Pourquié, 2000; Pourquié, 2001).

La somitogénesis ocurre simultáneamente con la regresión del surco primitivo. En pollo, conforme las células pasan por el nodo de Hensen forman una población de células pluripotentes que comienzan a expresar *Fgf8*. Las divisiones asimétricas de dicha población producen células hijas con capacidad de autoregenerarse y células progenitoras del MPS, que adquieren posiciones más rostrales conforme avanza la somitogénesis. La segmentación de las somitas requiere la actividad de un oscilador bioquímico, conocido como reloj de segmentación. Genes ligados a las vías de Notch y de Wnt tienen una expresión dinámica y temporal en la región posterior del MPS (Saga y Takeda, 2001; Pourquié y Tam, 2001; Vasiliasuskas y Stern, 2001). La expresión de dichos genes oscila en la región en que se expresa *Fgf8*, una vez que las células salen del dominio de *Fgf8*, la expresión de dichos genes se estabiliza, especificándose la nueva somita (Fig.6). En la formación de las somitas, en cada ciclo del reloj se van activando secuencialmente los genes *Hox*, de los más 3' a los más 5', estableciéndose la identidad axial de éstas estructuras (Saga y Takeda, 2001; Pourquié, 2001; Vasiliasuskas y Stern, 2001).



**FIGURA 6.** Somitogénesis. **(A)** Las somitas son numerados en dirección rostro-caudal: (S<sub>0</sub>)somita en formación, (S<sub>I</sub>) somita recién formada, (S-<sub>I</sub>) siguiente somita por formarse. **(B)** En el MPS posterior, la expresión de *c-Hairy1*, *c-Hairy2*, *c-Hey2*, HES1, HES7, *Her1* y *Lunatic Fringe*, oscilan según la dinámica mostrada en gris. En la fase I se expresan en una amplia región del dominio caudal, en la fase II la expresión se recorre hacia un dominio más restringido del dominio medio del MPS, en la fase III la expresión de los genes se estabiliza en el MPS anterior, justo donde ya no se expresa *Fgf8*. Esta secuencia se repite en la formación de cada somita. En pollo, todo el proceso toma 90 minutos (modificado de Pourquie y Tam,2001).

## JUSTIFICACIÓN

Dado que *Oct4* se expresa en las células pluripotentes del embrión temprano y en la línea germinal de ratón, el estudio de dicho factor transcripcional se ha centrado en su participación en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular. Sin embargo, en el embrión temprano *Oct4* también se expresa en el neuroectodermo, en el mesodermo presomítico y las somitas. Dado que el ratón nulo para *Oct4* muere antes de la implantación, con este modelo no es posible conocer la función de *Oct4* en las otras regiones en que se expresa. Por otro lado, estudios *in vitro* revelan que al incrementar o disminuir lo niveles de expresión de *Oct4*, las células pluripotentes diferencian a mesendodermo o trofoectodermo respectivamente, lo que sugiere que también puede participar en la diferenciación celular. Por lo anterior y con el fin de estudiar el efecto de incrementar el nivel de expresión de *Oct4 in vivo*, en el presente trabajo generamos líneas de ratones transgénicos que lo expresan ubicuamente.

Con nuestro modelo experimental podemos analizar el efecto de incrementar la expresión de *Oct4* en el neuroectodermo, el mesodermo y las somitas. Dado que el ortólogo de *Oct4* en el pez cebra, *pou2*, participa en el establecimiento del OI, en el presente trabajo nos concentramos en analizar si dicha función esta conservada en el ratón.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Estudiar *in vivo* posibles funciones del gen *Oct4*, mediante la generación de ratones transgénicos con una expresión generalizada de dicho factor transcripcional.

### **Objetivos particulares:**

- ◆ Generar ratones transgénicos que expresen ubicuamente *Oct4*.
- ◆ Describir los fenotipos producidos por el incremento de expresión de *Oct4* durante el desarrollo embrionario.
- ◆ Analizar el fenotipo de la sobreexpresión de *Oct4* en el neuroectodermo:
  - Caracterizar a nivel celular y molecular el efecto en el OI.
  - Determinar la posible función de *Oct4* en el establecimiento del OI.

## ANTECEDENTES

En 1998 Nichols y cols. generaron el ratón nulo para *Oct4*, el cual resultó letal en el estadio preimplantación. En este estudio se estableció que *Oct4* es un gen que interviene en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular, pero debido a su temprana letalidad no fué posible estudiar funciones diferentes a ésta en etapas más tardías del desarrollo embrionario. Los estudios realizados con células ES de ratón y con el pez cebra, aportan evidencias de que *Oct4* participa en la determinación de células que provienen de poblaciones pluripotentes. Por lo anterior decidimos generar un modelo experimental con el cual pudieramos estudiar el efecto de incrementar el nivel de expresión de *Oct4* *in vivo*

El sistema CRE-loxP ha sido muy útil cuando se quieren establecer líneas transgénicas en las que el producto del transgen impide la sobrevivencia del embrión y/o su desarrollo embrionario. Como éste era el caso del gen que nos interesaba estudiar, en el presente trabajo usamos el sistema CRE-loxP para generar la ganancia de función de *Oct4*. La recombinasa CRE del bacteriofago P1 de *E.coli*, reconoce secuencias consenso de 34 pares de bases (pb) llamadas sitios *loxP*, y cataliza eficientemente la recombinación entre ellos. Cuando los sitios *loxP* se encuentran en la misma orientación en cis, la recombinasa escinde el DNA que se encuentra entre éstos. En éste sistema se requiere introducir los sitios *loxP* al genoma de las células por integración al azar o bien por mutagénesis dirigida. También es necesario el dirigir la expresión de la recombinasa mediante un promotor tejido/tiempo específico. La recombinasa CRE y sus blancos *loxP* fueron introducidos independientemente en ratones transgénicos, los cuales al cruzarse generan una progenie en la que se manifiesta la acción de la recombinasa (Fig.7). De ésta manera fuimos capaces de generar ratones transgénicos con una expresión generalizada de *Oct4* y cuya caracterización se describe en este estudio.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1 Animales.

Los ratones silvestres que se usaron en este estudio son de la cepa CD1.

#### 1.1 Líneas transgénicas:

**FATN<sup>Cre</sup>** : Para dirigir la expresión de la recombinasa Cre a la línea germinal, se insertó su cDNA entre los exones 6 y 7 del gene de la fosfatasa alcalina tejido no específica (FATN). De esta forma se obtuvo la línea transgénica FATN<sup>Cre</sup>, que expresa la recombinasa Cre bajo la región regulatoria del gene de la fosfatasa alcalina tejido no específica (FATN), un gene que se expresa en la línea germinal de ratón (Lomelí et.al.,2000). La línea fue mantenida como heteróciga por medio de cruza con ratones silvestres CD1 y por PCR se determinaban los ratones portadores de CRE.

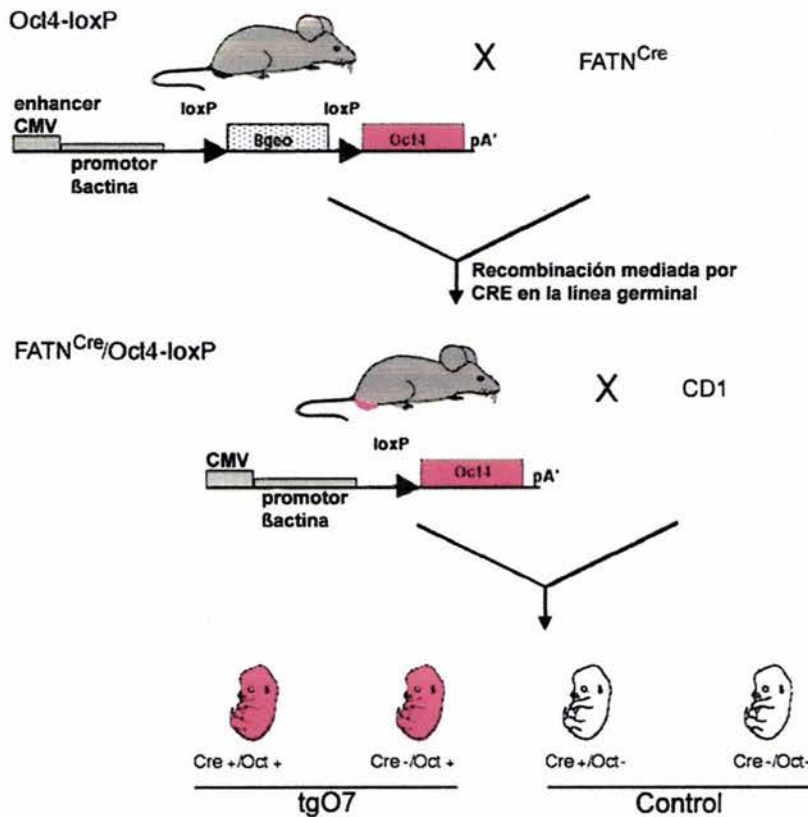
**Oct4-loxP**: Para generar las líneas transgénicas Oct4-loxP se usó el vector pCALL (Lobe et.al.,1999) que contiene el gene reportero lacZ/neomicina ( $\beta$ geo) flanqueado por sitios loxP, cuya expresión está dirigida a todos los tejidos por el enhancer del citomegalovirus (CMV) y el promotor de  $\beta$ -actina (Lobe et.al.,1999). Las líneas Oct4-loxP7 y Oct4-loxP20, fueron generadas a partir de una construcción donde se insertó la secuencia codificante de Oct4 en un sitio BglII que se encuentra después del segundo sitio loxP. Sin embargo, era posible que hubiera problemas de traducción a partir de esta construcción ya que llevaba accidentalmente un ATG antes del propio ATG de Oct4. Por este motivo se generaron otras líneas, Oct4-loxPG9 y Oct4-loxPF12, que llevan una construcción alternativa en que la secuencia codificante de Oct4 se insertó en un sitio XhoI después del segundo sitio loxP. De esta manera las líneas Oct4-loxP expresan ubicuamente el gene reportero antes de que se lleve a cabo la recombinación por Cre.

**Dobles transgénicos FATN<sup>Cre</sup>/ Oct4-loxP**: Machos de la línea FATN<sup>Cre</sup> se cruzaron con hembras de la línea Oct4-loxP. Por PCR se identificaron de la progenie los dobles transgénicos FATN<sup>Cre</sup>/Oct4-loxP, en los cuales la

recombinasa escinde el gene reportero entre los sitios *loxP* y el *Oct4* transgénico se expresa únicamente en la línea germinal (Fig.7).

### 1.2 Obtención de embriones con sobreexpresión de *Oct4*:

Machos  $FATN^{Cre}/Oct4-loxP$ , portadores de gametos con el transgene *Oct4-loxP*, se cruzaron con hembras silvestres (CD1) y la progenie se genotipificó por PCR para identificar las crías que provienen del alelo escindido del transgen, mismos que expresan ubicuamente *Oct4* (Fig.7), crías de la misma camada que resultaron negativas para el PCR fueron usados como controles silvestres. El día en que se encontró el tapón vaginal indicativo de la cópula fue considerado como día embrionario 0.5 (E0.5).



**FIGURA 7.** Estrategia experimental. Esquema de cruzas entre las líneas  $FATN^{Cre}$  y  $Oct4-loxP$  para obtener machos  $FATN^{Cre}/Oct4-loxP$ . Los dobles transgénicos se cruzan posteriormente con hembras silvestres de la cepa CD1, y en la progenie se identifican por PCR las crías que portan el alelo activado del transgen de *Oct4* (tgO7). Las crías de la misma camada que no portan el alelo activado se usan como controles.

## 2. Genotipificación.

El genotipo de nuestros ratones transgénicos se estableció amplificando por PCR (polimerase chain reaction) secuencias provenientes del transgene en DNA genómico. Tejido de oreja ( ratones adultos) o de saco vitelino (embriones), se colocó en 50 µl de buffer de lisis (50µM KCl, 10mM Tris pH=8.3, 2mM MgCl<sub>2</sub> , 0.01% gelatina, 0.45% NP-40 , 0.45% Tween 20 y 100µg/ml de proteinasa K) y se incubó por un mínimo de 6 hr a 50 °C. Después de la incubación se inactivó la proteinasa K calentando las muestras a 95°C por 15 min y se tomaron 2 µl como templado para la reacción de PCR.

Reacción :

Componentes	Concentración final
Buffer 10X PCR sin Mg (Invitrogen)	1X
dNTP 10mM	0.2mM (cada uno)
MgCl <sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)	1.5mM
Oligos	1 – 3 ng
Taq Polimerasa (Platinum Invitrogen)	2.5 unidades
Templado DNA	2µl
H <sub>2</sub> O	cbp 15 µl

En todos los casos se usaron las mismas concentraciones finales para el PCR. El par de oligos y las condiciones de amplificación fueron diferentes para identificar los distintos transgenes .

### **FATN<sup>Cre</sup> :**

Los oligos PGKpA/U1 y TNAP/ex6L amplifican un fragmento de 262 pb.

TNAP/ex6L :	CAC GTC GAT GGC CGC TCT A
PGKpA/U1:	TAA GGG CCA GCT CAT TCC TCC

Condiciones de amplificación:

94°C	0.45 min	
56°C	1 min	35 ciclos
72°C	1.15 min	

### **Oct4-loxP:**

Los oligos Oct4-3 y BGPA amplifican un fragmento de 518 pb.

Oct4-3:	CCT ACA GCA GAT CAC TCA
BGPA:	CAG AAG TCA GAT GCT CAA G

Condiciones de amplificación:

94°C	0.3	min	
54°C	0.45	min	35 ciclos
72°C	1	min	

### **Trangene Oct4-*loxP* después de la escisión:**

Los oligos Oct4-1 y CAGGS-1 amplifican un fragmento de 372 pb después de la escisión mediada por CRE.

OCT4-1:	AGC CTG GTC CGA TTC CAG
CAGGS-1:	GCT CTA GAG CCT CTG CTA AC

Condiciones de amplificación:

94°C	1	min	
65°C	1	min	35 ciclos
72°C	1	min	

### **3. Hibridación *in situ*.**

#### **A) Síntesis de la sonda de RNA.**

1. Reacción:

Buffer de transcripción 10X (Roche)	2µl
Mezcla de NTP's (UTP-DIG) (Roche)	2µl
Plásmido linealizado (1µg/µl)	1µl
Inhibidor RNAsa	1µl
SP6/T7 o T3 RNA polimerasa (10U/µl)	2µl
H <sub>2</sub> O DEPC	12µl

2. Incubar 2hr a 37 °C.

3. Tomar 1µl y correr en gel de agarosa para revisar si salió la transcripción.

4. Agregar H<sub>2</sub>O DEPC cbp 100µl.

5. Purificar por columna Quick Spin Columns (1274015 Roche).

6. Añadir 1µl de inhibidor de RNAsa, alicuotear y congelar a -70 °C.

#### **B) Preparación de los embriones.**

1. Disectar los embriones en PBT (PBS/0.1%Tween) DEPC 1X. De cada embrión tomar una muestra de saco vitelino para genotipificar.

2. Fijar en paraformaldehído al 4% de 4hr a toda la noche a 4°C.

3. Lavar y deshidratar los embriones como se indica:

PBT 2X	5 min
--------	-------

25% MeOH/PBT	5 min
50% MeOH/PBT	5min
75% MeOH/PBT	5min
100% MeOH	5min
Guardar en 100% MeOH a $-20^{\circ}\text{C}$	

### C) Hibridación.

#### Día 1

1. Rehidratar los embriones como se indica:

75% MeOH/PBT	5min
50% MeOH/PBT	5min
25% MeOH/PBT	5 min
PBT 2X	5 min

2. Aclarar los embriones en 2%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /PBT por 1 hr a TA.

3. Lavar 3X con PBT.

4. Permeabilizar los embriones con proteinasa K 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  a TA. El tiempo depende del estadio embrionario:

E7	3 min	E9	10 min
E8	5 min	E10	15 min

5. Lavar con 2mg/ml Glicina/PBT por 10 min.

6. Lavar 2X con PBT.

8. Fijar en 4% paraformaldehido / 0.2% glutaraldehido / PBT, 15 min a TA.

9. Lavar 4X con PBT.

10. Prehibridar con solución de hibridación (50% formamida, 5X SSC pH=4.5, 1% SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  tRNA, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparina) a  $69^{\circ}\text{C}$  por 1 hr.

11. Reemplazar con solución de hibridación fresca con la sonda de RNA marcada (250ng – 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y dejar hibridando toda la noche a  $69^{\circ}\text{C}$  en agitación suave.

#### Día 2

1. Lavar 3X con solución de hibridación 10 min a  $69^{\circ}\text{C}$  en agitación suave.

2. Lavar 3X con solución 1 (50% formamida, 5X ssC pH=4.5, 1%SDS) por 30 min a  $69^{\circ}\text{C}$  en agitación suave.

3. Lavar 3X con solución 2 (50% formamida, 2X SSC) por 30 min a  $69^{\circ}\text{C}$  en agitación suave.

4. Lavar 3X con TBST (para 100 ml: 2.5 ml Tris 1M pH=7.5, 0.8ml NaCl 5M, 0.02gr KCl, 0.1% Tween) por 5 min a TA.
5. Incubar los embriones en solución de bloqueo (1% Blocking Reagent (Roche), 10% suero de oveja inactivado en PBT) de 1 a 2.5 hr a TA.
6. Incubar los embriones con el anticuerpo anti-DIG (Roche) diluido 1:2000 en PBT toda la noche a 4°C con agitación suave.

### **Día 3**

Lavados con TBST adicionado con levamisol (SIGMA)(0.48 mg/ml):

3 X por 10 min a TA.

5X por 1.5 hr a TA.

Dejar en TBST/levamisol toda la noche a 4°C con agitación suave.

### **Día 4**

1. Lavar 3x con NTMT( 100mM NaCl, 100 mM Tris pH=9.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20, 2mM levamisol) por 10 min a TA.
2. Incubar los embriones con NTMT + NBT (3.5 µl/ml) + BCIP (3.5 µl/ml) en oscuridad y observar hasta que se vea la señal.
3. Lavar con PBT.
4. Fijar con 4% paraformaldehido.

## **4. Inmunodetección en membrana.**

### **A) Preparación de los extractos proteicos:**

A partir de cultivos de células:

1. Las células ( $2 \times 10^7$ ) se lisan en 100 µl de buffer de lisis (25mM HEPES pH=7.5, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1mM PMSF, 10 mM aprotinina) por 30 min a 4°C en agitación.
2. Centrifugar 10 min a 4°C.
3. Colectar el sobrenadante. Se separan 5 µl para la cuantificación de proteínas por Bradford, el resto mezclarlo 1:1 con sample buffer (para 50ml: 7.5 ml Glicerol, 2% SDS, 0.001% azul de bromofenol, 62mM Tris pH=7) y guardarlo a -70°C.

A partir de tejidos embrionarios:

1. Colectar los embriones en PBS fresco. De cada embrión tomar una muestra de saco vitelino para genotipificar.
2. Lisar los tejidos por sonicación en buffer RIPA (1X PBS, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) frío adicionado con inhibidores de proteasas 1.6mg/ml (Complete protease inhibitor cocktail, Roche).
3. Centrifugar 10 min a 4°C.
4. Colectar el sobrenadante. Se separan 5 µl para la cuantificación de proteínas por Bradford, el resto mezclarlo 1:1 con buffer de corrida y guardarlo a -70°C.

### **B) Inmunodetección:**

1. Cargar 40µg de proteína por carril en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%.
2. Las proteínas del gel se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) por transferencia húmeda.
3. Después de la transferencia lavar con agua la membrana y teñir con rojo Ponceau para ver las proteínas transferidas, una vez visualizadas lavar con agua.
4. Colocar la membrana en solución de bloqueo ( leche 5% en TBST) por 1 hr a TA.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo anti-OCT4 (BD Transduction Laboratories) diluido 1:500 en TBST, toda la noche a 4°C en agitación suave.
6. Lavar 3X con TBST por 10 min a TA.
7. Incubar con el segundo anticuerpo HRP Anti-ratón IgG (biomeda) 1:5000 en TBST por 1 hr a TA en agitación suave.
8. Revelar la membrana con ECL-Western blotting detection reagent (Amersham), y exponer el film.
- 9 La membrana donde se detectó la proteína de OCT4 es lavada con una solución de Glicina 0.1M pH=3 por 30 min a 37°C en agitación, para quitar los anticuerpos adheridos a la membrana y poder hacer una segunda detección de una proteína constitutiva , la β-tubulina.

10. Incubar la membrana con el anticuerpo anti- $\beta$ tubulina (Santa-Cruz) diluido 1:600 en TBST, toda la noche a 4°C en agitación suave.

11. Lavar 3X con TBST por 10 min a TA.

12. Incubar con el segundo anticuerpo HRP Anti-Rabbit IgG (biomeda) 1:5000 en TBST por 1 hr a TA en agitación suave.

13. Revelar la membrana con ECL-Western blotting detection reagent (Amersham), y exponer el film.

## **5. Histología.**

Los tejidos se fijan con 4% paraformaldehído por toda la noche a 4°C, y posteriormente se lavan 5 min. en PBS y 5 min. en NaCl 0.15mM. Posteriormente se deshidratan gradualmente con etanol al 30, 50, 70, 80, 95 y 100%, xilol:etanol (1:1) y xilol, cada uno por 30 min a TA. Luego se impregnan con xilol:parafina (1:1) y parafina 2X, cada uno por 45 min a 60°C. Se incluyen en parafina y se hacen cortes de 8  $\mu$ m.

## **6. Detección de muerte celular.**

Embriones en E9 fueron disectados y fijados con 4% paraformaldehído por toda la noche a 4°C. Seleccionamos 4 embriones controles y cuatro tgO7 de 21/22 somitas, se incluyeron en parafina y se cortaron. Las secciones de 8 $\mu$ m fueron procesadas para el ensayo de TUNEL con el reactivo In Situ Cell Death Detection Kit (Roche), en el que fundamentalmente se adiciona dUTP fluoresceinado que la enzima terminal transferasa incorpora a los extremos del DNA fragmentado durante el proceso de muerte. Las células positivas fueron contadas en el neuroepitelio de controles y tgO7. Los resultados fueron analizados por la "Prueba de T" para determinar el grado de significancia de las diferencias encontradas.

## **7. Microscopía electrónica de barrido.**

Fijar los embriones en fijador de Karnovsky (3% glutaraldehído, 0.1M cacodilato de sodio) por toda la noche a 4°C. Posteriormente tratar con 1%



OsO<sub>4</sub> y deshidratar gradualmente con etanol. Por último, secar por el método de punto crítico, y cubrir con oro. Visualizar los embriones con el microscopio electrónico de barrido (JEOL mod. 4510 LV).

## **8 . Tinción de cartilago.**

1. Deviscerar y quitar la piel a los embriones.
2. Fijar con etanol a TA por 24 hr.
3. Permeabilizar con acetona a TA por 24 hr en agitación ligera.
4. Teñir con la solución 0.3% Azul Alciano, 0.1% Alizarina Roja, 70% etanol, 0.05% acetona de 1 a 2 días a TA.
5. Aclarar en 1% KOH, 20% glicerol varios días hasta ver bien el esqueleto.
6. Almacenar en glicerol:etanol (1:1).

## **9. Tinción con X-gal.**

1. Fijar la muestra en la solución 1% paraformaldehido, 0.2% glutaraldehido, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, por 20 min a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS 1X.
3. Teñir en la solución 5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml Xgal (40mg/ml), en obscuridad a 37°C por toda la noche.

## RESULTADOS

### 1 Obtención de embriones con expresión ubicua de *Oct4*.

Para producir ratones transgénicos que expresaron *Oct4* en todo el organismo se usó el sistema *Cre/loxP*, en el cual se utiliza la recombinasa del fago P1 de *E.coli*, cuya propiedad es escindir *in vivo* el DNA que se encuentra entre los sitios consenso *loxP* cuando están ubicados en la misma dirección.

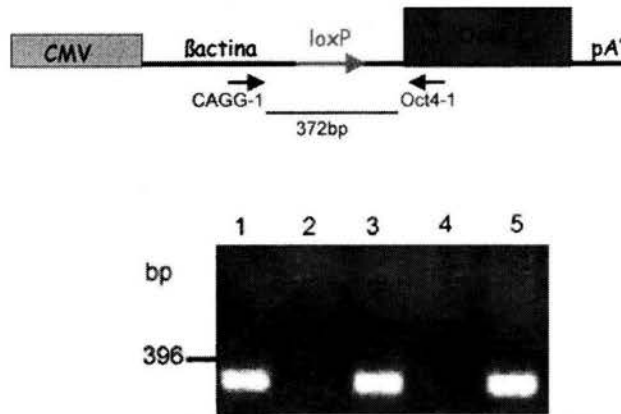
**1.1 Línea transgénica *FATN<sup>Cre</sup>***: Expresa la recombinasa Cre bajo la región reguladora del gen de la fosfatasa alcalina tejido no específica (FATN). Un análisis previo de esta línea nos permitió saber que un 50% de los machos *FATN<sup>Cre</sup>* expresan la recombinasa exclusivamente en la línea germinal (n=16). En embriones E13 portadores de *FATN<sup>Cre</sup>*, determinamos que un 59.6%± 16.6 (media ± DS) de las células germinales presentan la actividad de recombinasa CRE (Lomelí *et.al.*,2000).

**1.2 Líneas transgénicas *Oct4-loxP***: Como describimos en la sección de Material y Métodos, se generaron cuatro líneas transgénicas en ratón: *Oct4-loxP7*, *Oct4-loxP20*, *Oct4-loxPF12*, *Oct4-loxPG9*; las cuales expresan ubicuamente  $\beta$ geo antes de que se lleve a cabo la recombinación por Cre. Por medio de la tinción con X-gal revelamos los niveles y la distribución del transgen en las cuatro líneas a partir del estadio de blastocisto hasta E9. En las cuatro líneas vimos actividad de LacZ, sin embargo las líneas *Oct4-loxP7* y *Oct4-loxPF12* fueron las que tuvieron una tinción más intensa. La línea *Oct4-loxP7* fue la que usamos principalmente en nuestro análisis posterior. La línea

Oct4-*loxP7* también tenía una fuerte actividad de LacZ en gónadas de ratones adultos.

**1.3 Dobles transgénicos FATN<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP7* :** Por medio de tinciones con X-gal determinamos que en gónadas de machos y hembras dobles transgénicos efectivamente se escinde el gen reportero (*βgeo*) . En el desarrollo embrionario normal, en E17 *Oct4* ya no se expresa en gónadas de hembras y se expresa muy poco en machos. En esta etapa, por hibridación *in situ* detectamos la expresión *Oct4* en gónadas embrionarias de dobles transgénicos. Dichos análisis nos confirman que se produce *Oct4* a partir del transgen escindido. El análisis histológico cuidadoso de gónadas de machos y hembras dobles transgénicos en diferentes etapas del desarrollo revelaron que no existen alteraciones morfológicas significativas producidas por la expresión del *Oct4* transgénico. Los machos y las hembras dobles transgénicos son fértiles y producen camadas con un número de crías equivalentes al de la cepa silvestre (en promedio 12).

**1.4 Embriones con expresión ubicua de *Oct4*:** Cruzamos machos dobles transgénicos FATN<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP7* con hembras silvestres CD1 y genotificamos la progenie con un PCR que nos permite distinguir a las crías que provienen del transgen activado (Fig.8), las cuales llamamos tgO7, mientras que crías de la misma camada que no llevan el transgen activado las tomamos como controles para todo nuestro análisis posterior.



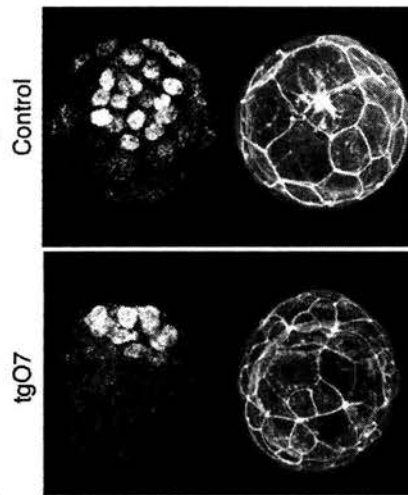
**FIGURA 8.** Transgen de *Oct4* después de la escisión mediada por Cre. Los oligos usados para detectar las crías que portan el transgen activado son CAGG-1 y Oct4-1. El panel de abajo muestra un ejemplo del PCR de 5 crías provenientes de la misma camada, los embriones 1,3 y 5 son tgO7.

Analizamos la viabilidad durante el desarrollo de los embriones con el transgen activado (tgO7). Hasta E8 las camadas tienen un número normal de crías (en promedio 12), para E9.5 encontramos algunos embriones tgO7 en proceso de reabsorción, fenómeno que continuó hasta E13. Para E14 ya no encontramos embriones tgO7 vivos. En total obtuvimos un 32% de crías tgO7 (tabla I).

Día embrionario	Embriones tgO7/total(%) (a)	Embriones tgO7 en reabsorción (%) (b)
8	26/80 (32.5)	0/26
9	62/210 (29.5)	3/62 (4.8)
10	22/62 (35.5)	1/22 (4.5)
12	35/95 (36.8)	9/35 (25.7)
13	14/53 (26.4)	12/14 (85.7)

**Tabla I.** Viabilidad de los embriones con el transgen activado. (a) Número de embriones tgO7 sobre el total de embriones analizados en cada etapa del desarrollo. (b) Número de embriones tgO7 en reabsorción sobre el total de embriones tgO7 analizados en cada etapa del desarrollo. En (a) y (b) los porcentajes se indican entre paréntesis.

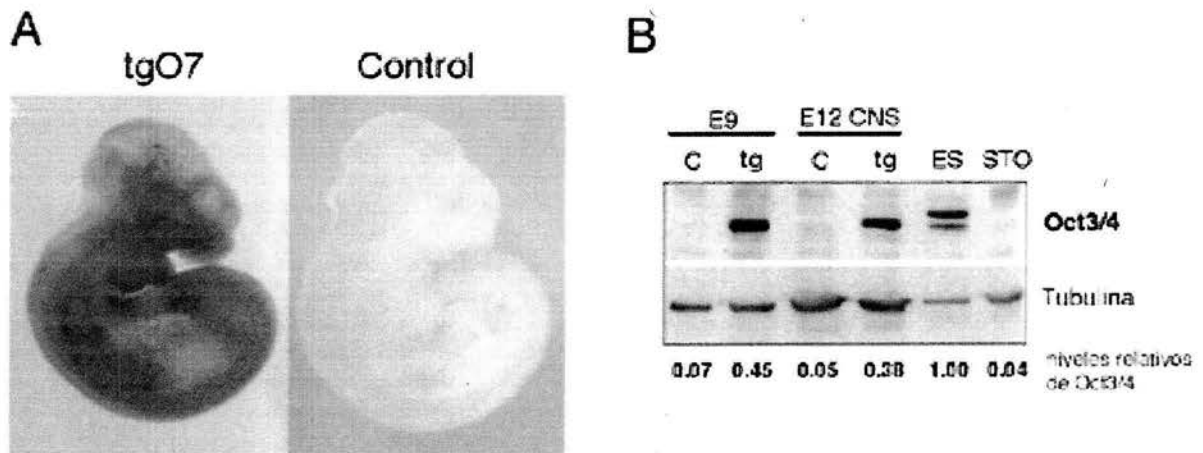
Dado lo que se sabe hasta este momento de la función de OCT4, el incremento en su expresión parece ser incompatible con la diferenciación del trofoectodermo. Por lo anterior, podíamos esperar un efecto letal en los blastocistos tgO7. Sin embargo, el número de embriones por camada es normal hasta E9 . Por medio de una inmunohistoquímica con un anticuerpo fluorescente dirigido contra OCT4, analizamos su expresión en blastocistos y no encontramos una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre tgO7 y controles (Fig.9), lo que explica que no tuvieran un fenotipo temprano. La sobrevivencia de los embriones mas allá del estadio de blastocisto, nos permitió analizar efectos posteriores del incremento de expresión de *Oct4*.



**FIGURA 9.** Inmunohistoquímica vs *Oct4* en blastocistos tgO7 y controles. Las células con mayor intensidad de fluorescencia son las de la MCI. A la derecha se muestra una tinción vs tubulina para ver la estructura del embrión.

En etapas posteriores analizamos la expresión de *Oct4* por hibridación *in situ*. De E8.5 a E12.5 los embriones tgO7 tienen una expresión ubicua de *Oct4*,

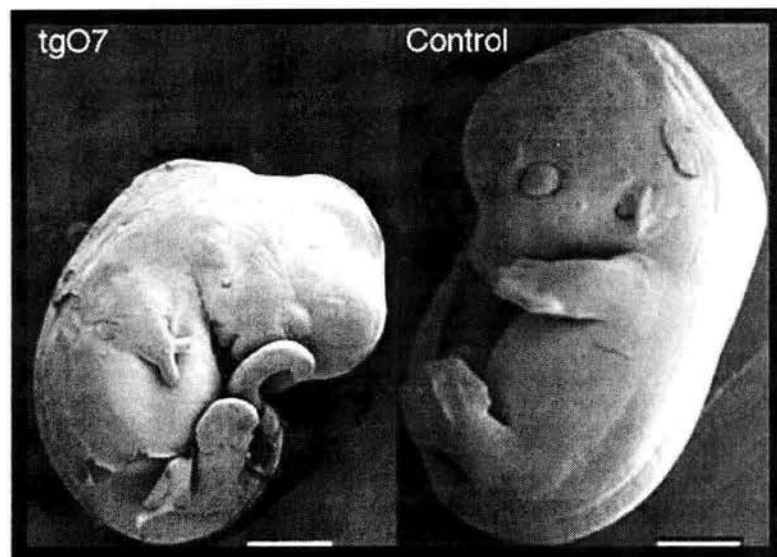
en la figura 10A se muestra la hibridación en E10. Sabíamos que se estaba produciendo el RNAm del *Oct4* transgénico y ahora queríamos determinar si se producía la proteína. Con un anticuerpo que reconoce OCT3/4 analizamos por inmunodetección en membrana (western-blot) extractos protéicos de embrión total de E9.5 y de sistema nervioso central (SNC) de embriones E12.5, tanto tgO7 como controles. Como control positivo usamos extractos protéicos de células ES y como control negativo fibroblastos de la línea STO. Detectamos la proteína OCT4 en las ES y los extractos de embriones tgO7. En contraste los extractos de embriones control y las células STO fueron negativos (Fig.10B). Las ES muestran una doble banda que probablemente se debe a una forma de OCT4 fosforilada en su dominio carboxilo terminal (Ezashi *et.al.*,2001). Posteriormente, en la membrana donde detectamos la proteína de OCT4 analizamos también la expresión de  $\beta$ -tubulina, que es una proteína constitutiva que nos sirve para estandarizar la cantidad total de proteína de cada extracto. Para determinar el nivel de expresión de OCT4 en los embriones tgO7, realizamos un análisis semicuantivo en el cual determinamos por densitometría la relación entre la cantidad de proteína en ES y en embriones tgO7. Establecimos como 100% la expresión de OCT4 en las ES y con respecto a estas los embriones tgO7 E9.5 expresan el 45% . Por otro lado, el SNC en E12 expresa solo el 35%, lo que puede deberse a que existe silenciamiento en la expresión del transgen en algunos tipos celulares.



**FIGURA 10. (A)** Hibridación in situ vs *Oct4* en embriones tgO7 y controles en E10. **(B)** inmunoblot vs OCT3/4 en extractos totales de embrión en E9 y SNC en E12 en tgO7 (tg) y controles (C). El panel de abajo muestra la expresión de  $\beta$ -tubulina como control de cargado.

## 2. Fenotipo de los embriones tgO7

E9 es el primer momento en que notamos anomalías morfológicas en los embriones tgO7. La cabeza es más pequeña, el primer arco branquial es hipoplásico y la curva entre el componente maxilar y el mandibular es más ancha, además algunos presentan defectos en el cerrado del tubo neural. Para E12 son evidentes las malformaciones. Los embriones tgO7 tienen malformaciones craneofaciales que incluyen la quijada y los procesos maxilar y mandibular hipoplásicos, además los ojos no se forman normalmente. La cola aparece engrosada y doblada irregularmente hacia la región dorsal, las extremidades tienen una morfología aberrante (Fig.11). Además los embriones tgO7 presentan edema, una epidermis muy frágil y frecuentemente un tubo neural sinuoso.



**Figura 11.** Micrografía electrónica de barrido de un embrión tgO7 comparado con un control en E12. La barra equivale a 1mm.

Fenotipo	Embriones tgO7 (%)
Malformaciones craneofaciales	12/14 (85.7)
Cola engrosada y doblada	14/14 (100)
Edema	11/14 (78.5)
Patas malformadas	13/14 (92.8)
Tubo neural sinuoso	4/14 (28.5)

**Tabla II.** Frecuencia de los fenotipos presentados en embriones tgO7 en E12 (n=14). Entre paréntesis se muestran los porcentajes.

Analizamos también embriones en E12 con el transgen activado provenientes de dobles transgénicos de las otras líneas de *Oct4*: *FATN<sup>Cre</sup>/Oct4-loxP20*, *-F12* y *-G9*. Los embriones tgOF12 presentan una cabeza más pequeña y empiezan a reabsorberse en E8. Los embriones tgO20 y tgOG9 presentan fenotipos menos severos y llegan al nacimiento.

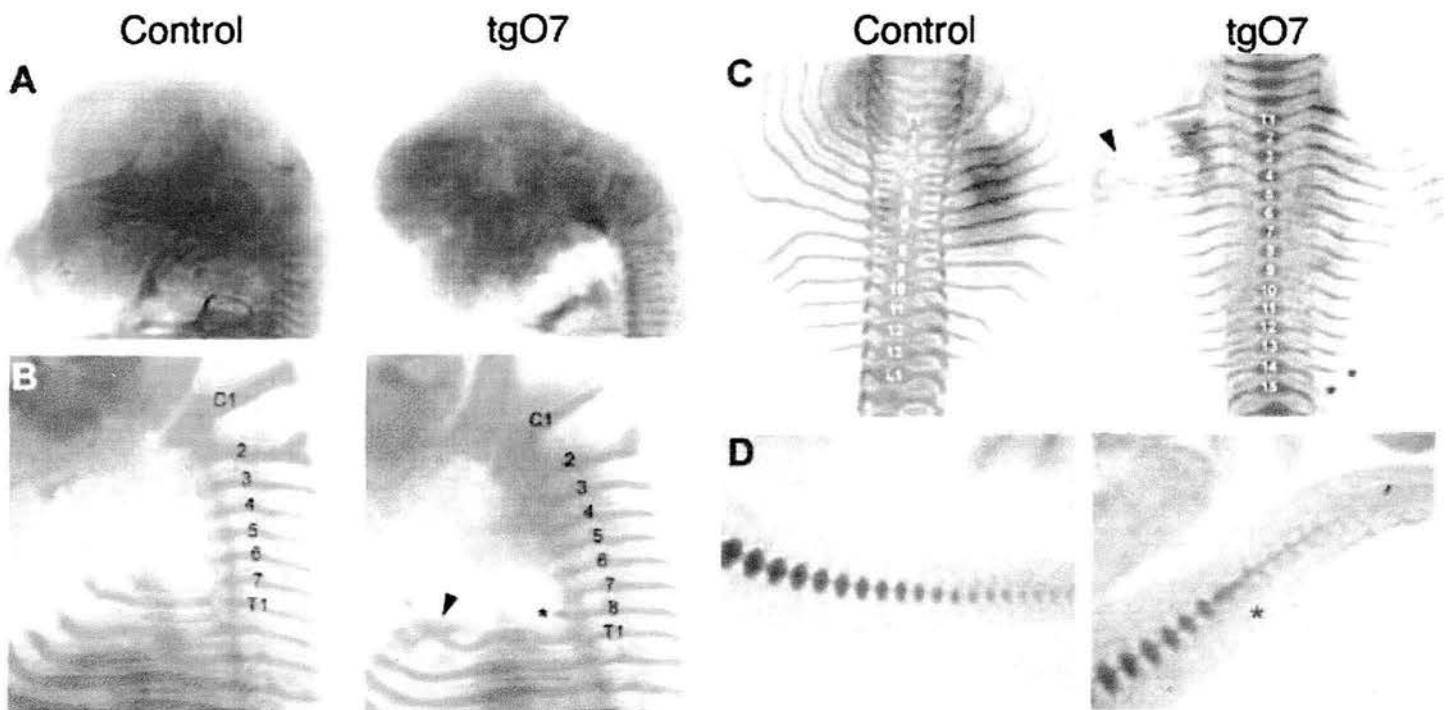


Los embriones tgO7 no sobreviven más allá de E14. La mortalidad probablemente se debe a problemas en el sistema cardiovascular, ya que además del edema que presentan, los análisis histológicos de embriones en E12 muestran que el corazón es el tejido más dañado. La malformación en las extremidades solo se encontró en embriones tgO7 (este fenotipo se describe en el Apéndice I).

Para continuar la caracterización del fenotipo realizamos tinciones con azul Alciano y Alizarina roja, que permiten visualizar cartílago y hueso. Analizamos embriones en E13 de las cuatro líneas: tgO7, tgO20, tgOF12 y tgOG9. Ya teñidos, les contamos las vértebras y los elementos esqueléticos de las patas. El ratón tiene 7 vértebras cervicales, 13 torácicas (que corresponden a las vértebras que tienen costillas), 6 lumbares y 4 sacras. Observamos alteraciones en la forma y número de los elementos esqueléticos: el cartílago aparece generalmente menos condensado y en la cola se ve especialmente desorganizado. En todas las líneas encontramos embriones con al menos una vértebra torácica extra. En los embriones tgO7 y tgOF12 hubo una transformación de la vértebra torácica 1 en la vértebra cervical 7, y en los embriones tgO7 y tgO20 encontramos costillas fusionadas (Fig.12, tabla III).

Las transformaciones homeóticas en las vértebras de los embriones tgO7 se parecen a las reportadas en mutantes con pérdida de función en los genes homeóticos *Hox7* y *Hox9*. Las vértebras se forman a partir de las somitas y su identidad axial está dada por la expresión de los genes homeóticos. Por lo anterior creemos que tanto la aparición de costillas extras, como la formación de

una cola engrosada (fenotipos constante en todas las líneas) pueden asociarse a un proceso de somitogénesis alterado en los embriones que tienen un incremento en la expresión de *Oct4* en el mesodermo presomítico (MPS). En la cola hay una acumulación excesiva de células que puede deberse a una alta proliferación o a una migración defectuosa de las células del MPS. El origen de ambos fenotipos axiales no fue determinado, y sugerimos que el efecto de la sobreexpresión de *Oct4* en el MPS debe ser analizado en el futuro.



**FIGURA 12.** Tinciones de cartílago en embriones tgO7 y controles en E13. **(A)** No hay condensación de los elementos esqueléticos en la cabeza en los embriones tgO7. **(B)** Transformación de la vértebra cervical 7 (7) en torácica 1 (T1). **(C)** Aparición de costillas extra (asteriscos rojos). **(D)** Condensación desorganizada del cartílago en la cola (asterisco morado). Las puntas de flecha en **(B y C)** muestran alteraciones en la forma de las costillas.

Tipo de alteración	T1 a C7	1 costilla extra (14). L1 a T13	2 costillas extra (15).	3 costillas extra (16).	Costillas fusionadas.
Líneas					
<b>tgO7</b> n=14	4/14 (28%)	4/14 (28%)	4/14 (28%)	2/14 (14%)	4/14 (28%)
<b>tgO20</b> n=14		1/14 ( 7%)	9/14 (64%)		2/14 (14%)
<b>tgOF12</b> n=9*	2/9 (11%)	5/9 (27%)			
<b>tgOG9</b> n=13		10/13 (77%)			

**Tabla III.** Alteraciones en la formación de los elementos esqueléticos. En los embriones tgO7 y tgOf12 la vértebra torácica 1(T1) no tiene costilla y se parece más a la vértebra cervical 7 (C7). En todas las líneas encontramos al menos una costilla extra, la vértebra lumbar 1 (L1) se transforma en la torácica 13 (T13). Las transformaciones fueron algunas veces bilaterales y otras sólo se presentaron de un lado. \* Para E13 la mayoría de los embriones tgOF12 ya están en proceso de reabsorción y sólo fue posible contar vértebras en 9 de 18 embriones.

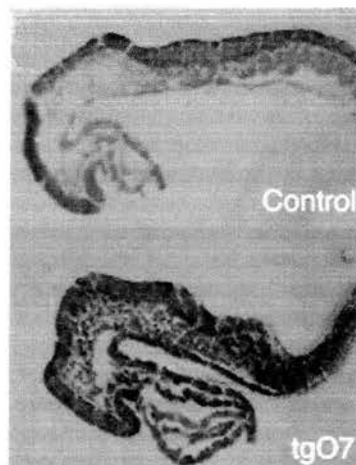
Los fenotipos fueron agrupados en:

- ◆ Fenotipo con alteraciones en estructuras anteriores.- cabeza reducida y malformaciones craneofaciales (tgO7 y tgOF12).
- ◆ Fenotipo con alteraciones en estructuras axiales.- cola engrosada /doblada y costillas extra (tgO7, tgO20, tgOF12 y tgOG9).
- ◆ Fenotipo en las patas (tgO7, Apéndice I).

En los embriones que expresan ubicuamente *Oct4* fue necesario distinguir los fenotipos generados por el incremento en la expresión en sus sitios de expresión endógenos (sobreexpresión), de los producidos en regiones y momentos donde normalmente no se expresa *Oct4* (expresión ectópica). Las regiones con sobreexpresión de *Oct4* son el neuroectodermo hasta E8, el mesodermo presomítico y los somitas hasta E9. En contraste, la extremidades nunca expresan *Oct4* y por lo tanto el fenotipo obtenido en éstas se debe a la expresión ectópica de *Oct4*.

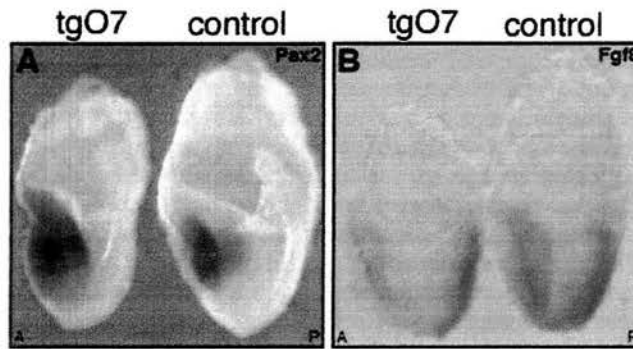
## 2.1 La sobre-expresión de *Oct4* en el organizador del Istmo.

Dado que *Oct4* se expresa en el neuroectodermo de ratón durante el periodo de regionalización del cerebro (Rosner *et.al.*, 1990; Schöler *et.al.*, 1990a; Burgess *et.al.*, 2002), nos enfocamos a estudiar el efecto de incrementar su expresión en el neuroectodermo de los embriones tgO7 (Fig.13). No se ha reportado función alguna para *Oct4* en el establecimiento del cerebro de ratón, pero existen evidencias que sugieren su participación durante la determinación regional del mesencéfalo y el metencéfalo, la cual depende del OI. Por un lado *pou2*, el ortólogo de *Oct4* en el pez cebra, tiene un papel en el establecimiento del OI y activa la expresión de *pax2* (Burgess *et.al.*, 2002; Reim y Brand, 2002). Por otro lado, *Oct4* se une con alta afinidad al enhancer que dirige la expresión temprana de *Pax2* en ratón (Pfeffer *et.al.*, 2002). Por lo anterior, consideramos interesante analizar el efecto de la sobreexpresión de *Oct4* sobre los marcadores del OI, tanto en la fase de establecimiento como en la de mantenimiento.



**FIGURA 13.** Corte sagital que muestra la expresión de *Oct4* en el neuroectodermo de embriones en E8, el control en el panel de arriba y el tgO7 en el panel de abajo.

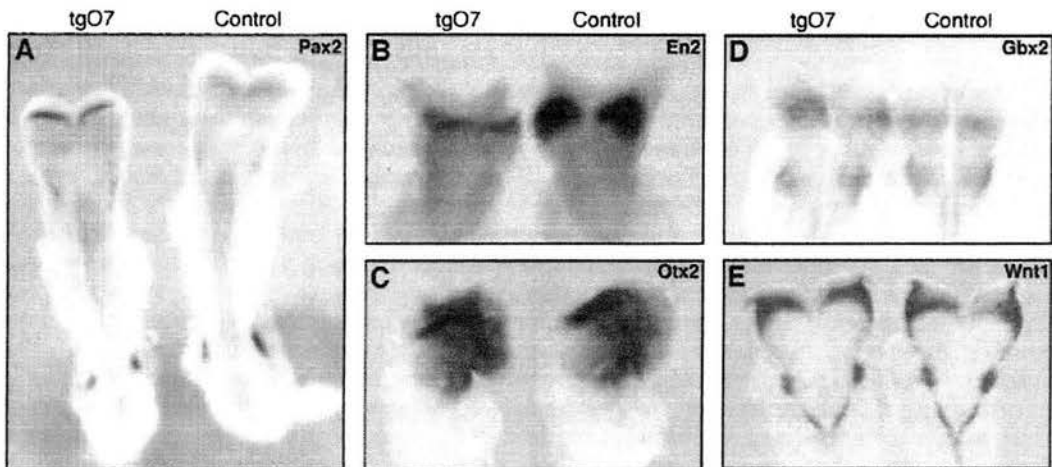
En la fase de establecimiento del OI (E7.5), analizamos la expresión de *Pax2*, *Fgf8*, *Otx2* y *Gbx2*. La expresión de *Pax2* se incrementó y expandió hacia la región anterior de los embriones tgO7(Fig14A), mientras que no hubo diferencia en la expresión de *Fgf8* (Fig.14B), *Otx2* y *Gbx2* (datos no mostrados) entre embriones controles y tgO7. En embriones tgOF12 en este estadio, la expresión de *Pax2* también se incrementó, aunque en menor proporción que en los embriones tgO7.



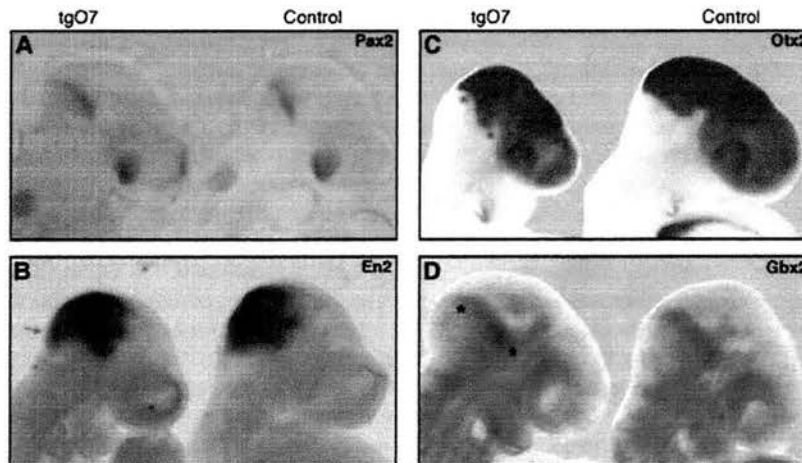
**FIGURA 14.** Hibridación *in situ* vs *Pax2* (A) y *Fgf8* (B) en embriones en E7.5.

En E8.5, la expresión de *Pax2* se incrementó en la región anterior en los embriones tgO7: el OI y los arcos branquiales. Sin embargo, su expresión en los pronefros fue similar entre controles y tgO7 (Fig.15A). Inesperadamente encontramos una reducción en la expresión de *En2* en embriones tgO7 (Fig. 15B). La expresión de *Otx2*, *Gbx2*, *Wnt1* (Fig. 18 C-E) y *Grg4* no se vio alterada en embriones tgO7.

Durante la fase de mantenimiento del OI (E9.5) la expresión de *Pax2* regresó a sus niveles normales en embriones tgO7 (Fig. 16A); al igual que *En2*. Sin embargo, el borde de expresión caudal de *En2* presenta una concavidad irregular (Fig.16B). *Otx2* y *Gbx2* no mostraron diferencias en la intensidad de expresión, pero la forma de sus fronteras de expresión se alteró de una manera complementaria (Fig.16 C y D ). La expresión de otros marcadores del OI como son *Wnt1*, *Grg4*, *Hes1* y *Fgfr1* no se alteró en embriones tgO7(datos no mostrados).



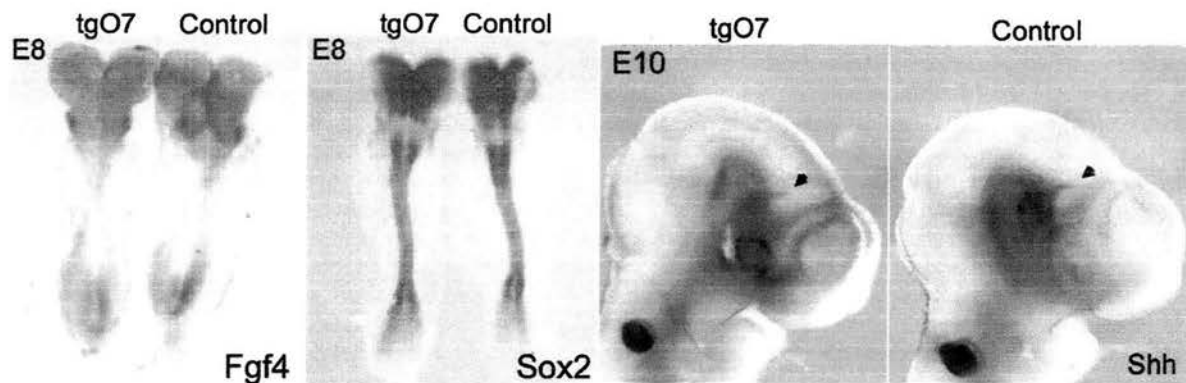
**FIGURA 15.** Expresión de *Pax2* (A), *En2* (B), *Otx2* (C), *Gbx2* (D) y *Wnt1* (E) en embriones controles y tgO7 en E8.5.



**FIGURA 16.** Expresión de *Pax2* (A), *En2* (B), *Otx2* (C) y *Gbx2* (D) en embriones E9.5. Los bordes de expresión de *En2* (flecha en B), *Otx2* (asteriscos en C) y *Gbx2* (asteriscos en D) aparecen irregulares en los embriones tgO7.

Analizamos también la expresión de otras moléculas que participan en el establecimiento del cerebro en ratón. Algunas de ellas, blancos reconocidos de *Oct4* como son *Sox2* y *Fgf4*, y otras como *Shh* (*Sonic hedgehog*), que aunque no se ha relacionado con *Oct4*, es un marcador ventral de todo el sistema nervioso. En el blastocisto, *Oct4* activa la expresión de *Fgf4* en la MCI. Sin embargo, en etapas posteriores del desarrollo, la expresión de *Fgf4* no depende

de *Oct4*. Como era esperado, no se alteró la expresión de *Fgf4* en E8.5 en embriones tgO7 (Fig.17). Por otra parte, *Sox2* es un marcador del neuroectodermo que puede ser regulado por *Oct4 in vitro*, sin embargo, en embriones tgO7 no se afectó su expresión (Fig. 17). Para E10, *Shh* tampoco cambia su expresión en embriones tgO7 (Fig. 17), indicando que el desarrollo ventral del sistema nervioso y de estructuras posencefálicas como la zona limitans (ZL), se determinan correctamente. Lo anterior nos indica que el incremento en la expresión de *Oct4* en el neuroectodermo no afecta indiscriminadamente la expresión genética. La sobreexpresión de *Oct4* en el OI altera de manera específica la expresión temprana de *Pax2* y tiene un efecto transitorio, probablemente indirecto, en la reducción de la expresión de *En2*.

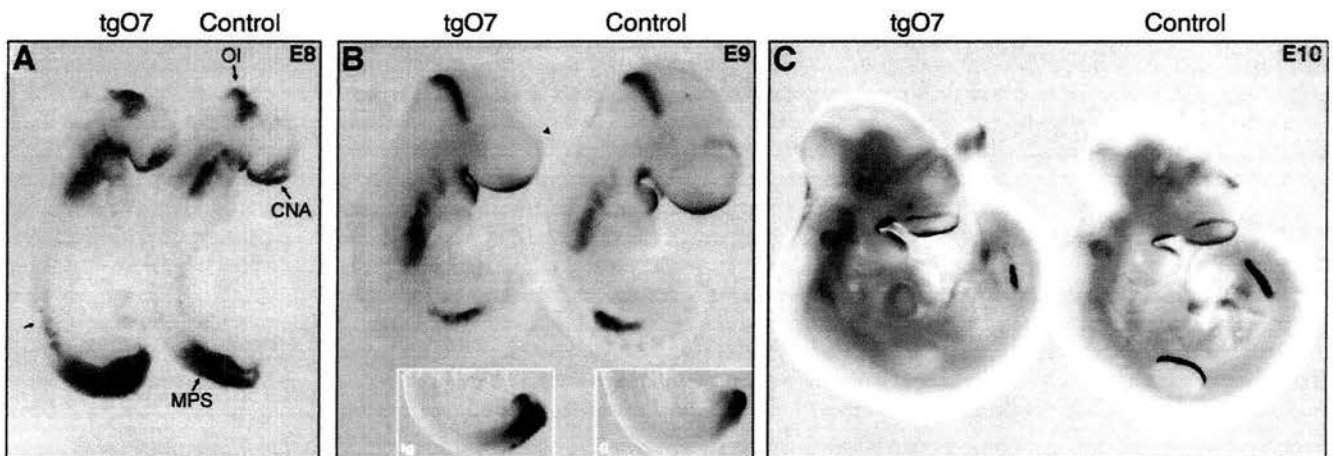


**FIGURA 17.** La expresión de *Fgf4*, *Sox2* en E8.5 y *Shh* en E10, no se altera en embriones. La punta de flecha muestra la expresión de *Shh* en la ZL.

## 2.2 Efecto sobre la expresión de *Fgf8*.

Durante el análisis molecular de los embriones tgO7 encontramos un efecto interesante para la expresión de *Fgf8*. Como ya mostramos, en E7.5 la expresión de *Fgf8* no se vio alterada (Fig.14B). Sin embargo, en E8.5 todos los sitios de expresión endógena de *Fgf8* se vieron afectados. En los arcos

branquiales y el mesodermo presomítico se observó un importante incremento en la expresión en todos los embriones tgO7 analizados, mientras que en el OI y en una estructura prosencefálica llamada cresta neural anterior (CNA), un 30% de los embriones analizados presentaron dominios de expresión más extensos e intensos, además se observaron algunas células de expresión ectópica en el mesodermo lateral (Fig.18A). Para E9.5 la expresión de *Fgf8* siguió incrementada en los arcos branquiales y en el mesodermo presomítico, mientras que en el OI se expresó de manera normal. En la zona limitans, una región entre el diencéfalo y el telencéfalo, desaparece la expresión de *Fgf8* (Fig.18B). En E10.5 todavía hay un aumento en la expresión de *Fgf8* en la punta de la cola, así como en el componente maxilar y mandibular del primer arco branquial, y en las fosas que van a formar la nariz (Fig. 18C). En contraste, la expresión de *Fgf8* se pierde en la cresta ectodérmica apical de las extremidades de embriones tgO7 (Fig.18C).



**FIGURA 18.** La expresión de *Fgf8* se altera en los embriones tgO7 en E8 (A), E9 (B) y E10 (C). Expresión en células del mesodermo lateral (punta de flecha en A). La expresión se pierde en la zona limitans (punta de flecha en B). Los recuadros en B muestran la expresión de *Fgf8* en la punta de la cola en embriones tgO7 (izquierda) y control (derecha). MPS: mesodermo presomítico, CNA: cresta neural anterior, OI=organizador del Istmo.



En embriones tgOF12 analizamos la expresión de *Fgf8*. En E8.5 no encontramos alterada su expresión, pero para E9.5 la expresión en el mesodermo presomítico esta incrementada y la zona limitans pierde su expresión. En E10.5 la punta de la cola y el componente maxilar y mandibular del primer arco branquial también muestran un incremento en la expresión de *Fgf8* (datos no mostrados).

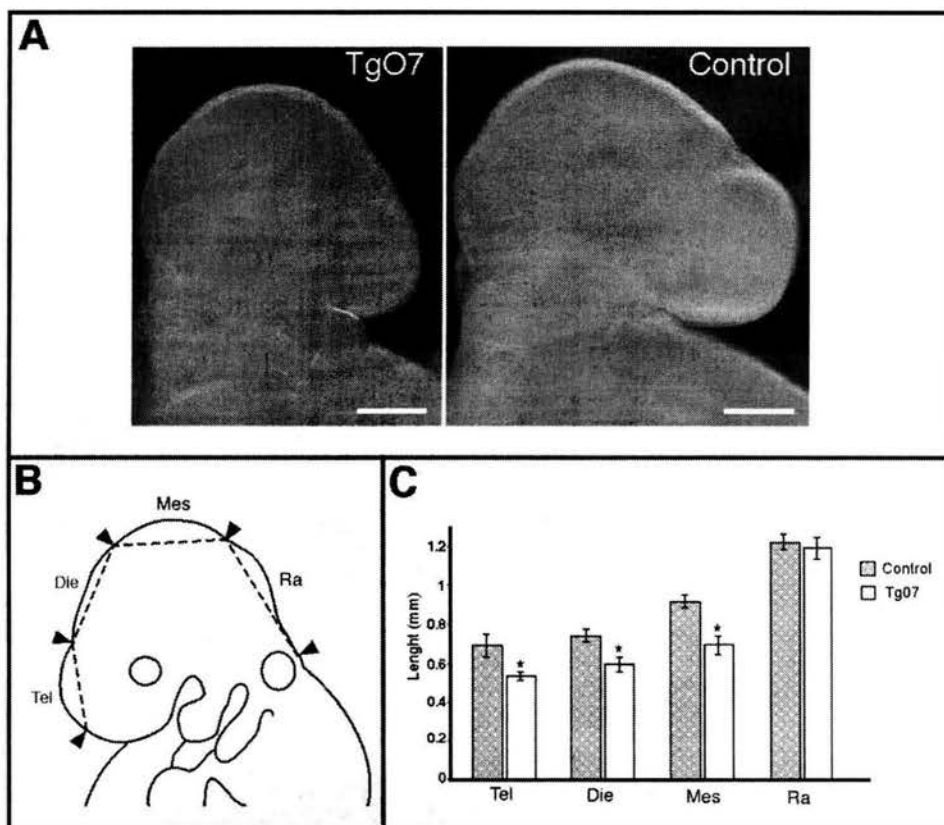
En el pez cebra ya se había encontrado una relación entre *pou2* y *Fgf8*, ya que en ciertas regiones *pou2* hace a las células competentes para responder a *Fgf8* (Reim y Brand, 2002). Lo que llama nuestra atención es que en nuestro transgénico hay un efecto muy claro de *Oct4* sobre los sitios de expresión endógenos de *Fgf8*, independientemente de si el primero está presente en exceso o ectópicamente.

## **2.3 Análisis de la expresión ectópica de *Oct4* en el cerebro.**

### **2.3.1 Reducción del tamaño de la cabeza .**

Dado que la cabeza reducida es la malformación más evidente en los embriones tgO7 (E9.5), decidimos analizar el efecto de la expresión ectópica de *Oct4* en el cerebro (en condiciones silvestres para este momento la expresión de *Oct4* se restringe a la línea germinal). Para determinar si la reducción de tamaño que observamos es significativa (Fig.19A), dividimos el cerebro en cuatro regiones y medimos su longitud en embriones tgO7 y controles de 24 somitas (n=4) (Fig.19B). Las regiones que definimos fueron: el telencéfalo (Tel) que corresponde a la región que va de la CNA a la constricción del diencefalo, el

diencéfalo (Die), el mesencéfalo (Mes), y el romboencéfalo anterior (Ra o región anterior del cerebro posterior) que corresponde a la región entre el OI y la vesícula ótica. La significancia de los resultados fue determinada mediante la “Prueba de T”. Como muestra la figura 20C, las regiones anteriores del cerebro de embriones tgO7: telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo muestran una reducción significativa ( $P < 0.05\%$ ) del 22 al 25% con respecto a los controles; mientras que en el romboencéfalo anterior no hubo cambios de longitud significativos.



**FIGURA 19. (A)** Reducción del tamaño de la cabeza de los embriones tgO7. Escala=500µm. **(B)** Regiones definidas: telencéfalo (Tel) corresponde a la región que va del ANR a la constricción del diencéfalo, diencéfalo (Die), mesencéfalo (Mes), y el romboencéfalo anterior (Ra o región anterior del cerebro posterior) que corresponde a la región entre el OI y la vesícula ótica. **(C)** En los embriones tgO7, el Tel, Die y Mes mostraron una reducción significativa en tamaño ( $*P < 0.05\%$ ). n=4, 24 somitas.

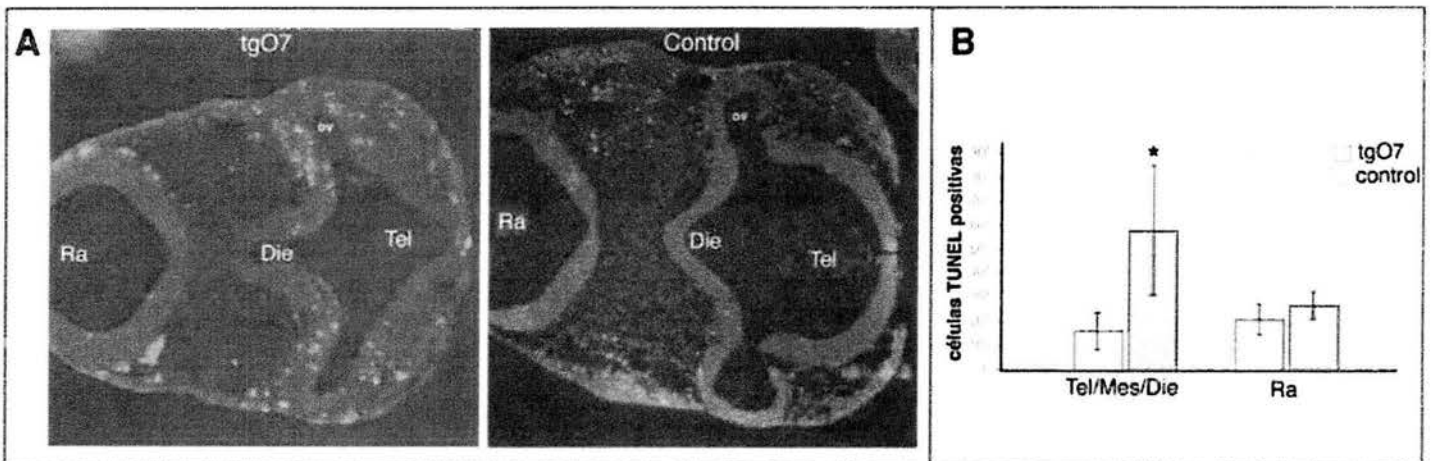
*Oct4* está implicado en determinar destinos celulares y es muy probable que sea necesario que su expresión se apague para que continúe normalmente el desarrollo del cerebro. Por esta razón, al expresar ectópicamente *Oct4* en el cerebro tenemos como consecuencia un desarrollo anormal que se refleja en la reducción de su tamaño. Por lo anterior, era probable que se viera afectada la estructura del cerebro, para lo cual realizamos cortes histológicos de cerebros de embriones tgO7 en E12 y sin embargo, no encontramos alteraciones morfológicas evidentes.

### **2.3.2 Aumento en la muerte celular.**

La reducción del tamaño en el cerebro se puede deber a una disminución de la proliferación celular o a un incremento en la muerte celular. Mediante un ensayo de incorporación de BrdU (bromodeoxiuridina), analizamos la proliferación celular en el neuroectodermo de embriones en E9.5 tgO7 y controles, pero no encontramos diferencia significativa (datos no mostrados). Entonces nos enfocamos en analizar la muerte celular. Para esto realizamos secciones seriadas de cerebro de embriones controles y tgO7 (21-22 somitas, n=4), las cuales fueron analizadas por TUNEL. Las secciones de cerebros tgO7 mostraron un incremento significativo en células positivas para TUNEL (Fig. 20A). El neuroepitelio fue dividido en una región anterior (Tel, Die, y Mes) y una región posterior (Ra), las células positivas para TUNEL fueron cuantificadas en cada región y el resultado fue analizado por la "Prueba de T" para determinar su significancia. Como se muestra en la figura 20B, la muerte en las regiones

anteriores del cerebro aumentó significativamente ( $P < 0.05\%$ ), mientras que en el romboencéfalo anterior no hubo diferencias.

El incremento en la muerte celular en las regiones anteriores del cerebro (Tel., Die.,Mes) correlaciona con la reducción en tamaño de las mismas regiones en embriones tgO7. Pensamos que al expresar ectópicamente *Oct4*, las células no pueden proseguir normalmente su desarrollo y entran al proceso de muerte celular. Lo anterior explicaría, al menos en parte, el efecto en la reducción del cerebro en los embriones tgO7.



**FIGURA 20. (A)** Ensayo de TUNEL en cortes de cerebro, el neuroepitelio en embriones tgO7 muestra un mayor número de células positivas. **(B)** Hay un incremento estadísticamente significativo ( $*P < 0.05\%$ ) en el número de células muriendo en las regiones anteriores del cerebro en embriones tgO7 (Tel, Mes, Die).

## PUBLICACIONES

**Lomelí H, Ramos-Mejía V, Gertsenstein M, Lobe C, Nagy A.** (2000) Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis*. **26**, 116-117.

Ramos-Mejía V, Escalante-Alcalde D, Kunath T, Ramirez L, Gertsenstein M, Nagy A, Lomelí H. (2004) Phenotypic analyses of mouse embryos with ubiquitous expression of Oct4: Effects on mid-hindbrain patterning and gene expression. *Dev. Dyn.* En prensa.

# Targeted Insertion of Cre Recombinase into the TNAP Gene: Excision in Primordial Germ Cells

Hilda Lomelí,<sup>1</sup> Verónica Ramos-Mejía,<sup>1</sup> Marina Gertsenstein,<sup>2</sup> Corrinne G. Lobe,<sup>3,4</sup> and Andras Nagy<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

<sup>2</sup>Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

<sup>3</sup>Cancer Research Division, Sunnybrook Health Science Centre, Toronto, Ontario, Canada

<sup>4</sup>Department of Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

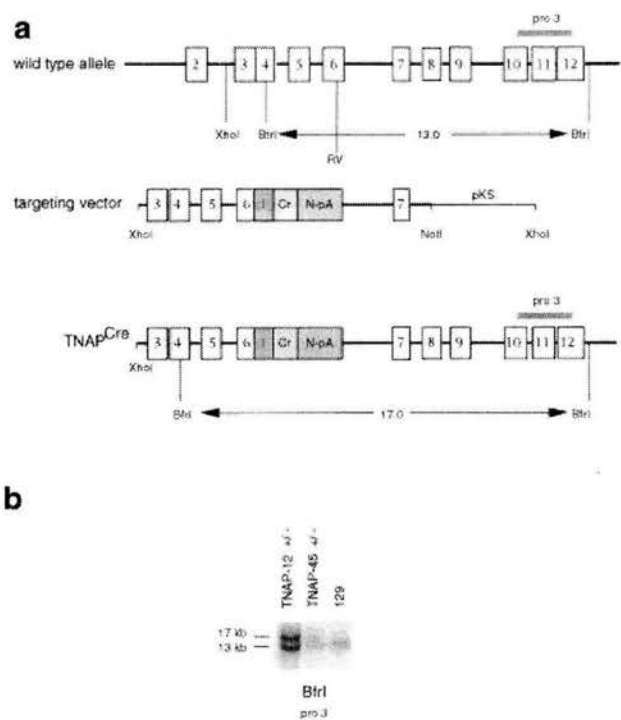
<sup>5</sup>Department of Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

Received 3 November 1999; Accepted 8 November 1999

Cell type-specific genomic alterations afforded by the Cre/loxP system are a powerful approach to study the function of genes in particular cell lineages and for which generalized null mutations result in early lethal phenotypes (Lobe and Nagy, 1998). Here we report the creation of a primarily PGC (primordial germ cell) specific Cre recombinase transgenic line, designated TNAP-Cre. In this strain, the Cre recombinase has been knocked into the locus of the TNAP (Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase) gene.

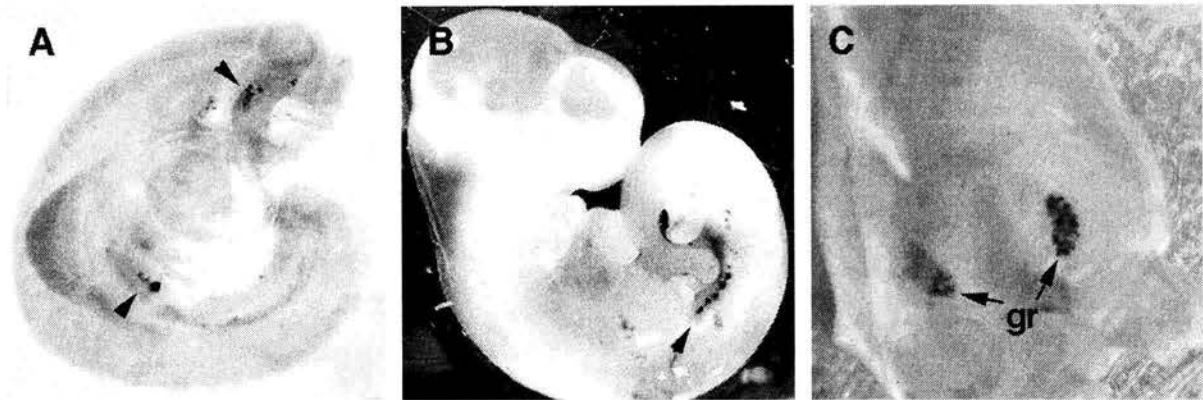
The structure of the TNAP-Cre targeting construct is depicted in Figure 1a. After electroporation into R1 ES (Nagy *et al.*, 1993a) cells, about 30% of the clones screened by Southern analysis had undergone homologous recombination (Fig. 1b). Two clones were used to derive germ-line chimeras (Nagy *et al.*, 1993b). Both lines gave germline transmission and the two transgenic lines did not differ from each other in any aspects studied. Our heterozygous TNAP-Cre mice on a hybrid background did not show any abnormality, in agreement with previous report of the null mutation of the TNAP gene (MacGregor *et al.*, 1995).

To test the *in vivo* specificity of excision achieved by the TNAP-Cre mouse lines, we crossed them with the double-reporter line, Z/AP (Lobe *et al.*, 1999). The Z/AP transgene expresses *lacZ* before Cre-mediated excision and the heat-resistant human alkaline phosphatase (hAP) gene after Cre excision. Double transgenic TNAP-Cre/Z/AP embryos showed the initial hAP activity was specific to the PGCs at E9.5–10.5 (Fig. 2). After midgestation, however, it was also expressed in the labyrinthine region of the placenta, the intestine and the neural tube. A detailed analysis of E13 embryos from crosses between TNAP-Cre males and Z/AP females showed 8 out of 16 embryos were positive exclusively in PGCs. Three embryos showed additional activity in ventral neural tube and/or placenta although always at a lower level than in the PGCs. Five presented a mosaic type of ectopic activity all over the embryos with a strong signal in PGCs. In the offspring of reciprocal crosses (Z/AP male, TNAP-Cre



**FIG. 1.** Generation of a TNAP<sup>Cre</sup> allele by homologous recombination. (a) The wild type TNAP locus, the targeting construct and the predicted structure of the TNAP<sup>Cre</sup> allele are represented. Exons are depicted by numbered boxes, shaded boxes represent the knocked in DNA. L is IRES (Jang *et al.*, 1988), Cr is Cre, N-pA is neomycin and polyA sequence. Sizes of the diagnostic restriction fragment (in kb) of the endogenous and targeted allele obtained with BfrI are indicated with arrows. The probe used in the southern analysis is denoted with a shaded box, called pro 3. (b) Southern analysis on DNA from 129 wild type and the two different clones (12 and 45).

\* Correspondence to: Andras Nagy, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University Ave., Toronto, Ontario M5G 1X5, Canada. E-mail: nagy@mshri.on.ca



**FIG. 2.** Alkaline phosphatase gene expression after Cre excision in double transgenic Z/AP-TNAP<sup>Cre</sup> embryos. (A) A whole-mount (headless) E9.5 embryo stained for hAP activity. The staining is indicated with arrowheads and localized within the developing gut region, where germ cells are found at this time, and in the neural tube. (B) A whole-mount E10.5 double transgenic embryo showing staining in the dorsal mesentery region, where germ cells are migrating at this time. (C) A dissected lower half of an E13 double transgenic embryo stained for hAP. Reporter expression is localized in primordial germ cells now present in the genital ridge (gr). For whole-mount *lacZ* and alkaline phosphatase staining of embryos and tissues, we followed the procedure described in Lobe *et al.*, 1999.

female), the fraction of embryos presenting ectopic activity was higher, suggesting either the presence of maternally produced Cre in the oocytes or different specificity of the maternal TNAP-Cre allele.

To evaluate the actual excision activity of the Cre recombinase in germ cells, the gonads from separate E13.5 double transgenic embryos were dissected and disaggregated. For each gonad, half the cells were stained for endogenous TNAP activity to indicate the total number of germ cells. The other half was stained for hAP activity to estimate the number of cells with Cre excision. This experiment indicated  $59.8\% \pm 16.6$ , ( $n = 6$ ) of the germ cells had Cre activity.

We next examined double transgenic embryos (Cre<sup>+</sup>/Z/AP<sup>+</sup>) at E6–E8 to determine the earliest stage of primordial germ cell specific excision. In most of the cases, E6, E7, and E8 double transgenic embryos did not show significant hAP activity in prospective PGCs or elsewhere (not shown). Some embryos in which hAP activity was detected at these early stages presented mosaic ectopic patterns. At E9, however, the PGCs were positive for hAP activity in most of the embryos. This observation indicates that Cre excision occurs before E9, which already results in detectable hAP activity at this stage.

We believe that the TNAP-Cre mouse will facilitate the production of germ cell-specific mutations in mice. Although excision of floxed DNA is not always exclusive to the PGCs, the frequency of specific excision is high enough for feasible use of this reagent in many studies addressing functions of genes in PGC development.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank George MacGregor for providing the genomic clone of the TNAP gene, and Gail Martin and Mark Lewandoski for providing plasmids PML78 containing the NLS-Cre and plasmid pK11 containing the FRT flanked Neo.

## REFERENCES

- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62:2636–2643.
- Lobe CG, Nagy A. 1998. Conditional genome alteration in mice. *BioEssays* 20:200–208.
- Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M, Nagy A. 1999. Z/AP, a double reporter for Cre-Mediated Recombination. *Dev Biol* 208:281–292.
- MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P. 1995. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121:1487–1496.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder J. 1993a. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8424–8428.
- Nagy A, Rossant J. 1993b. Production of completely ES cell-derived fetuses. In: Joyner A, editor. *Practical approach series: Gene targeting: A practical approach*. Oxford: IRL. p 147–179.

# Phenotypic Analyses of Mouse Embryos With Ubiquitous Expression of *Oct4*: Effects on Mid-Hindbrain Patterning and Gene Expression

Verónica Ramos-Mejía,<sup>1</sup> Diana Escalante-Alcalde,<sup>1,2</sup> Tilo Kunath,<sup>3</sup> Laura Ramírez,<sup>1</sup> Marina Gertsenstein,<sup>3</sup> Andras Nagy,<sup>3</sup> and Hilda Lomeli<sup>1\*</sup>

*Oct4* is a transcription factor that has been associated with pluripotency and fate determination in the initial cell lineages of mammals. On the other hand, *Pou2*, the ortholog of *Oct4* in zebrafish, serves additional later functions during brain development acting as a differentiation switch. In mice, *Oct4* is expressed throughout the neural plate of embryos until embryonic day (E) 8.0. In this study, we produced transgenic mouse embryos that ubiquitously express *Oct4* and analyzed the consequences during development. We show that, at E8.0, a higher dosage of *Oct4* in the neuroectoderm is sufficient to transiently alter mid-hindbrain patterning and produced a strong up-regulation of *Pax2*, indicating that *Oct4* can regulate this gene in vivo. After E9.5, ectopic *Oct4* in this region produced cell death and affected the development of the forebrain, suggesting that, at these later stages, *Oct4* down-regulation is necessary for normal development to proceed. The phenotype of the transgenic embryos was also accompanied with an increase of *Fgf8* expression in several of its endogenous domains, suggesting the possibility that *Oct4* can participate in the regulation of expression of this ligand. Our observations support the hypothesis that *Oct4*, like zebrafish *Pou2*, has a conserved function during early brain patterning in mouse. *Developmental Dynamics* 000:000–000, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** *Oct4*; MHB; *Fgf8*; *Pax2*; organizer; brain; mouse

Received 2 June 2004; Revised 14 July 2004; Accepted 3 August 2004

## INTRODUCTION

*Oct4* is a remarkable member of the POU transcription factor family. It was first identified in embryonic stem (ES) and embryonic carcinoma (EC) cell lines as well as in pluripotent cells of the preimplantation embryo (Schöler et al., 1990b; Rosner et al., 1990; Okamoto et al., 1990). Its unique expression pattern suggested an involvement of this factor in the estab-

lishment or preservation of cell totipotency. In the mouse, zygotic *Oct4* gene expression begins before the eight-cell stage in all blastomeres of the morula; later, it becomes restricted to the inner cell mass (ICM) of the blastocyst. During implantation *Oct4* expression is transiently up-regulated and subsequently shutdown in those cells of the ICM that give rise to the primitive endoderm. By E9.5, ex-

pression is still observed in the neural groove, posterior neuropore, the hindgut area where the primordial germ cells (PGCs) are located, the paraxial mesoderm, and the unsegmented presomitic mesoderm.

The expression of this factor becomes down-regulated from anterior to posterior as development progresses. After E9.5, the only cells that express high levels of the *Oct4* gene are the PGCs

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional, Autónoma de México, Apdo, México

<sup>3</sup>Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

Grant sponsor: DGAPA-UNAM; Grant number: IN213602-3; Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 40336-Q.

Dr. Kunath's present address is Institute for Stem Cell Research, University of Edinburgh, Edinburgh, EH9 3JQ UK.

\*Correspondence to: Hilda Lomeli, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: hilda@ibt.unam.mx

DOI 10.1002/dvdy.20211

Published online 00 Month 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



(Yeom et al., 1996). *Oct4* expression is shutdown during sexual differentiation of PGCs, but it is again up-regulated in the mature oocyte (Pesce et al., 1998).

Gene inactivation of *Oct4* is embryonic lethal at the time of implantation due to a failure to specify the ICM (Nichols et al., 1998). In vitro culture of *Oct4*<sup>-/-</sup> embryos resulted in the differentiation of all blastomeres into trophoctoderm, indicating that down-regulation of *Oct4* also might be crucial for trophoctoderm differentiation. Evidence obtained from studies with mouse embryonic cell lines such as ES, EC, and EG cells confirmed the importance of *Oct4* in the maintenance of pluripotency and supported a participation of this protein in the control of cell fate. In one of these studies (Niwa et al., 2000), by decreasing *Oct4* levels in ES cells, it was possible to establish that the minimal amount required for the preservation of cell totipotency was 50% of the regular endogenous *Oct4* level. Below that, cells differentiated into trophoctoderm. On the other hand, up-regulation of *Oct4* above 150% of the regular level resulted in differentiation into primitive endoderm and mesoderm. Moreover, it was shown recently that sustained up-regulation of *Oct4* in serum-free LIF-deficient medium promotes ES differentiation into neuroectoderm cells and subsequent neuronal differentiation (Shimozaki et al., 2003). From these observations, it was concluded that *Oct4* could be acting as a trigger for the specification of different cell lineages; therefore, changes in its expression levels during development could lead to cell fate alterations in vivo.

*Oct4* ortholog genes were initially identified in several mammalian species. The original thought that *Oct4* homologs were absent in the genomes of nonmammalian species led to the concept that it was a specific mammalian gene. In this regard, the identification of the *Pou2* gene as an ortholog of *Oct4* in zebrafish was a significant finding (Burgess et al., 2002). The *Pou2* gene was identified as the disrupted gene in *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) mutant zebrafish. Analysis of the *spg* phenotype revealed that this gene has an early function during the proliferation of blastomeres similar to the one of mouse *Oct4* during the for-

mation of the ICM. In addition, the *Pou2* gene was shown to have a specific function during midbrain and hindbrain formation (Burgess et al., 2002; Reim and Brand, 2002).

The anterior/posterior patterning of the vertebrate midbrain and cerebellum is regulated by a signaling center termed the mid-hindbrain boundary (MHB), which is localized in the junction between these two brain territories. The MHB produces secreted proteins with signaling activity and transcription factors participating in a complicated molecular network that underlies the establishment, refinement, and function of the organizer.

Among the secreted factors, Fgf8 and Wnt1 are key components. Other critical genes expressed in this region are the transcriptional factors *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*, and *En1/2* (reviewed by Liu and Joyner, 2001; Wurst and Bally-Cuif, 2001). The initial positioning of the MHB depends on the junction between the posterior expression domain of *Otx2* and the anterior expression domain of *Gbx2* (Simeone et al., 1992). Subsequently, *Pax2* is activated around the *Otx2-Gbx2* interface followed by *En1/2*, *Wnt1*, and *Fgf8* expression (Davis and Joyner, 1988; Rowitch and McMahon, 1995; Crossley and Martin, 1995).

Although a participation of *Oct4* during mouse brain morphogenesis has not been documented, different observations suggest that *Oct4* could be an important player in the MHB establishment in mice. First, *Oct4* is expressed in the early neural plate (Fig. 1E; Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990a; Burgess et al., 2002). Second, murine *Oct4* rescues the brain phenotype of zebra fish *spg* mutants. Third, in *spg* mutants, *Pax2.1* expression is almost eliminated. In the mouse, the regulatory region of *Pax2* contains an enhancer region with recognition sequences for POU domain proteins. This enhancer is active during the early expression of *Pax2* in the MHB, suggesting that the initial activation of this gene depends on a POU transcription factor (Pfeffer et al., 2002).

The studies of a possible involvement of *Oct4* in developmental processes, other than the maintenance of totipotency, are precluded in the knockout mouse; therefore, alterna-

tive approaches to alter *Oct4* levels in vivo are required. In this work, we produced mouse lines ubiquitously expressing *Oct4* in the postimplantation embryo. In one of these lines, in which the levels of *Oct4* expression allowed for the survival of embryos up to mid-gestation, we studied the effects of this gene during brain formation. We report that overexpression of *Oct4* in the neuroectoderm leads to misregulation of some MHB markers. Remarkably a strong up-regulation of initial *Pax2* expression provides new evidence indicating that *Oct4* regulates this gene in vivo. In addition, we found that *Oct4* had a strong specific influence on *Fgf8* expression in most of its endogenous domains, including regions outside the brain. Our study uncovered previously undescribed functions for *Oct4* in mouse development.

## RESULTS

### Ubiquitous Activation of *Oct4* Expression by Cre-Mediated Recombination

To explore the in vivo dosage effects of the *Oct4* gene in the embryo, we aimed to produce transgenic mice in which *Oct4* was expressed at high levels in the whole animal from the zygote stage onward. To obtain these embryos, a *Cre-loxP* approach was required, given that an early phenotype could be expected. For this purpose, the tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)<sup>Cre</sup> and *Oct4-loxP* transgenic lines were used. The TNAP<sup>Cre</sup> is a reported line that targets PGCs for restricted genomic alterations (Lomeli et al., 2000); and the *Oct4-loxP* lines were generated for the present work as described in the methods. The mating of these lines produced offspring that included mice overexpressing *Oct4* in primordial germ cells and gametes. Targeted mice called TNAP<sup>Cre</sup>/*Oct4-loxP* were selected and used in subsequent crosses with wild-type CD1 as shown in Figure 1A. The TNAP<sup>Cre</sup>/*Oct4-loxP* modified gametes, which did not present an apparent phenotype, allowed the generation of mouse embryos with ectopic expression of *Oct4* in the zygote and thereafter in every cell of the embryo.

Four different *Oct4-loxP* lines de-

AQ: 1

AQ: 2

F1

rived from two alternative constructs were available (see Experimental Procedures section for details). Before mating with the TNAP<sup>Cre</sup> mouse, these lines were analyzed by  $\beta$ -galactosidase activity to determine the transgene expression onset and localization. This analysis showed that, in all four lines, transgenic expression was present at the blastocyst stage. At later stages (E9.0) the *lacZ* activity was still detected in all the lines; however, the intensity was higher for the Oct4-*loxP7* and Oct4-*loxPF12* lines. In the former one, the reporter gene activity was followed up to day 14 and was found to be ubiquitous all over this period. This line was the one used for most of the analyses of the present work.

For a preliminary determination of the viability of transgenic embryos, progenies from different developmental stages derived from crosses of the TNAP<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP7* with wild-type females, were genotyped by PCR. Embryos with activated Oct4-*loxP* alleles were selected and referred to hereafter as tgO7; nonexcised littermates were identified and used as controls. In agreement with the previously determined excision efficiency for the TNAP<sup>Cre</sup> mouse (Lomeli et al., 2000), an average of 32% of the progeny expressed exogenous *Oct4*. Based on the report by Niwa et al. (2000), in which a higher dosage of *Oct4* in ES cells resulted in differentiation into primitive mesendodermal cells, early lethality of tgO7 embryos was a possible outcome. Surprisingly, tgO7 embryos were found in expected ratios until E9.5, indicating that they were able to survive beyond the blastocyst stage.

To assess *Oct4* expression in tgO7 embryos, the presence of the *Oct4* transcript was detected by ISH. As shown in Figure 1B, at midgestation, a strong transcriptional expression of *Oct4* was found in tgO7 embryos. Quantitative immunoblot analyses was also performed to compare the Oct4 protein endogenous expression in ES cells, with the transgenic expression in whole E9.5 and dissected brains of E12.5 tgO7 embryos (Fig. 1C). This experiment revealed that the amount of Oct4 in E9.5 embryos was 50% that observed in ES cells. This quantity represented the minimal amount of protein per cell in the

transgenic embryos, because it is likely that Oct4 expression is silenced in some cell types. A quantification of Oct4 in transgenic blastocysts by immunoblot was not possible; however, immunofluorescence studies showed that Oct4 protein was not significantly overexpressed in the tgO7 blastocysts compared with the wild-type ones (not shown). This finding can explain the lack of phenotype in tgO7 blastocysts. Of interest, transgenic blastocysts derived from Oct4-*loxPF12* mice presented a significantly higher level of Oct4 expression. A phenotypic analysis in such embryos is currently under way.

### Embryos Ubiquitously Expressing Oct4 Presented Several Morphological Abnormalities and Died Around E13.5

Resorption of some tgO7 embryos was first observed at E9.5. This phenomenon increased in the following days up to E13.5, after which, live embryos with excised transgenic alleles were not longer detected. Histological analysis of E12.5 tgO7 mutants suggested that lethality was due to a cardiac failure as this tissue was severely congested and embryos were highly edematous.

Significant defects were detected in tgO7 embryos beyond E9.5, including abnormalities in the head, trunk, tail, and limbs (Fig. 1D). The head was misshapen and visibly smaller. The first branchial arch seemed hypoplastic, and the gap between the maxillary and mandibular components was wider in tgO7 embryos. At E12.5, craniofacial malformations were evident, nasal and maxillary processes were reduced, and the lower jaw was poorly developed. The tail was engrossed and dorsally kinked. Tail abnormalities were consistent with an accumulation or defective migration of mesodermic cells from the tail bud. The neural tube presented a defective closure, which was noticed in the tail or as an irregular midline in the trunk region. In later stages (E13.5), abnormalities were expressed in the trunk where Alcian blue staining revealed alterations in vertebrate formation. Often an extra rib was present. Both

the tail and vertebrate malformations would fit with defective somitogenesis. This possibility is presently being investigated. Limb defects were present with different degrees of severity. They included failure of skeletal development affecting mainly digits and zeugopod elements.

Mutant embryos derived from the other Oct4-*loxP* transgenic lines (Oct4-*loxPF12*, -G9, and 20) were also evaluated. In general, they all presented the axial phenotypes, both in the tail and vertebrate regions. Head defects were also visible in the tgO7 embryos (derived from Oct4-*loxPF12*). These embryos were being lost from the progeny at earlier stages (E8). In contrast, embryos derived from the Oct4-*loxP20* and Oct4-*loxPG9* lines (which showed a lower *lacZ* staining) presented milder phenotypes, like the absence of craniofacial malformations and neural tube defective closure and survived to birth, after which, they were not followed. Head defects in these embryos were not measured but were not obvious. The limb phenotype only was observed in the tgO7 embryos.

### Influence of Oct4 Dosage on the Expression of Brain Molecular Markers During Mid-Hindbrain Regional Determination

*Oct4* expression in the neuroectoderm of wild-type mice is significant during the regional determination of the brain (Fig. 1E; Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990a; Burgess et al., 2002). Additionally, there is evidence demonstrating that an *Oct4* ortholog in zebrafish is implicated in the MHB development, and recently, an enhancer that can bind *Oct1* and *Oct4* proteins has been identified in the *Pax2* regulatory region. These findings together suggested the possibility that *Oct4* could act as a regulator of gene expression in the mouse MHB organizer. If this were the case, an increased dosage of *Oct4* in the neuroectoderm during MHB development, would result in overexpression of genes involved in brain patterning, suggesting the possible participation of *Oct4* in this process. For this reason, we did whole-mount in situ hy-

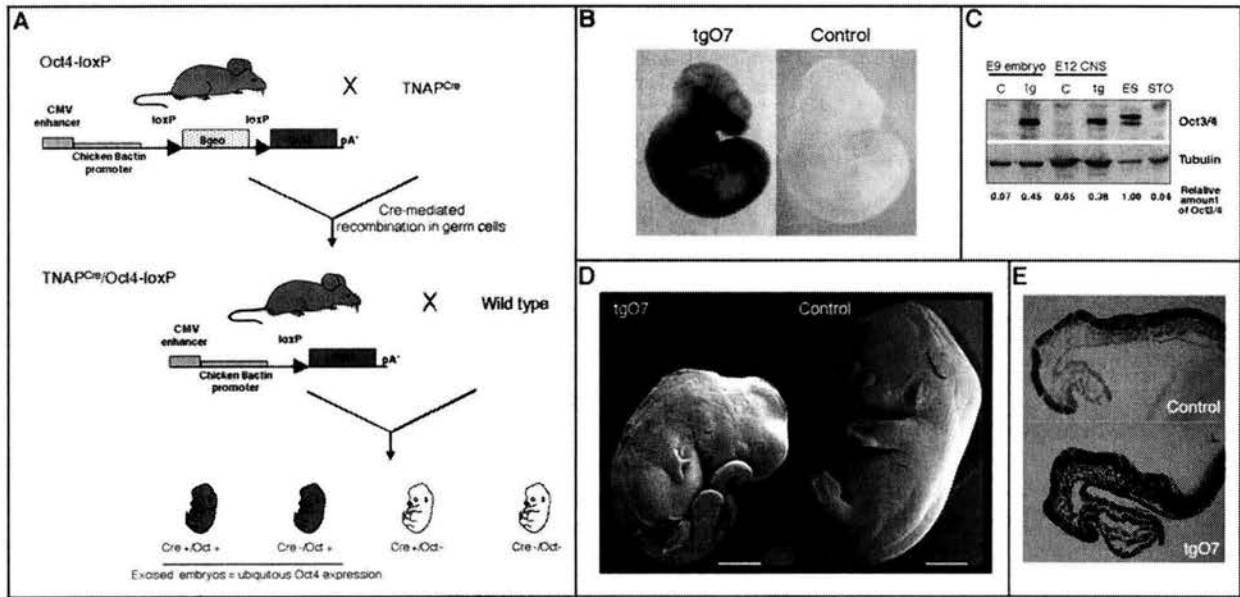


Fig. 1.

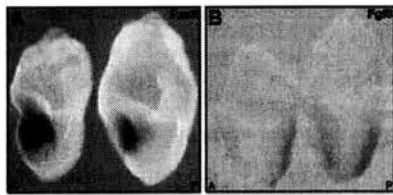


Fig. 2. *Pax2* is up-regulated in embryonic day (E) 7.5 tgO7 embryos. **A,B:** Lateral view of whole-mount in situ hybridization of E7.5 tgO7 (left) and control (right) embryos with *Pax2* (A) and *Fgf8* (B) probes. *Pax2* expression is expanded to anterior regions (A), and no difference was found in *Fgf8* expression at this stage (B). A, anterior; P, posterior.

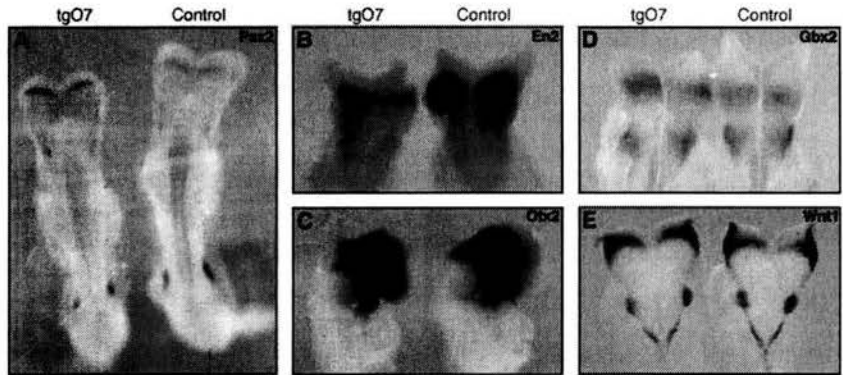


Fig. 3.

bridization in tgO7 embryos to follow the expression of several genes that are known to participate in the network of transcription and secreted factors that control the function of the MHB organizer.

At E7.5, *Pax2* expression is initiated in cells surrounding the *Otx2*/*Gbx2* boundary (Rowitch and McMahon, 1995). In tgO7 embryos, *Pax2* was found up-regulated toward its anterior limit (Fig. 2A). At this stage, we have examined other genes like *Fgf8* (Fig. 2B), *Otx2*, and *Gbx2* (data not shown), but none of them presented an altered expression pattern.

At E8.5 *Pax2* increase in the MHB was maintained (Fig. 3A). This up-regulation was also observed in the branchial arches but not in the pronephros, another region of *Pax2* endoge-

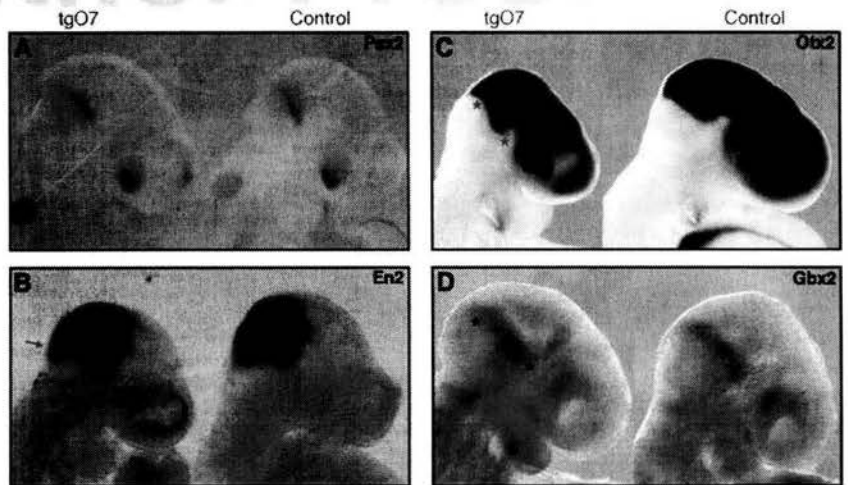


Fig. 4.

FOUO

FOUO

FOUO

FOUO

nous expression at this stage. *Engrailed 2* (*En2*), a gene that is expressed in a broad region covering the mes/met domain at this time (Davis and Joyner, 1988), was down-regulated in tgO7 embryos (Fig. 3B). *Otx2*, *Gbx2*, *Grg4*, and *Wnt1* expression were also investigated. *Otx2* and *Gbx2*, which are expressed in the mid-brain and hindbrain boundaries, respectively (Ang et al., 1994; Bouillet et al., 1995), did not show alterations (Fig. 3C,D); *Wnt1*, whose expression is restricted to the *Otx2*-positive side (Bally-Cuif et al., 1995), showed a subtle and transient decrease in the ventral region (Fig. 3E). *Grg4* showed an unaltered expression pattern (not shown).

By E9.5, *Pax2* recovered its wild-type expression level (Fig. 4A). Similarly, *En2* expression level was recovered, but its caudal border presented an abnormal concavity (arrow in Fig. 4B). Although the amount of expression of *Otx2* and *Gbx2* did not show alterations in the tgO7 embryos, both genes presented an irregular but complementary shape in their expression borders at E9.5 (Fig. 4C,D). By this stage, *Wnt1* also showed a normal expression pattern (not shown). *Pax2* expression was also examined in TgOF12 embryos at E7.5 and E8.5. This experiment confirmed the up-regulation, which was restricted as well to the MHB domain (not shown).

*Sox2*, a gene encoding for a tran-

scription factor that interacts with Oct4 is normally expressed in the presumptive neuroectoderm during gastrulation and in the neural tube at early somitogenesis. There is evidence suggesting that *Oct4* and *Sox2* coregulate each other (Avilion et al., 2003). Therefore, we examined the *Sox2* expression in tgO7 mutants but found no difference with respect to control embryos. Similarly, *Fgf4*, a recognized target for Oct4 (Yuan et al., 1995), did not present any change of expression at E8.5. Finally, we analyzed the expression of *Shh*, a gene that presents a longitudinal pattern along the ventral midline of the neuroectoderm and in the underlying mesoderm. At E10.5, the expression pattern of *Shh* seemed normal. Together, our results indicate that *Oct4* overexpression produced effects on specific genes and at specific regions. This observation underlies the importance of particular cofactors for the function of Oct4 in different developmental processes.

### **Oct4 Transgenic Expression Affected the Regulation of Fgf8 Endogenous Expression**

*Fgf8* acts as a potent organizing molecule and is required during gastrulation, somitogenesis, limb morphogenesis, regionalization of the neural plate, telencephalon patterning, and formation of the heart field, among others (Meyers et al., 1998; Sun et al.,

1999; Moon and Capecchi, 2000; Reifers et al., 2000; Dubrulle et al., 2001). Functional studies of the *spg/Pou2* mutant in zebrafish revealed phenotypic similarities with *acerebellar/Fgf8* (*ace*), suggesting that these two genes could act in the same or synergistic pathways (Reim and Brand, 2002). Specifically for zebrafish, Reim and Brand (2002) demonstrated that Pou2 is a factor that mediates competence to respond to *Fgf8* in the neuroectoderm. To determine whether *Oct4* transgenic expression affected the regulation of *Fgf8* expression in the tgO7 mouse, we determined the expression pattern for this gene in transgenic embryos.

At E7.5, *Fgf8* expression in the primitive streak appeared unaffected (Fig. 2B). However, at E8.5, *Fgf8* signal was augmented in the branchial arches and presomitic mesoderm, and few ectopic-positive cells were found in the lateral mesoderm (Fig. 5A). In the MHB and anterior neural ridge (ANR), 30% of the embryos presented a broader and less-confined domain of expression. At E9.5, *Fgf8* expression adjacent to the zona limitans intrathalamica (ZLI) was completely abrogated; but in the MHB, expression was no longer affected (Fig. 5B). Other regions outside the brain such as the tail bud and branchial arches presented up-regulation at this stage (Fig. 5B). At E10.5, *Fgf8* was up-regulated in the tail bud, the maxillary and mandibular components of the first branchial arch, and in the nasal pits. In the limbs, *Fgf8* expression was either completely lost or expressed in patches. This lack of expression correlated with an increased limb phenotype (Fig. 5C).

*Fgf8* expression was also analyzed in tgOF12 embryos at E8.5, E9.5, and E10.5. At E9.5 and E10.5, the results were the same as in the tgO7 embryos, in the zona limitans and tail bud. In the branchial arches, expression was increased but only in the maxillary region (not shown). At E8.5, *fgf8* expression in tgOF12 embryos was not yet affected.

Changes of *Fgf8* expression in the presomitic mesoderm and MHB (where *Oct4* is normally expressed at E8.5) are likely due to a higher dosage of this protein. On the other hand, the effects in the branchial arches, the

**Fig. 1.** Embryos with Oct4 ubiquitous expression. **A:** Schematic representation of the transgenic alleles carried by the Oct4-*loxP* and the TNAP<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP* lines. In the Oct4-*loxP* line, expression of the  $\beta$ geo reporter is found in the entire mouse. In TNAP<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP* mice, after Cre recombination the  $\beta$ geo reporter is removed and Oct4 expressed in the germ line. TNAP<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP* males are mated with CD1 females. The modified gametes of the TNAP<sup>Cre</sup>/Oct4-*loxP* allow the generation of embryos with general expression of Oct4. **B:** Ubiquitous Oct4 expression was detected by in situ hybridization in embryonic day (E) 10.5 in tgO7 embryos (left). **C:** Oct3/4 was detected in protein extracts of tgO7 E9 whole embryos and tgO7 E12.5 central nervous system (CNS) but not in equivalent extracts of control littermates.  $\beta$ -Tubulin was used as a standard for protein loading. Relative amounts of Oct3/4 were obtained with respect to endogenous expression of Oct3/4 in ES cells. STO cells were used as negative control. **D:** Scanning electron micrograph of E12.5 tgO7 (left) and control (right) embryos of the same litter. **E:** Sagittal sections of an in situ hybridization showing Oct4 expression in the neuroectoderm of E8.5 control and tgO7 embryos. Scale bar = 1 mm in D.

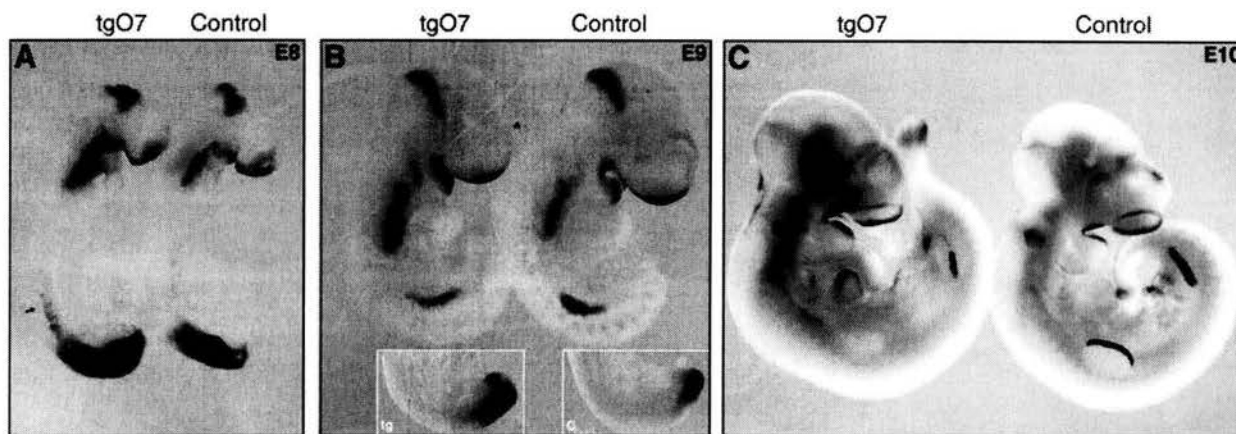
**Fig. 3.** Expression profile of mid-hindbrain boundary (MHB) genes in E8.5 tgO7 embryos. **A–E:** Whole-mount in situ hybridization of embryonic day (E) 8 embryos: dorsal views (A,B and D,E) and lateral view (C). **A–D:** In tgO7 embryos (left), *Pax2* expression is up-regulated (A) and *En2* expression is down-regulated (B); in contrast, expression of *Otx2* (C) and *Gbx2* (D) seems unaffected. **E:** *Wnt1* expression is slightly decreased in the ventral region.

**Fig. 4.** Gene expression in the mid-hindbrain boundary (MHB) of embryonic day (E) 9 embryos. **A–D:** Whole-mount in situ hybridization in control (right) and transgenic (left) E9 embryos for *Pax2* (A), *En2* (B), *Otx2* (C), and *Gbx2* (D) genes. *Pax2* (A) and *En2* (B) recovered their wild-type expression level in the MHB. B–D: *En2* (arrow in B) and *Otx2* (asterisks in C) show an irregular shape in its caudal border, and *Gbx2* shows an irregular shape in its rostral border (asterisks in D).

F4

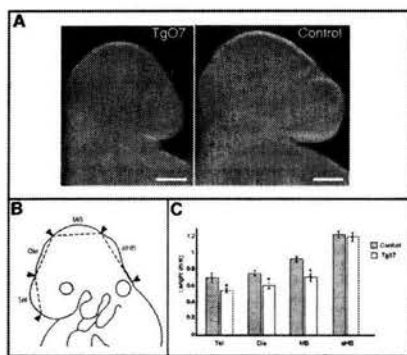
F5

ROFOG



**Fig. 5.** *Fgf8* expression is altered in tgO7 embryos. **A:** *Fgf8* expression in embryonic day (E) 8 embryos. Up-regulation is found in the branchial arches and presomitic mesoderm and for several embryos (30%), in the mid-hindbrain boundary (MHB) and the anterior neural ridge (ANR). Ectopic *Fgf8*-positive cells are present in the lateral mesoderm (arrow). **B:** At E9.5, *Fgf8* recovered its wild-type expression at the MHB but is still up-regulated in the branchial arches and the tail bud (inset panels in B). In all of the tgO7 embryos, *Fgf8* expression is abolished at the zona limitans (arrowhead). **C:** At E10.5, *Fgf8* is up-regulated in the tail, the maxillary and mandibular component of the first branchial arch and the nasal pits. In the limbs, *Fgf8* expression was either completely lost or expressed in patches.

ROFOG



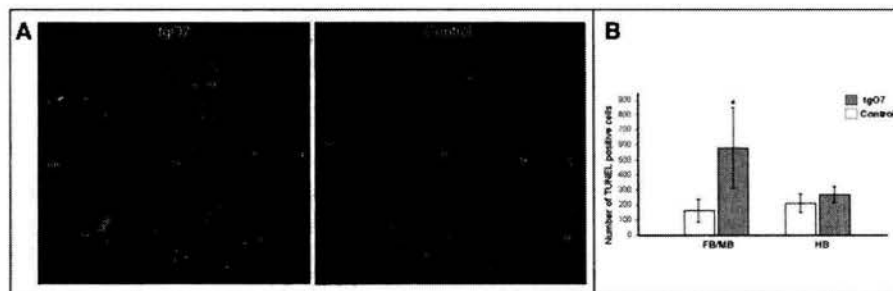
**Fig. 6.** Size reduction of anterior brain regions in tgO7 embryos. **A:** At embryonic day (E) 9.5, heads of tgO7 embryos (left) are smaller than those of control littermates (right). **B:** Schematic representation of brain regions measured. **C:** Lengths of brain regions from 24-somite stage tgO7 and control embryos (n = 4, for each) were plotted. According to the Student's *t*-test, size reduction was significant in the telencephalon (Tel), diencephalon (Di) and mid-brain (MB). Asterisks indicate  $P < 0.05$ . In contrast, the anterior hindbrain (aHB) did not present a significant difference. Scale bar = 500  $\mu$ m in A.

zona limitans, and the limbs are due to an ectopic *Oct4* expression. However, a remarkable observation is that, regardless of whether *Oct4* is overexpressed or ectopic, the observed effects on *Fgf8* expression are not ectopic, but mostly restricted to its endogenous domains.

### ***Oct4* Gain-of-Function in the Neuroectoderm After E9.0 Leads to a Size Reduction in the Forebrain and Midbrain Regions**

At E9, *Oct4* is not longer expressed in the neural tube. Therefore, a phenotypic effect after this stage could not be associated to an endogenous function. However, because *Oct4* has been

ROFOG



**Fig. 7.** *Oct4* ectopic expression induces apoptosis in anterior brain regions. **A:** Brain sections of 21- to 22-somite stage embryos assayed for terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL). The cell death in the neuroepithelium of tgO7 embryos (left) is increased in comparison to control littermates (right). **B:** Consistent with the size reduction of anterior brain regions (forebrain and midbrain, FB/MB) in tgO7 embryos, neuroectoderm of these regions had a significantly increased number of TUNEL-positive cells. The asterisk indicates  $P < 0.05$ , in comparison to control littermates (n = 4, for each). By contrast, hindbrain (HB) did not present any difference in TUNEL-positive cells. Di, diencephalon; Te, telencephalon; ov, optic vesicle.

recognized as a cell fate determinant, whose concentration is relevant at specific differentiation steps, we considered it interesting to explore whether ectopic *Oct4* could produce further alterations in brain development. As the main morphological distinction between control and tgO7 embryos was the reduced head size (Fig. 6A), we carried out a comparative analysis of the brain size in different areas of tgO7 and wild-type heads at the 24-somite stage. The brain was subdivided into four regions, and the length of each was measured along the anteroposterior axis in four control and four tgO7 embryos. One region, localized in the presumptive telencephalon (Tel), spanned from the optic level of the ANR to the diencephalic constriction; a second region corresponded to the presumptive diencephalon (Die); another region included the midbrain (MB); and the fourth region corresponded to the anterior hindbrain (aHB), spanning from the isthmus to the otic vesicle (Fig. 6B). Tel, Die, and MB regions were 22 to 25% reduced in tgO7 embryos ( $P < 0.05$ ), whereas no significant difference was found in the aHB (Fig. 6C).

To determine whether the size reduction of the brain was accompanied of an abnormal morphology, we performed a histological analysis of E12.5 tgO7 brains. Gross brain morphology was not altered, and the neuroepithelium presented a normal organization (not shown).

### Ectopic Expression of *Oct4* Increased Cell Death in the Brain of tgO7 Embryos

The reduced size of the tgO7 developing brain could be reflecting either a decrease in proliferation or an increase in cell death of neuroepithelial cells. To examine the first possibility, we performed an analysis of BrdU incorporation in E9.5 embryos. There was not a significant difference in BrdU incorporation between tgO7 and wild-type littermates.

To address whether cell death contributed to the reduction in size of tgO7 brains, we performed the TUNEL assay on serial sections of E9.5 embryos. At the 21- to 22-somite stage, tgO7 brain sections taken at a similar rostrocaudal level showed an increase in terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL)-positive cells in the neuroepithelium (Fig. 7A). For a quantitative study of cell death, the neuroepithelium was divided into an anterior region (midbrain and forebrain) and a posterior region (anterior hindbrain), and TUNEL-positive cells were counted in each part. We found that cell death in the anterior neuroepithelium of tgO7 embryos increased nearly four times in comparison to control brains (Fig. 7B). By contrast, cell death in the posterior neuroepithelium of tgO7 mutants, did not show a difference with respect to control embryos. Dead cells increased mainly in regions of normal cell death, like the optic vesicles and the dorsal diencephalon (Fig. 7A). We also found ectopic cell death in the mesencephalic region (not shown). These findings indicate that cell death is a likely cause for the size reduction in the anterior part of transgenic brains. Despite the increased cell death that we observed in the forebrain region, the molecular identity of organizing structures such as the ANR and the ZLI seemed to be conserved, as evidenced by the expression patterns of *Fgf8* and *Shh*, respectively.

### DISCUSSION

In this work, we have studied the phenotype of mice, ubiquitously expressing the transcriptional factor *Oct4* throughout development. This strategy was used in an attempt to explore the effects of increasing the levels of *Oct4* at early embryogenesis. A general evaluation of the amount of protein present in embryos of the tgO7 line at different developmental stages indicated that the *Oct4* protein increased gradually, not being significantly augmented in the preimplantation period. The first time in development when we detected a phenotype was at E7.5 where we found evidence indicating that *Pax2* was up-regulated. Detectable morphological abnormalities were seen only at E9.5 in which the amount of *Oct4* protein had accumulated to a level that was 50% that of ES cells.

The relative low increase of the *Oct4* protein achieved in the tgO7 line might be due to a deficient translation of the mRNA. This possibility is sug-

gested because the tgOF12 line containing a different *Oct4* transgenic construct, presented a faster accumulation of the protein at the blastocyst stage (according to immunostaining studies), although similar levels of mRNA were detected by ISH in both lines at midgestation. Nonetheless, the generalized expression of *Oct4* in the tgO7 line resulted in severe morphogenetic abnormalities.

Although a complex phenotype was found at mid-gestation, a distinction can be made between *Oct4* ectopic and overexpression effects. Of interest, the two major phenotypic alterations that were present in the tgO7 embryos, i.e., anterior neural plate patterning and paraxial-tail bud defects, could be associated to regions where *Oct4* is endogenously expressed. The axial defects were not addressed in the current study; therefore, it is not clear when they are initiated. Nevertheless, either they started at gastrulation or at somitogenesis and became visible when cells of the presomitic mesoderm and somites still express *Oct4* (Yeom et al., 1996). Early brain patterning defects, which are mainly focused on in this study are also apparent at a time when endogenous *Oct4* is still expressed in the neuroectoderm (E7.5–E8; Fig. 1E; Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990a; Burgess et al., 2002). Among the ectopic *Oct4* effects, one that was studied was the forebrain and midbrain size reduction, which is detected at E9.5 and is likely due to increased cell death. Defects in the limbs found in tgO7 embryos, also could not be associated to *Oct4* endogenous expression, because *Oct4* is never present in this region. Considering the previous description, the phenotype of tgO7 embryos is more specific than what could have been predicted for a general regulator of totipotency.

Another interesting observation about the phenotype is related to the finding that *Oct4* had a strong specific influence on *Fgf8* expression. In this regard, it is remarkable that *Fgf8* has significant functions on mid-hind-brain determination, migration of mesodermic cells at gastrulation, axis segmentation, and limb formation, all regions where *Fgf8* expression is affected. Therefore, the tgO7 phenotype

F6

F7

is consistent with *Fgf8* misexpressions.

### Oct4 Gain-of-Function in the Neuroectoderm Altered Gene Expression

Recent studies in zebrafish indicated that the *Pou2* gene, encoding a POU domain transcription factor orthologous to Oct4, was required during the establishment of the mid-hindbrain boundary and in hindbrain development. These data suggested the possibility that *Oct4* had a function in brain formation in mammals. If this were true, a gain-of-function situation could reveal possible target genes for Oct4 in the brain. As a first approximation, we analyzed the expression of different genes that are key players in the establishment of the MHB organizer. We found that an increased amount of *Oct4* in the anterior neural plate, strongly up-regulated *Pax2* gene expression in tgO7 and tgOF12 embryos at E7–E8. This finding is significant because it has been demonstrated that, in mouse, an enhancer that binds *Oct1* and *Oct4* in vitro controls the early expression of *Pax2* in the anterior neural plate. This enhancer has been shown to be an essential control element for the early expression of *Pax2* (Pfeffer et al., 2002). Therefore, our results combined with these previous data, strongly argues that *Oct4* plays an important role during mid-hindbrain patterning in the mouse, regulating the timing and spatial expression of *Pax2*. Similar observations had been described for zebrafish, where *Pou2*, the ortholog of *Oct4*, was shown to activate *Pax2.1* expression. Although, we cannot exclude the possibility that *Oct1* also participates in such regulation, it is worth mentioning that the inactivation of this gene does not result in brain patterning defects (Wang et al., 2004). Because *Oct4*<sup>-/-</sup> embryos are peri-implantation lethal, the functional essentiality of Oct4 for the initiation of *Pax2* expression can only be demonstrated with a conditional knock out of this gene in the anterior neural plate.

Other POU-factors like the class III Brn proteins (Brn-1, Brn-2, Brn-4, and Oct6) and the class IV Brn-3 are widely expressed in the developing

nervous system and during neural tube formation (He et al., 1989). However, although patterns of expression in the embryonic brain have been established for most of these proteins, none of such studies has addressed the specific expression in the neural plate at E7.5 (He et al., 1989; Eng et al., 2001; Heydemann et al., 2001; Sim et al., 2002). For this reason, to consider other candidates besides *Oct4* as possible *Pax2* regulators, it would be important to precisely identify which other POU factors are present in the anterior neural plate when *Pax2* expression is initiated. On the other hand, in vivo deletion studies of all the above-mentioned POU factors, only lead to abnormalities in limited brain regions at later stages of development, indicating that, if they were involved in *Pax2* regulation, none of them is essential for such role (Philips and Luisi, 2000).

In the tgO7 line, *Pax2* up-regulation was strictly limited to its endogenous expression domain in the neural tube. The stimulation of *Pax2* gene expression was also confined in time to early somite embryos. This specificity suggests that a cofactor is restricting the domain of action of Oct4, suggesting that it is acting as a heterodimeric complex. If this were the case, our results indicate that Oct4 is able to form a functional complex with the specific partner involved in *Pax2* activation. The only known protein whose expression overlaps with *Oct4* in this *Pax2* domain of expression that can interact with POU transcription factors is Sox2; however, no binding sites for HMG proteins are present in the *Pax2* regulatory region. The possibility also remains that *Oct4* could be acting as a homodimer or monomer on the *Pax2* enhancer sequence. This situation would only be compatible with our data if a general repressor of *Pax2* expression were active all over the embryo with the exception of the anterior neural plate.

*En2*, whose expression turns on a few hours after *Pax2* initiates expression, was also transiently altered in tgO7 embryos. However, this gene was down-regulated in E8.5 embryos but recovered its normal expression level by E9.5. Because the *En2* regulatory region does not contain recognition sequences for POU proteins, we

believe that *En2* is down-regulated by Pax proteins. The *En2* gene contains regulatory regions that bind Pax2/5/8, and it has been shown that Pax proteins are required for the positive regulation of *En2* expression in the MHB region (Song and Joyner, 2000). However, higher concentrations of Pax protein would lead to a decreased transcriptional activity (Chi and Epstein, 2002).

Except for the effect on *En2* and *Fgf8*, no other gross alterations of the expression were found in the MHB of tgO7 embryos. This lack of effect on other genes might be due to the transient character of both *Pax2* and *En2* regulation. In turn, for both genes it is established that activation and maintenance of expression, is controlled by separate enhancers (Song and Joyner, 2000; Pfeffer et al., 2002) all of which is in congruence with our data. Similarly, the histological analyses of tgO7 brains indicated that no significant morphological changes in midbrain and cerebellar structures were present at E12.5. It is possible that transient morphological defects appear in earlier stages coincident with the early alterations of expression. Such defects could partially explain both the change of shape in the patterns of expression of *Otx2* and *Gbx2* at E9.5, and the detected midbrain size reduction. These abnormalities would be reverted as gene expression becomes normal, indicating a high level of plasticity in brain formation at this stage of development.

### Oct4 Had an Influence on Fgf8 Expression

An interesting question that our work raises is why *Fgf8* expression is affected by Oct4 in the two lines of transgenic embryos tested, and whether this influence is meaningful in vivo. The specificity of this phenomenon is supported by the finding that several other genes whose expression was tested in tgO7 embryos, did not show variations at midgestation, including demonstrated targets of Oct4, like *Fgf4* and *Sox2*.

Our study does not demonstrate an effect on the regulation of *Fgf8* gene expression. In fact, in the *Fgf8* regulatory region, no binding sites for POU transcription factors have been identified. Then a direct binding of Oct4 to

such regions seems unlikely. Other mechanisms for the regulation of *Fgf8* expression by Oct4 are possible. An indirect one is that Oct4 induces the expression of one or various transcriptional regulators of *Fgf8*. A second alternative is that *Oct4* could function as a coactivator (or corepressor) by interacting with a factor that directly binds to the *Fgf8* regulatory region. In this situation, Oct4 would not be required to bind *Fgf8* regulatory sequences. For example, Oct4 is known to form a transcriptional complex with the Ets type transcription factor Ets2. This transcription factor complex functions to repress *tau interferon* genes in the absence of DNA binding of Oct4 (Ezashi et al., 2001). An appealing speculation is that an unknown factor could assemble with Oct4 to regulate *Fgf8* expression.

Instead of regulating its expression, *Oct4* could be increasing Fgf8-positive cell populations. This effect could be due to an enhanced Fgf8 signaling that could initially lead to alterations on proliferation or cell survival. This kind of synergistic action has been demonstrated during early neural development in zebrafish for these two factors. In this instance, it was found that *Pou2* makes cells competent to Fgf8 signaling (Reim and Brand, 2002). In our tgO7 embryos, increased *Fgf8* expression in the tail bud is accompanied with growth of the corresponding cell population.

### Forebrain and Midbrain Size Reductions Are Likely Due to Cell Death

A visible consequence of the transient deregulated expression of brain markers in our tgO7 mice was the 20 to 25% size reduction in forebrain and midbrain at E9.5 and abnormal craniofacial and branchial arch morphogenesis. A TUNEL assay indicated that cell death in these parts of the brain was also significantly increased. In a close examination of sections from control and tgO7 embryos, we noticed that cell death in the forebrain was augmented mainly in regions where apoptosis normally occurs. Regions of normal cell death that showed an increase were localized in the optic vesicles, and within the telencephalon. The progenitor cells of much of the

telencephalic and optic domains are contained in the ANR. Furthermore, Fgf8 has been implicated in mediating some of its functions. In 30% of E8.5 tgO7 embryos, *Fgf8* expression was increased in the ANR (Fig. 5A). On the other hand, apoptosis was also increased in the dorsal diencephalon, where the domain of dying cells was expanded away from the midline. In the tgO7 E9.5 embryos, we found a striking shutdown of *Fgf8* in the vicinity of the ZLI. This band is adjacent to the diencephalic domain where cell death is increased. Therefore, areas where apoptosis is affected seem to overlap with, or be close to domains where *Fgf8* expression is altered, suggesting that cell death increases could be associated to these variations.

Recently, it was shown that *Fgf8* regulates a cell survival pathway in the telencephalon (Storm et al., 2003). The effects of varying the level of *Fgf8* expression on cell death in the forebrain, were determined. It was found that either eliminating or increasing *Fgf8* leads to decreased cell survival. The molecular pathway that has been identified on this regulation of cell survival involves the activation of *Foxg1* by Fgf8 (Storm et al., 2003). The cell death phenotype that we observe is in agreement with this report.

In contrast with the situation in the forebrain, cell death in the midbrain seemed to be ectopic and not easily associated to changes of *Fgf8* expression in the MHB. Instead, cell death in the metencephalon could be related to the loss of *En1* expression, because increased cell death has been reported in the prospective midbrain of *En1*<sup>-/-</sup> embryos (Chi et al., 2003).

### Concluding Remarks

The ectopic expression of *Oct4* in midgestation embryos had important effects on several phenotypic aspects. Of interest, these effects were more specific than predicted. A molecular explanation for this observation could be that regulation by Oct4 requires the assembly of very specific complexes on DNA enhancer sequences. For this reason, only very specific partnerships would become functional during development.

Our work provides evidence for additional biological properties besides

the ones associated to conservation of pluripotency and the fate of initial cell lineages in mammals. Furthermore, our data allow us to conclude that Oct4 can affect the activation of *Pax2* during early brain development and confirms the participation of Fgf8 signaling during brain cell death. Our results also suggest the possibility that Oct4 participates either in the regulation of *Fgf8* expression or on the modulation of Fgf8 signaling activity. Conditional *Oct4* mouse mutants will be required to further explore these suggestions.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice

*Oct4* ubiquitous expression was produced by using the *Cre/loxP* site-specific recombination system. The TNAP<sup>Cre</sup> line previously described in Lomeli et al. (2000) provides Cre expression under the control of the TNAP gene promoter. To create the *Oct4-loxP* lines, we used the pCALL vector (Lobe et al., 1999), which contains the lacZ/neomycin fusion ( $\beta$ geo) reporter gene flanked by *loxP* sites. After the second *loxP* site, *XhoI* and *BglII* restriction sites allowed the insertion of the *Oct4* cDNA sequence. Gene expression in this vector is driven by the CMV enhancer/chicken  $\beta$ -actin hybrid gene promoter (pCAGG), which has been shown to provide a consistent and strong ubiquitous expression in transgenic embryos (Lobe et al., 1999). For the *Oct4-loxP7* and *Oct4-loxP20* lines, the *Oct4* coding sequence was inserted in *BglII*. As this construct accidentally carried a strong ATG preceding the *BglII* site, we predicted an effect on the efficiency of translation of *Oct4* from its own ATG initiation codon. For this reason, a second construct was generated in which the *Oct4* cDNA was inserted into the *XhoI* site. This construct was used for the generation of the *Oct4-loxPG9* and *Oct4-loxPF12* lines. All *Oct4-loxP* lines express lacZ before Cre-mediated recombination.

We mated TNAP<sup>Cre</sup> males with *Oct4-loxP* females to produce double-transgenic TNAP<sup>Cre</sup>/*Oct4-loxP* mice in which Cre excision removed  $\beta$ geo allowing the expression of *Oct4* in gametes (Fig. 1A). Males were genotyped by PCR, and those carrying the

AQ: 4

AQ: 5

AQ: 3



two transgenic alleles, *TNAP<sup>Cre</sup>* and *Oct4-loxP*, were used for a subsequent cross with a wild-type CD1 female. This cross produced a proportion of embryos with ubiquitous expression of *Oct4* (Fig. 1A). Mating was assumed to have occurred at midnight; E0.5 was the day on which vaginal plug was found.

### Genotyping

To establish the genotype, ear punches (adults) or yolk sacs (embryos) were analyzed by PCR (lysis buffer 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20, 100 μg/ml of proteinase K). Primers for the *TNAP<sup>Cre</sup>* line (forward, CACGTC-GATGGCCGCTCTA; reverse, TA-AGGGCCAGCTCATTCTCC) generated a 262-base pair (bp) fragment; primers for the *Oct4-loxP* line (forward, CCTACAGCAGATCACTCA; reverse, CAGAAGTCAGATGCTCAAG) generated a 518-bp fragment. To identify excised embryos, the pair of primers (forward, GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC; reverse, AGCCTGGTCCGATTCCAG) generated a 372-bp fragment only after Cre excision removed βgeo.

### Scanning Electron Microscopy

Embryos were fixed in Karnovsky's fixative (3% glutaraldehyde, 0.1 M sodium cacodylate) overnight at 4°C, post-fixed with 1% OsO<sub>4</sub>, and ethanol-dehydrated; then they were dried by the critical point method, sputtered-coated with gold, and examined with scanning electron microscope (JEOL mod. 5410 LV).

### Western Blot

Cells were lysed in lysis buffer (25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5% Triton X-100, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 10 mM BGP, 10 mM NAF, 200 μM NaVO<sub>4</sub>, 1 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin). Tissues were lysed with ice-cold RIPA buffer plus 1× complete protease inhibitor cocktail (Roche). A total of 40 μg of protein were loaded to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. We used antibod-

ies directed against Oct3/4 (BD Transduction Laboratories) and β-tubulin (Santa Cruz). Relative levels of Oct3/4 protein were determined by normalization of densitometric values of Oct3/4 corrected for the amount of β-tubulin.

### Whole-Mount RNA In Situ Hybridization

Mouse embryos were fixed and processed for in situ hybridization as described previously (Hogan et al., 1994). Antisense RNA probes were synthesized by using digoxigenin RNA labeling mix (Roche).

### TUNEL Assay

Wild-type and mutant embryos were dissected at E9 and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Eight-micrometer-thick paraffin transverse sections were processed for TUNEL assay by using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche). TUNEL-positive cells were counted in the neuroepithelium of 21- to 22-somite stage tg07 (n = 4) and control (n = 4) embryos. Differences were analyzed by Student's *t*-test to determine the level of significance.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Wassef for providing *Wnt1* probe, V. Juárez and J. Sepúlveda for their technical assistance, and Dr. Jennifer Nichols and Dr. Austin Smith for *Oct4* cDNAs.

### REFERENCES

Ang S, Conlon R, Jin O, Rossant J. 1994. Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Development* 120:2979–2989.

Avilion A, Nicolis S, Pevny L, Perez L, Vivian N, Lovell-badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126–140.

Bally-Cuif L, Cholley B, Wassef M. 1995. Involvement of *Wnt1* in the formation of the mes/metencephalic boundary. *Mech Dev* 53:23–34.

Bouillet P, Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Dolle P, Chambon P. 1995. Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* 204:372–382.

Brand M, Heisenberg C, Jiang Y, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane D, et al. 1996. Mutation in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* 123:179–190.

Burgess S, Reim G, Chen W, Hopkins N, Brand M. 2002. The zebrafish *spielonhe-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* 129:905–916.

Chi N, Epstein J. 2002. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18:41–47.

Crossley P, Martin G. 1995. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121:439–451.

Davis C, Joyner A. 1988. Expression patterns of the homeobox containing genes *En1* and *En2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes Dev* 2:1736–1744.

Dubrulle J, McGrew M, Pourquie O. 2001. FGF signalling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 106:219–232.

Eng S, Gratwick K, Rhee J, Fedtsova N, Gan L, Turner E. 2001. Defects in sensory axon growth precede neuronal death in *Brn3a*-deficient mice. *J Neurosci* 21:541–549.

Ezashi T, Ghosh D, Roberts R. 2001. Repression of *Ets-2*-induced transactivation of the tau interferon promoter by *Oct-4*. *Mol Cell Biol* 21:7883–7891.

He X, Treacy M, Simmons D, Ingraham H, Swanson L, Rosenfeld M. 1989. Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* 340:35–42.

Heydemann A, Nguyen L, Crenshaw E. 2001. Regulatory regions from the *Brn4* promoter direct LACZ expression to the developing forebrain and neural tube. *Brain Res Dev Brain Res* 128:83–90.

Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Liu A, Joyner AL. 2001. Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 24:869–896.

Lomeli H, Ramos-Mejía V, Gertsenstein M, Lobe C, Nagy A. 2000. Targeted insertion of Cre recombinase into the *TNAP* gene: excision in primordial germ cells. *Genesis* 26:116–117.

Meyers E, Lewandoski M, Martin G. 1998. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and FLP-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136–141.

Moon A, Capecchi M. 2000. *Fgf8* is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 26:455–459.

- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:378–391.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith A. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372–376.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in the mouse embryonic cells. *Cell* 60:461–472.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth D, Schöler H. 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71:89–98.
- Pfeffer P, Payer B, Reim G, di Magliano M, Busslinger M. 2002. The activation and maintenance of Pax2 expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separated enhancers. *Development* 129:307–318.
- Phillips K, Luisi B. 2000. The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J Mol Biol* 302:1023–1039.
- Reifers F, Adams J, Mason I, Schulte-Merker S, Brand M. 2000. Overlapping and distinct functions provided by fgf17, a new zebrafish member of the Fgf8/17/18 subgroup of Fgfs. *Mech Dev* 99:39–49.
- Reim G, Brand M. 2002. *spiel-onhe-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development* 129:917–933.
- Rosner M, Vigano M, Ozato K, Timmons P, Poirier F, Rigby P, Staudt L. 1990. A POU domain transcription factor in early stem cells of the mammalian embryo. *Nature* 345:686–692.
- Rowitch D, McMahon A. 1995. Pax-2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mech Dev* 52:3–8.
- Schöler H, Dressler G, Balling R, Rohdewold H, Gruss P. 1990a. Oct-4: a germline specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9:2185–2195.
- Schöler H, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. 1990b. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435–439.
- Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. 2003. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* 130:2505–2512.
- Sim F, Zhao C, Li W, Lakatos A, Franklin R. 2002. Expression of the POU-domain transcription factors SCIP/Oct-6 and Brn-2 is associated with Schwann cell but not oligodendrocyte remyelination of the CNS. *Mol Cell Neurosci* 20:669–682.
- Simeone A, Acampora D, Guilisano M, Stomaiuolo A, Boncinelli E. 1992. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687–690.
- Song D, Joyner A. 2000. Two Pax2/5/8-binding sites in Engrailed2 are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech Dev* 90:155–165.
- Storm E, Rubenstein J, Martin G. 2003. Dosage of Fgf8 determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1757–1762.
- Sun X, Meyers E, Lewandoski M, Martin G. 1999. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13:1834–1846.
- Wang V, Schmidt T, Chen J, Sharp P, Tantin D. 2004. Embryonic lethality, decreased erythropoiesis, and defective octamer-dependent promoter activation in Oct-1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24:1022–1032.
- Wurst W, Bally-Cuif L. 2001. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat Rev Neurosci* 2:99–108.
- Yeom Y, Fuhrmann G, Ovitt C, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöler H. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonic cells. *Development* 122:881–893.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. 1995. Developmental-specific activity of the Fgf4 enhancer requires the synergistic action of Sox-2 and Oct-3. *Genes Dev* 9:2635–2645.

Author Proof

## DISCUSIÓN

En este trabajo caracterizamos embriones transgénicos que expresan ubicuamente *Oct4*, generados con el fin de investigar el efecto de alterar los niveles de expresión de este gen *in vivo*. Esperábamos una letalidad temprana, ya que en el blastocisto es necesario que baje la expresión de *Oct4* para que diferencie el trofoectodermo. Sin embargo, los embriones tgO7 mueren alrededor de E13, al parecer por algún problema cardíaco. Al determinar en blastocistos la expresión de la proteína con inmunofluorescencia, nos dimos cuenta que no está incrementado OCT4 en embriones tgO7, probablemente debido a deficiencias en la expresión del transgen en estadios tempranos. El hecho de que no tuvieron efecto temprano nos permitió observar fenotipos tardíos que revelan posibles nuevas funciones de *Oct4*.

Mediante hibridación *in situ*, a partir de E8 detectamos una fuerte expresión de *Oct4* exógeno en los embriones tgO7. La cuantificación de la proteína nos reveló que extractos proteicos de embriones tgO7 en E9.5, tienen un 45% de proteína con respecto al nivel de OCT4 de las ES. El fenotipo de los embriones tgO7 incluye defectos en la formación de la cabeza, deformidades en la cola, transformaciones homeóticas a nivel de las vértebras y patas malformadas. Agrupamos las malformaciones en fenotipo con alteraciones en estructuras anteriores (cabeza, SNC y ojos), fenotipo con alteraciones en estructuras axiales (vértebras y cola) y el fenotipo de las patas.

Con la expresión ubicua de *Oct4* en los embriones tgO7 es importante diferenciar entre las regiones donde *Oct4* se expresa normalmente y que en los transgénicos causa un aumento de la expresión, de aquellas regiones donde nunca se expresa y que en los transgénicos corresponde a una expresión ectópica. Nos interesaba analizar los fenotipos que pudieran estar relacionados con la función silvestre de *Oct4*, y dado que este factor transcripcional se expresa normalmente en el neuroectodermo en el momento que se establecen las diferentes regiones del cerebro, decidimos enfocarnos al análisis del fenotipo en el SNC.

El fenotipo con alteraciones en estructuras axiales, que comprende la formación de una cola engrosada y el cambio de identidad en las vértebras, se presentó en todas las líneas transgénicas. Pensamos que dichas alteraciones se deben a un efecto temprano del aumento de expresión de *Oct4* en el mesodermo presomítico. El engrosamiento de la cola puede explicarse por un aumento en la población de células pluripotentes producido al incrementar la expresión de *Oct4* en el MPS. Alternativamente, puede ocurrir que la migración de las células del MPS sea mas lenta. Por otro lado, las transformaciones homeóticas que encontramos en los embriones con sobreexpresión de *Oct4* corresponden a anteriorizaciones en las vértebras cervicales y torácicas. Dicho cambio de la identidad axial es parecido al que se presenta en mutantes con pérdida de función de *Hox8*, *Hox9* y *Cdx2*. En el estudio de Niwa y cols. (1998), la expresión de *Cdx2* es reprimida cuando se incrementa el nivel de expresión de *Oct4*. *Cdx2* se expresa normalmente en el MPS, los embriones heterócigos para la pérdida de función de *Cdx2* presentan anteriorizaciones en las vértebras cervicales y torácicas, además de que se altera la expresión de algunos genes homeóticos, como por ejemplo *Hoxb8*. Por lo anterior, es probable que al incrementar la expresión de *Oct4* en el MPS se reprima la expresión de *Cdx2*, ocasionando que se modifique la expresión de algunos genes homeóticos y finalmente se altere la identidad axial. Sin embargo, es necesario examinar la expresión de *Cdx2* y de genes los homeóticos en los embriones tgO7 para establecer si es correcta nuestra hipótesis.

El fenotipo de las extremidades corresponde a un fenotipo producido por una expresión ectópica de *Oct4*. Dicho fenotipo solo fue observado en la línea tgO7, lo que podría deberse al sitio de inserción del transgen.

Por otra parte, hubo un efecto interesante en la expresión de *Fgf8*, ya que en casi todas las regiones donde se expresa normalmente se incrementó su expresión, aunque también mostró una disminución en su expresión en la zona limitans y en las extremidades. Parece improbable que *Oct4* regule directamente a *Fgf8*, ya que no se existen sitios de unión para OCT4 en la región reguladora

de *Fgf8*. Sin embargo, este resultado revela que existe una interacción entre éstos genes.

### 1. El organizador del istmo en embriones tgO7

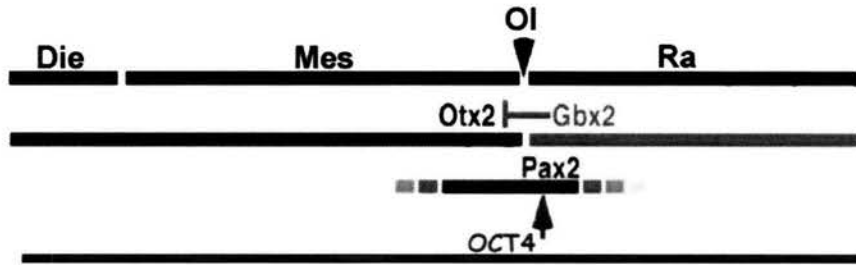
*Oct4* se expresa normalmente en el neuroectodermo de ratón en E7-E8. Su ortólogo en el pez cebra, *pou2*, tiene una función en el establecimiento del OI. Así mismo, la expresión temprana de *Pax2* en ratón depende de un enhancer al que *Oct4* se une con alta afinidad. Por esta razón, nos enfocamos a analizar el efecto de la sobreexpresión de *Oct4* en el OI.

En embriones en E7.5 está incrementada la expresión de *Pax2*, mientras ningún otro de los genes analizados (*Fgf8*, *Gbx2* y *Otx2*) mostraron alterada su expresión. Es interesante que la expresión de *Pax2* aumenta hacia la región anterior del embrión. Pfeiffer y cols.(2002) generaron ratones transgénicos, en los cuales el enhancer que dirige la expresión temprana de *Pax2* lleva una duplicación en la secuencia octamérica, a la que se une *Oct4*. En dichos ratones transgénicos, la expresión de *Pax2* se incrementa hacia la región anterior del embrión, de manera similar que a los ratones tgO7. Es posible que exista algún regulador negativo que evita la expresión de *Pax2*, a través de ese enhancer, en otras regiones del embrión. Otra posibilidad es que *Oct4* dependa de algún cofactor para activar la expresión de *Pax2*. Sin embargo, *Sox2* es el único cofactor demostrado de OCT4 que se expresa en esa región del embrión y el enhancer temprano de *Pax2* no tiene sitios de pegado para proteínas SOX.

Hay que considerar que la expresión temprana de *Pax2* podría activarse normalmente por otras proteínas con dominio POU y que *Oct4*, al estar sobreexpresado, interfiera con su función. Sin embargo, esto parece poco probable por las evidencias que se presentan a continuación. Las proteínas con dominio POU que se expresan en el desarrollo del SNC son *Oct1*, *Brn-1*, *Brn-2*, *Brn-4* y *Oct6* (He *et.al.*,1999). *Oct1* puede unirse al enhancer de *Pax2*, pero el ratón nulo para *Oct1* no muestra defectos en la formación del cerebro. Por otra parte, no se han establecido los patrones tempranos de expresión de *Brn-1*, *Brn-2*, *Brn-4* y *Oct6*, así que no sabemos si se expresan en el neuroectodermo en

E7.5. Además, los ratones nulos para estos genes muestran fenotipos tardíos en el desarrollo del SNC (Philips y Luisi, 2000).

Por lo anterior proponemos que en el embrión de ratón en gastrulación, OCT4 activa la expresión de *Pax2* en la región del neuroectodermo donde se encuentran los límites de expresión de *Otx2* y *Gbx2*, delimitando la región donde se establece el OI, como se muestra en el siguiente esquema:



Modelo de la acción de OCT4 sobre *Pax2* durante la fase del establecimiento del organizador del istmo (OI). Die: diencefalo, Mes: mesencefalo, Ra: romboencefalo.

En etapas posteriores del desarrollo, la expresión de *Pax2* ya no depende de OCT4 y se mantiene por la acción de los factores transcripcionales EN1/2 y PAX2/5/8.

Por otra parte, la expresión de *Fgf8* no se modificó en E7.5, aunque se ha reportado que *Pax2* es capaz de activar su expresión (Ye *et.al.*, 2001). Sin embargo, la expresión inicial de *Fgf8* es normal en mutantes nulos para *Pax2*, tanto en ratón como en pez cebra, y se pierde gradualmente en etapas posteriores. Lo anterior indica que PAX2 es importante para mantener, mas no iniciar, la expresión de *Fgf8*. Así, en los embriones tgO7, la sobreexpresión temprana de *Pax2* no afecta la expresión temprana de *Fgf8*.

En E8.5 disminuyó la expresión de *En2* en embriones tgO7. Como la región reguladora de *En2* no tiene dominios de unión para *Oct4*, pensamos que su decremento transitorio se debe a la sobreexpresión de *Pax2*. PAX2 es capaz de activar la transcripción de *En2* (Song y Joyner, 2000), pero a altas dosis las proteínas PAX pueden ser represoras transcripcionales de sus genes blancos (Chi y Epstein, 2002).

Para la fase de mantenimiento del OI, la expresión de los marcadores regresa a la normalidad. Nuestros datos concuerdan con estudios anteriores donde se ha demostrado que la expresión de cada uno de los marcadores del OI en este periodo está finamente regulada por la expresión de los otros, lo que le da una gran plasticidad a esta región, tal vez debido a la gran importancia que tiene el organizador en el desarrollo del cerebro. Además, resulta interesante que para E12 no encontramos alteraciones morfológicas evidentes en el cerebro, aunque no podemos descartar que existan alteraciones en la diferenciación de poblaciones celulares en el SNC. Por esta razón, proponemos analizar la expresión de marcadores que nos indiquen si el incremento en la expresión de *Oct4* puede afectar la diferenciación celular en esta región.

## **2. La expresión de *Fgf8* se altera en los embriones tgO7.**

En nuestro estudio analizamos la expresión de una gran cantidad de genes. Entre éstos, sólo en *Pax2*, *En2* y *Fgf8*, la expresión está alterada significativamente. El efecto sobre *Fgf8* llama la atención, pues su expresión se altera en sus regiones de expresión endógenas, ya sea que corresponda a una región con sobreexpresión o con expresión ectópica de *Oct4*. La región reguladora de *Fgf8* no está bien caracterizada, ni hemos encontrado en bases de datos sitios de unión para proteínas POU, por lo que no es probable que *Oct4* lo regule directamente. Sin embargo, se sabe que *Oct4* puede regular transcripcionalmente un gen sin unirse a su región reguladora, como es el caso de la represión del *interferon tau* mediante la formación de un complejo con *Ets2*, el cual se une al DNA (Ezashi et.al.,2001). Por otro lado, en el pez cebra se describió una interacción entre *pou2* y *Fgf8* en la formación del cerebro posterior, donde *pou2* hace competentes a las células de esa región para responder a *Fgf8* (Reim y Brand, 2002). Esta posibilidad concuerda con la acumulación de células en el mesodermo presomítico, una región donde *Oct4* y *Fgf8* están sobreexpresados.

## **3. Reducción de las regiones anteriores del cerebro.**

El telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo son significativamente más pequeños en los embriones tgO7 en E9.5. Estas mismas regiones tienen un

incremento significativo en la muerte celular en el mismo periodo embrionario. Dado que *Oct4* esta implicado en determinar destinos celulares, es muy probable que sea necesario que su expresión se apague para que continúe normalmente el desarrollo del cerebro. Así, estamos observando el efecto de expresar ectópicamente *Oct4* en el cerebro y como consecuencia obtenemos un desarrollo anormal, que se refleja en la reducción de su tamaño. También es posible que *Fgf8* participe en el incremento de la muerte celular en estas regiones, ya que se ha demostrado que alterar sus niveles de expresión produce muerte celular (Storm *et.al.*,2003). Adicionalmente, puede participar la baja expresión de *En2*, pues en el ratón nulo para *En1* la muerte celular aumenta en el mesencéfalo (Chi *et.al.*,2003).

Aunque hubo un incremento en la muerte celular en la región procencefálica y el mesencéfalo de los embriones tgO7, no se observaron alteraciones morfológicas evidentes en el cerebro en E12. Sin embargo, a nivel molecular no sabemos si la diferenciación de los grupos neurales está afectada en éstas regiones, por lo que proponemos el análisis celular con marcadores de diferenciación. En este punto hay que reflexionar sobre el dramático fenotipo facial de los embriones tgO7, que tienen la quijada y los procesos nasales y maxilares reducidos. Las células de la cresta neural que dan lugar a los procesos nasales y maxilares provienen de las regiones del cerebro que tuvieron un incremento en muerte celular, el telencéfalo y el mesencéfalo. Es posible que el incremento en la muerte celular afecte el número de células de la cresta neural que migran del neuroectodermo para dar lugar al mesénquima facial (Trainor y Krumlauf, 2000, y Chambers y McGonnel, 2002). En el mismo sentido, la quijada se forma de células que migran del primer arco branquial, el cual mostró también alteraciones morfológicas y moleculares, tales como la sobreexpresión transitoria de *Fgf8* y *Pax2*.



## CONCLUSIONES

Nuestro estudio sugiere que *Oct4* puede tener otras funciones además del mantenimiento de la pluripotencialidad.

Los embriones tgO7 tienen una expresión generalizada, aunque a bajos niveles, de *Oct4* y presentaron un fenotipo complejo. Aunque los embriones tgO7 expresan ubicuamente *Oct4*, nuestro análisis revela que el efecto a nivel molecular es muy restringido, ya que únicamente se altera la expresión *Pax2*, *En2* y *Fgf8*. Por lo anterior creemos que la función de *Oct4* debe estar finamente controlada por la presencia de cofactores y la accesibilidad de las secuencias reguladoras en sus genes blanco.

La función de *Oct4* en el embrión pre-implantación es la que hasta el momento se ha estudiado mejor. Sin embargo, en etapas post-implantación *Oct4* se expresa en regiones donde se llevan a cabo procesos importantes de determinación de estructuras embrionarias, tales como el surco primitivo, el mesodermo presomítico y el neuroectodermo. El fenotipo de los embriones tgO7 incluye alteraciones en la diferenciación de dichas regiones, que muy probablemente son ocasionadas por la sobreexpresión de *Oct4* en las mismas. En nuestro estudio nos centramos en analizar el efecto del incremento en la expresión de *Oct4* en el neuroectodermo, particularmente en el organizador del Istmo. Presentamos evidencias de que la expresión inicial de *Pax2* depende de *Oct4*. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren una interacción genética de *Oct4* con *Fgf8*.

Proponemos que *Oct4* además de mantener un estado indiferenciado en células, participa en procesos de diferenciación que estarían conservados entre el pez cebra y el ratón.

## PERSPECTIVAS

En pez cebra, la mutante *spg* donde se elimina el *pou2* de origen materno no se forma el endodermo. *Pou2* participa en el establecimiento del endodermo al activar la transcripción de *Sox17*, el primer gen en la cascada de su diferenciación. Sin embargo, al disminuir el nivel de expresión de *Oct4* en células EC, se induce la expresión de marcadores de diferenciación endodérmicos, tales como *Gata6* y  $\alpha$ -fetoproteína. Los datos son contradictorios, por lo que propongo analizar el efecto en la formación del endodermo al incrementar la expresión de *Oct4 in vivo*, con nuestro modelo experimental.

Por otra parte, también es interesante analizar que relación existe entre el fenotipo axial de los embriones transgénicos y el incremento en la dosis de *Oct4* en el mesodermo presomítico. Para lo cual habría que analizar la expresión de genes que participan en la somitogénesis, de genes que establecen la identidad axial, la morfología y el tiempo de formación de las somitas.

Finalmente, es recomendable inactivar la expresión de *Oct4* en el neuroectodermo, para comprobar su participación en la activación inicial de *Pax2*. Para esto propongo utilizar RNA de interferencia en embriones en gastrulación. De igual forma, inactivar su expresión del MPS nos permitiría estudiar su función en esta región.

## APÉNDICES

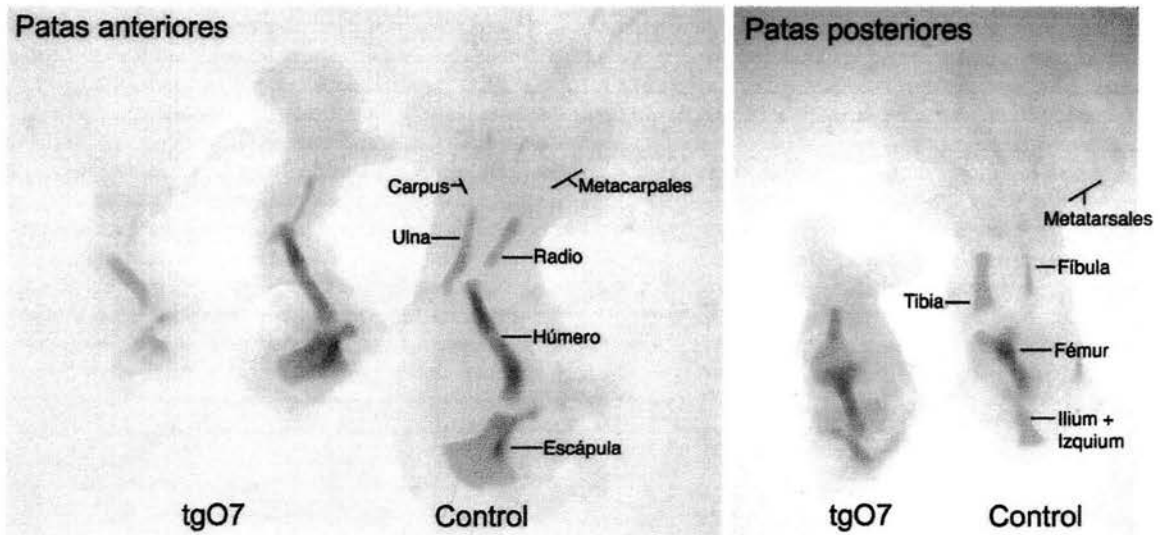
### APENDICE I

#### Fenotipo en la extremidades.

Las extremidades en el embrión de ratón se forman a partir de protuberancias que se proyectan de los costados de la pared lateral de cuerpo; las cuales aparecen en E9-9.5, y consisten en células mesenquimáticas envueltas por una capa de ectodermo. El cartilago y el hueso de las extremidades derivan del mesodermo lateral de estas protuberancias, mientras que los músculos se forman a partir de células provenientes de las somitas. Conforme la extremidad crece, el ectodermo superficial se engrosa formando la cresta ectodérmica apical (CEA), que es esencial para mantener la proliferación y el establecimiento de patrones en la región que se encuentra por debajo de ella, la zona de progresión (ZP). La polaridad antero-posterior en las extremidades requiere de la zona con actividad polarizante (ZAP), localizada en el margen posterior de la ZP.

Unicamente en los embriones tgO7, desde el inicio de la formación de las extremidades, observamos alterada su morfología (Fig.11). Conforme avanza el desarrollo fue evidente que las extremidades de los embriones tgO7 carecen de algunos elementos, por lo que decidimos realizar tinciones de cartilago(Fig.20).

En un mismo embrión tgO7, no se afectaron de igual manera todas las extremidades, ya que algunas presentaron fenotipos muy severos y otras fueron normales.



**FIGURA 20.** Tinción de cartílago en las extremidades de embriones tgO7

De 14 embriones tgO7 analizados, en la tabla IV se muestran los resultados de los elementos con que contaban las extremidades anteriores y en la tabla V la de los elementos de las extremidades posteriores. Es decir, por ejemplo en la tabla IV, de 28 extremidades superiores, 3 (el 10.7%) sólo contaban con la escápula, mientras que 14 (el 50%) eran normales ya que tenían los elementos esqueléticos completos.

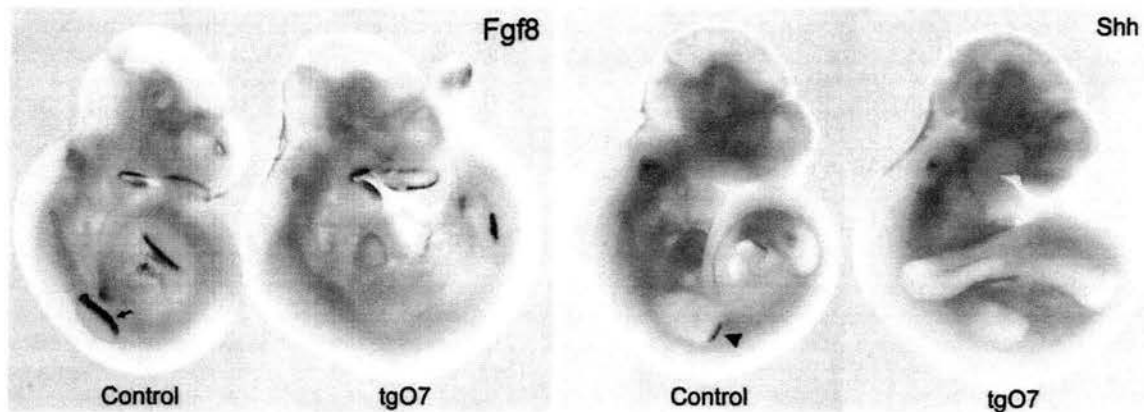
Escápula +	Húmero	Radio	Ulna	Carpus + Metacarpales
3 (10.7%)				
	3 (10.7%)			
		5 (17.8%)		
				3 (10.7%)
14 (50%)				

**TABLA IV.** En gris se señalan los elementos que tenían las extremidades superiores de embriones tgO7. n = 28.

Ilium + Izquium + femur	Tibia	Fibula	Metatarsales
1 (3.5%)			
9 (32.1%)			
			3 (10.7%)
15 (53.5%)			

**TABLA V.** Elementos encontrados en las extremidades posteriores de los embriones tgO7. n =28.

La expresión de *Fgf8* marca la CEA, mientras que *Shh* es un marcador de la ZAP. En E10 analizamos la expresión de ambos marcadores y observamos que se pierde su expresión en las patas que presentan con mayor severidad el fenotipo (Fig.21).



**FIGURA 21.** La expresión de *Fgf8* en las patas marca la cresta ectodérmica apical (CEA, flecha), mientras que *Shh* marca la zona de actividad polarizante (ZAP, punta de flecha). En los embriones tgO7 se pierde la expresión de ambos marcadores

## **APENDICE II.**

### **Tinción de cartílago.**

Con la finalidad de ver como se forman los elementos esqueléticos en los embriones que expresan *Oct4* ubicuamente, se realizó una tinción con Alizarina Roja y Azul Alciano en embriones de E13 CD1 (n=8 ), tgO7 (n=14), tgO20 (n=14), tgOF12 (n=9) y tgOG9 (n=13). A continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos. En condiciones silvestres los ratones tienen 7 vértebras cervicales, 13 torácicas (vértebras con costillas), 6 lumbares y 4 sacras (vértebras donde se localizan los miembros inferiores). Para E13 los 8 embriones CD1 analizados correspondieron con el número de vértebras reportado. En los embriones transgénicos el número de cervicales fue de 7 u 8, de 13 a 16 torácicas y de 5 a 7 lumbares . En el análisis estadístico no se tomaron en cuenta las vértebras lumbares ya que en muchos embriones la poca condensación del cartílago en los elementos de las patas inferiores no permitían definir las vértebras sacras y por lo mismo no es preciso el número de las lumbares determinado. Algunas veces las alteraciones no fueron simétricas, en cuyo caso se señala en la tabla si se encontraron del lado derecho (dcho.) o izquierdo (izqdo.). Para E13 de 18 embriones tgOF12 9 estaban en proceso de reabsorción, por lo que solo fue posible contar vértebras en 9 embriones.

Vértabras	Cervicales		Torácicas				Lumbares***			Observaciones
	CD1 = 7		CD1 = 13				CD1 = 6			
	7	8	13	14	15	16	5	6	7	
<b>Embriones tgO7 (n=14)</b>										
1		✓	✓						✓	
2	✓		✓					✓		
3	✓		✓					✓		
4	✓		✓					✓		
5		✓		✓					✓	
6		✓		✓					✓	Costillas fusionadas (V9-10 lado derecho)
7	✓			✓				✓		
8	✓			✓			✓			
9	✓				✓				✓	
10		✓			✓			✓		
11	✓				✓				✓	Costillas 5 y 6 (V12 y 13) fusionadas
12	✓*	✓**			✓*	✓		✓		Costillas fusionadas (V9 y 10)
13	✓					✓	✓			
14	✓					✓		✓		Costillas fusionadas (V11 y 12 lado izdo.)

(\*)lado derecho, (\*\*) lado izquierdo, (\*\*\*) no se tomó en cuenta para la estadística.

Vértebras	Cervicales		Torácicas			Lumbares***			Observaciones
	CD1 = 7		CD1 = 13			CD1 = 6			
	7	8	13	14	15	5	6	7	
<b>Embriones tgO20 (n=14)</b>									
1	✓		✓				✓		
2	✓		✓				✓		
3	✓		✓				✓		
4	✓		✓				✓		
5	✓*	✓**		✓*	✓*			✓	
				*					
6	✓				✓			✓	
7	✓				✓		✓		Costillas fusionadas (V9 y 10 lado dcho.)
8	✓				✓		✓		
9	✓				✓		✓		
10	✓				✓		✓		
11	✓				✓		✓		
12	✓				✓		✓		
13	✓				✓		✓		
14	✓				✓		✓		Costillas fusionadas (V8 - 9 lado dcho y V8- 9 lado izqdo.)

(\*)lado derecho, (\*\*) lado izquierdo, (\*\*\*) no se tomó en cuenta para la estadística.



Vértebras	Cervicales	Torácicas		Lumbares***		Observaciones
	CD1 = 7	CD1 = 13		CD1 = 6		
	7	13	14	5	6	
<b>Embriones tgOG9 (n=13)</b>						
1	✓	✓			✓	
2	✓	✓			✓	
3	✓	✓			✓	
4	✓		✓	✓		
5	✓		✓	✓		Costilla de la V21 es muy pequeña.
6	✓		✓	✓		
7	✓		✓	✓		Costilla de la V21 es muy pequeña.
8	✓		✓	✓		
9	✓		✓	✓		
10	✓		✓	✓		
11	✓		✓	✓		
12	✓		✓	✓		
13	✓		✓	✓		Costilla de la V21 es muy pequeña.

(\*\*\*) no se tomó en cuenta para la estadística.

Vértebras	Cervicales CD1 = 7		Torácicas CD1 = 13		Lumbares <sup>***</sup> CD1 = 6		Observaciones
	7	8	13	14	5	6	
<b>Embriones tgOF12 (n=9)</b>							
1	✓		✓			✓	
2	✓		✓			✓	
3	✓			✓		✓	
4	✓			✓		✓	
5	✓			✓	✓		
6	✓			✓	✓		
7	✓			✓	✓		
8		✓		✓	✓		Poca condensación del cartílago.
9		✓		✓		✓	Poca condensación del cartílago.

(<sup>\*\*\*</sup>) no se tomó en cuenta para la estadística.

## BIBLIOGRAFÍA

- Asano M, Gruss P.** (1992) *Pax5* is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech.Dev.* **39**, 29-39.
- Bally-Cuif L, Cholley B, Wassef M.** (1995) Involvement of *Wnt1* in the formation of the mes/metencephalic boundary. *Mech. Dev.* **53**, 24-24.
- Ben-Shushan E, Pikarsky E, Klar A, Bergman Y.** (1993) Extinction of *Oct-3/4* gene expression in embryonal carcinoma x fibroblast somatic cells hybrids is accompanied by changes in methylation status, chromatin structure and transcriptional activity of the *Oct-3/4* upstream region. *Mol.Cel.Biol.* **13**, 891-901.
- Ben-Shushan E, Thompson J, Gudas L, Bergman Y.** (1998) *Rex-1*, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via *Oct-3/4* and *Oct-6* binding to an Octamer site and a novel protein, *Rox-1*, binding to an adjacent site. *Mol.Cel. Biol.* **18**, 1866-1878.
- Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross M, Vriend G, Schöler H.** (1998) New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin perimplantation enhancer by *Oct-4* and *Sox-2*. *Genes Dev.* **12**, 2073-2090.
- Brand M, Heisenberg C, Jiang Y, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane D. et.al.** (1996) Mutation in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development.* **123**, 179-190.
- Brehm A, Ohbo K, Schöler H.** (1997) The carboxy-terminal transactivation domain of *Oct-4* acquires cell specificity through the POU domain. *Mol.Cel.Biol.* **17**, 154-162.
- Brehm A, Ohbo K, Zwerschke W, Botquin V, Jansen-Durr P, Schöler H.** (1999) Synergism with the germ line transcription factor *Oct-4*: viral oncoproteins share the ability to mimic a stem cell-specific activity. *Mol.Cel.Biol.* **19**, 2635-2643.
- Burgess S, Reim G, Chen W, Hopkins N, Brand M.** (2002) The zebrafish spiel-onhe-grenzen (*spg*) gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development.* **129**, 905-916.

- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A.** (2003) Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. **113**, 643-655.
- Chambers D, McGonnel, M.** (2002) Neural crest: facing the facts of head development. *Trends Genet.* **18**, 381-384.
- Chi N, Epstein J.** (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* **18**, 41-47.
- Chi C, Martinez S, Wurst W, Martin G.** (2003) The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development*. **130**, 2633-2644.
- Crossley P, Martin G.** (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*. **121**, 439-451.
- Crossley P, Martinez S, Martin G.** (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*. **380**, 66-68.
- Dale K, Pourquie O.** (2000). A clock-work somite. *Bioessays*. **22**, 72-83.
- Davis C, Joyner A.** (1988). Expression patterns of the homeobox containing genes *En1* and *En2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes Dev.* **2**, 1736-1744
- Dubrulle J, McGrew M, Pourquie O.** (2001) FGF signalling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell*. **106**, 219-232.
- Ezashi T, Ghosh D, Roberts R.** (2001). Repression of Ets-2-induced transactivation of the *tau interferon* promoter by Oct-4. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7883-7891.
- Fraidenraich D, Lang R, Basilico C.** (1998) Distinct regulatory elements govern *Fgf4* gene expression in the mouse blastocyst, myotomes, and developing limb. *Dev. Biol.* **204**, 197-209.
- Fuhrmann G, Chung A, Jackson K, Hummelke G, Baniahmad A, Sutter J, Sylvester I, Schöler H, Cooney A.** (2001) Mouse germline restriction of *Oct-4* expression by germ cell nuclear factor. *Dev. Cell.* **1**;377-387.

**Gidekel S, Bergman Y.** (2002) A unique developmental pattern of *Oct-3/4* DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. *J. Biol. Chem.* **277**, 34521-34530.

**Guo Y, Costa R, Ramsey H, Starnes T, Vance G, Robertson K, Kelley M, Reinbold R, Schöler H, Hromas R.** (2002). The embryonic stem cell transcription factors *Oct-4* and *FoxD3* interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *PNAS.* **99**, 3663-3667.

**Hay D, Sutherland L, Clark J, Burdon T.** (2004). *Oct-4* knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* **22**, 225-235.

**He X, Treacy M, Simmons D, Ingraham H, Swanson L, Rosenfeld M.** (1998). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature.* **340**:35-42.

**Hirsinger E, Jouve C, Dubrulle J, Pourquie O.** (2000). Somite formation and patterning. *Int Rev Cytol.* **198**,1-65.

**Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E.** (1994). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Kraft H, Mosselman S, Smits H, Hohenstein P, Piek E, Chen Q, Artzt K, van Zoelen E.** (1996) *Oct-4* regulates alternative platelet-derived growth factor  $\alpha$  receptor gene promoter in human embryonal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 12873-12878.

**Liu A, Joyner A.** (2001) Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 869-896.

**Liu L, Leaman D, Villalta M, Roberts M.** (1997) Silencing of the gene for the  $\alpha$ -subunit of the human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor *Oct-3/4*. *Mol. Endo.* **11**,1651-1658.

**Lobe C, Koop K, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M, Nagy A.** (1999) *Z/AP*, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol.* **208**,281-292.

- Lomelí H, Ramos-Mejía V, Gertsenstein M, Lobe C, Nagy A.** (2000) Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis*. **26**, 116-117.
- Lun K, Brand M.** (1998) A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development*. **125**, 3049-62.
- McMahon A, Bradley A.**(1990). The *Wnt-1 (int-1)* proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*. **62**,1073-1085.
- Meyers E, Lewandoski M, Martin G.** (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat.Genet*. **18**, 136-141.
- Moon A, Capecchi M.** (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat. Genet*. **26**, 455-459.
- Nichols J, Evans E, Smith A.** (1990). Establishment of germline-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*. **110**, 1341-1348.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *Oct-4*. *Cell*. **95**, 378-391.
- Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M.** (1999) The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol.Cell Biol*. **19**, 5453-5465.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith A.** (2000).Quantitative expression of *Oct-3/4* defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat.Genet*. **24**, 372-376.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H.** (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in the mouse embryonic cells. *Cell*. **60**, 461-472.

- Palmieri S, Peter W, Hess H, Schöler H.** (1994). *Oct-4* transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* **166**, 259-267.
- Pan G, Chang Z, Schöler H, Pei D.** (2002) Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* **12**, 321-329.
- Pesce M, Gross M, Schöler H.** (1998a) In line with our ancestors: *Oct-4* and the mammalian germ. *Bioessays.* **20**,722-732.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth D, Schöler H.** (1998b) Differential expression of the *Oct-4* transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* **71**, 89-98.
- Pfeffer P, Gerster T, Lun K, Brand M, Busslinger M.** (1998) Characterization of three novel members of the zebrafish *Pax2/5/8* family: dependency of *Pax5* and *Pax8* expression on the *Pax2.1* (*noi*) function. *Development.* **125**, 3063-3074.
- Pfeffer P, Payer B, Reim G, di Magliano M, Busslinger M.** (2002).The activation and maintenance of *Pax2* expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separated enhancers. *Development.* **129**, 307-318.
- Phillips K, Luisi B.** (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J.Mol.Biol.***302**, 1023-1039.
- Pourquie O.** (2001). Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.***17**, 311-350.
- Pourquie O, Tam P.** (2001). A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Dev Cell.***1**, 619-620.
- Reifers F, Adams J, Mason I, Schulte-Merker S, Brand M.** (2000). Overlapping and distinct functions provided by *fgf17*, a new zebrafish member of the *Fgf8/17/18* subgroup of Fgfs. *Mech. Dev.* **99**, 39-49.
- Reim G, Brand M.** (2002). *spiel-ohne-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development.***129**, 917-933.

- Reményi A, Lins K, Nissen J, Reinbold R, Schöler H, Wilmanns M.** (2003) Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev.* **17**,2048-2059.
- Rhinn M, Brand M.** (2001) The midbrain-hindbrain boundary organizer. *Curr.Op.Neurobiol.* **11**,34-42.
- Rosner M, Vigano M, Ozato K, Timmons P, Poirier F, Rigby P, Staudt L.** (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells of the mammalian embryo. *Nature.* **345**, 686-692.
- Rowitch D, McMahon A.** (1995). *Pax-2* expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of *Wnt-1* and *En-1*. *Mech. Dev.* **52**, 3-8
- Ryan A, Rosenfeld M.** (1997) POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* **11**,1207-1225.
- Saga Y, Takeda H.** (2001). The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nat Rev Genet.* **2**, 835-845.
- Saijoh Y, Fujii H, Meno C, Sato M, Hirota Y, Nagamatsu S, Ikeda M, Hamada H.** (1996). Identification of putative downstream genes of *Oct-3*, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells.* **1**, 239-2 52.
- Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T.** (2003). Involvement of *Oct3/4* in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis- inducing cultures. *Development.* **130**, 2505-2512.
- Schöler H.** (1991) Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet.* **7**; 323-329.
- Schöler H, Dressler G, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P.** (1990a). *Oct-4*: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* **9**, 2185-2195.
- Schöler H, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P.** (1990b) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature.* **344**, 435-439.
- Song D, Joyner A.**(2000). Two *Pax2/5/8*-binding sites in *Engrailed2* are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech. Dev.* **90**, 155-165.



- Storm E, Rubenstein J, Martin G.** (2003). Dosage of *Fgf8* determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain. *PNAS*. **100**,1757-1762.
- Sun X, Meyers E, Lewandoski M, Martin G.** (1999). Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev*. **13**, 1834-1846.
- Sylvester I, Schöler H.** (1994) Regulation of the *Oct-4* gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids. Res.* **22**,901-911.
- Tomilin A, Reményi A, Lins K, Bak H, Leidel S, Vriend G, Wilmanns M, Schöler H.** (2000) Synergism with the coactivator OBF1 (OCA-B,BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell*.**103**,853-864.
- Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A.** (2002) Identification of *Sox2* regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids. Res.* **30**,3202-3213.
- Trainor P, Krumlauf R.** (2000) Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**,116-124.
- Vigano M, Staudt L.** (1996) Transcriptional activation by Oct-3: evidence for a specific role of the POU-specific domain in mediating functional interaction with Oct-1. *Nucleic Acids Res.***24**,2112-2118.
- Wurst W, Bally-Cuif L.** (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99-108.
- Ye W, Bouchard M, Stone D, Liu X, Vella F, Lee J, Nakamura H, Ang S, Busslinger M, Rosenthal A.** (2001) Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Nat. Neurosci.***4**,1175-1181.
- Yeom Y, Fuhrmann G, Ovitt C, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöler H.**(1996) Germline regulatory element of *Oct-4* specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*. **122**, 881-893.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L.**(1995) Developmental-specific activity of the *Fgf4* enhancer requires the synergistic action of Sox-2 and Oct-3. *Genes Dev*. **9**, 2635-2645.