

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

Papel del Complejo *Iroquois* en el Desarrollo Embrionario de *Xenopus laevis*.

Tesis Entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al
grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología

Por

Alvaro Alberto Glavic Maurer

Enero, 2002

Director de Tesis: Dr. Roberto Mayor Caro

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
ABREVIATURAS . .	5
RESUMEN .	9
SUMMARY . .	11
INTRODUCCIÓN .	13
1. Embriogénesis temprana en <i>Xenopus laevis</i> . .	14
1.1. Morfogénesis en Anfibios .	14
1.2. Inducción mesodérmica, Mesodermo dorsal y dorsalización: Organizador de Spemann .	15
1.3. Inducción y posicionamiento del sistema nervioso en <i>Xenopus laevis</i> .	17
1.4. Transducción de señales: la cascada de los BMPs .	18
1.5. Establecimiento del eje antero-posterior (AP) . .	18
1.6. Genes homeóticos y patrón AP .	22
1.7. Interacción célula-célula en la definición de bordes entre territorios . .	24
2. El complejo <i>Iroquois</i> . .	25
2.1. Papel del complejo <i>Iroquois</i> en la formación de la placa neural de vertebrados .	27
2.2. Papel del complejo <i>Iroquois</i> en las subdivisiones del tubo neural en vertebrados .	28
2.3. Papel de los genes <i>Iroquois</i> en el patrón del corazón .	28
3. Límite entre el cerebro medio y posterior: Organizador del Istmo .	29
3.1. Estudios Embriológicos . .	29
3.2. Genes involucrados en el establecimiento del organizador del istmo .	30
HIPOTESIS .	35
Objetivo General . .	37
Objetivos Específicos .	39
MATERIALES Y METODOS .	41

1. Animales . . .	41
1.1. Obtención y crecimiento de embriones de <i>Xenopus laevis</i> . . .	41
1.2. Generación de explantes y conjugados embrionarios . . .	42
1.3. Microinyección de embriones e inducción con dexametasona . . .	42
2. Técnicas de Biología Molecular . . .	43
2.1. Generación de las Quimeras de <i>Gbx2</i> , <i>Otx2</i> y <i>Xiro1</i> . . .	43
2.2. Obtención de los fragmentos y vectores digeridos y Secuenciación . . .	45
2.3. Transcripción <i>in vitro</i> de mRNA . . .	46
2.4. Análisis de la expresión de los genes estudiados durante el desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> mediante hibridación <i>in situ</i> . . .	49
2.5. Reacción de b-Galactosidasa (<i>b - gal</i>) <i>in situ</i> . . .	52
2.6. Inmunodetección de Myc . . .	53
3. Reactivos para Hibridación <i>in situ</i> . . .	53
3.1. SOLUCIONES . . .	54
RESULTADOS . . .	57
1. <i>Xiro1</i> participa en el establecimiento del mesodermo dorsal en <i>Xenopus</i> . . .	57
1.1. <i>Xiro1</i> es expresado en el organizador de Spemann y sus derivados . . .	57
1.2. <i>Xiro1</i> es capaz de inducir ejes secundarios y controlar el patrón del mesodermo actuando como represor transcripcional . . .	59
1.3. La función de <i>Xiro1</i> depende de la expresión de <i>Bmp4</i> en el mesodermo . . .	64
2. Inducción del límite entre el cerebro medio y posterior en <i>Xenopus</i> . . .	67
2.1. Expresión de los genes <i>Otx-2</i> , <i>Gbx-2</i> y <i>Xiro1</i> y su relación con el organizador del istmo en <i>Xenopus</i> . . .	67
2.2. <i>Otx-2</i> y <i>Gbx-2</i> participan como represores en el posicionamiento del organizador del istmo . . .	70
2.3. La interacción de células expresando <i>Otx-2</i> y <i>Gbx-2</i> es suficiente para inducir el organizador del istmo . . .	79
3. <i>Xiro1</i> participa en el posicionamiento del organizador del istmo . . .	81
3.1. Experimentos de rescate . . .	86
3.2. Relaciones epistáticas de <i>Xiro1</i> , <i>Otx-2</i> y <i>Gbx-2</i> . . .	88
4. Propiedades inductivas del mesodermo . . .	91

5. Papel de los agentes posteriorizantes en la formación del organizador del istmo . . .	92
5.1. Papel de ácido retinoico en el desarrollo del istmo . . .	93
5.2. Papel de FGF y la vía de señalización Wnt en el desarrollo del istmo . . .	94
5.3. Los efectos ácido retinoico sobre <i>Otx-2</i> son mediados en parte por <i>Gbx-2</i> . . .	98
5.4. Interacción entre <i>Xiro1</i> , ácido retinoico y <i>Gbx-2</i> . . .	98
6. Papel de la vía de señalización <i>Notch/Delta</i> en la formación del organizador del istmo . . .	101
6.1. Interacción de <i>Otx-2</i> y la vía <i>Notch</i> en la inducción de <i>Pax2</i> . . .	103
7. <i>Xiro1</i> controla la expresión de <i>Delta1</i> . . .	104
DISCUSIÓN . . .	107
1. <i>Xiro1</i> controla el desarrollo del mesodermo dorsal reprimiendo la transcripción de <i>Bmp-4</i> . . .	107
2. El mecanismo de posicionamiento del organizador del istmo está conservado en pollo/ratón y <i>Xenopus</i> : actividades de <i>Otx-2</i> y <i>Gbx-2</i> . . .	110
3. Papel de <i>Xiro1</i> en el posicionamiento del organizador del istmo . . .	113
3.1. <i>Xiro1</i> es requerido para la expresión de <i>Gbx-2</i> . . .	113
3.2. <i>Xiro1</i> es requerido para la expresión de <i>Otx-2</i> . . .	114
3.3. Efectos de <i>Xiro1</i> sobre el posicionamiento del istmo . . .	114
3.4. <i>Xiro1</i> es suficiente y necesario para la expresión de <i>Fgf8</i> . . .	114
3.5. Un modelo para el posicionamiento del organizador del istmo . . .	116
4. Papel del mesodermo axial en la inducción del organizador del istmo . . .	118
5. Papel de los agentes posteriorizantes en el establecimiento del istmo . . .	118
5.1. Papel del Ácido retinoico en el posicionamiento del organizador del istmo . . .	119
5.2. Papel de FGF y la señal Wnt en la formación del organizador del istmo . . .	119
6. Interacciones de ácido retinoico, <i>Xiro1</i> y <i>Gbx-2</i> . . .	121
7. La vía Notch participa en el posicionamiento del istmo y en el desarrollo del cerebro medio . . .	122
8. <i>Xiro</i> regula la expresión de <i>Delta1</i> autónoma y no autónomamente . . .	123
CONCLUSIONES . . .	125

PERSPECTIVAS .	127
BIBLIOGRAFÍA .	129

DEDICATORIA *Dedico esta tesis a mi familia, en especial a mis Abuelos, Padres y Hermanos.
Un beso para todos.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, de todo corazón, el apoyo recibido por parte de la gente que me rodea y las instituciones, gubernamentales y privadas, que hicieron posible este pequeño aporte, desde Chile, a nuestro entendimiento de la naturaleza .

En especial quisiera mencionar a mis padres y abuelos, quienes desde pequeño me acercaron a la ciencia. Gracias.

No puedo dejar de agradecer con inmensa gratitud a mis amigos, indiscutible fuente de inspiración y asombro, la generosidad de José Luis Gómez-Skarmeta, Florencio Espinoza y Diego Cosmelli quienes estarán siempre conmigo.

Gracias a todos. Los quiero mucho.

ABREVIATURAS

b-gal	Beta Galactosidasa
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indol fosfato
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico tipo b Factor de crecimiento fibroblástico tipo b
BMP4	Proteína morfogénica óseo (Bone Morphogenic Protein)
CAP	Explante de ectodermo (cap animal)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cer	Cerberus
Chr	Chordin
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dnFGFR4	Dominante negativo del receptor 4a de FGF
dnRAR	Dominante negativo del receptor de ácido retinoico
dnTCF3	Dominante negativo del factor de transcripción TCF3
DTT	Ditiotreitol
eFGF	Factor de crecimiento fibroblástico embrionario
FGF8	Factor de crecimiento fibroblástico 8
HD	Homeodominio
ib	

Iro-box

MAB

Tampón de ácido maleico

MAB/BMBR

Boehringer Mannheim Blocking Reagent 2% en MAB

MEMFA

Fijador de paraformaldehido al 4%

ml

Mililitros

mm

Milímetros

mM

Milimolar

mRNA

Ácido Ribonucleico Mensajero

mg

Microgramos

mL

Microlitros

mM

Micromolar

NAM

Medio normal para anfibios (Normal Amphibian Medium)

NBT

Cloruro de 4-nitro blue tetrazolium

ng

Nanogramos

nM

Nanomolar

PBS

Tampón fosfato salino

pg

Picogramos

PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa

PTW

PBS+Tween20 al 0,1%

RTKs

Receptores tirosina quinasa

Su(H)

Supressor of Hairless

St

Estadio

TGF- β

Factor de Crecimiento Transformante tipo Beta

U

Unidades

XFD

Dominante negativo del recetor tipo 1 de FGF

RESUMEN

El complejo *Iroquois* corresponde a un nuevo grupo de homeoproteínas pertenecientes a la clase TALE. Estos genes han sido descritos en varios modelos animales, tanto vertebrados como invertebrados, sugiriéndose que participan en el desarrollo embrionario en la formación de los precursores neurales y en el establecimiento de bordes entre compartimentos. En *Xenopus*, los genes *Iroquois* (*Xiro*) han sido involucrados en la formación de la placa neural, controlando la expresión del factor antineural *bmp-4* y de los genes proneurales. Durante el desarrollo embrionario, el establecimiento de centros organizadores es fundamental para la correcta formación del individuo. Se han descrito, hasta la fecha, 3 organizadores: el Centro de Nieuwkoop, responsable de la inducción del mesodermo, el Organizador de Spemann, involucrado en dorsalización del mesodermo e inducción de la placa neural y el Organizador del Istmo, responsable del patrón y desarrollo del cerebro medio y parte del cerebro posterior. En esta tesis nos hemos propuesto estudiar el papel de los genes *Iroquois* en la formación del Organizador de Spemann y el Organizador del Istmo, y definir las interacciones celulares y moleculares suficientes y necesarias para su desarrollo. Así, la hipótesis propuesta fue: 1) *Xiro1* participaría, en *Xenopus*, en la formación del Organizador de Spemann y del Istmo, regulando la expresión de genes fundamentales para cada organizador. 2) Inhibiría la expresión de *bmp-4* en el Organizador de Spemann y controlaría los genes *Fgf8*, *En-2* y *Wnt1* en el Organizador del Istmo. En este último proceso, regularía la expresión de *Otx-2*, expresado en el cerebro medio y *Gbx-2* expresado en el cerebro posterior y de este modo determinaría la posición de istmo.

Como objetivos específicos se propuso estudiar, mediante métodos embriológicos y sobreexpresión de transcritos silvestres o de proteínas quiméricas de *Xiro1*, el papel de este gen durante la formación del organizador de Spemann y el organizador del istmo. También se propuso analizar la capacidad del mesodermo y de los agentes posteriorizantes (ácido retinoico, FGF y Wnt) de inducir este organizador y la participación de los factores de transcripción *Otx-2* y *Gbx-2* en la inducción y posicionamiento del istmo.

Se estableció que *Xiro1* es expresado en el mesodermo dorsal y actuando como represor transcripcional inhibe la expresión de *bmp-4* en esta región. Esto permite la correcta formación del organizador de Spemann y subsiguiente dorsalización del mesodermo. En cuanto al organizador del istmo, definimos que el mesodermo axial posee la capacidad de inducir los genes involucrados en el establecimiento del istmo y que FGF y la señal Wnt regulan la formación y posición de este dominio. Se demostró que *Otx-2* y *Gbx-2* actúan como represores y al igual que en otros sistemas, controlan mediante su represión transcripcional mutua, la posición del organizador del istmo. Por otra parte, se estableció que *Xiro1* es un elemento nuevo en la formación del organizador del istmo, que actuando como represor controla la expresión de *Otx-2*, *Gbx-2* y *Fgf8*. Además, se desarrolló un novedoso sistema *in vitro* para el estudio de las interacciones que definen el istmo. Se observó que la interacción *in vitro* de células expresando *Otx-2* y *Gbx-2* es suficiente para recrear los eventos que inducen la expresión de *Fgf8*, *En-2* y *Wnt1* en el embrión. Se demostró que la expresión de *En-2*, en el territorio *Otx-2*, es inducida por la señal FGF proveniente de las células *Gbx-2* positivas y la actividad de *Xiro1* es necesaria, en el dominio *Otx-2*, para la expresión de este gen. Por último, *Xiro1* es capaz de inducir, vía FGF, la expresión de *Delta1*. Este gen activa la expresión de *Fgf8* en el istmo y participa en la formación del cerebro medio.

En resumen, en esta tesis hemos sido capaces de describir las complejas cascadas génicas

mediante las cuales los genes *Iroquois* determinan el desarrollo y actividad de estos Organizadores, lo cuales son fundamentales para el correcto desarrollo embrionario. En conclusión, los genes *Iroquois* controlan la formación del Organizador de Spemann y del Istmio.

SUMMARY

The *Iroquois* complex corresponds to a new group of homeoproteins belonging to the TALE class. These genes have been described in different animal models, both vertebrates and invertebrates, and have been suggested to participate in the formation of neural precursors and the establishment of compartment boundaries during embryonic development. In *Xenopus*, the *Iroquois* genes (*Xiro*) are involved in the formation of the neural plate, controlling the expression of the antineural factor *bmp-4* and the expression of proneural genes. During embryonic development, the establishment of organizer centers is fundamental for the correct formation of the body plan. Until now, 3 organizers has been described: the Nieuwkoop center, responsible for mesoderm induction, the Spemann Organizer, implicated in mesoderm dorsalization and neural plate induction and the Isthmus Organizer, responsible of midbrain and part of the hindbrain patterning and development. In this thesis I have studied the role of the *Iroquois* genes in the formation of the Spemann and Isthmus Organizer, and have defined the cellular and molecular interactions necessary and sufficient for their development. Thus, I propose the following hypothesis: in *Xenopus*, *Xiro1* participates in the formation of the Spemann and Isthmus Organizers, regulating the expression of genes fundamental for each organizer. *Xiro1* would inhibit the expression of *bmp-4* in the Spemann Organizer and it would control the *Fgf8*, *En-2* and *Wnt1* genes in the Isthmus Organizer. In this last process, it would regulate *Otx-2* expression in the midbrain and *Gbx-2* expression in the hindbrain and thereby it would determine the Isthmus position.

The specific aims proposed in the thesis were to study the role of this gene during Spemann and Isthmus Organizer's development, through embryological methods and overexpression of wildtype and chimerical transcripts of *Xiro1* protein. In addition, the capability of the mesoderm and posteriorizing agents (retinoic acid, FGF and Wnt) to induce this organizer, and the participation of the transcription factors *Otx-2* and *Gbx-2* in the induction and positioning of the Isthmus were analyzed.

It was established that *Xiro1* is expressed in the dorsal mesoderm, and that it acts as a transcriptional repressor, repressing *bmp-4* in this region. This allows the correct establishment of the Spemann Organizer and subsequent mesoderm dorsalization. Regarding the Isthmus Organizer, I defined that the axial mesoderm possesses the ability to induce the genes involved in the positioning of the Isthmus and that FGF and Wnt signals regulate the formation and position of this domain. It was demonstrated that *Otx-2* and *Gbx-2* act as repressors and as in other systems, control the position of the Isthmus Organizer through their mutual transcriptional repression. Importantly, it was established that *Xiro1* is a new element in the formation of the Isthmus Organizer which, acting as a repressor, controls the expression of *Otx-2*, *Gbx-2* and *Fgf8*. In addition, we developed a novel *in vitro* system for studying the interactions that define the Isthmus. It was observed that the *in vitro* interaction of cells expressing *Otx-2* and *Gbx-2* was enough to recreate the events that induce the expression of *Fgf8*, *En-2* and *Wnt1* in the embryo. It was also demonstrated that *En-2* expression, in the *Otx-2* territory, is induced by the FGF signal coming from the *Gbx-2*-positive cells and the activity of *Xiro1* is necessary, in the *Otx-2* domain, for the expression of this gene. Finally, *Xiro1* is able to induce, via FGF, the expression of *Delta1*. This gene activates *Fgf8* expression in the isthmus and participates in the formation of the midbrain.

In this thesis we have been able to describe the complex genetic cascades by which the

Iroquois genes control the development and activity of these organizers, which are fundamental for the correct development of the embryo. In conclusion, the *Iroquois* genes participate in the Spemann and Isthmus Organizer development

INTRODUCCIÓN

El problema de la Biología del Desarrollo

El problema fundamental en biología es cómo en los seres vivos se establecen las relaciones entre sus componentes (células, tejidos, etc.) y los agentes externos (relaciones intra e Inter especies y con el medio ambiente) que llevan a la formación del organismo adulto y su conservación durante la evolución. El desarrollo embrionario ha sido estudiado en variados modelos invertebrados y vertebrados, lográndose establecer, en años recientes, con relativa precisión los eventos que ocurren durante la fecundación del oocito y el desarrollo temprano del embrión. Estos procesos tempranos, que involucran componentes de los padres, definen el curso a seguir en el devenir del individuo en sus primeras etapas. Luego comienzan a emerger las características propias del cigoto, en procesos característicos que terminan en el individuo como un organismo independiente en relación coherente con su medio. Debido a los avances en biología molecular, la biología del desarrollo ha centrado el entendimiento de los procesos internos del individuo en términos, principalmente, genético-moleculares que han permitido avanzar de manera significativa, pero fragmentada, en los mecanismos que definen al organismo como individuo. Queda aún mucho camino por recorrer en la comprensión de los fenómenos sustantivos en el ámbito genético, molecular y particularmente celular, que definen a partir de los gametos la emergencia del sistema denominado, individuo.

1. Embriogénesis temprana en *Xenopus laevis*

1.1. Morfogénesis en Anfibios

Todos los tejidos del animal adulto derivan de tres capas germinales: endodermo (sistema digestivo y respiratorio), mesodermo (músculo, sistema óseo y tejidos conectivos) y ectodermo (epidermis y tejido nervioso). La formación de estas capas germinales es uno de los primeros eventos que ocurren en el desarrollo embrionario y se produce en estrecha vinculación con el establecimiento del eje dorso–ventral del embrión. En la Figura 1 se resume el mapa de destino de las capas germinales y se muestran los centros organizadores implicados en la generación de las señales inductivas. Los mapas de destino celular en *Xenopus laevis* se encuentran muy bien estudiados y nos muestran que ya en el estadio de 32 células se pueden identificar las futuras capas germinales. Mientras que las células del Centro de Nieuwkoop corresponden a endodermo, las células del Organizador de Spemann formarán el mesodermo dorsal.

Previo a la gastrulación el embrión es relativamente homogéneo en cuanto a sus componentes celulares, si bien se distinguen regiones con capacidades inductivas, en su organización no se perciben asimetrías sustantivas. La gastrulación en el embrión de *Xenopus laevis* marca la transformación de la blástula por una serie de cambios morfogénéticos o movimientos celulares, en un embrión donde es posible distinguir las tres capas germinales. Los movimientos celulares durante la gastrulación se inician en el futuro lado dorsal, específicamente en la región ecuatorial donde se juntan los hemisferios animal y vegetativo, llamada la zona marginal. Es aquí donde se forma el labio dorsal del blastoporo por el cual migrarán al interior del embrión las células marginales dorsales, estas últimas darán origen a estructuras anterior-dorsales (endo-mesodermo de la cabeza y precursores de la notocorda y somitos), sucesivamente por los labios lateral y ventral migrarán los tejidos mesodérmicos de carácter más lateral y posterior.

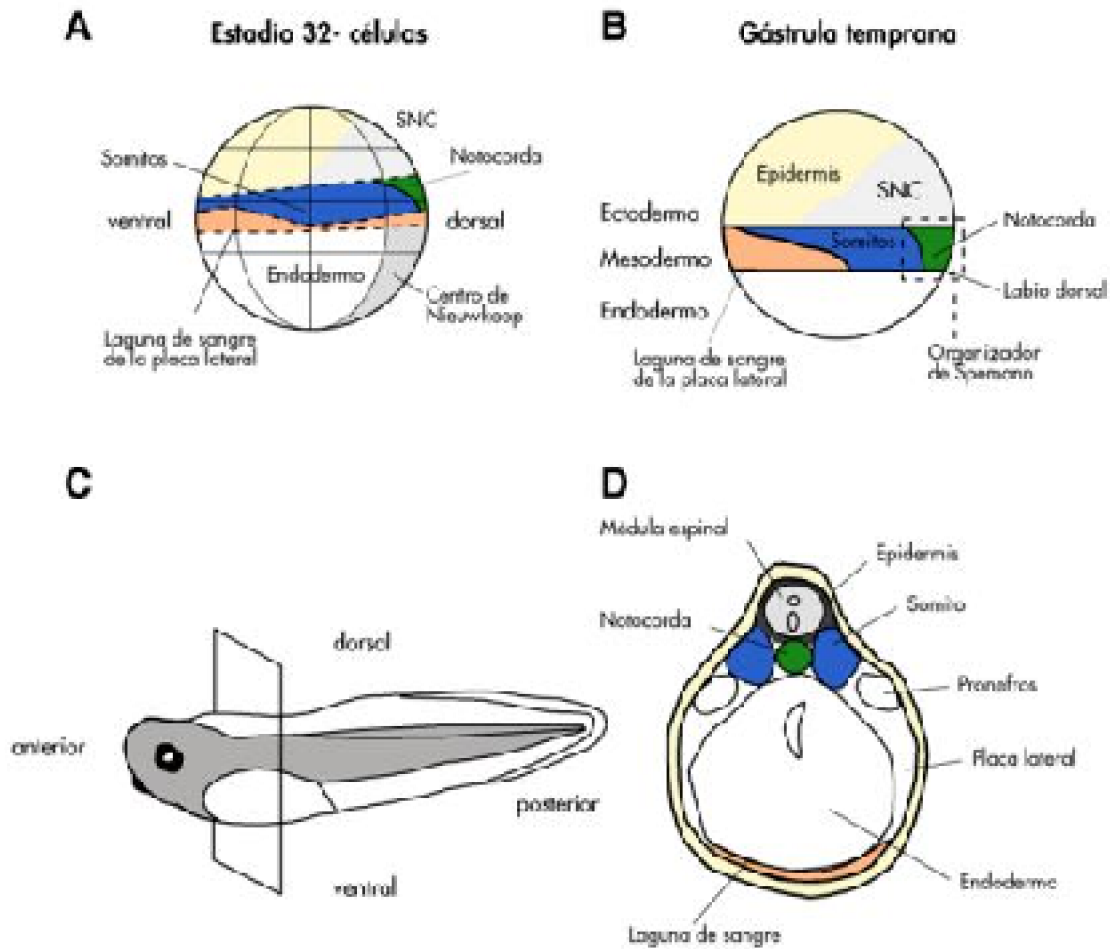


Figura 1. Resumen de los mapas de destino celular y centros organizadores en el embrión de *Xenopus laevis*

A) Embrión en estadio de 32 células mostrando la ubicación del Centro de Nieuwkoop. La polaridad dorsoventral ya se encuentra especificada por el desplazamiento de los determinantes cigóticos del citoplasma. Las líneas indican los planos de clivaje. **B)** Durante la gastrulación temprana, que se inicia en el futuro lado dorsal del embrión, primariamente se invaginan células endodérmicas marginales, seguidas por las células precursoras mesodérmicas; en tanto el ectoderma sufre epibolia. El Organizador de Spemann, ubicado en el labio dorsal se ha activado y el Centro de Nieuwkoop ya está inactivo. **C)** Plano de una sección a nivel del tronco de un renacuajo que se muestra en **D)**, SNC= Sistema Nervioso Central.

1.2. Inducción mesodérmica, Mesodermo dorsal y dorsalización:

Organizador de Spemann

En *Xenopus*, el mesodermo se forma durante los estadios de blástula en la región ecuatorial del embrión por células que han respondido a agentes maternos (revisado por Harland y Gerhart, 1997). Durante la ovogénesis los transcritos aportados por la madre determinan que la proteína VegT se localice y acumule en el polo vegetativo del embrión. Por otra parte, la entrada del espermatozoide gatilla el proceso de rotación cortical en el que otra proteína materna, b-catenina, es ubicada preferentemente en el núcleo de las células de la región dorsal. Ambas actividades maternas cooperan durante el estadio 9, cuando la inducción del mesodermo se lleva a cabo, para producir un gradiente cigótico dorso-ventral en el endodermo prospectivo de varios factores similares a Nodal (Xnrs), pertenecientes a la superfamilia TGF- β . Durante el estadio de gástrula temprana, altas concentraciones de estas moléculas, que requieren activa la vía de b-cateninas en la región dorsal del embrión, permiten la inducción del organizador de Spemann en las células suprayacentes al organizador de Nieuwkoop. En un evento paralelo, la localización de VegT y Vg1 (otra proteína materna) en el lado ventral produce menores niveles de las señales similares a Nodal y de esta manera es inducido el mesodermo ventral (Angius y cols., 2000). En estadio de gástrula, el organizador de Spemann secreta una variedad de moléculas cigóticas que se contraponen a la acción ventralizante de proteínas pertenecientes a la familia de ligandos del tipo BMP y Wnt, en un proceso conocido como dorsalización. En este proceso el mesodermo adquiere las características dorso-ventrales que permitirán la formación de todos los tejidos derivados del mesodermo. BMPs y Wnts son secretadas por las células competentes que rodean al organizador de Spemann. Wnt8, uno de los ligandos del tipo Wnt, estaría involucrado en la especificación de mesodermo lateral (somitogénico), mientras que BMP-4 sería responsable de la determinación de derivados mesodérmicos más ventrales como son el corazón, el mesénquima y la sangre (Marom K. y cols, 1999). Así, BMPs y Wnts favorecen el desarrollo ventral, mientras que Noggin, Chordin, Frzb1 y Cerberus, secretados por el organizador, se unen a las proteínas BMP y Wnt, interfiriendo con sus actividades ventralizantes y promoviendo el destino dorsal (Bouwmeester y cols., 1996; Piccolo cols., 1996; Zimmermann y cols., 1996; Wang y cols., 1996; Leyns y cols., 1996; Hoppler y Moon, 1998). Así, los datos sugieren que la polaridad dorso-ventral del mesodermo es debido al gradiente de actividad de los ligandos del tipo BMP y Wnt establecido en este eje, el que finalmente especifica diferentes tipos celulares en el mesodermo (Figura 2).

Una serie de genes cigóticos, expresados durante la formación del mesodermo han sido caracterizados, tales como los genes homeobox *Xlim-1*, *Gsc* y *Siamois*, y otros factores de transcripción tales como *Xbra* y *Mix1*.

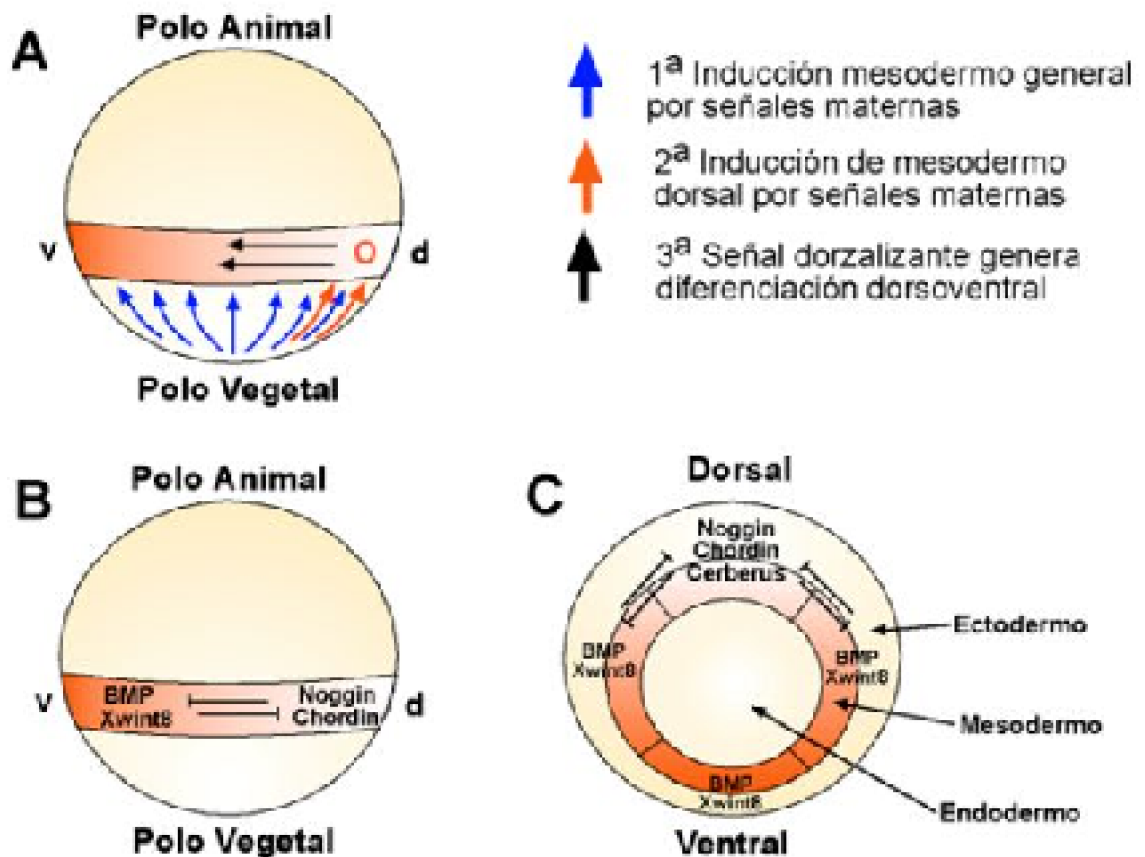


Figura 2. Esquema de la inducción y diferenciación dorso-ventral del mesodermo en *Xenopus laevis*

Vista lateral de un embrión en estadio de blástula. El tejido mesodérmico se muestra de color naranja en la zona ecuatorial del embrión. Las flechas de colores indican el origen y destino de las diferentes señales de diferenciación. v= ventral, d= dorsal, o= Organizador de Spemann. **B)** Vista lateral de un embrión en estadio de gástrula. **C)** Vista desde el polo vegetativo de una gástrula. Se muestra la ubicación e interacciones de los principales morfógenos.

1.3. Inducción y posicionamiento del sistema nervioso en *Xenopus laevis*

El desarrollo del sistema nervioso central se inicia durante la gastrulación. Durante la neuralización en los vertebrados, el ectodermo se divide en 4 grupos de células: la placa

neural, que formará el cerebro y la médula dorsal, la epidermis que formará la piel, la cresta neural que genera diversos tipos celulares tales como neuronas periféricas, glia y células pigmentadas y las placodas ectodérmicas, que darán origen a los ganglios craneales, sistema olfatorio periférico, parte del ojo, etc. Se ha establecido que el destino normal del ectodermo es tejido neural (Wilson P. y Hemmati-Brivanlou A., 1997; Weinstein D.C. y Hemmati-Brivanlou, 1997). BMP-4 es producido por las células ectodérmicas e inhibe la diferenciación neural, promoviendo la formación de epidermis. Las mismas moléculas que participan en la dorsalización del mesodermo, Noggin, Chordin y Follistatin, secretadas por el Organizador de Spemann, se unen a BMP-4, inhibiendo también de esta manera su acción antineuralizante y determinando la formación de la placa neural (Hemmati-Brivanlou y Melton D., 1997). Por lo tanto, la dorsalización del mesodermo como la neuralización del ectodermo serían mediadas por la interrelación entre los factores ventralizantes-antineuralizantes y moléculas dorsalizantes-neuralizantes secretadas por el Organizador de Spemann, generando un gradiente de actividad de BMPs y Wnts. Así, la regulación apropiada de la cascada de BMP-4 es crítica para la especificación dorso-ventral tanto del mesodermo como del ectodermo en *Xenopus laevis*. A pesar de la redundancia en sus funciones los inductores neurales serían fundamentales en el desarrollo embrionario. El doble *knock out* de Chordin y Noggin carece de estructuras anteriores y no así los mutantes independientes de cada proteína (Bachiller y cols, 2000).

1.4. Transducción de señales: la cascada de los BMPs

La manera en que las células detectan los niveles de inductor/inhibidor, las vías de transducción acoplada y sus interrelaciones ha comenzado a dilucidarse recientemente. Se han identificado dos clases de receptores con actividad serina/treonina quinasa para los ligandos BMP2/4. En el receptor de tipo II la actividad proteína quinasa es constitutivamente activa, mientras que el receptor de tipo I se activa cuando es fosforilado por el de tipo II. El receptor activo es un heterotetrámero que incluye dos receptores de cada tipo. Se han logrado avances en la identificación de varios componentes de la cascada de transducción de los BMP, estableciéndose una importante función para la familia de las proteínas SMAD. Estas proteínas de transducción de la señal BMP se agrupan en tres clases funcionales: las R-SMAD (reguladas por el receptor), las Co-SMAD (co-mediadoras) y las Anti-SMAD (antagonistas de la cascada de transducción), así como para una serie de factores de transcripción tales como *Msx1*, *Vent1* y *Gata1* (Gawantka y cols., 1995; Raftery y Sutherland, 1999).

1.5. Establecimiento del eje antero-posterior (AP)

El sistema nervioso de los vertebrados posee una organización estructural y funcional compleja. El patrón básico de esta organización se establece temprano en el desarrollo, durante la gastrulación tardía y la neurulación. Durante la neurulación el primordio neural se transforma de una capa de células (placa neural), en un tubo cilíndrico conocido como tubo neural, el que recorre el embrión a lo largo del eje antero-posterior (AP). En el tubo

neural es posible distinguir, a lo largo del eje AP, cuatro divisiones principales: cerebro anterior, cerebro medio, cerebro posterior y espina dorsal. Cada una de estas regiones contienen los precursores que darán origen a las estructuras del sistema nervioso central del individuo adulto. Además de las estructuras nombradas que dan origen principalmente al sistema nervioso central, derivados de las crestas neurales aportan con los ganglios del sistema nervioso periférico. Las crestas neurales se derivan del borde de la placa neural en una posición media del eje AP, lo que sugiere una organización antero-posterior en este tejido (Villanueva y cols., 2001).

Se ha determinado que las 4 regiones primordiales del sistema nervioso embrionario forman posteriormente:

1. El cerebro anterior, que da origen a:

a) telencéfalo, el cual incluye: hipófisis, área preóptica, núcleo magnocelular, primordio del hipocampo, etc.

b) diencéfalo, el que incluye: retina, núcleo supraquiasmático, tálamo, núcleo hipotalámico ventral, etc.

2. El cerebro posterior genera, principalmente, la médula oblongata, el plexus coroide.

3. La espina dorsal genera la médula espinal.

4. El cerebro medio corresponde, en *Xenopus*, a una franja de células relativamente bien definida en su posición e identidad. Se encuentra entre los cerebros anterior y posterior y origina el tectum óptico, parte del cerebelo y el tegmento dorsal y ventral (Esgleson y Harris, 1990). Las estructuras señaladas derivan de vesículas producidas durante subdivisiones progresivas de los 4 dominios principales del sistema nervioso. Dichas vesículas poseen características moleculares, celulares y morfológicas particulares, las que se han utilizado para generar el modelo de Prosómeros (Figura 3) del sistema nervioso de los vertebrados (Bally-Cuif y Wassef, 1995; Rubenstein y cols., 1998).

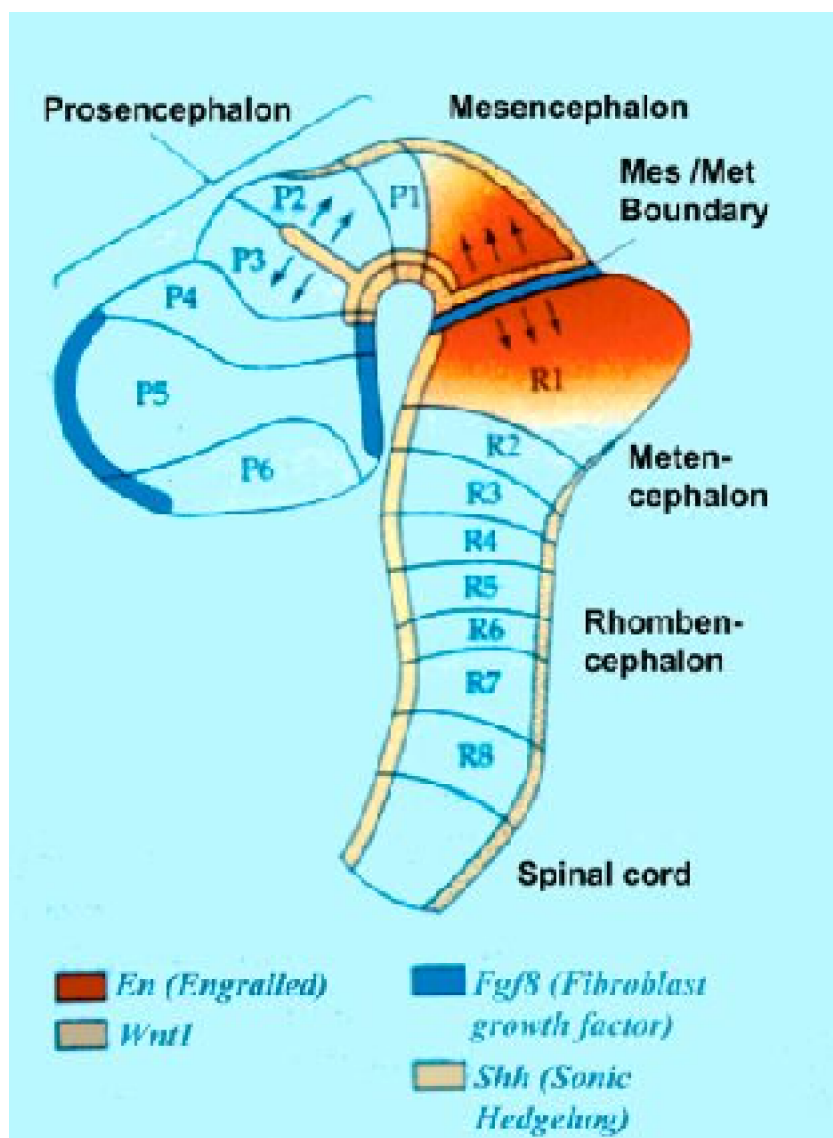


Figura 3. Modelo de prosómeros del sistema nervioso central de vertebrados

Esquema de un corte sagital de un embrión de ratón. Las divisiones están denotadas por sus nombres. En vertebrados es posible definir vesículas, las que permiten subdividir el sistema nervioso. Estas divisiones se asignaron por morfología, como por las características de las células que las componen. Se muestra la expresión de genes (*En-1/2*, *Fgf8*, *Wnt1*, etc.) que participan en el desarrollo del límite entre el cerebro medio y posterior.

Como se ha señalado previamente, el fenómeno de inducción neural, resumido en la interacción de BMP-4 con los inductores neurales, genera tejido neural de carácter anterior. Este mecanismo inductivo no da cuenta de las diferencias antero-posteriores que se observan en el sistema nervioso del embrión en el estadio de neurula tardía. Para explicar estas diferencias se ha propuesto el modelo de inducción-transformación.

1.5.1. Modelo de inducción-transformación

En 1952, Nieuwkoop (Nieuwkoop, 1952) propuso que el eje antero-posterior (AP) del sistema nervioso se establecía por el siguiente mecanismo: los inductores neurales especifican tejido neural anterior en todo el futuro sistema nervioso; más tarde, desde el extremo posterior del embrión se originaría una señal que transforma el tejido anterior en posterior. Esta señal posteriorizante actuaría en forma de gradiente, con un máximo en el extremo posterior y un mínimo en el extremo anterior (Figura 4). El modelo de inducción-transformación descrito no señala la capa germinal de la cual proviene el o los morfógenos. Se ha demostrado que el Organizador de Spemann está compuesto por al menos dos centros, uno que tiene capacidad de inducir tejido neural anterior y que involuciona primero durante la gastrulación, en el que se expresa Cerberus y Dkk y otro que posee propiedades inductivas de tejido neural posterior, que involuciona más tarde en el desarrollo, que expresa Chordin, Noggin, eFGF y bFGF (Revisado por Sive, 1993; Slack y Tannahill, 1992). Existen de esta manera, dos alternativas, un proceso de inducción vertical producido por señales provenientes del mesodermo que transforman el ectodermo neural suprayacente y como alternativa la inducción planar, en el que las señales provenientes desde la región posterior viajan en el plano del ectodermo neural transformándolo (Figura 4). Este modelo, originalmente propuesto por Nieuwkoop para la formación del tejido neural, ha sido recientemente extendido a los pliegues neurales donde existen diferencias antero-posteriores, tanto a nivel de expresión génica como de las estructuras que origina (Villanueva y cols., 2002).

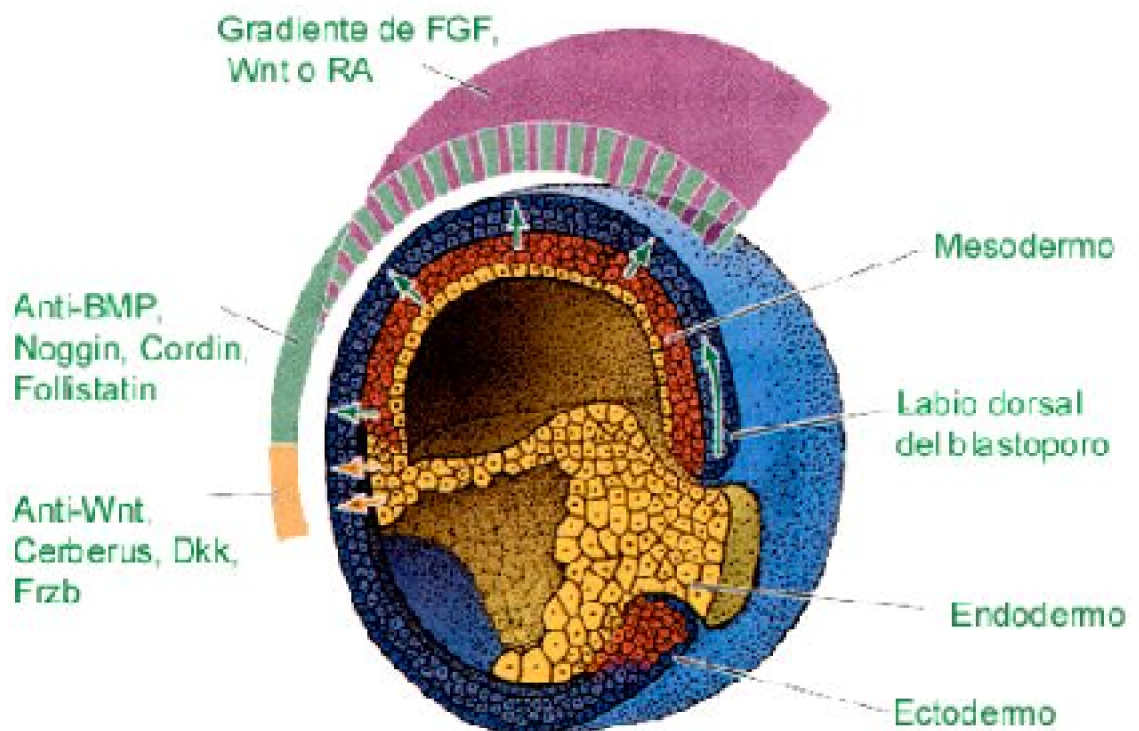


Figura 4. Modelo inducción-transformación

En un primer evento señales, como Noggin y Chordin, producidas desde el organizador de Spemann producen inducción de tejido neural de carácter anterior en el ectodermo dorsal. Posteriormente en el desarrollo del embrión, moléculas como FGF,

ácido retinoico (RA) y/o ligandos del tipo Wnt, producidas en la región posterior del mesodermo transforman el tejido neural anterior, generando distintos tipos celulares en el eje antero-posterior. Para explicar las diferencias dentro de la región transformada se han propuesto dos posibles formas de acción de las moléculas transformantes, la molécula transformante definiría distintos tipos celulares dependiendo de la concentración de ella a la cual las células son expuestas en el eje antero-posterior (gradiente) y/o las distintas moléculas identificadas podrían especificar distintos tipos celulares. Cabe notar que estas propuestas para explicar la aparición de diferencia antero-posteriores no son excluyentes.

1.5.2. Morfógenos posteriorizantes

Distintas evidencias experimentales sugieren que proteínas de la familia FGF, ácido retinoico y proteínas perteneciente a la familia de ligandos Wnt, serían las moléculas con la actividad posteriorizante (Durston y cols., 1989; McGrew y cols., 1997; Cox y Hemmati-Brivanlou, 1995; Kolm y cols., 1997). Se observó que la sobreexpresión de los receptores dominantes negativos para FGF y para ácido retinoico y el receptor de ácido retinoico constitutivamente activo (dominante activador), generado mediante fusión de esta proteína a la región transactivadora de la proteína viral VP16 (herpes simple) (Kolm y cols., 1997; Blumberg y cols., 1997) producen alteraciones en la expresión de genes a lo largo del eje AP. Estas alteraciones incluyen la inducción de genes posteriores en explantes y la represión de genes de carácter anterior. Se ha determinado que la capacidad de reprimir genes anteriores de Wnt3a depende de la vía de FGF funcional y por otra parte la propiedad posteriorizante (inducción de genes posteriores) de bFGF, requiere la actividad de Wnt (McCrew y cols., 1997). Junto a lo anterior, se ha establecido que ninguna de las tres moléculas posee capacidad inductora intrínseca (Gamse y Sive, 2000; Ribisi y cols., 2000). Es decir, tienen actividad transformante del tejido neural previamente inducido. Estos antecedentes sugieren que FGF, Wnt y ácido retinoico de forma conjunta estarían involucrados en activar genes posteriores y reprimir genes anteriores, dando información posicional dentro del eje AP.

Una conclusión derivada de la localización y eventual acción de las moléculas posteriorizantes es que el tejido neural más anterior en el embrión no se posteriorizaría porque la señal transformante no alcanzaría esas regiones. Existe, sin embargo la posibilidad que la región meso-endodérmica participe activamente durante el fenómeno de posteriorización, evitando que las estructuras más anteriores del embrión expresen los determinantes genéticos de la región posterior. Esta posibilidad ha sido propuesta por la actividad que poseen estos tejido de anteriorizar tejido neural posterior en pollo (Foley y cols., 1997) y por el reciente clonamiento y caracterización de *Cerberus* y *Dickkopf*. Estas proteínas poseen la capacidad de inducir cabezas en embriones de *Xenopus* y se ha demostrado que unen BMP y Wnt (Glinka y cols. 1997).

1.6. Genes homeóticos y patrón AP

1.6.1. Genes Hox

En *Drosophila* se ha establecido que la identidad de los segmentos en el eje AP esta determinada por la expresión de genes homeóticos (Lawrence y Morata, 1994). Estos genes se encuentran agrupados en el DNA, formando un complejo (*Hox*). La distribución 3'-5' de los genes corresponde al orden de expresión en el eje AP. El complejo homeótico se ha conservado durante la evolución y se encuentra también en vertebrados. Su expresión define regiones de la espina dorsal y del cerebro posterior. Análisis de mutantes nulos de ratón para ciertos genes *Hox*, han mostrado el papel que ellos cumplen en la determinación de la identidad de las divisiones existentes en el cerebro posterior (rombómeros) (Krumlauf, 1994; Wright, 1993; Lumsden y Krumlauf, 1996; Stern y Foley, 1998). Además, en pollo y *Xenopus* se ha determinado que la identidad de ciertos rombómeros está asociada a la expresión de algún gen homeótico en particular y que la expresión de ellos depende de ácido retinoico (Itasaki y cols., 1996; Bradley y cols., 1992; Kolm y Sive, 1995a).

Se ha propuesto una cascada de eventos independientes de ácido retinoico, implicada en la formación de las estructuras posteriores del embrión. En ella se propone que eFGF activaría la expresión de *Xcad3*, en la región posterior, esto más tarde permitiría la expresión de los genes del complejo *Hox*, y restringiría la expresión de *Otx2* (Epstein y cols., 1997). Estas conclusiones se encuentran apoyadas por experimentos de sobre expresión en embriones completos y de tejido ectodérmico cultivado *in vitro*, expuesto a eFGF o bFGF y ácido retinoico, en los que se han analizando la expresión de distintos genes *Hox*. Los fenotipos obtenidos al sobre expresar los genes mencionados (FGF, *XCad3* y ciertos *Hox*) producen disminución en el tamaño de las cabezas o embriones que no poseen estructuras anteriores (Kolm y Sive, 1995; Epstein y cols., 1997; Pownall y cols., 1996).

1.6.2. Genes homeóticos que definen estructuras anteriores

Otro gen homeótico de la clase *bicoid* relacionado con la determinación de la identidad AP en vertebrados es el homólogo del gen *orthodenticle* de *Drosophila*, denominado *Otx*. En *Drosophila* se ha determinado que participa en la formación de la cabeza junto a el gen *empty spiracles*. Los homólogos de estos genes han sido caracterizados en los distintos modelos vertebrados, incluyendo *Xenopus*; estos genes se conocen como *Otx* y *Emx* (Bally-Cuif y Boncinelli, 1997).

El análisis funcional de estos genes en ratón, realizando mutantes nulos o heterocigotos, ha permitido establecer que su expresión en las regiones anteriores del embrión, permiten la formación del cerebro anterior y medio (Bally-Cuif y Boncinelli, 1997; Acampora y cols., 1997). En *Xenopus*, experimentos de sobre expresión han demostrado que al expresar ectópicamente *Otx* se producen embriones que poseen colas de menor tamaño y cabezas mucho más grandes que lo normal (Pannese y cols., 1995; Blitz y Cho, 1995). El gen *Otx* es inducido en *Xenopus* durante la primera etapa de la inducción neural en un territorio bastante amplio del futuro sistema nervioso. Posteriormente, las moléculas transformantes (bFGF, eFGF, RA y Wnt) restringen su expresión a la región anterior del sistema nervioso (Blitz y Cho, 1995).

1.7. Interacción célula-célula en la definición de bordes entre territorios

1.7.1. Sistema de señalización Notch/Delta

El sistema Notch/Delta está compuesto principalmente por el receptor, Notch y sus ligandos, Delta y Serrate, siendo estas proteínas integrales de membrana de tipo II. Tanto Notch como Delta poseen un solo segmento transmembrana (Artavanis-Tsakonas y cols., 1999). Al ser expresadas en células distintas pero adyacentes, Delta puede unirse a Notch y promover su activación. La activación de Notch se produce mediante el corte proteolítico de dos enzimas. El primer corte ocurre cuando Delta se une a Notch, esto lleva al reconocimiento del sitio de corte por una proteasa del tipo Furin, posterior a este primer corte, que elimina gran parte del tallo extracelular de Notch el segundo corte se lleva a cabo por una TACE proteasa (presinilina) que forma parte del complejo gama-secretasa. Este segundo corte permite la traslocación del dominio citoplasmático de Notch (ICD) al núcleo de la célula, aquí se une al represor transcripcional *Supressor of Hairless (Su(H))* cambiando su actividad represora a activadora (Artavanis-Tsakonas y cols., 1999 y Figura 5). Este sistema de señalización célula-célula ha sido descrito en una variedad de sistemas metazoarios. Fue descrito originalmente en *Drosophila*, demostrándose que participaba en el proceso de neurogénesis. Este papel en el desarrollo embrionario ha sido conservado en vertebrados. Estudios posteriores han relacionado al sistema Notch/Delta con: la diferenciación neural en la retina de vertebrados (glia v/s neuronas), la segmentación de los somitos, la especificación del borde dorso-ventral del ala en *Drosophila* y el establecimiento del límite entre los compartimentos dorsal y ventral en el tejido precursor del ojo de *Drosophila* (Artavanis-Tsakonas y cols., 1999). Así, el sistema Notch/Delta ha sido utilizado durante la evolución en un sin número de procesos, en los que los contactos célula-célula juegan un papel fundamental.

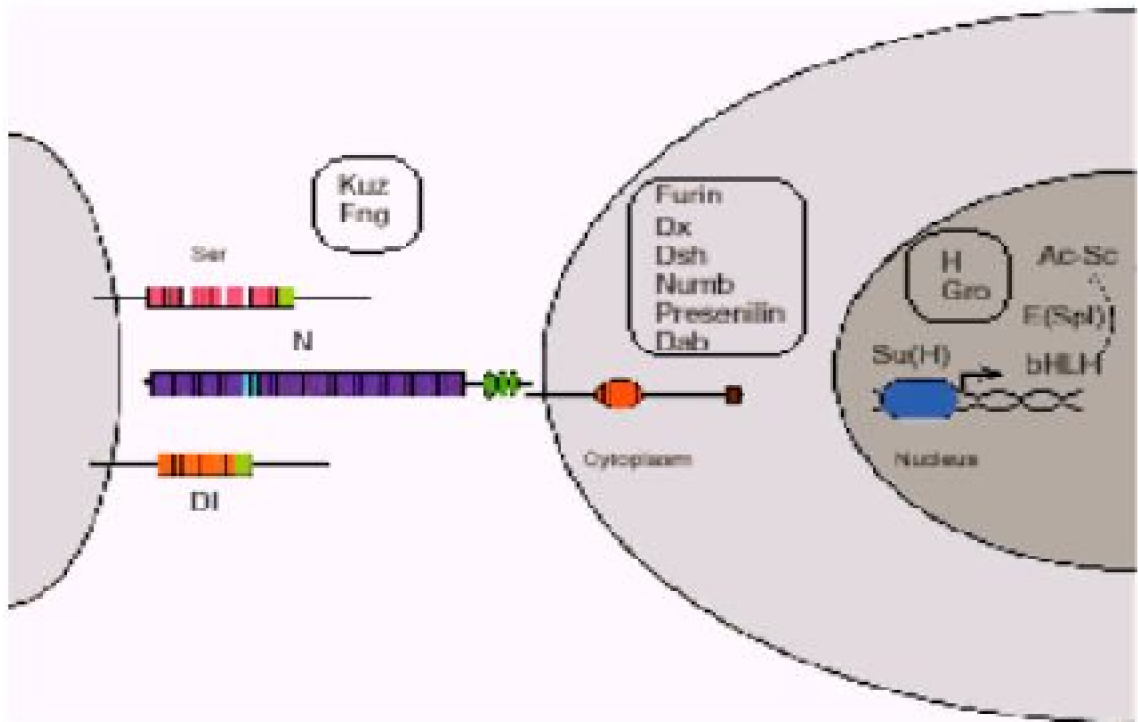


Figura 5. Esquema del sistema de señalización célula-célula Notch/Delta

La expresión del receptor (Notch) y sus ligandos (Delta y Serrate) en células adyacentes permite que estas proteínas interactúen. Seguido, una furin proteasa (*Kuz*) produce un corte de Notch en la región extracelular y permite un segundo corte en la región transmembrana que lleva a la traslocación del dominio intracelular de Notch al núcleo de la célula. Aquí interactúa con *Supresor of Hairless* (*Su(H)*) activando la transcripción de sus genes blanco.

2. El complejo *Iroquois*

El complejo *Iroquois* fue identificado primeramente en *Drosophila*, en el curso de una mutagénesis diseñada para encontrar genes relacionados con la formación de los órganos sensoriales en la mosca (quetas y sensilas). El primer alelo recuperado suprimía la formación de las quetas de la región lateral del mesotorax, dejando presentes solo las quetas centrales. Posteriormente se demostró que la falta de quetas era debida a la falta de expresión de los genes proneurales del complejo *Achaete-Scute* (*AC-S*), necesarios para la selección de las células madres del órgano sensorial. Estos resultados sugirieron que el locus *Iro* podía codificar factores que regulaban la expresión de *AC-S* en el mesotorax lateral.

La caracterización de los genes que componen el complejo *Iroquois* en *Drosophila* (*Caupolican*, *Araucan* y *Mirror*) permitieron la identificación de sus homólogos en vertebrados (Bosse y cols., 1997; Bellefroid y cols., 1998; Gómez-Skarmeta y cols., 1998; Funayama y cols., 1999; Bao y cols., 1999; Goriely y cols., 1999; Tan y cols., 1999;

Peters y cols., 2000; Christoffels y cols., 2000; Bosse y cols., 2000; Cohen y cols., 2000). En ratón y humanos se han identificado 6 genes que componen el complejo *Iro* (*Irx1-6*) organizados en 2 grupos (*Irx1-3* y *Irx4-6*), esta organización génica, se piensa, proviene de una duplicación completa del complejo ancestral, lo que es apoyado por la semejanza entre los elementos parálogos (*Irx1-3*, *Irx2-5*, *Irx4-6*) (Figura 6).

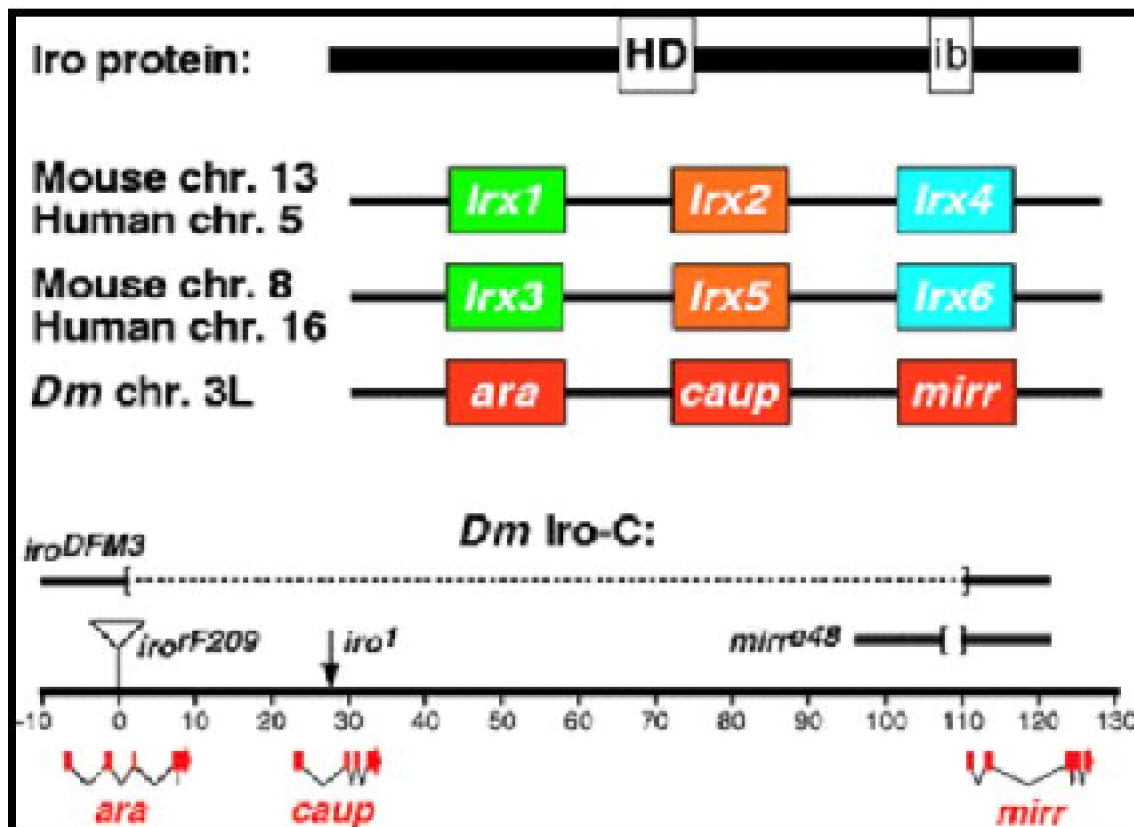


Figura 6. Organización genómica del complejo Iroquois

Los genes del complejo *Iroquois* codifican para factores de transcripción del tipo homeoproteínas (HD) y han sido clasificados como una familia debido a la presencia de una región en el extremo carboxilo terminal de la proteína que se ha llamado Irobox (ib). En *Drosophila* (Dm) el complejo está compuesto por tres genes, *Araucan*, *Caupolican* y *Mirror*. Se ha observado que las unidades transcripcionales comparten elementos regulatorios. Se indican los alelos mutantes mediante los cuales se caracterizó el complejo *Iro*. En ratón y humanos el complejo *Iroquois* está compuesto por 6 genes. Análisis de las secuencias nucleotídicas sugirió que en vertebrados superiores el complejo sufrió una duplicación completa. El esquema muestra la organización del

complejo y la relación entre los genes parálogos.

Al menos 4 ortólogos, de los 6 genes de ratón/humano, han sido encontrados en otros vertebrados y debido a su similitud a nivel aminoacídica de la región del homeodominio y de un región denominada Iro-box (C-terminal), posiblemente relacionada con la interacción proteína-proteína, se ha establecido que los genes *Iro* constituyen una nueva familia dentro de la clase de proteínas TALE (Bürglin, 1997). Aún cuando la función de estos genes en *Drosophila* y vertebrados es escasamente conocida, se piensa que ellos se requieren para definir, tempranamente en el desarrollo, la identidad de amplios territorios en el embrión. Ejemplos de esto son la región dorsal del disco de ojo-antena y grupos proneurales en el disco de ala en *Drosophila* y el tejido neural en *Xenopus* (revisado por Cavodeassi y cols., 2001).

2.1. Papel del complejo *Iroquois* en la formación de la placa neural de vertebrados

En *Xenopus*, tres genes *Iro* han sido identificados hasta el momento (Bellefroid y cols., 1998, Gómez-Skarmeta y cols., 1998). Dos de ellos *Xiro1* y *Xiro2* se expresan desde el comienzo de la gastrulación en el ectodermo dorsal y se ha determinado que son esenciales para el desarrollo del tejido neural. Al sobre expresar el mRNA silvestre de estos genes se expande el territorio neural y se reducen las crestas neurales (Gómez-Skarmeta y cols., 1998) y su falta de función transforma el tejido neural en epidermis (Gómez-Skarmeta y cols., 2001). La homología entre *Xiro1*, 2 y 3 a nivel de secuencias nucleotídicas, patrones de expresión y fenotipos producidos sugieren que existe redundancia en sus funciones.

Se han obtenido avances en el mecanismo mediante el cual los genes *Iro* favorecen la formación de la placa neural. Como ya se ha descrito, la inducción de el tejido neural se produce por una baja de la actividad de BMP-4 en el ectodermo dorsal. BMP-4 se expresa a través de todo el mesodermo y ectodermo de la blástula, durante la gastrulación la expresión de *Bmp-4* desaparece del mesodermo dorsal y del ectodermo dorsal. Dicha represión en la región dorsal del embrión depende de la señal Wnt, la que activaría uno o más represores en esta región (revisado por Harland, 2000). Uno de esos represores pareciera ser, en el ectodermo dorsal, *Xiro1*. *Xiro1* es activado por la señal Wnt, actúa como represor en el ectodermo y su sobre expresión reprime la transcripción de *Bmp-4*, más aún, la sobre expresión de una forma dominante negativa de *Xiro1* promueve expresión ectópica de *Bmp-4*. Es probable que *Xiro1* reprima directamente *Bmp-4* ya que se une directamente al promotor de este gen en ensayos de retardo de banda (Gómez-Skarmeta y cols., 2001). Es interesante notar que la falta de función de *Xiro1* en un contexto de falta de función de BMP-4 en el ectodermo no produce la expresión de marcadores neurales, esto sugiere que *Xiro1* reprime la expresión de otros factores que reprimen el destino neural en el ectodermo. Por otra parte, la capacidad de los genes *Xiro* de activar la expresión de genes proneurales *Xngr-1*, *Xash3*, *atonal* (Bellefroid y cols., 1998, Gómez-Skarmeta y cols., 1998) pareciera ser indirecta ya que, como se ha descrito, este gen se comporta como represor transcripcional.

2.2. Papel del complejo *Iroquois* en las subdivisiones del tubo neural en vertebrados

Durante la neurulación el patrón de expresión de *Xiro1* y *Xiro2* se restringe a dos bandas paralelas a lo largo del tubo neural, que se extienden desde el límite entre el cerebro medio y posterior hasta la región más caudal de la placa neural. *Xiro3* se expresa de manera similar pero las bandas de expresión son más angostas. Estos patrones de expresión sugieren que los genes *Xiro* funcionan, luego de la inducción neural, en definir dominios dentro del primordio neural. Esto ha sido demostrado en embriones de pollo, donde *Irx3*, el ortólogo de *Xiro3* en conjunto con otros genes que poseen homeodominios efectúan el posicionamiento y diferenciación del patrón dorso-ventral del tubo neural (Briscoe y cols., 2000). *Pax6*, *Pax7*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3*, *Nkx6.1* y *Nkx6.2* se expresan en el eje dorso-ventral del tubo neural en patrones que se superponen parcialmente, en respuesta al gradiente de Shh presente en este eje. La combinatoria de factores define 5 tipos celulares (V0, V1, V2, MN y V3). Por ejemplo, la expresión conjunta de *Irx3* y *Nkx6.1* produce la diferenciación de neuronas del tipo V2, mientras que la expresión, solo de *Nkx6.1* especifica células MN. Este tipo de eventos han permitido proponer que la identidad neuronal esta definida por combinatorias específicas de homeoproteínas (Briscoe y cols., 2000). Represión mutua entre los genes que codifican homeoproteínas permite la formación de bordes abruptos en su expresión. No se ha determinado si los genes *Iro* participa en este tipo de interacciones que llevan al establecimiento de bordes en vertebrados, como lo hacen sus contrapartes en el borde Notum/Bisagra del disco de ala y en los compartimentos Dorso/Ventral del disco de ojo en *Drosophila* (Cavodeassi y cols.2000).

En *Drosophila* la formación de centros organizadores esta asociado al establecimiento de compartimentos. Estos se establecen por expresión particular de genes homeóticos que definen la identidad celular de los compartimentos, que lleva a su vez a la expresión de moléculas de adhesión propias de cada sector y estableciendo una restricción de linaje. Como se ha mencionado, no se sabe el papel de *Iro* de vertebrados en el establecimiento de centros organizadores, ni de la capacidad de estos genes de controlar la producción de moléculas de adhesión. Sin embargo, la mayoría de los genes *Iro* identificados presenta límites de expresión refinada en el límite entre el cerebro medio y posterior. Este territorio se comporta, como veremos más adelante, como centro organizador tanto para el cerebro medio como para el cerebro posterior en vertebrados.

2.3. Papel de los genes *Iroquois* en el patrón del corazón

Los genes *Iro* participan también en la subdivisión del corazón de vertebrados en territorios de menor tamaño (Bao y cols. 1999). El corazón deriva de una estructura tubular única que da origen a dos tipos de cámaras: los ventrículos y las aurículas. En pollo *Irx4* es expresado principalmente en los ventrículos en desarrollo. La expresión ectópica de *Irx4* en las aurículas activa genes específicos de ventrículos. De manera

contraria, la expresión de una forma dominante negativa de *Irx4* en el ventrículo produce la disminución de genes específicos de ventrículos y activa la expresión de genes propios de aurícula. Sin embargo, estos cambios en la expresión génica no se extienden a transformaciones morfológicas aurículo/ventriviales. Así, más que definir la identidad de las cámaras del corazón, *Irx4* probablemente imprime características regionales específicas como las propiedades contráctiles y electrofisiológicas de los tejidos. Ratones mutantes para *Irx4* presentan corazones con morfología correcta, pero expresan de forma aberrante genes ventriculares y presentan cardiopatías (Bruneau y cols., 2001). En contraste a lo observado en *Xenopus*, *Irx4* se comporta como activador de la transcripción durante el desarrollo del corazón (Bao y cols., 1999). No obstante, puede formar un complejo represor de la transcripción, interactuando específicamente con los receptores de vitamina D y ácido retinoico (RXR) (Wang y cols., 2001). Estos antecedentes sugieren que la actividad transcripcional de los genes *Irx* es especie específica y tejido específica, siendo modulado su comportamiento transcripcional por interacción con otras señales presentes en el embrión, como por ejemplo ácido retinoico.

3. Límite entre el cerebro medio y posterior: Organizador del Istmo

3.1. Estudios Embrionológicos

En la placa neural es posible distinguir 4 divisiones fundamentales, entre el cerebro medio y posterior se localiza una estructura que en los últimos años ha atraído la atención de numerosos investigadores. Esta región, conocida como límite entre el cerebro medio y posterior (LCM/P) posee propiedades de organizador (organizador del istmo). Es decir, es capaz de modificar el destino celular de las células adyacentes a él (revisado en Alvarado-Mallart, 1993; Joyner y cols., 2000; Liu y Joyner, 2001; Martínez, 2001; Rhinn y Brand, 2001). Esta propiedad fue descrita originalmente en pollo, extendiéndose posteriormente a ratón. Experimentos de trasplantes entre pollo y codorniz demostraron que tejido que incluía la región caudal del cerebro medio y la región rostral del cerebro posterior era capaz de modificar el diencefalo (región caudal del cerebro anterior) y el romboencéfalo (región anterior del cerebro posterior) rostral cuando era transplantado a dichas posiciones en el embrión. Se observó que la identidad del diencefalo sufría transformaciones que llevaban a duplicaciones de las estructuras derivadas del cerebro medio, por otra parte cuando el trasplante era incluido en el romboencéfalo, este se transformaba dando origen a una duplicación similar pero de estructuras cerebelares (Gardner y Barald, 1991; Marin y Puelles, 1994; Martínez y Alvarado-Mallart, 1990; Martínez y cols., 1995; Martínez y cols., 1991). Esto sugirió que en el tejido transplantado existían actividades con propiedades transformantes que eran capaces de imprimir identidad de cerebro medio en el diencefalo y de cerebelo, en el romboencéfalo. Posteriormente se determinó que en el organizador del istmo se expresan los factores

secretados Wnt1 y el factor de crecimiento fibroblástico-8 (FGF8) y se sugirió que posiblemente eran estas proteínas difusibles las responsables de las transformaciones observadas. Finalmente, experimentos de implantación de esferas cargadas de FGF8 en pollo, definieron que la molécula fundamental que otorgaba a este tejido la capacidad organizadora era FGF8. Esta proteína era capaz de emular las transformaciones producidas por los trasplantes de tejidos y producir la expresión de los genes involucrados normalmente en el desarrollo del cerebro medio, entre ellos *Wnt1* (Crossley y cols., 1996; Liu y cols., 1999; Martínez y cols., 1999; Shamim y cols., 1999). Estos primeros antecedentes sobre este, denominado organizador secundario, han llevado a un gran número de investigadores a analizar sus propiedades morfogenéticas y estudiar cómo este organizador secundario es inducido por las actividades generadas por el organizador de Spemann u organizador primario.

3.2. Genes involucrados en el establecimiento del organizador del istmo

3.2.1. *Fgf8*

Estudios genéticos en pez cebra y ratón apoyan los antecedentes anteriores en términos de la necesidad de FGF8 para el correcto desarrollo de las estructuras derivadas de las regiones cercanas al LCM/P (Brand et al., 1996; Meyers et al., 1998; Reifers et al., 1998). *Fgf8* es expresado normalmente por las células del romboencéfalo que están en contacto con las células pertenecientes a la región caudal del cerebro medio, dominio que se caracteriza por la expresión de otra proteína difusible, Wnt1 (revisado en Joyner y cols., 2000; Liu y Joyner, 2001; Martínez, 2001). Experimentos recientes en pollo muestran que la expresión inicial de *Fgf8* aparece en un territorio que coexpresa dos factores de transcripción del tipo homeoproteínas, *Otx-2* y *Gbx-2*. Este dominio de coexpresión posteriormente a la aparición de *Fgf8* deja de expresar *Otx-2*, quedando sólo la expresión de *Gbx-2*. Estos datos han sugerido que la combinación de ambas homeoproteínas sería capaz de inducir *Fgf8*, este activaría la expresión de *Gbx-2*, él que reprimiría la expresión de *Otx-2* (Garda y cols. 2001; Wurst y Bally-Cuif, 2001).

3.2.2. Pax, Engrailed y Wnt

Si bien la evidencia generada de los estudios en pollo, de trasplantes e implantes de bolitas sugieren que el FGF8 es la molécula inductiva, estudios de mutantes nulos para FGF8 en ratón y pez cebra (*acerebellar*), descartan su rol en la inducción de los genes marcadores del límite entre el cerebro medio y posterior (LCM/P), pero sugieren que FGF8 sería necesario para la mantención de la expresión de *Engrailed* y *Wnt1* (Joyner, 1996; Reifers y cols., 1998). *Engrailed-1/2* y los factores homeobox pareados *Pax2/5* son expresados, en pollo y ratón, en el cerebro medio y posterior. Análisis de *Knock-out* en ratón han permitido definir que estos factores de transcripción son, al igual que la proteína secretada Wnt1, indispensables para la especificación correcta del cerebro medio y cerebelo (revisado en Joyner y cols., 2000; Liu y Joyner, 2001; Martínez, 2001). Además,

del análisis de los mutantes de estos genes se ha sugerido que la expresión de *En-1/2* es dependiente de *Pax2/5* y su mantención de la señal de *Wnt1*, que difunde desde las células ectodérmicas adyacentes.

3.2.3. *Otx*

Los genes *Otx* codifican para factores de transcripción del tipo homeoproteína, de la clase *bicoid*. Han sido identificados en *Drosophila* y en vertebrados, estableciéndose que su presencia es indispensable para la correcta formación de las estructuras anteriores del embrión. Además de este papel en el desarrollo de los sistemas señalados, sirve de límite en la formación del cerebro medio en vertebrados y ha sido involucrado en la mantención y posicionamiento del LCM/P en ratón. Esta aseveración se sustenta en que al eliminar la función de *Otx-1* y *2* (en ratón), el cerebelo se desarrolla de manera desproporcionada, comprometiendo gran parte de la cabeza (Acampora y cols., 1997). Esto sugiere que *Otx* imprime una restricción a las señales que determinan la expresión de los genes involucrados en el establecimiento del cerebelo, *En-2*, *Fgf8* y *Wnt1*. Además, ratones transgénicos que expresan *Otx-2* bajo el control de el promotor de *En-1* (cerebro medio y posterior) presentan relocalización del organizador del istmo en una posición más caudal. Esto es consecuencia de la expansión caudal de la expresión de *Otx-2*, represión de la expresión normal de los genes propios del territorio del LCM/P y de genes activos en el romboencéfalo. Los cambios señalados llevan al reestablecimiento del organizador del istmo en el nuevo límite caudal de expresión de *Otx-2*. Se ha sugerido que la reespecificación de los marcadores del límite entre el cerebro medio y posterior es producto de interacción entre este nuevo límite y las células del cerebro posterior que contacta las células *Otx-2* positivas (Acampora y cols., 1998; Broccoli y cols., 1999; Katahira y cols., 2000; Millet y cols., 1999; Rhinn y cols., 1998; Wassarman y cols., 1997).

3.2.4. *Gbx-2*

El gen *Gbx-2*, caracterizado en *Xenopus*, pollo y ratón, codifica para un factor de transcripción del tipo homeoproteína y corresponde a una subfamilia compuesta principalmente por los genes descritos en las distintas especies en que se encuentra presente (Ortólogos). Es expresado en el primordio neural en la región más anterior del romboencéfalo, denominado rombómero 1, que está en contacto con la región caudal del cerebro medio y que es precisamente donde el organizador del istmo se localiza. Análisis de sobreexpresión en pollo, mediante electroporación, ha establecido que *Gbx-2*, junto a los otros genes mencionados participa en el posicionamiento de el LCM/P. Por otra parte, experimentos de mutantes en ratón, han demostrado que este gen no participa en la inducción y posiblemente tampoco en la mantención de *En-2*, *Fgf8* y *Wnt1*, pero permite el correcto posicionamiento de estos genes. Al eliminar la función del gen *Gbx-2* se dispersa la expresión de los genes *En-2*, *Fgf8* y *Wnt1*, extendiéndose la expresión de *En-2* hacia una región más caudal del cerebro posterior (Wassarman y cols., 1997). Por el contrario, al realizar un transgénico en ratón que expresa *Gbx-2* bajo el control del promotor de *Wnt1*, lo que expande el dominio de *Gbx-2* al cerebro medio, se produce represión de *Otx-2* y de la expresión normal de los marcadores del LCM/P, generando, de

manera opuesta al transgénico *pEn1-Otx2*, embriones que presentan reposicionamiento de los genes del organizador en una región más rostral. Estos antecedentes, junto a los datos obtenidos del transgénico *pEn1-Otx2* y observaciones realizadas en experimentos de electroporación en pollo, con vectores que codifican para *Gbx-2* y *Otx-2*, han sugerido que *Otx-2* y *Gbx-2* poseen actividades transcripcionales opuestas y que estos factores de transcripción son los principales elementos en definir la posición en la que el organizador del istmo será inducido.

Gbx-2 ha sido identificado en *Xenopus*, se ha determinado que, al igual que en pollo y ratón, se expresa en el rombómero 1. Además se ha establecido que su inducción es dependiente de ácido retinoico (von Bubnoff y cols., 1995). Por último, análisis de sobreexpresión ha sugerido que este gen controla la expresión diferencial de moléculas de adhesión (King y cols.,1998) pero su papel en el establecimiento del organizador del istmo no ha sido aclarado en este vertebrado.

3.2.5. Modelo de inducción y posicionamiento del istmo en ratón

En resumen, *Otx-2* y *Gbx-2* son los factores de transcripción que se expresan con patrones definidos, más tempranamente en el territorio presuntivo del límite entre el cerebro medio y posterior. Su expresión es complementaria, siendo *Otx-2* expresado en la región anterior del embrión hasta el cerebro medio, incluyéndolo, mientras que *Gbx-2* se expresa en la región rostral del cerebro posterior. Experimentos de pérdida y ganancia de función en ratón y pollo han sugerido que estos genes poseen actividades opuestas y que son capaces de controlar su expresión de manera antagónica, definiendo de esta manera la posición en la que el organizador del istmo será inducido (Figura 7).

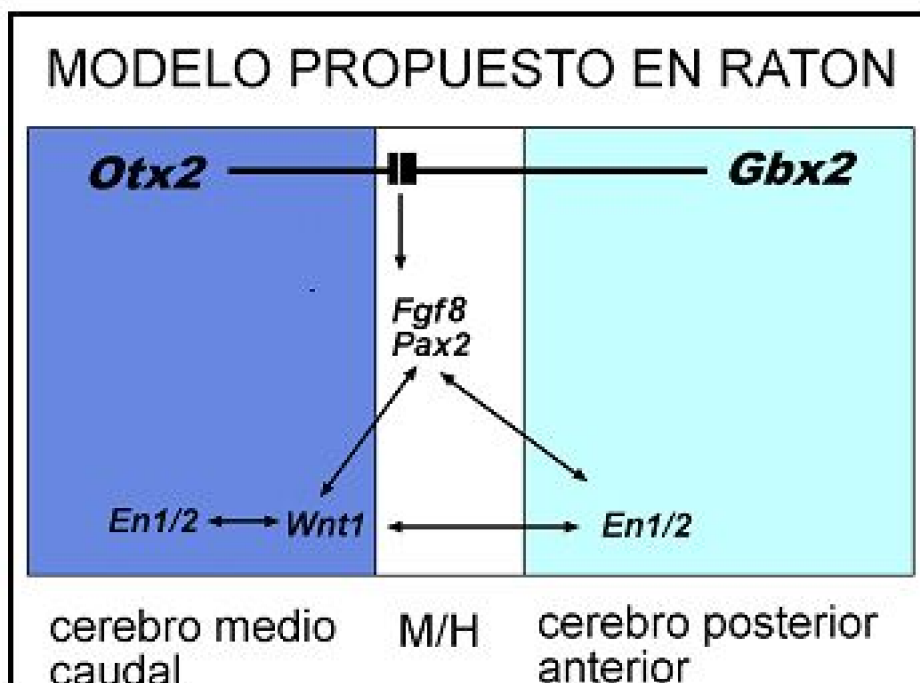


Figura 7. Modelo del posicionamiento del organizador del istmo

Actividades antagónicas entre las homeoproteínas *Otx-2*, expresada hasta la región

caudal del cerebro medio y *Gbx-2*, expresada en el territorio rostral del romboencéfalo, definen la posición en la que *Fgf8* es transcrito. La inducción de *Fgf8* activa la expresión de *Pax2/5* en un dominio que abarca el cerebro medio y parte del cerebro posterior. La presencia de este factor de transcripción es necesaria para la expresión de *En-1/2*, el que junto a *Fgf8* activan a expresión de *Wnt1*. Estos genes forman un ciclo autoregulatorio que consolida el organizador en la región del istmo entre la región caudal del cerebro medio y la región rostral del romboencéfalo.

En resumen, analizando el conjunto de experimentos realizados en pollo, ratón y *Xenopus* el modelo de establecimiento del límite entre el cerebro medio y posterior sería como sigue:

a.- Inducción neural: Noggin, Chordin y Follistatin disminuirían los niveles de la actividad antineuralizante de BMP-4, permitiendo la diferenciación de los pliegues y la placa neural de carácter anterior.

b.- Posteriorización: FGF, Wnts y ácido retinoico difundirían desde el extremo posterior del embrión generando un gradiente de actividad posteriorizante y con ello las diferencias antero-posteriores del tejido neural.

c.- Especificaciones antero-posteriores: el gradiente posteriorizante activaría una serie de factores transcripcionales (ej: *Otx-2*, *Gbx-2*, *Xiro1*, etc.) en regiones específicas del eje AP. La expresión de estos factores le conferiría distinta identidad AP a las células donde ellos se expresan (*Otx-2*:anterior, *Gbx-2* y *Xiro1*:cerebro medio/posterior, etc.)

d.- Organizador del LCM/P: El conjunto de actividades génicas descritas activaría el organizador del LCM/P, el cual sería capaz de ejercer su efecto inductivo del organizador en células vecinas. Esta actividad inductiva del LCM/P dependería del factor secretado FGF8 y conduciría a la activación de *Pax2/5*, *En-1/2* y *Wnt1* en regiones adyacentes.

e.- Especificación del organizador del istmo: La expresión de *En-1/2* y *Wnt1* en el organizador del istmo permitiría la especificación de este territorio. El ciclo autoregulatorio entre *En-1/2* y *Wnt1* contribuiría a la determinación del organizador del istmo.

Los antecedentes anteriormente expuestos han permitido plantear la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Xiro1 participarían en *Xenopus* en la formación del mesodermo dorsal y en la inducción y posicionamiento del organizador del istmo y de los genes que lo determinan (*Fgf8*, *En-2* y *Wnt1*). En este último proceso, regularía la expresión de *Otx-2*, expresado en el cerebro medio y *Gbx-2* expresado en el cerebro posterior y de este modo determinaría la posición de istmo.

Objetivo General

Determinar la participación de *Xiro1* en la formación del mesodermo y del organizador del istmo y cómo los genes *Xiro1*, *Otx-2* y *Gbx-2*, las señales posteriorizantes (FGF y/o ácido retinoico) y las estructuras mesodérmicas interactúan para establece el límite entre el cerebro medio y posterior.

Objetivos Específicos

Para responder a la hipótesis se plantean los siguiente objetivos:

Investigar si Xiro1 es expresado en el mesodermo y cómo este factor de transcripción¹. participa en el establecimiento del eje dorso-ventral del mesodermo.

Determinar desde qué tejido mesodérmico se originan las señales que especifican la 2. posición del LCM/P en el eje AP. Dado que el mesodermo posee actividades inductivas, se pretende en este objetivo definir si las distintas regiones AP de este tejido ejercen efectos sobre la expresión de genes en el ectodermo que se encuentra en contacto con ellos. En particular, se espera determinar qué región mesodérmica (dentro del eje AP) define la expresión de los marcadores del organizador del istmo.

Determinar si ácido retinoico, la vía Wnt y/o FGF regulan la formación del organizador³. del istmo. En este punto, se pretende definir si el proceso de posteriorización participa en el desarrollo del istmo y cuál es la identidad de los morfógenos involucrados.

Analizar si las señales posteriorizantes controlan la expresión de los genes Otx-2, 4. Gbx-2 y Xiro1. El análisis de la relación entre la expresión de estos factores y las moléculas transformantes, pretende determinar si la actividad inductiva de los morfógenos se pudiese deber a la activación de los factores de transcripción señalados.

Analizar si los genes Otx-2, Gbx-2 y Xiro especifican el organizador del istmo en 5. Xenopus. Este punto espera resolver si la interacción de estos factores de

transcripción es suficiente para la inducción y posicionamiento del organizador del istmo.

La combinación de técnicas de biología molecular y embriología clásica, permiten en *Xenopus*, realizar experimentos donde se combinan las ventajas y se superan las desventajas de ratón y pollo en el estudio de los problemas del desarrollo (disecciones y eliminación de funciones génicas, respectivamente). En *Xenopus* es posible realizar experimentos de pérdida de función a través de la microinyección de mRNAs que codifican para dominantes negativos, al mismo tiempo es posible realizar explantes, conjugados de tejidos y transplantes de tejidos que posean alteraciones en la información génica.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

1.1. Obtención y crecimiento de embriones de *Xenopus laevis*

Se mantuvo Xenopus laevis adultos, machos y hembras, en agua, con alimentación trisemanal (corazón de vacuno) y ciclo luz-oscuridad controlado (12 hrs.). Se indujo la ovulación mediante la inyección de 850 U de gonadotrofina coriónica humana en el saco dorsal linfático de las hembras y se recolectó los oocitos al cabo de aproximadamente 15 horas a 22°C. Para la obtención de espermatozoides, se anestesiaron los animales machos por inmersión en agua y hielo, a 4°C por 30 min. Los testículos removidos se maceraron en agua destilada para luego ser aplicados sobre los oocitos. Luego de 10 minutos se agregó agua destilada hasta dejar sumergidos los oocitos en proceso de rotación cortical. Después de media hora se removió la gelatina que cubre los embriones con una solución de cisteína al 2% en NAM 1/10 pH 8.1 y se lavaron con NAM 1/10, eliminando la solución de cisteína. Los embriones se mantuvieron en NAM 1/10 entre 14 ° - 23 ° C, según el estadio embrionario en que se determinó realizar los experimentos (el desarrollo de los embriones de anfibio es dependiente de la temperatura de incubación). Se usó la

clasificación por estadíos de Nieuwkoop y Faber (1967).

Reactivos y Materiales de Embriología

- - Jeringas de inyección de 1 ml, desechables (Becton Dickinson, Brasil)
- - Cisteína (Merck, Darmstadt, Alemania)
- - Ficoll (Polisacarosa 400, NYCOMED)
- - Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) 5000U.I. (Intervet, Chorulon)
- - Pinzas Dupont N°5
- - Medio normal de anfibios (Normal Amphibian Medium)

1.2. Generación de explantes y conjugados embrionarios

Los explantes y conjugados fueron realizados utilizando cuchillas de cejas y pinzas en medio 3/8 NAM. Se removió explantes de ectodermo (CAP animal) en estadio 9 (blástula tardía) y/o estadio 10 (gástrula temprana) y Notocordas, incluyendo o no mesodermo precordial de embriones en estadio 13. Los explantes de Keller fueron realizados en configuración de emparedado en estadio 10, se incluyó la región dorsal del mesodermo y la placa neural presuntiva (Keller y cols., 1992). Los explantes y conjugados generados fueron cultivados hasta el equivalente de neurula para los estudios de hibridación *in situ* simple o doble, según se indica en la sección de los resultados.

1.3. Microinyección de embriones e inducción con dexametasona

Se realizó la sobreexpresión de los genes analizados (Tabla 1) mediante inyección del mRNA transcrito *in vitro* en embriones de *Xenopus laevis* (Jones y Ribera, 1994). Se inyectó ya sea en estadio de 1 célula por el polo animal o en 1 de los blastómeros en estadio de 2 y/o 4 células (de acuerdo al experimento, se eligió los blastómeros ventrales o dorsales). La concentración de mRNA a inyectar se determinó para cada experimento (ver resultados). En la Figura I se muestra de modo esquemático como se llevaron a cabo las inyecciones dirigidas de los mRNA a mesodermo (sector ecuatorial del embrión) o ectodermo (polo animal) para asegurar la localización final en los dominios ectodérmicos y mesodérmicos dorsales ó ventrales. Como control, se usó embriones no inyectados o inyectados con el trazador de linaje *b-gal* en iguales concentraciones (Lombardo y Slack, 1997). Los embriones fueron cultivados hasta varios estadíos de desarrollo para estudiar los efectos de la manipulación de la expresión de los genes de interés sobre la dorsalización del mesodermo y el patrón antero-posterior del tubo neural. Características que fueron evaluadas mediante hibridaciones *in situ* o por análisis de la morfología embrionaria. La activación de las quimeras inducibles se llevó a cabo mediante adición de Dexametasona disuelta en etanol 95%, al medio de cultivo en una concentración final de 4mg/ml (Kolm y Sive, 1995) en el momento particular del desarrollo en que se deseó ensayar el papel de los genes de interés.

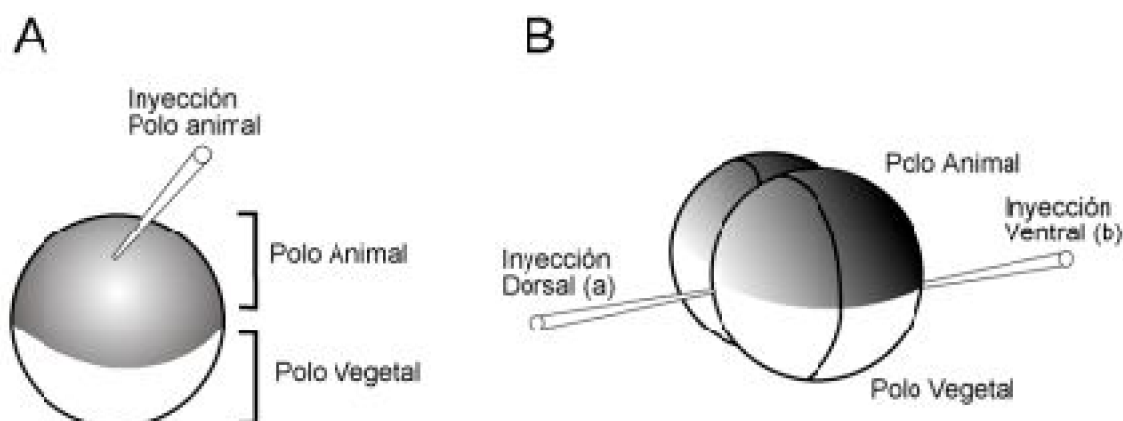


Figura 1. Esquema de las inyecciones realizadas en los embriones de *Xenopus*

A) Representación de la inyección de un embrión de dos células en la zona ecuatorial dorsal. La región dorsal del embrión se reconoce por la zona de menor pigmentación del polo animal. **B)** Representación de la inyección de un embrión de cuatro células en la zona ecuatorial dorsal (**a**) o ventral (**b**). Los blastómeros dorsales se reconocen en un embrión con clivaje regular por ser de mayor tamaño y de pigmentación más clara.

2. Técnicas de Biología Molecular

2.1. Generación de las Quimeras de *Gbx2*, *Otx2* y *Xiro1*

2.1.1. Quimeras de *Xiro1*

Para preparar las construcciones *Xiro-EnR* y *Xiro-VP16* se utilizaron los DNAs *EnR-Mix.1* y *VP16Mix.1* (Lemaire y cols., 1998). El homeodominio de *Mix.1* fue removido usando BamHI y NotI y la mayor parte del cDNA de *Xiro1* fue insertado utilizando el sitio BamHI (posición 440) y el sitio NotI de la región 3' del sitio de múltiple clonamiento. La fusión resultante contiene la mayor parte de la región codificante de *Xiro1*, excepto los primeros 41 aminoácidos. Para generar las construcciones *HD-GR*, *HD-GR-EnR* y *HD-GR-E1A* primero amplificamos por PCR la secuencia codificante del homeodominio de *Xiro1* con los siguientes oligonucleótidos: 5'-AACTGAAAGAGAATTCTGGTGTCC-3' y 5'-CCAAAGATG-TT**GAGCTCTT**CCTTAC-3' o 5'-CTTCATTTTT**CTCGAGTCTC**CTTC-3'. Los fragmentos resultantes fueron digeridos con EcoRI y SacI o XhoI, y subclonados en pBluescript. El dominio inducible por hormona fue obtenido por PCR desde el plasmidio *MyoD-GR* donado por H. Sive (MIT, EE.UU), usando los oligonucleótidos 5'-GGCGCC**GAGCTCC**CCTCTG-3' y 5'-GCGGG**CTCGAG**CCA-CTT-3'. Los fragmentos generados fueron cortados con SacI y XhoI y subclonados en pBluescript. Los fragmentos

de *Xiro1* y GR (dominio inducible) se secuenciaron para confirmar que no se incluyeran errores en la amplificación. Las regiones amplificadas de *Xiro1*, digerida con EcoRI y SacI, y la región GR, digerida con SacI y XhoI, fueron ligadas al plasmidio pCS2-MT (Turner y Weintraub, 1994) generando el vector *pCS2-MT-HD-GR*. Las regiones EnR y E1A fueron obtenidas desde el vector *pCS2-MT-NLS-EnR* y *pCS2-MT-NLS-E1A* (donados por N. Papalopulu, U. Cambridge, Inglaterra). Estos dominios fueron escindidos con XhoI y KpnI e insertados en el vector *pCS2-MT-HD-GR*, previamente cortado con las mismas enzimas, generando las fusiones *HD-GR-EnR* y *HD-GR-E1A* (Gómez-Skarmeta y cols., 2001, Figura II).

2.1.2. Quimeras *Otx-2* y *Gbx-2*

Los homeodominios de *Otx-2* y *Gbx-2* fueron amplificadas con los siguientes oligonucleótidos: 5'-ATGCCGT**GAATTC**GCTCAGCC-3', 5'-CACT**CTCGAGGC**-TCACTTCCC-3' (fusión no inducible) o 5'-CTC**GGGCC**CTCACTTCCCTGG-3' (fusión inducible) y 5'-ACCTGGACTA**GAATTC**AGATGAC-3', 5'-TTGCTTG-**CTCGAG**CTGCTGG-3' (fusión no inducible) o 5'-TGCT**GGGCC**AGCTGCTGG-3' (fusión inducible) respectivamente. Los fragmentos generados para las fusiones no inducibles de *Otx-2* y *Gbx-2* fueron digeridos con EcoRI y XhoI y subclonados en pBluescript produciendo los vectores *pBS-Otx* y *pBS-Gbx*, para luego ser secuenciados. Para obtener la fusión E1A, los vectores *pBS-Otx* y *pBS-Gbx*, que contiene las secuencias que codifican para los homeodominios respectivos y el vector pCS2-MT-E1A fueron digeridos con EcoRI y XhoI, los fragmentos de los homeodominios obtenidos y el vector linearizado fueron ligados por separado generando los vectores *pCS2-MT-NLS-Otx-E1A* y *pCS2-MT-NLS-Gbx-E1A*. Las construcciones EnR no inducibles (*Otx-EnR* y *Gbx-EnR*) fueron producidas intercambiando el dominio E1A, escindido con las enzimas XhoI y KpnI desde los vectores *pCS2-MT-NLS-Otx-E1A* (*Otx-E1A*) y *pCS2-MT-NLS-Gbx-E1A* (*Gbx-E1A*), con el dominio EnR escindido desde el vector *pCS2-MT-NLS-EnR* con las mismas enzimas de restricción.

Las construcciones inducibles fueron realizadas de la siguiente manera: Los fragmentos generados por PCR (fusiones inducibles) fueron digeridos con ApaI y XhoI y subclonados en pBluescript para posterior secuenciación. El fragmento GR fue obtenido por PCR utilizando los siguientes partidores: 5'-GGCGCC**GGGCC**CTCTG-3' y 5'-GCGGG**CTCGAG**CCACTTTG-3' y subclonado en pBluescript utilizando las mismas enzimas de restricción. Los fragmentos de *Otx-2*, *Gbx-2* y GR fueron escindidos de los correspondientes vectores y ligados al vector *pCS2-MT* para así generar las construcciones *pCS2-MT-Otx-GR* (*Otx-GR*) y *pCS2-MT-Gbx-GR* (*Gbx-GR*). Las fusiones E1A y EnR fueron producidas incluyendo los dominios E1A y EnR, escindidos desde los vectores *pCS2-MT-NLS-E1A* y *pCS2-MT-NLS-EnR* con las enzimas XhoI y KpnI, en los vectores *pCS2-MT-Otx-GR* y *pCS2-MT-Gbx-GR* previamente digeridos con las mismas enzimas de restricción, generando de este modo las construcciones *pCS2-MT-Otx-GR-E1A* (*Otx-GR-E1A*), *pCS2-MT-Otx-GR-EnR* (*Otx-GR-EnR*), *pCS2-MT-Gbx-GR-E1A* (*Gbx-GR-E1A*) y *pCS2-MT-Gbx-GR-EnR* (*Gbx-GR-EnR*) (Figura II). Los sitios de las enzimas de restricción usadas se encuentran destacados en negrillas

en los partidores utilizados.

Las condiciones del PCR para generar los fragmentos:

1. 3 min. 94°C
2. 30 seg. 94°C
3. 45 seg. 55°C
4. 1 min. 72°C
5. volver a paso 2. 24 veces
6. 10 min. 72°C
7. 4°C

2.2. Obtención de los fragmentos y vectores digeridos y Secuenciación

Los fragmentos digeridos menores a 1Kb fueron obtenidos directamente de las bandas, cortadas desde los geles de agarosa al 1%, mediante centrifugación a 10000r.p.m por 10min., posteriormente precipitadas con etanol y ligados a los vectores pertinentes, previamente digeridos y purificados, para realizar las fusiones o para secuenciación. Los clones en pBluescript fueron secuenciados completamente mediante secuenciación automática (Oligopeptido, Fac. de Medicina, Universidad de Chile) para confirmar la correcta amplificación de los homeodominios de los genes anteriormente señalados. Los DNAs mayores a 1Kb se obtuvieron mediante el método GENECLEAN.

Quimeras de *Xiro1*, *Gbx-2* y *Otx-2*

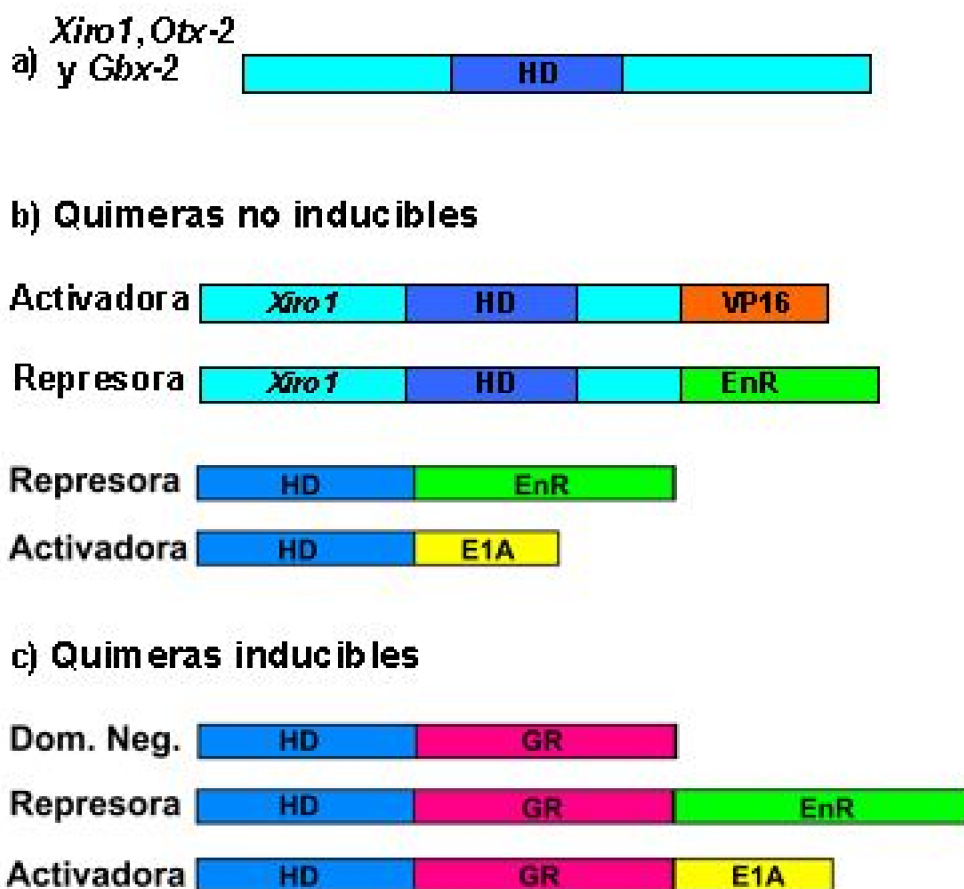


Figura II. Esquema de los genes silvestres y construcciones derivadas

a) Esquema de los transcritos silvestres (homeodominio: HD, azul). **b)** La mayor parte de la región codificante de *Xiro1* se fusionó a la secuencia del dominio represor de *Engrailed* (EnR, verde) o a la secuencia de la proteína activadora de la transcripción VP16 (VP16, naranja) generando las fusiones *Xiro1-EnR* y *Xiro1-VP16*. Además, los homeodominios de los genes *Xiro1*, *Otx-2* y *Gbx-2* (HD, azul) fueron fusionados en fase a las secuencias codificantes de la región represora de *Engrailed* (EnR, verde) o a la secuencia codificante de E1A (E1A, amarillo). **c)** Se generaron fusiones inducibles para estos genes. La región codificante para los homeodominio de estos genes fue fusionada al modulo GR (GR púrpura, región de unión a glucocorticoide del receptor humano de glucocorticoide, Kolm y Sive, 1995) y a las secuencias del modulo represor EnR o activador E1A, generando así las fusiones dominantes represoras inducibles y dominantes activadoras inducibles. Las fusiones dominantes negativos (Dom.Neg.) se realizaron fusionando el homeodominio sólo al modulo inducible (GR).

2.3. Transcripción *in vitro* de mRNA

Se transcribió mRNA a partir de los cDNA linearizados de los clones donados y de los producidos en el transcurso de esta tesis. Dependiendo de la orientación del inserto se usó la enzima de restricción y polimerasa adecuadas (Tabla 1).

La transcripción de los mRNA para la inyección en embriones se realizó mezclando 1 mg de plásmido linearizado, 2,5 mL de tampón de transcripción 10x, 2,5 mL de DTT 0,1M, 2,5 mL de mezcla de nucleótidos, 5 mL de GpppGppp 2,5 mM, 1 mL de RNAsin (20U), agua DEPC hasta completar 25 mL y 1 mL de la RNA polimerasa respectiva. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 20 min. para luego agregar 1 mL de GTP 25 mM y continuar la incubación a 37°C. Después de dos horas se agregó 1 mL de DNAsa I y se continuó la incubación a 37°C durante otros 30 minutos. El mRNA sintetizado se extrajo con un volumen de una mezcla fenol, cloroformo, alcohol isoamílico 25:24:1, y se precipitó agregando 0,1 volúmenes de acetato de litio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El mRNA se centrifugó durante 20 minutos a 12000g para luego eliminar el sobrenadante, lavar con etanol 70% y volver a centrifugar a 12000g durante 5 minutos, luego de los cuales se eliminó el líquido y secó el mRNA para finalmente resuspenderlo en 20 mL de agua DEPC.

Tabla1. Clones utilizados para síntesis de mRNA. Enzimas de Restricción y RNA polimeras usadas.

Papel del Complejo Iroquois en el Desarrollo Embrionario de *Xenopus laevis*.

Gen	Enzima de Restricción	RNA Polimerasa	Referencias
<i>b-gal</i>	Xba I	SP6	Enviado por F. Broders. Inst. Curie, Francia.
<i>BMP4</i>	XhoI	SP6	Schmidt y cols., 1995
<i>dnFGFR4</i>	Sall	SP6	Hardcastle y cols., 2000
<i>dnRAR</i>	NotI	T7	Blumberg y cols., 1997
<i>dnTCF3</i>	KpnI	SP6	Donado por R. Moon, U. Washington, EE.UU
<i>Gbx-2</i>	NotI	T7	von Bubnoff y cols., 1995
<i>Gbx-E1A</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Gbx-EnR</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Gbx-GR</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Gbx-GR-E1A</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Gbx-GR-EnR</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>HD-GR</i>	KpnI	SP6	Gómez-Skarmeta y cols., 2001
<i>HD-GR-E1A</i>	KpnI	SP6	Gómez-Skarmeta y cols., 2001
<i>HD-GR-EnR</i>	KpnI	SP6	Gómez-Skarmeta y cols., 2001
<i>Otx-2</i>	KpnI	T3	Blitz y Cho, 1995
<i>Otx-E1A</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Otx-EnR</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Otx-GR</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Otx-GR-E1A</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>Otx-GR-EnR</i>	KpnI	SP6	Esta tesis
<i>NICD</i>	NotI	SP6	McLaughlin y cols., 2000
<i>NICD-GR</i>	NotI	SP6	McLaughlin y cols., 2000
<i>Su(H)-ank-GR</i>	NotI	SP6	McLaughlin y cols., 2000
<i>Su(H)-DBM-GR</i>	NotI	SP6	McLaughlin y cols., 2000
<i>VP16RAR</i>	NotI	T7	Blumberg y cols., 1997
<i>XFD</i>	EcoRI	SP6	Amaya y cols., 1991
<i>Xiro1</i>	Xho	T3	Gómez-Skarmeta y

			cols., 1998
<i>Xiro3</i>	KpnI	SP6	Bellefroid y cols., 1998
<i>Xiro-EnR</i>	Sfil	T3	Gómez-Skarmeta y cols., 2001
<i>Xiro-VP16</i>	Sfil	T3	Gómez-Skarmeta y cols., 2001

Enzimas :

- SP6, T3, T7 RNA polimerasas, DNAsa I, BamHI, EcoRI, EcoRV, Sfil, SpeI, NotI, XbaI, XhoI, HindIII, KpnI, Taq polimerasa, Expand Long Template Polimerase (Boehringer, Mannheim, Alemania)

Reactivos de Biología Molecular

- Acetato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agarosa (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Alcohol Isoamilico (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania)
- DEPC, Dietilpirocarbonato (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- DTT (Promega, Wisconsin, EE.UU.)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Fenol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- GENECLEAN kit (BIO 101 inc., EE.UU.)
- GpppGppp, Sal de Sodio de m7G(5')ppp(5')G, estructura análoga al cap de mRNA (New England Biolabs, Beverly, EE.UU.)
- GTP (Pharmacia, Uppsala, Suecia)
- Quickspin columns (Boehringer, Alemania)
- RNAsin, inhibidor de RNAsas (Boehringer Mannheim, Alemania)
- Sephadex G-20 (Merck, Darmstadt, Alemania)

2.4. Análisis de la expresión de los genes estudiados durante el desarrollo de *Xenopus laevis* mediante hibridación in situ

Se utilizó una variación del método de Harland (Harland, 1991). Se usó sondas de RNA modificadas por la incorporación de digoxigenina, las cuales fueron generadas a partir de los cDNA para diversos marcadores mesodérmicos y neurales (Tabla 1). El mRNA para sondas se sintetizó mezclando 1 mL de plásmido linealizado, 2,5 mL de tampón de transcripción, 2,5 mL de DTT 0,1 M, 5 mL de DIGmix, 0,25 mL de RNAsin, agua DEPC hasta completar 25 mL y 1 mL de la RNA polimerasa correspondiente. Luego de dos

horas se agregó 1 mL de DNAsa I para continuar la incubación a 37°C durante 30 minutos para finalmente agregar 75 mL de agua DEPC y eluir la mezcla que contiene el RNA sintetizado en una columna Sephadex G20 equilibrada en TE pH 7,5 o bien columnas Quickspin (Roche) con el fin de eliminar los nucleótidos no incorporados al RNA. En el caso de sintetizar una sonda marcada con fluoresceína (para la realización de una in situ doble, ver siguiente párrafo). El mRNA se hizo en condiciones idénticas a las señaladas para la confección de sondas marcadas con digoxigenina, excepto que se usó una mezcla de FluoMix.

Los productos de las linearizaciones y transcripciones fueron analizados en geles de agarosa 1% TAE y la determinación de las concentraciones de ácidos nucleicos se realizó por lectura espectrofotométrica a 260 nm. Por lo general la incubación con la sonda se realizó a una concentración de 1 mg/ml.

Tabla 2. Clones para síntesis de Ribosondas. Enzimas de Restricción y RNA polimerasas usadas.

Gen	Enzima de restricción	RNA Polimerasa	Marcador	Referencia
<i>Cerberus</i>	EcoRI	T7	endo-mesodermo	Bouwmeester y cols., 1996
<i>Chordin</i>	EcoRI	T7	mesodermo dorsal	Sasai y cols., 1994, enviado por DeRobertis
<i>Xvent-1</i>	BamHI	T7	mesodermo ventral	Onichtchouk y cols., 1998
<i>Xwnt8</i>	BamHI	T7	mesodermo ventro-lateral	Christian & Moon, 1993
<i>Bmp-4</i>	EcoRI	T7	Mesodermo y ectodermo ventral	Donado por J.L. Gómez-Skarmeta, CBM, España.
<i>Xlim-1</i>	Sall	SP6	Mesodermo dorsal	Taira y cols., 1992
<i>Goosecoid</i>	EcoRI	T7	Mesodermo dorsal	Cho y cols., 1991
<i>Xiro1</i>	EcoRI	T7	Mesodermo dorsal y placa neural	Gómez-Skarmeta y cols., 1998
<i>Gbx-2</i>	HindIII	T3	Rombómero1	von Bubnoff y cols., 1995
<i>Otx-2</i>	EcoRI	T7	Cerebro anterior y medio	Blitz y Cho, 1995
<i>Pax2</i>	EcoRI	T3	Cerebro medio y placodas	Heller y Brädli, 1997
<i>En2</i>	EcoRI	T3	Cerebro medio	Hemmati-Brivanlou y cols., 1992
<i>Fgf8</i>	XbaI	T3	Organizador del istmo	Christen y Slack, 1997
<i>XWnt1</i>	HindIII	SP6	Cerebro medio	Wolda y cols., 1993
<i>XDelta1</i>	XhoI	T7	Neuronas primarias	Chitnis y cols., 1995
<i>Xsox2</i>	XbaI	T7	placa neural	Enviado por Dr. R Grainger
<i>Xslug</i>	BglII	SP6	cresta neural	Mayor y cols., 1995

Los embriones completos, explantes y/o conjugados, recolectados en los estadios señalados, fueron fijados por una hora en MEMFA. A continuación se retiró el MEMFA y se hicieron tres lavados de diez minutos con metanol 100 % para luego rehidratar con tres lavados sucesivos de cinco minutos en metanol 75%, 50% y 25% v/v. Después de lavar 3 veces durante 5 minutos con PTW se retiró el PTW y se agregó tampón de

hibridación suficiente como para cubrir los embriones que se recambió por tampón fresco luego que éstos bajarán al fondo del tubo. Se preincubó a 60°C durante 6 horas para luego someter a hibridación con las ribosondas marcadas por 16-20 hrs. Luego de la incubación con la sonda ya no se mantuvieron las precauciones respecto a las RNAsas y las soluciones usadas no contienen DEPC. El lavado de la sonda también se hizo a 60°C con incubaciones sucesivas de 10 minutos cada una con las soluciones de lavado de sonda 1,2,3 y 4. El último lavado fue de media hora en solución de lavado de sonda 5. Se continuó con 3 lavados de 5 minutos cada uno con PTW y dos lavados de 5 minutos en MAB. Luego se agregó MAB/BMBR, para bloquear los sitios inespecíficos a anticuerpos y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Al término de este período se cambió el medio por anticuerpo anti-digoxigenina 1/3000 o anti-fluoresceína 1/4000 en MAB/BMBR y se incubó a 4°C durante la noche. Posteriormente se realizaron 6 lavados de media hora cada uno con MAB para lavar el anticuerpo. Todos los lavados e incubaciones se realizaron con agitación constante. Se reveló mediante el uso de anticuerpos anti-digoxigenina o anti-fluoresceína acoplados a fosfatasa alcalina. Previo al revelado las muestras se ambientaron en solución AP con dos lavados de cinco minutos luego de los cuales se agregó una solución de BCIP/NBT en solución AP para incubar en ausencia de luz a 37°C durante el tiempo necesario. Después de revelar la hibridación *in situ* los embriones se fijaron en una solución de formaldehído al 4% en PBS durante una hora. Posteriormente se hicieron tres lavados de PBS de 5 minutos y un lavado de una hora para finalmente blanquear los embriones mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno y exposición a luz fluorescente hasta que no se observó pigmentación. En el caso de realizar una *in situ* doble se procedió a desarrollar primariamente la sonda antidigoxigenina revelando solamente con BCIP, para luego lavar 2 veces en agua destilada, incubar en metanol 100 % durante 30 min. a 60 C° y lavar 5 minutos en metanol 100%. A continuación se lavó 3 veces en MAB, se preincubó en MAB/BMBR durante 15 minutos a temperatura ambiente y se dejó en anticuerpo antifluoresceína 1/4000 en MAB/BMBR a 4° durante toda la noche. Una vez realizados los 6 lavados con MAB, seguidos por los 2 lavados en solución AP se reveló con BCIP/NBT.

Las preparaciones de embriones enteros o de cortes embebidos en parafina (secciones de 12 mm) se observaron con microscopía de luz.

2.5. Reacción de b-Galactosidasa (*b - gal*) *in situ*

En algunos experimentos se coinyectó como trazador de linaje mRNA de *b - galactosidasa (b - gal)*. Para detectar el producto de la reacción (de color turquesa) en los conjugados y embriones se procedió a retirar la membrana vitelina de los embriones en forma mecánica utilizando pinzas finas para luego fijarlos en MEMFA durante una hora. Luego se lavaron dos veces durante cinco minutos cada vez con PBS en agua DEPC y se incubaron a 37°C en ausencia de luz durante el tiempo necesario en una solución de Xgal 0,1% en tampón X-gal. Finalmente se lavaron dos veces con agua DEPC durante cinco minutos para luego fijar nuevamente en MEMFA durante una hora. A continuación se desarrolló el protocolo de hibridación *in situ*.

2.6. Inmunodetección de Myc

En alguno de los experimentos se detectó la proteína producida por el embrión al ser inyectado con el mRNA que codifica la proteína de interés. Esto se logró mediante el epítipo Myc incluido en fase en las proteínas quiméricas. Posteriormente al revelado de la hibridación *in situ* se bloqueó con MAB/BMBR por 30 minutos. Luego se retiró el bloqueador y se agregó una dilución 1/1000 del anticuerpo monoclonal anti-myc (BabCo) en MAB/BMBR, en la que los embriones fueron incubados 14-18 horas a 4°C. Luego se lavaron los embriones con MAB 4 veces por 30 minutos y se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón en dilución 1/200 en MAB/BMBR el cual se incubó por 6 horas. Completado el tiempo de incubación del anticuerpo secundario se procedió a lavar con PBS 4 veces por 30 minutos y se incubaron los embriones en DAB por 15 minutos, seguido, se adicionó a la DAB un μ L de una dilución de peróxido de hidrógeno 1/10. Se siguió la reacción bajo lupa hasta obtener la tinción deseada. La reacción fue detenida lavando 2 veces por 5 minutos con PBS y posterior fijación con solución de formaldehído en PBS.

3. Reactivos para Hibridación *in situ*

- Ácido maleico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Anticuerpo 1° anti-digoxigenina (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- Anticuerpo 1° anti-fluoreceína (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- Anticuerpo 2° anti-mouse Fb (Amersham Life Science, Little Chalfont, Inglaterra)
- Anticuerpo anti-myc (Babco, Richmond, EE.UU.)
- BCIP (Merck, Darmstadt, Alemania)
- BMBR, Boehringer Mannheim Blocking Reagent (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- Citrato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- CHAPS (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Cloruro de magnesio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- DAB (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Deoxicolato de sodio (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- EDTA (Merck, Darmstadt, Alemania)
- EGTA (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Formamida (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Heparina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

- H₂O₂ 30% (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- K₃Fe(CN)₆ (Merck, Darmstadt, Alemania)
- K₄Fe(CN)₆*3H₂O (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Alemania)
- MOPS (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- NBT (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NP-40 (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Paraformaldehido (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Polivinilpirrolidona (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- RNA de tórula (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- TRIS (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- X-gal (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Xileno (J.T.Baker, Phillipsburg, EE.UU.)

3.1. SOLUCIONES

- Agua DEPC (DEPC 0.1% $\frac{V}{V}$ en agua)
 - DIGmix: 10 mM CTP, GTP, ATP, UTP y digoxigenina 11-UTP 10 mM (Boehringer, Mannheim, Alemania)
 - Fluomix: 10 mM CTP, GTP, ATP, UTP y fluoresceína 12-UTP 10 mM (Boehringer, Mannheim, Alemania)
 - NTPmix (ATP 10 mM, CTP 10 mM, UTP 10 mM, GTP 1 mM) (Pharmacia, Uppsala, Suecia)
- Denhardt 50X (Ficoll 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1% y BSA 0,1%)
- MAB, Tampón de ácido maleico (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5)
- MAB/BMBR, (BMBR 2% en MAB)
- MEMFA (MOPS 0,1 M pH 7, EGTA 2 mM, MgSO₄ 1 mM, formaldehido 4%)
- PTW (Tween 20 0,1% en PBS 1X)
- Solución AP (TRIS 100 mM, MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 9,5)
- Solución de lavado de sonda:
 - Formamida 50%, SSC 2X, Tween 20 0,1% $\frac{V}{V}$
 - Formamida 25%, SSC 2X, Tween 20 0,1% $\frac{V}{V}$
 - Formamida 12,5%, SSC 2X, Tween 20 0,1% $\frac{V}{V}$

-
- SSC 2X, Tween 20 0,1% v/v
SSC 0,2X, Tween 20 0,1% v/v
- SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0,3 M pH 7,4)
 - Tampón de Hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, RNA de tórula 1mg/mL, Heparina 100 mg/mL, Denhardt 1X, Tween 20 0,1%, EDTA 10 mM, CHAPS 0,1%)
 - Tampón de Transcripción (Tris pH 7,6 200 mM, MgCl₂ 30 mM, espermidina 20mM, Boehringer, Mannheim, Alemania)
 - NAM (NaCl 110 mM, KCl 2 mM, Ca(NO₃)₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, NaHCO₃ 1 mM, Na₃PO₄ 2 mM pH 7,4)
 - Solución X-gal (K₃Fe(CN)₆ 20 mM, K₄Fe(CN)₆*3H₂O 20 mM, Deoxicolato de Sodio 0,01% p/v, NP-40 0,02% v/v en PBS)
 - PBS 20X (5,12 g NaH₂PO₄*H₂O, 23, 88 g Na₂HPO₄*H₂O, 204, 4 g NaCl, 800 ml H₂O destilada, pH 7,4).

RESULTADOS

1. *Xiro1* participa en el establecimiento del mesodermo dorsal en *Xenopus*

Estudios previos han mostrado que *Xiro1*, 2 y 3 se expresan en el tejido neural desde el comienzo de la gastrulación (Gómez-Skarmeta y cols., 1998; Bellefroid y cols., 1998). Durante el transcurso de esta tesis, se observó que la sobreexpresión de *Xiro1* en particular, producía embriones con fenotipos morfológicos que sugerían alteraciones en el patrón dorso-ventral del mesodermo. Este resultado nos motivó a analizar con mayor detención el patrón de expresión de *Xiro1* y su posible papel en el establecimiento del organizador de Spemann.

1.1. *Xiro1* es expresado en el organizador de Spemann y sus derivados

Mediante hibridación *in situ* detectamos, en embriones en estadio 10 (gástrula temprana), expresión de *Xiro1* en la región dorsal del mesodermo y endodermo. Esta expresión es muy débil para ser detectada en embriones completos y fue reconocible sólo al seccionar

sagitalmente embriones en dicho estadio (Figura 8A). Para determinar el territorio en el cual *Xiro1* es expresado, comparamos el patrón de expresión de *Xiro1* con el dominio de expresión observado para otros genes involucrados en el desarrollo del mesodermo dorsal. Realizamos hibridaciones *in situ* para los genes *Chordin* (*Chd*), *Goosecoid* (*Gsc*) y *Cerberus* (*Cer*) en embriones en estadio 10, los que fueron posteriormente seccionados para así comparar sus territorios de expresión con el de *Xiro1*. Observamos que *Xiro1* es expresado en la zona marginal dorsal en involución, en un dominio que esta separado del labio dorsal del blastoporo. Esta región corresponde al dominio anterior de expresión de *Chordin* y al territorio posterior en el que es posible detectar transcritos de *Goosecoid* y *Cerberus* (Figura 8B-E). La expresión mesodérmica de *Xiro1* continúa después de la gastrulación y es fácilmente detectado en la notocorda de embriones seccionados (Figura 8F), como también en los somitos de embriones en estadio 25 (Figura G y H). Ambos tejidos son derivados embrionarios del mesodermo dorsal. En estadio de larva natatoria (tailbud) la expresión de *Xiro1* puede ser detectada en el tubo neural, somitos y notocorda (Figura G y H).

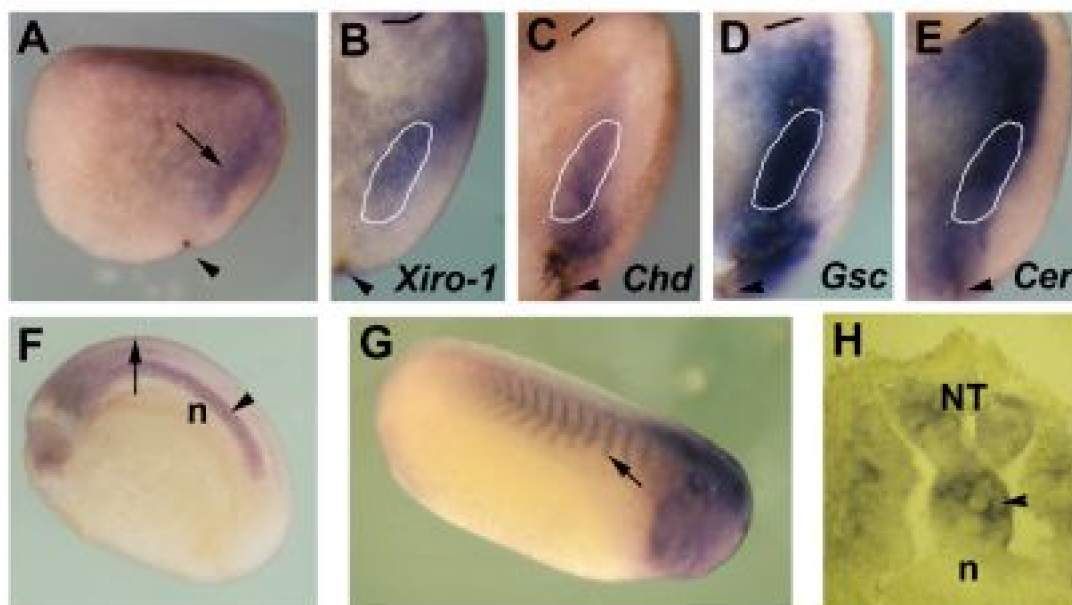


Figura 8. Patrón de expresión de *Xiro1*

(A) Secciones sagitales de embriones en estadio 10+ fueron analizadas mediante hibridación *in situ* para *Xiro1* (flecha). Punta de flecha: blastoporo. (B-E) Embriones fueron fijados en estadio 10+ y después de la hibridación *in situ* fueron seccionados en mitades para observar la expresión génica interna. El borde de la cavidad blastocélica es indicado por la línea negra (arriba); la punta de flecha indica el labio dorsal del blastoporo (abajo). (B) La expresión de *Xiro1* en la zona marginal en involución es indicada por la línea blanca; asterisco: expresión ectodérmica. (C) Expresión de *Chd*. (D) Expresión de *Gsc*. (E) Expresión de *Cer*. La expresión de *Xiro1* se indica en los tres casos (C-E) para mostrar el solapamiento con *Chd*, *Gsc* y *Cer*. (F) Después de la gastrulación, la expresión de *Xiro1* es detectada en el ectodermo (flecha), notocorda (n, punta de flecha), (sección sagital estadio 17). (G) En estadio 25, *Xiro1* se localiza en el tubo neural y puede ser fácilmente observada en los somitos (flecha). (H) Sección de un embrión de estadio 25

luego de la hibridación *in situ* para *Xiro1*. La expresión es detectada en la notocorda (punta de flecha), somitos y tubo neural (n: notocorda; NT: tubo neural).

1.2. *Xiro1* es capaz de inducir ejes secundarios y controlar el patrón del mesodermo actuando como represor transcripcional

La función de *Xiro1* fue estudiada mediante inyección de mRNAs sintetizados *in vitro* que codifican para *Xiro1* silvestre o sus distintas proteínas de fusión. Estas quimeras fueron construidas usando el dominio represor de la proteína Engrailed o la región transactivadora de la de la proteína viral VP16, los que fueron fusionados en fase con un fragmento que comprende gran parte de la región codificante de *Xiro1* (*Xiro1-En* y *Xiro1-VP16*). Otras construcciones fueron realizadas usando solo la región codificante para el homeodominio de *Xiro1* y las proteínas señaladas (ver materiales y métodos, Figura II). Inyecciones de *Xiro1*, *Xiro1-En* y *HD-GR-EnR* (o *Xiro1-En-GR*) en estadio de dos células producen ejes secundarios parciales (Figura 9A-C). La frecuencia de ejes secundarios fue mayor utilizando el sistema inducible, lo que probablemente está relacionado con la mayor estabilidad de la proteína *HD-GR-EnR* comparada con la de la proteína *Xiro1* (Tabla 3). Por otra parte, la inyección de *HD-GR-E1A* (denominado también *Xiro1-E1A-GR*) inhibe la formación de estructuras dorso-anteriores y los embriones inyectados con esta construcción carecen de ojos y otras estructuras cefálicas y presentan glándulas de cemento reducidas en tamaño (Figura 9D). Los efectos descritos para la sobreexpresión de las construcciones inducibles no fueron observados en los embriones controles crecidos en ausencia de dexametasona en el medio de cultivo.

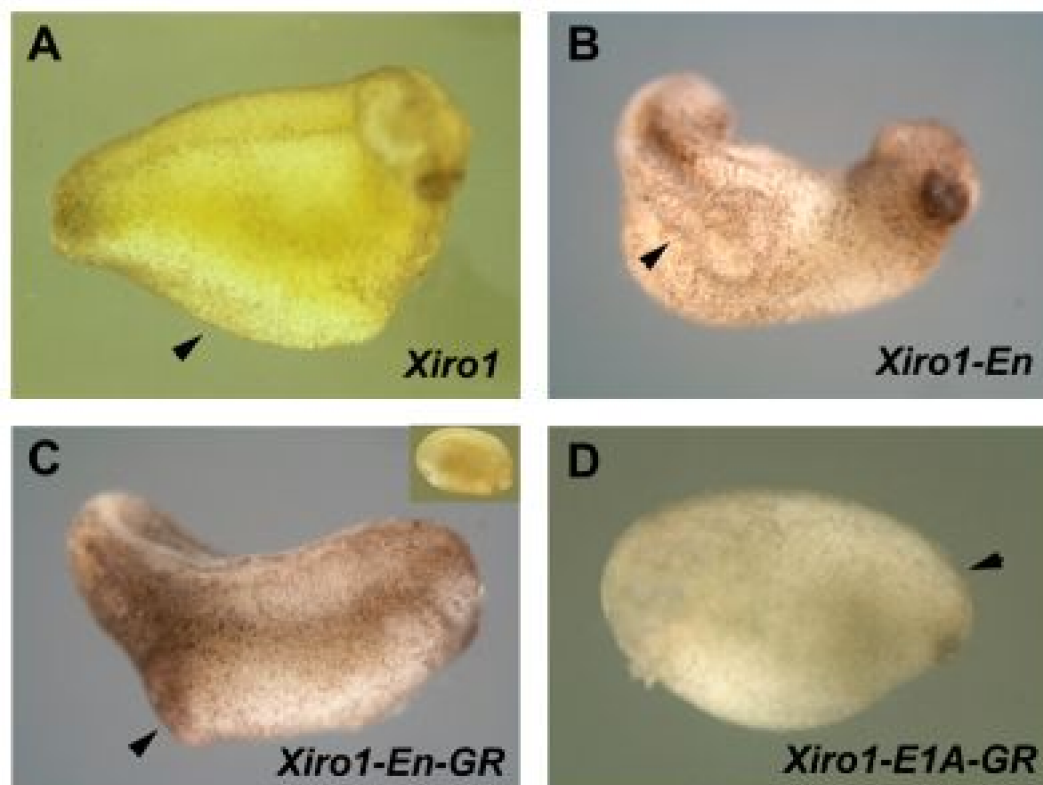


Figura 9. Fenotipos producidos por la sobreexpresión de *Xiro1* y sus construcciones

(A-C) Inyección de los mRNAs de *Xiro1* y de su fusión represora, inducible o no, en un blastómero en estadio de dos células, en la región presuntiva del mesodermo ventral produce ejes secundarios parciales (puntas de flechas). Este fenotipo fue producido en alrededor de 20% de los casos. (D) Por otra parte, la sobreexpresión de la fusión dominante activadora, en la región presuntiva del mesodermo dorsal, produce embriones carentes de ojos y con estructuras anteriores reducidas (punta de flecha). Inset en C muestra la ausencia de fenotipo en un embrión no tratado con dexametasona.

La similitud de los efectos para *Xiro1* y las construcciones represoras, inducibles o no, y el efecto opuesto para la fusión dominante activadora sugieren que *Xiro1*, probablemente se comporta como represor transcripcional en el mesodermo.

Para explicar los ejes secundarios producidos por la sobreexpresión de *Xiro1* y la fusión represora, y tomando en consideración que *Xiro1* es expresado en la región del organizador de Spemann, decidimos analizar si la expresión de los genes propios de este organizador eran afectados por estos tratamientos. Los embriones fueron inyectados con *Xiro1* o *Xiro1-En* en la región ecuatorial (mesodermo presuntivo) en uno de los blastómeros en estadio de dos células y la expresión de los genes del mesodermo dorsal, *Chordin* (*Chd*) y *Gooseoid* (*Gsc*) fue analizada en estadio de gástrula temprana (Estadio 10). La expresión ectópica de ambos transcritos produce inducción de los marcadores dorsales *Chd* y *Gsc* en territorios laterales y ventrales en la mitad inyectada del embrión (Figura 10A-D, Tabla 3). Como *Xiro1* y su fusión represora inducen la expresión de genes del mesodermo dorsal en el mesodermo ventral, investigamos el efecto de estas inyecciones sobre genes que se expresan normalmente en el mesodermo ventral. Los

embriones fueron tratados del mismo modo y la expresión de los genes ventrales, *Xvent1* y *Xwnt8*, fue analizada. Ambas inyecciones inhiben la expresión de los marcadores ventrales *Xvent1* y *Xwnt8* (Figura 10E-H). La observación que *Xiro1* y su fusión represora producen efectos similares, sugiere que *Xiro1* podría funcionar como represor en el mesodermo. Finalmente, la inducción ectópica de genes dorsales (*Chd* y *Gsc*) y represión de genes ventrales (*Xvent1* y *Xwnt8*) producidos por *Xiro1*, podrían explicar la inducción de los ejes secundarios observados en embriones que sobreexpresan este gen.

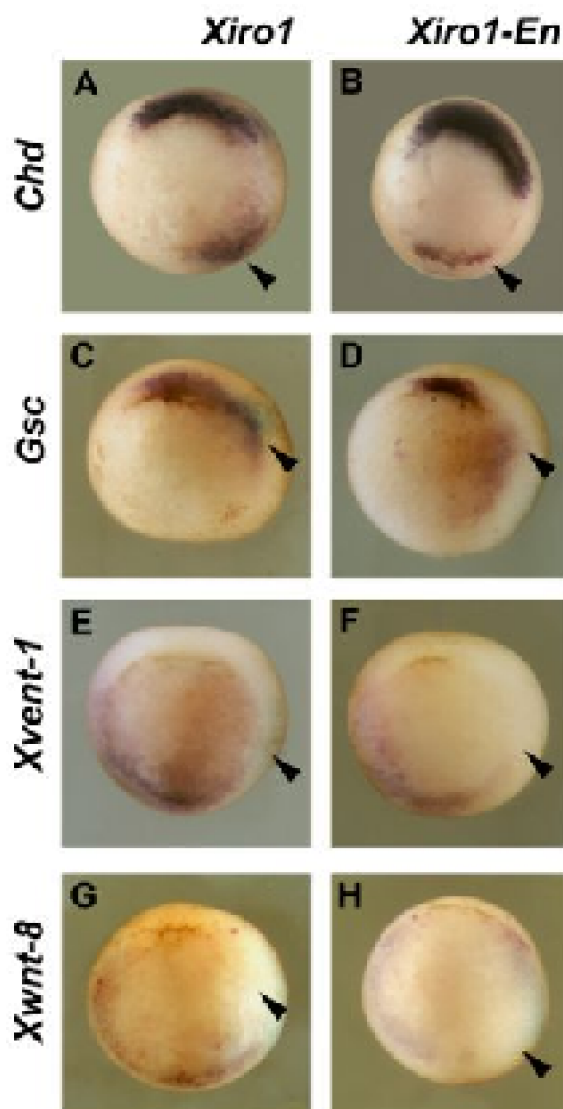


Figura10. *Xiro1* regula la expresión de genes mesodérmicos mediante represión

Al inyectar 2ng de *Xiro1*, en un blastómero en embriones en estadio de dos células en la región presuntiva del mesodermo ventral (A, C, E y G), o 2ng de *Xiro1-En* (B, D, F y H) se observa expresión ectópica de *Chordin* (A y B: puntas de flechas, A: 37% n=104 y B: 38% n=132) y *Goosecoid* (C y D: puntas de flechas, C: 34% n=95 y D: 54% n=131). Los genes ventrales son inhibidos por estos tratamientos. *Xiro1* inhibe la expresión de *Xvent1* (E) y *Xwnt8* (G) en 89% y 91% del los casos, respectivamente (E y G: puntas de flechas, E: n=162 y G: n=172), mientras que *Xiro1-En* produce el efecto inhibitorio en 92%

(F: punta de flecha, n=158) y 97% (H: punta de flecha, n=129) de los casos analizados. Todas las figuras son vistas desde el polo vegetativo, de embriones en estadio 10.25 orientados con la región dorsal hacia arriba.

Continuando con el análisis de la actividad transcripcional de *Xiro1*, evaluamos los efectos producidos por la sobreexpresión de las construcciones dominante activadoras de *Xiro1*, *Xiro1-VP16* y *HD-GR-E1A*, sobre la expresión de genes expresados normalmente en el mesodermo dorsal. La expresión de *Chordin*, *Gooseoid* y *Xlim-1* fue analizada en embriones inyectados con *Xiro1-VP16* o *Xiro1-GR-E1A*. Como la expresión de estos marcadores se localiza en la región del mesodermo dorsal, las inyecciones fueron dirigidas a la región ecuatorial de un blastómero, en el lado dorsal del embrión en estadio de dos células. La inyección de ambas construcciones inhibe la expresión de los genes *Chd*, *Gsc* y *Xlim-1* (Figura 11A-D). Los efectos similares producidos por *Xiro1* y la fusión represora (inducible o no) y los efectos opuestos generados por la sobreexpresión de las construcciones dominantes activadoras (*Xiro1-VP16* o *HD-GR-E1A*) sugieren fuertemente que *Xiro1* participa como represor de la transcripción en el establecimiento del patrón dorso-ventral del mesodermo.

Habiendo mostrado que *Xiro1* y las quimeras generadas producían efectos sobre el patrón dorso-ventral del mesodermo, evaluamos la especificidad de los fenotipos descritos, para ello realizamos experimentos de rescate. Embriones en estadio de dos células fueron inyectados en un blastómero en la región ecuatorial con *HD-GR-EnR* o una mezcla estequiométrica de *HD-GR-EnR* y *HD-GR-E1A* y posteriormente tratados con dexametasona en estadio de blástula. En ambas construcciones se incluyó el epitopo Myc, para localizar el sitio de inyección. Se analizó tanto la expresión de *Xvent1* como la aparición de ejes secundarios. Como se describió anteriormente, *HD-GR-EnR* reprime la expresión de *Xvent1* (Figura 12A) e induce ejes secundarios (Figura 12C). Sin embargo, ambos fenotipos pudieron ser revertidos al coinyectar *HD-GR-EnR* con *HD-GR-E1A* (Figura 12B y D), indicando la especificidad de los efectos descritos.

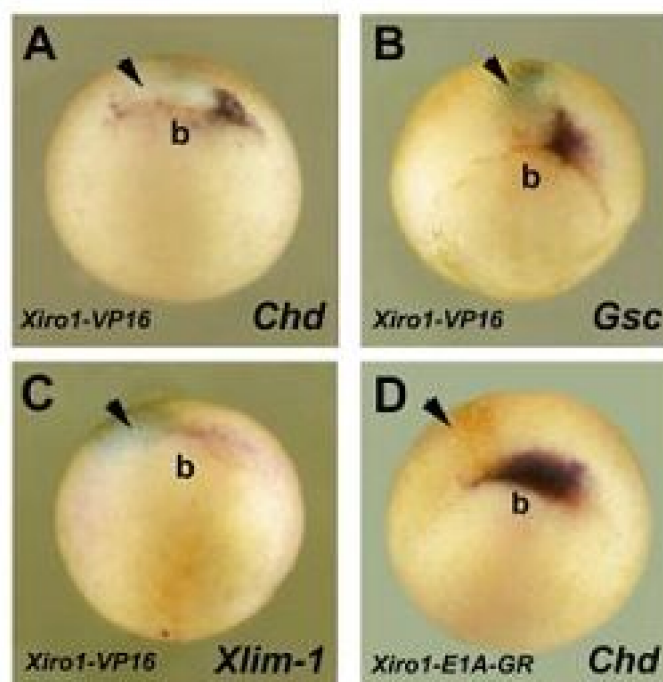


Figura 11. La proteína de fusión activadora de *Xiro1* causa represión de los genes dorsales

La sobreexpresión de 2ng de *Xiro1-VP16* en un blastómero en embriones en estadio de dos células, en la región presuntiva del mesodermo dorsal, reprime la expresión de *Chordin* (A: punta de flecha, 63% n=89), *Goosecoid* (B: punta de flecha, 60% n=62) y *Xlim-1* (C: punta de flecha, 79% n=76). La inyección dorsal de 0.5ng de *HD-GR-E1A* y posterior tratamiento con dexametasona desde estadio 5 causa la misma inhibición de la expresión de *Chordin* (D: punta de flecha, 83% n=32) y *Goosecoid* (83% n=30, dato no mostrado), b: labio dorsal del blastoporo.

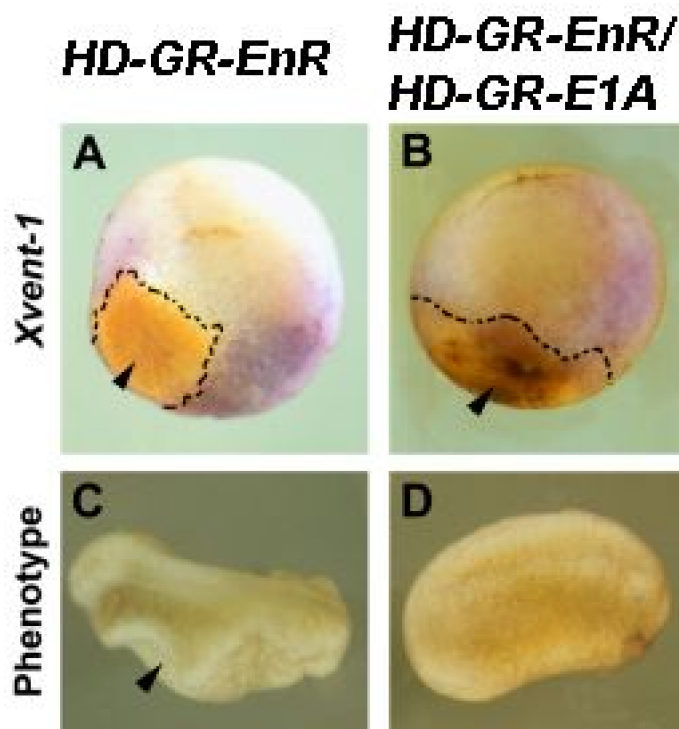


Figura 12. Los efectos de *HD-GR-EnR* son mediados por su homeodominio

La inhibición de *Xvent1* producida por la inyección de 0.5ng de *HD-GR-EnR* (A: punta de flecha, 94% n=54) puede ser revertida mediante la coinyección de una cantidad equivalente de *HD-GR-E1A* (B: punta de flecha, 22% n=119). La tinción de Myc se muestra incluida en la línea negra. El mismo resultado se obtiene al analizar la formación de ejes secundarios producidos por 0.5ng de *HD-GR-EnR* (C: punta de flecha, 37% n=30). Coinyección de cantidades iguales de *HD-GR-EnR* y *HD-GR-E1A* rescata el fenotipo de ejes secundarios parciales (D: 0% n=32).

1.3. La función de *Xiro1* depende de la expresión de *Bmp4* en el mesodermo

Ha sido demostrado que BMP-4 posee capacidad ventralizante y controla la expresión de muchos de los genes analizados en este estudio. Con el fin de investigar si *Xiro1* era capaz de reprimir la expresión de *Bmp-4*, un blastómero ventral de embriones en estadio de cuatro células fue inyectado con *Xiro1* o *Xiro1-En* y la expresión de *Bmp-4* fue analizada en estadio de gástrula temprana. Las inyecciones fueron dirigidas a la región ecuatorial o al hemisferio animal. Se observa una clara inhibición en la expresión de *Bmp-4*, tanto en el mesodermo (Figura 13A y B, Tabla 4) como en el ectodermo (Figura 13C y D), confirmando observaciones previas (Gómez-Skarmeta y cols., 2001). Como la inhibición de *Bmp-4* es capaz de dorsalizar los embriones y generar todos los efectos descritos en este análisis para la sobreexpresión de *Xiro1*, estudiamos si los efectos podían ser rescatados coinyectando *Xiro1* con el mRNA de *Bmp-4*. Los embriones fueron inyectados con *HD-GR-EnR* y tratados con dexametasona de la forma previamente

señalada, con el propósito de inhibir la expresión de *Xvent1* e inducir el desarrollo de ejes secundarios (Figura 14A y C). Al realizar la inyección de los embriones junto con transcritos de *Bmp-4*, la expresión de *Xvent1* fue rescatada y la formación de ejes secundarios inhibida (Figura 14B y D, Tabla 4). Estos resultados muestran que probablemente *Xiro1* participa en el patrón dorso-ventral del mesodermo como represor transcripcional y que la actividad dorsalizante observada en esta tesis, depende de la propiedad de *Xiro1* de reprimir la expresión de *Bmp-4* en el mesodermo.

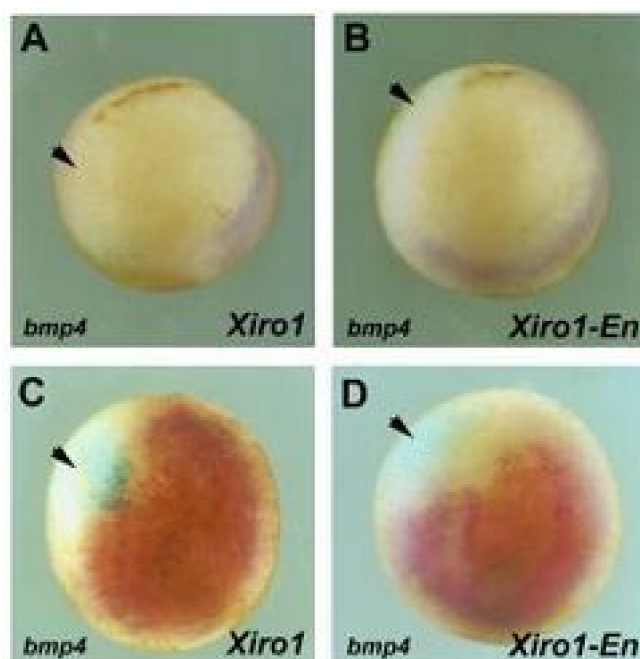


Figura 13. *Xiro1* reprime la expresión de *Bmp-4*

Los embriones fueron analizados para la expresión de *Bmp-4* (A y B: vista vegetativa; C y D vista animal). Sobreexpresión de 2ng de *Xiro1* o de *Xiro1-En*, en un blastómero de embriones en 4 células, reprime la expresión de *Bmp-4*. *Xiro1* reprime la expresión de *Bmp-4* en el mesodermo ventro-lateral y el ectodermo (A y C: puntas de flecha, 95% n=41). *Xiro1-En* se comporta de manera similar, reprimiendo la expresión de *Bmp-4* en el 98% de los casos (B y D: puntas de flecha, n=53).

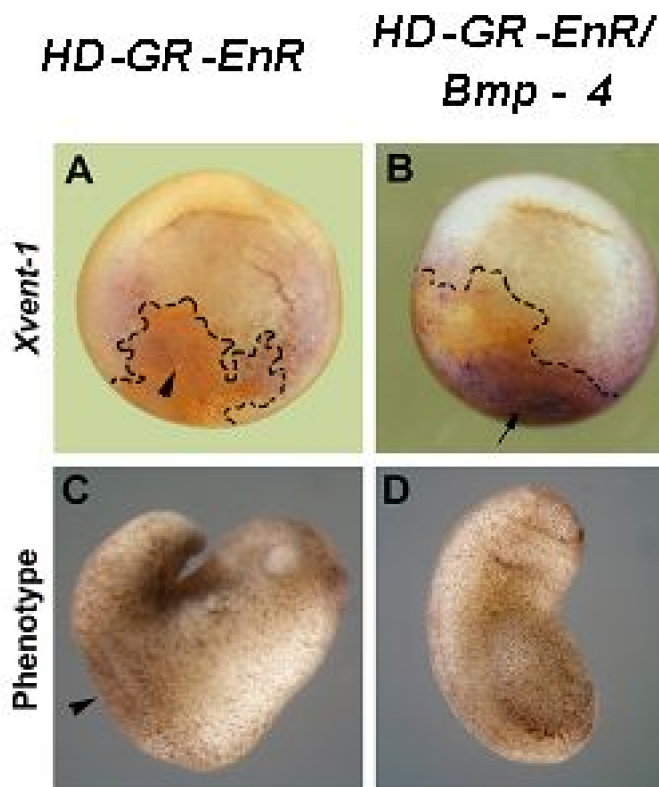


Figura 14. El fenotipo generado por HD-GR-EnR puede ser rescatado por la coinyección con Bmp-4

La inyección de 0.5ng de HD-GR-EnR en un blastómero ventral en estadio de cuatro células inhibe la expresión de *Xvent1* (A: punta de flecha, 91% n=23). La tinción de Myc ha sido marcada con la línea negra. (B) Rescate de la expresión de *Xvent1* mediante la coinyección de cantidades iguales (0.5ng) de HD-GR-EnR y Bmp-4. Flecha muestra el lugar de rescate de la expresión. Los ejes secundarios generados por la inyección de 0.5ng de HD-GR-EnR (C: punta de flecha, 37% n=30) parecen ser producto de la inhibición de Bmp-4, ya que la coinyección de Bmp-4 y HD-GR-EnR rescata el fenotipo de ejes secundarios (D, 0% n=44).

Tabla 3. Efectos de *Xiro1* sobre el patrón del mesodermo

	% de inducción (número de embriones) ^a			% de represión (número de embriones) ^a		
	Secondary Axis	<i>ishordin</i>	<i>gsc</i>	<i>Xvent-1</i>	<i>Xwnt-8</i>	<i>bmp-4</i>
<i>Xiro1</i>	23 (n=149)	37 (n=104)	34 (n=95)	89 (n=162)	91 (n=172)	95 (n=41)
<i>EnR-Xiro</i>	22 (n=44) % inhibición	38 (n=132) (número de	54 (n=131) embriones) ^b	92 (n=158)	97 (n=129)	98 (n=53)
<i>VP16-Xiro</i>	63% (n=67)	63% (n=89)	60% (n=62)	-	-	-

Las inyecciones fueron realizadas en un blastómero en estadio de 4 células en la presuntiva zona marginal ventral (a) o dorsal (b).

Tabla 4. Los efectos de *Xiro* pueden ser rescatados por su dominante negativo y por BMP-4

	% de inducción de ejes secundarios (número de embriones)	% de represión de la expresión de <i>Xvent1</i> (número de embriones)
HD-GR-EnR	35 (n=80)	92 (n=77)
HD-GR-EnR/HD-GR-E1A	0 (n=72)	22 (n=119)
HD-GR-EnR/BMP-4	0 (n=90)	17 (n=73)

2. Inducción del límite entre el cerebro medio y posterior en *Xenopus*

2.1. Expresión de los genes *Otx-2*, *Gbx-2* y *Xiro1* y su relación con el organizador del istmo en *Xenopus*

En pollo y ratón la expresión de los factores de transcripción *Otx-2* y *Gbx-2* son los primeros elementos detectados en la región presuntiva del límite entre el cerebro medio y posterior. Como primer paso en el análisis de la función de estos genes y de la homeoproteína *Xiro1*, en la inducción y posicionamiento del organizador del istmo durante el desarrollo de *Xenopus*, realizamos hibridaciones *in situ* doble de combinaciones de estos genes y marcadores moleculares del istmo. Como ha sido descrito previamente, la expresión de *Otx-2* es restringida durante la gastrulación a la región anterior del embrión (Blitz y Cho, 1995), para el final de la gastrulación, *Otx-2* se localiza en la región anterior de la placa neural, incluyendo el cerebro anterior y cerebro medio. En este momento comienza la expresión de *Gbx-2* (von Bubnoff y cols., 1995) en dos parches simétricos dentro del tejido neural, los que en su dominio anterior se superponen con células que expresan *Otx-2* (Figura 15A). Una imagen de mayor magnificación muestra una población de células mezcladas que expresan estos marcadores (Figura 15A, inset). Para mediados de la neurulación la población de células mezcladas es separada (Figura 15B) y es posible observar, en secciones, una expresión tenue y en gradiente de *Otx-2*. En los mismos embriones, *Gbx-2* es detectado en este tenue dominio de expresión de *Otx-2* (Figura 15B, inset). Finalmente, para fines de la neurulación el dominio de expresión tenue y en gradiente de *Otx-2* se restringe y el frente entre las expresiones de *Otx-2* y *Gbx-2* se hace más definido (Figura 15C e inset). Durante los estadios más tempranos analizados, *Xiro1* es coexpresado con *Otx-2* y *Gbx-2* (Figura 15D y G). El territorio de coexpresión de *Xiro1* con *Otx-2* corresponde a la región del cerebro medio presuntivo. La superposición entre el dominio más anterior de expresión de *Xiro1* y el dominio más caudal de *Otx-2* se mantiene y refina durante el desarrollo (Figura 15E y F) y es donde *En-2* es expresado (Gómez-Skarmeta y cols.,

1998). *En-2* es expresado principalmente en la región posterior del cerebro medio e incluye un pequeño dominio del territorio en que *Gbx-2* es expresado (Figura 15O y L). El dominio de coexpresión temprano de *Xiro1* y *Gbx-2* es más amplio que el territorio compartido por *Xiro1* y *Otx-2*, y parece ser más extenso que la región presuntiva del rombómero 1 (Figura 15D, G y M). Más tarde durante la neurulación los patrones de *Xiro1* y *Gbx-2* cambian drásticamente, manteniendo su colocalización en parte de la médula espinal y en el rombómero 1 (Figura 15H, I, N y O).

En el estadio de gástrula se observa claramente una población de células mezcladas expresando *Otx-2* y *Gbx-2* (Figura 15A y M). Es importante notar que en el estadio de neurula temprana, cuando comienza la transcripción de *Fgf8*, existe una tenue coexpresión de *Otx-2* y *Gbx-2* (Figura 15B y N). La expresión de *Fgf8* más temprana detectada dentro de la placa neural se superpone con el dominio en el que *Otx-2* es expresado tenuemente, dentro del territorio de expresión de *Gbx-2* (Figura 15J y N). El dominio de expresión de *Xiro1* abarca el territorio de expresión de *Fgf8* dentro de la placa neural (Figura 15K y N), y como fue mencionado anteriormente, el dominio de expresión de *Gbx-2* y la región más caudal del dominio de expresión de *Otx-2*.

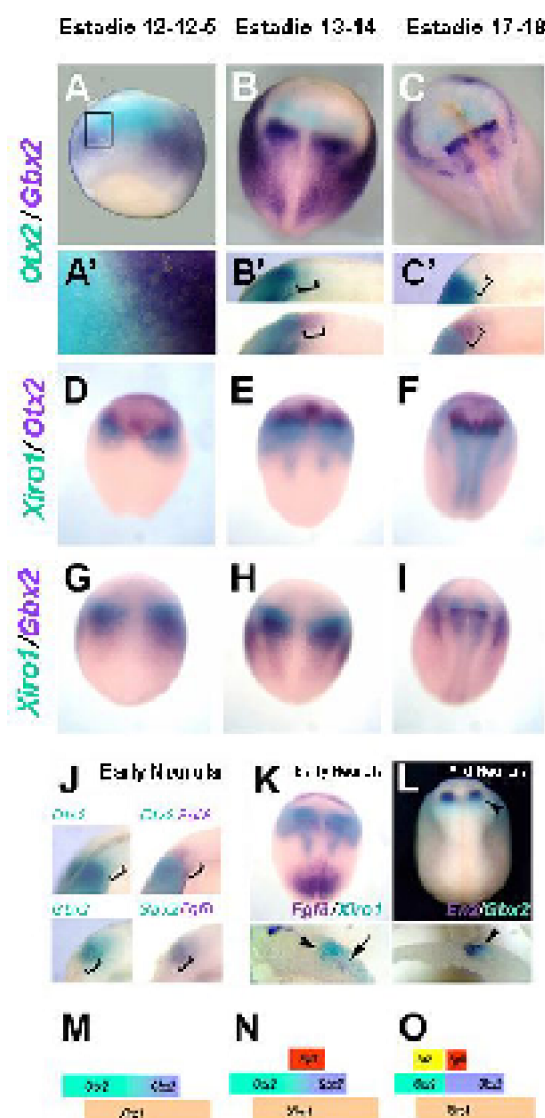


Figura 15. Comparación de la expresión de *Otx-2*, *Gbx-2* y *Xiro1*

Los embriones fueron fijados en gástrula tardía (estadio 12-12.5), neurula temprana (estadio 13-14) y neurula media (estadio 17-18) e hibridación *in situ* doble fue realizada para cada par de genes. Las imágenes son vistas dorsales con la parte anterior del embrión apuntando hacia arriba y las secciones e insets están orientados con anterior hacia la izquierda. **(A, B y C)** *Otx-2* (verde) y *Gbx-2* (púrpura) son expresados en dominios complementarios que se superponen en la región del istmo. **(A')** Magnificación del recuadro mostrado en A. Note la superposición de ambos genes. **(B',C')** Los embriones fueron seccionados sagitalmente y una doble *in situ* fue desarrollada con BCIP para *Otx-2* (verde) y en el mismo embrión *Gbx-2* fue detectado (púrpura). Note la superposición de ambos genes en neurula temprana (corchete B') que desaparece en neurula media (corchete en C'), para generar un borde preciso de expresión de *Otx-2* y *Gbx-2*. **(D, E y F)** *Otx-2* (púrpura) y *Xiro1* (celeste) se superponen en el dominio presuntivo del cerebro medio. **(G, H e I)** *Xiro1* (celeste) y *Gbx-2* (púrpura) coexpresan, casi completamente en la placa neural, con la excepción del dominio compartido por

Xiro1 y *Otx-2* y la médula espinal en neurula media.

(J) La expresión inicial de *Fgf8* en el istmo aparece en el dominio en que *Gbx-2* y *Otx-2* son coexpresados (corchetes). Esta expresión temprana precede el establecimiento del borde definido descrito para *Otx-2* y *Gbx-2*. Las imágenes son del mismo embrión después de la detección del primer gen y al finalizar la hibridación *in situ* doble, respectivamente. (K) Doble hibridación *in situ* para *Fgf8* (púrpura) y *Xiro1* (verde). La expresión de *Fgf8* está incluida en el territorio de expresión de *Xiro1* (flecha). Punta de flecha muestra el límite anterior de expresión de *Xiro1*. (L) Doble tinción para *En-2* (púrpura) y *Gbx-2* (verde). *En-2* es expresado principalmente en el dominio *Otx-2*. (M, N y O) Representación esquemática de los patrones de expresión descritos para los tres estadios analizados. Note el refinamiento en los patrones de expresión y la localización de las expresiones de *En-2* y *Fgf8*.

2.2. *Otx-2* y *Gbx-2* participan como represores en el posicionamiento del organizador del istmo

En ratón *Otx-2* y *Gbx-2* han sido implicadas en el posicionamiento del istmo. Se ha postulado que el producto de estos genes se comporta de manera antagónica, reprimiendo su transcripción de forma mutua y de esta manera generan un borde definido entre sus dominios de expresión, estableciendo así la posición donde *Fgf8* es expresado (Millet y cols., 1999; Broccoli y cols., 1999; Katahira y cols., 2000). Para examinar si ellos tiene una función en la formación del límite entre el cerebro medio y posterior en *Xenopus* y definir si participan como activadores o represores de la transcripción en esta región, fusionamos sus homeodominios con los dominios activador (E1A) o represor de la transcripción (EnR) de proteínas conocidas y comparamos los fenotipos generados por la inyección de los mRNAs correspondientes de estas construcciones (*Gbx2-E1A*, *Gbx2-EnR*, *Otx2-E1A* y *Otx2-EnR*) con los obtenidos mediante la sobreexpresión de los transcritos silvestres de *Gbx-2* y *Otx-2*. Los embriones fueron inyectados con los mRNAs señalados en un blastómero en estadio de dos células, junto con mRNA codificante para b-galactosidasa. Estos fueron fijados en estadio de neurula tardía y la expresión de varios marcadores fue analizada. La figura 16 muestra que la sobreexpresión de *Gbx-2* o *Gbx2-EnR* produce una expansión anterior en la expresión de *Xiro1*, pero su nivel de expresión se asemeja al que presenta este gen en la región de la médula espinal (Figura 16A y B). El efecto contrario se observa en los embriones inyectados con *Gbx-E1A*, donde la expresión anterior de *Xiro1* mantiene los niveles del cerebro medio pero se produce un desplazamiento caudal (Figura 16C). El análisis de la expresión de *Otx-2* mostró que la inyección de *Gbx-2* o su fusión represora (*Gbx-EnR*) mueven la expresión de este gen hacia la región anterior o eliminan su transcripción (Figura 16D y E), por el contrario la inyección de la fusión dominante activadora expande la expresión de *Otx-2* hacia la región caudal (Figura 16F). El nuevo límite creado por la sobreexpresión de *Gbx-2* o su fusión represora reposicionan la expresión de *Fgf8* hacia una región más anterior del embrión (Figura 16S y T), este desplazamiento hacia anterior fue observado también para la expresión de *En-2*, *Pax2* y *Wnt1* (Figura 16G, H, M, N, P y Q). En contraste, la sobreexpresión del mRNA de *Gbx-E1A* produce difusión y expansión hacia

posterior de la expresión de *Fgf8* (Figura 16U). Un efecto similar se observa para *En-2* y *Pax2* (Figura 16I y O), además se observa una expansión de *Wnt1* en estos embriones (Figura 16R). Por último, el marcador de las crestas neurales, *Xslug*, se expande al sobreexpresar *Gbx-2* o *Gbx-EnR* (Figura 16J y K) y disminuye o desaparece en los embriones inyectados con la fusión dominante activadora (Figura 16L).

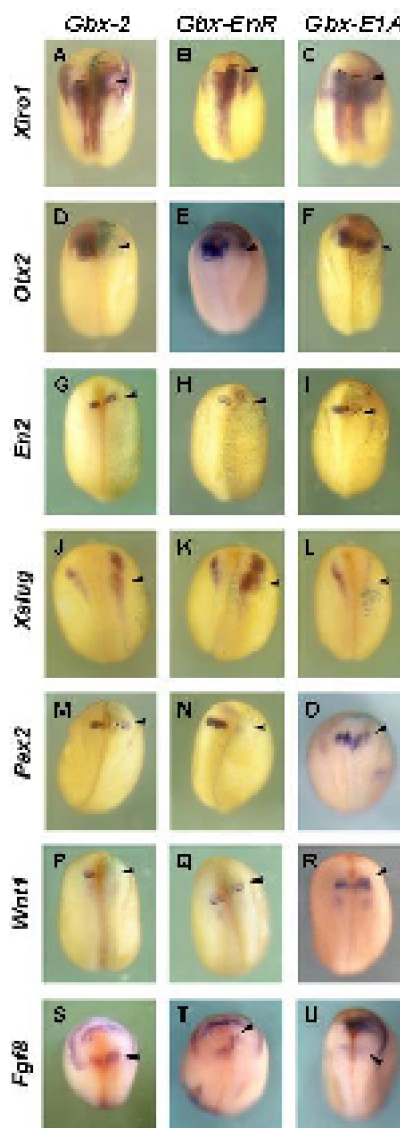


Figura 16. *Gbx-2* se comporta como represor transcripcional en el posicionamiento del organizador del istmo

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 2ng de *Gbx-2* (A, D, G, J, M, P, S), 2ng de la fusión represora de *Gbx-2* (*Gbx-EnR*) (B, E, H, K, N, Q, T) o 0.3ng de la fusión activadora de *Gbx-2* (*Gbx-E1A*) (C, F, I, L, O, R, U). La expresión de *Xiro1*, *Otx-2*, *En-2*, *Xslug*, *Pax2*, *Wnt1* y *Fgf8* fue analizada. **(A-C)** La expresión de la médula espinal de *Xiro1* es expandida hacia anterior en embriones inyectados con *Gbx-2* o su fusión represora (A y B), mientras que *Gbx-E1A* desplaza la expresión de *Xiro1* hacia posterior (C). **(D-F)** *Otx-2* es reprimido en los embriones inyectados con *Gbx-2* o *Gbx-EnR* (D y E) y es expandido caudalmente en los embriones

inyectados con la fusión activadora (F). **(G-I)** La expresión de *En-2* se desplaza en coherencia con los efectos descritos. *Gbx-2* y *Gbx-EnR* mueve su expresión rostralmente (G y H) mientras que *Gbx-E1A* disminuye la expresión de *En-2* y desplaza su expresión hacia posterior (I). **(J-L)** *Xslug* es expandido en los embriones inyectados con *Gbx-2* o *Gbx-EnR* (J y K), e inhibido en los inyectados con *Gbx-E1A* (L). **(M-O)** La expresión de *Pax2* se comporta de manera similar a lo observado para *En-2* en estos embriones. Es desplazado anteriormente y reprimido en los embriones sobreexpresando *Gbx-2* o su fusión represora (M y N) y se mueve hacia posterior en los inyectados con *Gbx-E1A*. **(P-R)** La expresión de *Wnt1* y *Fgf8* **(S-T)** siguen un patrón similar al descrito para *En-2*.

Cada experimento se realizó al menos dos veces con un número de 30 casos por experimento. El porcentaje de efecto fue cercano al 70%. Puntas de flechas muestran el efecto descrito.

Otx-2 participa como represor transcripcional en el posicionamiento del límite entre el cerebro medio y posterior, definido en función de los efectos observados en embriones inyectados con el transcrito silvestre de *Otx-2* y la construcción represora, *Otx-EnR*. Así, en embriones inyectados con el mRNA de *Otx-2* o de *Otx-EnR* se observa desplazamiento caudal o aumento en la expresión del dominio del cerebro medio de *Xiro1* (Figura 17A y B). Por otra parte, estos tratamientos reprimen y desplazan hacia posterior la expresión de *Gbx-2* (Figura 17D y E). *Pax2* y *En-2* se mueven de forma coherente hacia posterior en estos embriones (Figura 17G, H y J, K), mientras que la expresión de *Fgf8* se desplaza hacia caudal y en algunos casos desaparece de la mitad inyectada en embriones que sobreexpresan el transcrito silvestre o la construcción represora (Figura 17M y N). De manera opuesta, la sobreexpresión de *Otx-E1A* (fusión dominante activadora) extiende la expresión de la médula espinal de *Xiro1* hacia anterior (Figura 17C) y expande la expresión de *Gbx-2* hacia el cerebro anterior y disminuye su expresión (Figura 17F). *Fgf8*, *En-2* y *Pax2* son inhibidos o sus patrones de expresión se tornan difusos y se desplazan hacia anterior (Figura 17I, L y O).

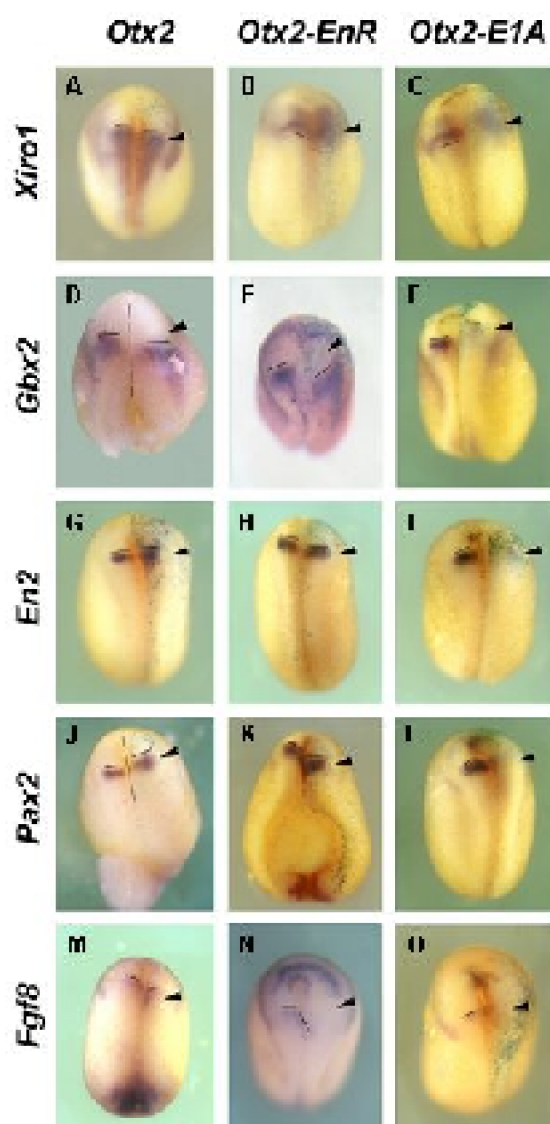


Figura 17. *Otx-2* participa como represor de la transcripción en el desarrollo del organizador del istmo

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 5ng de *Otx-2* (A, D, G, J, M), 2ng de la fusión represora de *Otx-2* (*Otx-EnR*) (B, E, H, K, N) o 1ng de la fusión activadora de *Otx-2* (*Otx-E1A*) (C, F, I, L, O). La expresión de *Xiro1*, *Gbx-2*, *En-2*, *Pax2* y *Fgf8* fue analizada en estadio de neurula media. **(A-C)** La expresión de *Xiro1* es expandida y desplazada hacia posterior en los embriones inyectados con *Otx-2* o *Otx-EnR* (A y B) mientras que se mueve hacia anterior y difumina en los embriones inyectados con la fusión activadora (C). **(D-F)** *Gbx-2* es desplazado caudalmente en los embriones inyectados con *Otx-2* y la fusión represora (D y E). *Otx-E1A* disminuye y mueve la expresión de *Gbx-2* hacia anterior (F). **(G-I)** El nuevo límite creado por la sobreexpresión de transcritos de *Otx-2* o *Otx-EnR* reposiciona caudalmente la expresión de *En-2* (G y H), por otra parte la expresión de la fusión dominante activadora reduce y desplaza rostralmente la expresión de *En-2* (I). **(J-L)** La sobreexpresión de *Otx-2* y de la fusión represora desplazan la expresión de *Pax2*

caudalmente (J y K), mientras que la inyección de la fusión activadora de *Otx-2* disminuye y desplaza rostralmente la expresión de *Pax2* (L). **(M-O)** *Fgf8* se comporta de manera similar en los embriones inyectados con estas construcciones.

Cada experimento se realizó al menos dos veces con un número de 30 casos por experimento. El porcentaje de efecto fue cercano al 70%. Puntas de flechas muestran el efecto descrito.

2.2.1. Análisis del papel de *Otx-2* y *Gbx-2* en el posicionamiento del organizador del istmo mediante fusiones inducibles

Al inyectar mRNAs en embriones de *Xenopus* se produce traducción inmediata de ellos, esto lleva a la acumulación de las proteínas para las cuales codifican, las que pueden, incorrectamente, actuar en otros momentos del desarrollo embrionario. Tomando en consideración esta posibilidad se diseñaron fusiones inducibles (ver materiales y métodos, Figura II). En ellas se incluyó los homeodominos de los genes en estudio, las regiones activadoras o represoras transcripcionales previamente mencionadas y el dominio de unión a esteroides del receptor de glucocorticoide humano. Este dominio se une a la proteína HSP90 y de esta manera es retenida en el citoplasma de las células. En el momento del desarrollo embrionario en el cual se desea evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen de interés se agrega dexametasona al medio de cultivo. Esto lleva a un cambio conformacional del dominio de unión a esteroides que libera la proteína sobreexpresada de la interacción con HSP90, permitiendo su traslocación al núcleo de la célula y consecuente activación o represión de sus genes blancos (Figura 18).

La activación en estadio de gástrula tardía de la fusión represora inducible de *Gbx-2* (*Gbx-GR-EnR*) produce desplazamiento hacia anterior en la expresión del cerebro medio de *Xiro1* y restricción de la expresión de *Otx-2* (Figura 19A y C), un desplazamiento similar se observa en la expresión de *En-2* (Figura 19E). De forma contraria, la sobreexpresión de una forma dominante negativa de la función de *Gbx-2* (*Gbx-GR*) mueve las expresiones de *Xiro1*, *Otx-2* y *En-2* hacia posterior (Figura 19B, D y F). Finalmente, *Xslug* es expandido, de manera similar a lo provocado por *Gbx-2*, al activar la construcción represora inducible en estadio de gástrula tardía (Figura 19G) y es reprimida su expresión en embriones que sobreexpresan la fusión dominante negativo y que fueron activados del mismo modo (Figura 19H). Así, *Gbx-2* participa en el posicionamiento del organizador del istmo como represor transcripcional en estadio de gástrula tardía.

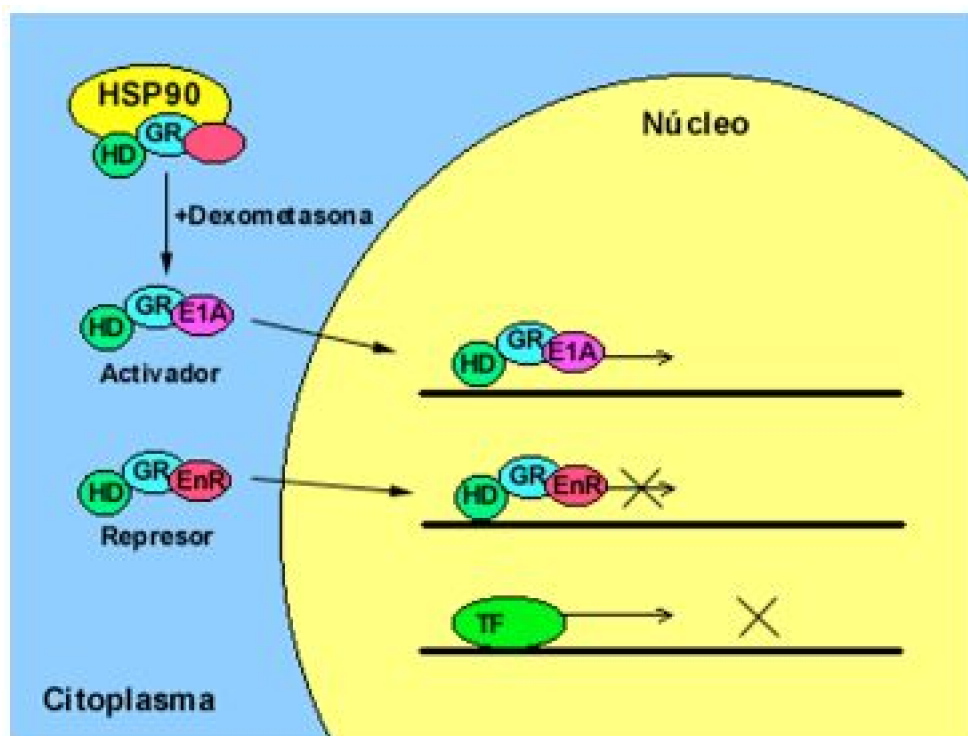


Figura 18. Esquema del funcionamiento de las construcciones inducibles

Las construcciones son transcritas *in vitro* a partir de los cDNA linearizados. Los RNAs resultantes son inyectados en los embriones de *Xenopus* en el estadio deseado. Dentro del embrión los RNAs son traducidos, el modulo GR (región de la proteína que le confiere unión a glucocorticoides), interactúa en el citoplasma con la proteína HSP90. Así, la proteína de fusión es retenida y no puede unirse a los genes blancos. En un momento particular del desarrollo, los embriones son transferidos a un medio de cultivo suplementado con dexametasona. Esta hormona se une al sitio GR de la proteína de fusión permitiendo que se desplace del citoplasma de la célula al núcleo, aquí se une a los genes blanco, activando o inhibiendo la expresión de ellos según sea el caso. Los fenotipos obtenidos usando las fusiones son comparados con los producidos por la sobreexpresión del transcrito silvestre (TF), permitiendo definir la actividad transcripcional del factor de transcripción (TF).

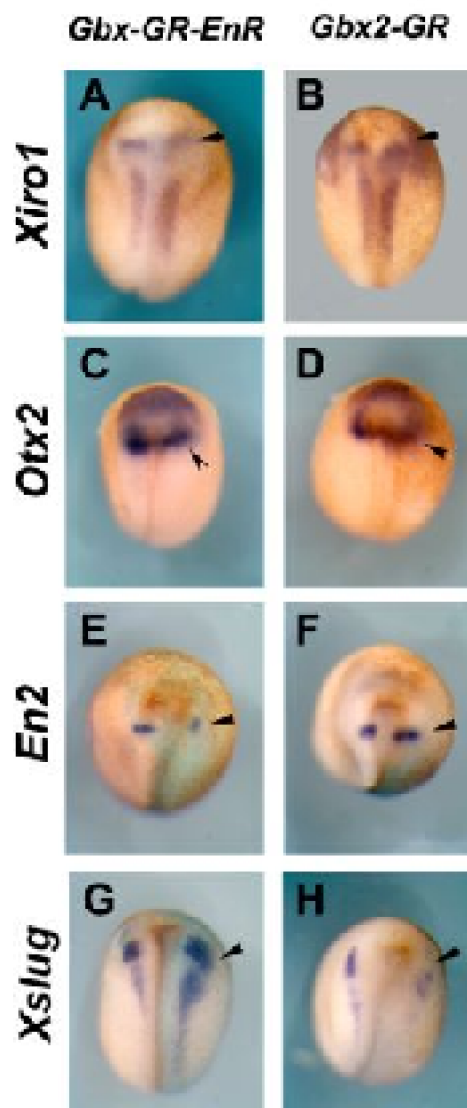


Figura 19. Análisis de la función tardía de *Gbx-2* mediante fusiones inducibles

Los embriones fueron inyectados en un blastómero, en estadio de dos células, con 1ng de *Gbx-GR-EnR* (A, C, E, G) o 1ng de la fusión dominante negativa inducible de *Gbx-2* (*Gbx-GR*) (B, D, F, H). Se indujo la actividad de las construcciones en estadio de gástrula tardía transfiriendo los embriones a medio de cultivo con dexametasona. La expresión de *Xiro1*, *Otx-2*, *En-2* y *Xslug* fue analizada en estadio de neurula media. (A, B) La expresión del cerebro medio de *Xiro1* disminuye y es desplazada anteriormente en los embriones que sobreexpresan la fusión represora inducible (*Gbx-GR-ER*, A), mientras que se expande y desplaza caudalmente en los embriones inyectados con la fusión dominante negativo (*Gbx-GR*, B). (C, D) La expresión de *Otx-2* se restringe hacia anterior en los embriones inyectados con la fusión represora inducible (C) y se expande hacia posterior en los inyectados con *Gbx-GR* (D). (E, F) La expresión de *En-2* se reposiciona producto del nuevo límite inducido. *En-2* es inhibido y desplazado hacia anterior al sobreexpresar la construcción represora inducible de *Gbx-2* (E) y se mueve hacia posterior y expande al inhibir la función de *Gbx-2* (*Gbx-GR*, F). (G, H) Por último, *Xslug* es

expandido en los embriones inyectados con *Gbx-GR-EnR* (G), e inhibido en los embriones inyectados con *Gbx-GR* (H). Las puntas de flecha muestran el efecto descrito. Cada experimento fue realizado dos veces con al menos 45 embriones. El efecto descrito se observó en cerca del 75% de los casos.

Utilizando una estrategia similar se examinó el papel de *Otx-2* en el desarrollo del límite entre el cerebro medio y posterior. La inyección de *Otx-GR-EnR* en un blastómero en estadio de dos células e inducido durante gástrula tardía desplaza la expresión de *Xiro1* caudalmente (Figura 20A). *Gbx-2* también es desplazado hacia posterior y se observa además disminución de su expresión en la placa neural (Figura 20C). Los marcadores propios del istmo, *Fgf8*, *En-2* y *Pax2* se desplazan o expanden hacia posterior como consecuencia del nuevo límite creado entre *Gbx-2* y la función *Otx-2* ectópica (Figura 20F, I y L). De forma opuesta, la sobreexpresión de moléculas que antagonizan la función de *Otx-2* (*Otx-GR-E1A* y *Otx-GR*) mueven el límite anterior de expresión de *Gbx-2* rostralmente, observándose un aumento leve en su expresión (Figura 20D y E). El desplazamiento en dirección opuesta de *Gbx-2* en el embrión reposiciona la expresión de *Fgf8*, *En-2* y *Pax2* en una región más anterior (Figura 20G, H, J, K y M, N). Estos resultados confirman el papel de *Otx-2* en el posicionamiento del istmo y muestran que *Otx-2* controla, como represor durante el estadio de gástrula tardía, el límite anterior de expresión de *Gbx-2* y posiblemente de esta manera la posición del organizador del istmo.

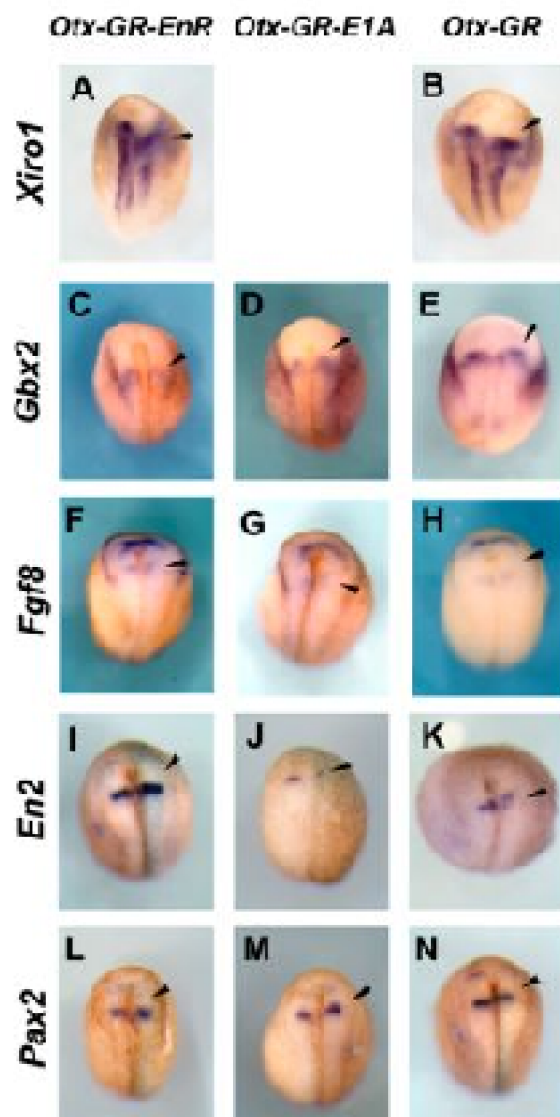


Figura 20. Análisis de la función tardía de *Otx-2* mediante fusiones inducibles

Los embriones fueron inyectados en un blastómero, en estadio de dos células, con 1ng de *Otx-GR-EnR* (A, C, F, I, L), 1ng de la fusión dominante activadora inducible de *Otx-2* (*Otx-GR-E1A*) (D, G, J, M) o 1ng de la fusión dominante negativo inducible (*Otx-GR*) (B, E, H, K, N). Se indujo la actividad de las construcciones en estadio de gástrula tardía (estadio 12.5), transfiriendo los embriones a medio de cultivo con dexametasona. La expresión de *Xiro1*, *Gbx-2*, *Fgf8*, *En-2* y *Pax2* fue analizada en estadio de neurula media. (A, B) La expresión del cerebro medio de *Xiro1* es desplaza caudalmente y se difumina en los embriones inyectados con *Otx-GR-EnR* (A). La inyección de *Otx-GR*, por otra parte, pierde su patrón y se desplaza hacia posterior (B). (C-E) *Gbx-2* es inhibido y desplazado caudalmente en los embriones que sobreexpresan la fusión represora inducible (C) y se expande anteriormente en los embriones que sobreexpresan las fusiones que bloquean la función de *Otx-2* (*Otx-GR-E1A* y *Otx-GR*, D y E respectivamente). (F-H) La expresión de *Fgf8* se desplaza hacia caudal y se mueve hacia rostral producto de las inyecciones de *Otx-GR-EnR* (F) y las fusiones que bloquean

la acción de *Otx-2* respectivamente (G y H). **(I-K)** *En-2* y *Pax2* **(L-N)** se comportan de forma similar. La expresión de estos genes se reposiciona como consecuencia del desplazamiento de *Gbx-2* y *Fgf8* de los embriones inyectados con las construcciones de *Otx-2*.

Las puntas de flecha muestran la mitad inyectada. Cada experimento fue realizado dos veces con al menos 30 embriones para cada caso. El efecto descrito se observó en cerca del 65% de los embriones analizados.

2.3. La interacción de células expresando *Otx-2* y *Gbx-2* es suficiente para inducir el organizador del istmo

Resultados de experimentos en pollo han mostrado que trasplantes de rombómero 1 o de tejido electroporado con un vector que expresa *Gbx-2* induce un organizador del istmo ectópico al ser transplantado en el dominio de expresión de *Otx-2* (Marin y Puelles, 1994; Katahira y cols., 2000). Analizamos si la interacción de tejidos sobreexpresando *Otx-2* y *Gbx-2* era suficiente para inducir marcadores del istmo. Embriones fueron inyectados con mRNA silvestres para *Otx-2* o *Gbx2* y crecidos hasta estadio 10, cuando los hemisferios animales fueron explantados y conjugados. La inyección de *Otx-2* o *Gbx-2* no produce expresión de los marcadores del istmo cuando estos explantes ectodérmicos son cultivados por separado (dato no mostrado) o cuando son conjugados con hemisferios animales explantados de embriones no inyectados (Figura 21A y B). Sin embargo, cuando los hemisferios animales inyectados con estos transcritos son conjugados y crecidos hasta estadio de neurula la expresión de *Fgf8*, *En-2* y *Wnt1* es inducida (Figura 21C, D y E). *Pax2* no fue detectado en estos conjugados (dato no mostrado). En la figura 21C el tejido expresando *Otx-2* fue coinyectado con mRNA para b-galactosidasa como marcador de linaje celular, esto nos permitió definir que la expresión de *Fgf8* aparece en el tejido expresando *Gbx-2*. En la figura 21D el hemisferio expresando *Gbx-2* fue coinyectado con mRNA para b-galactosidasa, así la expresión de *En-2* ocurre en el tejido que expresa *Otx-2*. La inducción observada para *Fgf8*, *En-2* y *Wnt1* necesariamente es dependiente de la interacción entre los tejidos expresando *Otx-2* y *Gbx-2* ya que, como se mencionó anteriormente, al conjugar estos tejidos con tejido control no existe inducción (Figura 21A y B). Utilizamos este ensayo *in vitro* para determinar si la señal FGF era requerida de manera directa en las células que expresan *Otx-2* o es necesaria en el tejido que expresa *Gbx-2* para inducir otra molécula de relevo que induce directamente la expresión de *En-2* en la región *Otx-2* positiva. Con este propósito coexpresamos *Otx-2* o *Gbx-2* con una forma dominante negativo del receptor de FGF (XFD, Amaya y cols. 1991) que carece del dominio intracelular, conjugamos estos tejidos ectodérmicos con hemisferios animales inyectados con *Gbx-2* y *Otx-2* respectivamente y analizamos la capacidad de estos conjugados de inducir la expresión de *En-2*. Las figuras 21F y 21G muestran que la inducción de *En-2* es completamente inhibida al bloquear la señal FGF específicamente en el territorio *Otx-2*, pero no se afecta cuando esta vía de señalización (FGF) es bloqueada en el tejido que expresa *Gbx-2*. Esto indica que la inducción de *En-2* es promovida por la activación de la vía FGF en las células *Otx-2* positivas, probablemente causada por las moléculas de FGF8 producidas en el hemisferio animal

que expresa *Gbx-2*. Más aún, observamos que el bloqueo de la señal FGF en el tejido *Otx-2* impide la inducción de *Fgf8* y *Wnt1* (Figura 21H e I). Por el contrario, al bloquear la señal de ácido retinoico en estos conjugados, usando una forma dominante negativa de su receptor (*dnRAR*), específicamente en el tejido *Otx-2*, la inducción de *Wnt1* no es inhibida (Figura 21J). Además, para investigar el posible efecto inhibitorio de *Gbx-2* sobre genes mesencefálicos realizamos conjugados de ectodermos expresando *Otx-2* y *Gbx-2* y tejido expresando *Gbx-2*. *Gbx-2* es capaz de inhibir la inducción de *En-2* en estos conjugados (Figura 21K). Finalmente, en los conjugados se analizó la inducción del gen *Delta1*. *Delta* participa en neurogénesis y en la segmentación de los somitos durante el desarrollo embrionario y ha sido demostrado que es inducido por FGF (Hardcastle y cols., 2000). En conjugados *Otx-2/Gbx-2* detectamos expresión de *Delta*, particularmente en el tejido expresando *Otx-2* (Figura 21M). Por último, como control, determinamos si en conjugados de tejido expresando *Otx-2* y tejido control se activaba la expresión de *Gbx-2*, no observamos inducción de este gen en estas condiciones (Figura 21L).

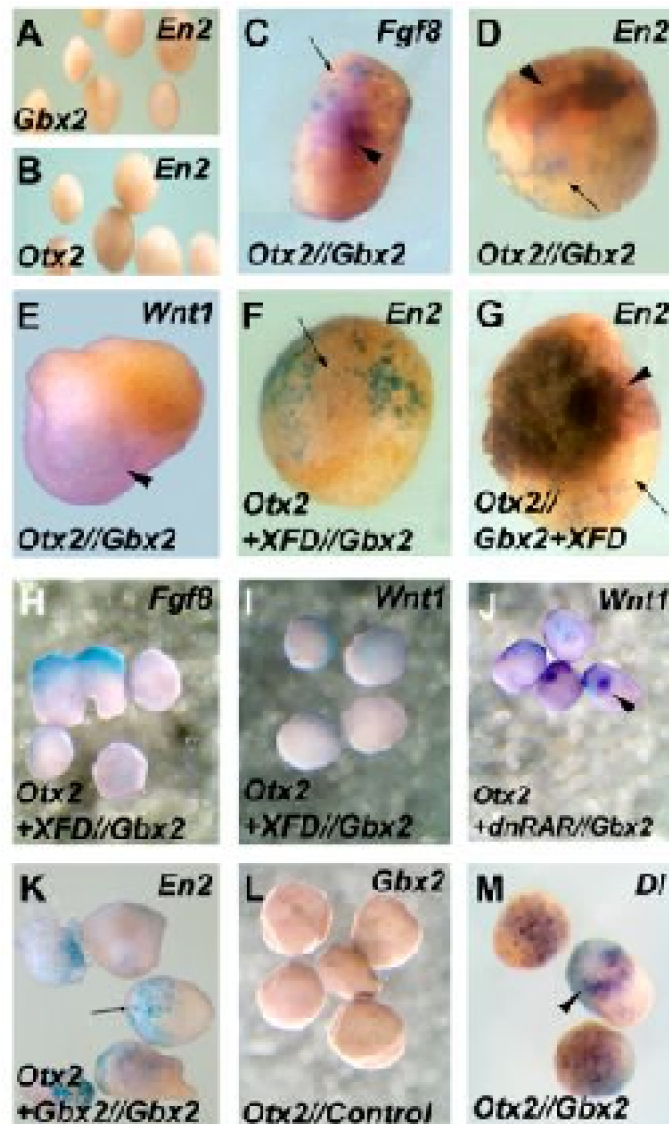


Figura 21. La interacción entre *Otx-2* y *Gbx-2* induce el istmo

Embriones fueron inyectados en estadio de una célula con 5ng de *Otx-2*, 2ng de *Gbx-2* o en combinación con 0.3ng de β -galactosidasa, 1ng del receptor mutado de FGF (*XFD*) o 1ng del dominante negativo del receptor de ácido retinoico (*dnRAR*). Los hemisferios animales fueron disectados en estadio 10 y cultivados como conjugados. **(A,B)** No se detectó expresión de *Fgf8* en conjugados en estadio de neurula tardía de hemisferios animales control conjugados con tejido ectodérmico expresando *Otx-2* (A, 0% n=20) o *Gbx-2* (B, 0% n=23). **(C, D, E, M)** Conjugados realizados en estadio 10 de hemisferios expresando *Otx-2* y *Gbx-2* inducen la expresión de *Fgf8* (C, 69% n=45), *En-2* (D, 93% n=119), *Wnt1* (E, 65% n=17) y *Delta1* (M, 73% n=18) (puntas de flechas). β -galactosidasa (flecha) fue coinyectada en el hemisferio *Otx-2* (C) o en el hemisferio *Gbx-2* (D). *Fgf8* fue inducido en el tejido *Gbx-2* y *En-2* en el que expresa *Otx-2*. **(F, H, I)** Conjugados de tejido expresando *Otx-2+XFD* y ectodermo que expresa *Gbx-2*. La inducción de *Fgf8* (H), *En-2* (F) y *Wnt1* (I) es bloqueada en el hemisferio *Otx-2* cuando se coinyecta el receptor mutado de FGF (la flecha en F muestra la tinción X-gal en el tejido inyectado con *Otx-2+XFD*, 22% de expresión de *En-2* n=37, 5% n=20 para *Fgf8* y 0% n=12 para *Wnt1*). **(G)** Conjugado de tejidos *Otx-2* y *Gbx-2+XFD*. La coinyección de *XFD* en el hemisferio *Gbx-2* no inhibe la inducción de *En-2* (punta de flecha 95% n=47). Flecha en (G) indica la tinción X-gal en el tejido expresando *Gbx-2+XFD*. **(J)** La expresión de *Wnt1* no es bloqueada en conjugados de ectodermo inyectado con *Gbx-2* y tejido expresando *Otx-2+dnRAR* (punta de flecha, 52% n=13). **(K)** Conjugado de hemisferios *Otx-2+Gbx-2* y *Gbx-2*. La coinyección de *Gbx-2* en el hemisferio *Otx-2* inhibe la inducción de *En-2* (8% n=23). La flecha muestra la tinción X-gal en el tejido inyectado con *Otx-2+Gbx-2*. **(L)** No existe inducción de *Gbx-2* en conjugados de hemisferios animales control e inyectados con *Otx-2* (0% n=19).

3. *Xiro1* participa en el posicionamiento del organizador del istmo

En *Xenopus*, la expresión de *Xiro1* precede la expresión de *Gbx-2*, la cual aparece dentro del territorio de *Xiro1*, y se superpone con el dominio de expresión del cerebro medio de *Otx-2*. Esto nos impulsó a examinar si *Xiro1* participaba en la formación del límite entre el cerebro medio y posterior. Para realizar esto, analizamos el efecto de sobreexpresar los mRNAs para *Xiro1* y sus construcciones derivadas sobre el desarrollo del organizador del istmo en estadio de neurula temprana, cuando el organizador comienza a establecerse y en estadio de neurula media, cuando el límite entre el cerebro medio y posterior se ha refinado y alcanzado su configuración final. La inyección de *Xiro1* incrementa la expresión de *Gbx-2* y desplaza posteriormente su límite rostral. De la misma manera, el dominio de expresión del cerebro medio de *Otx-2* se mueve a una posición más caudal (Figura 22A, D y 23B, A). Además, en los estadios analizados, la expresión de *Pax2* se expande y desplaza caudalmente en los embriones inyectados con el mRNA para *Xiro1* (Figura 22J y 23C). Desplazamiento posterior también fue observado para *Fgf8* (Figura 22G). Esto indica que *Xiro1* podría participar en los eventos iniciales durante el establecimiento del

istmo, a través de la activación de *Gbx-2*, pero también podría modular la expresión de *Otx-2* y *Pax2*.

Estudios previos han implicado a *Xiro1* en la represión de *Bmp-4* en la placa neural y en el mesodermo dorsal durante la gastrulación (Gómez-Skarmeta y cols., 2001; Glavic y cols., 2001). Así, los efectos de la sobreexpresión de *Xiro1* sobre *Gbx-2* y *Otx-2* podría ser consecuencia indirecta de alteraciones tempranas del mesodermo, que posteriormente se traducen en modificaciones en el patrón de la placa neural. Para evitar estos efectos tempranos, usamos quimeras inducibles de *Xiro1*. Ha sido mostrado previamente que la sobreexpresión del homeodominio de *Xiro1* fusionado a un modulo inducible y al dominio represor EnR (*HD-GR-EnR*) produce efectos similares a los producidos por la sobreexpresión del transcrito silvestre para *Xiro1*. En contraste, la sobreexpresión de una fusión similar, sin modulo transcripcional (*HD-GR*) o con un dominio activador (*HD-GR-E1A*) interfiere con la función de *Xiro1* (Gómez-Skarmeta y cols., 2001; Glavic y cols., 2001). Estas construcciones nos permiten modificar la función de *Xiro1* en diferentes momentos durante el desarrollo embrionario, cuando el tejido neural y el mesodermo han sido ya especificados. De hecho, embriones inyectados con estos RNAs no muestran ninguna alteración en la expresión del marcador general de placa neural *Xsox-2*, cuando los derivados de *Xiro1* son activados en estadio de gástrula tardía o neurula temprana (dato no mostrado).

Cuando la proteína *HD-GR-EnR* es inducida en estadio de gástrula tardía, la expresión de *Gbx-2* aumenta, pero al contrario de lo producido por *Xiro1*, su límite rostral de expresión se desplaza hacia anterior (Figura 22B). Más aún, la expresión de *Otx-2* es desplazada hacia rostral más que ser expandido posteriormente (Figura 22E) y la expresión de *Fgf8* en el dominio del organizador del istmo es expandida hacia anterior (Figura 22H). Del mismo modo, la expresión de *Pax2* es desplazada anteriormente (Figura 22K). En el caso de la sobreexpresión de *HD-GR-E1A*, el efecto opuesto fue observado, inhibición de *Gbx-2* y expansión caudal del dominio de expresión de *Otx-2* (Figura 22C y F). Note que la inhibición de la función de *Xiro1*, usando *HD-GR-E1A*, completamente reprime la expresión de *Fgf8* (Figura 22I) y disminuye y mueve posteriormente la expresión de *Pax2* (Figura 22L) y *En-2* (dato no mostrado). Las diferencias observadas para el límite posterior y anterior de *Otx-2* y *Gbx-2* respectivamente, en embriones inyectados con *Xiro1* y *HD-GR-EnR* podría ser consecuencia de un requerimiento temprano de *Xiro1* para la expresión de *Otx-2*, el que no se observa cuando la construcción inducible es activada en estadio de gástrula tardía o neurula temprana. De hecho, *Xiro1* es necesario para la formación de la placa neural y es capaz de activar *Otx-2* en tejido ectodérmico que sobreexpresa *Xiro1* (Gómez-Skarmeta y cols., 2001).

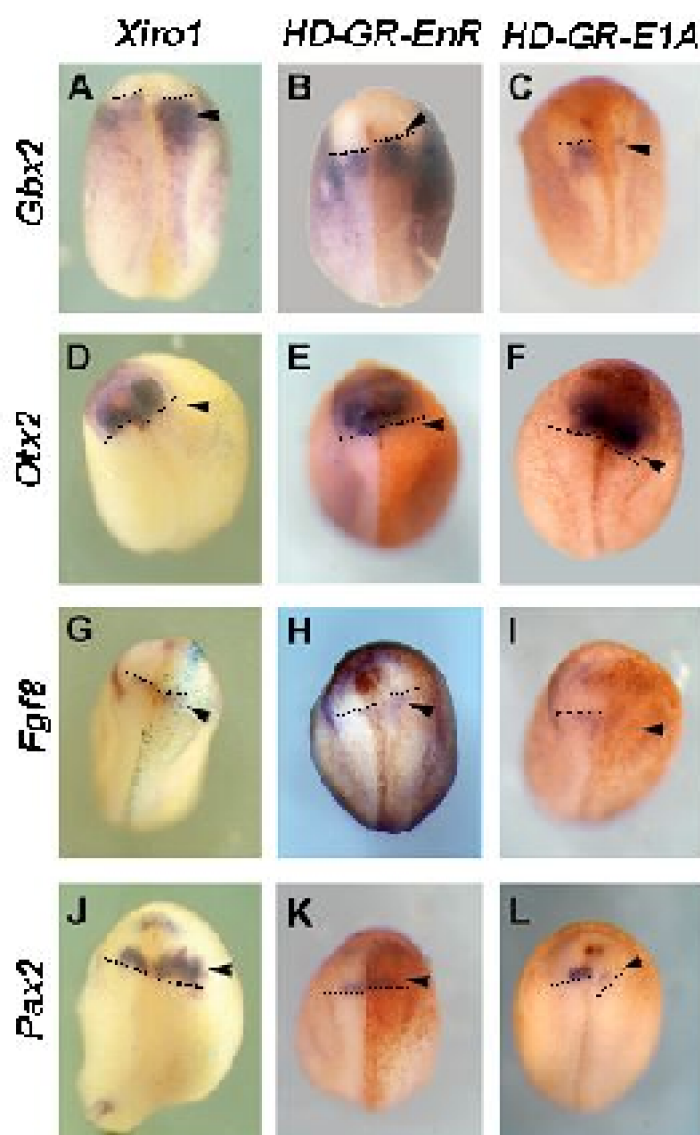


Figura 22. *Xiro1* participa en el posicionamiento del organizador del istmo.

Se inyectaron embriones en un blastómero en estadio de dos células con 2ng de mRNA de *Xiro1* (A,D,G, J), 0.5ng de *HD-GR-EnR* (B,E,H,K) o de *HD-GR-E1A* (C,F,I,L) las construcciones inducibles fueron inducidas alrededor del estadio 12.5. La mitad inyectada es marcada por la tinción X-gal para el caso de *Xiro1*. En el caso de las fusiones inducibles la región inyectada fue detectada mediante inmunodetección de Myc. **(A)** La sobreexpresión de *Xiro1* promueve expansión y desplazamiento caudal de *Gbx-2*. **(B)** El mRNA de *HD-GR-EnR* causa la expansión y el movimiento hacia anterior de la expresión de *Gbx-2*. **(C)** *Gbx-2* es reprimido en los embriones inyectados con *HD-GR-E1A*. **(D)** En embriones inyectados con el mRNA de *Xiro1* el dominio del cerebro medio de *Otx-2* se extiende caudalmente. **(E)** Sin embargo, la inyección de *HD-GR-EnR* causa desplazamiento hacia anterior del dominio de expresión de *Otx-2*. **(F)** *Otx-2* muestra una expansión caudal cuando el mRNA para *HD-GR-E1A* es sobreexpresado. **(G)** La expresión de *Fgf8* se mueve posteriormente en los embriones inyectados con *Xiro1*. **(H)** La sobreexpresión de *HD-GR-EnR* promueve expansión y desplazamiento hacia anterior del

dominio del istmo de *Fgf8*. **(I)** Este dominio es reprimido en los embriones inyectados con *HD-GR-E1A*. **(J)** *Pax2* se expande en embriones inyectados con el mRNA para *Xiro1*. **(K)** La inyección del mRNA para *HD-GR-EnR* produce desplazamiento hacia anterior de la expresión de *Pax2*. **(L)** *Pax2* se reprime y se mueve hacia caudal en los embriones inyectados con *HD-GR-E1A*. Las líneas punteadas muestran los efectos descritos. Las puntas de flecha apuntan a los lados inyectados.

Cada experimento se realizó dos veces con un mínimo de 45 embriones. El porcentaje de efecto para cada experimento fue cercano 70%.

Para aclarar este punto, las fusiones de *Xiro1* fueron activadas en estadio de gástrula temprana (Estadio 10) o tardía (Estadio 12) y los efectos producidos fueron analizados cuando comienza la expresión de *Fgf8* (Estadio 14). Como era esperado, la activación de *HD-GR-EnR* en estadio 10 expande la expresión de *Otx-2* (Figura 23D), mientras que *Gbx-2* fue expandido y su límite anterior desplazado hacia posterior (Figura 23D y G). Además, *Pax2* fue desplazado caudalmente en estos embriones (Figura 23J). Al interferir con la función de *Xiro1* durante gástrula temprana, mediante la inyección y posterior activación de *HD-GR-E1A* o *HD-GR*, se inhibe la expresión de *Otx-2* (Figura 23E y F), *Gbx-2* (Figura 23E, H y F, I) y *Pax2* (Figura 23K y L). En contraste, la activación de *HD-GR-EnR* en estadio de gástrula tardía inhibe la expresión del dominio del cerebro medio de *Otx-2* (Figura 23M) y expande y desplaza anteriormente la expresión de *Gbx-2* (Figura 23P). De manera similar, la expresión de *Pax2* es desplazada rostralmente (Figura 23S). De forma opuesta, la activación de *HD-GR-E1A* o *HD-GR* en estadio 12 expande la expresión de *Otx-2* (Figura 23N y O), mientras que la expresión de *Gbx-2* disminuye (Figura 23Q y R). *Pax2* es inhibido y desplazado hacia posterior con estos tratamientos (Figura 23T y U). Así, durante los estadios tempranos de la gastrulación *Xiro1* y *HD-GR-EnR* promueven la expansión de *Otx-2* en regiones posteriores del embrión. Esta activación después compite con la activación de *Gbx-2* mediada por *Xiro1*, lo que termina con el desplazamiento hacia posterior del organizador. De forma contraria, en los embriones en los que la activación de *HD-GR-EnR* se produce en estadio de gástrula tardía solamente la expresión de *Gbx-2* es inducida, esta reprime la expresión de *Otx-2*, generando desplazamiento anterior del organizador del istmo.

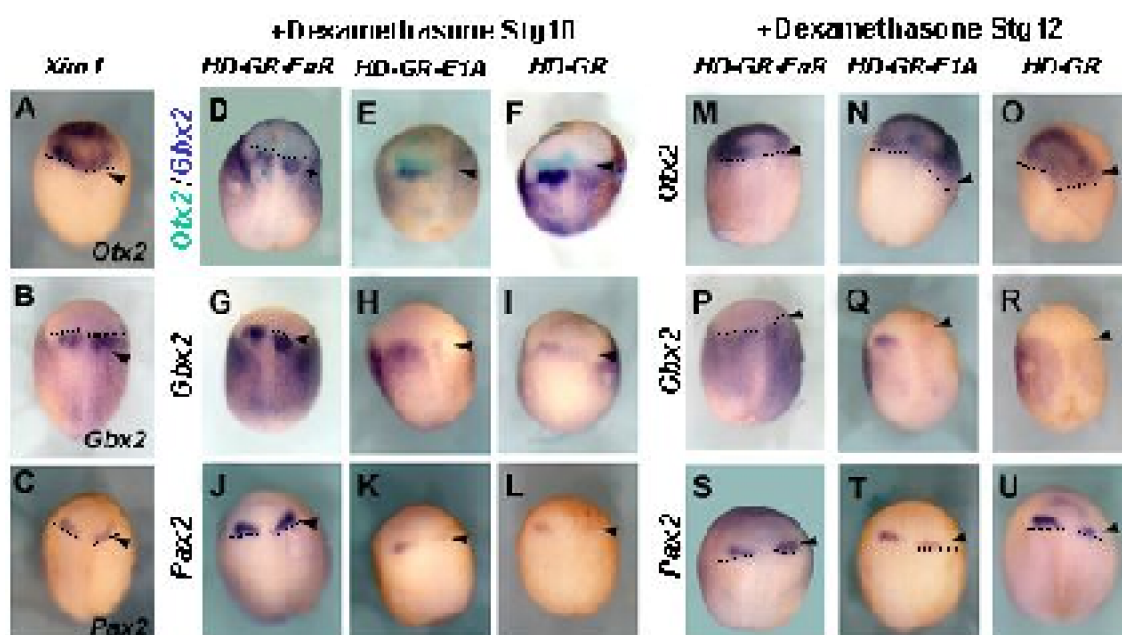


Figura 23. *Xiro1* controla la expresión de *Otx-2* y *Gbx-2* en estadios diferentes del desarrollo embrionario

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 2ng del mRNA para *Xiro1* (A, B, C), 1ng de *HD-GR-EnR* (D, G, J, M, P, S), 1ng de *HD-GR-E1A* (E, H, K, N, Q, T) o 1ng de *HD-GR* (F, I, L, O, R, U) y la expresión de *Otx-2*, *Gbx-2* y *Pax2* fue analizada en estadio de neurula temprana (estadio 14). Las fusiones inducibles fueron activadas en estadio 9.5-10 (D-L) o en estadio 12-12.5 (M-U). Los embriones inyectados con el mRNA para *Xiro1* muestran expansión hacia posterior de *Otx-2* (A), expansión y desplazamiento caudal de la expresión de *Gbx-2* (B) y *Pax2* se mueve caudalmente (C). (D-I) *Otx-2* y *Gbx-2* son expandidos y desplazados caudalmente en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* (D y G). *HD-GR-E1A* y *HD-GR* inhiben la expresión de *Otx-2* y *Gbx-2* cuando son activados en estadio 9.5-10 (E, H y F, I respectivamente, puntas de flechas). Se observa desplazamiento caudal de la expresión de *Pax2* en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* y activados en estadio 9.5-10 (J). La inyección de *HD-GR-E1A* y *HD-GR* reprime la expresión del dominio del cerebro medio de *Pax2* (K y L, puntas de flecha). (M-O) La expresión del cerebro medio de *Otx-2* es inhibida y desplazada rostralmente en los embriones que sobreexpresan *HD-GR-EnR* (M). De forma contraria, la sobreexpresión de *HD-GR-E1A* y *HD-GR* expande la expresión de *Otx-2* caudalmente al activar la fusión en estadio 12-12.5 (N y O). (P-R) La expresión de *Gbx-2* es expandida anteriormente al sobreexpresar *HD-GR-EnR* y activada en estadio 12-12.5 (P), mientras que la inyección de *HD-GR-E1A* y *HD-GR* inhibe la expresión de este gen (Q y R, puntas de flechas). (S-U) La expresión de *Pax2* es desplazada hacia anterior en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* y activados en estadio 12-12.5 (S), mientras que *HD-GR-E1A* y *HD-GR* produce la represión y el desplazamiento caudal de expresión de *Pax2* (T y U). Las puntas de flecha apuntan la mitad inyectada.

Cada experimento se realizó 2 veces con un mínimo de 20 embriones cada uno. El

porcentaje de efecto para cada experimento fue cercano 70%.

3.1. Experimentos de rescate

Con el fin de definir la especificidad de los fenotipos descritos para la ganancia y supresión de la función de *Xiro1* y establecer de mejor forma las propiedades transcripcionales de *Xiro1* realizamos experimentos de rescate. Como fue descrito anteriormente, las formas dominantes negativas (*HD-GR* o *HD-GR-E1A*) de *Xiro1* inhiben la expresión de *Gbx-2* y expanden caudalmente o reprimen la expresión de *Otx-2*, dependiendo del momento en que la dexametasona es agregada al medio de cultivo. La coinyección de *HD-GR* o *HD-GR-E1A* y mRNA para *Xiro1* y subsiguiente activación en estadio de gástrula temprana o tardía rescata la expresión de *Gbx-2* (Figura 24B, C y H, I respectivamente) y produce embriones con expresión normal de *Otx-2* (Figura 24E, F y K, L). Embriones coinyectados con *HD-GR-EnR* junto a *Xiro1* y activados en estadio de gástrula tardía muestran expansión de *Gbx-2* (Figura 24G) y expresión normal de *Otx-2* (Figura 24J), contrariamente la activación en estadio de gástrula temprana produce embriones con expresión de *Otx-2* expandida caudalmente (Figura 24D), tanto que la expresión de *Gbx-2* aumenta y su límite anterior de expresión es desplazado hacia posterior en estos embriones (Figura 24A). Así, los efectos descritos para las construcciones de *Xiro1* son específicos. Además, *Xiro1* se comporta como represor transcripcional capaz de promover la expresión de *Otx-2* en estadio de gástrula temprana y de *Gbx-2* en estadio de gástrula tardía. Luego, examinamos si los efectos de las formas dominantes negativas de *Xiro1* sobre la expresión de *Otx-2* (Figura 25A) y *Fgf8* eran consecuencia de la supresión de la expresión de *Gbx-2* en los embriones inyectados (Figura 25C). Ciertamente este es el caso para el límite caudal de la expresión de *Otx-2*, ya que la coexpresión de *HD-GR* y *Gbx-2* es suficiente para generar embriones con el patrón normal de *Otx-2* (Figura 25A y B). Aún cuando la coinyección de *HD-GR* y *Gbx-2* rescató la expresión normal de *Otx-2* no rescató la expresión de *Fgf8* (Figura 25D). Concluimos que la función de *Xiro1* es necesaria para la inducción de *Fgf8*, independientemente de la expresión de *Otx-2* y *Gbx-2*.

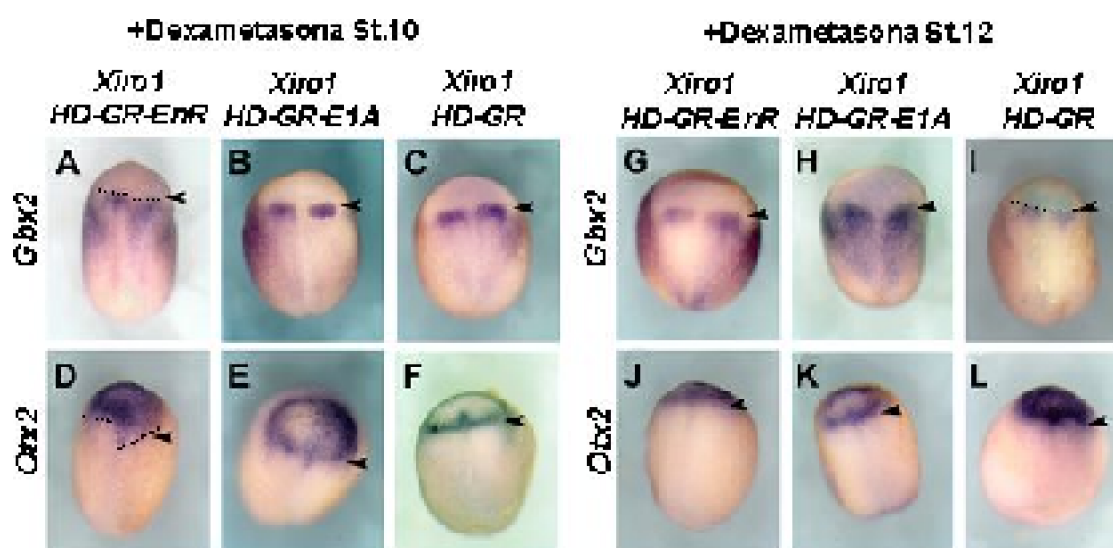


Figura 24. Experimentos de rescate

Los embriones se inyectaron en un blastómero en estadio dos células con cantidades iguales (1ng de cada uno) de *Xiro1* y *HD-GR-EnR* (A,D,G,J), *Xiro1* y *HD-GR-E1A* (B,E,H,K), o *Xiro1* y *HD-GR* (C,F,I,L). Las construcciones inducibles fueron activadas alrededor de estadio 10 (A-F) o 12.5 (G-L) y la expresión de *Otx-2* y *Gbx-2* se analizó en neurula temprana. Los embriones inyectados con una mezcla de *Xiro1* y *HD-GR-EnR* y activados alrededor de la fase 10 muestran expansión y el desplazamiento caudal de *Gbx-2* (A, 90% n=27) y expansión caudal del dominio del cerebro medio de *Otx-2* (D, 70% n=23). La sobreexpresión de *Xiro1* junto con *HD-GR-E1A* o con *HD-GR* y posterior activación en estadio 10 rescata la expresión normal de *Otx-2* y *Gbx-2* (B,E y C,F). La expresión de *Otx-2* y *Gbx-2* es rescatada en los embriones inyectados con las mezclas de *Xiro1* con *HD-GR-EnR* (G y J), con *HD-GR-E1A* (H y K), o con *HD-GR* (I y L) y activados en estadio 12-12.5. Las líneas punteadas muestran los desplazamientos en la expresión de los genes. Las puntas de flecha apuntan los lados inyectados.

El porcentaje de rescate de expresión normal para cada experimento fue cercano al 75%.

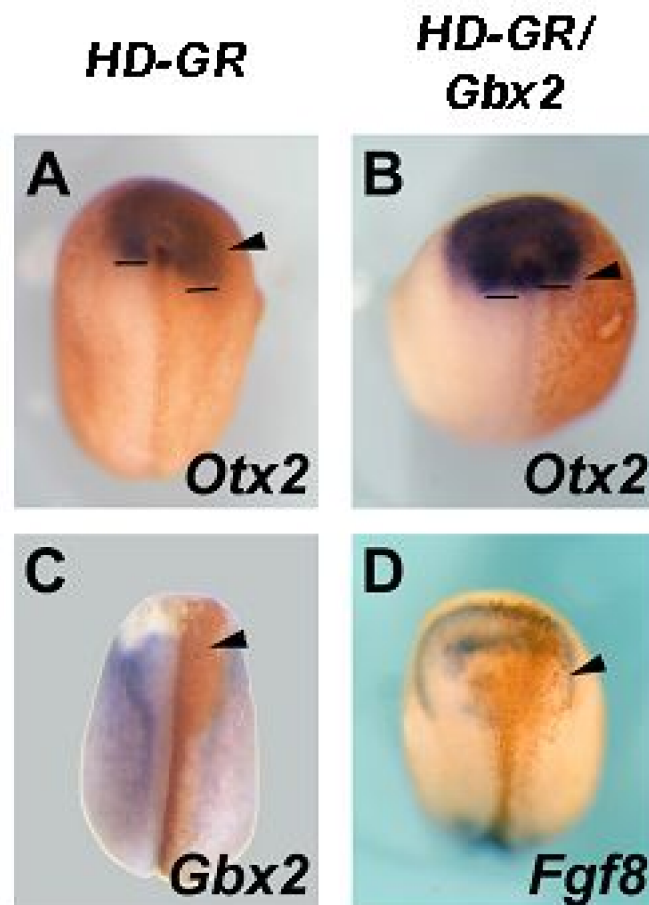


Figura 25. *Gbx-2* rescata la expresión de *Otx-2* pero no la de *Fgf8*

Los embriones se inyectaron en un blastómero en estadio de dos células con 0.5ng de una forma dominante negativo de *Xiro1* (*HD-GR*) (A,C), o con 0.5ng de *HD-GR* y 1ng de *Gbx-2* (B,D). Las fusiones inducibles fueron activadas alrededor de estadio 12.5 y el lado inyectado se definió por la inmunodetección de Myc.

(A) En los embriones inyectados con el mRNA para *HD-GR* la expresión del cerebro medio de *Otx-2* se expande caudalmente (líneas negras). (B) La co-expresión de *Gbx-2* y *HD-GR* restaura casi completamente la expresión normal de *Otx-2* (líneas negras). (C) La inyección de *HD-GR* produce la inhibición completa de *Gbx-2*. (D) La co-inyección de *HD-GR* y *Gbx-2* no rescata la expresión de *Fgf8*, aún cuando restaura casi completamente la expresión de *Otx-2*. Las puntas de flecha muestran los lados inyectados y apuntan los efectos descritos anteriormente.

Cada experimento se realizó por lo menos 2 veces con un mínimo de 54 embriones. El porcentaje de efecto (o rescate) para cada experimento fue cercano a 70%.

3.2. Relaciones epistáticas de *Xiro1*, *Otx-2* y *Gbx-2*

Con el fin de clarificar las relaciones epistáticas entre los genes involucrados en el establecimiento del organizador del istmo realizamos experimentos de hemisferios

animales y de conjugados. En el embrión la expresión de *Otx-2* y *Xiro1* se superponen en el dominio del cerebro medio, luego, analizamos si *Otx-2* es capaz de inducir la expresión de *Xiro1*. Efectivamente, la sobreexpresión de *Otx-2* activa la expresión de *Xiro1* en el ensayo de hemisferios animales (Figura 26B). La habilidad de *Xiro1* de inducir la expresión de *Otx-2* ha sido demostrada previamente (Gómez-Skarmeta y cols., 2001). La expresión de *Gbx-2* aparece dentro del territorio de *Xiro1* y *Xiro1* es capaz de inducir *Gbx-2* en embriones. Así, examinamos si la sobreexpresión de *Xiro1* podía promover la expresión de *Gbx-2* en ensayos de hemisferios animales, donde otras señales provenientes del embrión están ausentes. La actividad de *Xiro1* induce la expresión de *Gbx-2* en ectodermos competentes, mientras que *Gbx-2* es incapaz de inducir la expresión de *Xiro1* (Figura 26A y C). Seguido, examinamos la relación de *Xiro1* y *Gbx-2* utilizando el ensayo de conjugados descritos anteriormente. Si *Xiro1* es capaz de inducir la expresión de *Gbx-2*, entonces conjugados de células que expresan *Otx-2* y células expresando *Xiro1* deberían producir la inducción de *Fgf8* y *En-2*. Figuras 26D y E muestran que, ciertamente, este es el caso. La interacción entre tejidos que expresan *Otx-2* y tejido expresando *Xiro1* es suficiente para inducir la expresión de los marcadores del organizador del istmo, *Fgf8* y *En-2* en los hemisferios expresando *Xiro1* y *Otx-2*, respectivamente. Ya que la inhibición de la función de *Xiro1* (*HD-GR*) bloquea completamente la inducción de *Fgf8* en los embriones inyectados, evaluamos si *Xiro3* (otro gen de la familia *Iroquois*) podía inducir la expresión de este gen en ausencia de las señales presentes en el embrión. Efectivamente, *Xiro3* induce la expresión de *Fgf8* (Figura 26F). Esta inducción no es dependiente de la posible inducción de *Otx-2* y *Gbx-2* producida por *Xiro3* en estos hemisferios animales, ya que la coinyección de *Xiro3* y las construcciones dominantes negativos para *Otx-2* y *Gbx-2* no bloquea la inducción de *Fgf8* (Figura 26G).

Xiro1 y *Otx-2* se activan mutuamente, coexpresándose en el territorio del cerebro medio donde *En-2* es expresado. Investigamos si *Xiro1* es necesario para la inducción de *En-2* en el tejido expresando *Otx-2*. Para esto, el dominante negativo inducible de *Xiro1* fue coinyectado con *Otx-2*, los correspondientes hemisferio animales fueron conjugados con ectodermos inyectados con *Gbx-2* y la expresión de *En-2* fue posteriormente analizada. La Figura 26H muestra que la función de *Xiro* es indispensable, en el dominio *Otx-2*, para la inducción de *En-2*.

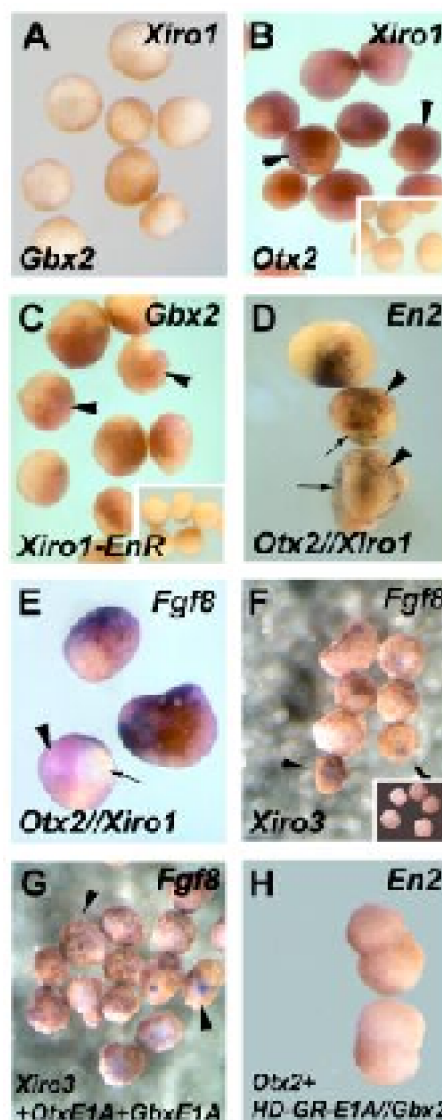


Figura 26. Análisis *in vitro* del papel de *Xiro1* en organizador del istmo

Se inyectaron los embriones en estadio de una célula con los mRNAs descritos, los hemisferios animales fueron explantados y conjugados en estadio 10 y cultivados hasta el equivalente de estadio 17. En este estadio se ensayó la expresión génica de los conjugados. **(A)** La inyección de 2ng del mRNA para *Gbx-2* no induce la expresión de *Xiro1* (0%, n=36). **(B)** La expresión de *Xiro1* es inducida en hemisferios animales inyectados con 5ng del mRNA para *Otx-2* (puntas de flecha, 65%, el n=23; inset: hemisferios animales controles). **(C)** Hemisferios animales inyectados con 2ng del mRNA para *Xiro1-EnR* expresan *Gbx-2* (puntas de flecha, 57%, el n=46; inset: tejido ectodérmico sin inyectar). **(D)** Conjugados *Otx-2*(5ng)//*Xiro1*(2ng) expresan *En-2* (puntas de flecha, 90%, el n=30) en el territorio *Otx-2* (las flechas indican la tinción X-gal en la region del conjugado que expresa *Xiro1*). **(E)** *Fgf8* también es inducido en estos conjugados (punta de flecha, 71%, el n=34, la flecha muestra la tinción X-gal en los hemisferios inyectados con *Xiro1*). **(F)** *Xiro3* es capaz de inducir la expresión de *Fgf8* en los hemisferios animales, en ausencia de otras señales provenientes del embrión (puntas

de flecha, 78% n=23, inset caps control). **(G)** La inducción de *Fgf8* producida por *Xiro3* no depende de la interacción entre células *Otx-2* y *Gbx-2* producidas por *Xiro3*. La coinyección de *Xiro3* y las formas dominantes negativas para estos genes no bloquea la inducción de *Fgf8* (puntas de flecha, 75% n=27); note que el nivel y porcentaje de inducción no disminuyó. **(H)** La interferencia con la función de *Xiro1* con *HD-GR-E1A* (0.5 ng) en estadio 12 suprime la inducción de *En-2* en el tejido inyectado con *Otx-2* (40%, n=33).

4. Propiedades inductivas del mesodermo

Como primera aproximación para comprender los mecanismos embrionarios de la inducción y posicionamiento del organizador del istmo realizamos experimentos en los que evaluamos el papel del mesodermo. Con este fin hicimos experimentos de conjugados de ectodermo competente (estadio 10) con notocordas explantadas de embriones en estadio 13 y explantes de Keller, donde se cultiva de forma planar tejido ectodérmico y el organizador de Spemann (Keller y cols., 1992). Los conjugados y explantes fueron crecidos hasta estadio de neurula tardía, cuando la expresión de *Otx-2*, *Gbx-2* y *Fgf8* fue analizada (Figura 27A y B). El primer tipo de experimentos nos permite determinar las propiedades de inducción vertical de la notocorda y el segundo las propiedades de inducción planares del mesodermo, respecto a los marcadores del istmo. Observamos que las señales verticales como las planares producidas por el mesodermo son capaces de inducir los genes *Otx-2* y *Gbx-2* (Figura 27C y E). En los conjugados de ectodermos y notocorda observamos que *Otx-2* se expresa en la región del ectodermo que queda en contacto con la región anterior de la notocorda. Por su parte, *Gbx-2* se expresa en el territorio ectodérmico adyacente al dominio de expresión de *Otx-2*, probablemente, incluyendo el dominio de expresión de *Fgf8* (Figura 27C y F) y no es inducido cuando se incluye solo la mitad anterior de la notocorda en el conjugado (Figura 27D). En los explantes de Keller la expresión de los genes *Otx-2*, *Gbx-2* y *Fgf8* sigue el mismo patrón (Figura 27E y F). Interesantemente, la inducción de los marcadores en los conjugados y explantes de Keller se corresponde con el orden antero-posterior detectado en los embriones completos. Esto nos sugiere que la notocorda posee diferencias antero-posteriores que son impresas en el ectodermo suprayacente. Misteriosamente, el mismo patrón de expresión de los marcadores señalados se produce aún cuando el mesodermo se encuentra orientado de manera inversa en el explante de Keller.

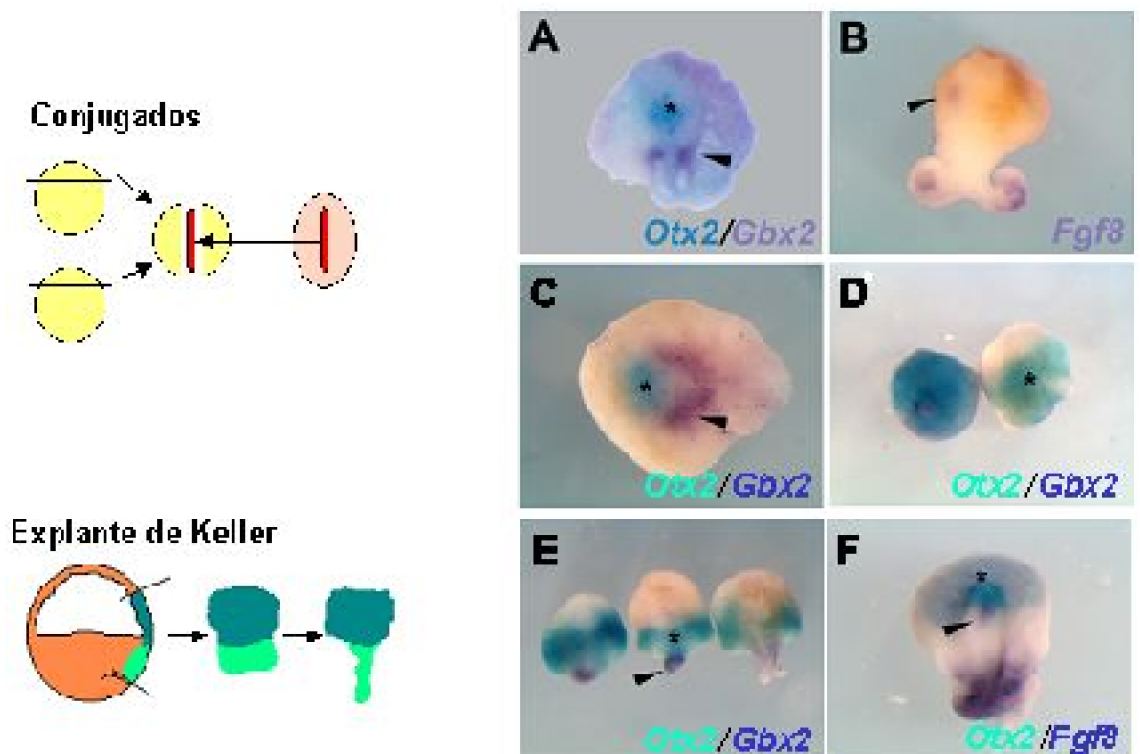


Figura 27. Propiedades inductivas del mesodermo

Las propiedades inductivas del mesodermo fueron ensayadas utilizando conjugados (A-D y F) y explantes de Keller (E). Los conjugados se realizaron poniendo en contacto hemisferios animales (Estadio 10, semicírculos amarillos) y notocordas explantadas en estadio de neurula temprana (Estadio 13, rectángulo rojo), éstos se crecieron hasta equivalente de estadio 17, cuando la expresión de los genes señalados fue detectada mediante hibridación *in situ* (A-D). Los explantes de Keller se hicieron en estadio 10 como muestra el esquema (verde claro: mesodermo, verde oscuro: ectodermo) y se analizó la expresión génica en estadio 17. **(A, C, E)** Doble hibridación *in situ* para *Otx-2* (verde, asterisco) y *Gbx-2* (púrpura, punta de flecha). En los conjugados (A y C) como en los explantes de Keller (E) ambos genes son inducidos en el orden antero-posterior correcto. **(B, F)** *Fgf8* es inducido en los conjugados (B, punta de flecha) en una región adyacente al dominio de expresión de *Otx-2* (F, punta de flecha). **(D)** En el conjugado con la mitad anterior de la notocorda, sólo observamos inducción de *Otx-2* al realizar .

5. Papel de los agentes posteriorizantes en la formación del organizador del istmo

Las propiedades diferenciales de inducción de los genes que participan en el desarrollo del límite entre el cerebro medio y posterior podrían ser producto de la distribución asimétrica de agentes posteriorizantes en la notocorda de embriones de *Xenopus*. Esta característica ha sido documentada para la inducción de *En-2*, este es inducido con

mayor eficiencia por la región anterior de notocordas explantadas que por la región posterior de las mismas (Hemmati-Brivanlou y cols., 1995). En la región posterior de la notocorda de *Xenopus* se expresan varios Fgfs y se ha propuesto que este dominio mesodérmico presenta mayores niveles de ácido retinoico. Estos antecedentes nos impulsaron a evaluar los efectos de estos agentes posteriorizantes en la formación del organizador del istmo. Utilizando construcciones dominantes negativas y dominantes activadoras y realizando experimentos usando las moléculas en cuestión, analizamos el papel de FGF, ácido retinoico y la señal Wnt en el desarrollo del límite entre el cerebro medio y posterior en *Xenopus*.

5.1. Papel de ácido retinoico en el desarrollo del istmo

Ha sido extensamente documentado el papel de ácido retinoico en el establecimiento del eje antero-posterior en embriones de vertebrados (revisado por Gamse y Sive, 2000). Esta molécula ha sido involucrada principalmente en la formación del cerebro posterior y sus divisiones, los rombómeros. Además se ha demostrado que ácido retinoico participa en la regulación transcripcional de los genes del complejo Hox y posee propiedades posteriorizantes que promueven la formación de embriones que carecen de estructuras anteriores. Analizamos, específicamente, el papel de ácido retinoico mediante sobreexpresión de construcciones del receptor RAR en el posicionamiento e inducción de los genes involucrados en el desarrollo del organizador del istmo. La sobreexpresión de una forma dominante negativa, que carece del sitio de unión al DNA, *dnRAR*, en un blastómero en estadio de dos células anterioriza el embrión, expandiendo y desplazando hacia posterior la expresión de *Otx-2*, *En-2* y *Fgf8* (Figura 28A, C y D), en estos embriones la expresión de *Gbx-2* disminuye y también es desplazada hacia posterior (Figura 28B). Además, la expresión de *Wnt1*, marcador del cerebro medio se expande y la expresión de *Xiro1*, correspondiente a este dominio, es expandida de manera similar (Figura 28G y E, respectivamente). Finalmente, la sobreexpresión de *dnRAR* bloquea la expresión de *Delta1* en la placoda del trigémino y en la placa neural (Figura 28F). De manera opuesta la inyección de la fusión dominante activadora, *VP16RAR*, restringe y reposiciona hacia anterior la expresión de *Otx-2*, *En-2* y *Fgf8* (Figura 28H, J y K). *Gbx-2* aumenta su expresión, observándose un leve movimiento hacia anterior (Figura 28I). El aumento de la función de ácido retinoico en estos embriones desplaza hacia anterior y aumenta la expresión de *Xiro1* y *Wnt1* (Figura 28L y N). Por último, este tratamiento desplaza hacia anterior la expresión de *Delta1* en la medula espinal y de la placoda del trigémino, sugiriendo un aumento de su expresión (Figura 28M).

Además se realizaron experimentos en los que utilizamos bolitas embebidas en ácido retinoico, las que fueron incluidas en tejidos ectodérmicos explantados de embriones previamente inyectados con *Otx-2*. En estos experimentos observamos que ácido retinoico es capaz de inducir la expresión de *Xiro1*, *Gbx-2* y *En-2* en el tejido expresando *Otx-2* (Figura 30A', B' y C'). No fuimos capaces de observar expresión de *Fgf8* en este tipo de ensayo (Figura 30D').

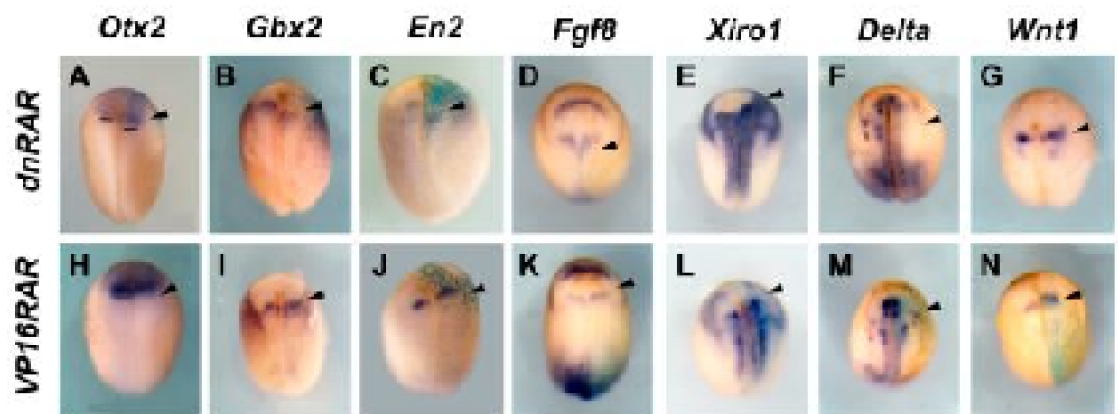


Figura 28. Efecto de ácido retinoico en la formación del organizador del istmo

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 1ng del mRNA para el receptor mutado de ácido retinoico (*dnRAR*) (A-G) o con 1ng del mRNA para la construcción dominante activadora del receptor de ácido retinoico (*VP16-RAR*) (H-N) junto a *FDAX* como marcador de linaje. La expresión de los genes señalados fue analizada en estadio de neurula media. (A, H) La inyección de *dnRAR* expande la expresión de *Otx-2* hacia posterior (A) y es restringida hacia anterior al sobreexpresar la construcción dominante activadora del receptor de ácido retinoico (H). (B, I) *Gbx-2* disminuye y se desplaza hacia posterior en los embriones inyectados con *dnRAR* (B), mientras que en los embriones inyectados con *VP16-RAR* aumenta su nivel de expresión y se desplaza hacia anterior (I). (C, J) *En-2* se desplaza hacia posterior (C) o hacia anterior (J) en los embriones inyectados con *dnRAR* y *VP16-RAR*, respectivamente. (D, K) *Fgf8* se difumina y expande caudalmente en los embriones inyectados con la construcción dominante negativa (D) y se mueve rostralmente y aumenta su expresión en los embriones inyectados con *VP16-RAR* (K). (E, L) La sobreexpresión de *dnRAR* aumenta y expande el dominio del cerebro medio de *Xiro1* (E), por otra parte, la sobreexpresión de *VP16-RAR* desplaza hacia anterior la expresión de este gen (L). (F, M) La falta de función de la señal de ácido retinoico (*dnRAR*) inhibe la expresión de *Delta* de la placa neural y de la región de la placoda del trigémino (F), mientras que la sobreexpresión desplaza hacia anterior la placoda del trigémino y pareciera aumentar la expresión de *Delta* en este territorio (M). (G, N) *Wnt1* se expande en los embriones que sobreexpresan *dnRAR*, no cambiando significativamente su posición (G). La inyección de *VP16-RAR* desplaza hacia anterior y expande la expresión de *Wnt1* (N).

Cada experimento fue realizado con un número superior a 30 embriones. Los porcentajes de efecto fue cercanos al 60%.

5.2. Papel de FGF y la vía de señalización Wnt en el desarrollo del istmo

Moléculas de la familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y ligandos del tipo Wnt han sido propuestos como agentes posteriorizantes, capaces de producir transformaciones de tejidos anteriores en tejidos de carácter más posterior e inducir la

expresión de genes que se expresan normalmente en dominios caudales en el embrión de *Xenopus* (revisado por Gamse y Sive, 2000). Siguiendo con nuestro análisis del posicionamiento y desarrollo del organizador del istmo examinamos el papel de estas proteínas en la expresión de los genes *Otx-2*, *Xiro1*, *Gbx-2* y *Fgf8*. Con este fin, sobreexpresamos una forma dominante negativo del receptor tipo IV de FGF, que tiene mutado el dominio quinasa, (*dnFGFR4*) el cual, a las concentraciones usadas, interfiere preferentemente con el papel de FGF en el ectodermo neural y no muestra efectos significativos en la inducción del mesodermo, territorio en el que FGF posee un papel ampliamente descrito (Amaya y cols., 1991). Para interferir con la función de la vía de señalización Wnt hicimos uso de una forma dominante negativo del factor de transcripción TCF3 (*dnTCF3*) que interactúa con b-catenina nuclear, complejo que promueve la transcripción de los genes blanco de esta vía de transducción. La sobreexpresión en un blastómero en estadio de dos células de *dnTCF3* inhibe la expresión del cerebro medio de *Otx-2* (Figura 29A), aumentando y expandiendo hacia anterior la expresión de *Gbx-2* y *Xiro1* (Figura 29B y D). Además la expresión de *Fgf8* se extiende hacia anterior en la mitad inyectada del embrión (Figura 29C). El análisis de la falta de función de FGF, producida por inyección en un blastómero en estadio de dos células de *dnFGFR4* en el establecimiento del límite entre el cerebro medio y posterior, mostró que la ausencia de activación de la vía FGF en los embriones inyectados restringe la expresión de *Otx-2* hacia rostral (Figura 29E) e inhibe la expresión de *Xiro1* del cerebro medio (Figura 29H).

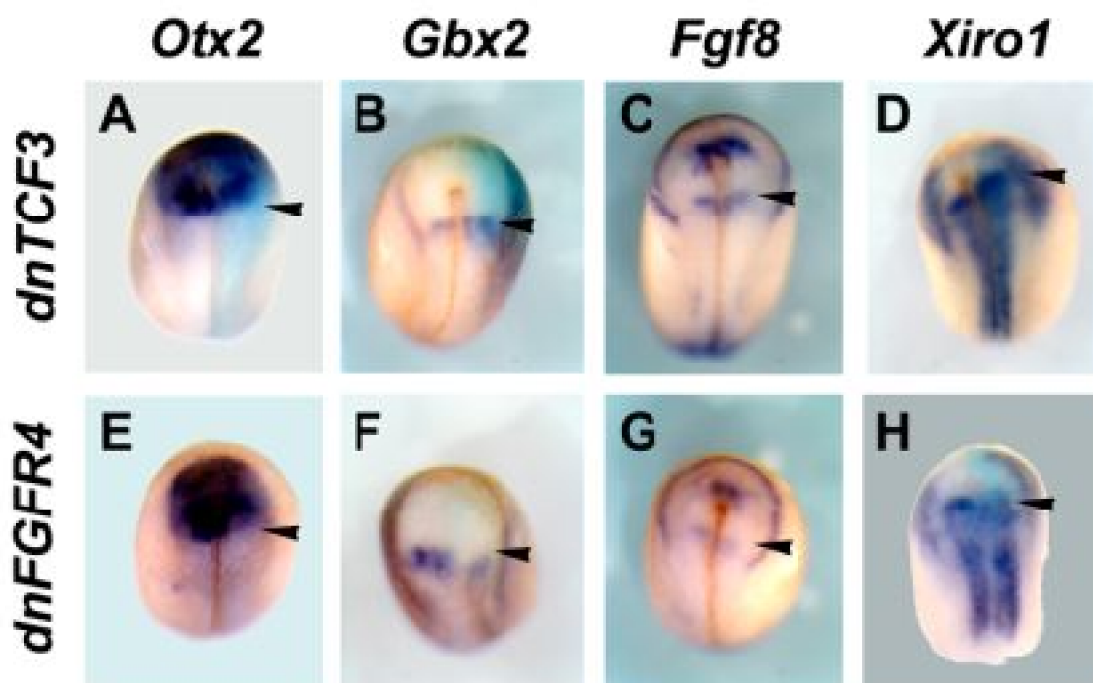


Figura 29. Efectos de FGF y la señal Wnt en el desarrollo del istmo

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 0.5ng del RNA para el receptor mutado de FGF (*dnFGFR4*) (A-D) o con 0.5ng del RNA para el dominante negativo de TCF3 (*dnTCF3*) (E-H) junto a FDAx como marcador de

linaje celular. La expresión de *Otx-2*, *Gbx-2*, *Xiro1* y *Fgf8* fue analizada en estadio de neurula media. **(A, E)** La expresión de *Otx-2* es restringida en los embriones inyectados con estos transcritos. **(B, F)** En los embriones inyectados con *dnTCF3* la expresión de *Gbx-2* aumenta y se desplaza hacia anterior (B), el efecto opuesto se observa en los embriones que sobreexpresan el receptor mutado de FGF (E). **(C-G)** La expresión de *Fgf8* se difumina y expande levemente hacia anterior en los embriones inyectados con *dnTCF3* (C), mientras que la inyección de *dnFGFR4* mueve hacia posterior y disminuye la expresión de *Fgf8* (F). **(D,H)** La expresión del cerebro medio de *Xiro1* se extiende hacia anterior en embriones inyectados con *dnTCF3* (D) y disminuye en los embriones inyectados con *dnFGFR4* (H).

Las puntas de flecha apuntan a los efectos descritos.

Cada experimento se realizó con un número superior a 45 embriones. Los porcentajes de efecto fue cercanos a 67%.

Además, produce embriones en los que la expresión de *Gbx-2* está disminuida y desplazada caudalmente (Figura 29F). *Fgf8* se observa difuso y desplazado hacia posterior en estos embriones (Figura 29G).

Por último, realizamos experimentos de conjugados usando bolitas embebidas de una solución de bFGF (FGF básico). Observamos que bFGF es capaz de inducir la expresión de *Xiro1*, *Gbx-2* y *En-2* en ectodermos expresando *Otx-2* (Figura 30A, B y C). No observamos expresión de *Fgf8* en estos ensayos, lo que podría deberse a un nivel muy bajo de expresión de este gen. La inducción de estos genes no es un artefacto del ensayo ya que conjugados de ectodermos control y bolitas embebidas en FGF o ectodermos expresando *Otx-2* puestos en contacto con bolitas embebidas en BSA no presentan inducción de *En-2* (Figura 30Cap C y BSA, respectivamente).

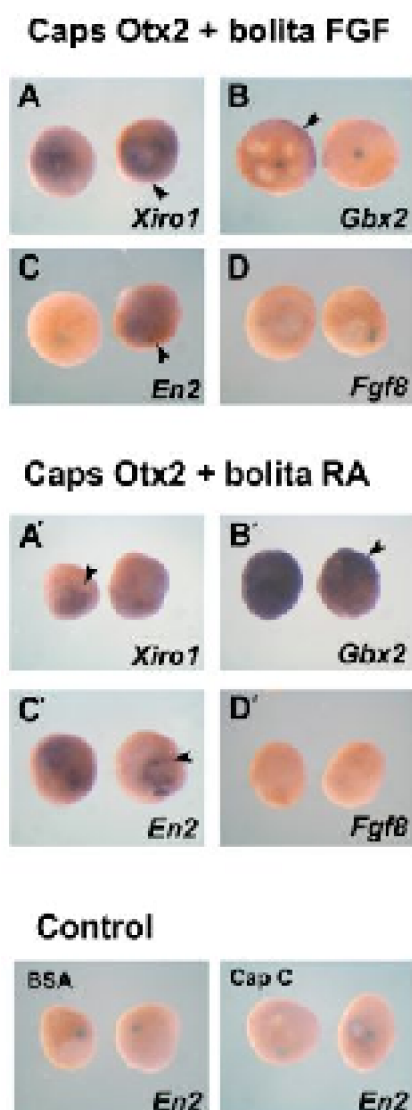


Figura 30. Capacidad de ácido retinoico (RA) y FGF para inducir el istmo in vitro

Los embriones fueron inyectados en estadio de una célula con 5ng del RNA para *Otx-2*, los hemisferios animales (caps) fueron explantados en estadio 10 y se procedió a implantar bolitas (Sephadex 50) embebidas en ácido retinoico o FGF (100ng/ml). Estos conjugados de hemisferios expresando *Otx-2* y bolitas se cultivaron hasta equivalente de estadio 17 cuando la expresión de *Xiro1*, *Gbx-2*, *En-2* y *Fgf8* fue analizada. **(A-D)** En los conjugados de caps *Otx-2* y bolitas FGF se observa inducción de *Xiro1* y *En-2* (A, 63% n=19 y C, 78% n=16). *Gbx-2* es débilmente inducido en los bordes del conjugado (B, 54% n=13). *Fgf8* no fue detectado en nuestro ensayo (D, 0% n=15). **(A'-D')** ácido retinoico (RA) induce la expresión de *Xiro1* y *En-2* en estos conjugados (A', 75% n=17 y C', 82% n=21). *Gbx-2* es inducido fuertemente por ácido retinoico (B', 92% n=9). No observamos expresión de *Fgf8* en los tejidos ectodérmicos tratados con RA (D', 0% n=17). Los efectos en los tejidos que expresan *Otx-2* son producidos por las moléculas presentes en las bolitas. Conjugados de tejido inyectado con *Otx-2* no expresa *En-2* al usar bolitas embebidas en BSA (BSA, 0% n=7). Por último, FGF no es capaz de inducir la expresión

de *En-2* en tejido ectodérmico no inyectado con *Otx-2* (CapC, 0% n=13).

Las puntas de flecha indican la expresión descrita para cada caso.

5.3. Los efectos ácido retinoico sobre *Otx-2* son mediados en parte por *Gbx-2*

Ha sido demostrado previamente que los agentes posteriorizantes modifican el eje antero-posterior del embrión, promoviendo el desarrollo de estructuras posteriores y restringiendo o haciendo desaparecer las estructuras derivadas de la región anterior del embrión (Kolm y Sive, 1995; esta tesis). La posición del límite caudal de expresión de *Otx-2* puede ser alterado utilizando construcciones dominantes negativa y activadora del receptor de ácido retinoico RAR (Blumberg y cols., 1997). Así mismo, la inyección de transcritos de *Gbx-2* o de su fusión represora (*Gbx-EnR*) es capaz de restringir la expresión de *Otx-2* rostralmente, de manera similar a lo producido por la fusión dominante activadora del receptor para ácido retinoico (*VP16RAR*, Figura 16D,E y 28H). Por otra parte, la inyección de *Gbx-E1A* expande la expresión de *Otx-2* hacia caudal de forma similar a lo observado para la construcción dominante negativa del receptor de ácido retinoico (*dnRAR*, Figura 16F y 28A). Tomando estos datos en consideración, examinamos si los efectos observados para las construcciones del receptor de ácido retinoico eran mediados por *Gbx-2*. Primero, determinamos en un experimento similar al de rescate (Figura 27B), que la restricción de *Otx-2*, provocada por *HD-GR-EnR* es debida a la activación ectópica de *Gbx-2*. De esta manera, la coinyección de *HD-GR-EnR* y *Gbx-GR-E1A* y posterior activación en estadio de gástrula tardía produce la expansión caudal de *Otx-2*, dominando el efecto de la fusión dominante activadora de *Gbx-2* en estos embriones (Figura 31A). Por otra parte, *Fgf8* es expresado en estos embriones en una posición más anterior (Figura 31C), sugiriendo que su expresión está controlada por *HD-GR-EnR* más que por la ausencia de la función *Gbx-2*. Realizamos experimentos de coexpresión para comprender la relación epistática entre ácido retinoico y *Gbx-2*. Observamos que la coinyección de *VP16RAR* y *Gbx-E1A* genera embriones con el patrón normal de expresión de *Otx-2* (Figura 31B) y la expresión de *Fgf8* aumenta y se expande hacia rostral y caudal en estos embriones (Figura 31D), sugiriendo que el nivel de expresión de *Fgf8* pudiese estar controlado por ácido retinoico y su posición final por *Gbx-2*.

5.4. Interacción entre *Xiro1*, ácido retinoico y *Gbx-2*

Los efectos producido por ácido retinoico en la posición del límite caudal de la expresión de *Otx-2* son mediados en parte por *Gbx-2* (Li y Joyner, 2001 y esta tesis) y *Xiro1* regula la expresión de *Gbx-2* en la región del romboencéfalo. Con estos antecedentes, investigamos la relación epistática de estos componentes para definir de este modo, la jerarquía molecular en el establecimiento del organizador del istmo. La inducción, en estadio de gástrula tardía, de embriones inyectados con la construcción represora de *Xiro1* (*HD-GR-EnR*), expande hacia anterior la expresión de *Gbx-2* y a través de esta

modificación, restringe la expresión de *Otx-2* rostralmente (Figura 32A y C). Al coinyectar la fusión dominante negativo del receptor de ácido retinoico (*dnRAR*) y *HD-GR-EnR* observamos que la expresión de *Gbx-2* es desplazada caudalmente, sin embargo, su expresión está aumentada en comparación a la mitad control (Figura 32B). Esto sugiere que *Xiro1* podría controlar la expresión de *Gbx-2* y ácido retinoico la posición en que *Gbx-2* es expresado normalmente en el embrión. Además, *Otx-2* es expandido en estos embriones (Figura 32D), confirmando el papel de ácido retinoico en el establecimiento del límite caudal de este gen. Opuesto a la expansión de *Gbx-2* detectada para *HD-GR-EnR*, la fusión dominante activadora de *Xiro1* (*HD-GR-E1A*) inhibe completamente la expresión de este gen (Figura 32E). Este efecto sobre *Gbx-2* es revertido mediante la coinyección de cantidades iguales de *HD-GR-E1A* y *VP16RAR*, observándose embriones con expresión de *Gbx-2* en la mitad inyectada (Figura 32F). Estos resultados no nos permiten definir una jerarquía clara entre estos componentes, pero sugieren que la expresión de *Gbx-2* es controlada por ambos, *Xiro1* y ácido retinoico, y que el límite caudal de la expresión de *Otx-2* es definida principalmente por *Gbx-2*.

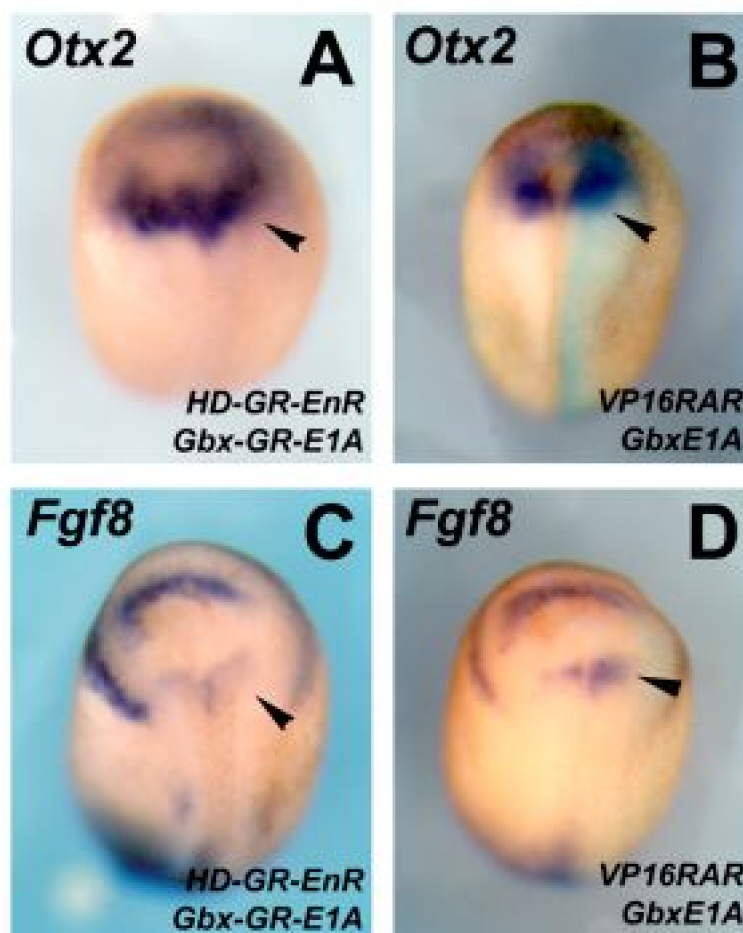


Figura 31. Interacción de ácido retinoico y *Gbx-2*

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con mezclas de mRNAs para las fusiones inducibles, represora de *Xiro1* (*HD-GR-EnR*) y dominante activadora de *Gbx-2* (*Gbx-GR-E1A*)(1ng de cada uno) (A, C) y con una mezcla

de la fusión dominante activadora de ácido retinoico (*VP16-RAR*, 1ng) y la fusión dominante activadora de *Gbx-2* (*Gbx-E1A*, 0.3ng) (B, D) para luego ensayar la expresión de *Otx-2* (A,B) y *Fgf8* en estadio 17(C, D). Las construcciones inducibles fueron activadas en estadio de gástrula tardía. (A) La expresión de *Otx-2* se extiende hacia posterior con la inyección de esta mezcla. (C) En estas condiciones la expresión de *Fgf8* se expande y desplaza hacia anterior. (B) La expresión de *Otx-2* es relativamente normal en los embriones inyectados con *VP16-RAR+GbxE1A*. (D) *Fgf8* se expande y levemente desplaza hacia rostral en los embriones inyectados con *VP16-RAR+GbxE1A*.

Cada experimento fue realizado con un número de embriones mayor a 45. Los porcentajes fueron cercanos a 70%. Puntas de flecha apuntan los efectos descritos.

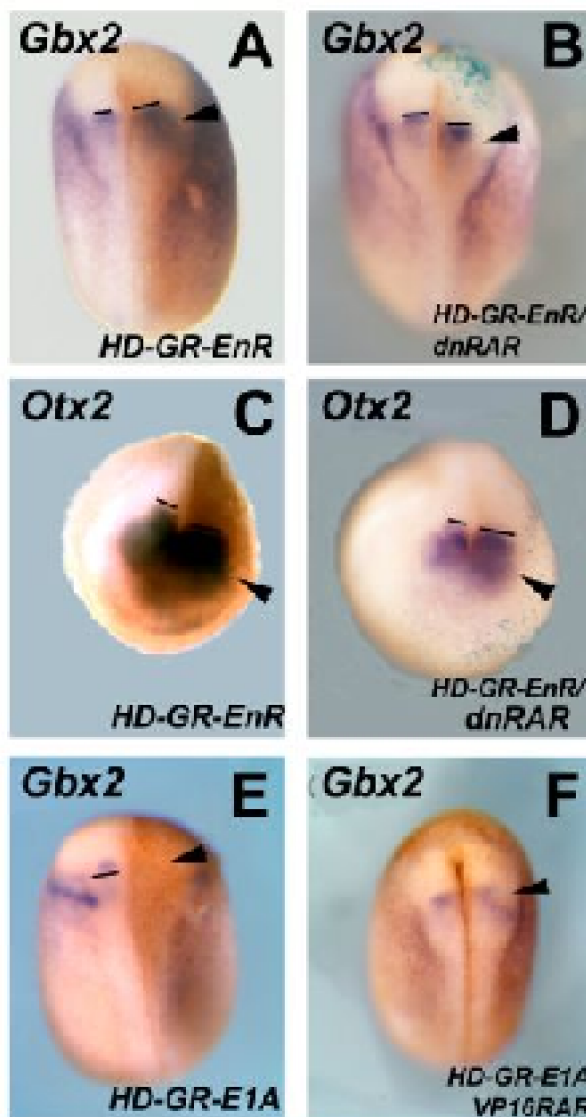


Figura 32. Interacción entre *Xiro1*, ácido retinoico y *Gbx-2*

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 1ng de cada RNA. Las fusiones inducibles fueron activada en estadio 12.5. (A, B) La inyección de *HD-GR-EnR* aumenta y desplaza hacia anterior la expresión de *Gbx-2* (A).

Al coinyectar el dominante negativo del receptor de ácido retinoico (dnRAR) en estos embriones la expresión de *Gbx-2* se mantiene elevada pero se mueve hacia posterior (B). **(C, D)** De acuerdo a lo observado en la expresión de *Gbx-2*, la expresión de *Otx-2* es restringida rostralmente en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* (C) y se expande en estos embriones al bloquear la función de ácido retinoico (D). **(E, F)** *Gbx-2* es inhibido en los embriones que sobreexpresan la fusión dominante activadora de *Xiro1* (E). La expresión de este gen es reestablecida al coinyectar la construcción dominante activadora de *Xiro1* junto a la construcción dominante activadora de ácido retinoico (*VP16-RAR*) (F).

Cada experimento se realizó dos veces con alrededor de 35 embriones para cada caso. Los porcentajes de efecto fueron cercanos a 65%. Puntas de flecha indican el fenotipo descrito.

6. Papel de la vía de señalización *Notch/Delta* en la formación del organizador del istmo

El sistema *Notch/Delta* es el principal mecanismo de señalización célula-célula descrito en el desarrollo embrionario. Como hemos demostrado, la interacción de tejidos expresando *Otx-2* y *Gbx-2* es suficiente para inducir los marcadores del organizador del istmo, como también para inducir la expresión de *Delta1*. *Delta1* posee un patrón dinámico de expresión que incluye numerosos territorios dentro del embrión. Para el momento en que la expresión inicial de *Fgf8* es detectada, *Delta1* se expresa en un dominio adyacente a la región anterior de expresión de *Xiro1* dentro de la placa neural (Figura 35A y de la Calle-Mustienes y cols., enviado a *Development*). Evaluamos el papel de este sistema en el desarrollo del límite entre el cerebro medio y posterior, para ello hicimos uso de construcciones, anteriormente descritas (McLaughlin y cols., 2000), que modifican la actividad de la señal *Notch* de forma autónoma celular. Las construcciones del tallo intracitoplasmático de *Notch* actúan positivamente sobre la vía *Notch* por sobreexpresión del efector directo (la región de repetidos de ankirina de *Notch* (*NICD* y *NICD-GR*)). La fusión de *Suppressor of Hairless* y los repetidos de ankirina (*Su(H)-ank-GR*) permite prescindir de la proteólisis de *Notch*, transformando este factor de transcripción de represor a activador y la construcción dominante negativo (*Su(H)-DBM-GR*) bloquea la acción de la vía *Notch* ya que posee mutado el sitio de unión al DNA. Así, el tallo intracitoplasmático de *Notch* es capturado en el núcleo pero este complejo es incapaz de unirse a los promotores de los genes blancos. La sobreexpresión, en un blastómero en estadio de dos células, del tallo intra citoplasmático de *Notch* inducible o no (*NICD-GR* y *NICD* respectivamente) o de una fusión dominante activadora inducible del factor de transcripción, componente de esta vía, *Suppressor of Hairless* (*Su(H)-ank-GR*) produce desplazamiento hacia anterior y expande la expresión de *Gbx-2* (Figura 33A, M y F, respectivamente). De forma opuesta, la inyección de una fusión inducible, que tiene mutado el dominio de unión al DNA y que actúa como dominante negativo de la función *Su(H)* (*Su(H)-DBM-GR*), genera embriones en los que la expresión

de *Gbx-2* está levemente desplazada hacia caudal (Figura 33T). *Otx-2* es restringido anteriormente en los embriones que poseen la vía Notch activada (Figura 33B, N y G). Sin embargo, aún cuando la expresión de *Otx-2* es restringida, la expresión de los marcadores mesencefálicos *Wnt1* y *Pax2* se observan desplazados hacia anterior y expandidos (Figura 33C, O, H y D, P, I respectivamente). No se detectó cambio significativo en la expresión de *Otx-2* en los embriones inyectados con *Su(H)-DBM-GR* (Figura 33U), sin embargo el patrón de expresión de *Wnt1* y *Pax2* es modificado en estos embriones, observándose disminución de su expresión (Figura 33V y W). Esto sugiere que la vía Notch podría participar en la inducción de las estructuras mesencefálicas. Además, analizamos el efecto de las construcciones que aumentan la señal Notch sobre *Fgf8*, *Xiro1* y los marcadores de tejido neural y pliegues neurales, *Xsox2* y *Xslug*. *Fgf8* aumenta su expresión en los embriones inyectados con *NICD*, *Su(H)-ank-GR* y *NICD-GR* (Figura 33E, J y Q). *Xiro1* es expandido anteriormente (Figura 33K y R) y *Xslug* aumenta su expresión en estos embriones, no observándose alteraciones en la expresión del marcador de tejido neural general *Xsox2* (Figura 33L y S). Estas observaciones sugieren que la vía Notch podría controlar la expresión de *Xiro1* y/o *Gbx-2* y a través de esta modificación, alterar el patrón de *Otx-2*. Finalmente, la vía Notch regularía la expresión de *Wnt1*, *Pax2* y *Xslug* de forma independiente a los efectos anteriormente descritos.

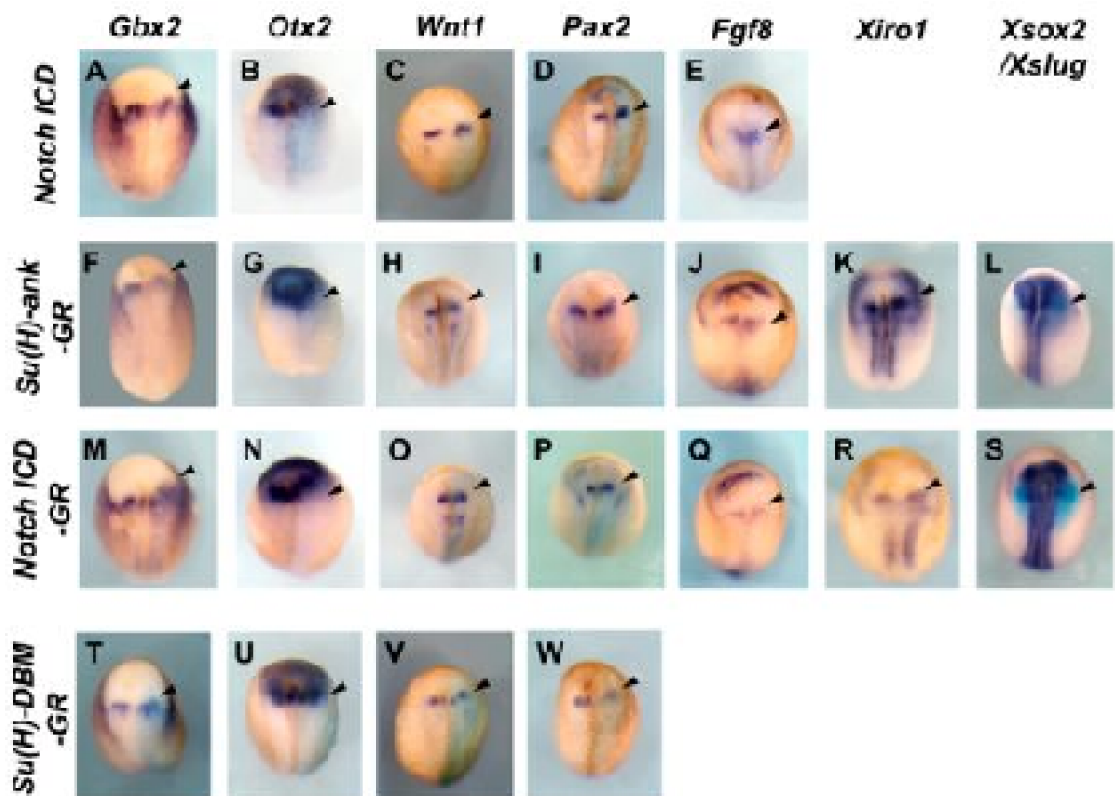


Figura 33. Efecto de la vía Notch sobre la formación del límite entre el cerebro medio y posterior

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio de dos células con 1ng del tallo intra celular de Notch inducible (M-S) o no (A-E) (*NICD-GR* y *NICD*), 0.5ng de la fusión dominante activadora inducible de *Suppressor of Hairless* (*Su(H)-ank-GR*)

(F-L) o 0.25ng de la construcción dominante negativa inducible de *Supressor of Hairless* (*Su(H)-DBM-GR*) (T-W) junto a FDax como marcador de linaje celular. Las fusiones inducibles fueron activadas en estadio de gástrula tardía y la expresión de los genes señalados analizada en estadio de neurula media. **(A,F,M,T)** La expresión de *Gbx-2* se expande hacia anterior en los embriones que sobreexpresan la vía Notch (A,F,M) y prácticamente no varía en los embriones en que la función Notch está bloqueada (T). **(B,G,N,U)** La expresión de *Otx-2* es restringida hacia anterior en los embriones en que se sobreexpresó las construcciones que activan la vía Notch (B, G, N) y no varía en los embriones expresando *Su(H)-DBM-GR* (U). **(C,H,O,V)** *Wnt1* es expandido y desplazado anteriormente en los embriones con la vía de Notch activada (C, H, O), mientras que la falta de función de Notch desplaza hacia anterior e inhibe la expresión de *Wnt1*. **(D,I,P,W)** *Pax2* se comporta de manera similar a lo observado para *Wnt1*. **(E,J,Q)** *Fgf8* aumenta y desplaza rostralmente su expresión en los embriones inyectados con las construcciones que activan la vía Notch. **(K,R)** La expresión de *Xiro1* no cambia significativamente los niveles de expresión pero es desplazado anteriormente en los embriones inyectados con *NICD-GR* y *Su(H)-ank-GR*. **(L,S)** La expresión de *Xslug* es expandida en estos embriones, modificación que no compromete la placa neural marcada por *Xsox2*. Los experimentos fueron realizados con 45 embriones y los porcentajes de efecto fueron cercanos al 58%. Las puntas de flecha indican los efectos señalados.

6.1. Interacción de *Otx-2* y la vía *Notch* en la inducción de *Pax2*

Para analizar, más directamente, la capacidad de la vía Notch de inducir genes mesencefálicos directamente investigamos en experimentos de hemisferios animales la habilidad de la vía Notch de inducir la expresión de *En-2*, *Wnt1* y *Pax2* en ectodermos que expresan además *Otx-2*. Los embriones fueron inyectados en estadio de una célula con transcritos de *Otx-2* o una combinación de mRNAs de *Otx-2* y de la construcción del tallo intra citoplasmático de Notch (*Notch ICD*). Los hemisferios animales de estos embriones fueron explantados en estadio 10, crecidos hasta estadio de neurula media cuando la expresión de *En-2*, *Pax2* y *Wnt1* fue analizada. La inyección de *Otx-2* fue incapaz de inducir la expresión de estos marcadores en este ensayo (Figura 34A, B y C). Del mismo modo, la coinyección de *Otx-2* y *Notch ICD* tampoco induce la expresión de *En-2* y *Wnt1* (Figura 34D y F), sin embargo *Pax2* es inducido por este tratamiento (Figura 34E), sugiriendo que la combinación de la señal Notch en células expresando *Otx-2* es suficiente para inducir la expresión de este gen.

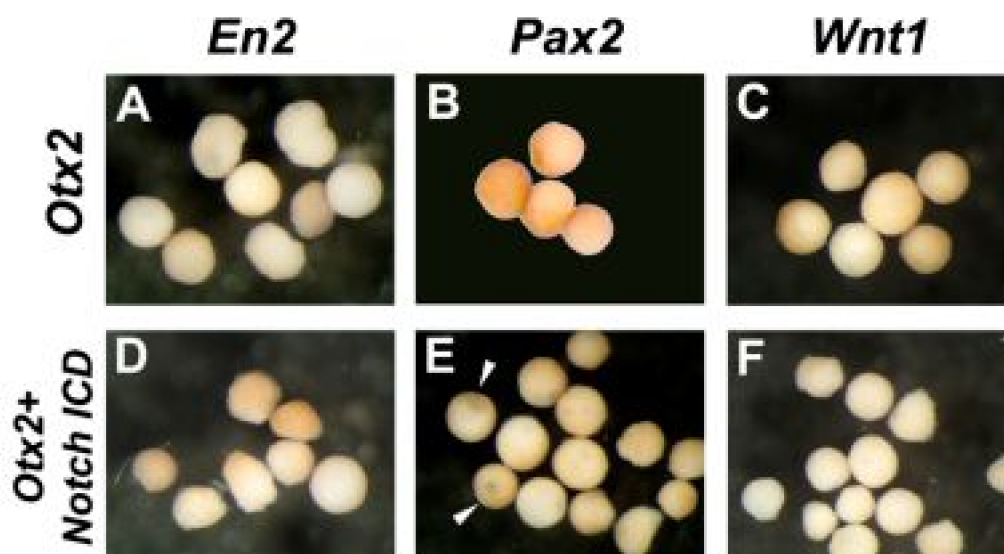


Figura 34. Interacción de la vía Notch y Otx-2

Los embriones fueron inyectados con 5ng de *Otx-2* o una combinación de 5ng de *Otx-2* y 1ng del tallo citoplasmático de Notch. Los hemisferios animales fueron explantados en 10 y la expresión de *En-2*, *Pax2* y *Wnt1* analizada en equivalente de estadio 17. (A,D) La expresión de *En-2* no fue inducida en estas condiciones (A,D: 0% n=13 y n=15). (B,E) *Pax2* no es inducido en los tejidos ectodérmicos que expresan *Otx-2* (B,0% n=17), mientras que es inducido débilmente en los hemisferios animales que sobreexpresan la combinación de *Otx-2* y *NICD* (E, 24% n=18). (C, F) *Wnt1* no es inducido por estos tratamientos (0% n=16 y n=12).

7. *Xiro1* controla la expresión de *Delta1*

Como se describió anteriormente, el sistema de señalización *Notch/Delta* se ha propuesto que participa en el establecimiento de bordes entre territorios. Debido al claro límite entre el cerebro medio y posterior y el efecto de la modificación de la actividad de este sistema sobre el istmo, investigamos si *Xiro*, involucrado en el establecimiento del organizador del istmo era capaz de regular también la expresión de *Delta1* (*DI*). Mediante la inyección en un blastómero en estadio de dos células, determinamos que *Xiro* y su fusión represora (*HD-GR-EnR*) reprimen la expresión de *DI* en el límite entre el cerebro medio y posterior, pero activa la expresión de *DI* en territorios cercanos al organizador del istmo (Figura 35B y C). Además, observamos que la inyección de *HD-GR-E1A* o *HD-GR* inhiben la expresión de *DI* (Figura 35D y E), sugiriendo que la función de *Xiro* es necesaria para la expresión de este gen. Estos datos sugieren que *Xiro* podría reprimir la expresión de *DI* en las células que expresan *Xiro*, pero activar la expresión de *DI* en las células adyacentes a las células que expresan *Xiro*. Para resolver esta actividad inductiva no autónomo celular de *Xiro* realizamos experimentos de conjugados. Embriones fueron inyectados en estadio de una célula, crecidos hasta estadio 10 cuando el tejido

ectodérmico, previamente inyectado con *Xiro1*, fue explantado y cultivado aislado o conjugado con tejido control inyectado con un marcador de linaje celular (FDAX) y/o expresando el receptor mutado de FGF (*XFD* o *dnFGFR4*) y la expresión de *Delta1* fue analizada en estadio de neurula media. *Xiro1* y no el marcador de linaje, es capaz de activar la expresión de *Delta1* en los hemisferios animales aislados (Figura 35F y G). Interesantemente, además de la activación observada en los explantes ectodérmicos inyectados con *Xiro1*, *Xiro1* es capaz de inducir la expresión de *Delta1* de forma no autónoma en el tejido control marcado con el marcador de linaje celular (Figura 35H e I). Esta inducción es dependiente de la señal de FGF en el tejido control como lo muestra la ausencia de expresión en los conjugados expresando las formas mutadas del receptor de FGF (Figura 35J y K).

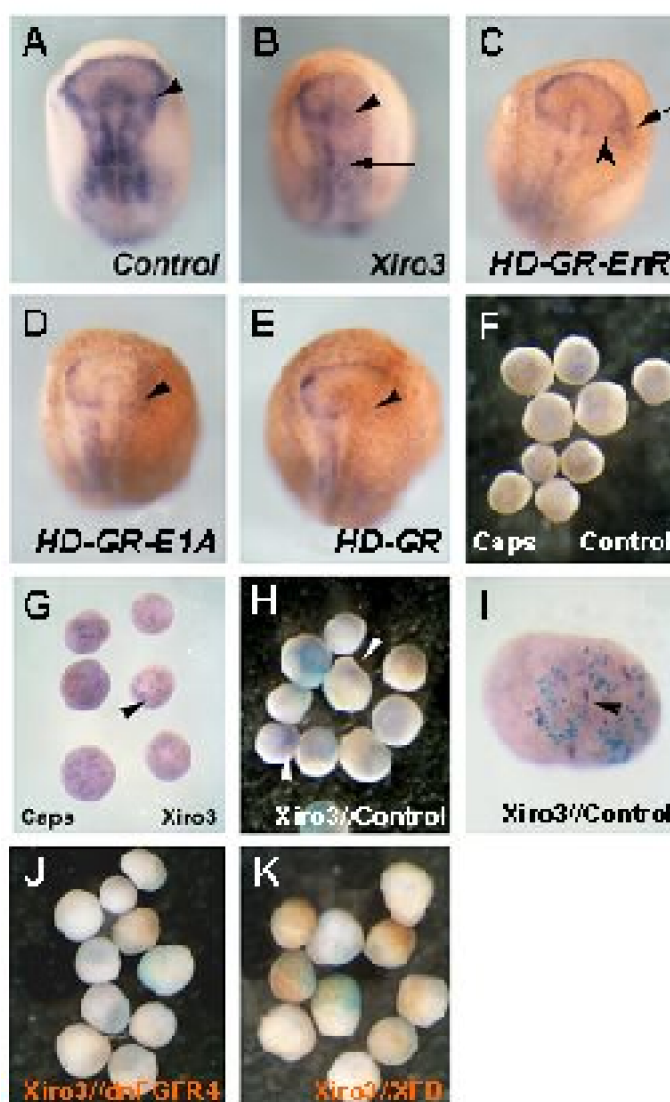


Figura 35. *Xiro* controla la expresión de *Delta1*

Los embriones fueron inyectados en un blastómero en estadio dos células. Las fusiones inducibles activadas en estadio de gástrula tardía y la expresión de *Delta1*

analizada en estadio 15. En los experimentos de hemisferios animales o conjugados los embriones fueron inyectados en estadio de una célula, los hemisferios animales explantados en estadio 10 y cultivados por separado o como conjugados hasta el equivalente de estadio 15 cuando la expresión de *Delta1* se analizó. **(A)** Expresión de *Delta1* (*DI*) en un embrión control (punta de flecha marca la expresión en el organizador del istmo). **(B)** *Xiro3* inhibe la expresión de *DI* en el istmo (punta de flecha) y la expande en la placa neural (flecha). **(C)** La sobreexpresión de *HD-GR-EnR* inhibe la expresión de *DI* en el istmo (punta de flecha) pero la induce en regiones más anteriores (flecha). **(D, E)** *HD-GR-E1A* y *HD-GR* inhiben la expresión de *DI*. **(F)** Hemisferios animales control no expresan *DI* en el estadio analizado. **(G)** La inyección de *Xiro3* promueve la expresión de *DI* en los hemisferios animales (87% n=23). **(H, I)** En los conjugados *DI* es inducido en el tejido control (64% n=34), sugiriendo una propiedad no autónoma de *Xiro* para inducir *Delta1*. **(J, K)** La señal no autónoma es FGF. La sobreexpresión del receptor mutado de FGF (*dnFGFR4* o *XFD*) bloquea la inducción de *Xiro* en el tejido control (5% n=21 y 0% n=23, respectivamente). En los conjugados el tejido control y el que expresa el receptor mutado fue inyectado además con FDAx como marcador de linaje celular.

Los experimentos de sobreexpresión en los embriones se realizaron con un número cercano a 50 embriones y el porcentaje fue próximo a 70%.

DISCUSIÓN

1. *Xiro1* controla el desarrollo del mesodermo dorsal reprimiendo la transcripción de *Bmp-4*

Los genes *Xiro1* y 2 han sido implicados en el control del desarrollo de la placa neural y se ha demostrado que regulan la expresión de los genes proneurales *Xash-3*, *ATH-3* y *Neurogenina* (Bellefroid y cols., 1998; Gómez-Skarmeta y cols., 1998). Se ha establecido recientemente que los efectos sobre el desarrollo de la placa neural son dependientes de la actividad represora de *Xiro1* sobre la transcripción ectodérmica de *Bmp-4* (Gómez-Skarmeta y cols., 2001). En esta tesis hemos descrito un nuevo papel para *Xiro1* en el desarrollo del mesodermo dorsal en *Xenopus*.

Hemos mostrado por primera vez que *Xiro1* es expresado en la región del organizador de Spemann, donde es capaz de controlar la expresión de genes del organizador como *Chordin* y *Gooseoid*. La expresión de *Xiro1*, en la zona dorsal marginal en involución, en una región que se superpone con el dominio de expresión de otros genes del organizador (*Chd*, *Gsc* y *Cer*), es compatible con una función de este gen regulando la expresión de genes del organizador. Usando proteínas quiméricas de *Xiro1*, que contienen el dominio represor y activador de proteínas conocidas, pudimos analizar si *Xiro1* funciona como represor o activador de los genes mesodérmicos. *Xiro1* y

Xiro-EnR produce los mismos efectos en los embriones inyectados, mientras que *Xiro-VP16* y *HD-GR-E1A* generan embriones con el fenotipo opuesto, indicando que *Xiro1* actuaría como represor transcripcional en el mesodermo (Lemaire y cols., 1998; Latinkic y Smith, 1999).

La observación que *Xiro1* actúa como represor transcripcional y que es capaz también de inducir la expresión de genes dorsales sugiere que el efecto sobre estos genes es indirecto. Este efecto podría ser mediado por la represión de otro factor, que a su vez reprime la expresión de los genes dorsales. En esta tesis se muestra que tal factor es probablemente BMP-4. Ciertamente, *Xiro1* inhibe la expresión de genes ventrales, incluyendo la transcripción de *Bmp-4*. Así, sugerimos que *Xiro1* es expresado en el mesodermo dorsal, donde ayuda a reprimir la expresión de *Bmp-4*. La inyección de *Xiro1* en el mesodermo ventral llevaría a una disminución de los niveles de actividad de BMP-4, induciendo la dorsalización de este tejido de manera similar a lo observado para la inyección de la forma dominante negativo del receptor de BMP (Schmidt y cols., 1995; Hoppler y Moon, 1998). Ya que la interferencia con la señal de BMP-4 suprime la expresión de *Xwnt8*, el efecto de *Xiro1* sobre *Xwnt8* es posiblemente debido a la reducción en la actividad de BMP-4 (Schmidt y cols., 1995; Hoppler y Moon, 1998).

En el proceso de dorsalización las señales del organizador (Chd, Noggin, etc.) inducen el corazón, riñón y los somitos. Se ha propuesto que este patrón de diferenciación dorso-ventral del mesodermo es producto de un gradiente de actividad de BMP-4 generado en el mesodermo (Dosch y cols., 1997; Eimon y Harland, 1999). Este gradiente emerge de la interacción entre BMP-4 y las proteínas secretadas por el organizador, como Noggin y Chordin, las que se unen a BMP-4 previniendo su señalización (Zimmermann y cols., 1996; Piccolo y cols., 1996). Aún cuando, al inicio de la gastrulación *Bmp-4* es expresado en el mesodermo dorsal, su expresión desaparece de esta región en estadio de gástrula media (Schmidt y cols., 1995; Hemmati-Brivanlou y Thomsen, 1995). En este estadio, las proteínas que unen BMP están siendo secretadas por el organizador, aún cuando ha sido demostrado que su actividad no puede reprimir la expresión de *Bmp-4* (Baker y cols., 1999). Nuestros resultados muestran que *Xiro1* reprime la expresión de *Bmp-4* en el mesodermo dorsal. Mientras que *Bmp-4* es inicialmente expresado en toda la zona marginal (mesodermo), *Xiro1* es transcrito en el organizador de Spemann, probablemente como consecuencia de las mismas señales que inducen el organizador. *Xiro1* entonces es capaz de reprimir la transcripción de *Bmp-4* en la región del mesodermo dorsal y contribuye así a la dorsalización de este tejido (Figura 36). Baker y cols. (1999) mostraron que la señal Wnt participa como represor de la transcripción de *Bmp-4* en la región dorsal del embrión. Es interesante notar que *Xiro1* es activado en el ectodermo dorsal por la señal Wnt (Gómez-Skarmeta y cols., 2001). Es tentador proponer que las mismas señales involucradas en la formación del centro de Nieuwkoop podrían ser las responsables de la activación de *Xiro1* en el mesodermo dorsal. Como la expresión de *Xiro1* no abarca completamente la región donde *Bmp-4* es reprimido, es posible sugerir que factores adicionales también participan en la represión de *Bmp-4*. Uno de estos factores podría ser el homólogo al gen de pez Cebra, *bozozok*. Este gen promueve la formación del mesodermo dorsal y neuroectodermo anterior mediante la inhibición de la actividad de BMP2/4 y de la vía Wnt (Melby y cols., 2000; Sirotkin y cols., 2000; Fekany-Lee y cols., 2000).

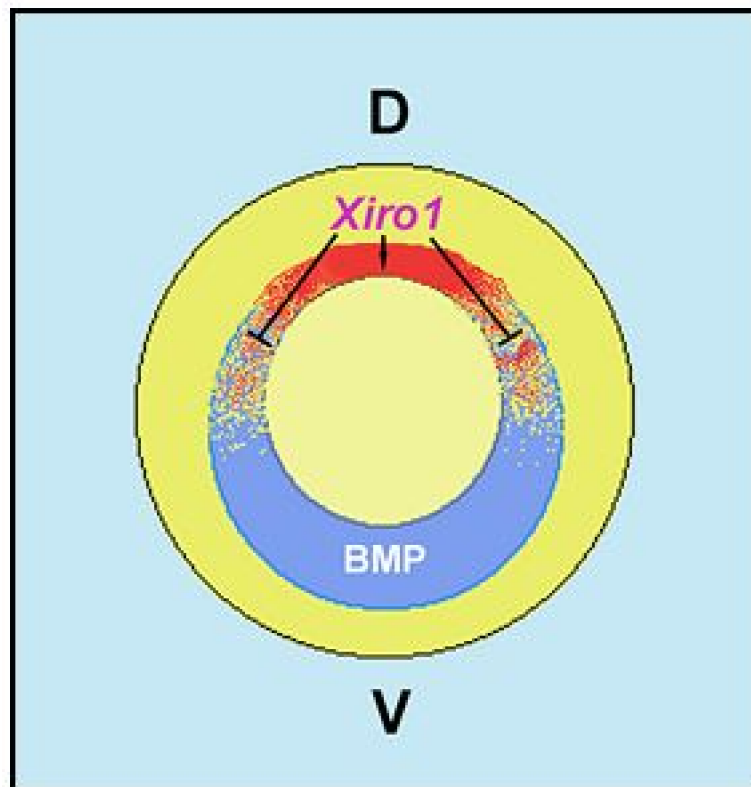


Figura 36. *Xiro1* controla el patrón del mesodermo mediante la represión de la expresión de *Bmp-4* en el Organizador de Spemann

Xiro1 es expresado en el mesodermo dorsal, posiblemente como consecuencia de la acción de las mismas señales que inducen el organizador de Spemann. En el mesodermo dorsal *Xiro1* actúa como represor transcripcional, reprimiendo la expresión del factor ventralizante *Bmp-4* (líneas negras). Así, *Xiro1* permite, mediante la represión de *Bmp-4*, la inducción del organizador (flecha) y en consecuencia de las moléculas dorsalizantes (Chordin, Noggin, etc.). Chordin y Noggin difundirían de la región dorsal (rojo), uniéndose a BMP-4 en las regiones lateral y ventral del mesodermo (azul), generando de esta manera un gradiente de actividad de BMP-4. Finalmente, el gradiente de actividad de BMP-4 se traduce en la diferenciación de los distintos tipos celulares derivados del mesodermo.

Gómez-Skarmeta y cols. (2001) y nosotros hemos observado que *Xiro1* inhibe la expresión de *Bmp-4* no solo en el mesodermo sino que también en el ectodermo (Figura 13). La disminución de BMP-4 llevaría a la neuralización del ectodermo y expansión de la expresión de los genes proneurales descrita previamente para las inyecciones de *Xiro* (Bellefroid y col., 1998; Gómez-Skarmeta y cols., 1998). Así, el ensanchamiento de la placa neural producido por la inyección de mRNA para *Xiro* (Gómez-Skarmeta y cols., 1998, 2001) es probablemente el resultado de la dorsalización del mesodermo y subsiguiente inducción neural del ectodermo en un territorio más amplio. Sin embargo, Gómez-Skarmeta y cols. (2001) ha reportado que los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* o *HD-EnR* no presentan alteraciones del mesodermo. De manera opuesta, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *Xiro1* produce una clara

modificación del patrón del mesodermo y formación de ejes secundarios. Una explicación para esta discrepancia podría relacionarse con el sitio de inyección. Gómez-Skarmeta y cols. (2001) realizaron inyecciones en el hemisferio animal mientras que nuestras inyecciones fueron dirigidas a la región ecuatorial del embrión. En esta tesis comparamos ambos tipos de inyecciones como se muestra, por ejemplo, en la Figura 13. Es claro que la represión diferencial de *Bmp-4* en el ectodermo o mesodermo depende del sitio de inyección. Así, nuestras observaciones apoyan la reinterpretación de los experimentos anteriormente publicados (Bellefroid y cols., 1998; Gómez-Skarmeta y cols., 1998, 2001) y son importantes para la correcta interpretación de los fenotipos de mutaciones nulas de los genes *Iro*, producidos en ratón.

Aún cuando nuestros resultados sustentan la conclusión que *Xiro1* es represor de *Bmp-4*, cierto puntos no pueden ser completamente explicados por nuestro modelo. Si *Xiro1* solo participase reprimiendo *Bmp-4*, las inyecciones de *Xiro1* deberían generar los mismos fenotipos producidos por la sobreexpresión del receptor dominante negativo de BMP-4. Si bien ambos tratamientos causan dorsalización, existen sin duda diferencias. Primero, *Xiro1* es incapaz de inducir ejes secundarios completos, y segundo, *Xiro1* produce disminución del marcador de cresta neural, *Xslug*, mientras que el receptor dominante negativo de BMP-4 expande la expresión de este marcador (Marchant y cols., 1998). Una posible explicación para esta diferencia es el mecanismo por el cual cada tratamiento disminuye la actividad de BMP-4. *Xiro1* regula la transcripción de *Bmp-4* mientras que la forma dominante negativa del receptor de BMP-4 bloquea la transducción de la señal, de esta forma cada modificación experimental altera la actividad de BMP-4 de manera diferente, llevando a distintos niveles efectivos de BMP-4. Ha sido determinado que la inducción de las células de la cresta neural requieren un nivel muy específico de actividad de BMP-4, el que improbablemente es alcanzado a través de la inhibición de la transcripción de *Bmp-4* (Marchant y cols., 1998; Nguyen y cols., 1998). Alternativamente, las diferencias observadas podrían ser explicadas por la acción de *Xiro1* sobre otros genes blanco. *Xiro1* es expresado en la región posterior de la placa neural y es inducido en el ectodermo por la combinación de inductores neurales y agentes posteriorizantes (Bellefroid y cols., 1998; Gómez-Skarmeta y cols., 1998). Es posible que *Xiro1* pueda poseer actividad posteriorizante, lo que podría explicar el porqué *Xiro1* no puede inducir ejes secundarios con estructuras anteriores normales.

En conclusión, en esta tesis hemos demostrado que Xiro1 se expresa en el organizador de Spemann donde reprime la transcripción de Bmp-4. Esta actividad represora de Xiro1 es necesaria para la especificación del mesodermo dorsal u Organizador de Spemann.

2. El mecanismo de posicionamiento del organizador del istmo está conservado en pollo/ratón y *Xenopus*: actividades de *Otx-2* y *Gbx-2*

En años recientes, nuevos hallazgos publicados en numerosos estudios han profundizado nuestro entendimiento de los mecanismos genéticos regulatorios que sostienen la especificación del organizador del istmo en el límite entre el cerebro medio y posterior (Broccoli y cols., 1999; Liu y cols., 1999, Martínez y cols., 1999; Millet y cols., 1999; Shamin y cols., 1999) y la naturaleza molecular de su actividad morfogenética (Crossley y cols., 1996; Meyers, 1998; Reifers y cols., 1998; Martínez y cols., 1999; Shamin y cols., 1999). Estudios en pollo, ratón y pez cebra convergen en mostrar que interacciones represivas mutuas entre los factores transcripcionales homeobox, de la clase *Otx* y *Gbx* posicionan el organizador del istmo en el primordio neural (Rhinn y Brand., 2001).

En esta tesis demostramos que mecanismos similares son conservados en *Xenopus* y hemos usado las ventajas de este modelo para estudiar en mayor detalle este proceso inductivo. Hemos analizado el patrón de expresión de los genes *Otx-2* y *Gbx-2* desde el estadio de gástrula hasta el estadio de neurula en embriones de *Xenopus*. Nuestros resultados muestran que durante la gastrulación la placa neural es dividida en un territorio anterior, *Otx-2* positivo, y un dominio posterior que expresa *Gbx-2*. En estadio de gástrula tardía, el dominio posterior de *Otx-2* se superpone con el territorio anterior de expresión de *Gbx-2*. En estadio de neurula temprana, los dominios de expresión de estos genes comienzan a separarse aún cuando mantienen un dominio de expresión tenue que se superpone. Es en este estadio cuando comienza la expresión de *Fgf8* en la región de solapamiento. Un patrón de expresión similar fue recientemente descrito en pollo (Garda y cols., 2001). Finalmente, en estadio de neurula media, el límite de los dominios de expresión de *Otx-2* y *Gbx-2* se define y no se detecta solapamiento de estos genes.

Analizamos la actividad transcripcional de *Otx-2* y *Gbx-2* realizando fusiones de las regiones de unión al DNA con los dominios activadores (E1A) y represores (En) (Friedman y cols., 1998; Jaynes y O'Farrell, 1991). Nuestros resultados indican que *Otx-2* y *Gbx-2* son probablemente represores transcripcionales, ya que el mismo fenotipo, ensayando la expresión de varios genes, es obtenido cuando los transcritos silvestres y las construcciones represoras son sobreexpresadas y el efecto opuesto es observado en los embriones inyectados con las fusiones activadoras. Así, la inyección de *Gbx-2* o su construcción represora desplazan la expresión de *Otx-2*, *Fgf8*, *Pax2*, *Wnt1* y *En-2* hacia posiciones más anteriores. Esto es similar a lo observado en los embriones de un ratón transgénico que expresa *Gbx-2* bajo el promotor de *Wnt1* (Millet y cols., 1999), o a lo observado en pez cebra y en pollo mediante expresión ectópica de este factor de transcripción (Katahira y cols., 2000; Rhinn y Brand, 2001). *Gbx-2* y su fusión represora modifican la expresión de *Xiro1*, posiblemente reprimiendo la expresión de *Otx-2* que mantiene la expresión de *Xiro1* en el cerebro medio.

Nuestros resultados también muestran que *Gbx-2* participa en la formación de las crestas neurales como represor transcripcional. En este momento no sabemos como *Gbx-2* controla la expresión del marcador de crestas neurales, *Xslug*. Sin embargo, ya que *Gbx-2* controla la expresión de moléculas de adhesión (King y cols., 1998) y ellas interactúan con proteínas del citoesqueleto y con moléculas accesorias, como b-catenina, es posible postular que la modificación producida por *Gbx-2* en el patrón de estas moléculas podría alterar la migración celular o modificar la señal neuralizante a través de

b-cateninas y de este modo expandir el dominio de expresión de *Xslug*.

La sobreexpresión de *Otx-2* o de su construcción represora produce el mismo fenotipo al observado en embriones de ratones mutantes en los que *Otx-2* es expresado ectópicamente en el romboencéfalo bajo el promotor de *En-1* (Broccoli y cols., 1999) o en embriones de pollo donde *Otx-2* fue expresado ectópicamente en el cerebro posterior (Katahira y cols., 2000): un desplazamiento posterior de los genes del organizador del istmo. Debe ser notado que en algunos embriones la expresión de *Gbx-2*, *Fgf8*, *Pax2*, *Wnt1* o *En-2* está casi completamente ausente. Esta observación puede ser explicada por la existencia de una región limitada de competencia en la cual estos genes pueden ser expresados. En otros vertebrados, experimentos de trasplantes e implantes usando bolitas cargadas con FGF8 han mostrado que tal región de competencia para la inducción del organizador del istmo efectivamente existe (Martínez y cols., 1991; Bally-Cuif y Wassef, 1994; Marin y Puelles, 1994; Crossley y cols., 1996; Martínez y cols., 1999). Debe hacerse notar que el tamaño del cerebro medio, y en consecuencia la región de competencia, en los embriones de *Xenopus* es más pequeña que en pollo o ratón, y así la probabilidad de estar en el área de competencia es menor en *Xenopus*.

En conjunto estas observaciones sugieren que, como en otros organismos, la represión mutua entre *Otx-2* y *Gbx-2* ocurre también en *Xenopus*. Esta interacción define la posición final del límite de expresión de estos factores de transcripción, el que a su vez posiciona el organizador del istmo, detectado por la expresión de *Fgf8*, *Wnt1*, *Pax2* y *En-2*.

Los experimentos previos relacionados con la interacción entre *Otx-2* y *Gbx-2* en la especificación del organizador del istmo han sido hechos en los animales completos, donde la posibilidad que señales adicionales provenientes de distintas regiones del embrión no ha sido descartada. En esta tesis hemos desarrollado un nuevo ensayo que permite el análisis de las interacciones celulares en forma aislada. Hemos encontrado que al conjugar hemisferios animales expresando *Otx-2* con hemisferios animales que expresan *Gbx-2* es suficiente para inducir marcadores del istmo como, *Fgf8*, *En-2* y *Wnt1*. Interesantemente, la expresión de *Fgf8* es en el tejido que expresa *Gbx-2*, mientras que la inducción de *En-2* ocurre en las células que expresan *Otx-2*, lo cual recapitula la situación observada en el embrión completo. Este nuevo ensayo *in vitro* para estudiar la inducción del organizador del istmo apoya evidencia indirecta recogida en ratón y pez cebra. En mutantes de pez cebra, que carecen de la notocorda, la polaridad antero-posterior del límite entre el cerebro medio y posterior es correctamente especificada, indicando que la inducción de este borde no requiere señales del mesodermo axial (Halpern y cols., 1993; Talbot y cols., 1995; Ang y Rossant, 1994; Weinstein y cols., 1994). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que en el embrión otros factores, además de *Otx-2* y *Gbx-2*, son requeridos para inducir alguno de los elementos del organizador del istmo. Ciertamente, apoyando esta posibilidad, en ratón la expresión inicial de *En-2* es independiente del límite *Otx-Gbx* (Acampora y cols., 1997). Nuestros resultados también sugieren que una señal producida por las células *Gbx-2* positivas, seguramente FGF8, actúa en las células que expresan *Otx-2* para inducir la expresión *En-2* y *Wnt1*. De esta manera, al interferir con la señal FGF, mediante la sobreexpresión de una forma dominante negativo del receptor de FGF (XFD), en el

territorio *Otx-2* la expresión de *En-2* es suprimida. Hay que notar que la expresión de *Fgf8* en el tejido que expresa *Gbx-2* parece depender de un ciclo de mantención, que involucra FGF y posiblemente *Wnt1*, entre las células *Otx-2* y *Gbx-2*, ya que al bloquear la vía FGF en el tejido *Otx-2* se inhibe la expresión de *Fgf8* en el tejido expresando *Gbx-2*. Aún cuando existe evidencia que XFD es capaz de bloquear otros ligandos de la familia FGF (Amaya y cols., 1991), la interpretación más simple de nuestros resultados es que XFD está bloqueando la señal de FGF8 producida por las células *Gbx-2*. Efectivamente, ha sido propuesto que *Fgf8* es el mediador de la actividad organizadora y es requerido para mantener la expresión de los marcadores del istmo (Reifers y cols., 1998; Crossley y Martín, 1995; Heikinheimo, 1994). Además, observamos que *Gbx-2* es capaz de inhibir la inducción de *En-2* en el tejido *Otx-2* sugiriendo que *Gbx-2* promueve la formación del cerebro posterior inhibiendo el desarrollo del cerebro medio. Por último, en nuestro ensayo, donde finalmente las interacciones célula-célula son las responsables de inducir el istmo, observamos inducción de *Delta1*, principal ligando de Notch. Esto permite pensar que el sistema Notch/Delta, principal mecanismo de señalización célula-célula, podría ser el responsable de las interacciones que producen la inducción de *Fgf8* en nuestros conjugados.

En conclusión, hemos sido capaces de demostrar, en un nuevo ensayo de células aisladas, que la interacción *Otx-2/Gbx-2* es suficiente para inducir el istmo y que el FGF8, producido por las células que expresan *Gbx-2*, es responsable de inducir el organizador del istmo.

3. Papel de *Xiro1* en el posicionamiento del organizador del istmo

Un trabajo previo ha mostrado que *Xiro1* funciona como represor transcripcional en la placa neural (Gómez-Skarmeta y cols., 2001), en esta tesis hemos descrito que participa como represor en el establecimiento del patrón dorso-ventral del mesodermo (Glavic y cols., 2001) y demostramos además que *Xiro1* es requerido para la expresión de varios marcadores del istmo actuando como represor transcripcional y participando en diferentes estadios del desarrollo regula la expresión de distintos genes y de este modo la posición del organizador del istmo.

3.1. *Xiro1* es requerido para la expresión de *Gbx-2*

Es claro de nuestro trabajo que la expresión de *Xiro1* precede la expresión de *Gbx-2*, y que este gen es activado inicialmente dentro del dominio de *Xiro1*. En embriones inyectados con *Xiro1* o una variante represora inducible (*HD-GR-EnR*) la expresión de *Gbx-2* es expandida. En contraste, en embriones inyectados con una forma dominante negativo inducible de *Xiro1* (*HD-GR*) o la variante dominante activadora (*HD-GR-E1A*), *Gbx-2* es reprimido. Adicionalmente, la expresión de *Xiro1* en hemisferios animales es

suficiente para inducir la expresión de *Gbx-2*. En conjunto estos resultados fuertemente apoyan la idea que *Xiro1* es requerido, como represor, para la expresión de *Gbx-2* en el organizador del istmo. Más aún, hemos encontrado que en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR*, *Gbx-2* es activado cuando la dexametasona (activación de la fusión inducible) se agrega en estadio de gástrula temprana o tardía. *Esto sugiere que Xiro1 activa la transcripción de Gbx-2 en estadio de gástrula tardía.*

3.2. *Xiro1* es requerido para la expresión de *Otx-2*

Xiro1 es coexpresado con *Otx-2* en el cerebro medio (Gómez-Skarmeta y cols., 1998 y esta tesis). Hemos encontrado una regulación positiva mutua entre estos dos genes. *Otx-2* activa *Xiro1* en hemisferios animales y *Xiro1* activa la expresión de *Otx-2* en embriones y en hemisferios animales (esta tesis y Gómez-Skarmeta y cols., 2001). También observamos activación de *Otx-2* en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* y posterior inducción en gástrula temprana, pero no cuando la dexametasona fue agregada en estadio de gástrula tardía. Más aún, al interferir con la función de *Xiro1*, en estadio de gástrula temprana, mediante la sobreexpresión de *HD-GR* o *HD-GR-E1A* la expresión de *Otx-2* es inhibida. *Esto indica que Xiro1 es requerido durante gástrula temprana, como represor, para la expresión de Otx-2.*

3.3. Efectos de *Xiro1* sobre el posicionamiento del istmo

La posición del organizador del istmo resulta del balance de la represión mutua entre *Otx* y *Gbx* (esta tesis; Millet y cols., 1999; Broccoli y cols., 1999; Katahira y cols., 2000). Ya que *Xiro1* participa en la activación de ambos genes, ayuda también al posicionamiento del límite entre el cerebro medio y posterior. Sobreexpresión de *Xiro1* durante la gastrulación produce activación ectópica de *Otx-2* en posiciones más caudales dentro del embrión. Esto promueve el desplazamiento posterior de la posición del istmo, indistintamente que *Xiro1* expande además la expresión de *Gbx-2* en neurula temprana. El desplazamiento hacia posterior es observado también en los embriones inyectados con *HD-GR-EnR* y tratados con dexametasona en gástrula temprana, pero no cuando la hormona es agregada en gástrula tardía. En esta última condición, *Xiro1* ya no puede activar la expresión de *Otx-2*, pero puede activar *Gbx-2*, lo que desplaza el límite entre el cerebro medio y posterior hacia anterior, reprimiendo la expresión de *Otx-2*.

No sabemos como *Xiro1* puede activar dos genes diferentes, *Otx-2* y *Gbx-2*, en dos lugares y momentos diferentes. Una posibilidad es que *Xiro1* podría actuar en colaboración con otros factores como ácido retinoico, Fgf o la señal Wnt, los que han sido involucrados previamente en la posteriorización de la placa neural y en la inducción de *Gbx-2* (Gvalas y Krumlauf, 2000; Gamse y Sive, 2000).

3.4. *Xiro1* es suficiente y necesario para la expresión de *Fgf8*

Los efectos de *Xiro1* sobre la expresión de *Fgf8* no son explicados por su efecto sobre

Otx-2 y *Gbx-2*. La interferencia con la función de *Xiro1* suprime completamente la expresión de *Fgf8*. Esto no es producto de la ausencia de *Gbx-2*, ya que la forma dominante negativo de *Gbx-2* no reprime la expresión de *Fgf8*, además, en embriones en los que la función *Xiro1* es reprimida y se restituyó niveles de *Gbx-2* que reestablecen la expresión normal de *Otx-2*, no existe expresión de *Fgf8*. Este resultado sugiere que *Xiro1* es absolutamente necesario para la expresión de *Fgf8* y que *Otx-2* y *Gbx-2* no son suficientes para la activación de *Fgf8*. De acuerdo con este resultado, en embriones mutantes para *Gbx-2*, *Fgf8* es inicialmente expresado pero no se mantiene en el tiempo (Wassermann y cols., 1997). Por otra parte, la sobreexpresión de *Xiro1* y *HD-GR-EnR* produce ensanchamiento del dominio de expresión de *Fgf8*. Esto podría ser consecuencia de un más amplio solapamiento de los territorios de expresión de *Otx-2* y *Gbx-2*, proceso que ha sido propuesto como responsable de la activación de *Fgf8* en pollo (Garda y cols., 2001). Establecimos que este no es el caso, *Xiro* es capaz de inducir efectivamente la expresión de *Fgf8* en ensayos de hemisferios animales y más aún, *Xiro* induce la expresión de *Fgf8* en los hemisferios animales en presencia de las construcciones que interfieren con las funciones de *Otx-2* y *Gbx-2*. *Esto muestra que Xiro puede activar directamente la expresión de Fgf8 en ectodermo que carece de las actividades de Otx-2 y Gbx-2.*

Usamos también el ensayo *in vitro* desarrollado en esta tesis para analizar el papel de *Xiro1* en la inducción del organizador del istmo. Conjugados de hemisferios animales expresando *Otx-2*, por un lado, y *Xiro1*, por el otro, inducen la expresión de *En-2* en el hemisferio *Otx-2* y *Fgf8* en el hemisferio *Xiro1*. Este resultado es el esperado si *Xiro1* esta activando la expresión de *Gbx-2*, el que a su vez interactúa con el hemisferio *Otx-2*. Además de este papel de *Xiro1* en la inducción del istmo, encontramos que la actividad de *Xiro1* es requerida en el tejido *Otx-2*, ya que la coexpresión de *Otx-2* y una forma dominante negativo de *Xiro1* bloquea la inducción de *En-2*. Así, la regulación mutua de *Otx-2* y *Xiro1* genera un dominio de coexpresión de estos genes (cerebro medio), coexpresión que es probablemente necesaria para definir la competencia de las células a la inducción producida por la señal (posiblemente FGF), proveniente de las células que expresan *Gbx-2*. La expresión cefálica de los genes *Iro* en pollo y ratón correlaciona, exactamente, con la región del diencéfalo que produce organizadores del istmo ectópico como respuesta a los transplantes de cerebro medio e implantes de bolitas embebidas con FGF8 (Bosse y cols., 1997; Bosse y cols., 2000; Alvarado-Mallart, 1993; Crossley y cols., 1996). *En conclusión, nuestros resultados muestran que Xiro1, además de regular la expresión de Otx-2 y Gbx-2 en distintos estadios, y de probablemente activar directamente Fgf8, le confiere al tejido que expresa Otx-2 la competencia para responder a las señales inductivas que especifican el istmo.*

Hasta aquí hemos abordado el papel de los genes *Iro* en el desarrollo de *Xenopus*, en particular en la formación del eje dorso-ventral del mesodermo y en relación con el límite entre el cerebro medio y posterior, y la función de los genes *Otx-2* y *Gbx-2* en la inducción y posicionamiento del organizador del istmo. Esta región de la placa neural corresponde a uno de los dominios especificados en el eje antero-posterior del embrión. A continuación analizaremos el papel del mesodermo y de las señales posteriorizantes en el establecimiento del organizador del istmo y como estos elementos se relacionan con los genes previamente descritos.

3.5. Un modelo para el posicionamiento del organizador del istmo

Con los datos hasta aquí presentados proponemos el siguiente modelo para el posicionamiento del organizador del istmo en *Xenopus* (Figura 37). En este modelo algunos de los elementos son similares a los encontrados en pollo y ratón, sin embargo, importantes nuevos componentes, encontrados en esta tesis, son incluidos. En estadio de gástrula (Figura 37A) existe en la región caudal del cerebro medio, activación recíproca entre *Otx-2* y *Xiro1*. Estas interacciones ayudan a mantener la coexpresión de estos dos genes, la cual es necesario para definir el dominio de competencia a las señales que inducen el istmo (*En-2*). Durante el estadio de gástrula tardía-neurula temprana, *Xiro1* activa la expresión de *Gbx-2* (Figura 37A y B). Esto produce la superposición de las expresiones de *Otx-2* y *Gbx-2* en la región presuntiva del istmo. En este territorio, en parte como consecuencia de la acción de *Xiro1*, así como también por la interacción *Otx-2/Gbx-2*, se activa la expresión de *Fgf8* en la región presuntiva del organizador del istmo (Garda y cols., 2001; Figura 37B). *Fgf8* y *Gbx-2* inician un ciclo de regulación positiva. Entonces, la represión mutua de *Gbx-2* y *Otx-2* transforman la interfase del istmo presuntivo en un límite definido (Figura 37C). *Xiro1* luego es requerido en el territorio *Otx-2* para la inducción de *En-2* (y probablemente *Wnt1*), vía FGF8 producido en las células *Gbx-2* positivas. El organizador del istmo se perpetúa mediante las interacciones entre *Fgf8*, *En-2* y *Wnt1*.

Aún cuando mostramos evidencia para este modelo en embriones de *Xenopus*, los patrones de expresión de varios genes *Iro* en ratón, pollo y pez cebra son compatibles con nuestro modelo. En *Xenopus*, *Xiro1*, 2 y 3 son expresados en el límite entre el cerebro medio y posterior (Bellefroid y cols., 1998; Gómez-Skarmeta y cols., 1998). En un trabajo reciente Sato y cols., (2001) muestran que en pollo el territorio positivo para *Irx-2* es capaz de responder a la señal Fgf8b en la región del organizador del istmo. Futuros experimentos son requeridos en estos organismos para establecer el papel de los genes *Iro* en la especificación del organizador del istmo.

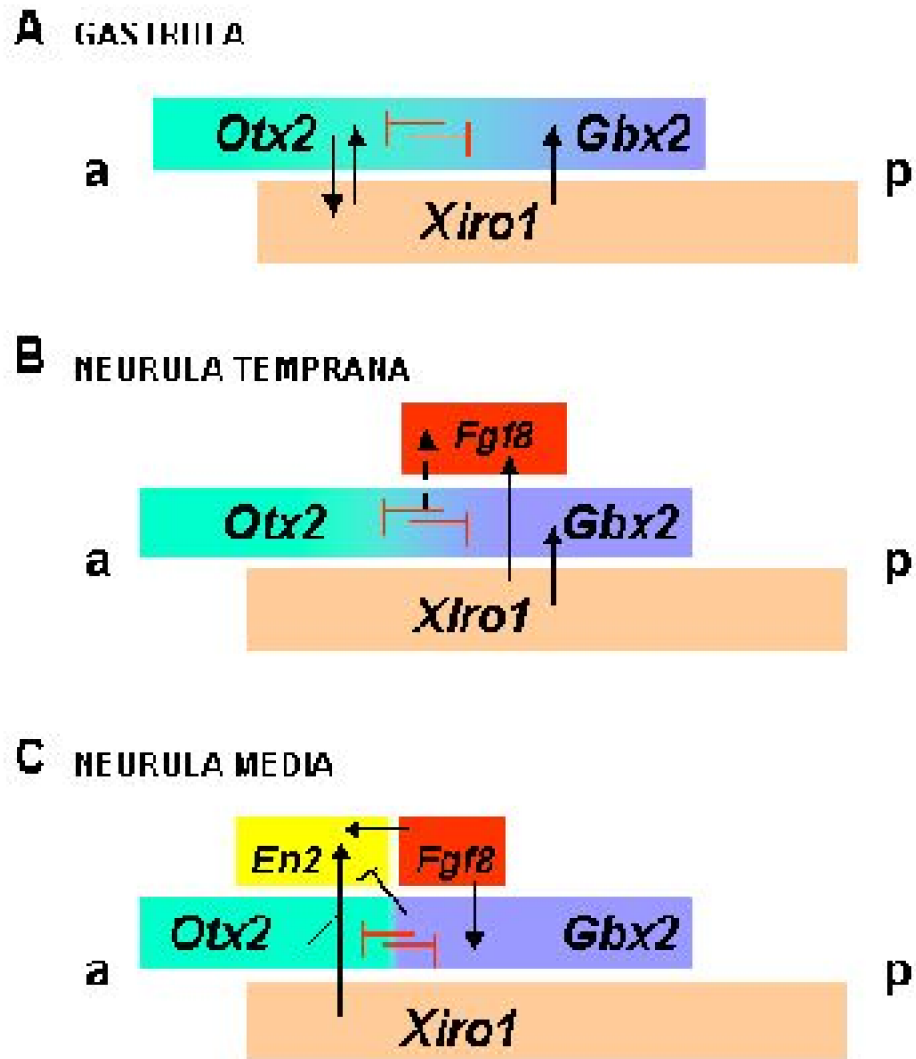


Figura 37. Modelo para la inducción y posicionando del organizador del istmo

(A) En gástrula tardía. *Xiro1* abarca el dominio de expresión *Gbx-2* y el territorio presuntivo del cerebro medio de *Otx-2*, promoviendo (flechas) la expresión de *Otx-2* y *Gbx-2* en dominios complementarios. Además, *Otx-2* activa la expresión de *Xiro1* en el cerebro medio durante los estadios tempranos de desarrollo. En este estadio empiezan las actividades represivas mutuas de *Otx-2* y *Gbx-2* (líneas rojas). (B) Neurula temprana. El dominio de expresión débil que se superpone entre *Otx-2* y *Gbx-2* empieza a ser restringido. El desplazamiento de *Gbx-2* hacia *Otx-2* podría ser debido a la actividad inductiva de *Xiro1* (flecha). En este estadio, como resultado del dominio de solapamiento creado por *Otx-2* y *Gbx-2* (flechas punteadas) y la actividad de *Xiro1* en esta región (flecha), comienza la expresión de *Fgf8* y por consiguiente el establecimiento del istmo. (C) Neurula media. Emerge el límite claro entre las expresiones de *Otx-2* y *Gbx-2*, probablemente debido al equilibrio alcanzado por sus actividades inhibitorias mutuas (líneas rojas). La interacción entre *Otx-2* y *Gbx-2* mantiene *Fgf8*, la que refuerza la expresión de *Gbx-2* en la cara caudal del istmo (flecha). Además, *Fgf8* induce la

expresión de *En-2* en el territorio competente, definido por la coexpresión de *Otx-2* y *Xiro1*, por otra parte, *Gbx-2* reprime la expresión de *En-2*. a: anterior, p: posterior.

Es interesante notar que en *Drosophila* los genes *Iro* participan en la formación de bordes organizadores durante el desarrollo de los discos imaginales (Cavodeassi y cols., 2001). Aquí hemos encontrado una función similar para los genes *Iro* en el desarrollo del cerebro de vertebrados. El patrón de expresión restringido de varios genes *Iro* en los rombómeros de vertebrados, los que se comportan como compartimentos (revisado por Lumsden y Krumlauf, 1996), abren la posibilidad que los genes *Iro* sean elementos comunes en las vías genéticas requeridas para la generación de bordes entre territorios.

4. Papel del mesodermo axial en la inducción del organizador del istmo

El mesodermo axial (notocorda y mesodermo precordial) es el tejido embrionario al que se le han asignado las propiedades transformantes que dan origen a los distintos tipos celulares a lo largo del eje antero-posterior de *Xenopus*. En el mesodermo precordial se expresan moléculas (Cerberus y Dickkopf) secretadas que determinan en las células de la placa neural propiedades anteriores, por otra parte en la región posterior de la notocorda se expresan distintos factores de crecimiento fibroblástico, los que poseen propiedades posteriorizantes. Las señales verticales emitidas por la notocorda, ubicadas bajo el ectodermo, son capaces de inducir la expresión de *Fgf8*, *Otx-2* y *Gbx-2* en conjugados con ectodermo competente. Estas mismas señales, producidas por el mesodermo dorsal, pueden viajar en el plano del ectodermo y activar la expresión de estos genes en nuestros explantes de Keller. Así, tanto vertical como planarmente las señales presentes en el mesodermo dorsal pueden activar la expresión de los genes que finalmente establecen el istmo.

La activación de *Otx-2* y *Gbx-2* producida en los conjugados de notocorda y ectodermo competente, sugiere que en la notocorda están presentes las moléculas capaces de imprimir exactamente en el ectodermo el patrón antero-posterior observado en el embrión, además estas propiedades se encuentran segregadas en el mesodermo axial, ya que la región anterior de la notocorda carece de la capacidad de inducir la expresión de *Gbx-2*, pero es capaz de inducir la expresión de *Otx-2*. No sabemos si el segmento anterior de la notocorda induce la expresión de *Fgf8* y si la activación de este gen depende en los conjugados de la interacción entre *Otx-2* y *Gbx-2*. Estos son puntos que en el futuro pueden ser resueltos con esta aproximación experimental.

5. Papel de los agentes posteriorizantes en el establecimiento del istmo

5.1. Papel del Ácido retinoico en el posicionamiento del organizador del istmo

Ácido retinoico regula la posición del límite entre el cerebro medio y posterior. Como agente posteriorizante transforma regiones anteriores del embrión en más caudales. Así, la falta de función de ácido retinoico se traduce en la disminución y desplazamiento caudal de la expresión de *Gbx-2* y expansión hacia posterior del territorio de *Otx-2* (Blumberg y cols., 1997; esta tesis). Esta modificación de los principales genes que participan del posicionamiento del límite entre el cerebro medio y posterior lleva al desplazamiento caudal de los marcadores del istmo. Además, este tratamiento expande los dominios mesencefálicos. Estos datos sugieren que ácido retinoico es un componente río arriba de *Gbx-2* y *Otx-2* y de esta manera participa en el posicionamiento del istmo. De hecho, *Gbx-2* parece ser el responsable final de la restricción de *Otx-2*, ya que la restricción producida por la forma dominante activadora del receptor de ácido retinoico es bloqueada si el embrión carece de la función de *Gbx-2*. Es necesario notar que la sobreexpresión y falta de función de ácido retinoico modifican de forma similar el patrón de expresión de *Xiro1*, esto es, producen una expansión hacia anterior. El cambio observado sobre *Xiro1* puede interpretarse del siguiente modo: la falta de función expande el dominio mesencefálico de *Xiro1* y por otra parte, el aumento de la función de ácido retinoico posterioriza la región anterior de *Xiro1*, esto permite que la expresión espinal de *Xiro1* se expanda hacia la región cefálica. Sin embargo, los datos que tenemos hasta el momento no nos permiten postular un mecanismo para explicar esta observación. Por último, la transcripción de *Delta1*, gen que se expresa, entre otros, en la región adyacente al cerebro medio en *Xenopus*, depende de la función ácido retinoico en cuanto su posición y su nivel de expresión. En particular la placoda del trigémino, donde *Delta1* es expresado, es especialmente sensible a la señal de ácido retinoico.

5.2. Papel de FGF y la señal Wnt en la formación del organizador del istmo

Ha sido documentado en ratón y pollo que FGF8 es la principal molécula en la formación del organizador del istmo. Esta molécula secretada es absolutamente necesaria para el desarrollo del límite entre el cerebro medio y posterior, posee la capacidad de inducir la expresión de *Gbx-2* y activar la expresión de *Wnt1* en el dominio mesencefálico de *Otx-2*. Por otra parte, *Wnt1*, el otro morfógeno secretado en esta región, es necesario para mantener el organizador y para el desarrollo de estructuras derivadas del cerebro medio en ratón (Joyner, 1996). En *Xenopus*, FGF y la señal Wnt han sido propuestas como agentes posteriorizantes (Gamse y Sive, 2000). Hemos utilizado construcciones dominantes negativos para interferir con la señal de FGF y Wnt y analizar de este modo el papel de estas rutas de señalización en el establecimiento del istmo. El principal efecto de interferir con la vía Wnt es la expansión de la expresión de *Fgf8*, esto sugiere que Wnt restringe la expresión de este gen. El aumento de la expresión de *Fgf8* puede explicar el aumento de *Gbx-2*, aún cuando es posible que Wnt directamente reprima la expresión de

Gbx-2. De forma similar, la falta de señal Wnt sugiere que esta es necesaria para mantener la expresión de *Otx-2* en el cerebro medio, por otra parte este fenotipo puede ser explicado en términos del aumento de *Fgf8*. FGF8, a través de *Gbx-2* podría inhibir la expresión de *Otx-2* del cerebro medio. Al bloquear la función de FGF (*dnFGFR4*) la expresión de *Fgf8* disminuye y se desplaza hacia posterior, sugiriendo un ciclo de mantención de su expresión o que FGF, actuando como posteriorizante, induce la expresión ístmica de *Fgf8*. Como ha sido descrito para ratón, *Fgf8* es necesario para mantener la expresión de *Gbx-2* en el rombómero 1. Sin embargo, aún cuando la expresión de *Gbx-2* es desplazada caudalmente y disminuye, la expresión de *Otx-2* es restringida hacia anterior o bien inhibida. Este fenotipo puede ser explicado por la disminución de *Fgf8*, esto se traduciría en la ausencia de expresión de *Wnt1*, de esta manera en la desaparición del cerebro medio y en consecuencia de la expresión de *Otx-2* en este territorio. Este comportamiento sugiere que el papel principal de estas vías en el desarrollo del organizador no es a través de su actividad posteriorizante, si no más bien en establecer los ciclos de mantención que perpetúan el istmo. Así, la señal FGF induciría o mantendría la expresión de *Fgf8*, esta molécula induciría a su vez la expresión de *Wnt1* y mantendría la expresión de *Gbx-2*, de la misma manera a lo que ocurre en ratón y pollo, ambos elementos definirían la formación del cerebro medio y el límite caudal de *Otx-2* respectivamente. Por otra parte, *Wnt1* podría contrarrestar el efecto inductor de FGF sobre *Fgf8*. De este modo sería consolidado el organizador (Figura 38).

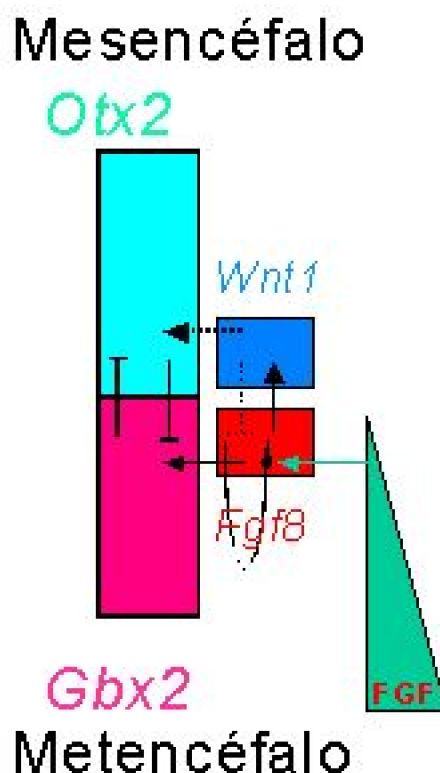


Figura 38. Papel de FGF y Wnt en la mantención del istmo

La expresión *Fgf8* en la región del istmo es inducida por *Xiro1* y/o por FGF proveniente desde la región posterior del embrión (flecha verde), la posición es

determinada por el equilibrio entre las actividades represoras mutuas de *Otx-2* y *Gbx-2* (líneas en negro). La expresión de *Fgf8* en la región caudal del istmo sostiene la expresión de *Gbx-2* y es mantenida por FGF o *Gbx-2*. Además, la señal FGF induce la expresión de *Wnt1* (flechas negras continuas). Por otra parte *Wnt1* mantiene la expresión de *Otx-2*, permitiendo el desarrollo del mesencéfalo (cerebro medio), y posiblemente restringe la expresión de *Fgf8* (flechas negras punteadas). De este modo al bloquear la actividad de FGF (*dnFGFR4*) la expresión de *Fgf8* y *Gbx-2* disminuye. La falta de señal FGF en el cerebro medio, posiblemente evita la inducción de *Wnt1*, lo que finalmente se traduce en la inhibición de la expresión de *Otx-2* en esta región. Por otra parte, al inhibir la vía Wnt, la expresión de *Fgf8* y *Gbx-2* se expande. Así, la actividad represora de *Gbx-2* junto a la falta de señal Wnt inhibe la expresión de *Otx-2* en el cerebro medio.

6. Interacciones de ácido retinoico, *Xiro1* y *Gbx-2*

El aumento de la función de ácido retinoico, *Xiro1* y *Gbx-2* desplaza rostralmente el organizador del istmo. La restricción de *Otx-2* hacia anterior observada con ácido retinoico y *Xiro1* es a través de *Gbx-2*, ambos elementos convergen en este factor de transcripción que, como hemos definido previamente, reprime la expresión de *Otx-2*. Así, la sobreexpresión de *VP16-RAR*, que aumenta la expresión de *Gbx-2* y en consecuencia mueve el límite caudal de *Otx-2* hacia anterior, junto a la forma dominante activadora de *Gbx-2* (*Gbx-E1A*) es suficiente para restablecer el patrón normal de expresión de *Otx-2*. Del mismo modo, el aumento de la función *Xiro1* (*HD-GR-EnR*) en estadio de gástrula tardía, activa y mueve hacia rostral la expresión de *Gbx-2*, reprimiendo la expresión de *Otx-2* del cerebro medio. Este efecto es bloqueado cuando *HD-GR-EnR* es coinyectado con la forma dominante activadora inducible de *Gbx-2* (*Gbx-GR-E1A*). En estos embriones la expresión de *Fgf8* esta desplazada hacia anterior pero, como mencionamos, el límite caudal de *Otx-2* esta desplazado hacia posterior. Experimentos realizados en pollo de implantes de bolitas embebidas en FGF8 mostraron que *Otx-2* es reprimido y *Gbx-2* activado en el dominio en que el primero es inhibido (Crossley y cols., 1996). En este estudio no fue posible definir si FGF8 directamente reprime *Otx-2* o es *Gbx-2*, inducido por FGF8, quien inhibe *Otx-2*. En este contexto, nuestros resultados sugieren que la inhibición de *Otx-2* que produce FGF8 en pollo es a través de *Gbx-2*. Todo lo anterior indica que, tanto *Xiro1* como ácido retinoico restringen la expresión de *Otx-2* a través de la activación de *Gbx-2* en posiciones más anteriores. Parece ser que entre *Xiro1* y ácido retinoico no existe una jerarquía en cuanto la regulación de *Gbx-2*, más bien ambos son elementos que activan la transcripción de este gen de forma independiente, ácido retinoico definiendo la posición antero-posterior y *Xiro1* el nivel de expresión. Como señalamos, *Xiro1* y ácido retinoico activan de manera diferente la expresión de *Gbx-2* (von Bubnoff y cols., 1995; esta tesis), así al aumentar la función de *Xiro1* y reprimir la función de ácido retinoico, la expresión de *Gbx-2* aumenta pero se desplaza hacia caudal y *Otx-2* en consecuencia se extiende en la misma dirección. Por otra parte, la sobreexpresión de *VP16-RAR* y la forma dominante activadora de *Xiro1* (*HD-GR-E1A*), que bloquea la función de *Xiro1*, produce embriones con expresión más

tenue de *Gbx-2*, pero desplazada hacia anterior. Por otra parte, el aumento en la señal de ácido retinoico (RA), en embriones, expande la expresión de *Fgf8* aún en presencia de la forma dominante activadora de *Gbx-2*, sugiriendo que RA y *Xiro1* son capaces de inducir *Fgf8* y confirma el papel de *Gbx-2* como elemento que solamente regula la posición del organizador del istmo. Es interesante notar que hemos determinado cuatro elementos en la regulación de la expresión de *Gbx-2*: la actividad de dos morfógenos (RA y FGF) y la actividad de dos factores de transcripción (*Otx-2* y *Xiro1*). Es posible imaginar el siguiente escenario, *Xiro1* y RA convergen en activar y definir el límite rostral de la expresión de *Gbx-2*, directamente o a través de la regulación de *Fgf8*. Es posible pensar entonces en un nuevo nivel de regulación, donde estos elementos actuarían sobre *Fgf8* y este sobre *Gbx-2*. El límite anterior de expresión de *Gbx-2* compite con la actividad represora de *Otx-2* desde la región anterior, definiendo el límite anterior de la expresión de *Fgf8* y así la posición del istmo. *Fgf8* mantiene luego la expresión de *Gbx-2* en el romboencéfalo. En este modelo especulativo para definir la expresión de *Gbx-2* es necesario incluir un factor que restringe la expresión en la región caudal, este podría ser mayores concentraciones de los morfógenos (RA, FGF o Wnt), que actuando como posteriorizantes definirían las identidades de las regiones posteriores al rombómero 1 (Figura 39). RA es el candidato más probable ya que ha sido involucrado en el patrón del cerebro posterior (Gvalas y Krumlauf, 2000). Sin embargo, Wnt8 y eFGF reprimir la expresión de *Gbx-2* en posiciones más caudales.

7. La vía Notch participa en el posicionamiento del istmo y en el desarrollo del cerebro medio

La vía Notch/Delta es el principal mecanismo de señalización célula-célula descrito durante la embriogénesis de vertebrados e invertebrados. Se ha demostrado su participación en un sin número de procesos entre los que se destacan: neurogénesis, segmentación de somitos y establecimiento de compartimentos en *Drosophila*. La activación de Notch por Delta produce la proteólisis del primero en la cara interna de la membrana plasmática. Este fragmento citoplasmático de Notch se mueve al núcleo de la célula donde interactúa con el represor transcripcional Supresor of Hairless, transformándolo en activador de la transcripción. Nuestros resultados muestran que la activación ectópica de la vía Notch induce la expresión de *Gbx-2* en posiciones más rostrales y en consecuencia restringe la expresión de *Otx-2*, con el consiguiente movimiento del istmo hacia anterior. Este efecto probablemente se debe a la activación de *Fgf8* que produce esta vía. Como mencionamos previamente, FGF8 mantiene y parece estar involucrado en la activación de la expresión de *Gbx-2* (esta tesis), así la inducción exacerbada de *Fgf8* en los embriones inyectados con las construcciones que activan la vía Notch expandiría *Gbx-2*, reprimiendo la expresión de *Otx-2*. Además, en estos embriones se observa aumento y desplazamiento anterior de los marcadores del cerebro medio, *Pax2* y *Wnt1*, esto podría ser consecuencia de la acción de FGF8 o bien debido a un efecto independiente de Notch sobre el mesencéfalo. Para resolver este

punto realizamos experimentos de hemisferios animales, en ellos notamos que la vía Notch, actuando sobre las células que expresan *Otx-2*, es capaz de inducir levemente la expresión de *Pax2*, pero no la expresión de otros marcadores del cerebro medio como *En-2* y *Wnt1*. Así, si bien la vía Notch puede inducir la expresión de *Pax2* en células que expresan *Otx-2*, los efectos observados en los embriones completos son probablemente producto de las modificaciones que ejerce la vía Notch sobre la expresión de *Fgf8* u otro factor presente en el embrión, pero ausente en las células animales aisladas. Hay que hacer notar que los efectos de desplazamiento son variables, incluso se detectan casos en que el istmo se desplaza en el sentido caudal. Esto sugiere que el establecimiento de los equilibrios entre las regiones del cerebro medio y posterior dependen de la vía Notch. No es claro como esto es posible pero probablemente pasa por el efecto de esta vía sobre *Fgf8*.

8. *Xiro* regula la expresión de *Delta1* autónoma y no autónomamente

Delta es el principal ligando de Notch y su unión a él es necesaria para la activación de esta vía de señalización célula-célula. Como hemos visto la vía Notch y *Xiro1* participan en el desarrollo del organizador del istmo. Notch se expresa de forma homogénea en la placa neural y por consiguiente su activación depende de la localización de sus ligandos. *Delta1* tiene un patrón dinámico de expresión, localizándose entre otros en el mesodermo paraxial, somitos, precursores neuronales y en el límite entre el cerebro medio y posterior. Por otra parte, *Xiro1* se expresa en somitos, placa neural y en la región del organizador del istmo. La comparación de los patrones de expresión de *Xiro1* y *Delta1* mostró que estos dos genes poseen patrones complementarios en la región del istmo, *Xiro1* es expresado en el cerebro medio y *Delta1* en contacto con *Xiro1* en una posición anterior. Esto nos llevó a analizar si *Xiro1* controla la expresión de *Delta1* en la región del límite entre el cerebro medio y posterior. Efectivamente, el aumento de la función *Xiro* mediante la sobreexpresión del mRNA para *Xiro3* o la fusión represora inducible de *Xiro1* (*HD-GR-EnR*) reprime la expresión de *Delta1* en la región del organizador del istmo y la activa en posiciones anteriores. El análisis detallado de la expresión de *Delta1* en los embriones inyectados mostró que la inducción ocurre en las células adyacentes a las que expresan el transcrito inyectado, sugiriendo la posibilidad que las células que expresan *Xiro1* tengan la capacidad de inducir de forma no autónoma la expresión de *Delta1*. Además, la función de *Xiro1* es necesaria para la expresión de *Delta1*. Investigamos la capacidad inductiva no autónoma de *Xiro1* mediante conjugados. Hemisferios animales inyectados con *Xiro1* son capaces de inducir, vía FGF, la expresión de *Delta1*. Así, la función de *Xiro1* es necesaria para la expresión de *Delta1*. Altos niveles de la función *Xiro1* reprimen *Delta1* de forma autónoma celular, es decir en las mismas células que expresan *Xiro1*. Sin embargo, el mismo *Xiro1* puede inducir no autónomamente la expresión de *Delta1*. De este modo, la expresión de *Xiro1* en el cerebro medio evitaría que *Delta1* sea inducido en esta región por el FGF8 proveniente de las células *Gbx-2*

positivas, pero localizaría la expresión de *Delta1* adyacente al cerebro medio, permitiendo que Notch sea activado en los territorios aledaños (Figura 39).

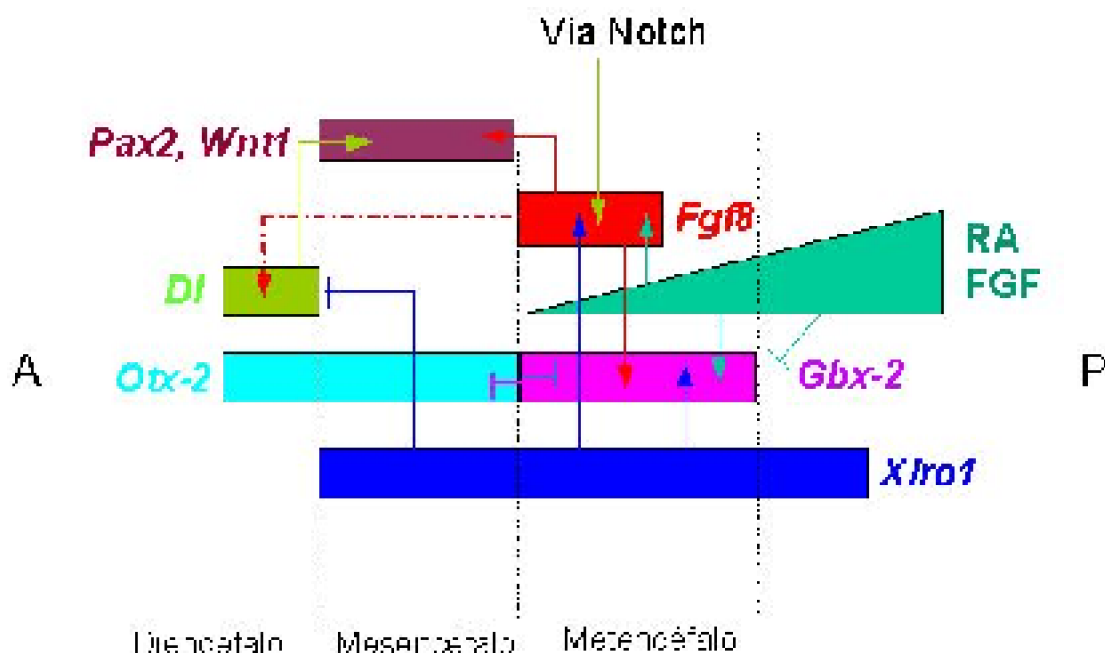


Figura 39. Esquema de las relaciones entre las actividades involucradas en la formación del organizador del istmo

En la región del metencéfalo *Xiro1* (flecha azul) y los agentes posteriorizantes (flecha verde) inducen la expresión de *Gbx-2*. El límite anterior de expresión de este gen coincide con el límite caudal de la expresión de *Otx-2* (líneas púrpura y celeste), el equilibrio alcanzado por *Gbx-2* y *Otx-2* define el dominio donde *Fgf8* es inducido por *Xiro1* (flecha azul) y los agentes posteriorizantes (flecha verde). *Fgf8* a su vez mantiene la expresión de *Gbx-2* en el rombómero 1, activa la expresión de *Wnt1* y *Pax2* en el mesencéfalo (flechas rojas) y la expresión de *Delta1* en el diencefalo (flecha roja punteada). El límite caudal de la expresión de *Gbx-2* y *Fgf8* probablemente es controlado por los agentes posteriorizantes (línea verde). La activación de *Delta1* no ocurre en el mesencéfalo debido a la represión autónoma celular que ejerce *Xiro1* sobre este gen (línea azul). *Delta1* desde la región diencefálica contribuye con la activación de *Pax2* y *Wnt1* (línea verde oliva). Previamente, cuando los movimientos de extensión y convergencia en la placa neural no han ocurrido y el mesencéfalo corresponde solo a una corrida de células, la vía Notch activaría la expresión de *Fgf8* (línea verde oliva), participando así del establecimiento del organizador del istmo.

CONCLUSIONES

1. *Xiro1* controla la formación del Organizador de Spemann.

1.1. *Xiro1* es expresado en el Organizador de Spemann o mesodermo dorsal.

1.2. Actuando como represor transcripcional bloquea la expresión de *bmp-4* en el organizador de Spemann.

1.3. La inhibición de la transcripción de *bmp-4* en el mesodermo dorsal permite el desarrollo del organizador de Spemann, secreción de las proteínas antiventralizantes (Noggin, Chordin etc.) y subsiguiente dorsalización del mesodermo.

2. Establecimiento del Organizador del Istmo

2.1. La notocorda induce la expresión espacial correcta de los genes que especifican el istmo.

2.1.1. El mesodermo axial (notocorda) es capaz de imprimir, en ectodermos competentes, el orden antero-posterior correcto de expresión de *Otx-2*, *Gbx-2* y *Fgf8*.

2.1.2. La región anterior de la notocorda sólo induce la expresión de *Otx-2*.

2.2. Los agentes posteriorizantes ácido retinoico, FGF y Wnt controlan la posición y expresión de los genes específicos del istmo.

2.2.1. Los agentes posteriorizantes: ácido retinoico, FGF y Wnt participan en el establecimiento del istmo.

2.2.2. Ácido retinoico y FGF pueden inducir la expresión de *Xiro1*, *Gbx-2* y *En-2* en

células que expresan *Otx-2*.

2.2.3. Ácido retinoico regula la posición del límite caudal de *Otx-2*, principalmente a través de *Gbx-2* y es capaz de activar la expresión de *Fgf8*.

2.2.4. Las vías de señalización de FGF y Wnt parecen ser necesarias para la formación del mesencéfalo.

2.3. *Otx-2* y *Gbx-2* definen la posición del istmo.

2.3.1. Al igual que en ratón y pollo, *Otx-2* y *Gbx-2* se expresan en patrones complementarios y definen la posición del organizador istmo.

2.3.2. *Otx-2* y *Gbx-2*, actuando como represores transcripcionales, reprimen su transcripción mutuamente.

2.3.3. La interacción de tejidos expresando *Otx-2* y *Gbx-2* recrea las interacciones que llevan a la formación del organizador del istmo. En este contexto, la inducción de *En-2*, en el tejido que expresa *Otx-2*, depende la señal FGF proveniente de las células *Gbx-2* positivas. Además, *Gbx-2* reprime la expresión de *En-2*.

2.4. *Xiro1* controla la formación del Istmo regulando la expresión de los genes que lo especifican.

2.4.1. *Xiro1* se expresan en el límite entre el cerebro medio y posterior y participa, como represor, en la inducción y posicionamiento del organizador del istmo.

2.4.2. *Xiro1* es necesario para, y es capaz de activar, la expresión de *Otx-2* durante gástrula temprana y *Gbx-2* durante gástrula tardía.

2.4.3. *Xiro1* es necesario y suficiente para activar la expresión de *Fgf8*.

2.4.4. *Xiro1* es necesario en el territorio del cerebro medio, que expresa *Otx-2*, para la inducción de *En-2*.

2.5. Otros.

2.5.1. *Xiro1* es necesario para la expresión de *Delta1* y lo activa, vía FGF, de forma no autónoma.

2.5.2 La señal de Notch participa en la formación del organizador del istmo. Expande el territorio mesencefálico y es capaz de inducir la expresión de *Pax2* en células que expresan *Otx-2*.

PERSPECTIVAS

Los resultados de esta tesis una serie de nuevas interrogantes, sin embargo, quisiera mencionar algunos temas que merecen especial atención.

El hecho que *Xiro1* participa en la formación del Organizador de Spemann y el organizador del istmo permite pensar en la posibilidad de que los genes *Iroquois* en vertebrados, al igual a lo propuesto en *Drosophila*, participen como un elemento general en la formación de bordes entre territorios que posean capacidad organizadora. Es interesante notar que, recientemente se ha identificado en pollo un territorio denominado Zona Limitans Intratalámica (ZLI) que parece poseer características de organizador. En este dominio, localizado entre el mesencéfalo y el diencefalo se expresa la molécula secretada Sonic Hedgehog (Shh). Por otra parte, en pez cebra el gen *Ziro7* tiene como límite anterior de expresión este territorio (Lecaudey y cols., 2001). En *Xenopus*, *Xiro1* probablemente también se expresa hasta este punto dentro del tubo neural. Sería interesante investigar el papel de los genes *Iroquois* en este posible organizador, en particular la interacción de Shh y estos genes, y más importante aún, estudiar el complejo *Iroquois* en la perspectiva de un elemento común en la formación de bordes y organizadores dentro del desarrollo embrionario.

Otros puntos interesantes de resolver en el futuro son: el papel de la vía Notch en el desarrollo del Organizador del Istmo y de las crestas neurales y cómo *Gbx-2* participa en la formación de las crestas neurales.

BIBLIOGRAFÍA

- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F. and Simeone, A. (1997). Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development* **124**, 3639-3650.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Briata, P., Corte, G. and Simeone, A. (1998). Visceral endoderm-restricted translation of *Otx1* mediates recovery of *Otx2* requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* **125**, 5091-5104.
- Alvarado-Mallart, R. M. (1993). Fate and potentialities of the avian mesencephalic/metencephalic neuroepithelium. *J. Neurobiol.* **24**, 1341-1355.
- Amaya, E., Musci, T.J. and Kirschner M.W. (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **66**, 257-270.
- Ang, S.L. and Rossant, J. (1994) HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**, 561-574.
- Angius, E., Oelgeschläger, M., Wessely, O., Kemp, C. and De Robertis, E.M. (2000). Endodermal nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 127, 1173-1183.**
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. and Lake, R. (1999). notch signaling: cell fate control and signaling integration in development. *Science* 284, 770-776.**

- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J.A., Anderson, R.M., May, S.R., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J. and DeRobertis, E.M. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* **403**, 658-661.
- Baker, J.C., Beddington, R.S.P. and Harland, R.M. (1999). Wnt signalling in *Xenopus* embryos inhibit *Bmp-4* expression and activates neural development. *Genes Dev.* **13**, 3149-3159.
- Bally-Cuif, L. and Wassef, W. (1994) Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 in quail/chick chimeras. *Development* **120**, 3379-94.
- Bally-Cuif, L. and Boncinelli, E. (1997). Transcription factors and head formation in vertebrates. *Bioessays* **19**, 127-135.
- Bao, Z.-Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E. and Cepko, C. L. (1999). Regulation of Chamber-Specific Gene Expression in the Developing Heart by *Irx4*. *Science* **283**, 1161-1164.
- Bellefroid, E. J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J. B. and Papalopulu, N. (1998). *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* genes and functions in neural specification. *EMBO. J.* **17**, 191-203.
- Blitz I.L. and Cho, K.W. (1995) Anterior neuroectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox orthodenticle. *Development* **121**, 993-1004.
- Blumberg, B., Bolado, J., Moreno, T.A., Kintner, C., Evans, R. and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* **124**, 373-379.
- Bosse, A., Stoykova, A., Nieselt-Struwe, K., Chowdhury, K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P. (2000). Identification of a novel mouse *iroquois* homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localization of all members of the mouse *iroquois* gene family. *Dev. Dyn.* **218**, 160-174.
- Bosse, A., Zülch, A., Becker, M. B., Torres, M., Gómez-Skarmeta, J. L., Modolell, J. and Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech. Dev.* **69**, 169-181.
- Bouwmeester, T., Kim, S-H., Sasai, Y., Lu, B., DeRobertis, E.M. (1996). Cerberus is a head inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.
- Bradley, L., Snape, A., Bhatt, S. and Wilkinson, D. (1992). The structure and expression of the *Xenopus Krox20* gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. *Mech.Dev.* **40**, 73-84.
- Brand, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., van Eeden, F. J. and Nusslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* **123**, 129-142.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*

101, 435-445.

- Broccoli, V., Boncinelli, E. and Wurst, W. (1999). The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature* **401**, 164-168.
- Bruneau, B. G., Bao, Z.-Z., Fatkin, D., Xavier-Neto, J., Georgakopoulos, D., Maguire, C. T., Berul, C. I., Kass, D. A., Kuroski-de Bold, M. L., de Bold, A. J., Conner, D. A., Rosenthal, N., Cepko, C. L., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (2001). Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1730-1736.
- Bürglin, T. R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4173-4180.
- Cavodeassi, F., Diez del Corral, R., Campuzano, S. and Domínguez, M. (1999). Compartments and organizing boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* **126**, 4933-4942.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Campuzano, S. (2000). The Iroquois homeobox genes function as dorsal selectors in the *Drosophila* head. *Development* **127**, 1921-1927.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Gómez-Skarmeta, J. L. (2001). The *Iroquois* family of genes: from body building to neural patterning. *Development* **128**, 2847-2855.
- Chitnis, A., Enrique, D., Lewis, J., Ish-Horowitz, D. and Kintner, C. (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos is regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta*. *Nature* **375**, 761-766.
- Cho, K.W.Y., Blumberg, B., Steinbeisser, H. and DeRobertis, E.M. (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: The role of the *Xenopus* homeobox gene *gooseoid*. *Cell* **67**, 1111-1120.
- Cho, K. O. and Choi, K. W. (1998). Fringe is essential for *mirror* symmetry and morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Nature* **396**, 272-276.
- Christian, J.L., McMahoan, J.A., McMahoan, P.A., Moon, R.T (1991). *Xwnt-8* a *Xenopus* *Wnt-1/int-1*- related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryo genesis. *Development* **111**, 1045-1055.
- Christoffels, V. M., Habets, P. E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W. H., Bao, Z. Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R. P. and Moorman, A. F. (2000a). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* **223**, 266-278.
- Christoffels, V. M., Keijser, A. G., Houweling, A. C., Clout, D. E. and Moorman, A. F. (2000b). Patterning the embryonic heart: identification of five mouse *iroquois* homeobox genes in the developing heart. *Dev. Biol.* **224**, 263-274.
- Christen, B. and Slack J.(1997). *FGF-8* is associated with anteroposterior patterning and limb regeneration in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **192**, 455-466.
- Coffman, C.R., Skoglund, P, Harris, W.A. and Kintner, C.R. (1993). Expression of an extracellular deletion of *Xnotch* diverts cell fate in *Xenopus* embryos. *Cell* **73**, 659-671.
- Cohen, D. R., Cheng, C. W., Cheng, S. H. and Hui, C. C. (2000). Expression of two

- novel mouse *iroquois* homeobox genes during neurogenesis. *Mech. Dev.* **91**, 317-321.
- Cox, G. and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* **121**, 4349-4358.
- Crossley, P. H., Martínez, S. and Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**, 66-68.
- de la Calle-Mustienes, E., Glavic, A., Modolell, J. and Gómez-Skarmeta, J.L. (2002). Cell-cycle arrest mediated by XGadd45-gamma and primary neuron differentiation are both autonomously impaired and non-autonomously facilitated by Xiro1. Enviado a Development.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gómez-Skarmeta, J. L., Cavodeassi, F. and Modolell, J. (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **13**, 1754-1761.
- Domínguez, M. and de Celis, J. F. (1998). A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the *Drosophila* eye. *Nature* **396**, 276-278.
- Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1997). Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* **124**, 2325-34.
- Esgleson, G. and Harris, W. (1990). Mapping of the presumptive brain regions in the neural plate of *Xenopus laevis*. *J. of Neurobiol.* **21**, 427-440.
- Eimon, P.M., Harland, R.M. (1999). In *Xenopus* embryos, BMP heterodimers are not required for mesoderm induction, but BMP activity is necessary for dorsal/ventral patterning. *Dev. Biol.* **16**, 29-40.
- Epstein, M., Pillemer, G., Yelin, R., Yisraeli, J. and Fainsod, A. (1997). Patterning of the embryo along the antero-posterior axis: the role of the *caudal* genes. *Development* **124**, 3805-3814.
- Fekany-Lee, K., Gonzalez, E., Miller-Bertoglio, V., Solnica-Krezel, L. (2000). The homeobox gene *bozozok* promotes anterior neuroectoderm formation in zebrafish through negative regulation of BMP2/4 and Wnt pathways. *Development* **127**, 2333-2345.
- Foley, A., Storey, K. and Stern, C. (1997). The precordal region lacks neural inducing ability, but can confer anterior character to more posterior neuroepithelium. *Development* **124**, 2983-2996.
- Friedman, A.D., Triezenberg, S.J. and McKnight, S.L. (1988). Expression of a truncated viral trans-activator selectively impedes lytic infection by its cognate virus. *Nature* **335**, 452-454.
- Gamse, J. and Sive, H. (2000). Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neuroectoderm as paradigm. *BioEssays*, **22**, 976-986.
- Garda, A.-L., Echevarria, D. and Martinez, S. (2001). Neuroepithelial co-expression of *Gbx2* and *Otx2* precedes *Fgf8* expression in the isthmus organizer. *Mech Dev.* **101**, 111-118.
- Gardner, C. A. and Barald, K. F. (1991). The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick

- chimeric embryos. *Development* **113**, 1037-1048.
- Gawantka, V., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1995). Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene *Xvent-1*. *EMBO J.* **14**, 6268-6279.
- Glavic, A., Gómez-Skarmeta, J.L. and Mayor, R. (2001) *Xiro-1* controls mesoderm patterning by repressing BMP-4 expression in the Spemann organizer. *Dev. Dyn.* **222**, 368-376.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan AP., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-362.
- Gvalas, A. and Krumlauf, R. (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 380-386.
- Gómez-Skarmeta, J. L., De la Calle-Mustienes, E. and Modolell, J. (2001). The Wnt-activated *Xiro-1* gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates *Bmp-4*. *Development* **128**, 551-560.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J. and Mayor, R. (1998). *Xiro*, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* **17**, 181-190.
- Gómez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **10**, 2935-2946.
- Goriely, A., Diez del Corral, R. and Storey, K. G. (1999). *c-Irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech. Dev.* **87**, 203-206.
- Hardcastle, Z., Chalmers, A.D. and Papalopulu, N. (2000). FGF8 stimulates neuronal differentiation through FGFR-4a and interferes with mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* **10**, 1511-1514.
- Harland, R., Weintraub, H. (1985). Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *Cell Biol.* **101**, 1094-1099.
- Harland, R.M. (1991). *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* **36**, 685-695.
- Harland, R.M. and Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 611-667.
- Halpern, M.E., Ho, R.K., Walker, C. and Kimmel, C.B. (1993). Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation. *Cell* **75**, 99-111.
- Heikinheimo, M., Lawshe, A., Shackleford, G.M., Wilson, D.B. and MacArthur, C.A. (1994). Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limb and central nervous system. *Mech. Dev.* **48**, 129-138.
- Hemmati-Brivanlou, A., Thomsen, G.H. (1995). Ventral mesoderm patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev. Genet.* **17**, 78-89.
- Hemmati-Brivanlou, A., de la Torre, J.R., Holt, C. and Harland, R.M. (1991). Cephalic expression and molecular characterization of *Xenopus En-2*. *Development* **111**,

715-724.

- Hemmati-Brivanlou A. and Melton D. (1997). Vertebrate neural induction. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 43-60.
- Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2001). *Hes1* and *Hes3* regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J.*, **20**, 4454-4466.
- Hoppler, S. and Moon, R.T. (1998). BMP2/4 and *Wnt-8* cooperatively pattern the *Xenopus* mesoderm. *Mech. Dev.* **71**, 119-129.
- Itasaki, N., Sharpe, J., Morrison, A. and Krumlauf, R. (1996). Reprogramming Hox expression in the vertebrate hindbrain: influence of paraxial mesoderm and rhombomere transposition. *Neuron* **16**, 487-500.
- Jones, S.M. and Ribera, A.B. (1994). Overexpression of a potassium channel gene perturbs neural differentiation. *Neurosci* **14**, 2789-2799.
- Jaynes, J.B. and O'Farrell, P.H. (1991). Active repression of transcription by the *engrailed* homeodomain protein. *EMBO J.* **10**, 1427-1433.
- Joyner, A. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *TIG* **12**, 15-19.
- Joyner, A. L., Liu, A. and Millet, S. (2000). *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**, 736-741.
- Katahira, T., Sato, T., Sugiyama, S., Okafuji, T., Araki, I., Funahashi, J. and Nakamura, H. (2000). Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum. *Mech Dev.* **91**, 43-52.
- Kehl, B., Cho, K. O. and Choi, K. W. (1998). *mirror*, a *Drosophila* homeobox gene in the Iroquois complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* **125**, 1217-1227.
- Keller, R., Shih, J., Sater, A.K. and Moreno, C. (1992). Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of *Xenopus*. *Dev. Dyn.* **193**, 218-234.
- King, M.W., Ndiema, M., and Neff, A.W. (1998). Anterior structural defects by misexpression of *Xgbx-2* in early *Xenopus* embryos are associated with altered expression of cell adhesion molecules. *Dev. Dyn.* **212**, 563-579.
- Kolm, P.J. and Sive, H. (1995a). Regulation of the *Xenopus* labial homeodomain genes, *HoxA1* and *HoxD1*: activations by Retinoids and Peptide Growth Factors. *Dev. Biol.* **167**, 34-49.
- Kolm, P.J. and Sive, H. (1995). Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **171**, 791-800.
- Kolm, P., Apekin, V. and Sive, H. (1997). *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Dev. Biol.* **192**, 1-16.
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.
- Latinkic, B.C. and Smith, J.C. (1999). *Gooseoid* and *Mix.1* repress *Brachyury* expression and are required for head formation in *Xenopus*. *Development* **126**, 1769-1779.

- Lawrence, P. and Morata, G. (1994). Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* **78**, 181-189.
- Lecaudey, V., Thisse, C., Thisse, B. and Schneider-Maunoury, S. (2001). Séquence and expresión pattern of *zoro7*, a novel, divergent zebrafish iroquois homeobox gene. *Mech. Dev.* **109**, 383-388.
- Lemaire, P., Darras, S., Caillol, D., Kodjabachian, L. (1998). A role for the vegetally expressed *Xenopus* gene *Mix.1* in endoderm formation and in the restriction of mesoderm to the marginal zone. *Development* **125**, 2371-2380.
- Leyns, L., Gómez-Skarmeta, J. L. and Dambly-Chaudière, C. (1996). *iroquois*: a prepatterning gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **59**, 63-72.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S-H., Piccolo, S., DeRobertis, E.M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of wnt signal expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-756.
- Liu, A. and Joyner, A. L. (2001). Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 869-896.
- Liu, A., Losos, K. and Joyner, A. L. (1999). FGF8 can activate *Gbx2* and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development* **126**, 4827-4838.
- Lombardo, A. and Slack, J. (1997). Inhibition of eEFG expression in *Xenopus* embryos by antisense mRNA. *Dev. Dyn.*, **208**, 162-169.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 1109-1115.
- Mancilla, A. and Mayor, R. (1996). Neural crest development formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of *Xslug* induction. *Dev. Biol.* **177**, 580-589.
- Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N., Mayor, R. (1998). The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* **198**, 319-329.
- Marine, J.C., Bellefroid, E.J., Pendeville, H., Martial, J.A., Pieler, T. (1997). A role for *Xenopus* Gli-type zinc finger protein in the early embryonic patterning of the mesoderm and neuroectoderm. *Mech Dev.* **63**, 211-25.
- Marin, F. and Puellas, L. (1994). Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus. *Dev. Biol.* **163**, 19-37.
- Martínez, S. (2001). The isthmic organizer and brain regionalization. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 367-371.
- Martínez, S. and Alvarado-Mallart, R. M. (1990). Expression of the homeobox *Chick-en* gene in chick/quail chimeras with inverted mes-metencephalic grafts. *Dev Biol.* **139**, 432-436.
- Martínez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L. and Martin, G. R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development* **126**, 1189-1200.
- Martínez, S., Marin, F., Nieto, M. A. and Puellas, L. (1995). Induction of ectopic *engrailed* expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental

- boundaries as barriers. *Mech. Dev.* **51**, 289-303.
- Martínez, S., Wassef, M. and Alvarado-Mallart, R. M. (1991). Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* **6**, 971-981.
- Mayor, R., Guerrero, N., Young, R.M., Gómez-Skarmeta, J.L. and Cuellar, C.(2000). A novel function for the *Xslug* gene: control of dorsal mesoderm development by repressing BMP-4. *Mech. Dev.* **97**, 47-56.
- McGrew, L., Hoppler, S. and Moon, R. (1997). Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **69**, 105-114.
- McLaughlin, K., Ronces, M. and Mercola, M. (2000). Notch regulates cell fate in the developing pronephros. *Dev. Biol.* 567-580.
- Melby, AE, Beach C., Mullins, N., Kimelman, D. (2000) Patterning the early zebrafish by opposing actions of bozozok and vox/vent. *Dev. Biol.* **224**, 275-285.
- Meyers, E. N., Lewandoski, M. and Martin, G. R. (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet.* **18**, 136-141.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E. and Joyner, A. L. (1999). A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, 161-164.
- Müller, M., Weizäcker, E. and Campos-Ortega, J.(1996). Transcription of a zebrafish gene of the *hairy-enhancer of split* family delineates the midbrain analage in the neural plate. *Dev. Genes Evol.* **206**, 153-160.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1967). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland, Amsterdam.
- Nieuwkoop, P.D. (1973). The organization center; its origin spatial organization and morphogenic action. *Adv. Morphog.* **10**, 2-39.
- Nguyen, V.H., Schmid, B., Trout, J., Connors, S.A., Ekker, M., Mullins, M.C. (1998). Ventral and lateral region of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by *bmp2/swirl* pathway of genes. *Dev. Biol.* **199**, 93-110.
- Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G. and Boncinelli, E. (1995). The *Xenopus* homologue of *Otx2* is maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development* **121**, 707-720.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D. (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* **281**, 2031-2034.
- Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K. and Ruther, U. (2000). Organization of mouse *iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.* **10**, 1453-1462.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., DeRobertis, E.M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-598.
- Pownall, M.E., Tucker, A., Slack, J. and Isaacs, H. (1996) eFGF, *Xcad3* and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* **122**, 3881-3892.
- Rafferty L.A. and Sutherland D.J. (1999). TGF-b Family Signal Transduction in

- Drosophila* Development: From Mad to Smad. *Dev. Biol.* **210**, 251:268.
- Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M. (1998). *Fgf8* is mutated in zebrafish *acerebellar* (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381-2395.
- Rhinn, M. and Band, M. (2001) The midbrain-hindbrain boundary organizer. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 34-42.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M. and Ang, S. L. (1998). Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* **125**, 845-856.
- Ribisi, S., Mariani, F., Amar, E., Lamb, T., Frank, D. and Harland, R.M. (2000). Ras-mediated FGF signaling is required for the formation of posterior but not anterior neural tissue in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **227**, 183-196.
- Rubenstein, J., Shmamura, K, Martinez, S. and Puelles, L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 445-447.
- Sato, T., Araki, I. and Nakamura, H. (2001). Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development* **128**, 2461-2469.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., DeRobertis, E.M. (1994). *Xenopus chordin*: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779-790.
- Shamim, H., Mahmood, R., Logan, C., Doherty, P., Lumsden, A. and Mason, I. (1999). Sequential roles for *Fgf4*, *En1* and *Fgf8* in specification and regionalization of the midbrain. *Development* **126**, 945-959.
- Schmidt, J.E., Suzuki, A., Ueno, N., Kimelman, D. (1995). Localized BMP-4 mediates dorsal/ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* **169**, 37-50.
- Sirotkin, H.L., Dougan, S.T., Schier, A.F., Talbot, W.S. (2000). *bozozok* and *squint* act in parallel to specify dorsal mesoderm and anterior neuroectoderm in zebrafish. *Development* **127**, 2583-2592.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A. and Boncinelli. (1992a). Nested expression of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**, 687-690.
- Simeone, A., Gulisano, M., Acampora, D., Stornaiuolo, A., Rambaldi, M. and Boncinelli, E. (1992b). Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila empty spiracles* gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* **11**, 2541-2550.
- Sive, H. (1993). The frog prince-ss: a molecular formula for dorsoventral patterning in *Xenopus*. *Genes Dev.* **7**, 1-12.
- Slack, J.M.W. and Tannahill, D. (1992). Mechanism of anteroposterior axis specification in vertebrates. Lessons from amphibians. *Development* **114**, 285-302.
- Stern, C. and Foley, A. (1998). Molecular dissection of hox gene induction and maintenance in the hindbrain. *Cell* **94**, 143-145.
- Taira, M, Jamrich, M., Good, P.J., Dawid, I.B. (1992). The LIM containing homeobox gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus* gastrula

- embryos. *Genes Dev.* **6**, 356-366.
- Talbot, W.S., Trevarrow, B., Halpern, M.E., Melby, A.E., Farr, G., Postlethwait, J.H., Jowett, T., Kimmel, C.B. and Kimelman, D. (1995). A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* **378**, 150-157.
- Tan, J. T., Korzh, V. and Gong, Z. (1999). Expression of a zebrafish *iroquois* homeobox gene, *Ziro3*, in the midline axial structures and central nervous system. *Mech. Dev.* **87**, 165-168.
- Turner, D.L. and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos convert ectodermal cells in neural fate. *Genes Dev.* **12**, 1424-1447.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P. and Mayor, R. (2002). Posteriorization by FGF, Wnt, and Retinoic Acid is required for neural crest induction. *Dev. Biol.* **241**, 289-301.
- von Bubnoff, A., Schmidt, J. and Kimelman, D. (1995). The *Xenopus laevis* homeobox *Xgbx-2* is an early marker of anteroposterior patterning in the ectoderm. *Mech. Dev.* **54**, 149-160.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., Moos, M., 1997. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**, 757-766.
- Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S. and Martin, G. R. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development* **124**, 2923-2934.
- Weinstein, D.C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W.S., Hoodless, P., Prezioso, V.R., Jessell, T.M., and Darnell, J.E. Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3# is required for notochord development in the mouse embryos. *Cell* **78**, 575-588.
- Weinstein D.C. and Hemmati-Brivanlou A. (1997). Neural induction in *Xenopus laevis*: evidence for the default model. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 7-12.
- Wilson P.A and Hemmati-Brivanlou A. (1997). Vertebrate Neural Induction: Inducers, Inhibitors and Nex Synthesis. *Neuron* **18**, 699-710.
- Wolda, S.L., Moody, C.J. and Moon, R.T.(1993). Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.* **155**, 46-57.
- Wurst, W. and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99-108.
- Wright, C. (1993). Hox genes and hindbrain. *Curr.Biol.* **3**, 618-621.
- Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M., Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.