



03081  
3  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
UACPyP del CCH**

**Proyecto Académico en Investigación Biomédica Básica**

TESIS DE POSTGRADO  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
PRESENTA

M. en C. DIANA MARIA ESCALANTE ALCALDE

**"ELEMENTOS QUE REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN  
DE LA FOSFATASA ALCALINA TEJIDO NO ESPECÍFICA: UN  
GEN EXPRESADO ABUNDANTEMENTE EN LAS CÉLULAS  
GERMINALES PRIMORDIALES DE RATÓN"**

Director de tesis: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Cuernavaca, Morelos

Noviembre de 1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RESUMEN

El presente trabajo consistió en la caracterización de la transcripción de los promotores de los exones 1A y 1B del gen de la fosfatasa alcalina tejido no-específica (*FATN*), en células embrionarias totipotenciales (ES), en células germinales primordiales (CGP), en embriones en desarrollo y en ratones transgénicos para construcciones reporteras. Los resultados muestran que las células ES, y los tejidos embrionarios, incluyendo las CGP, usan el promotor del exon 1A para dirigir la transcripción del *FATN*. La actividad transcripcional en las células ES se ve aumentada por la adición de AR (AR). Un fragmento de 184 pb que contiene un elemento de respuesta a AR (ERAR) fué capaz de transferir la responsividad al AR, al promotor basal del gen de la timidina cinasa. Muchos ratones transgénicos para construcciones con el gen reportero *lacZ*, incluyendo diferentes fragmentos del promotor del exon 1A, presentaron expresión en embriones de 12.5 días postcoito (dpc), pero reflejando el patrón de expresión del *FATN* solo de manera parcial. De forma interesante, todos los transgénicos, excepto uno, para una construcción con 8.5 kb del promotor, no mostraron expresión en ningún tejido en embriones de 12.5 dpc. La metilación del DNA se consideró un mecanismo importante de inactivación de la expresión del *FATN* ya que la metilación del *FATN* endógeno fue mayor en tejidos y líneas celulares que expresan la enzima, en comparación con aquellos que no la expresan. Evidencia que apoya la presencia de secuencias que promueven la metilación del DNA fue el encontrar un mayor nivel de metilación en *lacZ* y el las 1.9 kb proximales del promotor, en ratones transgénicos producidos con la construcción de 8.5 kb, en comparación con que aquel encontrado en ratones con construcciones mas cortas del promotor. Un fragmento de 1 kb (entre -5.5 y -4.5 kb) fue capaz de promover la metilación del DNA en los transgenes pero no hubo un efecto obvio en la expresión de estos. Sugerimos que la metilación es un mecanismo de regulación negativa importante en la regulación de la transcripción del *FATN* y que esto puede explicar la expresión de esta enzima en las células germinales primordiales y en las células tumorales.

## ABSTRACT

The present study is the characterization of the transcription from exons IA or IB *TNAP* promoters in a line of embryonic stem cells, in germ cells, in developing embryos and in transgenic mice bearing reporter constructs. Results showed that ES cells and embryonic tissues, including PGC, used exon 1A promoter to drive the expression of *TNAP*. Transcriptional activity in ES was up-regulated by retinoic acid (RA). Accordingly, a 184 bp fragment, containing a putative RA-responsive element (RARE), was able to transfer responsiveness to RA to the thymidine kinase basal promoter. Most transgenic mice with *lacZ* reporter constructs, including different fragments of exon 1A promoter, showed expression in 12.5 day postcoitum (dpc) mouse embryos, but reflecting only partially the *TNAP* expression pattern. Interestingly, all transgenic mice produced, except one, bearing reporter construct with 8.5 kb of this promoter, showed no expression in any tissue of 12.5 dpc embryos. DNA methylation was considered to be an important inactivating mechanism of *TNAP* expression as endogenous *TNAP* methylation was higher in non-expressing than in expressing cells or tissues. In agreement with the presence of DNA methylation-promoting sequences, higher methylation level of *lacZ* and the foremost 1.9 kb of exon 1A promoter was observed in transgenic mice produced with constructs bearing 8.5 kb than those with shorter fragments. A 1 kb fragment (-5.5 to -4.5) promoted DNA methylation of transgenes sequences but there was not an obvious effect in reporter gene expression. We suggest that methylation is a relevant negative regulatory mechanism of *TNAP* and may explain the expression of this enzyme in germ and tumor cells.

## CONTENIDO

### INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN..... 1

### ANTECEDENTES

#### A) BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES .

1.- Origen y migración de las CGP..... 3

2.- Diferenciación de las células germinales durante la fase de gonadal..... 4

3.- Moléculas que modifican la sobrevivencia y conducta proliferativa  
de las CGP *in vitro*..... 6

4.- Aspectos moleculares de las CGP..... 8

#### B) LA FOSFATASA ALCALINA TEJIDO NO ESPECIFICA.

1.- Generalidades..... 10

2.- Función..... 11

3.- Expresión de la FATN durante el desarrollo embrionario del ratón..... 12

4.- Estructura del gen de la *FATN* y sus regiones reguladoras..... 13

5.- Reguladores de la transcripción del *FATN*..... 15

#### C) REGIONES REGULADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN Y SUS MÉTODOS

##### DE ESTUDIO

1.- Regiones reguladoras de la transcripción..... 16

2.- Algunos métodos de estudio..... 19

OBJETIVOS..... 21

### MATERIALES Y MÉTODOS

A) Transfección de células germinales en cultivos primarios de gónadas embrionarias. 22

B) Ensayo histoquímico para la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en cultivos primarios.... 22

C) Ensayos de doble marcado..... 23

### RESULTADOS

#### A) CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL PROMOTOR 1A DE LA *FATN* EN

##### ENSAYOS *in vitro*.

1.- El promotor del exon 1A es empleado por las CG y tejidos embrionarios para dirigir la  
expresión del *FATN*..... 24

2.- Transfección de cultivos primarios de gónadas..... 24

3.- La expresión de $\beta$ -galactosidasa en las células transfectadas con pAP/1A1.9/lacZ no es en células germinales.....	30
4.- Ensayos funcionales del promotor del exon 1A en las células embrionarias pluripotenciales (ES).....	32
5.- Regulación de la transcripción del <i>FATN</i> por AR en células ES y la localización del elemento de respuesta a AR en el promotor del exon 1A.....	34
B) CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL EXON 1A DEL <i>FATN</i> EN ENSAYOS <i>in vivo</i> (ANIMALES TRANSGÉNICOS).....	35
PUBLICACIÓN 1.....	38
PUBLICACIÓN 2.....	39
<b>DISCUSIÓN</b>	
A) ELEMENTOS DEL PROMOTOR DEL EXON 1A DEL <i>FATN</i> QUE DETERMINAN EXPRESION ESPECIFICA.....	
1.- Sobre las CGP y las células ES.....	40
2.- La regulación de la expresión específica en el epitelio del estómago y del pulmón esta dada por la combinación de dos elementos.....	41
B) REGULACION DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL <i>FATN</i> POR AR Y METILACION: IMPLICACIONES BIOLÓGICAS	
1.- Regulación por AR.....	43
2.- El papel de la metilación.....	44
C) ALTERNATIVAS PARA GENERAR LÍNEAS INMORTALES DE CG.....	49
D) ALTERNATIVAS PARA ESTUDIAR LAS CGP DESDE EL PUNTO DE VISTA MOLECULAR.....	53
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	55
REFERENCIAS.....	57

# INTRODUCCIÓN

## JUSTIFICACIÓN

Una de las preguntas fundamentales para la Biología del Desarrollo es como se determinan y diferencian los diversos tipos celulares que conforman a un individuo. Si bien, existen actualmente ejemplos de linajes celulares en los que se conoce ampliamente, tanto a nivel celular como molecular, como ocurren estos procesos (*e.g.* el linaje muscular, Lassar y Münsterberg, 1994), hay muchos otros casos en los que se desconoce, como lo es en el caso de la determinación y diferenciación de las células germinales primordiales (CGP) de mamíferos. El estudio de estos procesos en este tipo celular resulta de gran relevancia biológica ya que es el encargado de la perpetuación de las especies y es el único que realiza el proceso de meiosis. Además, resulta también un modelo atractivo para el estudio de uno de estos procesos desde el punto de vista que un mismo precursor tiene dos únicas opciones de diferenciación, hacia ovocitos o hacia espermatoцитos. Debido a ciertas limitantes de estudio que presentan estas células, en los últimos años se han realizado esfuerzos por establecer modelos que permitan abordar tanto a nivel celular como molecular los mecanismos que dirigen la diferenciación de este tipo celular.

El presente trabajo, es parte de una estrategia experimental enfocada a establecer un modelo para estudiar las CGP que involucra su inmortalización mediante: (a) la expresión dirigida de genes inmortalizantes condicionados en este tipo celular por medio de la construcción de animales transgénicos o, (b) la transfección de construcciones inmortalizadoras en células germinales purificadas. Sólo hasta recientemente se han estandarizado algunos protocolos que permiten obtener poblaciones de este tipo celular con una elevada pureza, sin embargo su susceptibilidad extrema parece dejar como mejor opción la de inmortalizar a través de la construcción de animales transgénicos. Uno de los requisitos fundamentales para establecer esta estrategia es el de contar con un promotor de un gen que se exprese muy abundantemente en estas células. Uno de los candidatos es el promotor del gen de la fosfatasa alcalina tejido no-

específica (*FATM*) que codifica para una enzima de superficie que se expresa en las células germinales durante un amplio período que abarca etapas críticas de su desarrollo.

Con base en lo anterior, la introducción del presente trabajo, está dividida en tres partes. La primera, esta enfocada a describir el conocimiento actual que se tiene sobre la biología de las células germinales primordiales, con la finalidad de tener un contexto que nos permita establecer cuales son las preguntas fundamentales sobre la diferenciación de este tipo celular. La segunda parte presenta los antecedentes existentes sobre la biología molecular del *FATN* que nos permitieron emprender la búsqueda de las regiones que regulan la expresión de esta enzima, con énfasis en aquellas que regulen su expresión en las células germinales primordiales. La tercera sección, trata sobre las regiones que regulan la transcripción de un gen así como algunas de las herramientas experimentales que se emplean para su estudio, con la finalidad de proporcionar un contexto general para el presente trabajo.

Si bien durante el curso de este estudio no se logró establecer que secuencias del *FATN* controlan la expresión en células germinales primordiales, el presente trabajo contiene contribuciones importantes. Dentro de éstas, se encuentra el establecimiento, por primera vez, de un sistema de transfección de células germinales embrionarias. Otras contribuciones se relacionan a la identificación de elementos que regulan la transcripción del *FATN*. Dentro de estas se encuentran: un elemento de respuesta a ácido retinóico (AR); un elemento que controla la expresión tejido específica de esta enzima en el epitelio pulmonar y estomacal del embrión; y probablemente el de más impacto, la demostración de elementos que regulan negativamente su transcripción por medio del incremento en la metilación del DNA. Este último tipo de regulación, nos ha permitido establecer un modelo que explica la expresión de esta enzima tanto en las CGP como en células tumorales. Las implicaciones biológicas de estos tipos de regulación se discuten. Finalmente se plantea una serie de alternativas experimentales enfocadas a la immortalización de las CGP, y al estudio de los eventos moleculares involucrados en su diferenciación.

## ANTECEDENTES

### A) BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES .

#### 1.- Origen y migración de las CGP.

Las CGP en el ratón se determinan al parecer muy temprano en el desarrollo (Soriano y Jaenisch, 1986). Muy recientemente, se ha determinado que el establecimiento final del linaje germinal esta influenciado por la posición de las células en el embrión durante el proceso de gastrulación (Tam y Zhou, 1996). En este mamífero, la edad más temprana en la que las CGP pueden identificarse, gracias a su fuerte reacción histoquímica de fosfatasa alcalina, es a los 7-7.5 días postcoito (dpc), en el mesodermo de la región posterior de la línea primitiva (Ginsburg et al, 1990). Posteriormente, a los 8 dpc estas células se localizan en la base del alantoides, y a los 9 dpc en el intestino en formación, debido a que son acarreadas con los movimientos morfogénéticos de los tejidos que dan lugar a este órgano (Chiquoine, 1954).

A los 10 dpc, en la región ventral del mesonefros, se observan los primeros rudimentos de la formación de la cresta genital representada por un engrosamiento del epitelio celómico. Este evento coincide con la salida de las CGP del intestino y la migración de estas por el mesenterio dorsal, y lateralmente hacia la región de las crestas genitales, que culmina alrededor de los 11.5 dpc. Las CGP, durante esta fase migratoria activa, se caracterizan por presentar una forma amiboidea, interdigitaciones con las células somáticas circundantes y organelos polarizados en sentido inverso a la dirección del movimiento (Zamboni y Merchant, 1973; Clark y Eddy, 1975).

Conforme las CGP se establecen en la gónada, pierden sus características de células migratorias, lo que indica un cambio importante en sus propiedades de superficie. A los 12 dpc, las CGP se encuentran integradas dentro del compartimento epitelial de la gónada diferenciada (ovario o testículo) cuya morfología depende del sexo genético del individuo (Koopman et al, 1990; Koopman et al, 1991). Durante el período descrito, las células germinales primordiales van de un grupo de 50-80 células a los 7.5 dpc hasta alcanzar un

número de alrededor 10 mil células por embrión a los 12.5 dpc (Tam y Snow, 1981; Cuervo, 1996). El tiempo de división calculado para estas células es de aproximadamente 16 horas (Tam y Snow, 1981).

Los mecanismos que utilizan las CGP para migrar y dirigirse a la gónada se desconocen ampliamente. Sin embargo, se ha postulado que caminos específicos formados por las células somáticas circundantes y/o la adhesión diferencial a componentes de la matriz extracelular, combinado con la posible existencia de factores quimiotácticos producidos por la gónada, son algunos de los mecanismos que utilizan estas células para llegar a su destino (Alvarez-Buylla y Merchant, 1983; Godin et al, 1990; Wylie y Heasman, 1993). La llegada de las CGP a la gónada y la pérdida de sus características migratorias marca el inicio de otra fase del desarrollo de las CGP a las que se denomina simplemente células germinales (CG). A esta fase se denominará fase de gonadal.

## **2.- Diferenciación de las células germinales durante la fase de gonadal.**

Las CG ya establecidas en la gónada (12.5 dpc), continúan proliferando activamente lo que da como resultado que para los 13.5 dpc, su número aumente hasta alrededor de 25 mil CG por embrión (Tam y Snow, 1981; Cuervo, 1996). Entre los 13.5 y los 14.5 dpc, estas células muestran una conducta proliferativa muy particular de cada sexo. Mientras que en el ovario las CG inician la primera división meiótica (ovocitos), en el testículo éstas entran en un reposo mitótico (proespermatogonias-T), el cual se mantiene hasta 8 días después del nacimiento (Peters, 1970; Hilscher y Hilscher, 1978). Se sugiere que el inicio de la meiosis embrionaria es un proceso pasivo en este tipo celular, y que las CG en la gónada masculina no inician este proceso, debido a factores de naturaleza aún desconocida que las detienen en el ciclo celular. Una de las evidencias que apoyan esta hipótesis es la observación de que las proespermatogonias que no alcanzan la gónada y quedan fuera de la influencia de las células somáticas del testículo inician el proceso de meiosis (Upadhyay y Zamboni, 1982). Otras evidencias experimentales que apoyan esta idea provienen de experimentos de formación de gónadas quiméricas en cultivo de órganos por medio de reagregación o el cultivo de crestas genitales masculinas

de 10.5 dpc. En el primer caso, el análisis de agregados de ovarios con proespermatogonias de 12 dpc marcadas con un colorante vital, revelaron que las segundas no lograban iniciar la meiosis en ambiente ovárico, sino que se mantenían en reposo mitótico, sugiriendo que una vez que las proespermatogonias reciben la instrucción de no dividirse ésta se mantiene. Adicionalmente en quimeras formadas por oogonias de 12.5 dpc marcadas y testículos de la misma edad, alrededor del 20 % de las oogonias inician la meiosis. En quimeras de oogonias de 13.5 dpc y testículos de la misma edad la mayoría de las CG femeninas no progresan en la división meiótica y mueren (Dolci y De Felici, 1990). Estos resultados apoyan la existencia de una substancia que previene la meiosis o un factor que provoca la degeneración de los ovocitos en testículos fetales. Este factor que previene la meiosis podría ser el mismo que dirige el arresto mitótico de las proespermatogonias pero no existen evidencias que apoyen esta idea.

En el caso del cultivo de crestas genitales de 10.5 días, solo las células que quedan en interacción estrecha con células epiteliales que se diferencian en células de Sertoli, entran en arresto mitótico, mientras que las que no lo hacen inician la meiosis. Esta evidencia sugiere que un evento importante que dirige la diferenciación de las proespermatogonias, es la interacción con las células de Sertoli (McLaren y Buehr, 1990). Las señales específicas provenientes de las células somáticas del testículo que determinan la diferenciación de las proespermatogonias durante el desarrollo embrionario se desconocen, sin embargo se han descrito algunas moléculas que pudieran tener un papel en este proceso (ver adelante).

Otro evento importante que ocurre a cierta población de CG durante esta etapa es la muerte celular. Se han observado dos episodios distintos de muerte celular en la ovogénesis embrionaria. El primero ocurre a oogonias de 13 dpc y el segundo a ovocitos que han alcanzado la etapa de paquiteno de la primera división meiótica entre los 15-16 dpc y se extiende hasta el nacimiento (Gondos, 1978) Recientemente se ha dado evidencia de que estas células sufren muerte celular programada o apoptosis (Coucovanis et al, 1993), un tipo de muerte de características muy particulares que se diferencia de la muerte necrótica. Una onda similar de muerte ocurre a las proespermatogonias; en este caso

alrededor del 50% de las CG mueren alrededor del nacimiento (Roosen-Runge y Leik, 1968).

### 3.- Moléculas que modifican la sobrevivencia y conducta proliferativa de las CGP *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente, las CGP pasan de un estado de proliferación mitótica activa a, ya sea un reposo mitótico en el caso de las CGP en un testículo, o bien inician la primera división meiótica cuando se encuentran en un ovario. Este evento se considera como el primer marcador fisiológico de la diferenciación de las células germinales. Hasta la fecha, los avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan la diferenciación de este tipo celular han sido reducidos, debido principalmente a dos limitantes fundamentales. La primera consiste en el número reducido de células puras que se pueden obtener de sus diferentes etapas del desarrollo. La segunda, es su gran susceptibilidad a manipulaciones experimentales, como el cultivo *in vitro*. Respecto a esta segunda limitante, hay que mencionar que solo hasta recientemente se han logrado realizar cultivos de CGP gracias a la determinación de factores de crecimiento que promueven su proliferación y/o sobrevivencia *in vitro* (ver adelante).

El receptor tirosina cinasa c-kit, cuyo ligando es el factor Steel, es una de las moléculas que expresan las CGP. Se ha demostrado que la función de este receptor tiene un papel muy importante en la sobrevivencia de las CGP. Históricamente, se observó que ratones mutantes en el locus *white-spotting* (*W*) (Mintz y Russell, 1957) carecían de CGP o tenían un número muy reducido de éstas. El análisis de esta mutación reveló que el proto-oncogen *c-kit* era el que se encontraba mutado. Paralelamente, otra mutación, la del locus *Steel* (*Sl*; McCoshen y McCallion, 1975), que codifica para el factor de crecimiento Steel, presentaba un fenotipo en las CGP, similar al de la mutación de *c-kit*. Al establecerse que steel es el ligando de c-kit, se comprendió la similitud de ambos fenotipos ya que al no producirse el factor de crecimiento, o al estar mutado su receptor, las CGP no pueden transducir la señal y por lo tanto no pueden sobrevivir.

El factor Steel se presenta en dos formas, una soluble y otra anclada a la membrana. En experimentos realizados *in vitro* se ha determinado que la forma con mayor capacidad para promover la sobrevivencia de las CGP es la que se encuentra anclada a la membrana (Dolci et al, 1991; Matsui et al, 1991). Además de Steel, existen otros factores que promueven la sobrevivencia y/o proliferación de las CGP *in vitro*, como el TGF $\alpha$ , el LIF y la IL-4 (Kawase et al 1994; Matsui et al 1991; Cooke et al, 1996). El incremento en la sobrevivencia de las CGP provocado por el cultivo con Steel y LIF es por medio de la inhibición de la muerte celular programada (Pesce et al, 1993).

Otras de las moléculas descritas que tienen un papel en la proliferación de la CGP son el cAMP y el ácido retinóico (AR) . En el caso del cAMP, el efecto positivo en la proliferación de las CGP se da empleándolo sólo y en combinación con el factor LIF (De Felici et al, 1993; Dolci et al, 1993). En cuanto al AR, éste incrementa el número de CGP de la fase migratoria y retarda significativamente la muerte de CG gonadales (Koshimizu et al, 1995). Si bien se han logrado avances tanto en el conocimiento de los factores que promueven proliferación y sobrevivencia en CGP cultivadas *in vitro*, la longevidad de los cultivos lograda es muy limitada (7-10 días) y no permite obtener un número abundante de células puras para realizar caracterizaciones moleculares.

El cultivo de CGP en presencia de LIF, Steel y bFGF transforma a estas células en líneas con características similares a líneas células embrionarias totipotenciales (Matsui et al, 1992). Entre estas características se encuentran: la expresión abundante de fosfatasa alcalina, la expresión del antígeno de superficie SSEA-1 y del factor de transcripción Oct-4, y su capacidad de contribuir a la formación de la línea germinal en ratones quiméricos. Sin embargo, dado que estas líneas parecen modificarse significativamente, no pueden ser empleadas para el estudio de la diferenciación de la línea germinal.

En experimentos *in vitro* se ha observado que el factor transformante beta-1 (TGF $\beta$ -1) tiene un efecto negativo sobre la proliferación de las células germinales (Godin y Wylie, 1991). Sin embargo, se desconoce si *in vivo* este factor tiene el mismo efecto. Existe la posibilidad de que algún otro factor de la familia de TGF $\beta$ , como puede ser la inhibina o activina, e incluso la hormona antimülleriana, que son expresadas en el testículo en el período cuando las

proespermatogonias entran en reposo mitótico, pudieran ejercer la misma función (Feijen et al 1994; Münsterberg y Lovell-Badge, 1991). Otra actividad que se le ha postulado a TGF $\beta$  es la de ser el un agente quimioatrayente que pudiera dirigir la migración de estas células hacia la gónada (Godin y Wylie, 1991).

#### 4.- Aspectos moleculares de las CGP

Hasta la fecha se conocen pocas moléculas que se expresan en las CGP durante su desarrollo embrionario y que pudieran tener un papel relevante en la biología de este tipo celular. Algunas de estas se describen en la Tabla 1.

La fosfatasa alcalina es una enzima que desde mediados de este siglo se ha empleado como una trazador de la aparición y migración de estas células. Dado que en otros sistemas esta enzima tiene un papel en la migración celular (Chang et al, 1993; Thibaudeau et al, 1993), hasta hace poco tiempo se pensaba que la expresión abundante de ésta en las CGP podría tener el mismo papel. Sin embargo, la mutación dirigida del gen que codifica para esta enzima en las CGP, ha demostrado que su ausencia no modifica la conducta migratoria de estas células (MacGregor et al, 1995).

Oct-4, que es un factor de transcripción de la familia de los que se unen a motivos octaméricos (Schöler et al, 1989), es otra de las proteínas que se expresa en este tipo celular. El papel que juega este factor en las CGP aún no se ha determinado, sin embargo, dado que se expresa entre los 8.5-12 dpc en CGP de ambos sexos, en ovocitos no fertilizados y en células pluripotenciales embrionarias, se piensa que es un factor involucrado en mantener un estado de totipotencialidad en células capaces de producir nuevas células germinales (Schöler et al, 1989).

Recientemente, se ha descrito que las CG de ratón expresan el homólogo de la proteína VASA de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Fujiwara et al, 1994). En este insecto dicha proteína tiene un papel en la determinación de la línea germinal; sin embargo, en el ratón, el homólogo de esta proteína parece no estar relacionado a este evento, ya que su expresión se da en las CG ya establecidas en la gónada.

En este año, se ha descrito en la gónada de 11.5 dpc de ambos sexos, la presencia de ciertos polipéptidos similares a los polipéptidos activadores de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP, de sus iniciales en inglés). Como se mencionó en la sección anterior, estos polipéptidos tienen la función de incrementar los niveles intracelulares de cAMP. Si bien la expresión de éstos no es estrictamente en las CGP, es probable que la expresión en la gónada tenga un papel directo en el control de la proliferación de este tipo celular *in vivo* (Pesce et al, 1996).

Durante la vida embrionaria las CGP expresan en su superficie una gran variedad de determinantes antigénicos con una distribución temporal muy específica. A algunas de estas moléculas se les ha asociado un papel en el proceso de migración de estas células, como es el caso del antígeno embrionario estado específico-1 (SSEA-1, por sus iniciales en inglés), por ser muy abundante en la superficie en este tipo celular durante su período migratorio y desaparece gradualmente una vez que ya han colonizado la gónada (Donovan et al, 1986; Gomperts et al, 1994). Sin embargo, aún no se ha establecido si ésta y otras moléculas relacionadas, realmente tienen un papel funcional en la migración de este tipo celular.

Dado que muchos proto-oncogenes están involucrados en el control del crecimiento, la proliferación y diferenciación de una variedad de tipos celulares, se ha analizado la expresión de algunos de estos en CG de 12-15 dpc de ambos sexos (Coucovanis y Jones, 1993). El proto-oncogen *c-myc* no se expresa en CG de 12 dpc y comienza a expresarse 24 horas después y hasta los 15 dpc en ambos sexos. *c-jun* y *c-fos* se expresan a bajos niveles en CG de 12 dpc y su expresión aumenta considerablemente en ambos sexos entre 13-15 dpc. El incremento en la expresión de *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* entre los 12 y 13 dpc parece estar relacionado mas bien con eventos generales de la regulación de la proliferación o diferenciación de las CG que con el inicio de la meiosis. *c-kit* aparece en CG de 12 dpc de ambos sexos, desaparece a los 13 dpc en los machos, volviendo a expresarse a los 14-15 dpc; en las hembras la expresión es continua hasta los 14 días. La desaparición de *c-kit* en proespermatogonias de 13 dpc pudiera ser uno de los eventos necesarios para la entrada en reposo mitótico y la nueva aparición tener un papel en la sobrevivencia de las

proespermatogonias-T. *c-mos* pasa de no expresarse a los 12 dpc a expresarse de los 13-15 dpc en CG de ambos sexos. *c-mos* es un proto-oncogen que en la maduración del ovocito tiene dos funciones descritas, la de estimular la progresión de la meiosis y la de factor citostático (Sagata et al, 1989; Yew et al, 1992). La expresión de *c-mos* en células germinales de 13-15 dpc pudiera tener un papel en el inicio y progresión de la meiosis en las CG femeninas, mientras que en las CG masculinas pudiera tener un efecto en el arresto mitótico vía su función citostática.

TABLA 1  
Expresión de moléculas en la línea germinal durante el desarrollo embrionario\*

	7.5	8.5	9.5	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5
FATN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
oct-4	nd	+	+	+	+	+	+h	+h	+h
vasa	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SSEA-1	-	-	+	+	+	+	+	+	-
PG1	nd	nd	-	+	+	+	+	+	+m
$\alpha$ -Forssman	nd	-	-	+	+	+	+	+	+
SSEA-3	nd	-	-	-	-	+	+	-	-
EMA-1	+	+	+	+	+	+	-	nd	nd
EMA-6	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd
4C9	-	+	+	+	+	+	+	+	+h
GCNA1	nd	nd	-	-	+	+	+	+	+
c-kit	+	+	+	+	+	+	+h	+	+
c-myc	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	+	+
c-fos	nd	nd	nd	nd	nd	+/-	+	+	+
c-jun	nd	nd	nd	nd	nd	+/-	+	+	+
c-mos	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	+	+

h. hembras; m. machos; nd, no determinado. \*Tabla modificada de Enders y May, 1994.

## B) LA FOSFATASA ALCALINA TEJIDO NO ESPECIFICA.

### 1.- Generalidades.

Las fosfatasas alcalinas (fosfohidrolasa de monoéster-ortofosfórico E.C. 3.1.3.1) son enzimas que hidrolizan uniones fosfomonoéster contenidos en una gran variedad de compuestos orgánicos. Su actividad óptima *in vitro* es a un pH alcalino. Se encuentran unidas a membrana por medio del grupo glicosil fosfatidil inositol y están altamente glicosiladas. Normalmente se les encuentra en forma de homodímeros u homotetrámeros. En el ratón, se han descrito hasta la actualidad tres isoformas de la fosfatasa alcalina: la embrionaria (FAE), la intestinal (FAI) y la denominada tejido no específica (FATN) que debe su nombre

a que se expresa en una gran variedad de tejidos (Manes et al, 1990; Terao y Mintz, 1987; Terao et al, 1990). A la FATN también se le conoce con el nombre de isoforma de hígado/hueso/riñón ya que estos tejidos la expresan en abundancia. Cada una de las isoformas se encuentra codificada por genes independientes aunque debido a su similitud en secuencia se cree se originaron de un gen ancestral común. Aunque los diferentes genes presentan homología, el de la *FATN* diverge en secuencia más con respecto a las otras (55%). El gen que codifica para esta enzima, se encuentra localizado en el cromosoma 4 del ratón y consiste de 12 exones que se extienden en alrededor 50 kb (Terao et al, 1990). La proteína consta de 525 aminoácidos, con un peso molecular predicho con base en la secuencia de 57kD, y es codificada por un transcrito procesado de 2.5 kb (Terao y Mintz, 1987). Su actividad enzimática se inhibe por homoarginina, levamisol o bromotetramisol y es sumamente termolábil. Dentro de las características que presenta ésta y las otras isoformas, está un dominio de unión a proteínas de la matriz extracelular, rasgo que sugirió que esta enzima pudiera tener un papel en la migración celular. En particular se ha identificado que este dominio puede unirse a las colágenas tipo I, II y X (Millán y Fishman, 1995).

## 2.- Función.

La FATN se expresa muy abundantemente durante el desarrollo embrionario en centros de proliferación, diferenciación y morfogénesis, por lo que se había sugerido que pudiera tener un papel importante durante el desarrollo. Sorprendentemente, la mutación dirigida de este gen mostró que esta enzima no es tan relevante para el desarrollo embrionario y la migración de las células germinales primordiales, en virtud de que los embriones mutantes se desarrollan normalmente (MacGregor et al, 1995). Aunque la función de esta enzima se desconoce ampliamente, estudios en pacientes con hipofosfatasa, un síndrome provocado por la carencia de FATN en humanos, ha permitido atribuirle al menos dos funciones. La primera esta en relación con el metabolismo de piridoxina o vitamina B-6. En este caso se ha descrito que la fosfatasa alcalina tiene la función de desfosforilar al fosfato de piridoxal extracelular para dar lugar al derivado permeable para las células, el piridoxal (Whyte et al. 1985; Fedde y Whyte, 1990). La segunda esta en relación a defectos en la calcificación de los huesos y dientes que presentan los pacientes

que padecen de hipofosfatasa. Al parecer el exceso de pirofosfato, provocado por la ausencia de la FATN, evita la formación de cristales de fosfato de calcio, esencial para la calcificación de los huesos y dientes (Caswell et al, 1991).

El análisis de la mutación dirigida de este gen en el ratón apoya lo anterior y además reveló funciones fisiológicas esenciales para esta enzima (Waymire et al, 1995). Aunque estos animales presentan un desarrollo ontogenético normal, mueren dos semanas después del nacimiento, evento precedido por convulsiones y parálisis, lo que indica un efecto a nivel del sistema nervioso central. Si bien esta enzima no se expresa en el sistema nervioso, el defecto se debe a fallas en el metabolismo del piridoxal 5-fosfato, un cofactor de la glutamato descarboxilasa, que se sugiere tiene como consecuencia la reducción de los niveles de GABA en el cerebro. Estos animales pueden ser rescatados de morir durante un tiempo, si se les administra vitámeros de B-6, lo que permitió determinar que los ratones *FATN<sup>-</sup>/FATN<sup>-</sup>* presentan hipomineralización de algunos huesos y displasia dental.

### **3.- Expresión de la FATN durante el desarrollo embrionario del ratón.**

La FAE y la FATN son las únicas isoformas que se expresan durante el desarrollo embrionario. En etapas tempranas del desarrollo se ha estimado que hay aproximadamente 10 veces más transcrito de la isoforma embrionaria que de la FATN. Sin embargo, entre los 7 y 14 dpc la FATN es la isoforma predominante en el embrión completo mientras que la FAE se vuelve indetectable. El patrón de expresión de esta última isoforma durante el desarrollo embrionario se ha establecido por métodos histoquímicos, y por pruebas bioquímicas y moleculares (Kwong y Tam, 1984; Merchant-Larios et al, 1985; Hahnel et al, 1990; MacGregor et al, 1995; este trabajo). A continuación se hace una breve descripción de los sitios, estructuras y tipos celulares que expresan la FATN durante la etapa embrionaria.

Una cantidad poco abundante del transcrito de la FATN se puede detectar en embriones desde dos células. A los 4.5 dpc, en la etapa de blastocisto, la FATN se expresa en las células del trofoectodermo y en células de la masa celular interna. Posteriormente, en la etapa de huevo en cilindro (5 dpc), las

células que expresan la enzima se localizan en el ectodermo extraembrionario. En la etapa previa a la formación de la línea primitiva (6 dpc), se encuentran grupos de células en el ectodermo extraembrionario.

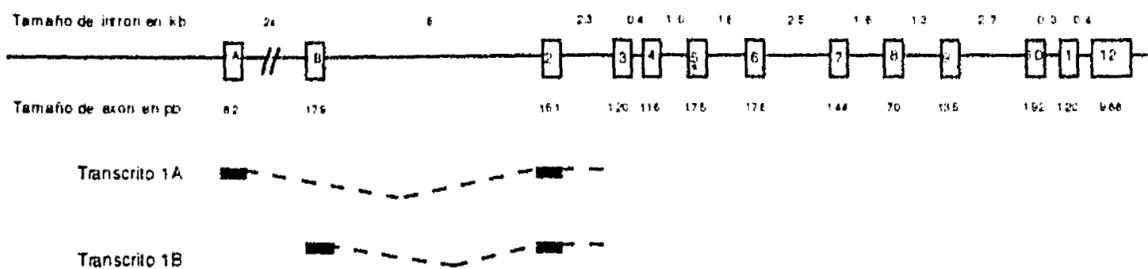
En la etapa de pliegue cefálico temprano y tardío (7 dpc), se observa expresión en la base del alantoides (lugar donde se encuentran las CGP), en la región de la línea primitiva y en el corion. Un día después (8 dpc), las células positivas se encuentran en la parte posterior de la línea primitiva específicamente en el mesodermo para-axial, el neuroectodermo y las CGP. A los 11 dpc, la expresión se localiza en las CGP dentro de la cresta genital, el epitelio intestinal y el tubo neural en el sector ventrolateral.

Entre los 13 y 14 dpc, la expresión es en el esqueleto en desarrollo, en las gónadas (debido a las CG), la placenta y el epitelio intestinal. La actividad en el esqueleto en desarrollo se asocia a la expresión en condrocitos y osteoblastos que sintetizan vesículas de matriz que se piensa juegan un papel importante en la calcificación. En la placenta la expresión parece localizada en la región laberíntica de la placenta. En embriones de 10-13, dpc un sitio que se caracteriza por su elevada actividad de FA, es el ectodermo apical de los miembros en desarrollo.

#### **4.- Estructura del gen de la *FATN* y sus regiones reguladoras**

El *FATN* mapea en el cromosoma 4 del ratón y se extiende en al menos 50 kb que contienen doce exones (Esquema I; Terao et al, 1990; Studer et al, 1991). En el extremo 3' del gen, en el exon 12, se encuentran las señales putativas de procesamiento del RNA (poliadenilación), 16 pb hacia abajo del sitio AATAAA y 17 bases arriba del una región rica en G+T. La región 5' no traducida esta contenida en los exones 1A y 1B (ver mas adelante) y en parte del 2. La región que codifica para la proteína se encuentra en 11 exones, del 2 al 12 con la región 3' no traducida dentro del exon 12. El sitio activo de la enzima esta codificado por la secuencia en el exon número 5.

**Esquema I. Locus del *FATN* (Terao et al, 1990; Studer et al, 1991)**



La expresión del *FATN* esta regulada por la presencia de dos exones líder que están controlados por dos diferentes promotores, lo que da como resultado la síntesis de dos mensajeros con diferente procesamiento. Los transcritos poseen diferentes regiones 5' no traducibles pero ambos codifican para una proteína idéntica. Con la finalidad de estudiar la regulación de la enzima y su expresión tejido específica se han caracterizado parte de ambas regiones promotoras, correspondientes a las regiones 5' de los exones 1A y 1B (Esquema I).

El promotor del exon 1A es responsable de la expresión del *FATN* en líneas celulares embrionarias y en general en todos los tejidos adultos caracterizados por una elevada expresión como son el riñón, el hueso y la placenta. Este promotor se encuentra localizado 32 kb hacia arriba de exon 2. La secuencia de las 1.9 kb 5' del exon 1A contiene características similares a las de promotores de genes de mantenimiento como son regiones ricas en G/C con múltiples sitios de unión para el factor transcripcional Sp1 y expresión en tejidos de origen diverso. En particular contiene un elemento promotor similar a la caja TATA localizada 25 pb hacia arriba del inicio de la transcripción (TTCATAA) y tres repetidas GGCGGG en posiciones -61, -71 y -76 que corresponden a los sitios de unión para el factor Sp1 (Terao et al, 1990).

La caracterización funcional de 1.9 kb de la región 5' del promotor del exon 1A en células F9 (que expresan la *FATN*) reveló un aumento de alrededor 7 veces en la expresión de un reportero dirigido por el fragmento del promotor mencionado, respecto al basal sin el promotor (Terao et al, 1990). Esta evidencia sugiere que dentro de las 1.9 kb del promotor del exon 1A existen elementos generales esenciales para la transcripción así como determinantes para dirigir la transcripción celular, al menos en células F9. Sin embargo, la

observación de que este fragmento de promotor solo representó el 5% de la actividad obtenida con el promotor-aumentador del virus SV40, sugiere la ausencia de algún elemento aumentador ("enhancer").

El inicio de la transcripción para el promotor 1B se ha mapeado aproximadamente a 8 kb hacia arriba del extremo 5' del exon 2. La secuencia de 774 pb de la región 5' del exon 1B muestra que esta región carece de secuencias consenso de las cajas TATA y CAAT (Studer et al, 1991). Los únicos tejidos con niveles detectables del transcrito que contiene el exon 1B son el corazón y diafragma del ratón adulto, pero curiosamente estos tejidos tienen una actividad enzimática muy reducida. Hasta la fecha no se han realizado ensayos de la funcionalidad de esta región promotora.

Algunas de las preguntas importantes a responder son: ¿Que promotor utilizan las células germinales primordiales y los demás tejidos embrionarios para dirigir la expresión del *FATN*? Dada la especificidad de uso del promotor del exon 1B y que los tejidos donde se sintetizan se caracterizan por una muy reducida actividad enzimática, parece poco probable que sea el promotor del exon 1B el que emplean las CGP para dirigir la transcripción del *FATN*. Entonces, ¿1.9 kb del promotor del exon 1A son suficientes para dirigir la expresión de manera específica en todos los tejidos donde se ha descrito expresión de la enzima a partir de este promotor (riñón, placenta, hueso, etc.)? o bien, ¿existen dentro de las 1.9 kb analizadas los elementos necesarios para dirigir la expresión en células germinales? Para contestar algunas de estas preguntas es necesario determinar las regiones promotoras del *FATN* que están involucradas en la regulación de la expresión no solo *in vitro* por medio de la transfección de líneas celulares con construcciones reporteras, sino también *in vivo* mediante la construcción de animales transgénicos. Esta última estrategia, es la que daría mayor información respecto a la presencia de elementos de tejido especificidad que determinan el patrón de expresión *in vivo*.

##### **5.- Reguladores de la transcripción del *FATN*.**

Se han realizado algunos estudios en relación a la regulación de la expresión del *FATN* en algunas líneas celulares embrionarias que expresan constitutivamente dicha isoforma, las células de teratocarcinoma F9 y P19. Estas

células, se asemejan a las células embrionarias pluripotenciales y proveen un modelo sencillo de diferenciación celular *in vitro*. Las células F9 se diferencian en endodermo primitivo, parietal y visceral, dependiendo de las condiciones de cultivo empleadas (Rudnicki y McBurney, 1987). En particular se diferencian hacia endodermo primitivo si se les trata con ácido retinóico y sus derivados, este evento se acompaña del aumento en la actividad de FA. Este aumento en actividad de debe al incremento en la cantidad del transcrito así como de la proteína. El incremento en los niveles del transcrito se debe a un aumento en la transcripción, independiente de la síntesis de proteínas *de novo*, y no a un aumento en la estabilidad del mensajero (Gianní et al, 1991).

Se ha descrito que el promotor funcional en las células F9 es el del exon 1A (Studer et al, 1991). La evidencia anteriormente descrita sugiere que dentro de dicha región promotora pudieran existir elementos de respuesta a AR. Las células P19 también son un modelo de diferenciación *in vitro*. En presencia de AR estas células se diferencian irreversiblemente a células con fenotipo neuronal y glial. La adición de AR a las P19 también induce la transcripción del gen del *FATN* (Scheibe et al, 1991). En ambos casos, el cAMP parece tener un efecto muy débil sobre la inducción de la transcripción en estos tipos celulares.

Otra línea celular donde se han realizado estudios sobre la regulación del *FATN* es la línea de fibroblastos L929. Estas células normalmente no expresan el mensajero de la *FATN*, sin embargo se ha observado que el transcrito que contiene el exon 1B, aumenta dramáticamente por la adición de cAMP y análogos, inductores de la adenilato ciclasa y AR (Gianní et al, 1993).

### **C) REGIONES REGULADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN Y SUS MÉTODOS DE ESTUDIO**

#### **1.- Regiones reguladoras de la transcripción.**

La transcripción de un gen eucariote esta determinada por la presencia de elementos básicos (promotor basal), que permiten la unión de RNA polimerasas y proteínas accesorias que inician la síntesis del transcrito. Para los genes que son transcritos por la RNA pol II (que dan lugar a los hnRNA), y a diferencia de los que son transcritos por las RNA pol I y III, dichos elementos

básicos son mas diversos. En general, el nivel correcto de transcripción de un gen esta dado por la acción de otros elementos, que incrementan o disminuyen el nivel de la transcripción y/o confieren temporalidad y tejido especificidad a la expresión. A dichos elementos se unen proteínas, y es la integración de múltiples interacciones DNA-proteína y proteína-proteína a lo largo de sus secuencias regulatorias, lo que determina el estado transcripcional de un gen particular.

Un promotor basal esta constituido (aunque no en todos los casos) de dos elementos: una región a la que se unen factores transcripcionales generales que reconocen una secuencia específica, y una región que determina el inicio de la transcripción, el iniciador (revisado en Goodrich et al, 1996). Uno de los elementos basales de los que se ha desprendido mayor conocimiento a nivel de regulación transcripcional es la caja TATA, que generalmente se encuentra hacia arriba del inicio de la transcripción (entre -25 y -35 pb) en muchos de los genes eucariotes estudiados. A esta secuencia, se une un factor de transcripción denominado TFIID que esta formado por varias subunidades, una de las cuales es la proteína de unión a la caja TATA (TBP, de sus iniciales en inglés). El TFIID es reconocido por la RNA pol II y por otros factores transcripcionales generales (TFIIA, TFIIB, TFIIIC, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) para formar el complejo de inicio de la transcripción. Aunque existen promotores que carecen de caja TATA, se ha determinado que el TFIID también puede ser empleado por este tipo de promotores. El iniciador es un elemento pequeño, poco conservado, que acompaña el sitio de inicio de la transcripción y al parecer también es reconocido por algunas de las subunidades del TFIID (revisado en Goodrich et al, 1996).

Los aumentadores ("enhancers") son regiones que incrementan de manera significativa la actividad de un promotor basal. Son mas complejos que el promotor basal (puede contener diversos sitios de unión para factores transcripcionales específicos), actúan independientemente de su orientación, pueden localizarse a gran distancia del sitio de inicio de la transcripción y en algunos casos determinan la tejido especificidad y temporalidad de la expresión de un gen. Aun no se comprende muy bien como es que estas regiones regulatorias actúan de manera concertada con el promotor basal para activar la transcripción dependiente de la RNA pol II, pero se han propuesto tres modelos

no excluyentes: el primero en el que la unión de activadores transcripcionales a su secuencia blanco, provocan el reclutamiento de los factores transcripcionales generales; el segundo en el que el activador provoca un cambio conformacional en el complejo de inicio de la transcripción; y el último por la promoción de modificaciones covalentes (e.g. fosforilación) de componentes del mencionado complejo (revisado en Goodrich et al, 1996). Algunos de estos modelos también pueden aplicarse a los casos donde hay represión de la transcripción como puede ser el caso de los silenciadores, elementos que mantienen apagado un gen particular de manera tejida específica (Mori et al, 1992). En este sentido, la interacción del factor represor con la maquinaria de transcripción pudiera evitar el reclutamiento, provocar un cambio conformacional inadecuado, o modificar covalentemente a los factores de transcripción generales, a manera de inhibir la formación o la actividad del complejo de iniciación.

Otro factor importante en la regulación de la transcripción de un gen es el estado conformacional de la cromatina. En general un estado conformacional "abierto" permite la unión de factores de transcripción, por esta razón los sitios con hipersensibilidad a la DNasa I correlacionan con regiones relevantes para la transcripción de un gen. Una conformación "cerrada" por consecuencia evitará la unión de factores reguladores de la transcripción y en general serán regiones inactivas en términos de transcripción. Dentro de los mecanismos conocidos, que promueven un relajamiento en la cromatina se encuentra por ejemplo, la acetilación de las proteínas que constituyen los nucleosomas (Wolffe y Pruss, 1996). Por su parte, la metilación, interfiere con la unión de factores de transcripción así como provocar modificaciones en la estructura de la cromatina mediante un mecanismos aun no muy bien establecidos (Eden y Cedar, 1994).

En resumen podemos decir que la transcripción a partir de promotores dependientes de la RNA pol II esta controlada de manera muy fina, por la acción concertada de factores regulatorios positivos y negativos incluyendo activadores sitio específicos, represores y proteínas asociadas a la cromatina. En general los elementos que controlan la tejida especificidad y temporalidad de la expresión de un gen se localizan en la región 5' al sitio de inicio de la transcripción y pueden extenderse a lo largo de muchas kilobases.

## 2.- Algunos métodos de estudio.

Existe una gran variedad de ensayos para estudiar los diversos aspectos relacionados a la transcripción de un gen (localización de sitios de hipersensibilidad a la DNasa, ensayos de unión de proteínas a secuencias específicas, extensión de iniciadores, marcado de RNA nascente). Para los fines del presente trabajo, mencionaré algunos de los sistemas que permiten localizar de las regiones asociadas a la transcripción específica de un gen determinado. Estas involucran la introducción, en células o en animales transgénicos, de una construcción de DNA recombinante, que contiene las regiones a ser analizadas, fusionadas generalmente a un gen heterólogo (e.g. reportero), con las señales de procesamiento adecuadas, lo cual permite registrar la actividad transcripcional de la región a analizar. El fragmento del promotor a analizar deberá contener la región del promotor basal y el fragmento de mayor tamaño posible de la región 5'. Como se mencionó anteriormente, en general la mayoría de los elementos regulatorios de la transcripción se encuentran en la región 5' del gen, sin embargo algunos aumentadores importantes pueden estar presentes en el extremo 3' del gen o incluso dentro de intrones o exones, por lo que esto debe tenerse en cuenta también para el diseño de una construcción.

Dentro de los sistemas que se emplean para determinar las regiones necesarias para promover de una manera adecuada (tejido especificidad y temporalidad) la transcripción de un gen determinado se encuentran: los sistemas de transfección de células y los sistemas de animales transgénicos.

En los sistemas de transfección, las construcciones se introducen por medio de diversos métodos como son la transfección mediante la formación de precipitados de fosfato de calcio, la mediada por liposomas, la electroporación o la mediada por retrovirus. El análisis puede ser en ensayos transitorios, es decir, en células que han sido transfectadas pero que no hayan integrado la construcción en su genoma, o bien en ensayos en líneas estables (aquellas en las que ocurrió el evento de integración).

Para fines prácticos, en general se recurre a los ensayos transitorios debido a la rapidez con la que se pueden obtener los resultados. Sin embargo, en este caso, es requisito indispensable obtener una eficiencia de transfección

elevada para asegurar resultados confiables. Una de las principales desventajas de este sistema de análisis es que los resultados obtenidos pueden ser muy parciales y solo reflejar la actividad transcripcional asociada al tipo celular particular que se empleó para el ensayo. En este sentido, el realizar el análisis, por medio del sistema de animales transgénicos descarta esta limitante ya que el estudio se puede hacer en el contexto del animal completo. Una de las desventajas que presenta este sistema es que la actividad transcripcional de la construcción a analizar puede verse influenciada por el sitio de integración del transgene. El estudio puede realizarse en líneas estables pero dado que el tiempo requerido para establecer una línea es prolongado, se puede optar, si los objetivos lo permiten, por realizar el análisis en transgénicos transitorios (generación cero= Go). El uso de animales transgénicos transitorios permite realizar el análisis en un tiempo relativamente corto, principalmente cuando este se realiza en embriones, ya que en un período de alrededor de dos semanas se pueden obtener gran número de individuos transgénicos para una diversidad de construcciones (Escalante-Alcalde y Covarrubias, en prensa).

Una vez obtenida la o las regiones apropiadas, se pueden localizar los elementos específicos por medio de deleciones o mutaciones específicas en secuencias que potencialmente son sitios de unión a factores de transcripción y ensayar sus efectos en la actividad transcripcional con alguna de las técnicas antes mencionadas.

## OBJETIVOS

### General:

Determinar si fragmentos de alguno de los dos promotores del *FATN* pueden emplearse para dirigir la expresión de genes heterólogos a las CGP.

### Particulares:

Determinar cual de los dos promotores usan las CGP y las células embrionarias totipotenciales (ES) para dirigir la transcripción del *FATN*.

Caracterizar los posibles elementos que regulan la expresión de este gen en células germinales primordiales y en ES en ensayos *in vitro*.

Caracterizar los posibles elementos que regulan la expresión de este gen en ensayos *in vivo* (en animales transgénicos).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección solo se describen los protocolos que no aparecen en la sección correspondiente de las publicaciones anexadas (ver publicaciones 1 y 2).

### **A) Transfección de células germinales en cultivos primarios de gónadas embrionarias.**

Gónadas de 12.5 dpc fueron incubadas 10 minutos a 37 °C con una solución de tripsina 0.25 % en Verseno (PBS-EDTA, GIBCO); la enzima se inactivó por la adición de medio M15 (suplementado con 15 % de suero bovino fetal), y las gónadas se disgregaron con pipeta. Después de dos lavados con medio libre de suero (Optimem, BRL), las células se resuspendieron en 500 µl del mismo medio. De esta suspensión, se sembraron pozos con 60 mil células cada uno, en cajas de cultivo de 96 pozos. Cada pozo se aforó a 50 µl de medio y se le agregó 3 µl de la solución para transfectar. Esta última se preparó de la siguiente manera. Se disolvieron 50 µg de lipofectAMINE (BRL) en 100 µl de Optimem en un tubo de policarbonato. Por separado se disolvieron 10 µg de la construcción a ensayar en 100 µl de Optimem. Una vez disueltos se mezclaron ambas soluciones y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de una incubación de 4 horas a 37 °C en presencia de la solución para transfectar se retiró el medio con mucho cuidado y se sustituyó por 100 µl de medio M15 fresco. Las células se cultivaron por espacio de 24 horas a 37 °C. Posteriormente las células se sometieron a un ensayo para detectar la actividad del producto del gen reportero *lacZ*.

### **B) Ensayo histoquímico para la actividad de la β-galactosidasa en cultivos primarios.**

Las células de cada pozo se fijaron con formol 4% en PBS pH 7.5 de 5-10 min. y se lavaron dos veces con PBS durante 10 min. A cada pozo se le agregó 100 µl de una solución de ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM en PBS que contenía 1 mg/ml de X-gal. Se incubó a 37 °C durante una noche, y posteriormente se lavó cada pozo con PBS. Las células que

expresaron la construcción presentaron la típica coloración azul. Para fotografiar los cultivos, los pozos se llenaron de glicerol y se colocó un cubreobjetos en la parte superior, con la finalidad de evitar la deformación de la imagen debido a la formación de un menisco.

### **C) Ensayos de doble marcado.**

Histoquímica para  $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina. Los cultivos de células transfectadas se fijaron y trataron como se mencionó en el punto anterior. Después de dos lavados con PBS se incubaron con una solución 25 mM de Tris-HCl pH 9.0; 0.15 M de NaCl; 4.0 de  $MgCl_2$ ; 0.4 mg/ml de  $\alpha$ -naftil fosfato; 1.0 mg/ml rojo rápido TR. Un pozo de cada condición fué empleado para control de la histoquímica, el cual se incubó con una solución similar pero carente del sustrato ( $\alpha$ -naftil fosfato).

Inmunohistoquímica para  $\beta$ -galactosidasa y para el SSEA-1. Las células se fijaron como se mencionó anteriormente. Después de tratar las células durante 1 hora con una solución 5 % de albúmina bovina en PBS se permeabilizaron con una solución 0.2 % de Triton-X100 en PBS durante 2 min. Inmediatamente después se incubaron durante una hora con el sobrenadante del hibridoma TG-1 (que reconoce al antígeno SSEA-1; Beverley et al, 1980) y después de lavados con PBS se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a rodamina. Posteriormente, las mismas células se incubaron durante una hora con un anticuerpo policlonal anti  $\beta$ -galactosidasa (Whatman) a una dilución de 1:1000 y después de lavados se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína. Las células se observaron con los filtros fluorescentes correspondientes a cada fluoróforo para determinar la co-localización de ambas señales.

## RESULTADOS

En esta sección se describen en extenso los resultados no publicados y se hace una breve descripción de aquellos que fueron publicados (ver publicaciones 1 y 2).

### A) CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL PROMOTOR 1A DE LA *FATN* EN ENSAYOS *in vitro*.

1.- El promotor del exon 1A es empleado por las CG y tejidos embrionarios para dirigir la expresión del *FATN*.

Por medio de la técnica de RT-PCR (empleando oligonucleótidos específicos para los transcritos que contienen el exon 1A o el 1B) se determinó que las CG y gónadas de 11.5 y 12.5 dpc, los tejidos donde se encuentran las CGP durante su migración hacia la gónada (la base del alantoides y el mesenterio dorsal), así como embriones completos de 8.5, 10.5, 11.5 y 12.5 dpc expresan el transcrito que contiene el exon 1A (Publicación 1; Fig. 1A).

2.- Transfección de cultivos primarios de gónadas.

Una vez determinado que las CG utilizan el promotor del exon 1A para dirigir la expresión del *FATN*, se procedió a establecer si dentro de 1.9 kb de la región 5' del exon 1A se encuentran elementos que dirijan la expresión en células germinales. Inicialmente se estableció un sistema de transfección de cultivos primarios de gónadas de 12.5 dpc, para posteriormente hacer ensayos funcionales con fusiones del promotor del exon 1A y el gen reportero *lacZ*, en dichos cultivos.

El sistema de transfección estandarizado está basado en el uso de liposomas. El primer paso en la estandarización de este protocolo consistió en establecer las concentraciones de liposomas y de DNA óptimas, empleando el vector de expresión pCH110 (Pharmacia) o el vector pRSV/*lacZ*. Estos vectores contienen al gen reportero *lacZ* dirigido por el promotor-aumentador del virus SV40 y el promotor del virus de sarcoma de Roux respectivamente. Estos

promotores se consideran generales para células de mamífero, por lo tanto la expresión del reportero debiera ser en todas aquellas células que fueron transfectadas. La transfección de cultivos primarios de gónadas con los mencionados vectores y con las condiciones estandarizadas dió una eficiencia de transfección de alrededor del 20 % considerándose suficiente para los propósitos (Fig. 1). Además, fue posible corroborar, mediante un doble marcaje, que las CG pueden ser transfectadas y expresar el gen reportero a partir del promotor de SV40 (Fig. 2).

Posteriormente se procedió a transfectar las construcciones reporteras, amablemente proporcionadas por los Drs. E. Garattini y M. Terao (Milán, Italia). Estas construcciones consistieron de la clonación de 2 y 1.3 kb de la región 5' de los exones 1A y 1B respectivamente, en el sitio único de clonación Hind III del pCH110 (Pharmacia). Las construcciones resultantes se denominaron pCH110/1A y pCH110/1B conteniendo fragmentos del promotor de los exones 1A y 1B respectivamente. En la Figura 3 se muestran los resultados de la transfección con los vectores mencionados. Como se puede observar, aparentemente el número de células que expresaron el reportero correlaciona con la funcionalidad de los promotores. Puesto que el promotor del exon 1B no es funcional en células de la gónada, era de esperar que el número de células que expresen el reportero transfectadas con esta construcción debería ser nulo. Por el contrario, la construcción con el promotor del exon 1A presentó evidencias de funcionalidad ya que el número de células que expresaron el reportero fue de 10 veces más que con la construcción con el promotor del exon 1B. Sin embargo, la morfología de la mayoría de las células que expresaron el reportero no correspondió con la de CG sino con células somáticas (Fig 4). Este hecho, puso de manifiesto que probablemente la secuencia del promotor-aumentador de SV40 ejercía un efecto sobre el fragmento del promotor del exon 1A, provocando la expresión no específica en células somáticas.

Para evitar los efectos indeseables del promotor de SV40, el fragmento que contenía las 1.9 kb del promotor del exon 1A y el gen *lacZ*, fueron subclonados en otro vector. A esta construcción se le denominó pAP/1A1.9/*lacZ*. Al realizar nuevamente ensayos de transfección con esta construcción, y al compararla con los que fueron transfectados con pCH110/1A, se observó que el número de células que presentaban expresión era reducido y la morfología de

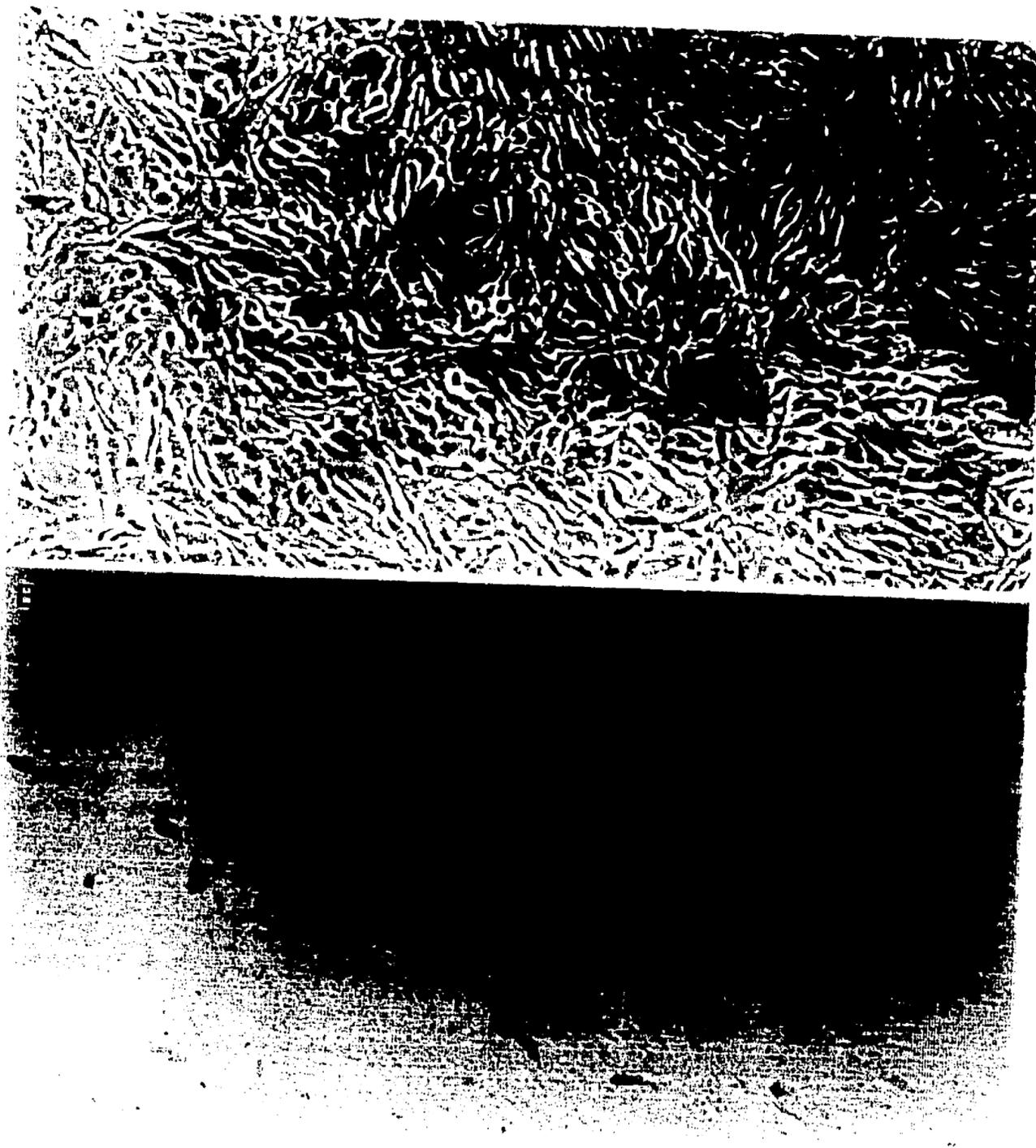
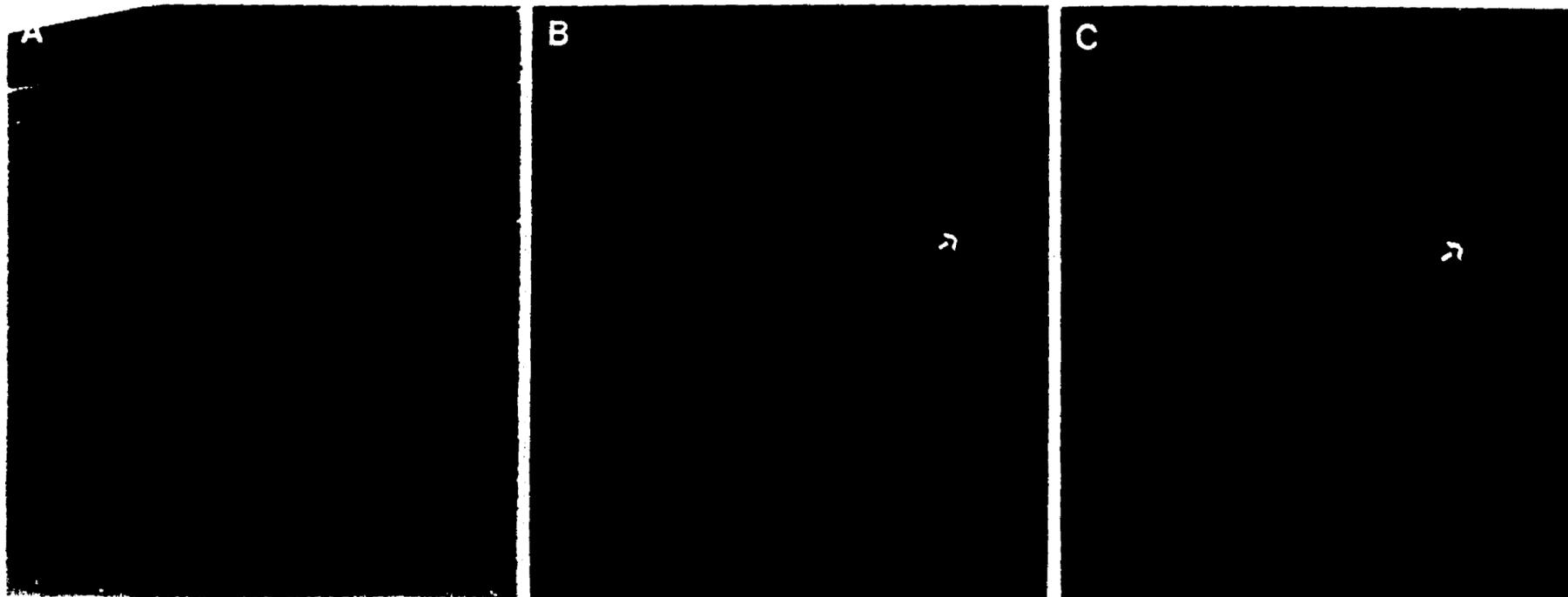


Figura 1. Expresión de  $\beta$ -galactosidasa en un cultivo primario de gónadas de 12.5 dpc lipofectado con el vector pRSV/lacZ. A) Óptica de contraste de fases. B) Óptica de campo claro del campo mostrado en a) donde se observan las células que expresaron el gen reportero *lacZ*. (10x).

Figura 2. Doble inmunotinción para el SSEA-1 y para  $\beta$ -galactosidasa. A) Óptica de contraste de fases de un cultivo primario de gónadas de 12.5 dpc, lipofectado con el vector pCH110. B) y C) Microscopía de fluorescencia del campo observado en A. B) Se observa una célula germinal anti-SSEA-1 positiva en color rojo (rodamina). C) Una de las células que expresaron  $\beta$ -galactosidasa (en color verde), corresponde a la célula germinal presente en el campo (flecha). (10x)



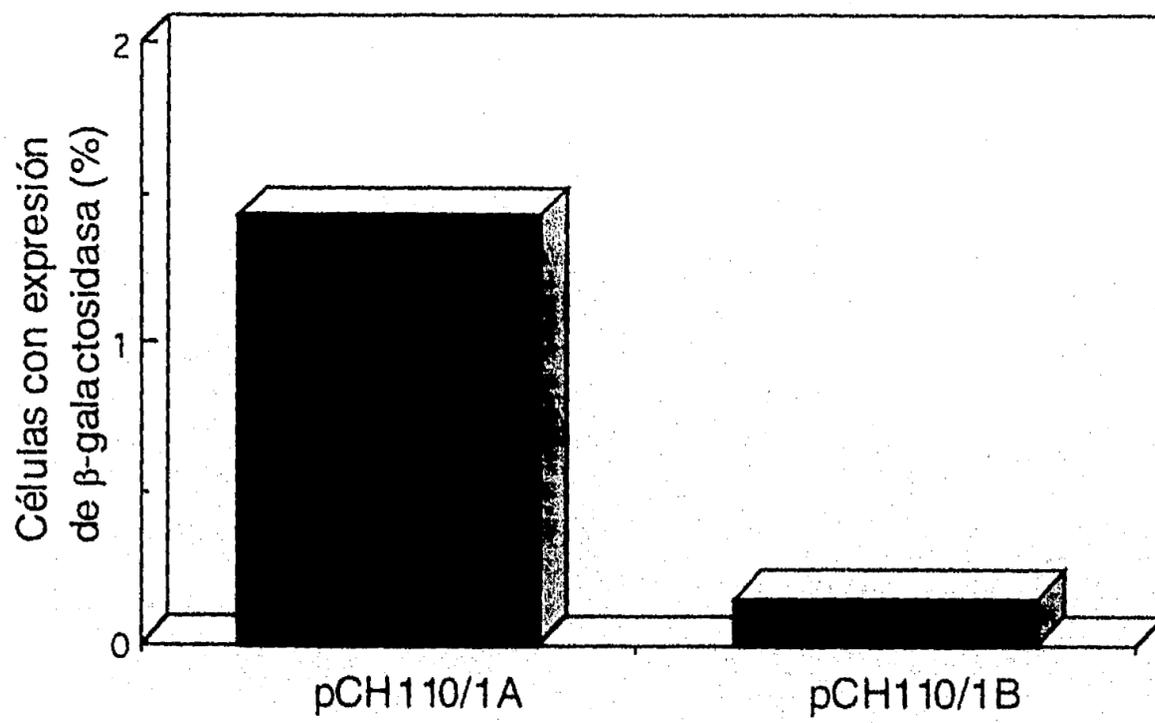


Figura 3. Expresión de  $\beta$ -galactosidasa en cultivos primarios de gónadas de 12.5 dpc lipofectados con las construcciones pCH110/1A y pCH110/1B.

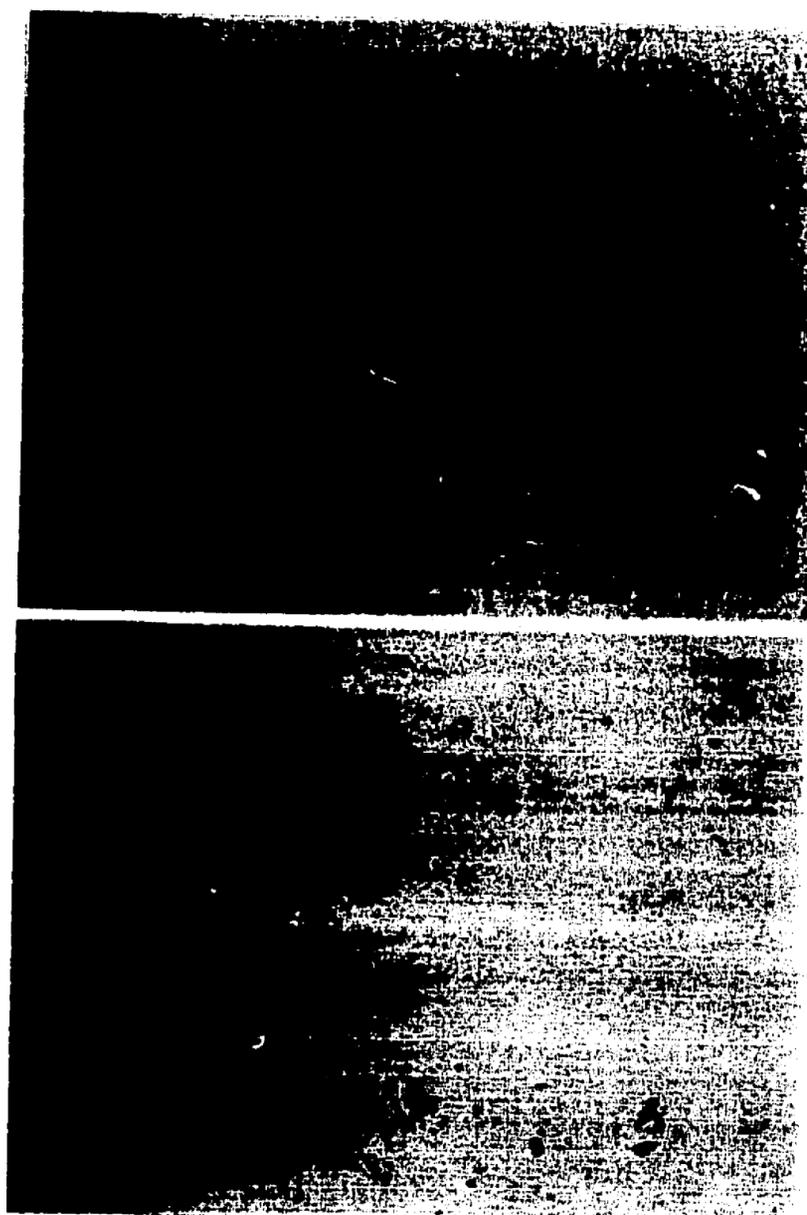


Figura 4. Cultivo primario de gónadas de 12.5 dpc lipofectado con el vector pCH110/1A. A) Histoquímica para fosfatasa alcalina. La morfología de las CG, único tipo celular en la gónada que expresa esta enzima, es en general redonda. B) Histoquímica para  $\beta$ -galactosidasa. La morfología de las células que expresan la proteína reportera es en general del tipo fibroblasto o epitelial. (10x)

las células era similar a la que presentan las células germinales en cultivo (Fig. 5).

### **3.- La expresión de $\beta$ -galactosidasa en las células transfectadas con pAP/1A1.9/lacZ no es en células germinales.**

Con la finalidad de determinar si las células que presentaban la expresión del reportero eran efectivamente CG, se procedió a realizar un ensayo donde se trató de ver si co-localizaban las células que expresaban el reportero con las que presentaban actividad de FA. Para tal fin, a las células transfectadas se sometieron inicialmente a la reacción histoquímica para  $\beta$ -galactosidasa. Posteriormente a estos mismos cultivos de les sometió a la tinción histoquímica para fosfatasa alcalina. Los datos obtenidos con este método de doble marcado no pudieron ser conclusivos puesto que la actividad de la FA se disminuía significativamente después de realizar la primera histoquímica. Alternativamente, se procedió a realizar un doble inmunomarcado empleando un anticuerpo anti  $\beta$ -galactosidasa y un anticuerpo anti-SSEA1 (TG1) que es un marcador de superficie de las células germinales, cada uno acoplado a un anticuerpo secundario con diferente fluoróforo. Con esta combinación pudimos observar que las células que expresaban el gen reportero no correspondían a las células que expresaban el antígeno SSEA-1. Esto sugirió que la expresión del reportero se debía a una expresión inespecífica en algunas de las células transfectadas, y que por lo tanto parecen no existir elementos que dirijan la expresión del *FATN* en CGP dentro de las 1.9 kb analizadas.

Con esto en mente, decidimos realizar construcciones reporteras que portaban fragmentos mas grandes del promotor del exon 1A. Se obtuvieron las construcciones pAP/4.3/lacZ, pAP/5.5/lacZ y pAP/8.5/lacZ que contienen 4.3, 5.5 y 8.5 kb, respectivamente, de la región 5' del exon 1A. Al parecer, ninguna de estas construcciones fue capaz de dirigir la expresión del reportero en células germinales. Aunque cabe la posibilidad de que no fuera posible observar un doble marcado debido a la desaparición del antígeno SSEA-1 de la superficie de las CG, ya que se ha reportado que desaparece alrededor de los 13-14 dpc. Recordemos que los cultivos primarios se establecen de gónadas de 12.5 dpc y

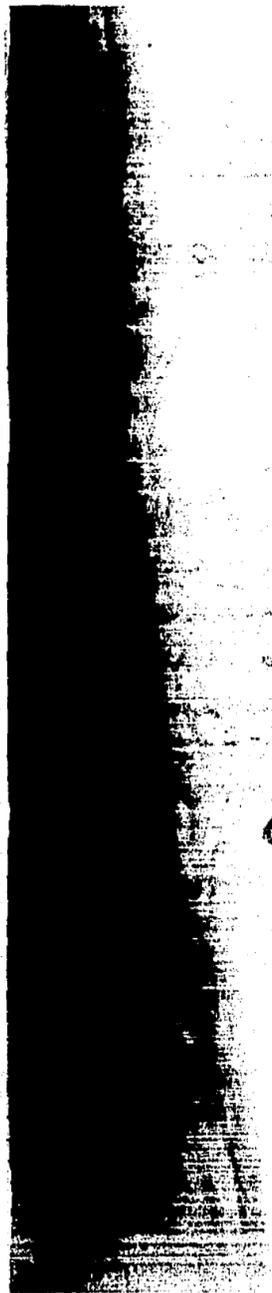


Figura 5. Cultivo primario de gónadas de 12.5 dpc lipofectadas con la construcción pAP/1A1.9/acZ. Las células que expresaron el reportero con este vector presentaron una morfología redondeada. (20x)

que después de la transfección se dejan recuperar 24 horas, por lo que las CG tienen una edad equivalente a las CG de 13.5 dpc.

#### **4.- Ensayos funcionales del promotor del exon 1A en las células embrionarias pluripotenciales (ES).**

Dado que fue difícil corroborar la funcionalidad de alguno de los fragmentos del promotor en las transfecciones de cultivos primarios de gónadas, decidimos realizar ensayos funcionales en una línea de células embrionarias pluripotenciales. Estas células comparten algunas características con las células germinales como son, la expresión de la FATN, la expresión del antígeno SSEA-1 y del factor de transcripción Oct-4, y pueden contribuir a la formación de la línea germinal (Matsui et al, 1992; Schöler et al, 1989). Al igual que para el caso de las CG, primero fue necesario determinar a partir de que promotor se transcribe el mensajero de la FATN en este tipo celular. Esto se realizó también mediante el protocolo de RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para cada transcrito (Publicación 1, Fig. 1A). El transcrito amplificado correspondió al que contiene el exon 1A, indicando por un lado que podía ser utilizado como modelo así como, extrapolar que las células de la masa celular interna expresan esta isoforma a partir del promotor del exon 1A.

Posteriormente se procedió a realizar ensayos de la funcionalidad del promotor del exon 1A en estas células así como en la línea de fibroblastos STO (que no expresan FATN) como control negativo. Las diferentes construcciones fueron transfectadas, también por lipofección, y después de 24 horas de recuperación las células se lisaron. Posteriormente, porciones de cada extracto se sometieron a un ensayo espectrofotométrico que revela la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. En una primera serie experimental (Fig. 6) se observó un aumento en la actividad de alrededor 4 veces en células ES transfectadas con la construcción pAP/5.5/lacZ en comparación con las que fueron transfectadas con pAP/0.32/lacZ y pAP/1.9/lacZ. Adicionalmente, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa registrada en las células STO transfectadas con las mismas construcciones, fue similar a la registrada en células ES transfectadas con las construcciones pAP/0.32/lacZ y pAP/1.9/lacZ (Fig. 6). Este resultado sugirió que entre -1.9 y -5.5 kb podían existir elementos que determinan la expresión específica en células ES. Sin embargo, en otra serie experimental realizada seis meses después,

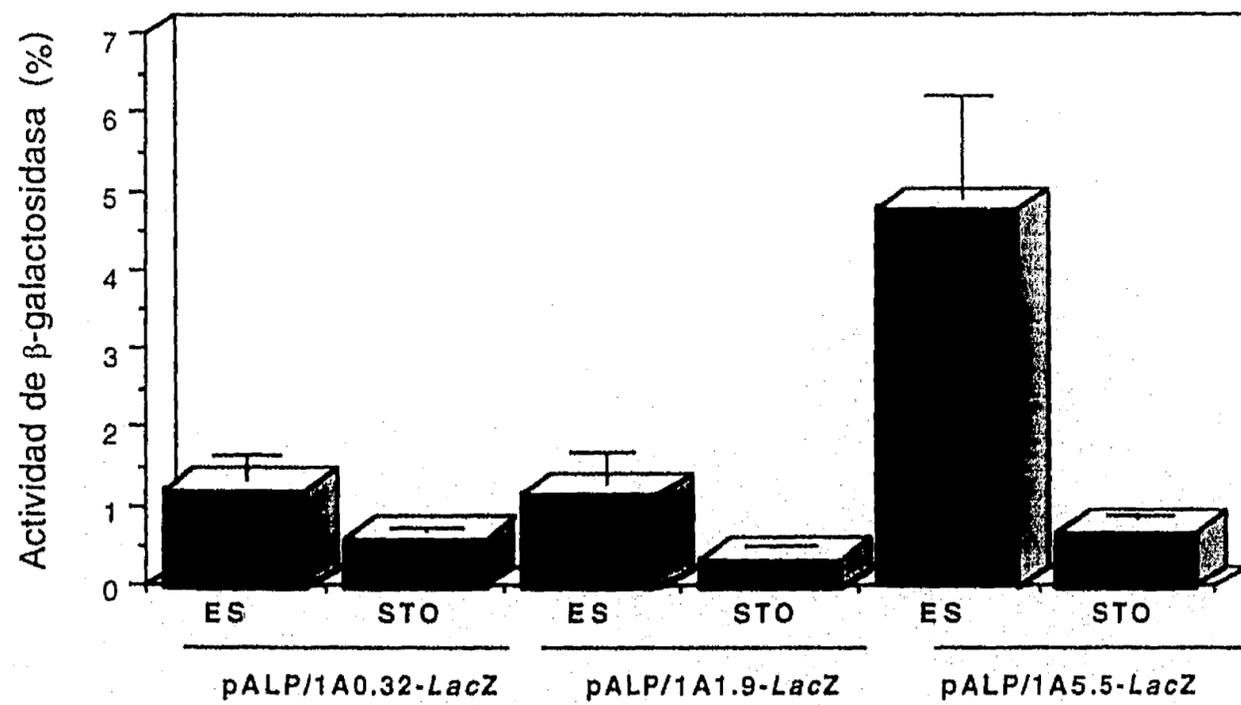


Figura 6. Actividad relativa de  $\beta$ -galactosidasa en células ES y fibroblastos STO lipofectadas con tres construcciones reporteras. Los datos se expresan como el porcentaje de la expresión obtenida con el vector pCH110 (promotor-aumentador de SV40-*lacZ*) (100%). n=4.

estos resultados no pudieron ser reproducidos. Debido a que en esta última serie se empleó un lote diferente de suero bovino fetal, cabía la posibilidad de que algún componente presente en el primer lote empleado (e.g. hormonas esteroides, glucocorticoides, hormona tiroidea, AR) fuera responsable del aumento en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en células transfectadas con la construcción pAP/5.5/lacZ. Para responder esta interrogante se inició una serie experimental encaminada a estudiar el efecto de varios de estos componentes en la regulación de la transcripción del *FATN*. De los componentes empleados (AR, hormona tiroidea, estradiol, cAMP y bdcAMP) solo el AR tuvo efecto en la activación de su transcripción (ver siguiente sección). Este resultado sugirió que, dentro la región del promotor del exon 1A analizada, era probable que existiera un elemento de respuesta al AR.

#### **5.- Regulación de la transcripción del *FATN* por AR en células ES y la localización del elemento de respuesta a AR en el promotor del exon 1A.**

Como se mencionó en introducción, la transcripción del *FATN* se estimula por la adición de AR en dos líneas de teratocarcinoma embrionario, las F9 y las P19. También se había determinado que una línea de células embrionarias pluripotenciales, las MBL-1 expresaba el mensajero de la *FATN* a partir del promotor del exon 1A, sin embargo no se determinó si también en estas células hay una estimulación de la transcripción debida a la adición de AR como pudiera esperarse. Para determinar si dentro del fragmento del promotor del exon 1A estudiado se encontraban elementos de respuesta a AR, inicialmente determinamos si había inducción en la transcripción del *FATN* debida a la adición de AR. (Publicación 1, Fig. 2). Los resultados muestran que hay un aumento en el transcrito, alrededor de 4 veces, debido a la adición de AR. Posteriormente, se realizaron ensayos funcionales para la construcción pAP/1A8.5/lacZ, con la finalidad de establecer si dentro de las 8.5 kb analizadas pudiera haber un elemento de respuesta a AR (ERAR). Un aumento en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de más de 20 veces pudo observarse con la adición de AR lo que sugirió fuertemente que dentro de este fragmento se localiza un ERAR. Posteriormente, se procedió a determinar la posible localización de este elemento utilizando diferentes construcciones reporteras (Publicación 1; Fig. 3). De estos experimentos se desprendió que un fragmento

de alrededor 1.0 kb entre -5.5 y -4.5 kb confería respuesta a AR. Dentro de éste, un fragmento EcoRI-Sau3A de 170 pb fue capaz de responder a AR (Publicación 1; Fig 4). La secuencia del fragmento de 1.0 kb reveló varios posibles ERAR, uno en el extremo 3' del fragmento con la secuencia aagtcannnnnaggctca en la cadena antisentido. Sin embargo, un fragmento que contiene esta secuencia no fué capaz de responder a AR. En el extremo 5' del fragmento de 1.0 kb se localizaron 2 posibles ERAR. Uno de ellos con la estructura DR1 que no fue capaz de responder a AR y otro con la estructura DR5 que se encuentra en el fragmento EcoRI-Sau3A que sí fue capaz de responder a AR (Publicación 1; Fig. 5).

## **B) CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL EXON 1A DEL *FATN* EN ENSAYOS *in vivo* (ANIMALES TRANSGÉNICOS)**

Paralelamente a la caracterización funcional del promotor del exon 1A *in vitro*, se realizó un análisis de la funcionalidad del mismo en animales transgénicos. Como paso inicial se estandarizó la metodología de construcción de líneas estables de animales transgénicos. Sin embargo, dado lo prolongado de esta estrategia se decidió estandarizar las condiciones para producir animales transgénicos transitorios (Publicación 2).

Una vez lograda una eficiencia igual a la reportada por laboratorios experimentados, se procedió a producir animales transgénicos para diferentes construcciones reporteras que portaban fragmentos de diversos tamaños de la región 5' del exon 1A, fusionados al gen reportero *lacZ* (Publicación 1, Tabla I; Publicación 2). Los patrones de expresión del gen reportero se compararon con el patrón de expresión normal de la fosfatasa alcalina. En ningún caso se logró observar expresión del reportero en las CG. El patrón mas reproducible de expresión del reportero fue en los epitelios pulmonar y estomacal. El segundo patrón reproducible fue en la cresta ectodérmica apical de los miembros en desarrollo. En algunos ratones se observó expresión correcta en tejido pero no en temporalidad como el caso de los elementos esqueléticos en desarrollo. Otro caso fue el del tubo neural que en una caso presentó tinción en un patrón parcialmente similar al esperado. En muchos casos se presentó expresión ectópica. Una observación interesante fue que en 6 de 7 ratones con la

construcción de 8.5 kb no se logró observar expresión alguna. Lo que puso de manifiesto la existencia de un posible elemento de regulación negativa.

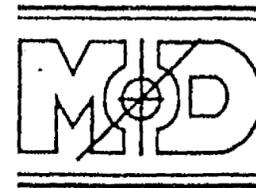
La secuencia del fragmento de 1.0 kb que confiere respuesta a AR fue comparada contra los bancos de secuencias. El análisis reveló la presencia de una secuencia (Publicación 1; Fig. 5) con elevada homología (75-80 %) con varios elementos repetidos B2. Dichos elementos se encuentran presentes en un número de 50 a 100 mil copias en el genoma del ratón, y identificaron inicialmente en los dsRNA-B, los cuales generan estructuras tipo horquilla en hnRNA (Krayev et al, 1982). En 1994, Hasse y Schulz, mostraron que fragmentos del promotor del gen de la alfa-fetoproteína, que contienen secuencias parecidas a los elementos repetidos B2, tienen la capacidad de inducir metilación *de novo* en el gen reportero al que fueron fusionados. Adicionalmente, ellos mismos observaron que fragmentos que contenían secuencias B2 de diferentes orígenes también tenían el efecto de incrementar la metilación.

Dado que el análisis de ratones transgénicos reveló la posible presencia de elementos de regulación negativa, pensamos que el elemento parecido a B2 encontrado en el promotor del exon 1A pudiera ser el responsable de dicho efecto, y también sugirió a la metilación del DNA como un mecanismo de regulación negativa importante en la regulación de la expresión del *FATN*. En la publicación 1, figura 7, se muestran los patrones de metilación de la región promotora proximal al exon 1A en tejidos y líneas celulares que expresan o no la *FATN*. Nótese que el mayor grado de metilación registrado correlaciona con la inactividad del gen en cerebro y en la línea de fibroblastos STO.

Una vez determinada la relación entre metilación e inactividad del gen, realizamos ensayos de metilación en DNA de placenta de animales transgénicos, para determinar si la secuencia semejante a elementos repetidos B2 estaba directamente relacionada a la promoción de la metilación. El ensayo se realizó en DNA de animales transgénicos para construcciones reporteras que contenían o no, el fragmento con el elemento similar a la repetida B2, y comparando los patrones de metilación en el gene reportero y en la región proximal del promotor 1A de los transgenes (Publicación 1; Fig. 8). Los resultados sugieren que el fragmento de alrededor de 1 kb que contiene la

repetida B2 es capaz de promover un mayor grado de metilación en comparación con aquellos que carecen de él. Sin embargo, al parecer existen elementos adicionales que promueven metilación en mayor grado.

PUBLICACIÓN 1



## Retinoic acid and methylation *cis*-regulatory elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression

D. Escalante-Alcalde<sup>a</sup>, F. Recillas-Targa<sup>a</sup>, D. Hernández-García<sup>a</sup>, S. Castro-Obregón<sup>a</sup>, M. Terao<sup>b</sup>, E. Garattini<sup>b</sup>, L. Covarrubias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

<sup>b</sup>Istituto di Ricerche Farmacologiche 'Mario Negri', Via Eritrea 62, 20157 Milano, Italy

Received 23 October 1995, revision received 6 March 1996; accepted 8 March 1996

### Abstract

To understand the mechanisms regulating the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) activity during development, we characterized *cis*-transcriptional regulatory elements. In embryonic cells and tissues, *TNAP* expression was driven preferentially by the exon 1A (E1A) promoter, one of the two promoters previously defined. Transcriptional activity of E1A promoter was up-regulated by retinoic acid (RA) through a putative RA-responsive element. Transgenic mice analysis with *lacZ* reporter constructs revealed negative regulatory elements within 8.5 kb of E1A promoter. Promoter sequences of endogenous *TNAP* in non-expressing tissues and those carried by the 8.5 kb-*lacZ* transgene were found to be highly methylated. A 1 kb fragment of E1A promoter increased the methylation level of *lacZ* and promoter sequences. The role of RA and DNA methylation in defining the embryonic expression pattern of *TNAP* is discussed.

**Keywords:** Alkaline phosphatase; Promoter; Retinoic acid; Methylation; Primordial germ cells; Mouse development

### 1. Introduction

Alkaline phosphatases (APs; EC.3.1.3.1.) are ubiquitous membrane-anchored enzymes which catalyze the hydrolysis of monophosphate esters. Although the physiological role of these enzymes is poorly understood, its relevance can be inferred by its ubiquitous distribution and the high level of expression in several cells during vertebrate development, such as primordial germ cells (PGCs) and those in morphogenetic and differentiating centers. An extracellular matrix protein binding domain is present in APs which may be relevant for migratory cells expressing these enzymes (Millán and Fishman, 1995). Of the three isoforms present in the mouse, embryonic (EAP), intestinal (IAP) and tissue non-specific (TNAP) alkaline phosphatases, the latter is expressed in a wide range of tissues and during almost all embryonic development (from the blastocyst stage to birth; Merchant-

Larios et al., 1985; Hahnel et al., 1990; MacGregor et al., 1995). In the mouse, *TNAP* is located in chromosome 4, and has 12 exons extended in around 50 kb (Terao et al., 1988, 1990). The knockout of this gene had no effect in embryonic development, including PGC migration, although it is lethal a few days after birth (MacGregor et al., 1995).

One approach to understand the role of *TNAP* is by studying the *cis*-elements which regulates its gene expression. In general, these elements reside in the non-coding regions, mostly in 5'-flanking sequences, where transcription is activated by specific *trans*-acting proteins. Two transcripts are found in the adult mouse which derive from different leader exons (exon 1A and exon 1B) and the same coding sequence (Terao et al., 1990; Studer et al., 1991). Exon 1A (E1A) and exon 1B (E1B) are located at around 32 kb and 8 kb upstream of the first coding exon (exon 2), respectively (Fig. 3). E1A promoter is responsible for the expression in several embryonic cell lines and in all adult tissues characterized by relatively high *TNAP* expression. E1A 5'-flanking region (1.9 kb)

\* Corresponding author. Tel.: +52 5 6227636; fax: +52 73 172388; e-mail: covs@ibi.unam.mx.

contains a TATA-like box located at -25, three Sp1 binding sites at positions -61, -71 and -76, several inverted repeats and a perfect direct repeat. Although this fragment could drive moderate expression of a reporter gene in F9 cells (Terao et al., 1990), it is unknown if it is capable of driving expression in other cell lines or tissues that express this enzyme. E1B promoter is specifically active in the heart; 800 bp of the presumed E1B promoter is devoid of TATA and CAAT consensus sequences, and contains a 9 bases inverted repeat (Studer et al., 1991).

In the present study we characterized the transcription from either E1A or E1B *TNAP* promoters in a line of embryonic stem (ES) cells, in developing embryos and in transgenic mice bearing reporter constructs. Our results showed that ES cells and embryonic tissues, including PGCs, used E1A promoter to drive the expression of *TNAP*. Transcriptional activity in ES cells was up-regulated by retinoic acid (RA). Accordingly, a 184 bp fragment, containing a putative RA-responsive element (RARE), was able to transfer responsiveness to RA to the thymidine kinase (TK) basal promoter. Most transgenic mice with *lacZ* reporter constructs, including different fragments of E1A promoter, showed expression in 12.5 days post coitum (d.p.c.) mouse embryos, but reflecting only partially the *TNAP* expression pattern. Interestingly, all transgenic mice produced, except one, bearing reporter constructs with 8.5 kb of this promoter, showed no expression in any tissue of 12.5 d.p.c. embryos. DNA methylation was considered to be an important inactivating mechanism of *TNAP* expression as endogenous *TNAP* methylation was higher in non-expressing than in expressing cells or tissues. In agreement with the presence of DNA methylation-promoting sequences, higher methylation level of *lacZ* and the foremost 1.9 kb of E1A promoter was observed in transgenic mice produced with constructs bearing 8.5 kb than those with shorter fragments. A 1 kb fragment (-5.5 to -4.5) promoted DNA methylation of transgene sequences but there was not an obvious effect in reporter gene expression. We suggest that methylation is a relevant negative regulatory mechanism of *TNAP* and may explain the expression of this enzyme in germ and tumor cells.

## 2. Results

### 2.1. Developing embryos, ES and primordial germ cells use E1A promoter to drive the transcription of *TNAP*

In order to define the major regulatory elements controlling *TNAP* expression during development, we first determined which of the two promoters characterized in this gene is used in whole embryos, PGCs and ES cells (Fig. 1). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) specific for transcripts containing either E1A or E1B showed that, in embryos from 8.5 to 12.5 d.p.c., only E1A transcripts were detected. In gonads, where

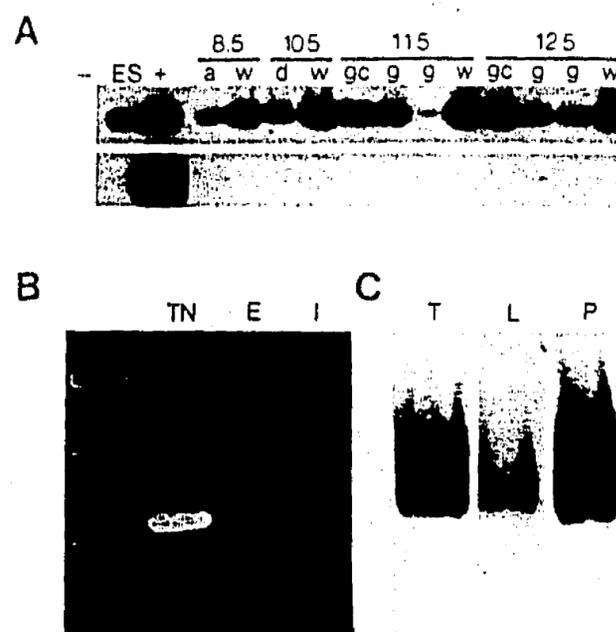


Fig. 1. AP isoforms and specific *TNAP* transcripts in embryonic tissues and ES cells. (A) E1A- or E1B-containing *TNAP* transcripts in embryonic tissues and ES cells. RT-PCRs specific for E1A or E1B were performed and Southern blot hybridization applied to the amplification products using exon-specific oligonucleotides as probes. Autoradiographs for E1A (top; 15 min exposure) or E1B (bottom; O.N. exposure) are shown. RT-PCR products were of the expected sizes (160 bp for E1A transcripts, and 188 bp for E1B transcripts). RNA samples for RT-PCRs were from ES cells, whole embryos (w), the basal region of the allantois (a), the dorsal mesentery (d), gonads (g) and semi-purified primordial germ cells (gc). Positive control tissues (+) were kidney for E1A, and heart for E1B. As negative controls (-), PCR was performed in the absence of template. (B) AP isoforms expressed in ES cells. RT-PCRs specific for each isoform were performed. The specific amplification products for the embryonic (E, 438 bp) and the tissue non-specific (TN, 240 bp) APs were obtained from ES cell RNA. The specific amplification product for the intestinal AP (I, 396 bp) was not detected. The same amount of cDNA was used in this experiment, and verified by performing a RT-PCR for the HPRT constitutive gene (not shown). (C) In situ AP activity in gel in the absence or presence of specific inhibitors. Levamisole (L, an inhibitor of *TNAP*) or L-phenylalanine (P, an inhibitor of *IAP*) were used. Note the reduction in total AP activity (T) in the presence of levamisole.

germ cells are the only histochemical AP-positive cells, and in semi-purified PGCs, E1A transcript was also the only transcription product detected. This observation was reiterated in regions containing migratory PGCs (the base of allantois and dorsal mesentery; Fig. 1A). Therefore, E1A promoter of *TNAP* is, likely, the major promoter used during development.

Because ES cells express high levels of AP, preserve the potential to differentiate in vitro and in vivo to several cell types, and are not derived from tumors (several tumor cell lines overexpress or express ectopically AP), they are good candidates to study AP gene regulatory mechanisms. ES cells are derived from the inner cell mass of the blastocyst and, although it was previously established that the blastocyst expresses *EAP* and *TNAP* (Hahnel et al., 1990), it is now known that the latter isoform is expressed in cells of the inner cell mass and of the trophectoderm

(MacGregor et al., 1995). To determine which AP isoform(s) is (are) expressed in ES cells (AB1 line), RT-PCR for each isoform were performed. We found that EAP and TNAP mRNAs were present but not those of IAP (Fig. 1B); based on the amount of the amplified product, it appears that TNAP mRNA level expression was at least twice that of EAP mRNA. Moreover, densitometric analysis of in situ gel AP activity in the presence or absence of levamisole (a specific inhibitor for TNAP; Borgers, 1973), indicated that around 80% of the total AP activity was derived from the TNAP isoform (Fig. 1C). Only E1A transcripts were observed in these cells, indicating that the same promoter as in developing embryos is used (Fig. 1A).

## 2.2. TNAP E1A promoter is regulated by RA in ES cells

It has been reported that AP expression can be up-regulated by glucocorticoids, vitamin D, parathyroid and thyroid hormones, estrogens, RA and cAMP in several cell lines (Firestone and Heath, 1981; Scheibe et al., 1991; Heath et al., 1992). Up-regulation of TNAP expression by RA has been observed in P19 and F9 teratocarcinoma cell lines and by cAMP in the latter (Gianni et al., 1991; Scheibe et al., 1991; Studer et al., 1991). In order to determine if transcription can be activated in response to these activators in ES cells, we performed specific RT-PCR for either E1A or E1B transcripts. As shown in Fig. 2, only the level of E1A-containing tran-

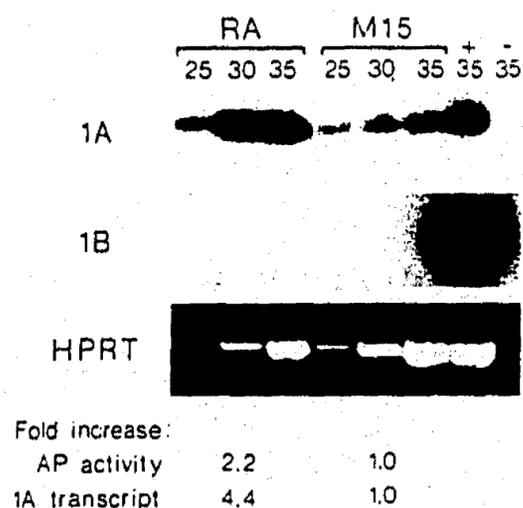


Fig. 2. RA regulation of exon-specific TNAP transcripts. Semiquantitative RT-PCR detection of E1A (top) or E1B (bottom) was performed taking samples after 25, 30 and 35 PCR cycles and related to the HPRT RT-PCR product to estimate the expression level. E1A and E1B PCR products were visualized as described in Fig. 1. Autoradiographs, resulting from 10 min (E1A) or 60 min (E1B) exposures, of representative samples are shown. PCR controls were as in Fig. 1. ES cells were treated with retinoic acid (RA), dbcAMP, 17- $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -est) and thyroid hormone (T3) or untreated cells (M15); only results from RA treatments are shown. AP activity was measured from replica cultures. The fold increase in both E1A transcript and AP activity are shown (numbers below).

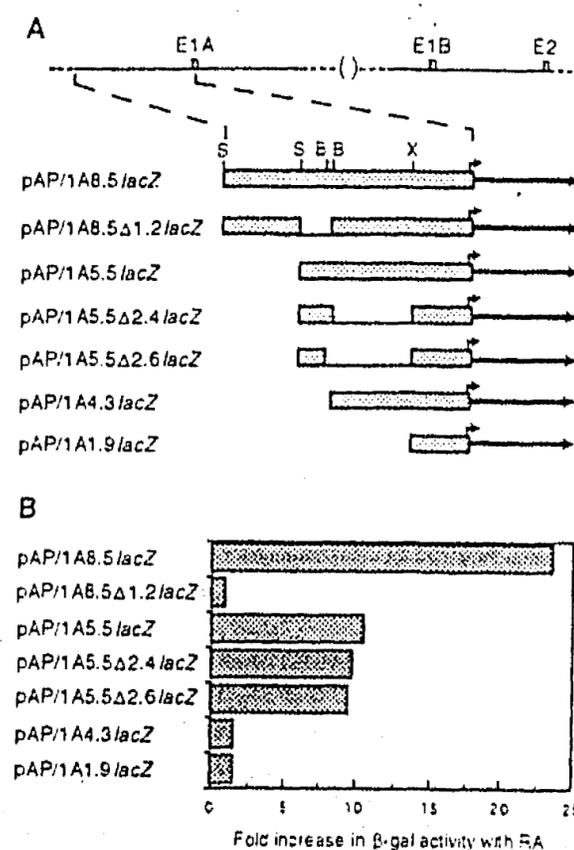


Fig. 3. E1A promoter region conferring responsiveness to RA. (A) E1A promoter-lacZ fusion constructs. The general TNAP structure is shown at the top (based on Terao et al., 1990; E1A, E1B and E2 are exon 1A, exon 1B and exon 2, respectively). Dotted boxes correspond to E1A promoter sequences including the transcription start site (bent arrow). Solid lines represent lacZ. S: *Sall*; B: *BamHI*; X: *XbaI*. (B) Fold increase in  $\beta$ -galactosidase activity of transfected cells treated with RA. The values are expressed as the ratio between the activity of RA treated and that of untreated cells.

scripts was increased by RA. Similarly, the level of TNAP activity was duplicated in the presence of RA (Fig. 2). Increases in either TNAP transcripts or AP activity were not observed when cultured 15 h with dbcAMP, 17- $\beta$ -estradiol or T3 thyroid hormone (not shown).

In order to locate the possible RARE, we designed several TNAP E1A promoter-lacZ fusion constructs (Fig. 3A). ES cells were transiently transfected with these constructs and cultured in the presence or absence of RA. As can be observed in Fig. 3B, in the presence of RA, a significant increase in  $\beta$ -galactosidase activity was obtained with constructs containing 5.5 or 8.5 kb of E1A promoter (10- and 23-fold increase, respectively). This data suggest that TNAP transcription is directly regulated by RA. Transient transfection with lacZ fusion constructs containing deletions in the region between positions -1.9 and -5.5 of E1A promoter (Fig. 3A) localized the potential RARE in a 1 kb fragment (from -5.5 to -4.5; Fig. 3B).

In order to more finely identify the potential RARE and establish if it could transfer RA responsiveness to a heterologous promoter, the aforementioned 1 kb fragment was digested with *Sau3A* and *EcoRI* and the resulting

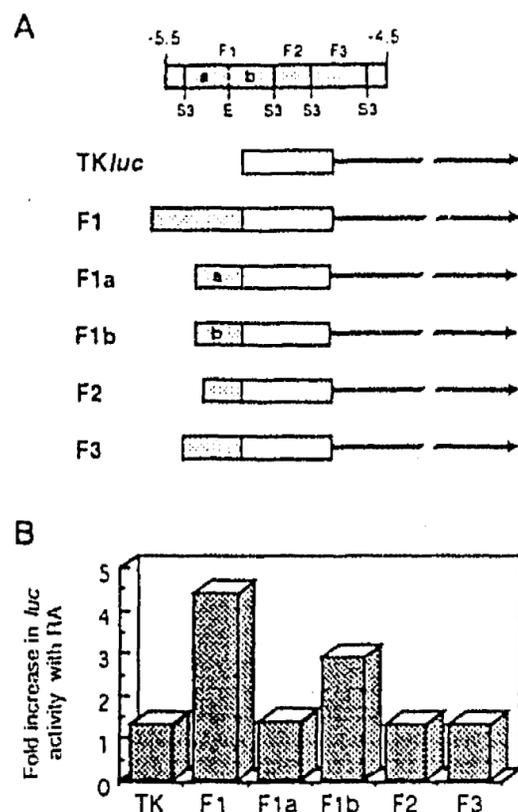


Fig. 4. RA responsiveness of TK promoter fused to fragments of E1A promoter. (A) Fusion constructs used for the transient transfection assays. The 1000 bp fragment from  $-4.5$  to  $-5.5$  kb was digested with *Sau3A* (S3) and *EcoRI* (E). Five internal fragments (F1, 373 bp; F1a, 189 bp; F1b, 184 bp; F2, 160 bp; F3, 260 bp; dotted boxes) were inserted upstream the TK promoter (open box) driving *luc* (solid line) expression. (B) Fold increase in luciferase activity of transfected ES cells treated with RA. The values are expressed as the ratio between the activity of RA treated and that of untreated cells.

fragments were subcloned upstream of the herpes simplex virus TK gene promoter, driving the expression of the luciferase reporter gene. Transfection of ES cells with five of the resulting constructs (containing DNA fragments F1, F1a, F1b, F2, F3; Fig. 4A) showed that F1 and F1b fragments were able to transfer RA responsiveness to the TK promoter as a four- and three-fold increase, respectively, in luciferase activity was observed by addition of RA (Fig. 4B). These data locate the putative RARE within a 184 bp fragment (F1b). Sequence analysis revealed a related DR5 sequence ( $^{2}/_{\text{c}}\text{g}^{\text{g}}/\text{tcannnnn}^{\text{g}}/\text{c}^{\text{g}}/\text{tca}$ ; Leblanc and Stunnenberg, 1995) within this fragment (Fig. 5), proposed as the major element responsible for RA transcriptional activation. An additional closely related DR5 sequence in the antisense strand of F3 fragment and one DR1 in the antisense strand of F1a fragment were found, but they did not confer RA transcriptional activation in our assays.

### 2.3. E1A promoter is negatively regulated in transgenic mice

An approach to define which sequences are controlling

the temporal and tissue-specific gene expression is by introducing promoter-reporter gene fusion constructs in transgenic mice. In 12.5 d.p.c. embryos, AP is highly active in intestine, stomach, lung (this report), apical ectodermal ridge of limbs, basal zone of the neural tube, germ cells, genital tubercle and in some pre-ossification centers (limbs and maxilla). TNAP should be the major enzyme responsible of that pattern, since most of the activity detected at 12.5 d.p.c. was dramatically diminished by levamisole (data not shown). In addition, as described above, only E1A-containing transcripts were detected in embryos at different stages, indicating that *TNAP* expression is driven by E1A promoter during development. Based on this, we generated several stable and transitory transgenic mice with constructs driving *lacZ* expression by 1.9, 4.3, 5.5 or 8.5 kb of E1A upstream sequences. The expression patterns obtained in 12.5 d.p.c. embryos are summarized in Table 1 and some examples shown in Fig. 6. The  $\beta$ -galactosidase patterns obtained were not identical, but some of the structures stained in many transgenic embryos correlated with those expressing the endogenous *TNAP* (Merchant-Larios et al., 1985; MacGregor et al., 1995), such as the stomach and lung epithelia (Tg155 and Tg11-10V95) and the apical ectodermal ridge of limbs (Tg20). An intriguing observation was that whereas five out of six (83%) transgenic embryos produced with 1.9 and 4.3 kb fusion constructs showed *lacZ* expression, only one out of seven (14%) with 8.5 kb fusion construct had expression. This points to possible negative regulatory elements between  $-4.3$  and  $-8.5$  kb of E1A promoter.

```

1  ctccaccagtcacttattttgctttaaaaa
2  aaaaaatgtatctgagtacactgcagttgt
3  ctccacacacaccagaagagggcgtagat
4  cacatggttgtagccaccatggtggttctg
111 ggatgtgaaccctgagccatttctccagcc
121 ctttttagctctttggttaactacctgcaaa
131 aaaaacaaccctctttgagctgggctgt
141 gcatacaggaggaaacaagttttgctaa
151 gggggaaagttagtgccgcccagcccc
161 aaagctgcaattcaagacctcagactttatt
171 tagaagcaaaactgagagggcaggagtctta
181 gcacatcaaacagcaaatctaggctcctcc
191 cagccgtccagataagcctttgtttaccaa
201 ggagaaccactctttgtcgtgctgggagac
211 caggaggtcaattagaggccggtttggctcg
221 ccttgctagcattc

```

Fig. 5. Sequence analysis of the fragment conferring RA responsiveness and containing a B2-like repetitive element. The sequence of the fragment from  $-5.5$  (*Sall*) to  $-4.5$  (*BamHI*) was determined (956 bp). The sequence shown is the region where similarities to the DR5 RARE consensus (bold), and a B2-like repetitive element (shaded box) sequences were found. Relevant restriction sites are underlined (gtcgac, *Sall*; gatc, *Sau3A*; gaattc, *EcoRI*).

#### 2.4. High levels of methylation correlates with the presence of cis-elements within the TNAP E1A promoter

To establish if methylation is a possible mechanism regulating TNAP expression in vivo, we determined the methylation level of the foremost 1.9 kb of E1A promoter in expressing and non-expressing tissues or cell lines. DNA was analyzed by Southern blot hybridization following digestion with *HpaII* and *MspI*. The methylation level was estimated by the degree of *HpaII* digestion within the region probed. DNA from brain and STO fibroblasts, not expressing TNAP, showed higher levels of methylation than DNA from placenta and ES cells, which express this enzyme abundantly (Fig. 7). These data suggest that methylation is involved in the negative regulation of TNAP expression.

Methylation levels of *lacZ* were determined in transgenic mice bearing different E1A promoter fragments. As shown in Fig. 8A, *HpaII* bands of higher molecular weight hybridizing to the *lacZ* probe were obtained from placental DNA of transgenic embryos produced with constructs containing the E1A promoter fragment from -5.5 to -4.5 kb (AP/8.5*lacZ*, AP/5.5*lacZ*, AP/5.5Δ2.6*lacZ*). In general, the high level of methylation associated with this fragment did not correlate with the lack of transgene expression (Table 1). However, transgenic embryos carrying the 8.5 kb promoter construct, which expressed *lacZ* very infrequently, displayed the highest level of methylation. Remarkably, when the fragment from -5.5 to -4.5 was fused to the foremost 1.9 kb of E1A promoter (AP/5.5Δ2.6*lacZ*), most embryos expressing *lacZ* did it in stomach and lung (Table 1 and

Table 1  
Characteristics of AP/1A-*lacZ* transgenic embryos

AP/1A promoter construct	Transgenic	Expression characteristics in 12.5 d.p.c. embryos
AP/1A8.5 <i>lacZ</i>	Tg 11-10V95	Stomach and lung epithelia
	Tg 1-17V95	None
	Tg2-17V95	None
	Tg3-17V95	None
	Tg6-17V95	None
	Tg 11-17V95	None
	Tg8-14V195	None
AP/1A5.5 <i>lacZ</i>	Tg9-18V1195	None
	Tg2-24I96	Stomach and lung epithelia, developing skeletal elements, craniofacial lateral spots, mesonephric ducts
AP/1A4.3 <i>lacZ</i>	Tg20	Apical ectodermal ridge, genital tubercle, distal region of muzzle
	Tg149	Craniofacial lateral spots
	Tg155	Stomach and lung epithelia, interdigital region of limbs
	Tg160	All developing skeletal elements, craniofacial lateral spots
AP/1A1.9 <i>lacZ</i>	Tg18	Telencephalum, rhombencephalum, somites, basal region of limbs
	Tg142	None
AP/1A8.5Δ1.2 <i>lacZ</i>	Tg4-18X1195	First and second branchial arches, spot in the base of forelimbs
	Tg6-18X1195	None
	Tg7-18X1195	None
	Tg21-18X1195	None
	Tg2-26X1195	Apical ectodermal ridge, nasal region, frontal and posterior region of the head (superficial), tail somites, wall of the stomach, distal intestine, some spots within the gonad not germ cells
AP/1A5.5Δ2.6 <i>lacZ</i>	Tg4-16I96	Cervical region of the neural tube
	Tg4-5I96	Stomach and lung epithelia, intestine, dorsal ganglia, developing ribs, maxilla, spots in the forelimb
	Tg7-5I96	Stomach and lung epithelia, spot in the base of the forelimb, some points in the developing ribs and dorsal region.
	Tg3-10I96	Stomach and lung epithelia, neural tube, otic region, line in telencephalic region, mesencephalic flexure, genital tubercle
	Tg4-10I96	Spots in the lateral body and a spot in the head
	Tg5-10I96	Genital tubercle
	Tg6-10I96	None
	Tg1-12I96	None
	Tg2-12I96	None
	Tg4-12I96	Stomach and lung epithelia, intestine, mesencephalic flexure, posterior region of the forelimbs and hindlimbs, and genital tubercle



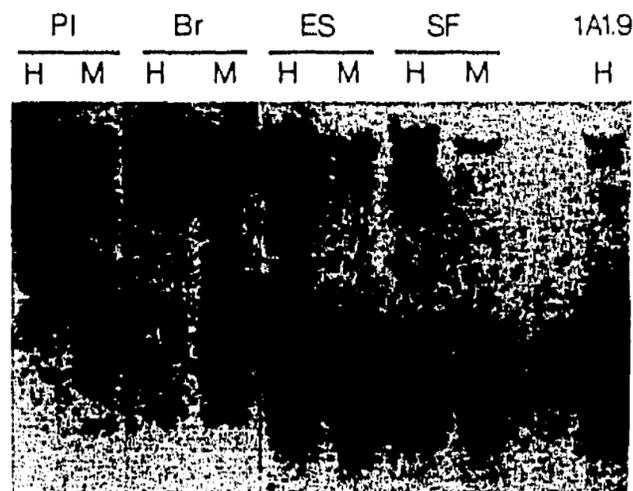


Fig. 7. Methylation of endogenous *TNAP* proximal regulatory sequences (1.9 kb) in expressing and non-expressing tissues or cell lines. DNA from tissues or cell lines expressing (placenta, PI; ES cells, ES) and not expressing (brain, Br; STO fibroblasts, SF) *TNAP* were digested with *Hpa*II (H) and *Msp*I (M) restriction enzymes (methylation-sensitive and -insensitive isoschizomers, respectively) and Southern blot hybridizations were performed using the 1.9 kb most proximal region of E1A promoter. As control, placental DNA plus a plasmid containing the foremost 1.9 kb of E1A promoter (1.5 ng) was digested with *Hpa*II (1A1.9); the expected fragments were produced and were identical to the ones obtained from *Msp*I digested DNA of transgenic mice. Higher molecular weight *Hpa*II fragments hybridizing to the probe are observed in digested DNAs from brain and STO fibroblasts than in those from placenta and ES cells.

### 3. Discussion

Transcriptional regulation by multiple promoters is a characteristic of several genes. More than one promoter in a single gene may define temporal and tissue-specific expression patterns, and/or differential regulation under certain circumstances. Of the two promoters described for *TNAP*, in whole embryos (8.5–12.5 d.p.c.) we only found activity of the one directing E1A transcription. PGCs, during their migratory stages (8.5 d.p.c. basal region of allantois, 10.5 d.p.c. dorsal mesentery) and when arriving at the developing gonad (at 11.5–12.5 d.p.c.), expressed only *TNAP* isoform from E1A promoter. In addition, it has been shown that E1A promoter is regulated by RA and cAMP (Studer et al., 1991). On the other hand, transcripts containing E1B have only been detected in the adult heart. Therefore, E1A promoter defines a broader temporal and tissue-specificity than E1B promoter, and seems to be more sensitive to environmental cues.

#### 3.1. *TNAP* regulation by RA

It has been reported that the most proximal 1.9 kb of E1A promoter can drive gene expression in F9 cells, but the activity reported is only 5% of that reached with the SV40 late T-antigen promoter-enhancer sequences (Terao

et al., 1990). We have obtained similar results in ES cells with reporter constructs extending up to position –8.5 kb from the transcription start of E1A. However, if the SV40 enhancer was added to these constructs, we observed a several-fold increase in promoter activity (data not shown). These data suggest that either additional enhancer elements are required for efficient *TNAP* expression, or enhancer elements within the fragment analyzed were inactive. RARE is a potential inactive enhancer in ES cells since, as it was reported previously (Studer et al., 1991) and we confirmed here, RA increases the level of E1A-containing transcript. Indeed, we found a 184 bp fragment at around position –5.5 kb which was able to confer RA responsiveness to a heterologous promoter, and contains a sequence with similarity to the consensus RARE. These data can be interpreted as *TNAP* transcriptional regulation mediated by a RA nuclear receptor; however, it will be necessary to demonstrate directly whether the RARE found is functional, especially in the context of *TNAP* promoter.

The RA responsiveness observed in culture may not be relevant for the *in vivo* *TNAP* regulation. However, we noticed that in the developing embryo, some regions potentially producing RA (inferred from the expression pattern of the human *ADH3*, a retinol dehydrogenase gene; Zgombic-Knigh et al., 1994) also show AP activity. Among those regions are the apical ectodermal ridge of the limbs, the ventral zone of the neural tube, the craniofacial region and the eye. Since RA has been involved in pattern formation, morphogenesis and differentiation, *TNAP* may have a role in those processes. However, since no developmental defects were seen in the *TNAP*<sup>–</sup>/*TNAP*<sup>–</sup> mice, lacking completely *TNAP* activity, we cannot discard the possibility of *TNAP* expression pattern being just a consequence of RA signaling.

#### 3.2. Tissue-specific sequences of E1A *TNAP* promoter

We used transgenic mice to look for tissue-specific regulatory elements. Although the *lacZ* expression patterns obtained were not totally reproducible, eight 12.5 d.p.c. transgenic embryos showed expression in the lung and stomach epithelium, where *TNAP* is normally expressed. The most reasonable conclusion from these data is that sequences responsible for tissue-specific expression (*i.e.* for lung and stomach) are located within the proximal 1.9 kb of E1A promoter but that efficient specific expression requires additional regulatory elements located within the fragment from –5.5 to –4.5 kb. A sequence (TTGCCAAG) with similarity to the thyroid- and lung-specific enhancer element (Francis-Lang et al., 1992) was found at position –1470 bp of exon 1A *TNAP* promoter. The transcription factor binding to this element is expressed in the lung, and disruption of its gene affects lung development among other organs (Kinamura et al., 1996). Although with low penetrance, specific transgene

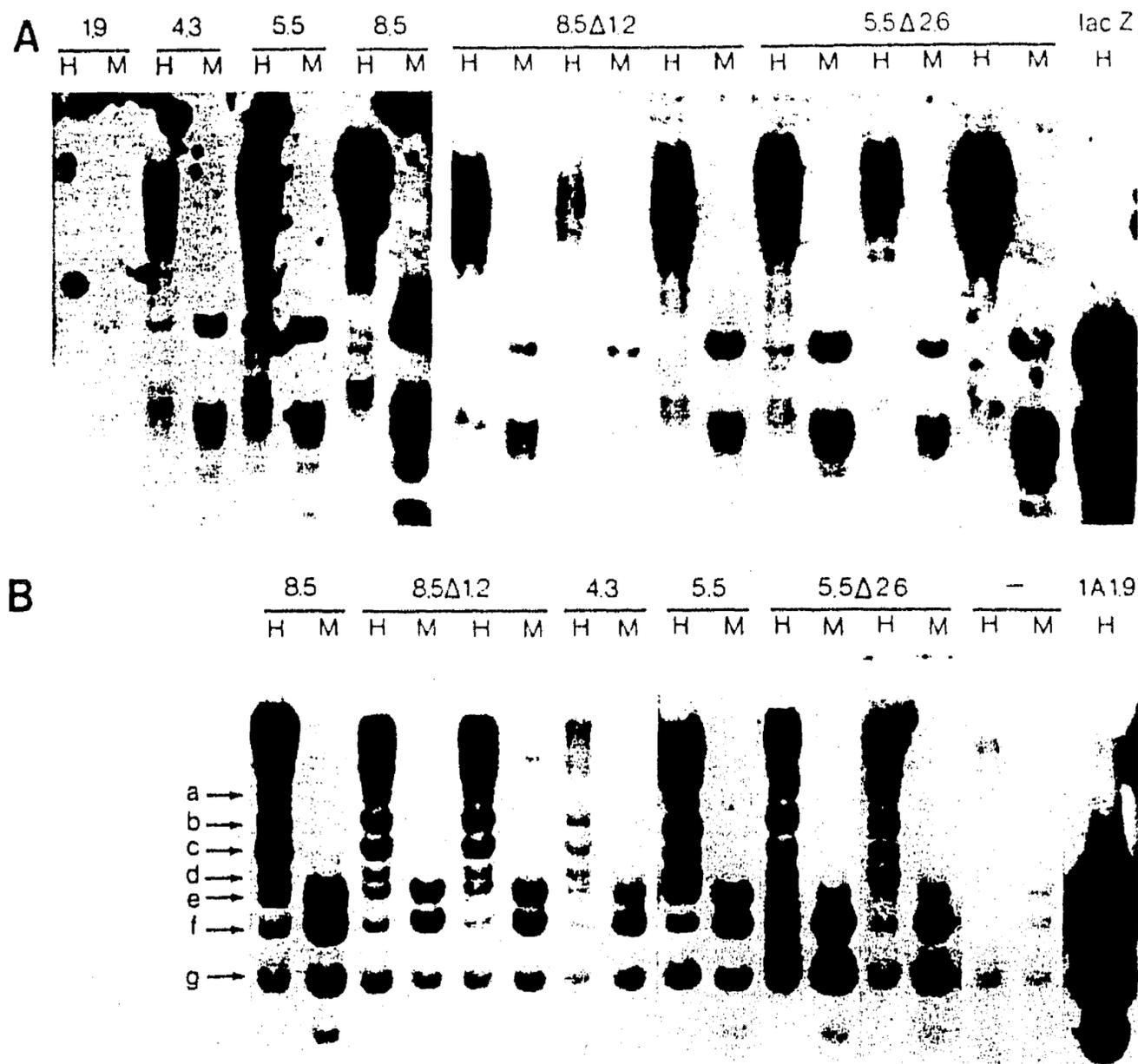


Fig. 8. DNA methylation of *lacZ* reporter and *TNAP* regulatory sequences. Placental DNAs (20  $\mu$ g) from transgenic embryos bearing AP/1A1.9*lacZ* (1.9), AP/1A4.3*lacZ* (4.3), AP/1A5.5*lacZ* (5.5), AP/1A8.5*lacZ* (8.5), AP/1A8.5Δ1.2*lacZ* (8.5Δ1.2) and AP/1A5.5Δ2.6*lacZ* (5.5Δ2.6) transgenes, and a wild type embryo (-) were digested as described in Fig. 7. Specific probes for *lacZ* and foremost 1.9 kb of the promoter were used. The overall differences in band intensities between *MspI* lanes (bands e-g) is due to the transgene copy number. As control, 5 ng of a *lacZ*-containing plasmid (*lacZ*) or a plasmid containing the foremost 1.9 kb of E1A promoter (1A1.9) were mixed with wild-type mouse genomic DNA and digested with *HpaII*; fragments detected are the ones expected and identical to the ones obtained with *MspI*. (A) Methylation levels of *lacZ*. A significant increase in the molecular weight of *HpaII* fragments (higher methylation) is observed as promoter length augments. Moreover, higher methylation is seen in constructs containing the -5.5 to -4.5 kb fragment (5.5Δ2.6) than in those lacking it (8.5Δ1.2). (B) Methylation patterns of the foremost 1.9 kb of E1A promoter. Similar methylation pattern (i.e. number and relative intensity of *HpaII* bands) is seen in lanes 5.5 and 5.5Δ2.6 (bands b-e) all derived from DNA of transgenic mice carrying the -5.5 to -4.5 fragment. A distinctive pattern is shown in 4.3 and 8.5Δ1.2 lanes (bands a-d) which is derived from DNA of transgenic mice lacking that fragment. Also, the methylation pattern seen in 8.5 lane is similar to the one displayed in 8.5Δ1.2 lanes; however, the level of methylation is higher in the former. Sizes of fragments f and g are 608 and 404 bp, respectively.

expression was also found at the apical ectodermal ridge of 12.5 d.p.c. embryos but the regulatory elements controlling this pattern seem to differ from those directing expression to the developing stomach and lung.

We have not detected reporter gene expression in PGCs of any transgenic mice produced. In support of the lack of PGC-specific regulatory elements, specific expression was not observed after transfection of semi-purified PGCs with any of the *lacZ* fusion constructs de-

scribed here, although SV40 promoter worked efficiently in PGCs (D.E.-A., unpublished observations). In summary, *TNAP* expression pattern seems to be defined by independent tissue-specific regulatory elements.

### 3.3. Methylation and expression of *TNAP*

DNA methylation is considered critical in the control of gene expression; however, very little is known about

the participating *cis*-regulatory elements. Recently, it was reported that B1/B2-like repetitive sequences from the  $\alpha$ -fetoprotein control region, may function to enhance the *de novo* DNA methylation in transfected cells (Hasse and Shulz, 1994). The methylation analysis of the *lacZ* in our transgenic mice is in agreement with a role of the B2 repetitive sequence found in *TNAP* promoter in promoting DNA methylation, but we cannot discard that other sequences within the 1 kb fragment tested could be responsible instead. Interestingly, not only does the fragment from  $-5.5$  to  $-4.5$  increase the global level of methylation, but also it seems that some sites within the foremost 1.9 kb of E1A promoter are more efficiently methylated. Our data suggest that methylation directed by a *cis*-regulatory element contained in the region from  $-5.5$  to  $-4.5$ , probably involving a B2 repetitive sequence, is rather specific and independent of the transcriptional activity (see below) and its position within the promoter region.

As we report here, a high level of methylation seems to be important for *TNAP* inactivation in non-expressing tissues. Accordingly, transgenic mice with reporter constructs containing 8.5 kb of E1A promoter, showing the highest level of methylation among the transgenic embryos produced, expressed *lacZ* very infrequently. However, the methylation level associated with the B2-containing fragment in *TNAP* promoter seems not to be sufficient for gene inactivation. Therefore, additional negative regulatory elements should be located between positions  $-8.5$  and  $-5.5$  kb of E1A promoter. These negative regulatory elements could also promote DNA methylation, as a higher level of methylation was displayed by 8.5 kb than 5.5 kb of E1A promoter; low stringency Southern blot hybridization did not detect any additional B2-related sequence within the 8.5 exon 1A promoter fragment (data not shown). From our data, we suggest that *TNAP* expression is being negatively regulated by methylation, affecting either specific regulatory sequences or chromatin structure.

Specific DNA methylation (e.g. imprinting: programming gene expression) has to occur as differentiation proceeds from the very earliest stages of development, and demethylation (e.g. erase imprinting: resetting the gene expression program), in germ cells during gametogenesis. Recently, Szabó and Mann (1995) suggested, based on the analysis of biallelic expression of imprinted genes, that germ cells start erasing the imprinting program during their migratory phase (7.5–10.5 d.p.c.) and complete it by gonad colonization (11.5–12.5 d.p.c.). Imprinting by methylation reinitiates at around 15.5 d.p.c. in both sexes (Kafri et al., 1992). Interestingly, germ cells start to express *TNAP* at around 7.5 d.p.c. (Ginsburg et al., 1990) when demethylation would start, and down-regulate it after 15.5 d.p.c. (Donovan et al., 1986) when methylation re-initiates. It is possible that *TNAP* expression pattern in germ cells, rather than being of functional

relevance, is the result of the methylation-demethylation process. In agreement with this hypothesis, EG cells derived from 8 d.p.c. PGCs, and ES cells, both expressing high levels of *TNAP*, have in general, an unmethylated DNA (Labosky et al., 1994; Szabó and Mann, 1994). Remarkably, the level of DNA methylation is commonly lower in tumor than in normal cells (Gama-Sosa et al., 1983), and usually many tumor cells express high levels of AP (Millán and Fishman, 1995). Then, the expression of this enzyme in tumor cells could be a consequence of the transforming phenotype rather than being involved directly in the process of tumorigenesis. This hypothesis may not apply to all human AP isoforms, but it will be of interest to know which human AP genes are regulated by DNA methylation.

In conclusion, *TNAP* expression pattern during mouse development could result, at least in part, from RA responsiveness and the degree of DNA methylation in particular cell types. One prediction based in this hypothesis is that *TNAP* will be up-regulated, or ectopically expressed, in RA-treated embryos or in those with the targeted mutation of the DNA (cytosine-5)-methyltransferase gene (Li et al., 1992). Importantly, it is also predicted that demethylation regulatory elements should exist as methylated transgenes were not demethylated.

#### 4. Experimental procedures

##### 4.1. Cell culture and transfection assays

ES cells (AB1 line) were cultured on a feeder fibroblast layer, following a routine protocol (Ramírez-Solis et al., 1993). To analyze the regulation of *TNAP* expression,  $5 \times 10^5$  ES cells were cultured on gelatin-coated 35 mm tissue culture dishes during 15 h with M15 medium alone or supplemented with  $10^{-6}$  M *all trans*-RA,  $10^{-3}$  M cAMP,  $10^{-3}$  M dbcAMP,  $2 \times 10^{-6}$  M 17- $\beta$ -estradiol or  $10^{-8}$  M thyroid hormone. Transfections were done with a modification of the method described by Strauss et al. (1993). Briefly, 0.8 pmol of each construct plus an unspecific plasmid DNA up to 10  $\mu$ g were used in each transfection. The DNA was dissolved in 100  $\mu$ l of OPTIMEM serum-free medium (BRL) and mixed with 50  $\mu$ g of LipofectAMINE (BRL) dissolved in 100  $\mu$ l of the same medium. ES cells ( $1.6 \times 10^6$ ) were transfected in suspension with this mixture during 4 h in a total volume of 1 ml of OPTIMEM. After this, each transfection was split in two, plated on gelatin-coated 35 mm tissue culture dishes and cultured for 24 h in 2 ml of M-15 medium with or without RA ( $10^{-6}$  M).

##### 4.2. Collection of embryos and fractions containing primordial germ cells

CD-1 mice were mated and the day of plug observation was referred as 0.5 d.p.c. Embryos at 8.5, 10.5, 11.5

and 12.5 d.p.c. and purified primordial germ cells, were obtained following the protocols described by Hogan et al. (1986).

#### 4.3. RT-PCR for AP mRNAs and specific transcripts derived from E1A and E1B of TNAP

RNA purification, RT and PCRs were carried out following standard protocols. For RT-PCR of TNAP mRNA, two oligonucleotides internal to the coding sequence were designed. The sense oligonucleotide sequence is located in exon 4 (5' CCTTAAGGGCCAGCTACACC 3') and the antisense oligonucleotide sequence in exon 5 (5' AGCGCAGGATGGATGTGACC 3'). The predicted molecular weights of the amplification products are 240 bp for the cDNA and 1244 bp for the genomic DNA. For EAP and IAP, the oligonucleotides used were those described by Hanhel et al. (1990). The samples were subjected to one hot start cycle (95°C, 3 min) followed by 30 amplification cycles (95°C, 1 min.; 55°C, 1 min 15 s; 72°C, 1 min). For E1A- and E1B-specific transcripts, the antisense downstream oligonucleotide was the same for the amplification of both transcripts and its sequence is contained in exon 2 (5' GGTGTACCCTGAGATTCG-TCC 3'). The sense upstream oligonucleotides were specific for E1A (5' TGCGCTCCTTAGGGCTGCCG 3') and E1B (5' GACATAGGGGACAGGGACCTGT 3'). The samples were subjected to 35 amplification cycles (E1A: 95°C, 1 min; 55°C, 2 min; 72°C, 2 min; and E1B: 95°C, 1 min; 53°C, 2 min; 72°C, 2 min). After amplification the samples were run in a 3% agarose gel, blotted to nylon membranes and hybridized to <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotides specific for E1A (5' GTCTGTTCCGGCTCGCG 3') or E1B (5' TCGATCCAGATGCTGAA 3') (Studer et al., 1991). When necessary, the amount of cDNA used was normalized by performing a RT-PCR amplification specific for the mRNA of the constitutive hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene.

#### 4.4. Determination of AP activity

For in situ gel analysis,  $5 \times 10^6$  ES cells were trypsinized and resuspended in PBS. After centrifugation at 1500 rpm, the cells were resuspended in 0.5 ml of AP buffer (10 mM Tris, pH 9.5; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>), homogenized and centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was recentrifuged for 15 min at 12 250 rpm. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of AP buffer-1% Triton X-100. H<sub>2</sub>O-saturated butanol (100  $\mu$ l) was added and mixed during 30 min. The mixture was centrifuged for 30 min at 14 000 rpm. The lower aqueous phase was recovered and the protein was precipitated with acetone. After 1 h centrifugation at 14 000 rpm, the pellet was resuspended in 50  $\mu$ l of AP buffer. Semi-purified AP (4  $\mu$ l) was run in triplicate in a denaturing 7.5% acrylamide gel without heating the samples before loading. One

gel was incubated in 30 ml of AP buffer with 165  $\mu$ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate (BCIP). To test the activity in the presence of inhibitors, gels were incubated as above but 25 mM L-phenylalanine or 1 mM levamisole was added to the AP-incubating media. For spectrophotometric measurement of TNAP activity,  $5 \times 10^5$  cells cultured as described before were lysed in 100  $\mu$ l of AP buffer-1% Triton X-100. Fifty  $\mu$ l of the extract and 445  $\mu$ l of AP buffer were added to spectrophotometric cuvettes. Five  $\mu$ l of 100 mg/ml *p*-nitrophenol-phosphate were added to each cuvette mixed and incubated for 30 min at room temperature, and protected from light. The reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of 0.25 M EDTA and read at OD<sub>405</sub>. For histochemistry, embryos and dissected organs were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, and AP activity developed by incubation in 25 mM Tris (pH 9.0), 0.15 M NaCl, 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mg/ml  $\alpha$ -naphthyl phosphate (Boehringer Mannheim), and 20 mg/ml Fast Red TR (Sigma) for 10 min at room temperature.

#### 4.5. Reporter gene constructs

*lacZ* reporter constructs were obtained with different fragments of the 5' flanking region of TNAP E1A promoter (Fig. 3A). A *Pst*I 1.9 kb fragment from the ALP-blu construct described by Terao et al. (1990), was cloned into the unique *Hind*III site of the *lacZ* expression vector, pCH110 (Stratagene), using *Hind*III linkers. Since the SV40 promoter in this construct could have unwanted effects on the TNAP transcription, a *Xba*I-*Bam*HI fragment containing 1.86 kb of the 5' flanking region, 77 bp of the E1A as well as the *lacZ*, was ligated with a *Xba*I-*Bam*HI fragment from the vector pCAT basic (Promega) carrying the ampicillin resistance gene and a replication origin. This plasmid was named pAP/1A1.9*lacZ*, which has 1.86 kb of E1A promoter, and was used as the basic construct for the ones described below. To obtain pAP/1A5.5*lacZ*, a *Sal*I-*Xba*I 3.5 kb fragment from the TNAP genomic clone 81 (Terao et al. 1990) was subcloned into the *Sal*I-*Xba*I sites of pAP/1A1.9*lacZ*. For pAP/1A8.5*lacZ* construct, a *Sal*I 3 kb fragment from the genomic clone 81, was cloned, in the correct orientation, into the unique *Sal*I site of pAP/1A5.5*lacZ*; for transgenic mice production, *Not*I adaptors were added in the 5' extreme of the promoter (*Sal*I) and in the 3' extreme of the *lacZ* (*Bam*HI). pAP/1A8.5 $\Delta$ 1.2*lacZ* was obtained by deleting the 1.2 kb *Sal*I-*Bam*HI fragment to pAP/1A8.5*lacZ*-*Not*I. Construct pAP/1A4.3*lacZ* was obtained by subcloning the *Bam*HI fragment from pAP/1A5.5*lacZ*, which includes 4.3 kb from the TNAP E1A promoter fused to the *lacZ*, in pKS+ (Stratagene). Constructs with other deletions of the E1A promoter were made in two steps, first subcloning the fragments *Sal*I-partial-*Bam*HI (1.2 kb) and *Sal*I-*Bam*HI (1.0 kb) from pAP/1A5.5*lacZ* in pGEM-11Zf(+) (Promega). Then, these fragments were

subcloned as *Sall*-*XbaI* fragments into pAP/1A1.9*lacZ*. The corresponding constructs were named pAP/1A5.5Δ2.4*lacZ* and pAP/1A5.5Δ2.6*lacZ*, respectively. To the latter, a *NotI* adaptor was introduced to the 3' extreme of *lacZ* for transgenic mice production. The vector pC1110 (Pharmacia) was used as a control vector for the constitutive expression of *lacZ*. For the activation of TK promoter by E1A promoter sequences, the 1 kb *Sall*-*BamHI* fragment mentioned above was digested with *Sau3A*-*EcoRI* and the resulting fragments were subcloned in the expression vector pTK*luc* kindly donated by Dr. T. Gulick.

#### 4.6. Measurement of $\beta$ -galactosidase and luciferase activity

Transfected cells were lysed with 100  $\mu$ l of Cell Culture Lysis Reagent (Promega) and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ .  $\beta$ -galactosidase activity was measured spectrophotometrically using an assay based in the protocol described by Ausubel et al. (1994). Briefly, 5–50  $\mu$ l of the extracts were added up to 1 ml of buffer Z (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0). The reaction was started by adding 200  $\mu$ l of 4 mg/ml chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) (Boehringer Mannheim) as substrate, and incubated at  $30^{\circ}\text{C}$ . The reaction was stopped by adding 0.5 ml of 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution and read at  $\text{OD}_{574}$ . One nmol of the product corresponds to  $\text{OD}_{574} = 0.0441$ . Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System (Promega). Briefly, 10  $\mu$ l of each extract and 100  $\mu$ l of luciferase assay reagent were mixed and measured in a Monolight 2010 automatic luminometer (Analytical Luminescence Laboratory) for 10 s. The photon count was normalized for  $\mu$ g of protein. Protein was quantified by the standard Bradford protocol (Ausubel et al., 1994).

#### 4.7. Sequence determination

Selected fragments were subcloned in Bluescript KS+ vector (Stratagene). The fragments were sequenced using T3 and T7 primers. Sequencing of the clones was accomplished by the Sanger dideoxy chain termination procedure (Sanger et al., 1977) using the Sequenase enzyme (United States Biochemical) and [ $^{35}\text{S}$ ]dATP (Amersham) as tracer. Sequences were analyzed using several computer programs (MacMolly, Soft Gene Berlin Inc.; Wisconsin Package Fasta, Genetics Computer Group Inc.; NASITE, Intelligenetics Inc.).

#### 4.8. Production of transgenic mice

Stable or transitory transgenic mice were generated by pronuclear microinjection as described by Hogan et al. (1986). Briefly, the male pronucleus of fertilized eggs

from CD-1 female mice were microinjected and immediately transferred to CD-1 pseudopregnant mice. Six fragments containing E1A promoter sequences fused to *lacZ*, were used for transgenic mouse production: *NotI*-*NotI* and *Sall*-*NotI* fragments from pAP/1A8.5*lacZ*; a *BamHI*-*BamHI* fragment from pAP/1A5.5*lacZ*; a *XbaI*-*BamHI* fragment from pAP/1A1.9*lacZ*; a *NotI*-*NotI* fragment from pAP/1A8.5Δ1.2*lacZ* and a *Sall*-*NotI* fragment from pAP/1A5.5Δ2.6*lacZ*. Identification of transgenic animals was done by Southern blot hybridization of genomic DNA from tails or placentas. Embryos at 12.5 d.p.c. were fixed with 4% paraformaldehyde and stained overnight at  $30^{\circ}\text{C}$  for  $\beta$ -galactosidase in 5 mM potassium ferrocyanide and 5 mM potassium ferricyanide in PBS containing 1 mg/ml X-Gal (Molecular Probes).

#### 4.9. Methylation analysis of genomic DNA

High molecular weight DNA (20  $\mu$ g) was digested overnight with *HpaII* (methylation sensitive) and *MspI* at a ten-fold excess. DNA was exhaustively digested with *HpaII* and performance of the enzyme was determined by mixing wild-type chromosomal DNA with a fragment containing the probe sequence. Fragments were separated on 2% agarose gels and transferred to nylon membranes (Hybond) with 0.4 N NaOH. Hybridization was performed at  $42^{\circ}\text{C}$  in 50% formamide. Probes were labeled with [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP using the nick translation priming method (Amersham). The probes to test methylation of *lacZ* and the foremost 1.9 kb of E1A promoter were an *EcoRI* fragment (3.2 kb) and a *XbaI*-*EcoRI* fragment (1.86 kb), respectively, both derived from the pAP/1A1.9*lacZ* construct.

#### Acknowledgments

We thank to Dr. L. Segovia and Dr. M. Rocha for the critical reading of this manuscript, and Dr. Elizabeth Mata, Graciela Cabeza, and Sergio González for their technical assistance. This work was supported by The Program of United Nations for Development (PNUD/MEX/93/019), CONACyT (1663M9209) and PAPIIT/UNAM (IN-201991 and IN-206194).

#### References

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (1994) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York.
- Borgers, M. (1973) *J. Histochem. Cytochem.* 21, 812–824.
- Donovan, P.J., Stott, D., Cairns, L.A., Heasman, J. and Wylie, C.C. (1986) *Cell* 44, 831–838.
- Firestone, G. and Heath, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1396–1403.
- Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. and Di Lauro, R. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 576–588.
- Gama-Sosa, M., Slagel, V., Trewyn, R., Oxenhandler, R., Kou, K., Gehrke, C. and Ehrlich, M. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 6883–6894.

- Gianni, M., Studer, M., Carpani, G., Terao, M. and Garattini, E. (1991) *Biochem. J.* 274, 673-678.
- Ginsburg, M., Snow, M.H.L. and McLaren, A. (1990) *Development* 110, 521-528.
- Hahnel, A., Rappapolee, D., Millán, J., Manes, T., Ziomek, C., Theodosiou, N., Werb, Z., Pedersen, R. and Schultz, G. (1990) *Development* 110, 555-564.
- Hasse, A. and Schulz, W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1821-1826.
- Heath, J., Suva, L., Yoon, K., Kiledjian, M., Martin, T. and Rodan, G. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 636-646.
- Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 332 pp.
- Kafri, T., Ariel, M., Schemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. and Razin, A. (1992) *Genes Dev.* 6, 705-714.
- Kinamura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. (1996) *Genes Dev.* 10, 60-69.
- Labosky, P., Barlow, D. and Hogan B. (1994) *Development* 120, 3197-3204.
- Lehman, B.P. and Stunnenberg, H.G. (1995) *Genes Dev.* 9, 1811-1816.
- Li, E., Bestor, T. and Jaenisch, R. (1992) *Cell* 69, 915-926.
- MacGregor, G., Zambrowics, B.P. and Soriano, P. (1995) *Development* 121, 1487-1496.
- Merchant-Larios, H., Menlović, F. and Alvarez-Buylla, A. (1985) *Differentiation* 29, 145-151.
- Millán, J.L. and Fishman, W. (1995) *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 32, 1-39.
- Ramírez-Solis, R., Davis, A. and Bradley, A. (1993) *Methods Enzymol.* 225, 855-878.
- Sanger, F., Niklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Scheibe, R., Moeller-Runge, J. and Muller, W. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 21300-21305.
- Strauss, W., Dausman, J., Beard, C., Johnsen, C., Lawrence, J. and Jaenisch, R. (1993) *Science* 259, 1904-1907.
- Studer, M., Terao, M., Gianni, M. and Garattini, E. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1352-1360.
- Szabó, P. and Mann, J. (1994) *Development* 120, 1651-1660.
- Terao, M., Pravtcheva, D., Ruddle, F.H. and Mintz, B. (1988) *Somat. Cell Mol. Genet.* 14, 211-215.
- Terao, M., Studer, M., Gianni, M. and Garattini, E. (1990) *Biochem. J.* 268, 641-648.
- Zgonbic-Knigh, M., Satre, M. and Duester, G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6790-6795.

PUBLICACIÓN 2

**21. Transitory transgenic analysis as an in vivo system to study promoter regulatory elements**

Diana Escalante-Alcalde and Luis Covarrubias.

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo, Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.

FAX: (52-73) 17-2388

TEL: (52-5) 622-7636/7631

E-MAIL: covs@ibt.unam.mx

## 21.1 Background, Principles, and Applications

During development, gene expression is tightly regulated in time and space. The specific expression pattern of a particular gene results from the combination of several parameters, which include: (1) the presence in its promoter of sequences binding specific trans-acting proteins; (2) the expression of these trans-acting proteins which, when bound to their target sequence, determine activation or repression of transcription, and; (3) an adequate chromatin conformation such that, in its open conformation, allows binding of transcription factors to their target sequences. The RNA polymerase II complex binds to promoter sequences usually found immediately upstream of the gene coding region. However, initiation of transcription by this complex is strongly influenced by a concerted action of cis- and trans-regulatory factors. Although cis-regulatory elements are most frequently located 5' to the gene coding region, they can also be found in introns and even in the 3' sequences of the gene.

Transgenic mouse technology offers a powerful tool to study, *in vivo*, different molecular aspects of gene expression. One of them is the identification of regulatory sequences that determine temporal and tissue-specific gene expression. In transgenic mice, the recombinant gene is carried by all cells, and during the whole process of development. Therefore, the evaluation of the influence of cis-acting DNA sequences in transgenic mice may be a definitive strategy to identify the elements determining the specific pattern of transcription in the developing animal.

To date, the most widely used method to generate transgenic mice has been the microinjection of recombinant DNA into the pronucleus of fertilized eggs. In order to identify the relevant cis-acting sequences in a given gene, its promoter and possible regulatory sequences to analyze are conveniently fused to a reporter gene

(i.e. a gene encoding an innocuous and easily detectable protein) which contains the necessary transcription processing signals (Fig. 1). The temporal and tissue-specific pattern of reporter gene expression in the transgenic animal would be expected to reflect that of those elements directing transgene expression. However, an intrinsic limitation of this approach is the quasi-random insertion of transgenes into the host genome. Thus, it is frequent to observe how endogenous cis-regulatory sequences influence transgene expression in an unpredictable way, which may obscure the elements under analysis. Therefore, reproducible expression patterns have to be obtained, by characterizing animals from three or more transgenic lines, in order to generate reliable data (see below).

The establishment of stable transgenic lines of mice and the analysis of transgene expression in their embryos requires several months (Fig. 1). Furthermore, it should be considered that, for a particular reporter gene construct, each transgenic line represents a single integration event and consequently a unique expression pattern. This time-consuming approach can be simplified by the production and direct analysis of transgenic embryos (i.e., transitory transgenic approach) (Fig. 1). In this case, the analysis is made on transgenic embryos developed in uterus after pronuclear egg injection and transfer into the oviducts of pseudopregnant mice. This approach overcomes the necessity to generate and maintain different lines of transgenic mice and, since each transgenic embryo represents a distinct integration event, it provides a representative pattern of expression. Moreover, the expression of a particular promoter-reporter gene construct can be tested in several independent transgenic embryos in no longer than 20 days. A pre-requisite of this approach is to optimize the technique in order to provide a high efficiency of transgenesis.

## 21.2 Materials and Reagents

### 21.2.1 Equipment

- Dissecting microscope and optic fiber illumination (Nikon, Japan)
- Inverted microscope with interference optic (Diaphot, Nikon, Japan)
- Anti-vibration table (i.e. marble table) for manipulation
- Micropipette puller (P--97, Sutter Instrument, Co, USA)
- Microforge (Nikon, Japan)
- Microburner
- Two hydraulic micromanipulators (Narishige, Japan)
- Two robotic joy sticks (Narishige, Japan)
- One syringe micrometer for micromanipulation suction system
- One 50 ml syringe for micromanipulation injection system
- Microcentrifuge

#### 21.2.2 Reagents and Supplies

- Microinjection buffer (5 mM Tris-HCl , 0.1 mM EDTA pH 7.5)
- M2 and M16 media (Hogan et al., 1994)
- Mineral oil (M8410, Sigma, USA)
- Avertin (Hogan et al., 1994; 24,048--6 and T4,840--2, Aldrich, USA)
- Hyaluronidase (H4272, Sigma, USA)
- Bovine serum albumin (A3311, Sigma, USA)
- Water for embryo transfer (W1503, Sigma, USA)
- High purity agarose (GIBCO/BRL, USA)
- Qiaex DNA purification kit (Qiagen, Inc., USA)
- Rubber tubing with mouthpiece (A7177, Sigma, USA)
- Watchmakers' forceps (number 5, Fine Scientific Tools, USA)
- 5--0 silk thread
- Microcapillary tubing for holding pipettes (1B100--6, World Precision Instruments, Inc., USA)

-- Microcapillary with filament for injection needles (TW100F--6, World Precision Instruments, Inc., USA)

-- Pasteur pipettes

### 21.3 Experimental procedure

The first step in the analysis of a promoter region is to determine the pattern of expression of the gene under study. This can be done by in situ hybridization, immunofluorescence or immunohistochemistry and, in a few cases, by histochemistry (the example shown below). After preparing adequate fusion constructs containing the promoter sequences, series of pronuclear egg microinjections are performed.

#### 21.3.1 Purification of DNA fragments

Higher gene expression and integration frequencies are obtained using lineal constructs, devoid of vector sequences, than with circular plasmids (see for review Hogan et al., 1994). The purity of DNA is perhaps the most important consideration to obtain high frequency of transgenesis. Purification of the DNA fragment to be used for microinjection can be achieved by different methods (e.g. zonal sucrose gradient centrifugation, electroelution, low melting agarose). In our experience the use of chaotropic agents and activated silica gel particles (Qiaex, Qiagen Inc.) is the fastest procedure and permits to obtain high integration frequencies (25--50%). The protocol described below allows to recover, with high yield, DNA fragments of large size (i.e. 20--50 kb) without significant shearing.

1. 20-30  $\mu$ g of plasmid construct are digested with the appropriate restriction enzymes to release the fragment for injection.
2. The fragment is separated by agarose gel electrophoresis. A 0.7% agarose gel is recommended for fragments between 5 and 20 kb.

3. Agarose slice (up to 100 mg), containing the DNA fragment of interest, is load in a microcentrifuge tube and the Qiaex gel extraction protocol described by the manufacturer is followed.

4. The DNA fragment is eluted from the silica gel beads by incubating in the microinjection buffer for 2 min. at 50 °C.

### 21.3.2 Production of postimplantation transgenic embryos

The production of transgenic mice by pronuclear microinjection of eggs has been described extensively elsewhere (Hogan et al, 1994; Gordon, 1993; Mann and McMahon, 1993). Therefore, in this section we describe a brief stepwise protocol to obtain transgenic embryos.

1. Obtaining of fertilized eggs. Fertilized eggs, surrounded by cumulus cells, are recovered from the ampulla of pregnant females. For the outbred CD--1 strain superovulation is not required.

2. Hyaluronidase treatment. To release eggs from the cumulus cells, they are incubated for 1 min. at RT in M2 medium containing 300 <m>g/ml hyaluronidase. Somatic cells are removed through several washes in M2 medium. The eggs are placed in the microinjection chamber.

3. Pronuclear microinjection. In general, the male pronucleous is selected for injection because it is larger than the female one. We use DNA's which are diluted to a concentration of 2.5 <m>g/ml in microinjection buffer.

4. Transference. The eggs surviving microinjection (generally over 80%) are transferred immediately to the oviduct of pseudopregnant mice (CD--1).

Alternatively, the embryos may be transferred after overnight incubation in M16 medium, when they are at the two cell stage, without any difference in the outcome. For best results, The number of eggs transferred to each oviduct should be around 15. About half of these are expected to develop normally (at least up to E12.5 stage), and 25 to 50 % of them should be transgenics (i.e. 25--50% transgenesis).

### 21.3.3 Analysis of reporter gene expression

Among the different reporter genes which are available, those allowing in situ analysis are recommended. The bacterial  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) is the most widely used, because in situ detection of enzyme activity is very simple and the endogenous  $\beta$ -galactosidase activity is very low. Whole mount analysis using X-gal as substrate gives good results for embryos up to 15.5 days post coitum (dpc). For later stages, organs or embryo fragments of interest should be dissected, as the diffusion of substrate is limited. Alternatively, staining can be performed in serial sections of frozen embryos.

1. After transfer to the foster mother, the embryos are left to develop until the stage of choice, and then the mother sacrificed and its uterus dissected.
2. Embryos are fixed separately with 4% paraformaldehyde (in PBS), and permeabilized with a 0.02% NP-40 solution (in PBS).
3. Staining is performed with 1 mg/ml of X-gal in 5 mM potassium ferricyanide/ferrocyanide. We recommend to incubate the embryos immersed in staining solution overnight at 30 °C to avoid significant background. In some cases, in which reporter expression is strong, 4 hours of incubation may be enough to see the blue color of the X-gal staining.
4. Embryos carrying the transgene are identified by extracting DNA from a fragment of the placenta or from the yolk sac of each embryo, and analyzing it by Southern or dot blot hybridization and/or by PCR using labeled specific probes or the appropriate oligonucleotides, respectively. These techniques are described in detail in molecular biology manuals (see for instance Sambrook et al., 1989).

### 21.4 Results

Cis-acting promoter/enhancer elements are in general very complex. Therefore, the interpretation of results obtained from the analysis of transgenic animals will be more or less difficult depending on the complexity of the promoter being studied. In

general, if at least two transgenic embryos are obtained that exhibit the expected pattern of expression, it can be considered as functional in terms of promoter specificity, but insufficient for a definitive conclusion. Only more than two lines with the expected pattern can be taken as conclusive

As an example of the use of transitory transgenic mice, in this section we will show the results that we obtained with promoter fragments of the tissue non-specific alkaline phosphatase gene (*TNAP*) (Terao et al., 1990; Studer et al., 1991; Escalante-Alcalde et al., 1996). At 12.5 dpc, *TNAP* is expressed in the primordial germ cells, the neural tube, the apical ectodermal ridge of limbs, the stomach and lung epithelia, and muzzle. Although this gene has two promoters, during the embryonic life transcription takes place only from the exon 1A (E1A) promoter (Escalante-Alcalde et al., 1996). Table 1 and Fig. 2 show the expression patterns obtained with several reporter constructs containing the E1A promoter of *TNAP*.

With a construct containing the foremost 1.9 kb of E1A promoter, the influence of sequences flanking the integration site is very evident. Thus, the expression patterns observed for the reporter were diverse and not coincident with the *TNAP* expression pattern (Table 1; Fig. 2 A-C). Regions of tissue specific expression (apical ectodermal ridge and stomach and lung epithelium) start to be seen with constructs containing 4.3 kb and 5.5 kb of sequences immediately upstream E1A transcription start site (Table 1; Fig 2 D, E). However, it should be noted that the expected pattern of expression appeared infrequently (i.e. although reproducible, only a few embryos showed such expression pattern; Table 1), and overlapped to an unspecific expression pattern, probably due to regulatory elements around the integration site. Interestingly, the combination of proximal (up to --1.9 kb) and distal elements (between --5.5 and --4.5) resulted in reproducibility of the specific expression in lung and stomach epithelia, but yet included within an unspecific expression pattern (Table 1, numbers in bold; Fig 2 G-I). Note that, either the 1.9 kb

or the 4.3 kb fragments proximal to the transcription start alone were not able to efficiently direct specific expression. Element(s) directing the specific expression to primordial germ cells seem not to be present in the promoter fragment analyzed (until --8.5 kb).

Although less frequently reported, transgenic embryo analyses can also be applied to uncover the presence of elements regulating negatively gene expression. This can clearly be seen in the results shown for the construct containing 8.5 kb of *TNAP* E1A. Here only one out of 7 individual embryos expressed the reporter gene (Table 1, underlined numbers). This observation let us to determine that promoter E1A contains a cis--methylation regulatory elements which negatively act on *TNAP* expression (Escalante--Alcalde et al., 1996). In this case the negative effect was observed in all developing tissues, but tissue specific negative elements such as silencers have also being identified in transgenic mice (Wuenshell et al., 1990).

#### 21.5 Troubleshooting

As it was mentioned above, when analyzing promoter regulatory sequences in transgenic embryos, it is a pre--requisite to be in disposition of obtaining high efficiency of transgenesis (in the range of 25--50%). Low integration frequencies are obtained if microinjection is not performed properly. Microinjection of very small volumes of DNA solution is cause of low efficiency of transgenesis. However, care should be taken as microinjection of an excessive volume would result in pronuclear rupture. Thus, an optimal pronuclear swelling is important for both egg survival and DNA integration frequency. To determine egg damage due to microinjection, we recommend to evaluate egg survival after an overnight culture, as this relates directly to the number of recovered embryos. Additional relevant parameters are DNA purity and its concentration, composition of injection buffer, and mouse strain.

Weak expression driven by tissue specific elements could be limiting for their identification. To overcome this problem, one possibility is to use alternative reporter genes. However, although several reporter genes have been used to date (e.g. chloramphenicol acetyltransferase and luciferase genes), direct in situ detection of their expression is not possible. Recently, the gene encoding the green fluorescent protein (GFP) has been introduced as a reporter. The GFP gene should allow direct confocal analysis of its expression in the intact embryo (up to 9.5 dpc) or in dissected tissues.

If specific expression of the reporter gene is not observed, it could be due to the fact that important regulatory elements are missing in the sequence analyzed.

Therefore, it should be considered that regulatory elements are distributed along the entire sequence of the gene, and in some cases covering long distances. Then, analysis of regulatory elements using transgenic embryos should be first tried using the largest possible fragment, comprising as extended 5' and 3' flanking sequences as possible. However, there is an inverse correlation between the length of the injected fragment and integration frequency. This effect starts to be obvious with fragments larger than 20 kb. To solve this limitation, it is possible to co-inject overlapping fragments and select for those where homologous recombination has occurred as it has been reported previously (Zambrowicz et al., 1994).

Alternatively, it is now possible to introduce very large fragments into embryos using YAC constructs (Schedl et al., 1993; see also chapter 9).

#### 21.6 Future directions

One of the major problems when the activity of a promoter is being studied in transgenic mice is the noise caused by ectopic transgene expression. This problem is mainly due to the regulatory elements around the integration site; therefore, isolation of transgenes from the influence of endogenous sequences would be desirable. This can be achieved by flanking the transgene with elements that

prevent the transmission of chromatin structural features associated with repressed or active chromosomal domains. These elements, known as insulators, define the limits of transcriptionally active chromatin, protecting it against the repressive influence of neighboring heterochromatin (Chung et al, 1993; Wolffe, 1994). Then, insulators might have important practical implications for the efficiency and accuracy of transgene expression. However, this approach would not be suitable to study sequences which promote changes in chromatin structure such as some elements within long control regions (LCRs) that regulate certain loci (Festenstein et al., 1996).

Ideally, cis--regulatory elements should be studied in their natural chromosomal location. This is now possible by targeting mutations to specific elements by homologous recombination in embryonic stem cells. These cells can be used to produce chimeric and finally, the mutant mice (for details on the gene targeting technology, see for example Ramírez--Solis et al., 1993). The gene targeting approach has the advantage that independent regulatory elements can be studied in a context of integrity, where all remaining regulatory elements, and the appropriate chromosomal environment are preserved (Fiering et al, 1993; Fiering et al, 1995).

#### Acknowledgments

This work was supported by The Program of United Nations for Development (PNUD/MEX/93/019), CONACyT (1663M9209), and PAPIIT/UNAM (IN--201991 and IN--206194).

#### References

Chung JH, Whiteley M, and Felsenfeld G (1993) A 5' element of the chicken  $\beta$ -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74:505-514

Escalante--Alcalde D, Recillas--Targa F, Hernández--García D, Castro--Obregón S, Terao M, Garattini E, and Covarrubias L (1996) Retinoic acid and cis--methylation regulatory elements control the mouse tissue non--specific alkaline phosphatase gene expression. *Mech Dev* (in press)

Festenstein R, Tolain I N, Corbella P, Mamalaki C, Parrington J, Fox M, Miliou A, Jones M, and Kioussis D (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science* 271: 1123-1125

Fiering S, Kim CG, Epner E, and Groudine M (1993) An "in--out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: Analysis of the  $\beta$ -globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8469-8473

Fiering S, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DJK, Enver T, Levy TJ, and Groudine M (1995) Targeted deletion of 5' HS2 of the murine  $\beta$ -globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev* 9:2203-2213

Gordon J (1993) Production of transgenic mice. *Meth Enzymol* 225:747-771

Hogan B, Beddington R, Costantini F, and Lacy E (1994) *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual* (2nd ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press

Mann JR and McMahon AP (1993) Factors influencing frequency production of transgenic mice. *Meth Enzymol* 225:771-781

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press

Ramírez--Solis R, Davis AC, and Bradley A (1993) Gene targeting in embryonic stem cells. *Meth Enzymol* 225:855-878

Schedl A, Larin Z, Montoliu L, Thies E, Kelsey G, Lehrach H, and Schutz G (1993) A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection. *Nuc Acids Res* 21:4783-4787

Studer M, Terao M, Gianni M and Gartini E (1991) Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney--type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression. *Bioch Biophys Res Comm* 179:1352-1360

Terao M, Studer M, Gianni M and Garattini E (1990). Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney--type alkaline phosphatase gene. *Biochem J* 268:641-648

Wuenshell CW, Mori M, and Anderson DJ (1990) Analysis of SCG10 gene expression in transgenic mice reveals that neural specificity is achieved through selective derepression. *Neuron* 4:595-602

Wolfe AP (1994) Insulating chromatin. *Curr Biol* 4:85-87

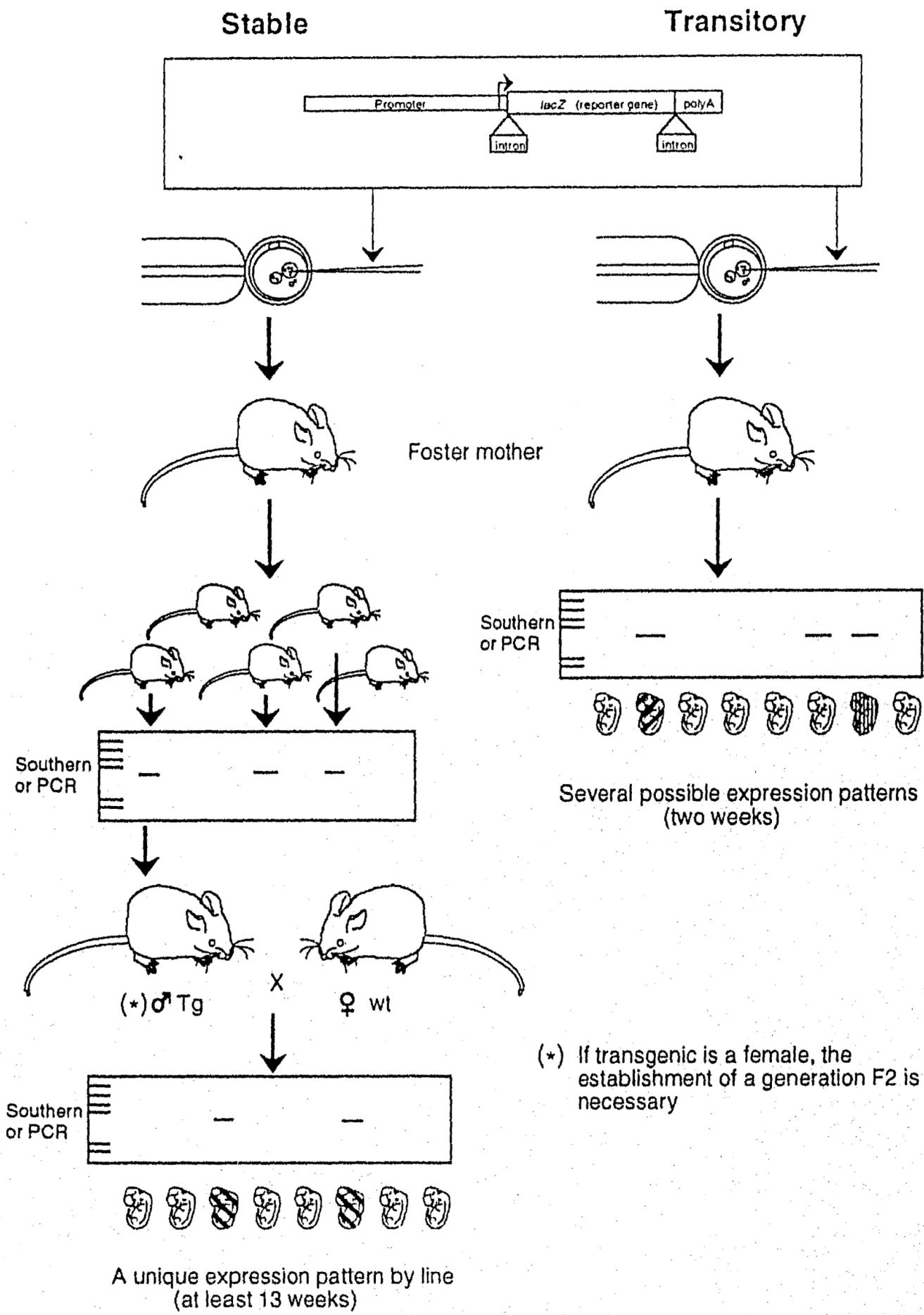
Zambrowicz BP, Zimmermann JW, Harendza CJ, Simpson EM, Page DC, Brinster RL, and Palmiter RD (1994) Expression of a mouse *Zfy--1/lacZ* transgene in the somatic cells of embryonic gonad and germ cells of the adult testis. *Development* 120: 1549-1559

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Two alternative routes to analyze promoter sequences in transgenic mouse embryos. Transgenics could be derived from stable lines (left) or directly from injected eggs (right). In both strategies the eggs are microinjected with promoter-reporter fusion constructs (box). Promoter fragments must contain the transcription start site (bent arrow), polyadenylation signals in the 3' end and generally splice donor/splice acceptor sequences (intron) before or after the reporter gene.

Figure 2. Patterns of  $\beta$ -galactosidase expression observed in 12.5 dpc transgenic embryos carrying *TNAP E1* promoter-*lacZ* constructs. (A--C) Transgenic embryos bearing the construct pAP/1A1.9. Independent lines of transgenic mice with this construct show different expression patterns: regions of the cephalic and dorsal areas, and in the base of limbs (A); a spot in the lateral region of the face and a diffuse pattern in the posterior region of the head (B); no expression in any tissue (C). The dark appearance of the liver in B and C is due to its high blood content. (D-I) Transgenic embryos showing reporter gene expression in some specific tissues. Transgenic mouse embryo bearing constructs pAP/1A4.3 (D), and pAP/1A8.5<D>1.2 (F), show expression in the apical ectodermal ridge (aer), whereas pAP/1A5.5 (E) and pAP/1A5.5<D>2.6 (G--I) show strong X-gal staining in the stomach (S) and lung epithelia (not shown). Expression in the distal tip of muzzle is observed in a transgenic embryo bearing the construct pAP/1A4.3 (D). Note, however, that unspecific expression is also observed in the transgenic embryos such as: in several skeletal elements (E), regions of the head (F), some paraxial elements (G), the posterior region of limbs (H) and some spots in the base of limbs (I).

# Production of transgenic mice



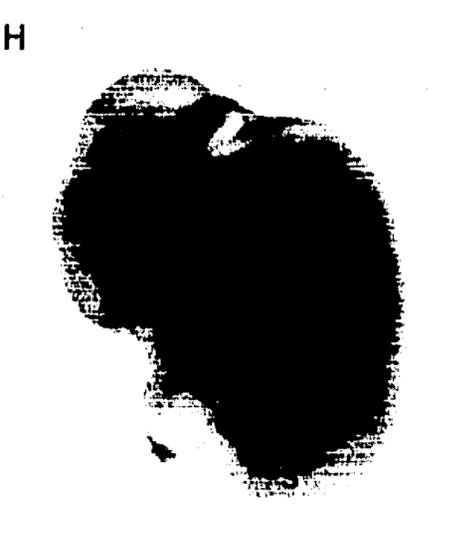


Table 1  
Reporter gene expression in 12.5 dpc transgenic embryos

Tissue	pAP/1.9	pAP/1A4.3	pAP/1A5.5	pAP/1A8.5	pAP/1A5.5<D>2.6	pAP/1A8.5<D>1.2
Primordial germ cells <sup>a</sup>	-/3	-/4	-/2	-/7	-/9	-/6
Stomach epithelium <sup>a</sup>	-/3	1/4	1/2	1/7	4/9	-/6
Lung epithelia <sup>a</sup>	-/3	1/4	1/2	1/7/	4/9	-/6
Intestine <sup>a</sup>	-/3	-/4	-/2	-/7	2/9	-/6
Neural tube <sup>a</sup>	-/3	-/4	-/2	-/7	1/9	1/6
Apical ectodermal ridge <sup>a</sup>	-/3	1/4	-/2	-/7	-/9	1/6
Mesonephic ducts <sup>b</sup>	-/3	-/4	1/2	-/7	-/9	-/6
Developing skeletal elements <sup>b</sup>	-/3	1/4	1/2	-/7	2/9	-/6
None	1/3	-/4	1/2	6/7	3/9	3/6

<sup>a</sup> Tissues that express *TNAP*; <sup>b</sup> Tissues that do not express *TNAP*

The number in each construct corresponds to the size of the promoter in kb. Internal deletions are indicated by a <D> followed by the size in kb of the fragment deleted.

## DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación de las CGP no ha podido ser abordado con éxito, debido a la dificultad de obtener un gran número de estas células con elevada pureza, o el mantenerlas por períodos prolongados en cultivo para realizar manipulaciones experimentales. El presente trabajo forma parte de una estrategia encaminada a establecer un modelo de estudio para estas células, la cual consiste en generar líneas inmortales de CGP mediante la expresión dirigida de genes immortalizantes. La primera aproximación en esta estrategia, consistió el análisis de las regiones de control del *FATN*, gen que se expresa abundantemente en las CGP, con la finalidad de determinar elementos que pudieran emplearse para dirigir la expresión de genes heterólogos en este tipo celular.

### **A) ELEMENTOS DEL PROMOTOR DEL EXON 1A DEL *FATN* QUE DETERMINAN EXPRESION ESPECIFICA.**

#### **1.- Sobre las CGP y las células ES.**

De los ensayos de transfección transitoria de cultivos primarios de gónadas se desprendió la posibilidad de que no se encontraran elementos que determinaran la expresión en las CGP, en la región analizada del promotor del exon 1A del gen de la *FATN* (hasta -8.5 kb). Esta observación se vió apoyada por los resultados obtenidos en los ensayos realizados en embriones transgénicos, ya que en ningún caso se logró observar expresión del gen reportero en este tipo celular. Aún es posible que dentro de las 8.5 kb analizadas se encuentre algún elemento importante que determine especificidad de expresión en este tipo celular, pero que requiera de elementos esenciales localizados arriba de -8.5 kb, dentro del intron 1A (recordemos que mide aproximadamente 32 kb), dentro de otras regiones intragénicas o incluso en el extremo 3' del gen. Otra posibilidad es que la presencia de elementos de especificidad se encuentren enmascarados por el efecto de elementos de regulación negativas (e.g. metilación, ver siguiente apartado) presentes en algunas de las construcciones analizadas.

De la misma manera, parece no haber elementos que determinen la especificidad de la expresión en las células ES en la región analizada, ya que en condiciones de cultivo en ausencia de AR, las diferentes construcciones mostraron un nivel de actividad transcripcional similar al de las células STO. El nivel de actividad registrado en ambas líneas pudiera deberse a la actividad del promotor basal. La actividad de un promotor basal sería de esperar que fuera incrementada por la presencia de un aumentador general como el de SV40. De hecho, si células de ambas líneas son transfectadas con construcciones reporteras dirigidas por 0.32 o 2 kb del promotor del exon 1A y el aumentador de SV40, la actividad registrada se incrementa en un orden de magnitud respecto a actividad basal sin aumentador (datos no mostrados). Estos resultados explican el porque las células somáticas de la gónada transfectadas con la construcción pCH110/1A, que contiene 2 kb de la región del promotor del exon 1A y el aumentador de SV40, presentaron una expresión abundante. Este resultado también sugiere que hasta -2 kb no existen elementos "silenciadores" que restrinjan la expresión en tipos celulares que normalmente no expresan la enzima.

**2.- La regulación de la expresión específica en el epitelio del estómago y del pulmón esta dada por la combinación de dos elementos.**

Como se mencionó anteriormente, el mejor sistema de análisis para localizar las regiones que controlan la expresión adecuada de un gen es el de los animales transgénicos. El análisis realizado en el presente trabajo con este enfoque, nos permitió describir por primera vez la expresión de la FATN en el epitelio del estómago y del pulmón, así como, localizar las regiones de control que determinan la expresión de esta enzima en los mismos. Dado que no se había reportado expresión de esta enzima en estos órganos con anterioridad, al inicio de nuestro análisis esta expresión se consideró como ectópica. Sin embargo, dada la reproducibilidad del patrón en ensayos posteriores, esta expresión posiblemente se debía a la ausencia de un elemento silenciador para estos tejidos o a una expresión aún no descrita. Para discernir entre estas posibilidades, se analizó la actividad enzimática de FA asociada a estos tejidos por medio de una técnica histoquímica, lo que nos permitió demostrar que el epitelio del estómago y del pulmón de embriones de 12.5 dpc, presentan

actividad de FA. Con seguridad, esta actividad corresponde a la de la expresión del *FATN* ya que, como se ha demostrado con anterioridad (Hahnel et al, 1990) la única isoforma que se expresa en el embrión de esa edad es la *FATN*. Nuestros resultados contradicen, en cierto sentido, algunos de los resultados obtenidos por MacGregor et al (1995). En dicho trabajo, donde se interrumpió de manera dirigida el gen del *FATN* con *lacZ*, el gen reportero se encuentra dirigido por "todos" los elementos regulatorios del *FATN*, lo que les permitió observar, mediante el ensayo de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, el patrón de expresión de *TNAP* durante el desarrollo. Dentro del patrón reportado por ellos, no se observó expresión en el estómago o el pulmón, y solo en algunos casos se logró observar una tenue tinción en la cresta ectodérmica apical de los miembros en desarrollo (MacGregor, com. per.). Es posible que no se haya descrito la expresión en el estómago por confundirse con la expresión que tiene esta enzima en el intestino durante la etapa embrionaria. En cuanto a la ausencia de expresión en el pulmón, así como también en la cresta ectodérmica apical, es posible que la expresión del reportero en estos tejidos sea muy baja por lo que no logró observarse con la tinción para  $\beta$ -galactosidasa. En nuestro caso, la falta de un contexto cromosomal adecuado pudiera explicar la fuerte expresión del reportero en los animales transgénicos.

Como se mencionó con anterioridad, la expresión específica en el epitelio del estómago y del pulmón parece estar determinada por la combinación de dos elementos, uno localizado en la región proximal del promotor y otro distal en el fragmento comprendido entre -4.5 y -5.5 kb. Aunque desconocemos la localización exacta y la secuencia de estos posibles elementos es notorio que dentro de las 1.9 kb del promotor proximal se encuentra una secuencia que tiene homología con el elemento enhancer específico de tiroides y pulmón (Francis-Lang et al, 1992). A este sitio se une el factor de transcripción TTF-1 cuya expresión en el pulmón es precisamente en el epitelio de este órgano. Al parecer este factor no se expresa en el epitelio del estómago aunque no se descarta que algún factor de la familia se exprese en este tejido. Aunque las evidencias sugieren que el elemento similar al sitio de unión del TTF-1 encontrado en el promotor 1A del gen de la *FATN* pudiera determinar la especificidad de la expresión al menos en el epitelio del pulmón, una forma de corroborarse es por medio de la mutagénesis dirigida de este elemento, con la consecuente pérdida de su función.

El análisis de la secuencia del fragmento comprendido entre -4.5 y -5.5 kb no reveló la presencia de algún elemento de unión para un factor de transcripción conocido, específico de estómago y pulmón. Es posible que en este fragmento se encuentren elementos que aún no hayan sido descritos; de forma alternativa, elementos de unión a factores de transcripción no tan generales, en conjunción con él (o los) elemento proximal, pueden ser los responsables de la expresión específica en el epitelio de estos órganos. No es infrecuente, encontrar en la literatura ejemplos en los que la expresión tejido específica esta determinada por la combinación de elementos distantes. Esto nos demuestra la modularidad de los elementos regulatorios y la gran complejidad de los mecanismos de regulación de la expresión génica.

## **B) REGULACION DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL *FATN* POR AR Y METILACION: IMPLICACIONES BIOLÓGICAS**

### **1.- Regulación por AR.**

AR es un morfógeno implicado en una gran variedad de procesos durante el desarrollo. Aunque es conocido que el AR activa la transcripción del *FATN* en diversas líneas celulares, a la fecha se desconoce a ciencia cierta el papel funcional que tiene la activación de la transcripción de esta enzima por AR en el organismo completo. La distribución del AR en embriones de diferentes etapas se ha determinado, de manera indirecta, de dos formas. La primera, en animales transgénicos, por medio de la activación transcripcional producida por el AR endógeno sobre una construcción reportera que contiene varios ERAR (Rossant et al, 1991), y la segunda, por la distribución, en el embrión, de la enzimas involucradas en la biosíntesis de AR como lo es la alcohol deshidrogenasa (Zgombic-Knigh et al, 1994). Es interesante notar que, de todas las regiones en las que se ha inferido la presencia de AR, algunas de estas coinciden con la expresión de la *FATN*, como son: la masa celular interna y el trofoblasto del blastocisto (4.0 dpc), la región de la línea primitiva y la región posterior del embrión (7.5 dpc), la región de la mandíbula y maxila (12 dpc), la porción basal del tubo neural, la cresta ectodérmica apical de la extremidades y el estómago. Varias de estas regiones estan implicadas en procesos morfogenéticos fundamentales como por ejemplo, la región de la línea primitiva es la zona del

embrión donde ocurre el proceso de gastrulación, o la cresta ectodérmica apical, que es fundamental para la morfogénesis de las extremidades. De aquí que durante mucho tiempo se pensó que la expresión de la FATN pudiera tener un papel importante en diversos procesos morfogénéticos. Sin embargo, embriones mutantes en esta enzima no presentan ningún efecto en su desarrollo embrionario (MacGregor et al, 1995), por lo que existe la posibilidad de que el patrón de expresión de la FATN sea un efecto secundario de la señalización del AR. Esta última idea es importante, ya que recientemente se han realizado esfuerzos para tratar de identificar genes importantes en diversos procesos morfogénéticos por su respuesta a AR (Forrester et al, 1996). En este sentido, la respuesta a AR no sería una garantía para identificar genes importantes en dichos procesos.

De las dos funciones bien establecidas para la FATN, su participación en el metabolismo de la vitamina B6 y en el proceso de osificación, es en esta última en la que probablemente el AR participa de una forma activa. *In vitro*, el AR tiene la capacidad de inducir la expresión de FATN y de aumentar otras características del fenotipo osteoblástico en células pre-osteoblásticas (el aumento en los niveles del mRNA de procólageno tipo I y la elevación de la respuesta a PTH; Heath et al, 1989). *In vivo* el AR pudiera estar participando en la diferenciación de las células osteoblásticas, e indirectamente, en la osificación a través de la activación de la expresión del *FATN*. Una evidencia que apoya esta hipótesis es el hecho de que la aplicación en pollo de inhibidores de la síntesis de AR, como el citral, tiene como efecto malformaciones en el esqueleto (Abramovici, 1972).

## 2.- El papel de la metilación

La metilación de secuencias de DNA correlaciona con la inactividad de una gran variedad de genes. Por este motivo, se ha considerado a la metilación del DNA como un mecanismo crítico en el control de la expresión génica. Sin embargo, es poco lo que se sabe de posibles elementos en *cis* que regulen este proceso. Por ejemplo, se han descrito fragmentos de la región de control del gen de la adenina fosforibosiltransferasa que son capaces de promover metilación *de novo* en secuencias aledañas, pero sin atribuir la función a un elemento en particular ("centros de metilación *de novo*"; Mummaneni et al, 1993).

Recientemente, Hassse y Shulz (1994), atribuyeron una función similar, en ensayos *in vitro*, a un tipo particular de elementos presentes en la región de control del gen de la fetoproteína alfa. Estos autores encontraron que una actividad de metilación *de novo* se encontraba asociada a fragmentos que contenían secuencias repetidas B1 y B2, siendo los fragmentos que contenían una B2 los que conferían el efecto más pronunciado. Nuestros resultados apoyan un papel directo de las B2 en la promoción de la metilación *de novo in vivo* (en animales transgénicos). Si bien el fragmento (-5.5 y -4.5 kb) con la secuencia similar a una repetida B2 encontrada es capaz de promover metilación *de novo*, parece haber otra región adicional, hacia arriba de -5.5 kb, que también promueve metilación. Con ensayos de hibridación tipo Southern, se determinó que arriba de -5.5 kb y hasta -8.8 kb, no se encuentran secuencias tipo B2 adicionales (datos no mostrados). Por lo tanto, el elemento adicional que promueve metilación *de novo*, podría ser a una repetida B1, o bien otro tipo de elemento aun no identificado que tenga la misma función. El papel de estos elementos en la metilación *de novo* es relevante desde el punto de vista del conocimiento de los diversos mecanismos de regulación transcripcional. Tradicionalmente se había pensado que la metilación *de novo* ocurre de manera inespecífica, y que puede ser más bien una consecuencia de los cambios en la cromatina asociados a la inactivación génica (Cedar y Razin, 1990). Nuestros resultados, aunados a los de los otros autores, sugieren que la función de los mencionados elementos repetidos pudieran participar en la regulación de la transcripción, promoviendo metilación *de novo* de una manera activa y específica. Dada la existencia de elementos que promueven metilación *de novo*, también se puede predecir la existencia de señales o elementos que regulen la extensión de la metilación y/o que promuevan la desmetilación de manera específica. De esta manera, el equilibrio entre la acción de las señales que promueven metilación y las que promueven desmetilación tendrá un efecto neto en los niveles, la especificidad y la temporalidad de la expresión de un gen.

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de metilación del DNA puede ser un evento importante en la regulación de la transcripción del *FATN*. La expresión de esta enzima en diversos tejidos durante el desarrollo embrionario, y particularmente en las CGP, puede reflejar la fuerte dependencia del estado de metilación en la regulación de su expresión. Estudios de

Recientemente, Hassse y Shulz (1994), atribuyeron una función similar, en ensayos *in vitro*, a un tipo particular de elementos presentes en la región de control del gen de la feto-proteína alfa. Estos autores encontraron que una actividad de metilación *de novo* se encontraba asociada a fragmentos que contenían secuencias repetidas B1 y B2, siendo los fragmentos que contenían una B2 los que conferían el efecto más pronunciado. Nuestros resultados apoyan un papel directo de las B2 en la promoción de la metilación *de novo in vivo* (en animales transgénicos). Si bien el fragmento (-5.5 y -4.5 kb) con la secuencia similar a una repetida B2 encontrada es capaz de promover metilación *de novo*, parece haber otra región adicional, hacia arriba de -5.5 kb, que también promueve metilación. Con ensayos de hibridación tipo Southern, se determinó que arriba de -5.5 kb y hasta -8.8 kb, no se encuentran secuencias tipo B2 adicionales (datos no mostrados). Por lo tanto, el elemento adicional que promueve metilación *de novo*, podría ser a una repetida B1, o bien otro tipo de elemento aun no identificado que tenga la misma función. El papel de estos elementos en la metilación *de novo* es relevante desde el punto de vista del conocimiento de los diversos mecanismos de regulación transcripcional. Tradicionalmente se había pensado que la metilación *de novo* ocurre de manera inespecífica, y que puede ser más bien una consecuencia de los cambios en la cromatina asociados a la inactivación génica (Cedar y Razin, 1990). Nuestros resultados, aunados a los de los otros autores, sugieren que la función de los mencionados elementos repetidos pudieran participar en la regulación de la transcripción, promoviendo metilación *de novo* de una manera activa y específica. Dada la existencia de elementos que promueven metilación *de novo*, también se puede predecir la existencia de señales o elementos que regulen la extensión de la metilación y/o que promuevan la desmetilación de manera específica. De esta manera, el equilibrio entre la acción de las señales que promueven metilación y las que promueven desmetilación tendrá un efecto neto en los niveles, la especificidad y la temporalidad de la expresión de un gen.

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de metilación del DNA puede ser un evento importante en la regulación de la transcripción del *FATN*. La expresión de esta enzima en diversos tejidos durante el desarrollo embrionario, y particularmente en las CGP, puede reflejar la fuerte dependencia del estado de metilación en la regulación de su expresión. Estudios de

expresión bialélica sugieren que las CGP del ratón comienzan el borrado de su programa de improntas \* en el genoma alrededor del día 7.5 dpc y es finalizado a los 12.5 dpc (Szabó y Mann, 1995). Un nuevo programa de improntas comienza a reestablecerse de los 15.5 dpc en adelante (Kafri et al, 1992). La expresión de la FATN en las CGP presenta una correlación inversa con el grado de metilación (Fig. 7). Con base en lo anterior, proponemos que una vez que se activa el mecanismo de desmetilación del DNA para el borrado del programa de improntas en las CGP, este tiene como efecto la desmetilación de regiones de activación en el *FATN*. El efecto secundario de este evento es, por lo tanto, la activación de la transcripción de este gen.

Otro grupo de evidencias que apoyan esta hipótesis es la correlación que existe entre el grado de metilación y la expresión de esta enzima en otros tejidos embrionarios. Como se mencionó anteriormente, la FATN se expresa en el blastocisto y en embriones antes de la gastrulación con una distribución amplia. En el blastocisto, en general el DNA se encuentra desmetilado, y este estado se invierte gradualmente antes de la gastrulación por lo que, conforme avanza el desarrollo, los diferentes tejidos somáticos van obteniendo un nivel de metilación *de novo* de acuerdo a la expresión diferencial y alélica de su genoma. Entonces es probable que el patrón de expresión del *FATN* durante el desarrollo sea en parte un reflejo del equilibrio entre los mecanismos de metilación y desmetilación presentes en cada tejido. Adicionalmente, líneas celulares de origen embrionario que expresan la FATN, como son las ES (derivadas de la masa celular interna del blastocisto) o las EG (derivadas de células germinales primordiales), también poseen un bajo nivel de metilación en su DNA (ver discusión, publicación 1).

Las ES y las EG, y en cierto sentido las CGP, comparten la característica de la totipotencialidad (capacidad de dar lugar a un nuevo organismo). Pareciera existir pues, una correlación entre el grado de potencialidad y el grado de metilación del DNA. Entonces la potencialidad de una célula pudiera estar modulada por un equilibrio entre los mecanismos de metilación-desmetilación del DNA, el cual se encontraría desplazado hacia la metilación mientras menos totipotencial sea una célula. Aquí cabría preguntar entonces:

\* El programa de improntas en el genoma ('imprinting') se conoce como la serie de huellas, (e.g. metilación) que determinan la expresión parental específica (monoalélica) de diversos genes.

Edad (dpc)	7.5	12.5	14.5	15.5	18.5
Expresión FATN	+	++	++	+	-
Nivel de Metilación	-?	-	-	+/-	+

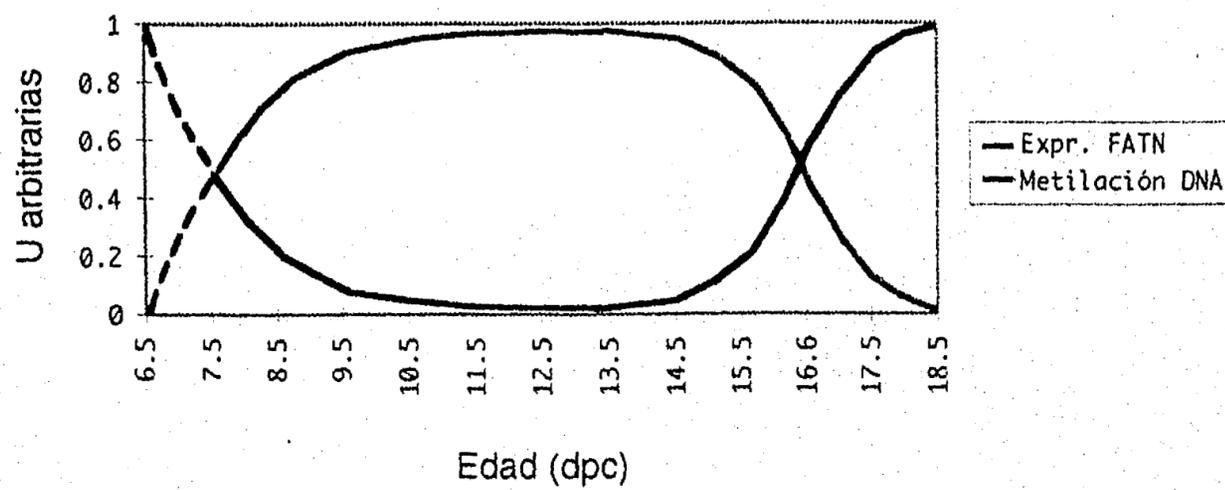


Figura 7. La expresión de la FATN en las CG durante la vida embrionaria, coincide con la disminución del nivel de metilación de su DNA.

Edad (dpc)	7.5	12.5	14.5	15.5	18.5
Expresión FATN	+	++	++	+	-
Nivel de Metilación	-?	-	-	+/-	+

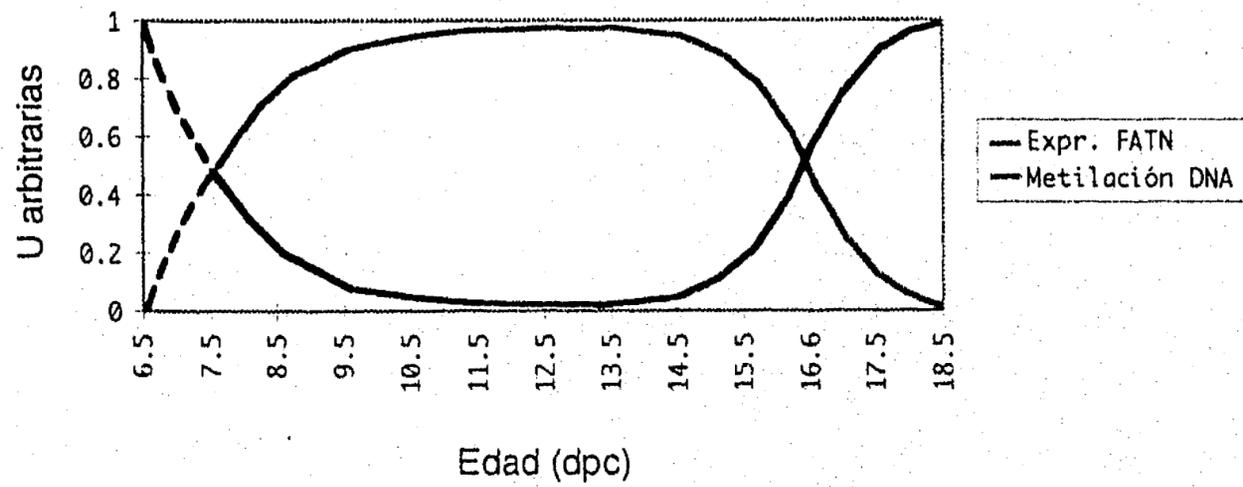


Figura 7. La expresión de la FATN en las CG durante la vida embrionaria, coincide con la disminución del nivel de metilación de su DNA.

¿Toda célula con un bajo nivel de metilación expresaría FATN y se comportaría como una célula embrionaria? Aunque no existe una respuesta certera a esta pregunta es notorio que las células tumorales, que en muchos casos se comportan como células embrionarias, expresan ésta y/o alguna otra isoforma de FA y, además, presentan un grado de metilación de DNA menor al de las células normales (ver discusión, publicación 1).

En el humano, el monitoreo de la actividad de FA sérica o la fracción que contiene la FATN, se emplea como parte de un grupo de pruebas bioquímicas que indican el estado de una enfermedad tumoral o de un proceso de metástasis. En el caso particular de la FATN, ésta normalmente no se emplea como marcador de una malignidad primaria debido a su naturaleza ubiqa, sin embargo, su elevación confirma el diagnóstico de un proceso tumoral. Otras de las isoformas del humano como la de placenta o la de célula germinal, también son empleadas como indicadores de la malignidad de un tumor. Desde hace mucho tiempo varios autores se han preguntado sobre el papel que juega la expresión de esta enzima en el proceso tumoral; se había llegado a pensar que la expresión de esta enzima era uno de los eventos primarios que originan la expresión del fenotipo tumoral o transformado (revisado en Millán y Fishman, 1995). Sin embargo, a la luz de nuestros hallazgos, es posible sugerir que la expresión de esta enzima en las células tumorales sea un efecto secundario del evento de transformación. El desequilibrio en el mecanismo de metilación de las células tumorales, probablemente afecte la regulación de la transcripción de muchos genes, siendo el del *FATN* uno de los genes blanco. Esta hipótesis puede no ser aplicable a todas las isoformas de FA del humano, por lo que sería muy interesante establecer si estas también son reguladas negativamente por metilación. Estudios de evolución molecular pudieran sugerir que algunos de los mecanismos de regulación están conservados (Manes et al, 1990).

Con base en el porcentaje de homología entre las diferentes isoformas del humano y su distribución en el organismo, se ha propuesto que el gen de la FATN es al parecer el más antiguo y que de la duplicación de éste se derivó una isoforma tejido específica, de la cual se originaron las otras isoformas tejido específicas (Harris, 1982); lo mismo parece ocurrir para el caso de las isoformas del ratón (Manes et al, 1990). Como se había mencionado con anterioridad, el promotor del exon 1A del *FATN* comparte algunas características de los genes

de mantenimiento, y cabe señalar que la distribución de esta enzima es mucho mas amplia que las de los genes tejido específicos. Pudiera ser que el *FATN* en su origen funcionara como un gen de mantenimiento, y que actualmente su distribución en el embrión sea un reflejo de la activación por AR, en combinación con el equilibrio entre el mecanismo de metilación-desmetilación activado en cada tejido o tipo celular. El por qué no se contraseleccionaron estos mecanismos de regulación, se puede explicar por la conveniencia de una expresión ampliamente distribuida para el metabolismo del fosfato de piridoxal, aunado a la ausencia de un efecto negativo de la expresión de esta enzima durante el desarrollo.

### **C) ALTERNATIVAS PARA GENERAR LÍNEAS INMORTALES DE CG.**

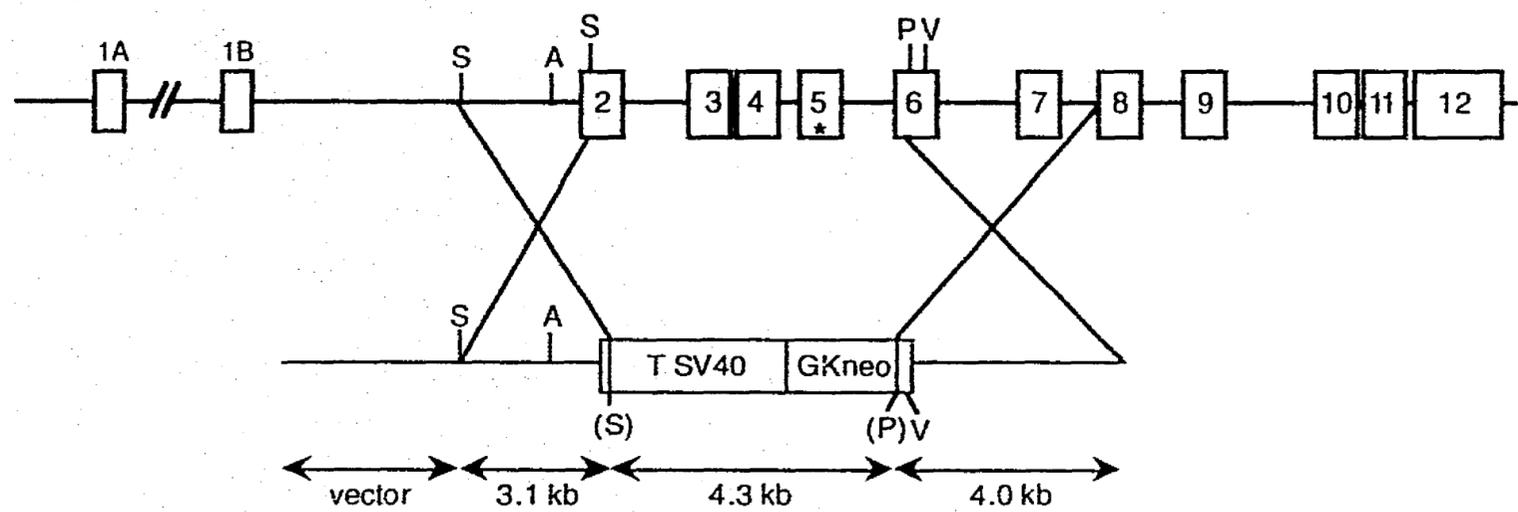
La generación de líneas inmortales ha sido una herramienta de gran impacto para el estudio de los diferentes procesos involucrados en la diferenciación de diversos tipos celulares (Frederiksen et al, 1988; Windle et al, 1990). La inmortalización de un tipo celular dado, se puede obtener mediante la introducción de un gen cuyo efecto en la maquinaria celular es el de mantener a las células dividiéndose de forma indefinida, y el de mantenerlas congeladas en el estado de diferenciación en el que se introdujo el gen.

Una de las maneras de realizar una inmortalización dirigida a un tipo celular en particular es mediante la expresión dirigida de un gen inmortalizante, por transfección *in vitro* de un tipo celular particular o en animales transgénicos, usando la región regulatoria de un gen que se exprese en el tipo celular de interés (Hanahan D, 1989). Esta última era precisamente la estrategia que habíamos planteado para inmortalizar a las CGP, utilizando la región de control de la transcripción del *FATN*. Sin embargo, dado que no se logró determinar un fragmento del promotor del exon 1A de la *FATN* que permitiera la expresión en CGP, es necesario encontrar una manera alternativa para dirigir la expresión del gen inmortalizante.

Una posibilidad es la introducción del gen inmortalizante en un locus particular, a manera de lograr una expresión específica en CGP. Brevemente, el gen inmortalizante se introduciría en células ES, por medio de recombinación homóloga, en el locus del *FATN*, lo que haría su expresión dependiente de

todos los elementos regulatorios endógenos del *FATN*. Posteriormente, las células ES recombinantes se emplearían para formar ratones quiméricos (los cuales se establecen mediante la microinyección de las células ES en blastocistos tipo silvestre). De los individuos desarrollados se seleccionarían aquellos individuos donde las células ES fueron capaces de contribuir a la línea germinal y de transmitir la modificación de su genoma a su descendencia. De esta manera se puede establecer una línea de ratones transgénicos (generación F1) donde todas sus células portan la inserción del gen inmortalizante en el locus del *FATN*. De embriones derivados de esta línea se podrían recuperar CGP de embriones de diferentes etapas del desarrollo embrionario para establecer líneas inmortales. Actualmente hemos construido un vector base que nos permitirá introducir diversos genes heterólogos en el locus del *FATN* (Fig. 8), el cual está basado en el vector de recombinación empleado por MacGregor et al (1995) para realizar la mutación dirigida de dicho gen.

Dado que las CGP no son el único tipo celular que expresa *FATN*, es necesario, para garantizar el éxito de la estrategia arriba mencionada, utilizar genes inmortalizantes que sean inactivos en el animal intacto para evitar efectos indeseables. Uno de los agentes inmortalizantes condicionales más empleados es la versión termosensible del antígeno T de SV40, que es inactivo a la temperatura corporal del animal y es activo a 32 °C (Jat y Sharp, 1989). De esta forma se pueden recuperar CGP de los embriones transgénicos, que al ser cultivadas a la temperatura permisiva (32 °C), éstas pueden eventualmente establecer líneas inmortales. Como alternativa se pueden emplear genes inmortalizantes fusionados a un dominio de unión a hormonas esteroides para hacer su función dependiente de hormonas. Recientemente se reportó la fusión de la proteína c-myc con un receptor de estrógenos modificado que tiene poca afinidad por estrógenos, pero tiene una elevada afinidad por el ligando sintético 4-hidroxitamoxifen (Littlewood et al, 1995). Entre las ventajas que presenta esta proteína de fusión es que es incapaz de activarse por los niveles de estrógeno circulantes en la sangre y que carece de actividad de transactivación dependiente de ligando por lo que no contribuye a la actividad transcripcional de la proteína de fusión (Littlewood et al, 1995). En este caso las CGP obtenidas de los embriones transgénicos se podrían inmortalizar al adicionar al medio de cultivo 4-hidroxitamoxifen, con la consecuente activación de la proteína de



51

Figura 8. Construcción para recombinación homóloga en el locus del *FATN*. En la parte superior se muestra un esquema del locus del *FATN*. En la parte inferior se muestra el esquema de la construcción base para la recombinación homóloga. En este caso se ejemplifica la construcción con el gen inmortalizante antígeno T de SV40 (T SV40) y el gen de selección neo dirigido por el promotor de GK (GKneo). Las regiones genómicas recombinantes corresponden a las 3.1 kb hacia arriba del atg, ubicado en el exon 2, y 4.0 kb que comprenden parte del exon seis y hasta antes del exon 8. En este caso el alelo recombinante tendrá una reducción de alrededor 1.0 kb. S=Sca I, A=Afl II, P=Pvu II, V= EcoR V.

fusión.

Dado que existe la posibilidad de que la inmortalización altere a las CGP, es necesario establecer estrategias alternativas que permitan mantenerlas en cultivo, por períodos que permitan realizar ensayos o manipulaciones experimentales. Una posibilidad es expresar en éstas, un gen cuyo producto evite la apoptosis sufrida por la carencia de factores de sobrevivencia adecuados.

Si bien se han identificado factores que promueven la sobrevivencia de CGP de edades específicas (8.5-10.5 dpc), aún no se han encontrado las condiciones adecuadas para mantener CGP de otras etapas. La expresión dirigida ( por recombinación homóloga en el locus del *FATN*) de por ejemplo *bcl-2* o *bclx<sub>L</sub>* (proteínas que evitan la apoptosis; Boise et al, 1993; García et al, 1992), podría permitir establecer sistemas de ensayo adecuados para las CGP. A esta estrategia se le puede agregar una variante adicional que permitiría seleccionar poblaciones 100% puras de CGP. En un protocolo de recombinación homóloga, generalmente se adiciona a la construcción un gen que confiere resistencia a un antibiótico (e.g. *neo* ), cuya expresión permite seleccionar a las células que integraron la construcción; normalmente el gen de selección se encuentra dirigido por un promotor general. La modificación a esta estrategia consiste en la expresión de *bcl-2* o *bclx<sub>L</sub>* y *neo* dirigidos por los elementos regulatorios del *FATN*. De esta manera, solo las células que expresan la *FATN* serían resistentes al antibiótico, por lo que las células somáticas contaminantes en una purificación de CGP se descartarían al adicionar el antibiótico al medio de cultivo. La expresión de ambos genes por una región de control común se logra transcribiendo ambos genes de manera dicistrónica, introduciendo, entre ambos genes, el sitio de entrada interna de ribosomas (IRES, internal ribosome entry site) para que se traduzcan los productos independientemente (Mountford et al, 1994).

#### D) ALTERNATIVAS PARA ESTUDIAR LAS CGP DESDE EL PUNTO DE VISTA MOLECULAR.

Estudiar la biología de las células germinales primordiales ha sido una empresa difícil por las limitantes metodológicas que impone este tipo celular. El abordar diferentes aspectos de la biología de las CGP mediante el estudio y manipulación de líneas inmortales de CGP parece la estrategia más atractiva y de la que probablemente se podrían obtener respuestas relevantes. Sin embargo, existe el riesgo de que la expresión de genes inmortalizantes en este tipo celular tenga efectos que interfieran con su estudio. Por esto, es necesario establecer diversas estrategias que permitan abordar el estudio de diferentes aspectos de su biología de manera simultánea. Existen varios enfoques experimentales que se pueden aplicar al estudio de estos aspectos, de hecho algunos de estos empiezan a ser aplicados en nuestro laboratorio. A continuación se plantean dichas estrategias y los aspectos que pueden ser abordados con las mismas.

Una de las preguntas más intrigantes en el estudio de las CGP es precisamente ¿que determina sus propiedades tan particulares (memoria de la totipotencialidad, realizar el proceso de la meiosis)? Existen varias estrategias establecidas hoy día que permiten identificar genes que se expresan de manera diferencial entre dos linajes celulares, poblaciones de un mismo linaje o células en diferente etapa de desarrollo. Por ejemplo, sería posible identificar genes que se expresen específicamente en la línea germinal, que genes son característicos entre CGP de diferente sexo, o bien que genes se expresan diferencialmente en ovogonias o proespermatogonias de diferentes etapas del desarrollo. Sería de gran relevancia establecer ¿cuales son las modificaciones moleculares que sufren las ovogonias de 12.5 dpc para iniciar el proceso de la meiosis a los 13.5 dpc?; ¿o cuales son los eventos moleculares que detienen a las proespermatogonias en reposo mitótico durante el desarrollo embrionario?

Técnicas como el desplegado diferencial ("differential display") de productos de amplificación de mRNA (Liang y Pardee, 1992; Liang et al, 1993) o el análisis de bancos de expresión sustraídos (Ghosh, 1996) son dos de las estrategias experimentales que permitirían abordar algunas de estas preguntas. Sin embargo, estas estrategias requieren de partir de poblaciones muy puras de

las células a ensayar. No ha sido sino hasta muy recientemente que se ha logrado establecer un sistema de purificación sencillo, rápido, de gran rendimiento y eficiencia de purificación de CGP (Pesce y De Felici, 1995). Este sistema ha sido montado en nuestro laboratorio para purificar CGP de 11.5 dpc, ovogonias y m-proespermatogonias de 12.5 dpc y el RNA de estas poblaciones celulares se ha empleado para realizar ensayos de desplegado diferencial de CG de ambos sexos.

Otra forma de conocer más sobre los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación de las CGP es el tamizado de moléculas ya conocidas que pudieran tener un papel importante en eventos particulares. Un ejemplo son las moléculas que están involucradas en la regulación del ciclo celular. Como se mencionó en la introducción dos de los eventos más significativos de la diferenciación de las CGP durante la etapa embrionaria están relacionados al control de su conducta proliferativa: el inicio de la meiosis en las CG femeninas y el arresto mitótico en las masculinas. Si bien es evidente que en la regulación de estos eventos deben estar relacionadas moléculas del ciclo celular, hasta la fecha se desconoce cuáles y cómo es que estas moléculas controlan dichos eventos de diferenciación.

Para el inicio de la meiosis es muy probable que se comparta parte de la maquinaria que se emplea para la división mitótica. Sin embargo, dado que el primer proceso tiene particularidades, también es de esperar que la maquinaria celular requiera de condiciones muy particulares, o incluso de la intervención de moléculas no descritas. Como ejemplo, habría que mencionar que en la línea germinal, en la etapa posnatal, se ha descrito en el ratón un grupo de ciclinas (de los tipos A, B y D) que únicamente se expresan en etapas específicas de la diferenciación de este tipo celular (Chapman y Wolgemuth, 1992; Chapman y Wolgemuth, 1993; Ravnik et al, 1995; Sweeney et al, 1996). En las proespermatogonias se desconoce cuál es el mecanismo por el que estas entran en arresto mitótico. A este respecto es posible que parte del mecanismo sea mediado por las proteínas inhibitorias de cinasas dependientes de ciclinas de G1 (Sherr y Roberts, 1995). Dentro de estas, p27<sup>Kip1</sup> y p21<sup>Cip1</sup> pudieran ser fuertes candidatos ya que estas parecen mediar el arresto del ciclo debido a estímulos externos (Polyak et al, 1994; Datto et al, 1995). Es probable que las diferencias existentes no se deban a cambios cualitativos en las moléculas que

controlan en ciclo celular, sino a cambios cuantitativos o modificaciones de la actividad de éstas. En este caso, el enfoque del tamizado de moléculas del ciclo, puede no dar información relevante, por lo que deben establecerse estrategias para ensayar experimentalmente la posible participación de algunas de estas moléculas. Con base en lo anterior, hemos planeado ensayar en cultivo, el efecto que pudiera tener el bloquear la función de p27<sup>Kip1</sup> y p21<sup>Cip1</sup> en CGP de 12.5 dpc mediante el uso de oligonucleótidos antisentido.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Si bien no fue posible encontrar dentro de la región promotora del *FATN* analizada elementos que nos permitieran expresar genes heterologos en CG, el análisis realizado nos permitió identificar un elemento de respuesta a ácido retinóico y un elemento (por vez primera) que promueve metilación *de novo*. Nuestros hallazgos sugieren que el patrón de expresión del *FATN* durante el desarrollo embrionario del ratón puede deberse a la respuesta a AR y al grado de metilación particular de cada tipo celular.

Una manera de probar el papel del AR en la expresión de este gen, durante el desarrollo embrionario, consiste en el tratamiento de hembras gestantes con AR. El resultado esperado, sería la sobre-expresión o la expresión ectópica del gen en los embriones tratados. Para el caso de la metilación se puede predecir que la mutación dirigida del gen de la 5-citosina metil transferasa de DNA (CMT), debiera también tener el efecto de sobre-expresión o expresión ectópica del *FATN*. De hecho, ahora sabemos (MacGregor com. per.) que efectivamente la mutación dirigida de este gen tiene como efecto la aparición de actividad de FA, de manera ectópica, en la región del alantoides. Actualmente trabajamos en un diseño experimental basado en el tratamiento de hembras gestantes con 5-azacitidina (un agente que inhibe a la CMT), que tiene como efecto la disminución neta del grado de metilación del DNA. El efecto de este tratamiento debería tener también como consecuencia la sobre-expresión o expresión ectópica del *FATN*. Estos datos apoyarían fuertemente que la expresión del *FATN* depende en gran medida de la metilación de secuencias reguladoras.

controlan en ciclo celular, sino a cambios cuantitativos o modificaciones de la actividad de éstas. En este caso, el enfoque del tamizado de moléculas del ciclo, puede no dar información relevante, por lo que deben establecerse estrategias para ensayar experimentalmente la posible participación de algunas de estas moléculas. Con base en lo anterior, hemos planeado ensayar en cultivo, el efecto que pudiera tener el bloquear la función de p27<sup>Kip1</sup> y p21<sup>Cip1</sup> en CGP de 12.5 dpc mediante el uso de oligonucleótidos antisentido.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Si bien no fue posible encontrar dentro de la región promotora del *FATN* analizada elementos que nos permitieran expresar genes heterólogos en CG, el análisis realizado nos permitió identificar un elemento de respuesta a ácido retinóico y un elemento (por vez primera) que promueve metilación *de novo*. Nuestros hallazgos sugieren que el patrón de expresión del *FATN* durante el desarrollo embrionario del ratón puede deberse a la respuesta a AR y al grado de metilación particular de cada tipo celular.

Una manera de probar el papel del AR en la expresión de este gen, durante el desarrollo embrionario, consiste en el tratamiento de hembras gestantes con AR. El resultado esperado, sería la sobre-expresión o la expresión ectópica del gen en los embriones tratados. Para el caso de la metilación se puede predecir que la mutación dirigida del gen de la 5-citosina metil transferasa de DNA (CMT), debiera también tener el efecto de sobre-expresión o expresión ectópica del *FATN*. De hecho, ahora sabemos (MacGregor com. per.) que efectivamente la mutación dirigida de este gen tiene como efecto la aparición de actividad de FA, de manera ectópica, en la región del alantoides. Actualmente trabajamos en un diseño experimental basado en el tratamiento de hembras gestantes con 5-azacitidina (un agente que inhibe a la CMT), que tiene como efecto la disminución neta del grado de metilación del DNA. El efecto de este tratamiento debería tener también como consecuencia la sobre-expresión o expresión ectópica del *FATN*. Estos datos apoyarían fuertemente que la expresión del *FATN* depende en gran medida de la metilación de secuencias reguladoras.

Por otro lado, dado que pensamos que la generación de líneas inmortales puede ser una herramienta importante para abordar muchas preguntas relacionadas con la diferenciación de las CGP, continuaremos los esfuerzos encaminados a generar dichas líneas por medio de la expresión dirigida de genes inmortalizantes. De manera paralela, se continuarán varios protocolos experimentales diseñados para estudiar la diferenciación de este tipo celular desde el punto de vista molecular.

## REFERENCIAS

Abramovici A (1972). The teratogenic effect of cosmetic constituents on the chick embryo. *Adv Exp Med Biol* 27:162-174.

Bernard O, Reid HH y Bartlett PF (1989). Role of the *c-myc* and the *N-myc* proto-oncogenes in the immortalization of neural precursors. *J Neurosci Res* 24:9-20.

Berverley PCL, Linch D and Delia D (1980) Isolation of human haematopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies. *Nature* 287:332-333.

Boise LH, González-García M, Postema C, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G y Thompson CB (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.

Cedar H y Razin A (1990). DNA methylation and gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1049:1-8.

Chapman DL y Wolgemuth DJ (1992). Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line. *Mol Reprod Dev* 33:259-269.

Chapman DL y Wolgemuth DJ (1993). Isolation of the murine cyclin B2 cDNA and characterization of the lineage and temporal specificity of expression of the B1 and B2 cyclins during oogenesis, spermatogenesis, and early embryogenesis. *Development* 118:229-240.

Chiquoine AD (1954). The identification, origin and migration of the primordial germ cells of the mouse embryo. *Anat Rec* 118:135-146.

Cuervo R (1996). Purificación biomagnética de células germinales primordiales de ratón. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana.

Caswell AM, Whyte MP y Russell RGG (1991). Hypophosphatasia and the extracellular metabolism of inorganic pyrophosphate: clinical and laboratory aspects. *Crit Rev clin Lab Sci* 28:175-232.

Chang WS, Serikawa K, Allen K y Bently D (1992). Expression of epithelial alkaline phosphatase in segmentally iterated bands during grasshopper limb morphogenesis. *Development* 118:651-663.

Clark JM y Eddy EM (1975). Fine structural observations on the origins and associations of primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 47:136-155.

Cooke JE, Heasman J y Wylie C. (1996). The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev Biol* 174:14-21

Coucovanis EC y Jones P (1993) Changes in protooncogene expression correlated with general and sex-specific differentiation in murine primordial germ cells. *Mech Dev* 42:49-58.

Coucovanis E, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG y Jones P (1993). Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 209:238-247.

Datto M, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y y Wang X (1995). Transforming growth factor  $\beta$  induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5545-5549.

De Felici M, Dolci S y Pesce M (1993). Proliferation of mouse primordial germ cells *in vitro*: a key role for cAMP. *Dev Biol* 157:277-280.

Dolci S y De Felici M (1990) A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads. *Development* 109:37-40.

Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS y Donovan PJ (1991). Requirement for cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352:809-811.

Dolci S, Pesce M y De Felici M (1993). Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on *in vitro* proliferation of mouse primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 35:134-139.

Donovan PJ, Stott D, Godin I, Heasman J y Wylie CC (1986). Migratory and post migratory germ cells behave differently in culture. *Cell* 44:831-838.

Eden S y Cedar H (1994). Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Op Genet Dev* 4:255-259.

Enders GC y May II JJ (1994) Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol* 163: 331-340.

Escalanate-Alcalde D y Covarrubias L. Transitory transgenic analysis as an *in vivo* system to study promoter regulatory elements. En: *Microinjection and transgenesis of cultured cells and embryos* (Eds. Cid-Arregí A y García-Carrancá A) Springer. Hidelberg, Alemania. (en prensa)

Fedde KN y Whyte MP (1990). Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isozyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal 5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am J hum Genet* 47:767-775.

Feljen A, Goumans MJ y Eijnden-van Raaij AJM (1994) Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins. *Development* 120:3621-3637.

Forrester LM, Nagy A, Sam M, Watt A, Stevenson L, Bernstein A, Joyner A y Wurst W (1996). An induction gene trap screen in embryonic stem cells: Identification of genes that respond to retinoic acid *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1677-1682.

Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M y Di Lauro R (1992). Cell-type specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expresion. *Mol Cel Biol* 12:576-588.

Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D y McKay R (1988). Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1:439-448.

Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M y Noce T (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12258-12262.

García I, Martinou I, Tsujimoto Y y Martinou JC (1992). Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by Bcl-2 proto-oncogene. *Scienc* 258-302-304.

Ghosh S (1996). A novel mediated-PCR based strategy for construction of substraction libraries from limiting amounts of mRNA. *Nuc Acids Res* 24:795-796.

Gianní M, Studer M, Carpani G, Terao M y Garattini E (1991). Retinoic acid induces liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *Biochem J* 274:673-678.

Gianní M, Terao M, Sozzani S y Garattini E (1993). Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells. *Biochem J* 296:67-77.

Ginsburg M, Snow MHL y McLaren A (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110:521-528.

Godin I, Wylie C y Heasman J (1990). Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108:357-363.

Godin I y Wylie CC (1991) TGF $\beta$ 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113:1451-1457.

Goodrich JA, Cutler G y Tjian R (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interaction in transcription. *Cell* 84:825-830.

Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C and Heasman J (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120:135-141.

Forrester LM, Nagy A, Sam M, Watt A, Stevenson L, Bernstein A, Joyner A y Wurst W (1996). An induction gene trap screen in embryonic stem cells: Identification of genes that respond to retinoic acid *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1677-1682.

Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M y Di Lauro R (1992). Cell-type specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expresion. *Mol Cel Biol* 12:576-588.

Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D y McKay R (1988). Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1:439-448.

Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M y Noce T (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12258-12262.

García I, Martinou I, Tsujimoto Y y Martinou JC (1992). Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by Bcl-2 proto-oncogene. *Scienc* 258-302-304.

Ghosh S (1996). A novel mediated-PCR based strategy for construction of subtraction libraries from limiting amounts of mRNA. *Nuc Acids Res* 24:795-796.

Gianní M, Studer M, Carpani G, Terao M y Garattini E (1991). Retinoic acid induces liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *Biochem J* 274:673-678.

Gianní M, Terao M, Sozzani S y Garattini E (1993). Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells. *Biochem J* 296:67-77.

Ginsburg M, Snow MHL y McLaren A (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110:521-528.

Godin I, Wylie C y Heasman J (1990). Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108:357-363.

Godin I y Wylie CC (1991) TGF $\beta$ 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113:1451-1457.

Goodrich JA, Cutler G y Tjian R (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interaction in transcription. *Cell* 84:825-830.

Gomperts M, García-Castro M, Wylie C and Heasman J (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120:135-141.

Gondos B (1978). En: *The vertebrate ovary* (ed. Jones R) pp 83-120 Plenum Press, New York.

Hahnel AC, Rappolee DA, Millan JL, Manes T, Ziomek CA, Theodosiou NG, Werb Z, Pedersen RA y Schultz GA (1990). Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* 110:555-564.

Hanahan D (1989). Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 246:1265-1275.

Harris H (1982). Multilocus enzyme systems and the evolution of gene expression: the alkaline phosphatases as a model example. *Harvey Lectures* 76:95-124.

Hasse A y Schulz W (1994). Enhancement of reporter gene de novo methylation by DNA fragments from the alpha-fetoprotein control region. *J Biol Chem* 269:1821-1826

Heath JK, Rodan SB, Yoon K y Rodan GA (1989). Rat calvarial cell lines immortalized with SV-40 large T antigen: constitutive and retinoic acid inducible expression of osteoblastic features. *Endocrinology* 124:3060-3068.

Hilscher B y Hilscher W (1978). Some details on the kinetics of oögonia and M-prospermatogonia in NMRI mice in comparison to rat and man. En: *Development and function of reproductive organs*. (Ed. Byskov AG y Peters H) Experta Medica, Amsterdam. 131-139.

Jat PS y Sharp PA (1989). Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol Cell Biol* 9:1672-1681.

Kawase E, Yamamoto H, Hashimoto K y Nakatsuji N (1994). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev Biol* 161:91-95.

Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N y Lovell-Bagde R (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.

Koopman et al (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121.

Koshimizu U, Waranabe M y Nakatsuji N (1995). Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. *Dev Biol* 168:683-685.

Kwong WH y Tam PPL (1984). The pattern of alkaline phosphatase activity in the developing mouse spinal cord. *J Embryol exp Morph* 82:241-251.

Krayev AS, Markusheva TV, Kramerov DA, Ryskov AP, Skryabin KG, Bayev AA y Georgiev GP (1982). Ubiquitous transposon-like repeats B1 and B2 of the mouse genome: B2 sequencing. *Nuc Acids Res* 10:7461-7475.

Lassar A y Münsterberg A (1994) Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. *Curr Op Cell Biol* 6:432-442.

Liang P y Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polimerase chain reaction. *Science* 257:967-971.

Liang P, Averboukh L and Pardee AB (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display. *Nuc Acids Res* 21: 3269-3275.

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG y Evan GI (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nuc Acids Res* 23:1686-1690.

MacGregor GR, Zambrowicz BP y Soriano P (1995). Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121:1487-1496.

Manes T, Glade K, Ziomek CA y Millán JL (1990). Genomic structure and comparison of the mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics* 8:541-554.

McLaren A y Buehr M (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31:185-195.

Merchant-Larios H, Menlovic F y Alvarez-Buylla A (1985). Characterization of alkaline phosphatase from primordial germ cells and ontogenesis of this enzyme in the mouse. *Differentiation* 29:145-151.

Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa SI, Williams D, Zsebo K y Hogan BLM (1991). Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353:750-752.

Matsui Y, Zsebo K y Hogan BLM (1992) Derivation of pluripotent embryonic stem cells from primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847.

McCoshen JA y McCallion DJ (1975). A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia* 31:589-590.

Millán JL y Fishman WH (1995). Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32:1-39.

Mintz B y Russell ES (1957). Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J exp Zool* 134:207-237.

Mori N, Schoenherr C, Vandenberg D y Anderson DJ (1992). A common silencer element in the SCG10 and type II Na<sup>+</sup> channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron* 9:45-54.

Mountford P, Zevnik B, Duwel A, Nichols J, Li M, Dani C, Robertson M, Chambers I y Smith A (1994). Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4303-4307.

Mummanemi P, Bishop PL y Turker M (1993). A cis-acting element accounts for a conserved methylation pattern upstream of the mouse adenine phosphoribosyltransferase gene. *J Biol Chem* 268:552-558.

Münsterberg A y Lovell-Badge R (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113:613-624.

Pesce M, Farrace MG, Piacenti M, Dolci S y De Felici M (1993). Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118:1089-1094.

Pesce M y De Felici M (1995). Purification of mouse primordial germ cells by MiniMACS magnetic separation system. *Dev Biol* 170:722-725.

Pesce M, Canipari R, Ferri GL, Siracusa G y De Felici M (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells.

Peters H (1970). *Phil Trans Roy Soc Lond B* 259:91-101.

Polyak K, Kato J, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM y Koff A (1994). p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Dev* 8:9-22.

Ravnik SE, Rhee K y Wolgemuth DJ (1995). Distinct patterns of expression of the D-type cyclins during testicular development in the mouse. *Dev Genetics* 16:171-178.

Roosen-Runge EC y Leik (1968). *Am J Anat* 122:275-300.

Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M y Giguère V (1991). Expression of a retinoic acid response element-*hsplacZ* transgen defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes & Dev* 5:1333-1344.

Rudnicki MA y McBurney MW (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. En: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach* (Ed. Robertson EJ) IRL Press. Oxford, Inglaterra. 19-48.

Sagata N, Watanabe N, GFV Woude e Ikawa Y (1989). The *c-mos* proto-oncogen product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342:512--518.

Scheibe RJ, Moeller-Runge I y Mueller WH (1991). Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* 266:21300-21305.

Schöler HS, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N y Gruss P (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8:2543-2550.

Sherr C y Roberts J (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev* 9:1149-1163.

Soriano P y Jaenisch R (1986). Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 46:19-29.

Studer M, Terao M, Gianni M y Garattini E (1991). Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase: cell and tissue specific expression. *Bioch Biophys Res Comm* 179:1352-1360.

Sweeney C, Murphy M, Kubelka M, Ravnik SE, Hawkins CF, Wlogemuth DJ y Carrington M (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells. *Development* 122:53-64.

Szabó P y Mann J (1995). Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting. *Genes & Dev* 9:1857-1868.

Tam PPL y Snow MHL (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol exp Morphol* 64:133-147.

Tam PPL y Zhou SX (1996). The allocation of epiblast cells to the ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol* 178:124-132.

Terao M y Mintz B (1987). Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7051-7055.

Terao M, Studer M, Gianni M y Garattini E (1990). Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. *Biochem J* 268:641-648.

Thibaudeau G, Drawbridge J, Dollarhide AW, Haque T y Steinberg MS (1993). Three populations of migrating amphibian embryonic cells utilize different guidance cues. *Dev Biol* 159:657-668.

Upadhyay S y Zamboni L (1982). Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6584-6588.

Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP y MacGregor GR (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature Genetic* 11:45-51.

Windle J, Weiner RI y Melon PL (1990). Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:597-603.

Whyte MP, Mahuren JD, Vrabel LA y Coburn SP (1985). Markedly increased circulating pyridoxal 5'-phosphate levels in hypophosphatasia. *J clin Invest* 76:752-756.

Wolffe AP y Pruss D (1996). Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84:817-819.

Wylie CC y Heasman J (1993). Migration, proliferation and potency of primordial germ cells. *Sem Dev Biol* 4:162-170.

Yew N, Mellini ML y Woude GFV (1992). Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature* 355:649-652.

Zamboni L y Merchant H (1973). The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. *Am J Anat* 137:299-336.

Zgombic-Knight, Satre MA y Duester G (1994). Differential activity of the promoter for the human alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene *ADH3* in the neural tube of transgenic mouse embryos. *J Biol Chem* 269:6790-6795.