

생쥐 발생시 고온이 형태형성에 미치는 영향

박태신·설은영·박형우·김명희*

연세대학교 의과대학 해부학교실 및 BK21 의과학사업단

Hyperthermia Effect on Morphogenesis during Mouse Development

Tae-Shin Park, Eun Young Seol, Hyung Woo Park and Myoung Hee Kim*

Department of Anatomy and Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine, C.P.O. Box 8044, Seoul 120-752, Korea

ABSTRACT

Humans, rats, mice, and other species exposed to hyperthermia exhibit a variety of developmental defects. Development of central nervous system is particularly sensitive to hyperthermia. It is known that hyperthermia induces cell death in embryos and affects gene and protein expression. Homeobox-containing genes (*Hox*) are a family of regulatory genes encoding transcription factors that primarily play a crucial role during development and direct anterior-posterior axial patterning during embryogenesis. To observe morphological effects and gene expression pattern by heat exposure, day 9 p.c. (post-coitum) mouse embryos were exposed to hyperthermia in culture. Embryos exposed to 43°C for 15 minutes induced significant decrease in crown-rump length and somite number, and delayed in ear and limb formation. The expression of *Hoxa-7* gene in heat-treated embryos did not show any restricted pattern of expression along the anterior-posterior axis, whereas the control group have a distinct anterior boundary of expression, i.e., C5 in the ectoderm-derived spinal ganglia and neural tube, and T3-T5 in the mesoderm-derived prevertebrae. This result indicates that a brief heat shock at specific stage during embryogenesis can interfere with the normal establishment of Hox codes, and subsequently perturb the morphogenesis.

Key words : *Hox*, hyperthermia, morphogenesis.

Received : Oct. 28, 1999. Revised : Nov. 23, 1999. Accepted : Nov. 29, 1999.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail : mhkim1@yumc.yonsei.ac.kr. 본 연구는 1998년도 학술진흥재단의 기초의학 학술연구비 일부와 1998년도 연세대학교 의과대학 신진교수연구비 일부의 지원에 의하여 수행되었음.

서론

고온 (hyperthermia)은 인간을 포함한 여러 종에서 발생 과정 동안 기형을 유발할 수 있다. 생쥐 발생에 있어 낭배형성 (gastrulation) 후기는 고온에 민감하게 반응하여 배자 성장 장애와 중추 신경계통의 기형을 유발시킨다 (Buckiová and Brown, 1999). 고온은 임신기의 모체가 감기로 인한 고열 또는 사우나나 강렬한 햇빛에 노출되어 형성될 수 있고 이로 인해 배자에 기형을 유발할 수 있다 (Miller *et al.*, 1978; Miller and Ziskin, 1989). 또한 온도가 높을수록, 고온에 노출되는 시간이 길어질수록 생체 내에서 미치는 영향은 더욱 커지며 심각해진다. 고온에 의한 배자 발생의 기형은 발생중인 배자의 불연속적인 영역에 나타나는 세포 증식의 변화나 부적절한 세포 죽음 (cell death), 또는 이 두 가지의 상호 작용에 기인한다 (Breen *et al.*, 1998). 기니픽, 햄스터, 흰쥐, 생쥐, 토끼, 양, 돼지, 원숭이 사람과 같은 대부분의 포유류에서 고온에 의한 중추신경계의 결함이 가장 흔히 관찰되는데, 이는 주로 신경아세포 (neuroblast)의 증식이 지체되었거나 세포 죽음 때문이라고 보고되고 있다 (Graham *et al.*, 1998). 한편 고온에 의한 온도 상승으로 인해 생체내의 효소 활성이 세포활성에 영향을 미쳤기 때문이라는 보고도 있다 (Miller and Ziskin, 1989).

고온은 또 세포 죽음 (apoptosis 또는 programmed cell death)을 유도하기도 한다 (Mirkes *et al.*, 1997). 배자를 짧은 시간 동안 미약한 온도인 42°C에서 열 충격을 가한 뒤 37°C에서 회복시킨 다음, 다시 강한 열 충격 (43°C)을 가했을 때에는 별다른 이상을 나타내지 않는데, 이는 열충격 내성 (thermotolerance)을 갖게되기 때문이라고 알려져 있다. 이런 열충격 내성을 갖게된 배자가 다시 열충격을 받게되면 대부분의 다른 단백질의 합성이 감소되거나 열충격 단백질 즉, heat shock protein (HSP)의 발현이 유도되고 이것은 새롭게 합성된 단백질이 잘못 folding되는 것을 방지함으로써 열충격 내성을 갖게 한다고 알려져 있다 (Walsh *et al.*, 1987). 특히 고온에 의해 가장 많이 발현되는 Hsp70 단백질이 고온으로부터 배자를 보호하는 열충격 내성을 유도하는데 직접적인 역할을 한다고 알려져 있으며 (Mirkes *et al.*, 1999), 이런 열충격 내성은 배자에 해로운 수준의 DNA 분절화 즉, apoptosis를 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Mirkes *et al.*, 1997).

척추동물에서 *Hox* 유전자는 A, B, C, D 4개의 cluster에 tandem repeat 형태로 존재하고 있으며, 여러 종에서 높은 유사성 (homology)을 나타내는 homeobox를 지니며, 이는 단백질로 번역시에 DNA와 결합하는 homeodomain을 암호화한다 (Chan and Mann, 1996). *Hox* 유전자들은 배자 및 태아 발생에서 중요하게 작용하여 신체 전-후축 (anterior-posterior axis)을 따라 다양한 영역에서의 발현을 총체적으로 조절한다 (Duboule and Dollé, 1989). 각 *Hox* 유전자는 cluster에서 유전자의 위치에 따라 13개의 group으로 나뉘어지며, 이 중 1-4 group은 아가미 영역 (branchial area)과 능형뇌 (rhombencephalon)의 형태 발생을, 5-8 group은 신체의 가슴 부위 (thoracic portion)를, 그리고 9-13 group은 허리-꼬리 영역 (lumbo-sacral region)을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Boncinelli, 1997). 제 7 group에 속하는 *Hoxa-7* 유전자는 생쥐의 낭배형성 시기에 처음 발현되는데 (발생 7.5일), 주로 신경관 (neural tube), 신경능선 (neural crest), 그리고 축엽과 외측 중배엽 (paraxial and lateral plate mesoderm)에서 발현된다. 발생 9.5일에는 상지의 중간엽 (mesenchyme)에서도 발현되고, 발생 12.5일에는 5번째 경추 신경절 (cervical spinal ganglion)과 신경관, 그리고 3번째에서 5번째 흉추에서부터 꼬리 쪽으로 발현하는 것으로 알려져 있다 (Min *et al.*, 1998). 본 연구에서는 배자 배양 (whole embryo culture)법을 이용하여 발생 중인 생쥐의 배자를 고온 (43°C)에 노출시켰을 때 일어나는 형태적인 변화와 발생시 형태 형성에 관여한다고 알려져 있는 *Hoxa-7* 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰함으로써 고온이 발생 과정에 미치는 영향에 대하여 알아보려 한다.

재료 및 방법

실험 동물 및 배자

실험동물은 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 저녁에 암컷 3~4마리와 수컷 1마리를 합사시킨 후 다음날 아침 9시에 plug가 관찰되면 이 때를 발생 0.5일로 정의하였다. 임신한 쥐 2마리로부터 발생 8.5일째 되는 배자 15마리를 분리하였다. 이 중 2마리는 흡착되었고 5마리는 손상되었으며 2마리는 크기가 너무 작아 배제시키고 잘 분리된 6마리로 배자 배양을 수행하였다.

배자 배양 및 열 충격

실험 대조군과 고온군으로 각각 3마리씩의 배자를 24시간 동안 37°C에서 배양 용기를 회전시키면서 배양하였다. 이때 사용한 배지는 Streptomycin과 Penicillin G를 포함하는 75% Rat serum과 25% Tyrode's buffer로 50 ml conical tube에 6 ml을 채워서 배양하였다. 가스 교환은 12시간 간격으로 첫날은 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂를 사용하였고 둘째 날에는 20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂로 교환하였다 (Sadler, 1979; Foerst-Potts and Sadler, 1997). 고온군은 37°C에서 18시간 배양 후 43°C에서 15분 동안 노출시켜 열충격을 가한 후 37°C에서 5시간 더 배양하였고, 실험대조군은 37°C에서 계속 배양하였다.

외형 관찰

배양이 끝난 배자는 수술 현미경 하에서 머리 둔부길이 (crown rump length, CRL), 체절 (somite)의 수, 배자의 회전 (turning) 유무, 아가미궁 (branchial arch)의 수, 신경관의 폐쇄 유무, 눈 (optic), 귀 (otic) 소포의 폐쇄 및 상지썩 (upper limb bud)의 발달 상태 등의 외형상 특징 (Theiler, 1972)을 측정 및 관찰하였다.

Probe 합성

Hoxa-7 유전자로부터 homeobox를 포함하고 있는 exon 2로부터 1.28 kb *EcoRI-SacI*절편 (Puschel *et al.*, 1991)을 분리하고 이를 pGEM-3zf(+) 벡터의 동일한 부위에 삽입하여 pGEM:2KRIS를 제작하였다 (Fig. 1). *EcoRI*으로 처리된 pGEM:2KRIS DNA 1 μ g을 SP6 중합효소와 Dig labelling kit (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany)를 사용하여 anti-sense RNA를 합성하였으며, sense RNA의 경우는 *SacI* 효소가 처리된 주형 DNA 1 μ g을 T7 중합효소와 반응시켜 얻었다.

Whole-mount in situ Hybridization

외형 관찰이 끝난 배자는 4% paraformaldehyde에 고정시킨 뒤 메탄올로 탈수 (dehydration)시키고 다시 rehydration시켜 6% H₂O₂로 탈색하였다. 이를 Proteinase K로 처리한 후, 다시 4% paraformaldehyde / 0.2% glutaraldehyde로 고정시킨 뒤 prehybridization buffer (50% formamide, 5×SSC, 50 μ g/ml yeast tRNA, 1% SDS, 50 μ g/ml heparin)를 넣고 50°C에서 prehybridization 시켰다. Hybridization buffer 1 ml당 0.1 μ g 농도로 digoxigenine으로 표지된 RNA 탐침 (probe)을 첨가하여 50°C에서 하룻 밤 동안 hybridization하였다. 이를 용액 1 (50% formamide, 5×SSC, pH 6.0, 1% SDS)로 70°C에서 세척한 뒤 용액 2 (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1% Tween 20)에 RNase A를 첨가하여 hybridization이 되지 못한 RNA를 제거하였고, 다시 용액 3 (50% formamide, 2×SSC, pH 6.0)으로 70°C에서 세척해 준 뒤 preblocking한 anti-digoxigenine 항체로 4°C에서 하룻 밤 동안 부착한 후 염색액으로 발색시켜 전체 배자에서 발현되는 양상을 관찰하였다.

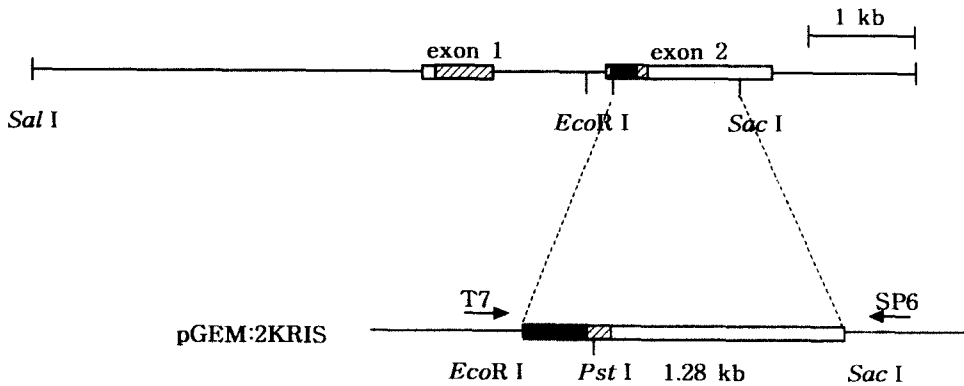
Hoxa-7

Figure 1. Restriction map of pGEM:2KRIS containing a part of exon 2 of murine *Hoxa-7* gene. Exons are indicated as boxes: white box, the 5'- and the 3'-untranslated regions; hatched box, protein coding region; black box, homeobox. The directions of transcription for sense and antisense probe are marked as arrows along with the appropriate polymerases names for RNA synthesis, T7 or SP6.

결 과

고온이 외형 발생에 미치는 영향

실험 대조군과 고온군으로 처리한 배자의 외형을 관찰한 결과, 전체적으로 고온군 배자의 꼬리부분이 실험 대조군에 비해 잘 발달하지 못하고 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 수술 현미경을 이용하여 관찰한 결과 (Table 1), 머리-둔부 길이 (CRL)는 실험 대조군에 비해 고온군에서 잘 자라지 못했음을 볼 수 있었고, 특히 1마리는 심장이 뛰고 있음에도 불구하고 꼬리부분이 거의 발달하지 못하였다 (Fig. 2). 체절 (somite)의 수는 실험 대조군에서는 23 ~ 24개였으나 고온군에서는 전혀 형성되지 않은 극심한 형태와 7개, 12개로 상당한 차이를 보였고, 아가미궁 (branchial arch)의 수는 대조군에서는 3개가 관찰된 반면, 고온군에서는 3개, 2개, 1개가 관찰되었다. 배자의 회전 (turning)은 실험 대조군에서는 이미 완료가 된 반면, 고온군에서는 2개가 막 회전을 시작하였고 1개는 전혀 회전되지 않았으며, 신경관 (neural tube)은 실험 대조군 모두와 고온군 2개 배자에서는 닫혀있었고 고온군 1개에서만 열려있었다. 눈의 형성에 있어서는 실험 대조군 모두와 고온군 2개에서 소포 (vesicle)를 형성하였고, 나머지 하나에서는 홈 (sulcus) 형태를 띄고 있었다. 귀의 형성은 실험 대조군에서는 모두 관 (duct)을 형성하였고, 고온군에서는 관을 형성한 것, 포낭 (cyst)을 형성한 것, 전혀 형성하지 못한 것 등 다양하게 나타났다. 상지뼈의 경우는 실험 대조군에서는 모두 능선 (crest)을 형성하였고, 고온군에서는 1개는 능선을, 1개는 낮은 능선 (low crest), 나머지 하나에서는 전혀 형성되지 않은 것 등 역시 다양하게 나타났다. 실험 대조군과 고온군 모두에서 심장 박동이 관찰되었으므로 배양 도중에 이상이 생겨 발생이 진행되지 못한 것은 아니라는 것을 확인하였다.

Expression Pattern of *Hoxa-7*

발생시 제한된 시공간에서 발현되어 배자의 형태를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 *Hox* 유전자 중 하나인 *Hoxa-7* 유전자 (Puschel *et al.*, 1991; Knittel *et al.*, 1995)의 발현 양상을 실험 대조군과 고온군 배자에서 whole mount in situ hybridization 방법으로 관찰하였다. 대조군의 경우 *Hoxa-7*의 발현 부위로 알려진 3번째에서 5번째 흉추 (thoracic vertebrae, T3-T5)에서 정확한 앞쪽 경계 (anterior boundary)를 이루며 꼬리 부위로 발현이 이어지는 위치 특이적인 발현양상을 보였으나 (Fig. 2A), 고온군에서는 정확한 앞쪽 경계면을 관찰할 수 없었고 배자전 부위에서 ectopic하게 발현하였다 (Fig. 2B).

Table 1
Hyperthermia Effects on the Morphology in Mouse Embryos

	YS	CRL	S	BA	Turn ^a	NT ^b	Op ^c	Ot ^d	ULb	H ^e
Control group	2.7	2.3	24	3	C	C	Ve	D	C	B
	2.5	2.1	24	3	C	C	Ve	D	C	B
	2.4	2.3	23	3	C	C	Ve	D	C	B
Heat shock group	2.6	1.8	7	3	S	C	Ve	D	C	B
	2.1	1.9	12	2	S	C	Ve	Cy	L	B
	1.8	1	N	1	N	O	S	N	N	B

The assessment of morphology: diameter (mm) of yolk sac (YS) and crown rump length (CRL); the number of somite (S) and branchial arch (BA); ^arotation of embryo (Turn), completed (C) or start (S) or no rotation (N); ^bthe status of neural tube (NT), closed (C) or opened (O); ^cdevelopmental stage of optic system (Op), optic vesicle (Ve) or optic sulcus (S); ^ddevelopmental stage of otic system (Ot), otocyst with endolymphatic duct (D) or otocyst (Cy) or no development (N); upper limb bud (ULb), crest (C) or low (L) or no detection (N); ^eheartbeat (H), beating (B) or no beating (N).

고 찰

고온 (hyperthermia)이란 정상의 체온보다 높은 온도를 말한다. 고온은 거의 모든 동물에서 여러 가지 이상을 유발하는데, 이런 체온의 상승 요인으로는 열을 발생시키는 감염이나 뜨겁고 습한 환경, 강한 운동, 혹은 약물 등이 있다. 태아 발생시 신경관이 닫히는 시기에 고온에 노출되면 신경관에 이상이 생기고, 신경의 증식 후기에는 소두증 (microcephaly)이 야기되며, 특히 신경상피 (neuroepithelium)에서의 조직학적 이상이 발생한다고 알려져 있다 (Graham *et al.*, 1998). 본 실험에서는 생쥐 발생시 고온이 형태 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배자 배양 중 43°C 항온기에서 15분 동안 배자를 노출시켜 인위적으로 고온의 환경을 만들어 준 후 배자의 형태와 발생 조절 유전자의 발현 양상을 관찰하였다.

형태적으로는 체절의 수에 큰 변화가 있었으며 귀, 팔 형성과 머리-둔부 길이에서 큰 차이가 나타났으나 신경관 폐쇄 유무는 별다른 차이를 보이지 않았다. 모든 배자는 심장이 박동하고 있었으므로 배양 중간에 죽어서 더 이상 크지 못한 것이 아니라 고온이 이들의 형태를 변화시켰다고 생각할 수 있다. 흰쥐 (rat)의 경우 고열에 의해 가장 민감하게 영향을 받은 기관이 눈 (Walsh *et al.*, 1987)이었다는 보고가 있으나, 본 실험에서 사용한 생쥐의 경우 눈에서는 큰 차이를 보이지 않았으며 오히려 체절 수에서 가장 민감한 반응을 나타내었다. 이것은 배자가 고온에 노출될 당시 stage에서의 차이 때문일 것으로 예측된다. 특히 체절은 나중에 척추 (axial skeleton)로 분화되기 때문에 체절 수의 감소는 꼬리 (caudal) 쪽의 척추 미분화나 truncation을 유도할 것으로 예측된다. 낭배형성 시기에 고온이 가해지면 뇌 부위를 포함한 중추신경계에 많은 이상을 보이게 된다 (Graham *et al.*, 1998), 본 실험에서는 낭배형성 시기가 지난 발생 9일 배자를 고온에 노출시켰기 때문에 뇌쪽 보다는 꼬리 쪽에서 형태 형성이 잘 일어나지 않은 결과를 보였다고 생각된다. 이 시기는 생쥐에서 전신경공 (anterior neuropore)이 거의 닫히는 시점이고 신경 계통보다는 꼬리 쪽의 발생이 활발히 일어나므로 이 과정에 관여하는 여러 요인들에 이상이 생겨서 이런 결과가 나왔을 것으로 유추된다.

한편 고온이 척추에서 homeotic transformation을 유도한다는 보고가 있으므로 (Li *et al.*,

Figure 2. External morphology of control (A) and heat shock (B) embryos cultured *in vitro* and the expression patterns of *Hoxa-7* detected by the whole mount in situ hybridization. The arrowheads indicate the anterior boundary of *Hoxa-7* gene expression.

1997), 본 실험에서는 axial pattern 형성에 영향을 미치는 *Hoxa-7* 유전자의 발현 양상을 분석하였다. 생쥐의 *Hoxa-7* 유전자의 발현 양상은 실험 대조군에서는 정상적인 발현 양상, 즉 체절 중 3번에서 5번 흉추 위치로부터 꼬리 쪽으로 발현하는 양상을 보였지만 고온군에서는 정확한 앞쪽 경계가 나타나지 않고 원래 발현되지 않는 앞쪽 (anterior)에서도 발현되는 등 전체적으로 실험 대조군과는 다른 발현 양상을 보였다. 이런 결과는 고온에 의한 열충격이 *Hoxa-7* 유전자가 정확한 부위에서 발현하는 것을 방해하였고, 이것은 각 체분절에서 Hox code의 이상을 초래하여 각 부위가 올바른 형태로 발달하지 못하게 하여 궁극적으로 기형을 유발시켰다고 생각된다. 임신한 생쥐에 retinoic acid (RA)를 처리하면 anterior 혹은 posterior homeotic transformation을 포함하는 기형이 유발되는데, 특히 발생 8.5일째 RA에 노출되면 고온에 노출됐을 때와 유사한 꼬리쪽의 형태 기형이 나타난다 (Kessel, 1992). 이것은 *Hox* 유전자의 발현이 *in vitro*에서 RA에 의해 조절된다는 점에서 특히 흥미롭다 (Lobe, 1995). 최근 형질 전환된 생쥐를 분석한 연구 결과, 사람의 *HOXA-7*의 위치특이 조절인자에 두 개의 RARE (retinoic acid receptor element) 반복 서열이 존재하고 있는 것으로 밝혀졌는데 이와 매우 유사한 염기서열이 생쥐의 것에서도 존재하고 있으며 (Min *et al.*, 1996; 1998), F9 teratocarcinoma cell line에 RA를 처리한 후 RARE 반복 서열의 존재 여부에 따라 reporter 유전자의 발현이 조절되는 것으로 미루어 (unpublished data) RA가 *Hoxa-7*의 위치 특이적인 발현을 유도할 가능성은 매우 높다고 본다. 따라서 고온에 의한 *Hoxa-7* 유전자의 위치특

이적 발현 변화에 대한 분자 수준에서의 기작을 이해하기 위해선 고온에 의한 열 충격 단백질과 *cis* 혹은 *trans*로 작용하는 위치특이 조절인자, 또는 RARE와의 관계 등을 규명하여야 하리라고 보며, 이것은 궁극적으로 고온에 의해 유도되는 형태 기형 유발 기작을 밝히는 데에도 기여를 할 것으로 기대된다.

인 용 문 헌

- Boncinelli, E., 1997. Homeobox genes and disease. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **7**: 331-337.
- Breen, J.G., T.W. Claggett, G.L. Kimmel and C.A. Kimmel, 1998. Heat shock during rat embryo development *in vitro* results in decreased mitosis and abundant cell death. *Reprod. Toxicol.* **13**: 31-39.
- Buckiová, D. and N.A. Brown, 1999. Mechanism of hyperthermia effects CNS development: Rostral gene expression domains remain, despite severe head truncation; and the hindbrain/otocyst relationship is altered. *Teratology* **59**: 139-147.
- Chan, K. and R.S. Mann, 1996. A structure model for a homeotic protein-extradenticle-DNA complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5223-5228.
- Duboule, D. and P. Dollé, 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *The EMBO J.* **8**: 1497-1505.
- Foerst-Potts, L. and T.W. Sadler, 1997. Disruption of *Msx-1* and *Msx-2* reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev. Dynamics* **209**: 70-84.
- Graham, J.M. Jr., M.J. Edwards and M.J. Edwards, 1998. Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. *Teratology* **58**: 209-221.
- Kessel, M., 1992. Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development* **115**: 487-510.
- Knittel, T., M. Kessel, M.H. Kim and P. Gruss, 1995. A conserved enhancer of the human and murine *Hoxa-7* gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* **121**: 1077-1088.
- Li, Z., O. Chisaka, H. Koseki, T. Aksaka, M. Ishibashi and K. Shiota, 1997. Heat-shock-induced homeotic transformations of the axial skeleton and associated shifts of hox gene expression domains in mouse embryos. *Reprod. Toxicol.* **11**: 761-770.
- Lobe, C.G., 1995. Activation of Hox gene expression by *Hoxa-5*. *DNA Cell Biol.* **14**: 817-823.
- Miller, P., D.W. Smith and T.H. Shepard, 1978. Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. *Lancet* **1**: 519-521.
- Miller, M.W. and M.C. Ziskin, 1989. Biological consequences of hyperthermia. *Ultrasound Med. Biol.* **15**: 707-722.
- Min, W., M. Cho, S.I. Jang, H.-H. Chang, C.-S. Lee, M.-H. Jun and M.H. Kim, 1996. Sequence and functional analysis of an upstream regulatory region of human HOXA7 gene. *Gene* **182**: 1-6.
- Min, W., H.-J. Woo, C.-S. Lee, K.-K. Lee, W.K. Yoon, H.W. Park and M.H. Kim, 1998. 307-bp fragment in HOXA7 upstream sequence is sufficient for anterior boundary formation. *DNA Cell Biol.* **17**: 293-299.
- Mirkes, P.E., L.M. Cornel, H.W. Park and M.L. Cunningham, 1997. Induction of thermotolerance in early postimplantation rat embryos is associated with increased resistance to hyperthermia-induced apoptosis. *Teratology* **56**: 210-219.
- Mirkes, P.E., L.M. Cornel, K.L. Wilson and W.H. Kilmann, 1999. Heat shock protein 70 (Hsp70) protects postimplantation murine embryos from the embryolethal effects of hyperthermia. *Dev. Dynam.* **214**: 159-170.
- Puschel, A.W., R. Balling and P. Gruss, 1991. Separate elements cause lineage restriction and specific boundaries of Hox-1.1 expression. *Development* **112**: 279-288.
- Sadler, T.W., 1979. Culture of early somite mouse embryos during organogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **49**: 17-25.
- Theiler, K., 1972. *The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age.* Springer Verlag, New York.

Walsh, D.A., N.W. Klein, L.E. Hightower and M.J. Edwards, 1987. Heat shock and thermotolerance during early rat embryo development. *Teratology* **36**: 181-191.