

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR
DE TUMORES p53 MODIFICA EL ESPECTRO DE
TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO
GENETICO CARENTE DE p53.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

Por
M.C. ARTURO CHAVEZ REYES

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DEL 2001



ARTURO CHAVEZ REYES

ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

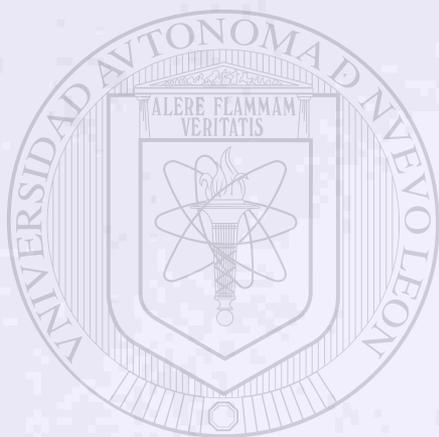
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
RC267
.C43
2001
c.1

2001



1080124427



UANL

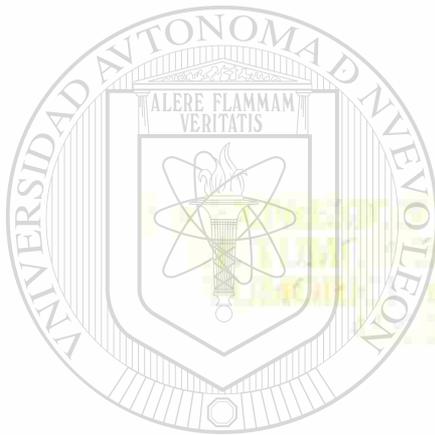
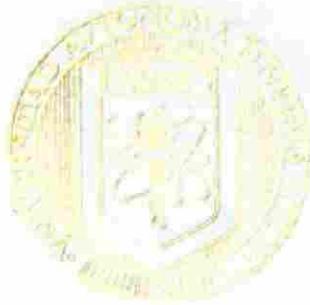
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
ESPECIALIDAD EN BIBLIOTECAS

®

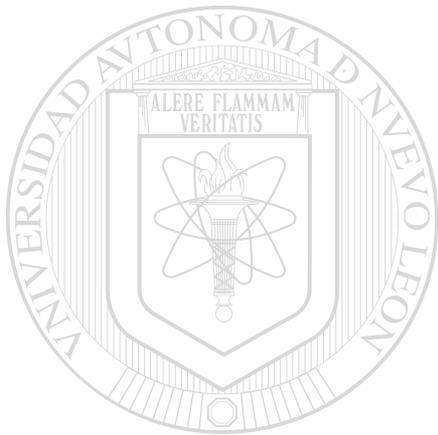
Por
M.C. ARTURO CHAVEZ RIVERA

M.C. FERRER, N. L.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA



TD
RC267
.C43
2001



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



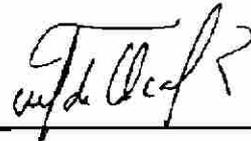
**LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR
DE TUMORES *p53* MODIFICA EL ESPECTRO DE
TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO
GENETICO CARENTE DE *p53*.**

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Ph.D. Guillermina Lozano
Director Externo de Tesis



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director Interno de Tesis



Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

Monterrey, N.L.

Diciembre del 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR
DE TUMORES *p53* MODIFICA EL ESPECTRO DE
TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO
GENETICO CARENTE DE *p53*.

COMISION DE EXAMEN

Ph.D. Guillermina Lozano
PRESIDENTE

Guillermina Lozano

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
SECRETARIO

Roberto Montes de Oca Luna

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
VOCAL

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
VOCAL

Dr. Mario R. Morales Vallarta
VOCAL

Dr. Carlos E. Hernández Luna
SUPLENTE

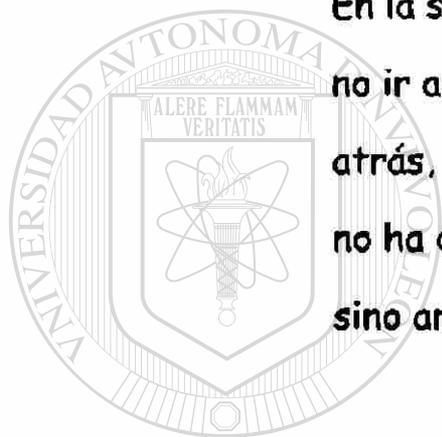
Ricardo A. Gómez Flores

Mario R. Morales Vallarta

Carlos E. Hernández Luna

Monterrey, N.L.

Diciembre del 2001



En la senda del vivir
no ir adelante es ir
atrás, y el que a arar empieza
no ha de volver la cabeza
sino arar y proseguir.

UANL

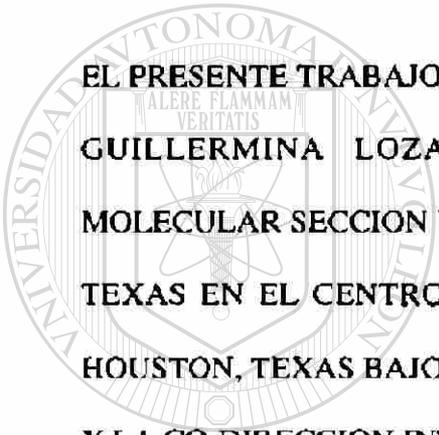
Lope de Vega

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LOCALIZACION



EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE LA PH.D. GUILLERMINA LOZANO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA MOLECULAR SECCION DE GENETICA DEL CANCER DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS EN EL CENTRO DE CANCER M.D. ANDERSON DE LA CIUDAD DE HOUSTON, TEXAS BAJO LA DIRECCION DE LA PH.D. GUILLERMINA LOZANO Y LA CO-DIRECCION INTERNA DEL DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA,

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN [®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A mis padres:

Arturo y Nora Hilda

Gracias por estar siempre dispuestos a darme su amor, comprensión y apoyo. Por todos los sacrificios y esfuerzos por los hemos pasado para lograr llegar a este punto.

A mis hermanas:

Nora y Erika

Por todo su cariño, por todo el tiempo que no me ha sido posible compartir con ustedes y por su manera tan especial de motivarme a seguir siempre adelante.

A:

Yolanda

Por ser la principal motivación en mi vida y por todo el tiempo que ha invertido en la discusión y revisión de mi trabajo.

A mi abuelita:

Antonia

Por su amor y sus oraciones.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guillermina Lozano por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por su crítica, guía y por aguantarme durante todo este tiempo, *thanks Gigi*.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por introducirme al complicado mundo de la genética molecular y confiar en mí, por todo su apoyo y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Tamez Guerra porque gracias a ellos me inicié en la investigación científica y siempre me han brindado todo su apoyo.

A los miembros de mi comisión de examen: Dr. Ricardo Gomez Flores, Dr. Mario Morales Vallarta y Dr. Carlos Hernández Luna, muchas gracias por el apoyo y todo lo que me han enseñado durante todo este tiempo.

Al Dr. John M. Parant por todo lo que hemos compartido juntos, por su ayuda, por estar siempre dispuesto a compartir conmigo sus conocimientos y especialmente por ser *un muy buen amigo, gracias buddy*.

Al Dr. Matthew Starost por los estudios patológicos y por tener la paciencia de discutir los datos y explicarme todo tan claramente.

A la Lic. Helia Yohaina Haaz Melgarejo por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

Al Biol. Mario Alberto Valdés Marroquín por ser mi hermano desde hace tanto tiempo.

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Lozano: John, Susan, Geng, Caty, Patty, Lisa, Gene, Sohela, Carolyn, Joanna, Tommo, Arlette, Lin, Patrick, Jin, Mini, Chad, Shuling, Brandon, Jason, Shunbin y Janet, por toda la ayuda, críticas y enseñanzas que me han brindado.

A todas las personas del M.D. Anderson que de alguna forma han contribuido a que pueda terminar este trabajo, especialmente al personal del departamento de Genética Molecular.

A mis amigos del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas: José Luis, Leo, Esther, Mati, Lidia, Pera, Bertha, Catarino, Aracely, Betty, Herminio, Moises, porque de todos he aprendido mucho.

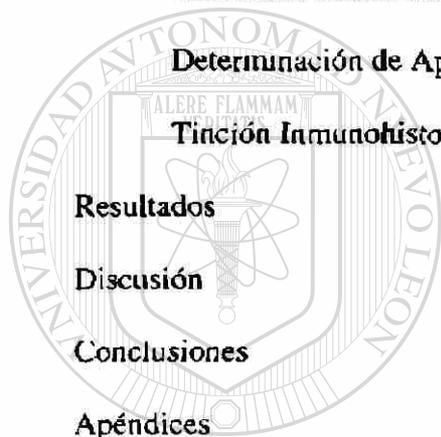
A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron a que la realización de este trabajo fuera posible y que sin intención omito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado durante mi carrera.

INDICE GENERAL

	Pag.
Localización	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice General	v
Indice de Figuras	vii
Indice de Tablas	xi
Indice de Apéndices	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	19
p53	19
mdm2	32
mdmX	41
LcK	44
Hipótesis	51
Objetivos	52
Diagrama de Flujo	53
Materiales y Métodos	54
Animales Utilizados	54

Construcción del vector de expresión transgénica	55
Generación de los ratones transgénicos	56
Aislamiento de DNA genómico	57
Determinación del genotipo de los ratones	58
Secuenciación	61
Análisis de Western Blot	62
Procesamiento de Tejidos para Histología	63
Tinción de Hematoxilina y Eosina	64
Determinación de Apoptosis	64
Tinción Inmunohistoquímica	65
Resultados	67
Discusión	97
Conclusiones	106
Apéndices	108
<hr/>	
Referencias Bibliográficas	122
Vitae	156



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



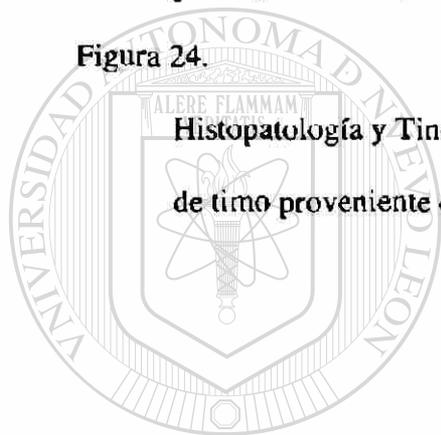
INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Generación de ratones transgénicos.	7
Figura 2. Estructura de la proteína p53 humana.	21
Figura 3. Las vías de p53.	30
Figura 4. Organización de la proteína mdm2.	33
Figura 5. Mecanismos involucrados en la inactivación de p53 por MDM2.	35
Figura 6. Representación esquemática de la homología entre las proteínas MDM2 y MDMX.	42
Figura 7. Organización de la región promotora del gen <i>LcK</i> y su patrón de expresión.	47
Figura 8. Construcción del casete de expresión transgénica.	68
Figura 9. Caracterización del vector de expresión transgénica <i>pLcK-Hp53</i>	69

Figura 10.	70
Oligonucleótidos iniciadores para la genotipificación del transgen.	
Figura 11.	71
Genotipificación de los ratones obtenidos de la primera microinyección.	
Figura 12.	73
Determinación de la expresión del transgen en diferentes órganos de ratón por Western Blot.	
Figura 13.	75
Genotipificación de los ratones por PCR.	
Figura 14.	76
Genotipificación de las nuevas líneas de ratones.	
Figura 15.	77
<hr/>	
Caracterización de las nuevas líneas de ratones transgénicos	
Figura 16.	79
Curvas de sobrevivencia	
Figura 17.	81
Incidencia de linfomas de timo.	
Figura 18A.	82
Histopatología del linfoma de timo y su diseminación a corazón.	

Figura 18B.	83
Histopatología del linfoma de timo y su diseminación a hígado y pulmón.	
Figura 18C	84
Histopatología del linfoma de timo y su diseminación a riñón y glándula mamaria.	
Figura 19	85
Espectro de tumores en ratones <i>p53</i>^{-/-}.	
Figura 20A.	86
Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.	
Hemangiosarcoma y Retinoblastoma	
Figura 20B.	87
Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.	
Sarcoma y Hemangiosarcoma de Glándula Mamaria.	
Figura 20C.	88
Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.	
Osteosarcoma y Adenocarcinoma.	
Figura 20A.	89
Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.	

Teratoma.	
Figura 21.	91
Hemangiosarcoma de células gigantes.	
Figura 22.	93
Análisis de Tunel para la determinación de apoptosis.	
Figura 23.	94
Tinción Inmunohistoquímica de un linfoma de tímo proveniente de un ratón <i>mdm2</i>^{-/-}<i>p53</i>^{-/-}<i>Tg</i>⁺.	
Figura 24.	96
Histopatología y Tinción Inmunohistoquímica de un linfoma de tímo proveniente de un ratón <i>mdm2</i>^{-/-}<i>p53</i>^{-/-}<i>Tg</i>⁺.	



UANL

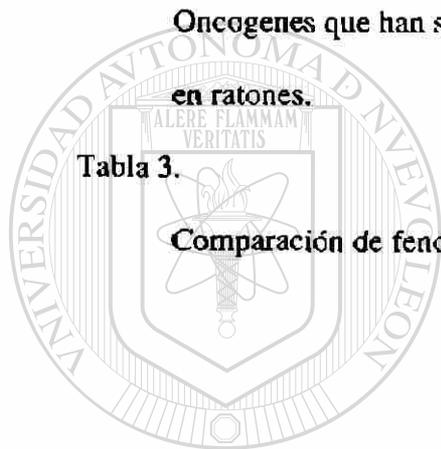
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.	14
Promotores tejido específico que se utilizan en la generación de ratones transgénicos.	
Tabla 2.	16
Oncogenes que han sido expresados transgénicamente en ratones.	
Tabla 3.	90
Comparación de fenotipos.	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



INDICE DE APENDICES

	Pag.
Apéndice 1.	108
Análisis estadístico del espectro de tumores observado.	

Apéndice 2.	118
Lista de reactivos, kits y buffers utilizados.	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento, Porcentaje
°C	Grados centígrados
AAs	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
AGP-A	α 1-Glicoproteína Acida
Alb	Albúmina
Aprox.	Aproximadamente
ATT	α 1-Antitripsina
BrdU	5-Bromo 2'-desoxiuridina
Ca	Calcio
Ca ⁺²	Ión calcio
CDKs	Kinasas dependientes de ciclina
cDNA	DNA complementario o copia
Cip-1	Cdk-interacting protein, proteína de interacción con CDKs
CMV	Citomegalovirus
CR	Regiones Conservadas
CRP	Proteína C-reactiva
CuZn SOD	Dismutasa superoxidasa de Cobre/Zinc
Cys	Cisteína
DAB	Diamino bencidina
det.	Determinación
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Mezcla de los desoxirribonucleosil trifosfatos: ATP, GTP, CTP y TTP
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
EDTA	Acido Etilen-Diamino Treta-acético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ES	Embryo Stem, Estaminal embrionaria

Etc.	Etcétera
EtOH	Etanol
FERs	Fibroblastos de embrión de rata
GFP	Green Fluorescent Protein, Proteína Verde Fluorescente
Glu	Acido Glutámico
GPX	Glutation Peroxidasa
H&E	Hematoxilina y Eosina
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HCl	Acido Clorhídrico
Hg	Mercurio
Hg⁺²	Ión mercurio
hGH	Human Growth Hormone, Hormona del Crecimiento Humano
HLA	Antígenos de histocompatibilidad
Hp53	p53 humano
Hr.	Hora
Hrs.	Horas
HSV-TK	Timidina Kinasa del Virus del Herpes Simplex
IR.	Radiación ionizante

Ig **Inmunoglobulina**
IGF-BP3 **Insuline-like growth factor binding protein 3, proteína 3 de unión al factor**
de crecimiento tipo insulina

IL-3	Interleucina 3
IR	Radiación Ionizante
Kb	Kilobase, 1000 pares de bases.
kDA o kD	Kilodaltones
KO	Knockout, inactivación
L5	Proteína ribosomal L5
LcK	Lymphoid Cell Kinase, Kinasa de Células Linfoides
Leu	Leucina
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni

Lys	Lisina
M	Molar, concentración molar, molaridad.
MA	Massachussets
MBP	Proteína mielina básica
mdm	Murine double minute, doble diminuto murino
MDR1	Gen de Resistencia a Multidroga 1
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar, concentración milimolar.
MMPs	Metaloproteínas de matriz
MMTV	Murine Mamary Tumors Virus, Virus de Tumores Mamaros de Ratón
M-MuLV	Virus de la Leucemia Moloney
MO	Missouri
MSV	Virus del sarcoma murino
MT	Metalotioneína
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Neo	Neomicina
NFP	Proteína de neurofilamentos
ng	Nanogramo
NK	Natural Killer, Asesinas Naturales
NTP	Nucleotide Tri-Phosphate
OH	Hidroxi
ORF	Open reading frame, marco abierto de lectura
p53AIP1	p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1, Proteína 1 Inductora de Apoptosis regulada por p53
P53DINP1	p53-dependent Damage-Inducible Nuclear Protein 1, Proteína Nuclear 1 Dependiente de p53 Inducible por Daño
Pag.	Página

Pb	Pares de bases o nucleótidos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERP	p53 Apoptosis Effector Related to PMP-22, Efector de Apoptosis dependiente de p53 Relacionado a PMP-22
pH	Potencial de hidrógeno
Ph.D.	Doctor en Filosofía
pl	Picolitros
POD	Peroxidasa
prob.	Probabilidad
PTGF-β	p53-Induced Transforming Growth Factor β, Factor β de Crecimiento Transformante Inducido por p53.
Rb	Retinoblastoma
Rb	Retinoblastoma
Ren-2	Renina 2
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Estreptavidina
Sdi1	Senescent cell DNA synthesis inhibitor, inhibidor de la síntesis de DNA en células senescentes.
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundo
SEN	Señal de Exportación Nuclear
Ser	Serina
SLN	Señal de localización nuclear
St.	Stret, calle
SV40	Virus de simio 40
TAF	Transcription Activation Factor, Factor Activador de la Transcripción
TBE	Bufer de tris, boratos y EDTA
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TdT	Terminal desoxi-transferasa

TFII E	Factor de transcripción II E
Tg	Transgénico
TGF- α	Factor de crecimiento transformante α
TK	Timidina kinasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R	Receptor de TNF
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF
Tris	Trizma base
Trp	Triptófano
Tunel	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TX	Texas
U.V.	Luz Ultravioleta
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UB	Ubiquitina
UPE	Upstream Promoter Elements, Elementos Promotores Río Arriba.
VP	Vasopresina
WAF-1	Wild-type p53 activated fragment 1, fragmento 1 activado por p53 silvestre
WAP	Proteína ácida whey.
α 2u-G	α 2u Globulina
β 2-m	Cadena β 2 de la microglobulina
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro

TFIIIE	Factor de transcripción II E
Tg	Transgénico
TGF- α	Factor de crecimiento transformante α
TK	Timidina kinasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R	Receptor de TNF
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF
Tris	Trizma base
Trp	Triptófano
Tunel	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TX	Texas
U.V.	Luz Ultravioleta
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UB	Ubiquitina
UPE	Upstream Promoter Elements, Elementos Promotores Río Arriba.
VP	Vasopresina
WAF-1	Wild-type p53 activated fragment 1, fragmento 1 activado por p53 silvestre
WAP	Proteína acídica whey.
α 2u-G	α 2u Globulina
β 2-m	Cadena β 2 de la microglubulina
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro

RESUMEN

El activador transcripcional p53 ha sido identificado como un supresor de tumores y su alteración o pérdida son eventos críticos en la etiología de diversos tumores. Activa la transcripción de varios genes involucrados en la regulación del ciclo celular (*p21*, *mdm2*) o apoptosis (*bax*). La proteína MDM2 se une a p53 e inhibe sus funciones. Los ratones que carecen de *mdm2* presentan letalidad embrionaria debida a apoptosis a los 5.5 días de gestación. Y la ausencia simultánea de p53 rescata este fenotipo. Por otro lado, los ratones carentes de p53 son viables y fértiles, pero tienen una alta predisposición al desarrollo de tumores. Aproximadamente el 75% de ellos desarrollan tumores, siendo los linfomas de timo los más frecuentes. Mientras que los ratones que carecen tanto de p53 como *mdm2* presentan una incidencia similar. El objetivo de este trabajo era generar

ratones transgénicos que expresen p53 humano específicamente en timocitos. Una vez generados estos ratones, fueron cruzados con ratones carentes de p53 y con ratones[®] carentes de p53 y *mdm2*. En los ratones transgénicos carentes de p53 endógeno se encontró una disminución en la incidencia de tumores de timo, un aumento en otros tipos de tumores y la aparición de tipos de tumores no observadas anteriormente en los ratones carentes de p53. Mientras que en los ratones transgénicos carentes de p53 y *mdm2* se observó el desarrollo de linfomas de timo, los cuales no presentan apoptosis ni expresión del transgen.

INTRODUCCION

La integración estable de información genética exógena dentro del genoma murino ha venido a constituir una herramienta muy importante para diferentes aspectos de la biología. Es una característica común que el gen exógeno integrado (el transgen) sea expresado de manera apropiada tanto espacial como temporalmente. La construcción de diferentes líneas de ratones transgénicos expresando varias versiones de un gen permite definir las secuencias de DNA que están involucradas en su especificidad de expresión *in vivo*. Esto a su vez abre el camino para una gran variedad de experimentos en los cuales un determinado gen es dirigido para expresarse en diferentes tipos celulares, lo cual es de gran ayuda para descifrar la importancia fisiológica de dicho gen. Tal estrategia ha sido utilizada, por ejemplo, para contestar preguntas acerca del papel de oncogenes en la transformación maligna de las células normales.

Un aspecto muy interesante a través de los años ha sido el tratar de comprender como es posible que a partir de una sola célula (el huevo fertilizado) sea posible la formación de un organismo complejo conformado por muy diferentes tipos de tejidos. La información de dicho desarrollo se encuentra almacenado en el genoma en forma de DNA, una secuencia de nucleótidos que es única e idéntica para todas las células de un organismo dado. Por lo cual, se ha concluido que el secreto del desarrollo del huevo fertilizado a un organismo adulto, debe radicar en una expresión sumamente controlada, tanto espacial como temporalmente, de genes específicos o grupos de genes. Se ha realizado una vasta investigación tratando de elucidar dichos patrones de expresión. Al

principio fué un gran avance el establecimiento de sistemas *in vitro* en los cuales se podía poner a prueba la acción de determinados factores, tales como drogas, hormonas, virus, etc., sobre secuencias específicas de DNA, esto gracias a la implementación de diversos métodos de biología molecular y celular tales como la clonación y la transfección. Pero a la vez, siempre se había especulado que tan extrapolables serían estos métodos cuando se querían aplicar los datos a sistemas *in vivo*. La complejidad presentada en un ser viviente rebasa por mucho la de cualquier sistema de cultivo de tejidos *in vitro*, ya que en un ser vivo se presenta toda la gama de moléculas y factores que realmente pueden tener alguna influencia en el funcionamiento de tal o cual molécula, mientras que en un sistema *in vitro* únicamente entran en juego los factores contenidos en tal sistema celular y los que se adicionen artificialmente. Es por esto que se comenzó a considerar la posibilidad de crear sistemas que permitieran el estudio de moléculas utilizando organismos vivos como tubos de ensayo complejos.

Después de muchos ensayos se logró la creación de protocolos que permiten la introducción de genes exógenos en el genoma de ratones y es por lo cual que este organismo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de diversas moléculas en forma de transgen. La disponibilidad de tales animales transgénicos ha abierto nuevas posibilidades en cuanto al estudio del desarrollo se refiere:

- Estudiar el papel de varios genes en vías específicas de diferenciación o en sistemas fisiológicos
- Analizar las consecuencias de la expresión ectópica o no regulada de ciertos genes

- Estudiar los efectos de la integración del DNA *per se*, que algunas veces conlleva a la generación de mutaciones
- Crear modelos animales de enfermedades de humanos
- Analizar la posibilidad de curar ciertos defectos genéticos mediante el uso de terapia génica

Los ratones transgénicos pueden ser producidos al menos de tres formas diferentes:

1. Inyección directa del DNA en uno de los pronúcleos de los huevos fertilizados
2. Infección de los huevos con retrovirus
3. Uso de células estaminales previamente transfectadas con el DNA de interés para producir quimeras mediante agregación o inyección de blastocistos

A la fecha el método de inyección directa del DNA es el más ampliamente utilizado y a grandes rasgos se lleva a cabo de la siguiente manera: Se recolectan huevos fertilizados de las ratonas alrededor de 12 a 15 horas después del coito. En esta etapa los pronúcleos

masculinos y femeninos aún se encuentran de forma individual dentro del huevo. Los huevos son mantenidos en un medio de cultivo especial bajo una capa de aceite mineral.®

De ahí son tomados por medio de succión con una pipeta que es manejada a través de un micromanipulador. La microinyección se realiza con una micropipeta de vidrio conectada a una jeringa y manejada por un segundo micromanipulador. Se inyectan dentro del micronúcleo masculino aproximadamente de 1 a 2 picolitros (pl) de la solución que contiene el DNA de interés. Los huevos microinyectados son entonces transferidos a los oviductos de hembras pseudopreñadas obtenidas por apareamiento con machos que han

sido previamente vasectomizados. Los ratones que se desarrollan a partir de los huevos transferidos se obtienen aproximadamente de 19 a 21 días después de la transferencia.

Posteriormente, los ratones que contienen el transgen se pueden detectar de varias formas, siendo las más comunes el Análisis de Southern Blot y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Normalmente se espera que algunos de los ratones obtenidos de este procedimiento hayan incorporado el transgen en sus cromosomas y esté, por lo tanto, presente en todas las células del animal, incluyendo aquellas de la línea germinal. El patrón de digestión del DNA por enzimas de restricción y la intensidad relativa de las bandas obtenidas por hibridización con sondas marcadas radioactivamente, proporciona información importante acerca del número de copias del transgen que se integraron al DNA genómico, así como la posición de las mismas dentro del cromosoma (cabeza-cola, cola-cola, cabeza-cabeza). En este punto es común encontrar que en diferentes líneas de transgénicos los locus de inserción varían ampliamente de línea a línea. Pero dentro de una misma línea de ratones transgénicos, este patrón de DNA debe ser el mismo entre los diferentes tejidos del animal.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Finalmente, los ratones transgénicos encontrados en el paso anterior son cruzados con ratones negativos o silvestres y la progenie de estas cruzas debe ser caracterizada por los mismos métodos. Generalmente, si el ratón contiene el transgen en la línea germinal, se espera que la mitad de su progenie herede su mismo patrón específico de inserción, al igual que se esperarían de cualquier otro marcador genético. Sin embargo, en algunas ocasiones el ratón transgénico original aparecen como animales mosaico, muy

probablemente debido a una inserción cromosomal retrasada del DNA microinyectado. En esta situación, es solo hasta después de la transmisión del transgen a su descendencia que todas las células somáticas contendrán el transgen. El protocolo se describe esquemáticamente en la figura 1.

Históricamente, los primeros animales que contenían genes exógenos introducidos experimentalmente fueron derivados de la microinyección del DNA del virus de simios 40 (SV40) dentro de la cavidad del blastocisto (Jaenisch, 1975; Jaenisch and Mintz, 1974). Sin embargo, en este experimento no se demostró la integración del DNA viral en la línea germinal. Un estudio posterior sugiere que algo del DNA de SV40 se mantiene de manera episomal en algunos tejidos somáticos. Posteriormente, la transmisión en línea germinal del DNA exógeno fué detectada en estudios subsecuentes en los cuales embriones de ratón fueron expuestos a virus infecciosos de la leucemia Moloney (M-MuLV), lo que resultó en la generación de la primera cepa de ratones transgénicos (Jaenisch, 1976; Jaenisch, 1977). Por otro lado, la primera vez que se logró la expresión de un transgen en ratones mediante la técnica de inyección directa del DNA exógeno dentro de pronúcleos fué utilizando un gen de fusión que contiene la región promotora del gen de la metalotioneína (MT) murina fusionada al gen estructural tímida kinasa del virus del herpes simplex (HSV-TK) o al gen de la hormona de crecimiento de rata (Brinster et al., 1981; Palmiter et al., 1982). Desde entonces, muchos diferentes genes exógenos han sido insertados en la línea germinal del ratón mediante la inyección de DNA. Obteniéndose de ello información muy importante:

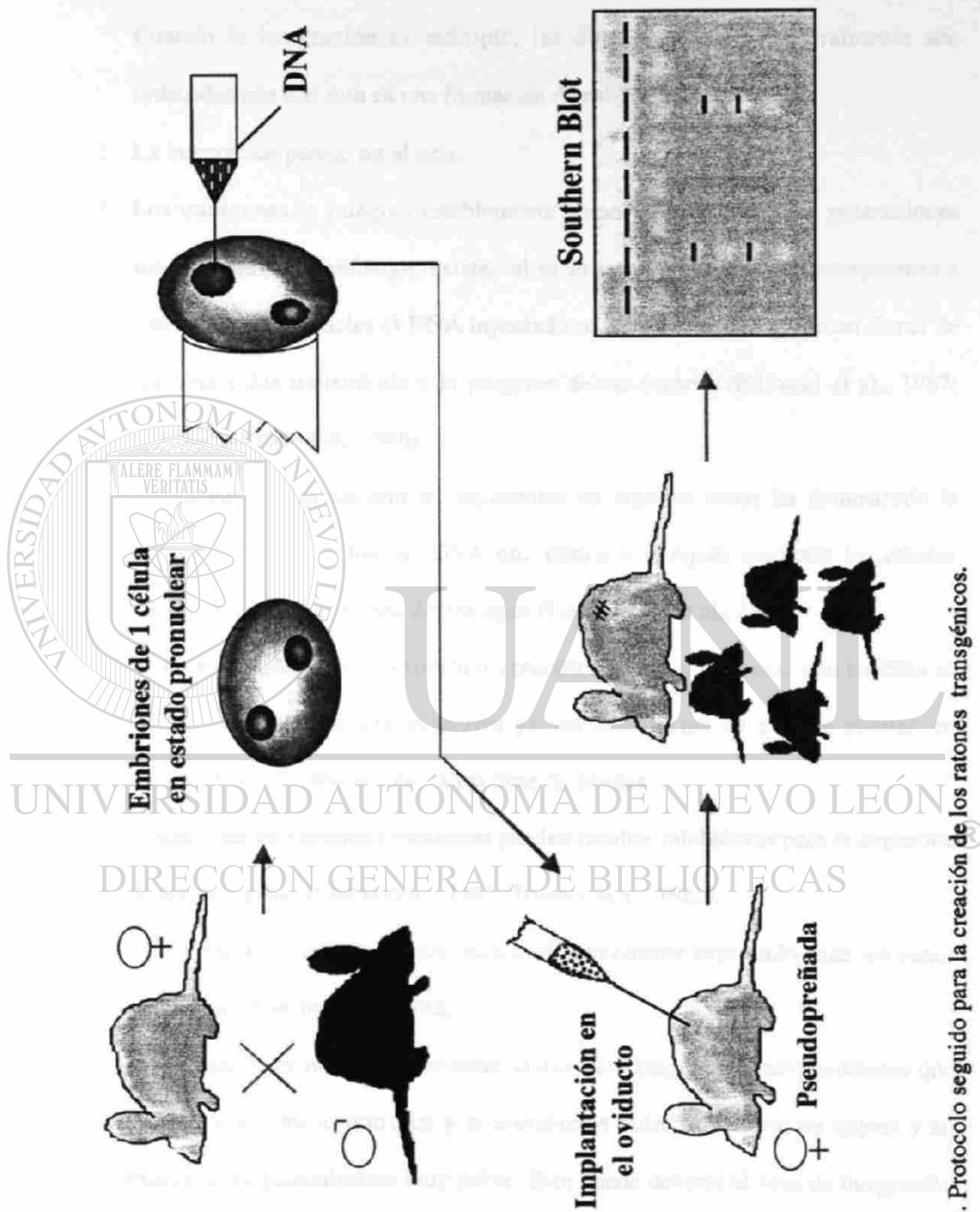


Figura 1. Protocolo seguido para la creación de los ratones transgénicos.

1. Desde una hasta más de 100 copias del transgen se pueden integrar al genoma. Cuando la integración es múltiple, las diferentes copias generalmente son ordenadas una tras otra en una formación de cabeza a cola.
2. La integración parece ser al azar.
3. Los transgenes se integran establemente y son transmitidos a las generaciones subsecuentes. Sin embargo, existen al menos dos documentadas excepciones a esta regla, en las cuales el DNA inyectado se mantuvo no integrado en forma de episoma y fue transmitido a la progenie de esa manera (Elbrecht et al., 1987; Rassoulzadegan et al., 1986).
4. El análisis de las secuencias adyacentes en algunos casos ha demostrado la presencia de rearrreglos del DNA que tienen por objeto aminorar los efectos producidos por la inserción del transgen (Covarrubias et al., 1987).
5. Se ha encontrado que la expresión específica de los transgenes, que también es establemente transmitida, es activa ya sea únicamente en un tipo celular, en algunos tipos de células o en varios tipos de células.
6. Secuencias de vectores procariotes pueden resultar inhibitoras para la expresión de algunos genes (Chada et al., 1985; Townes et al., 1985).
7. cDNA carentes de intrones son menos eficientemente expresados que los genes completos (Brinster et al., 1988).
8. La expresión es muy variable entre líneas de transgénicos independientes que contienen el mismo transgen y la correlación entre el número de copias y su expresión es generalmente muy pobre. Esto puede deberse al sitio de integración del transgen o a la carencia, lo cual es el caso en la mayoría de las construcciones,

de alguna(s) secuencia reguladora importante que determinen su expresión independientemente de la posición.

Una consecuencia muy importante de una expresión transgénica correcta es que, siempre que un promotor sea sujeto a la regulación a través de estímulos externos (tales como iones metálicos, hormonas, antibióticos, etc.), esta propiedad es generalmente retenida en los ratones transgénicos, lo cual abre un camino al control *in vivo* del efecto del producto de un gen determinado mediante la creación de un ratón transgénico con un gen de fusión (Jaenisch, 1988).

Infeción retroviral.

A diferencia del DNA microinyectado, los retrovirus se integran al genoma con un mecanismo precisamente definido. Solamente una copia proviral es insertada en un

sitio cromosomal dado y no se inducen más rearrreglos del genoma huésped que una corta duplicación de secuencias del huésped en el sitio de integración (Varmus, 1982). Los

embriones de ratón en estado de preimplantación pueden ser expuestos a stocks virales concentrados (Jaenisch, 1976) o co-cultivados sobre monocapas de células productoras

de virus (Jahner and Jaenisch, 1980). También existen métodos que permiten introducir

virus en embriones en etapas post-implantación entre los días 8 y 12 de la gestación

(Jaenisch, 1980). Aunque esto permite la infección de células de muchos tejidos

somáticos, las células germinales son infectadas a una muy baja frecuencia (Soriano and

Jaenisch, 1986). La principal ventaja en el uso de retrovirus o vectores retrovirales para la

transferencia de genes en animales es la facilidad técnica para introducir los virus en los embriones en diferentes etapas del desarrollo. Además, se ha probado que es más sencillo el aislamiento de las secuencias del huésped adyacentes al inserto proviral que al de aquellos adyacentes a insertos derivados de la inyección pronuclear. Esta es una ventaja importante cuando se tiene que identificar el gen endógeno alterado por la inserción del transgen. Las principales desventajas en el uso de los retrovirus como vectores de transferencia son el límite en el tamaño del DNA traducido y los problemas para reproducir la expresión del transgen en el animal.

Células embrionarias estaminales o pluripotenciales.

Las células embrionarias estaminales (ES) se establecen *in vitro* a partir de blastocistos explantados y que mantienen sus cariotipos normales en cultivo (Doetschman et al., 1985). Cuando estas células son inyectadas de nuevo dentro de blastocistos, tienen

la capacidad de colonizarlos y contribuir a la línea germinal del animal quimérico resultante (Bradley et al., 1984; Gossler et al., 1986). Se pueden introducir eficientemente genes dentro de las células ES mediante transfección de DNA o transducción mediada

por retrovirus y las células resultantes aún mantienen su capacidad pluripotencial.

Utilizando esta tecnología, se han generado ratones a partir de clones de células que fueron seleccionadas *in vitro* por un fenotipo específico (Hooper et al., 1987; Kuehn et al., 1987).

Expresión de transgenes en tejidos específicos.

En los primeros experimentos de transgénesis solamente se obtenía expresión baja o extremadamente variable del transgen. Una de las primeras variables que se encontró que contribuía a esto fué que la presencia de secuencias procariotas en los transgenes producía una inhibición en la expresión de algunos genes como el de β -globina, α -actina y α -fetoproteína. Entonces se comenzaron a utilizar transgenes a los cuales se les removían estas secuencias antes de realizar las microinyecciones. Sin embargo, algunos otros genes como los de inmunoglobulina (Ig), elastasa y colágeno al parecer no eran afectados significativamente por la presencia de las secuencias procariotas y eran expresados independientemente de la posición cromosomal en donde se habían insertado. Al analizar las diferencias entre los genes que sí eran afectados por las secuencias procariotas y los que no se observó que estos últimos contenían secuencias 5' con respecto al sitio de inicio de la transcripción. De ahí se dedujo que en esas regiones debían encontrarse elementos reguladores que promovían la expresión de los genes.

Ahora sabemos que se trata de los promotores y enhancers. Los promotores están localizados (en su mayoría) río arriba del sitio de inicio de la transcripción y son normalmente de una longitud de alrededor de 100 pb. Se requieren para que el inicio de la transcripción sea precisa y eficiente, mientras que los enhancers tienen como función la de aumentar la transcripción. La característica distintiva de los enhancers es que pueden actuar sobre los promotores desde grandes distancias, en una forma independiente de su orientación y algunas veces desde río abajo de la unidad transcripcional (Lewin, 2000; Maniatis et al., 1987).

En los promotores se encuentran secuencias cuya función es la de controlar la expresión del gen. Entre estas, existe una región rica en AT que se conoce como la caja TATA, además de uno o más elementos de entre 8 a 12 pb conocidos como elementos promotores río arriba (UPEs, por sus siglas en inglés: upstream promoter elements). En la mayoría de los promotores la caja TATA se encuentra situada aproximadamente a 25 pb río arriba del sitio de inicio y tiende a estar rodeada de regiones ricas en GC, lo cual parece ser importante en su funcionamiento. Existe una minoría de promotores que no contienen la caja TATA. De manera general, la transcripción comienza con la unión de factores de transcripción a la caja TATA, lo cual marca el inicio de la formación del complejo transcripcional. Además, existen también otras regiones consenso que son requeridas para la unión del resto de la maquinaria transcripcional. Aproximadamente a 75 pb río arriba del sitio de inicio (-75) se encuentra una de estas regiones, la caja CAAT, llamada así por su secuencia consenso. La caja CAAT juega un papel crucial en la eficiencia del promotor mas no así en la determinación de especificidad del mismo. Otra secuencia importante es la caja GC que se localiza a -90 pb y contiene la secuencia GGGCGG. Frecuentemente se pueden encontrar multiples copias de este elemento y pueden estar en cualquier dirección (Lewin, 2000).

Estos son los elementos básicos de un promotor y aunque la mayoría de los promotores comparten en cierto grado esta estructura, su funcionalidad y especificidad van a depender de los factores de transcripción que se unan a él y si también a la presencia o ausencia de enhancers. Por ejemplo, el enhancer de Ig dirige la expresión de Ig o *myc* a células B (Iglesias et al., 1987; Ritchie et al., 1984) pero incrementa la

expresión del antígeno T de SV40 en varios tejidos (Suda et al., 1987). Se ha demostrado que existe una gran variedad de promotores específicos para un solo tipo de tejido, lo cual es una gran ventaja en la producción de ratones transgénicos porque con ellos es posible dirigir la expresión de un transgen a un tejido específico. En la TABLA 1 se muestra una lista parcial de promotores específicos y el tejido en el que son activos. También se ha mostrado que los promotores que son sujetos a regulación por estímulos hormonales o ambientales son capaces de controlar apropiadamente la expresión de transgenes. Entre estos se encuentran el promotor de la metalotioneína, que es estimulado con metales pesados (Choo et al., 1987; Palmiter et al., 1983); además de promotores regulados por hormonas como el del virus de tumores mamarios de ratón (MMTV-LTR) (Choi et al., 1987), el gen de la transferrina (Hammer et al., 1986) y el gen H-2 E_α (Le Meur et al., 1985), entre otros.

Aplicaciones de la tecnología transgénica

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Modelos de oncogénesis y enfermedades. La tecnología transgénica ha sido de mucho valor en el estudio de las consecuencias de la expresión de oncogenes en los animales.

Con el uso de ratones transgénicos se han podido abordar problemas que no era posible aclarar satisfactoriamente en cultivos de tejidos. Por ejemplo, se puede saber que tipo de tejidos son más susceptibles a la actividad transformante de un oncogene, se puede establecer la relación entre las múltiples etapas de la oncogénesis así como la cooperatividad entre oncogenes y el efecto de los oncogenes sobre el crecimiento y la diferenciación. Cuando un gene celular es introducido a la línea germinal bajo el control

Tejido	Gen o Promotor
Cerebro	MBP, <i>Thy-1</i> , NFP, GRH, VP
Cristalino	Cristalino
Células Epiteliales de Glándula Mamaria	β -Lactoglobulina, WAP
Espermátidas	Protamina
Páncreas	Insulina, Elastasa
Riñón	Ren-2
Hígado	Alb, AGP-A, CRP, α 2u-G, AAT, HBV
Saco Vitelino	α -Fetoproteína
Tejidos Hematopoyéticos	
▪ Células eritroides	β -Globina
▪ Células B	κ Ig, μ Ig
▪ Células T	Receptor de Células T, <i>lck</i>
▪ Macrófagos	M-MuLV LTR
Tejido Conectivo	MSV LTR, Colágeno, Vimentina
Músculo	α -Actina, Cadena Ligera de Miosina
Varios Tejidos	H-2 (HLA), β 2-m, CuZn SOD

ATT, α 1-antitripsina; AGP-A, α 1-glicoproteína ácida; Alb, albúmina; α 2u-G, α 2u globulina; β 2-m, cadena β 2 de la microglobulina; CRP, Proteína C-reactiva; CuZn SOD, Dismutasa superoxidasa de Cu/Zn; HLA, Antígenos de histocompatibilidad; MBP, Proteína mielina básica; MSV, Virus del sarcoma murino; NFP, Proteína de neurofilamentos; Ren-2, Renina 2; VP, Vasopresina; WAP, Proteína acídica whey. Adaptada de Jaenisch, Science, 1988.

TABLA I. Promotores tejido específicos que se utilizan en la generación de ratones transgénicos.

de un promotor exógeno, se asume que el fenotipo obtenido en los animales transgénicos revelará no solamente las consecuencias patológicas de la expresión no regulada del transgen, sino que también ayudará en el análisis de su función normal en el desarrollo y diferenciación. Por otro lado, los fenotipos que se han inducido en ratones transgénicos mediante la expresión de genes virales han venido a constituir excelentes modelos para el estudio de enfermedades que en algunos casos son muy parecidas a las humanas. La tabla 2 muestra algunos oncogenes que han sido expresados transgénicamente en ratones.

Sistema Inmune. Los ratones transgénicos también han sido importantes en el estudio de la expresión de inmunoglobulinas. Se ha mostrado que genes de Ig funcionalmente rearrreglados al ser introducidos en línea germinal se activan y alteran la expresión del repertorio de Igs endógenas (Ritchie et al., 1984). Así, se ha encontrado que las cadenas ligeras y pesadas, cuando son expresadas en suficiente cantidad, pueden interferir por algún mecanismo de autoregulación con rearrreglos posteriores de genes de Igs, así como causar anomalías muy complejas en el sistema inmune. También se han usado ratones transgénicos en el estudio de los genes de clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (Le Meur et al., 1985; Pinkert et al., 1985; Yamamura et al., 1985).

Marcadores de linaje. Un tópico muy importante en la biología es la construcción de mapas confiables que describan la ascendencia, la locación y el compromiso celular en el embrión en desarrollo. En el estudio del linaje celular del embrión implantado era necesario el desarrollo de marcadores estables de las células progenitoras individuales que dejaran el embrión inalterado. La introducción de DNA exógeno en embriones

Organo o tejido Afectado	Oncogene	Tipo de construcción	Fenotipo	Referencia
Páncreas	SV40	Elastasa 1 de rata (rE1)	Tumores de células acinares	Ornitz et.al. 1987
	SV40	Enhancer de SV deletado ^a (SVΔ-e-MGH)	Adenomas de cels. De isletas	Messing et.al. 1985
	SV40	Insulina II de rata (RIP1-Tag, (RIR-Tag)	Hiperplasia de cels. β	Hanahan 1985
Glándula Mamaria	c-myc	Promotor/enhancer de MMTV ^b (MTV/c-myc)	Adenocarcinomas	Stewart et.al. 1984
	c-myc	Promotor de la proteína ácida whey de ratón (wap-myc)	Adenocarcinomas	Schoentemberger et.al. 1988
	Ha-ras	(wap-ras)	Tumores de lento desarrollo	Andres et.al. 1987
	Ha-ras	Promotor/enhancer de MMTV (MTV/v-Ha-ras)	Adenocarcinomas	Sinn et.al. 1987
Glándula Salivar	c-neu	Promotor/enhancer de MMTV (MTV-c-neu)	Adenocarcinomas	Müller et.al. 1988
	Ha-ras	(wap-ras)	Adenocarcinomas	Andres et.al. 1987
	Ha-ras	Promotor/enhancer de MMTV (MTV/V-Ha-ras)	Adenocarcinomas	Sinn et.al. 1987
Piel	Papiloma bovino	Plásmido linearizado (BPV-1)	Fibropapilomas	Lacey et.al. 1986
Cerebro	SV40	Adenovirus 2 y 5 (pK4)	Glioblastomas	Kelly at.al. 1986
	SV40	Gen de fusión de metalotionefina (SV-MGH)	Papilomas en el plexus coroideo	Palmiter et.al. 1985
	SV40	Enhancer de Ig humana y promotor T de SV40 ^c (Ig/Ip-T)	Tumores en el plexus coroideo	Suda et.al. 1987
Sist. Nervioso Periférico	SV40	Enhancer deletado de SV (SVΔe-MGH)	Neuropatías desmielinizantes	Messing et.al. 1985
Ojo	SV40	Promotor del αA-cristalino (α-crys-Tag)	Tumores en las cels. Epiteliales del cristalino	Mahon et.al. 1987
Hígado	SV40	Enhancer deletado de SV ^a (SVΔe-MGH)	Carcinoma	Messing et.al. 1985
Pulmón	Ha-ras	Enhancer de Ig humana (Ig/Ip-ras)	Tumores adenomatosos multicéntricos	Suda et.al. 1987
Endotelio Vascular	Región T-media de Polioma	Retrovirus no replicable (py-MT)(N-TKmt) ^d	Hemangiomas	Bautch et.al. 1987 Williams et.al. 1988
Células Linfoides	c-myc	Enhancer de Ig murina (Eμ-myc)	Linfomas de cels. B	Adams et.al. 1985
	c-myc	Promotor/enhancer de MMTV ^b (MTV/c-myc)	Linfomas B, T, no-B y no-T	Leder et.al. 1986
	c-myc	Enhancer de Ig humana ^c (Ig/Ip-myc)	Linfomas pre-B	Suda et.al. 1987
Corazón	SV40	Secuencias adyacentes al gen de murino de la protamina 1 (mP1-SV40)	Rhabdomio-sarcomas	Behringer et.al. 1988
Hueso	SV40	Secuencias adyacentes al gen de murino de la protamina 1 (mP1-SV40)	Osteosarcomas	Behringer et al. 1988
Testículos	c-myc	Promotor/enhancer de MMTV ^b (MTV/c-myc)	Neoplasmas de cels. de Sertoli	Leder et al. 1986

- a Como gen de fusión con el gen de la hormona de crecimiento metalotionefina humana
b MMTV, mouse mammary tumor virus (virus de tumores de glándula mamaria de ratón)
c Enhancer de la inmunoglobulina humana y promotor T de SV40
d Región t-media ligada al promotor de la timidina kinasa del virus del herpes simplex.

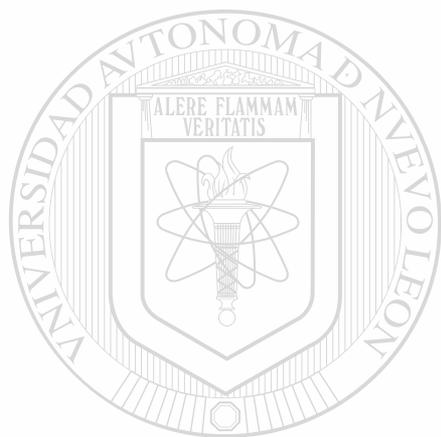
TABLA 2. Oncogenes que han sido expresados transgénicamente en ratones.

después de la etapa de una célula produce mosaicismo genético que puede ser utilizado para analizar tales relaciones de linaje. El primer estudio de este tipo, que utilizó retrovirus como marcadores genéticos, mostró que aproximadamente 8 células eran asignadas para la formación de todos los tejidos somáticos, mientras que las células germinales parece ser que son asignadas antes que las somáticas (Soriano and Jaenisch, 1986).

Marcadores para regiones cromosomales. La inserción de DNA exógeno puede servir como marcador molecular para las regiones adyacentes del loci huésped para las cuales no sería posible obtener sondas de alguna otra manera. Por ejemplo, un genoma proviral integrado en la región pseudoautosomal de los cromosomas sexuales del ratón resultó ser un marcador único para el análisis de esta región, que está compuesta de secuencias altamente repetidas (Harbers et al., 1986; Soriano et al., 1987).

Mutaciones en ratones transgénicos. La inserción de transgenes en el genoma celular puede causar mutaciones debido a la eliminación de la función de un gen endógeno. La mayoría de las inserciones producen mutaciones que son recesivas y han sido observadas lo mismo en embriones infectados con retrovirus que en aquellos en donde se utilizó la microinyección de pronúcleos para su generación. Los retrovirus inducen mutaciones a una frecuencia de alrededor del 5 al 6 %, mientras que con la inyección del transgen en los pronúcleos parece ser que dicha inducción es mayor (Copeland et al., 1989; Spence et al., 1989). La generación de mutantes por inserción de transgenes es atractiva debido a que, como se mencionaba en la parte anterior, el mismo DNA introducido puede ser

utilizado como sonda para identificar el sitio de inserción y las secuencias del huésped adyacentes al mismo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

p53

p53 es un gen supresor de tumores que se encuentra involucrado, directa o indirectamente, en la mayoría de las neoplasias humanas. La observación de que había una frecuencia extraordinariamente alta de mutaciones en *p53* en diversos tipos de cánceres humanos, ha sido confirmada y ampliada con el análisis de más de 2500 tumores y líneas celulares de tumor. Más de la mitad de las principales formas de cáncer contienen mutaciones en *p53* (Hollstein et al., 1994; Hollstein et al., 1991).

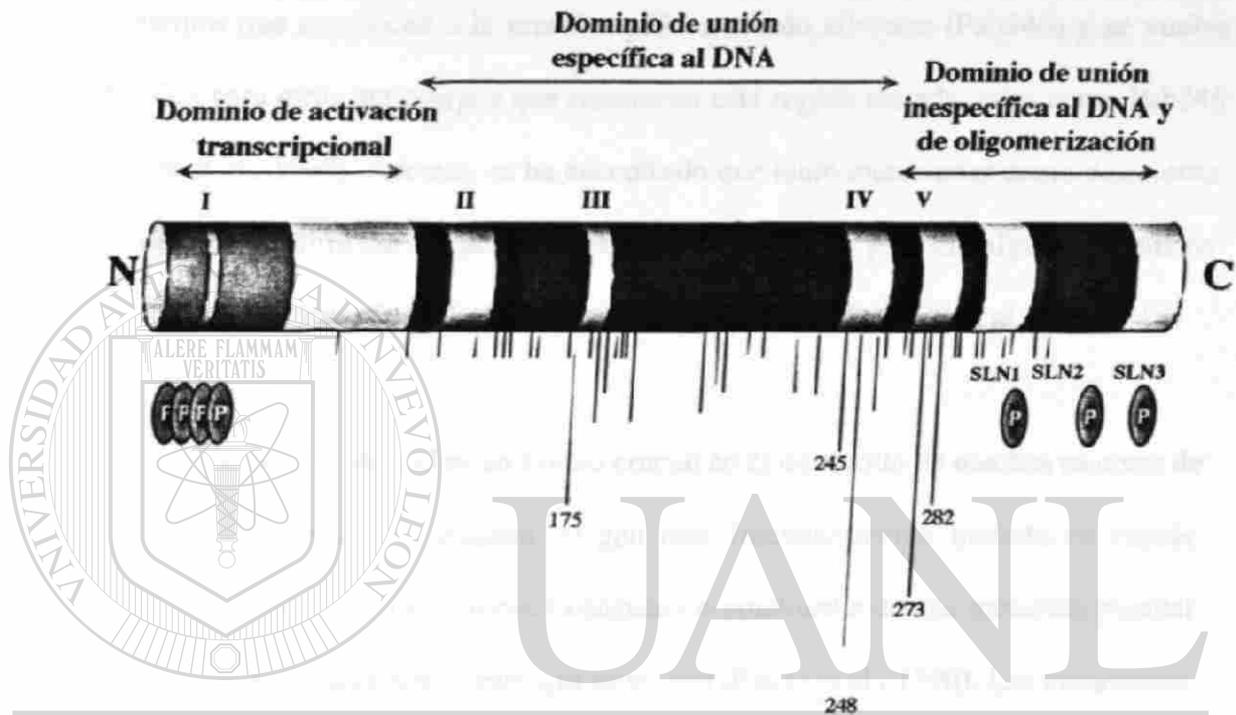
p53 es crucial para la regulación del ciclo celular bajo condiciones de daño al DNA y fué identificado originalmente por su asociación con la oncoproteína viral antígeno T grande de SV40 (Lane, 1979). Debido a que *p53* se encontró asociada con una oncoproteína viral, en niveles elevados en células transformadas [Oren, 1982 #3 y a que mostró cooperación con *ras* para transformar células (Eliyahu et al., 1984; Parada et al., 1984), se le consideró en un principio como un oncogene. Pero subsecuentes investigaciones indicaron que el gen *p53* estaba mutado y que su función real es la regulación del crecimiento celular y por lo tanto, que debía ser reclasificado como un supresor de tumores.

El gen *p53* está localizado en el cromosoma 11 en el ratón y en el 17p13 en el humano (Benchimol et al., 1985; Donehower et al., 1992). Contiene 11 exones, el

primero de los cuales es no codificante (Oren, 1985). Este gen se encuentra conservado entre todas las especies vertebradas analizadas, incluyendo humano, ratón, rata, mono, rana y trucha. A nivel de proteína se distinguen 5 regiones muy conservadas entre las diferentes especies, y corresponden a los siguientes aminoácidos: I, 13-17; II, 117-142; III, 171-181; IV, 234-258 y V, 270-286 de la proteína humana (figura 2). La homología en la secuencia de aminoácidos de la proteína p53 entre el humano y el ratón es de 81 %, mientras que su homología en las regiones altamente conservadas es de 99 % (Soussi et al., 1990).

La proteína p53, que consta de 390 aminoácidos en el ratón y de 393 en el humano, migra con una movilidad relativa equivalente a 53 kD en geles de poliacrilamida-SDS. Estudios de la secuencia de aminoácidos dan algunos indicios de su función. El extremo amino terminal contiene un grupo de residuos ácidos dispuestos en alfa hélice, que es un dominio común en muchos activadores transcripcionales ácidos.

El extremo carboxilo contiene una región básica dispuesta en alfa hélice (Soussi et al., 1990) que está involucrada en oligomerización (Sturzbecher et al., 1992). En esta región también se encuentran tres señales de translocación al núcleo (Shaulsky et al., 1990), las cuales están muy conservadas en las proteínas p53 de mamíferos. Aquí también radica la capacidad de unión inespecífica al DNA (Foord et al., 1991), ya que se ha demostrado que proteínas p53 con el extremo carboxilo truncado no oligomerizan ni se pueden unir al DNA. En cuanto a la región central de la proteína, la cual es hidrofóbica, rica en prolina y conformada por laminas beta, es la que le da especificidad de unión al DNA, es por eso que esta región es más conservada que las regiones amino y carboxilo terminales y



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 2. Estructura de la proteína p53 humana. N, terminación amino. C, terminación carboxilo. P, sitio de fosforilación. SLN, señal de localización nuclear. I, II, III, IV y V, dominios altamente conservados entre especies. Las líneas verticales indican los sitios altamente predispuestos a mutaciones.

contiene cuatro de los cinco dominios altamente conservados de p53 (Soussi et al., 1990); en esta región se localizan la mayoría de las mutaciones que inactivan a p53 y que están asociadas con tumores humanos (Hollstein et al., 1991). Las mutaciones en esta región cambian la conformación de la proteína de manera que ya no es reactiva a anticuerpos que reconocen a la proteína p53 en estado silvestre (Pab246) y se vuelve específica para otros anticuerpos que reconocen esta región mutada, tales como Pab246 (Gannon et al., 1990). Además, se ha encontrado que tanto mutaciones como deleciones en esta región eliminan la actividad transcripcional de p53 en algunos modelos experimentales (O'Rourke et al., 1990; Raycroft et al., 1991; Raycroft et al., 1990).

La inactivación de p53 es un evento crucial en el desarrollo de muchos tumores de orígenes diversos, y es en realidad, el gen más frecuentemente mutado en cáncer (Hollstein et al., 1991). Las alteraciones consisten normalmente de una mutación puntual en uno de los alelos y deleción o rearreglo en el otro (Baker et al., 1990). Las mutaciones puntuales a menudo ocurren en el dominio de unión específica al DNA y eliminan la capacidad de p53 de unirse al DNA y activar la transcripción de genes blanco (De Fromental and Soussi, 1992; Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). Otros mecanismos por los cuales se puede inactivar p53 en tumores son: exclusión nuclear (Moll et al., 1992), inactivación viral y amplificación del gen *mdm2*. La unión de la proteína E6 del virus del papiloma humano induce la ubiquitinación y consecuente degradación de p53 en el desarrollo de carcinomas de ovario. La amplificación del gen *mdm2*, que ocurre en el 33 % de los sarcomas, resulta en la sobreproducción de la proteína MDM2 que inhibe las funciones de p53 (Momand et al., 1992; Oliner et al.,

1992). Por lo tanto, además de las mutaciones en el gen *p53 per se*, alteraciones en otros componentes de su vía contribuyen también al desarrollo de tumores.

Mutaciones congénitas de *p53* en línea germinal están asociadas con el síndrome de Li Fraumeni (LFS) (Malkin et al., 1990; Srivastava et al., 1990). Este síndrome familiar es un desorden autosomal familiar que se caracteriza por una aparición temprana de múltiples tumores primarios en tejidos suaves. Más del 60% de las familias con LFS presentan mutaciones en uno de los alelos del gen *p53* (Evans and Lozano, 1997). La herencia en la línea germinal de un alelo mutante de *p53* incrementa considerablemente la predisposición al desarrollo de tumores, ya que únicamente se requerirá de inactivar el alelo silvestre restante, hecho que ha sido encontrado en numerosas muestras de tumores provenientes de estas familias (Barel et al., 1998; Hung et al., 1999; Sedlacek et al., 1998). La eliminación del gen *p53* del genoma de ratones a través de recombinación homóloga produce ratones que, aunque son morfológicamente normales, desarrollan tumores a una velocidad muy elevada comparada con aquellos que aún tienen *p53* (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). Una vez más, la ausencia de *p53* muestra que es un factor de propensión para tumorigénesis.

Estudios en cultivo de tejidos han comprobado el efecto que tiene *p53* como agente supresor de tumores. La introducción de *p53* en células cultivadas de carcinoma colorrectal que carecen de *p53* redujo el fenotipo tumorigénico de estas células (Baker et al., 1990). En ensayos de formación de focus, *p53* redujo la transformación mediada por la combinación de varios oncogenes cooperadores (Eliyahu et al., 1984).

El mecanismo molecular por medio del cual *p53* funciona en la célula para regular su crecimiento aún no se ha definido en su totalidad. *p53* está involucrado en una variedad de procesos celulares, entre los que se incluyen: transactivación, muerte celular programada (apoptosis), ciclo celular, reparación del DNA y replicación (Friedman et al., 1990; Sturzbecher et al., 1988; Tack et al., 1989). Algunos trabajos indican que la replicación puede ser una respuesta a activadores transcripcionales (Baru et al., 1991). Se ha mostrado que *p53* inhibe la replicación inducida por el antígeno T mayor de SV40 (Bargonetti et al., 1991), y que se une a la proteína A de replicación (Dutta et al., 1993; Li and Botchan, 1993). También, algunos experimentos indican que *p53* produce una inhibición de la división celular en la etapa tardía de la fase G1 del ciclo celular, esto es, un poco antes de que la replicación, que se produce en la fase S, tome lugar (Baker et al., 1990; Chen et al., 1990).

Muchos tipos de células transformadas, como el carcinoma colorrectal (Baker et al., 1990), osteosarcoma (Chen et al., 1990), fibroblastos transformados de rata (Martinez et al., 1991), glioblastomas (Mercer et al., 1990) y leucemia mieloide crónica (Johnson et al., 1991), detienen su división cuando el *p53* silvestre es sobreexpresado. En tanto que en otros tipos de células, esta sobreexpresión las conduce a una muerte celular programada. La inducción de *p53* silvestre en células de leucemia mieloide (Yonish-Rouach et al., 1991), linfoma de Burkitt (Ramqvist et al., 1993), eritroleucemia y cáncer de colon, lleva las células a apoptosis tres o cuatro horas después de la expresión de *p53* (Yonish-Rouach et al., 1993). Sin embargo, la causa de que la sobreexpresión de *p53*

algunas veces produzca inhibición de la división celular, mientras que otras apoptosis, aún es desconocida.

Muchos aspectos de la vía de *p53* aún necesitan ser descifrados. Normalmente las células tienen un nivel basal de la proteína *p53*, pero este se ve incrementado drásticamente cuando el DNA es dañado por agentes tales como: luz ultravioleta (U.V.), radiaciones ionizantes, choque térmico, hipoxia, hiperoxia y drogas quimioterapéuticas. En respuesta a la mayoría de estos agentes, los niveles de la proteína *p53* se incrementan de 1 a 12 horas después del tratamiento. Este aumento es debido a la combinación de una elevación en la traducción de *p53* y una inhibición en su degradación (Maltzman and Czyzyk, 1984). La generación de cortes a la doble cadena de DNA induce la activación de *p53*, además, *p53* tiene afinidad por DNA de cadena sencilla y por extremos cortados de DNA. La ausencia de actividad de *p53* debida a mutaciones en el propio gen o a alteraciones en la vía de señalización que es activada por *p53*, permite que la célula continúe su ciclo a pesar de daños en el DNA. Esto provoca que la descendencia acumule mutaciones que la puede llevar a la inmortalización y transformación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La capacidad de desarrollar ratones carentes de *p53* demostró que *p53* no es indispensable para el crecimiento, diferenciación y desarrollo de los embriones (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el fondo genético en el cual se encuentra inactivado el gen *p53* puede influenciar significativamente el fenotipo de los ratones carentes de *p53*. Los ratones que son heterocigotos para el alelo mutante de *p53* desarrollan tumores desde los 9 meses de

edad y presentan una supervivencia promedio de 18 meses. Estos ratones muestran una gran variedad de tumores, siendo los sarcomas los de mayor prevalencia. En los pacientes de Li-Fraumeni el tipo de tumor más frecuente también son los sarcomas, lo cual convierte a estos ratones en un muy buen modelo de estudio para el síndrome de Li-Fraumeni. Por otro lado, los ratones que carecen de *p53* son también muy susceptibles al desarrollo de tumores, aproximadamente un 75 % de ellos presentan múltiples tipos de tumores a los seis meses de edad y tienen una supervivencia promedio de 19 semanas. El principal tipo de tumor que se desarrolla en estos ratones es el linfoma de timo, con una incidencia de alrededor del 71%. Mientras que un pequeño porcentaje de ellos desarrollan algún otro tipo de tumor, ya sea solo o en conjunto con el linfoma de timo. Durante el desarrollo embrionario de estos ratones, a excepción de que 20% de las hembras *-/-* desarrollan exencefalia (Sah et al., 1995), no se observan otras anomalías.

Aunque no está completamente entendido cómo *p53* lleva a cabo su efecto en las células, es claro que la función de activar la transcripción es uno de los principales aspectos de sus efectos biológicos (Crook et al., 1994; Pietenpol et al., 1994). La identificación de los blancos transcripcionales de *p53* ha sido crítica para discernir las vías por las que *p53* produce respuestas celulares tales como crecimiento, inhibición y muerte celulares. Existen varios genes que se consideran mediadores de la respuesta de *p53* y que son particularmente relevantes para las funciones biológicas de *p53*, algunos de los cuales se mencionan a continuación: *p21^{WAF1/Cip1}*, que codifica una proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), induce arresto en la fase G1 del ciclo celular dependiente de *p53*. Aún y cuando los ratones que carecen de *p21* son viables y no

desarrollan tumores, tienen una deficiencia de alrededor del 60% en la inducción de arresto celular dependiente de p53 (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995). Recientemente se describió un nuevo gen blanco de p53 que también está implicado en inhibición del crecimiento, *14-3-3 σ* (HME1, Stratifin), sólo que el producto de este gen genera inhibición de ciclo celular en la fase G2 (Hermeking et al., 1997) y no en G1 como lo hace p21. La expresión exógena de esta proteína produce un bloqueo del ciclo celular no coordinado, con síntesis de DNA pero sin mitosis, que da lugar a poliploidía. Otro gen implicado en control de crecimiento es *PTGF- β* (p53-induced Transforming Growth Factor β), que se expresa altamente en placenta, está implicado en la formación de cartilago y hueso, además de tener actividad anti-inflamatoria e inhibir la proliferación de progenitores hematopoyéticos (Tan et al., 2000).

Entre los genes blanco de p53 que están involucrados en la vía de apoptosis se encuentran: *bax*, que pertenece a la familia de Bcl2, es regulado positivamente por p53 y codifica una proteína que promueve apoptosis (Miyashita and Reed, 1995). *Fas/APO-1*, receptor de la familia del receptor de TNF (TNF-R) que activa apoptosis después de la unión de anticuerpos específicos (Owen-Schaub et al., 1995). *IGF-BP3* (Insulin-like growth factor binding protein 3), la proteína codificada por este gen, inhibe la señalización por el factor de crecimiento tipo insulina y por lo tanto, es antimitogénico, lo cual representa otra posible vía por la cual p53 puede inhibir el crecimiento (Buckbinder et al., 1995). *PAG608/wig-1*, produce una proteína que se localiza principalmente en nucleólo y cuya expresión se induce por daño al DNA y activa apoptosis (Israeli et al., 1997). *KILLER/DR5*, otro miembro de la familia de TNF-R que activa la cascada de

caspasas (Wu et al., 1997). *TRUNDD*^{DcR2/TRAIL-R4}, un receptor 'falso' de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) que retrasa la apoptosis mediada por KILLER/DR5 y p53 (Meng et al., 2000). *PUMA*, su producto contiene dominios BH3 clásicos de la familia de Bcl2 los cuales utiliza para unirse a Bcl2 y de esa manera inducir la activación de apoptosis (Nakano and Vousden, 2001; Yu et al., 2001). *NOXA*, proteína inducida por rayos X que también contiene dos dominios BH3 y se localiza en la mitocondria, donde activa la caspasa 9 (Oda et al., 2000). *PERP* (p53 apoptosis Effector Related to PMP-22), proteína transmembranal que se activa rápidamente después de daño al DNA e induce apoptosis (Attardi et al., 2000). *HSP27*, proteína de choque térmico cuya expresión es inducida por eliminación de andrógeno y que está implicada en resistencia a apoptosis inducida por drogas citotóxicas (Gao et al., 2000). *P53AIP1* (p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1), proteína mitocondrial que depende de la fosforilación de la serina 46 de p53 para su activación transcripcional y que provoca muerte celular por la disipación de la molécula $\Delta\Psi_m$ mitocondrial (Oda et al., 2000). *P53DINP1* (p53-dependent

Damage-Inducible Nuclear Protein 1), la sobre-expresión de su proteína induce la fosforilación de la serina 46 de p53, que induce *p53AIP1* y por consecuencia apoptosis (Okamura et al., 2001). Sin embargo, ninguno de estos genes ha mostrado de manera individual ser esencial para la apoptosis dependiente de p53. Por ejemplo, ratones carentes de *Bax* o *Fas* pueden presentar apoptosis dependiente de p53 (Knudson et al., 1995; Reinke and Lozano, 1997). Esto es debido muy probablemente a que varios de los genes mencionados pueden tener funciones redundantes y la eliminación de uno de ellos es compensada por otro. Además, existen reportes que sugieren que p53 es capaz de inducir apoptosis independiente de transcripción (Caelles et al., 1994). Pero

recientemente se generó un ratón que tiene mutado el gen de p53 (Leu25 a Glu, Trp26 a Ser) y produce una proteína cuyo único defecto es que no puede inducir transcripción (Jimenez et al., 2000). Los ratones homocigotos para esta mutación presentan un fenotipo muy similar al de los ratones que carecen de p53, lo que indica que la funcionalidad de p53 es principalmente a través de la activación de la transcripción de sus genes blanco. La figura 3 muestra las vías de p53 y algunos de los genes implicados en las mismas.

Otros genes blanco de p53 que no están implicados en inhibición del crecimiento celular o apoptosis son: *mdm2* codifica una proteína que forma un complejo con p53 e inhibe su capacidad de activación transcripcional; *GADD45*, cuyo producto interactúa con el factor de replicación y reparación PCNA e inhibe la entrada de las células a la fase S; *ciclina G*, que codifica un ciclina, la que aún no se ha demostrado se asocia o active a alguna CDK conocida.

Más candidatos para genes de respuesta a p53 incluyen los que codifican para el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), trombospondina-1, metaloproteinasas de matriz (MMPs), catespina D, Kang ai (KAI1) factores de crecimiento de fibroblastos, retinoblastoma, PCNA, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), ciclina D, creatina kinasa y el gen de la resistencia a multidroga 1 (MDR1) (Dameron et al., 1994; Ko and Prives, 1996; Sun et al., 1999). Recientemente se han identificado más genes blanco de p53: La enzima antioxidante Glutathion Peroxidasa (GPX) (Tan et al., 1999), la proteína de unión a Calcio S100A2, *TP53TG1* (Takei et al., 1998), *TP53TG3*

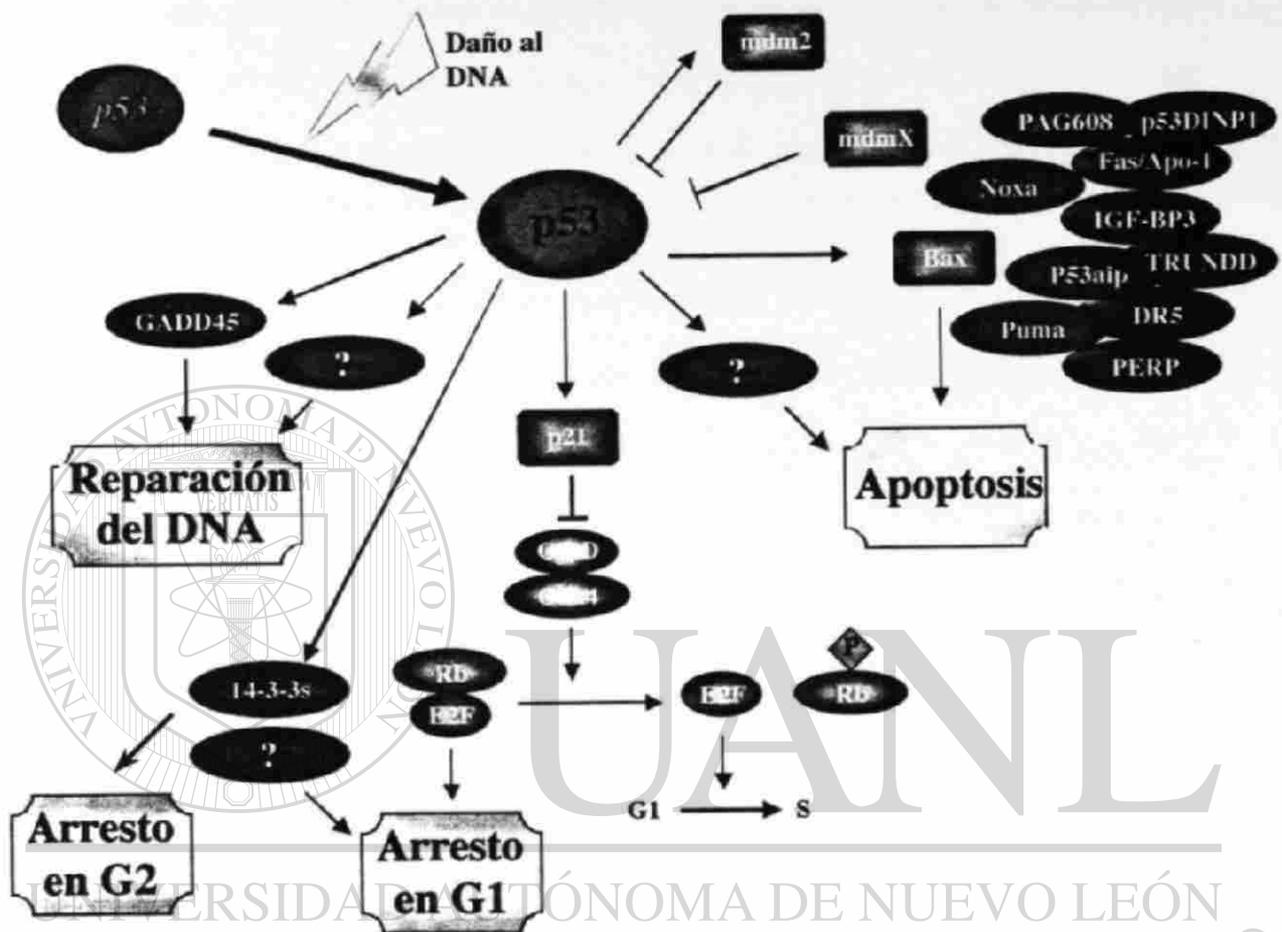
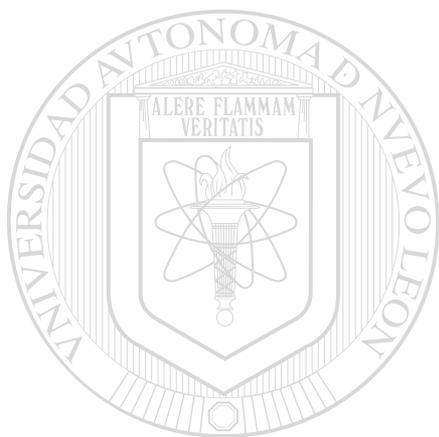


Figura 3. Las vías de p53. Las flechas (↓) representan inducción, mientras que las otras líneas (⊥) representan bloqueo.

(Ng et al., 1999), *p53R2* (Tanaka et al., 2000), *GML* (Furuhata et al., 1996), *P2XM*
(Urano et al., 1997), *BA11* (Nishimori et al., 1997) y *CSR* (Han et al., 1998).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



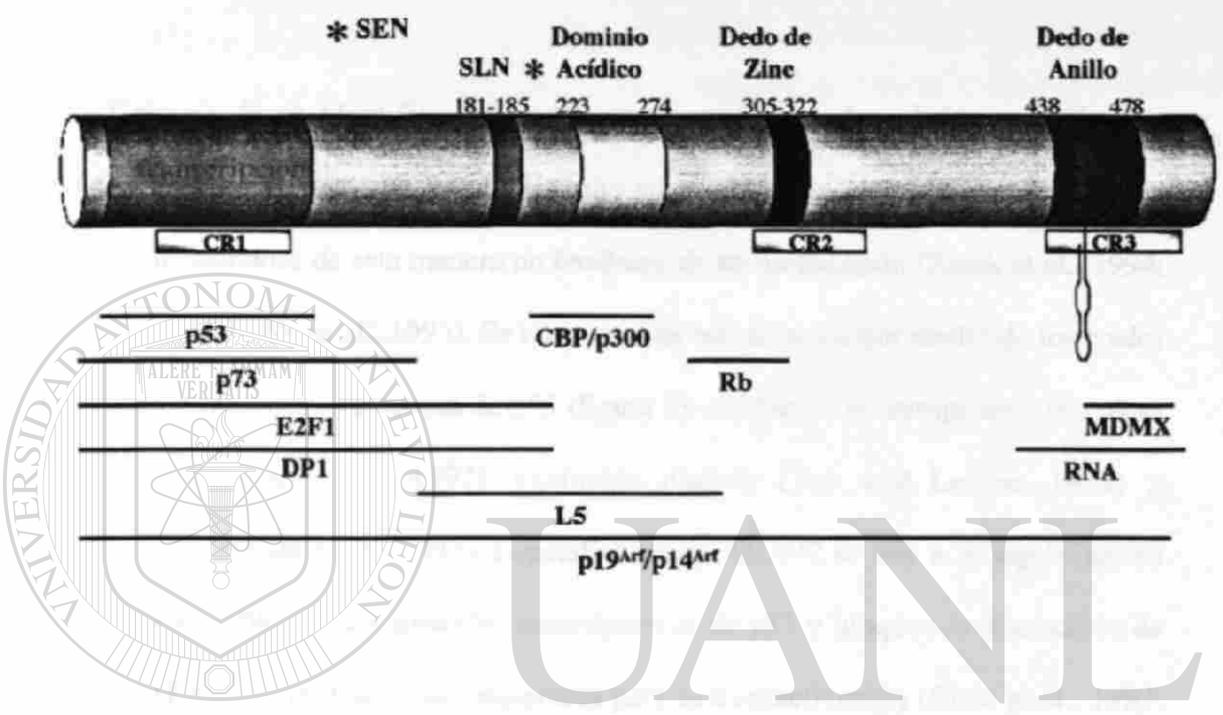
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

mdm2

El gen *mdm2* fue clonado originalmente de la línea celular murina transformada 3T3DM. Es uno de tres genes mantenidos establemente en la forma de minutos dobles (murine double minutes) y es el responsable de la transformación de la línea celular 3T3DM (Fakharzadeh et al., 1991). Esto se confirmó al demostrarse que la sobreexpresión de MDM2 ocasionó una transformación de las líneas celulares NIH3T3 y RAT2. Además, estas células produjeron tumores en ratones desnudos mientras que las células parentales no lo hicieron. La sobreexpresión de *mdm2* también ocasionó transformación de una línea celular normal de fibroblastos de embrión de rata (FERs) en combinación con el gen *ras* activado (Finlay, 1993). Estos datos apoyan el hecho de que el gen *mdm2* es un oncogene.

La clonación y secuenciación del gen *mdm2* indicó que tiene dominios similares a los factores de transcripción (Fakharzadeh et al., 1991). Actualmente el gen *mdm2* se ha secuenciado en humano, hamster, ratón, pez zebra y rana. Su alineación muestra tres regiones con alta identidad y se les ha denominado CR1, CR2 y CR3. La identidad entre ellas es de 45%, 37% y 48% respectivamente, que es alta si se compara con 16% de identidad total entre dichos genes (Momand et al., 2000). MDM2 tiene un dominio de unión a zinc llamado dedo de anillo (figura 4)(Boddy et al., 1994). También cuenta con un dominio ácido entre los aminoácidos 230-301, que consta de un 37 % de residuos de ácidos aspártico y glutámico. Este dominio es capaz de activar la transcripción cuando se fusiona al dominio de unión al DNA *lexA* (Oliner et al., 1993). Además, se han

...ción de la proteína MDM2...
 ...ción de la proteína MDM2...
 ...ción de la proteína MDM2...



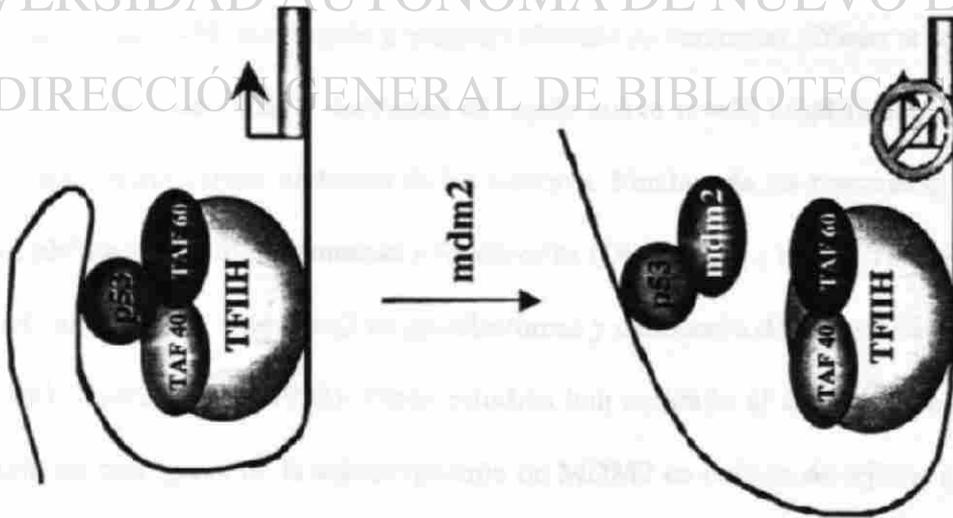
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 4. Organización de la proteína MDM2. SLN, señal de localización nuclear. SEN, señal de exportación nuclear. CR, regiones conservadas entre diferentes especies. Las líneas horizontales indican la región a la cual se unen las moléculas indicadas bajo cada línea.

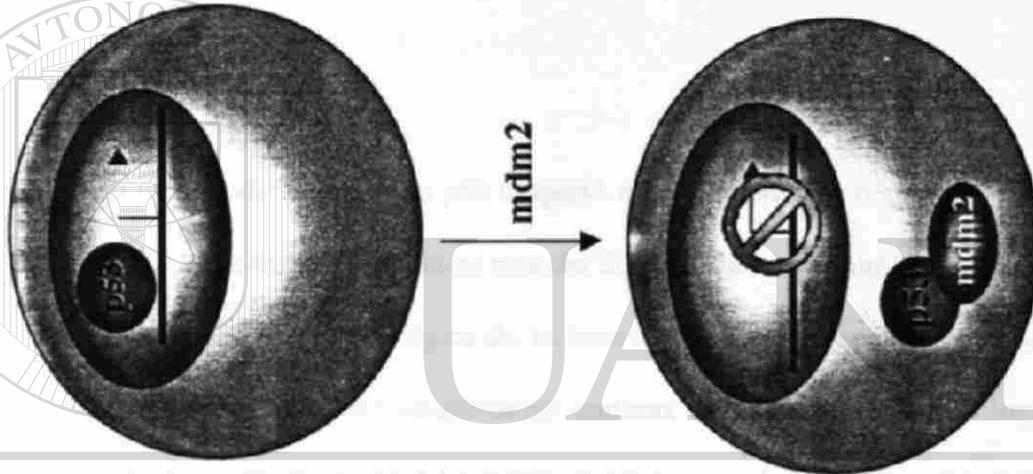
encontrado una señal de localización nuclear (SLN) entre los aminoácidos 178-182, para dirigir el transporte de MDM2 hacia dentro del núcleo; una señal de exportación nuclear (NES) que permite que MDM2 viaje del núcleo al citoplasma y; un dominio de unión de ATP (Momand et al., 2000).

Después de su identificación como un oncogene, se descubrió que *mdm2* es activado transcripcionalmente por p53 y que su producto se une a p53 e inhibe sus funciones, formándose de esta manera un feedback de autoregulación (Barak et al., 1994; Juven et al., 1993; Wu et al., 1993). Se conocen tres mecanismos por medio de los cuales MDM2 puede inhibir las funciones de p53 (figura 5): inhibición transcripcional (Barak et al., 1993; Momand et al., 1992), exclusión nuclear (Tao and Levine, 1999) y ubiquitinación (Honda et al., 1997). Específicamente, MDM2 se une a la región amino terminal responsable de la activación transcripcional de p53 y bloquea la interacción de p53 con TAF40 y TAF60, que son requeridos para la transactivación (Chen et al., 1993; Haines et al., 1994; Oliner et al., 1993). Además, cuando MDM2 se une a p53, el complejo es exportado al citoplasma mediante la señal de exportación nuclear de MDM2, hecho que impide que p53 se una al DNA y ejerza su acción transcripcional. El otro proceso de inactivación es la ubiquitinación de p53, que lo marca para degradación. La ubiquitina es un residuo proteico de 76 AAs que se une covalentemente a las proteínas substrato en sus grupos amino primarios (como la terminación amino o los residuos de lisina) (Hershko and Ciechanover, 1998) y produce una cadena de poli-ubiquitina. La conjugación con ubiquitina marca las proteínas para una proteólisis rápida por un proteosoma 26S que reside en el citoplasma. En uno de los pasos que conducen a la

Inhibición Transcripcional



Exportación Nuclear



Ubiquitinación

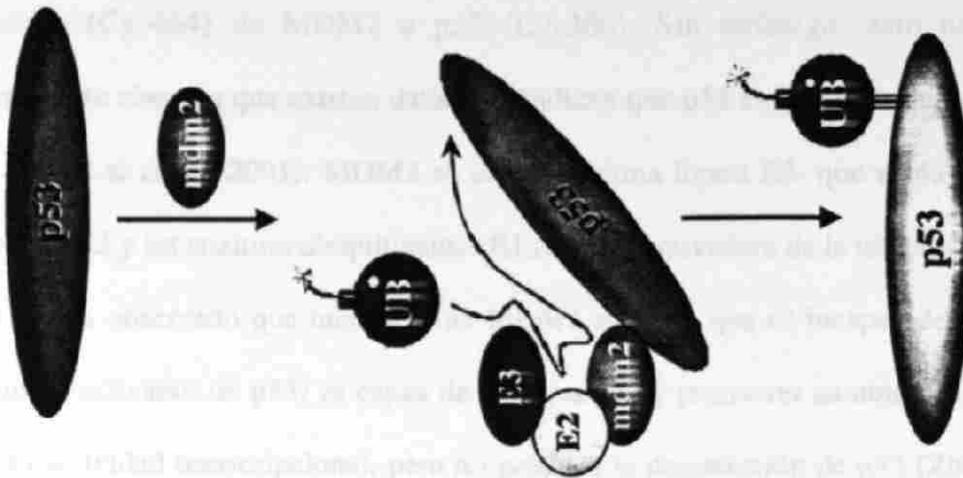


Figura 5. Mecanismos involucrados en la inactivación de p53 por MDM2.

proteólisis de p53, se produce la transferencia de una unidad de ubiquitina de un residuo de cisteína (Cys464) de MDM2 a p53 (Lys386). Sin embargo, esto no está completamente claro ya que existen datos que indican que p53 es mono-ubiquitinado en varios AAs (Lai et al., 2001). MDM2 es una ubiquitina ligasa E3, que actúa como la unión entre p53 y las enzimas ubiquitinantes E1 (enzima activadora de la ubiquitina) y E2 (Ubc4). Se ha observado que una proteína MDM2 mutante que es incapaz de unirse a p300 (un co-activador de p53) es capaz de unirse a p53 y promover su ubiquitinación e inhibir su actividad transcripcional, pero no produce la degradación de p53 (Zhu et al., 2001).

La interacción de MDM2 con p53 despertó mucho interés en el estudio de *mdm2* debido a que *p53* se encuentra mutado en más del 50 % de cánceres humanos (Greenblatt et al., 1994). La significancia biológica de la interacción entre estas dos proteínas fue esclarecida cuando se analizaron muestras de tumores en busca de modificaciones de

mdm2. La clonación y localización del gen *mdm2* del humano indicó que se encuentra en el cromosoma 12q13-14, una región a menudo alterada en sarcomas (Oliner et al., 1992).

El análisis de osteosarcomas y sarcomas de tejido suave reveló amplificación del gen *mdm2* en aproximadamente un tercio de los tumores. Muchos de los tumores que tenían *mdm2* amplificado, también contenían *p53* silvestre (Oliner et al., 1992). También se ha encontrado amplificación de *mdm2* en glioblastomas y carcinoma de pecho (Reifenberger et al., 1993; Sheikh et al., 1993). Otros estudios han ayudado al entendimiento de las consecuencias biológicas de la sobreexpresión de MDM2 en cultivo de tejidos e indican que podría cooperar con *ras* en la transformación de FERs. El análisis detallado de este

foci reveló la presencia de *p53* silvestre, en contraste a otros estudios que reportan que la transformación por *myc* y *ras* no puede tolerar la expresión de *p53* silvestre. Esto lleva a la hipótesis de que la sobreexpresión de MDM2 causada por la amplificación del gen representa un mecanismo alternativo para inactivar la función de *p53*.

La relación entre MDM2 y *p53* va más allá de interacciones proteína-proteína. El gen *mdm2* contiene un sitio de unión para *p53*, el cual, cuando es puesto junto a un promotor mínimo estimula la transcripción en una forma dependiente de *p53*. De hecho, la unión de *p53* al gen *mdm2* estimula la transcripción de un transcrito único que produce una proteína MDM2 capaz de unirse a *p53* e inactivarlo (Barak et al., 1994; Juven et al., 1993; Wu et al., 1993). Estos datos demuestran claramente un feedback autoregulatorio por medio del cual *p53* y MDM2 se regulan uno a otro.

Para estudiar las interacciones de MDM2 y *p53* *in vivo* se inactivó el gen *mdm2* en ratones utilizando recombinación homóloga en células embrionarias estaminales (ES). Se obtuvieron ratones heterocigotos para el alelo inactivado de *mdm2* y fueron fenotípicamente normales y fértiles. Sin embargo, no se identificaron mutantes homocigotos entre más de 50 crías nacidas de cruces entre heterocigotos, lo cual indicaba que los ratones deficientes en *mdm2* estaban muriendo durante la embriogénesis. Al analizar los embriones en diferentes etapas, se logró saber que mueren entre los 3.5 y 5.5 días de gestación.

Ya que *p53*, *p21* y *mdm2* son altamente expresados en células ES, lo cual indica que se expresan de manera temprana durante el desarrollo, se pudo hipotetizar que la letalidad embrionaria observada en ratones mutantes carentes de *mdm2*, es causada por la incapacidad de regular negativamente apoptosis o inhibición de la división celular dependientes de *p53*. Como los ratones deficientes en *p53* son viables y fértiles, se hicieron cruces entre ratones heterocigotos para *mdm2* y para *p53*. Al analizar la descendencia, se lograron identificar animales mutantes homocigotos para *mdm2* en un fondo genético deficiente de *p53*, pero no cuando *p53* era heterocigoto o silvestre. El rescate de la letalidad de embriones *mdm2* *-/-* en un fondo genético deficiente de *p53* sugiere que una de las principales funciones de MDM2 es la de regular negativamente la actividad de *p53* (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). Posteriormente se comprobó que la muerte de estos embriones es a través de la vía de apoptosis (Lisa L. Amelise, comunicación directa). Estos datos muestran que MDM2 es un regulador negativo de *p53* *in vivo* y que la letalidad de los embriones carentes de MDM2 es debida

a una actividad no regulada de *p53* que termina en la apoptosis del embrión. Además, estudios realizados en los cuales se reintrodujo *p53* en MEFs *p53**-/-mdm2**-/-* e indujo apoptosis, corroboraron los datos obtenidos anteriormente *in vivo* (de Rozières et al., 2000). Estudios posteriores en MEFs y tumorigenesis mostraron poca diferencia fenotípica entre ratones *p53**-/-* y ratones *p53**-/-mdm2**-/-*, lo que sugiere que la única función de MDM2 es regular a *p53* (McDonnell et al., 1999; McMasters et al., 1996).

Estudios de expresión transgénica de MDM2 han sugerido funciones de MDM2 que son independientes de *p53*. La sobre-expresión de MDM2 en glándula mamaria de

ratonas lactantes mostró que el 16% de las ratonas que hubieran tenido múltiples embarazos (y por lo tanto, múltiples lactancias) desarrollaron tumores a los 18 meses de edad (Lundgren et al., 1997). Durante la lactancia, que es cuando ocurre la sobreexpresión de MDM2, parece que la glándula mamaria sufre hipertrofia y algunas células contienen varios núcleos, lo que indica que mientras que algunas células mueren o no se diferencian, otras sufren inestabilidad genómica. Cuando estos ratones son cruzados a un fondo genético carente de *p53* el fenotipo no cambia, indicando que el efecto de la sobreexpresión de MDM2 es independiente de *p53*. Otros ratones transgénicos que expresan MDM2 en todo el cuerpo desarrollan sarcomas (Jones et al., 1998). Esto correlaciona con los datos clínicos que señalan que el 30% de los sarcomas están asociados con la sobreexpresión de MDM2. También se encontró que cuando estos ratones fueron cruzados a un fondo genético sin *p53*, matuvieron el mismo fenotipo, indicando una vez más que MDM2 tiene un papel en tumorigénesis independiente de *p53*.

Además de unirse a *p53*, MDM2 también se une a otras proteínas, una de ellas es *p19^{ARF}/p14^{ARF}* (Chin et al., 1998; Kamijo et al., 1997; Kurokawa et al., 1999), producto del locus *Ink4a/Arf* murino (*CDKN2-A* en humanos). Este gen genera dos proteínas mediante el uso de diferentes marcos de lectura, *p16^{INK4a}* y *p19^{Arf}*. *P19^{Arf}* puede unirse a MDM2 en el AA 284 de la región amino terminal, pero parece que la región carboxilo terminal es necesaria para incrementar la eficiencia de esta unión (Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). La unión de *P19^{Arf}* con MDM2 in vitro produce una disminución de la actividad ubiquitina ligasa de MDM2 (Honda and Yasuda, 1999) y lo secuestra en los nucleólos (Tao and Levine, 1999; Weber et al., 1999), lo cual libera a *p53* de su regulador

y le permite ejercer sus funciones como activador transcripcional. El homólogo humano de P19^{Arf} es P14^{Arf} y actúa igual que la versión murina, solo que parece ser que este es capaz de formar un complejo ternario con MDM2 y p53 (Stott et al., 1998) (Zhang and Xiong, 1999). P53 regula negativamente la expresión de P14^{Arf}, lo cual vendría a aumentar la actividad de MDM2 y por lo tanto, reducir la actividad de p53, creando así otro feedback autoregulator (Stott et al., 1998). En resumen, p53 puede regular positivamente a MDM2 de dos formas diferentes: 1) activación transcripcional directa de *mdm2* y 2) regulación negativa del inhibidor de MDM2, p14^{Arf}.

MDM2 también se une a E2F1, un factor de transcripción que activa genes específicos de la fase S del ciclo celular. E2F1 forma un complejo con DP1 y juntos activan la transcripción de genes a través de un dominio llamado E2F. MDM2 estimula la activación dependiente de E2F1/DP1 del promotor de E2F (Martin et al., 1995). Otra proteína que se une a MDM2 es el supresor de tumores Retinoblastoma (Rb). La unión de

Rb a MDM2 en el CR2 (Xiao et al., 1995) bloquea su capacidad de desestabilizar a p53 (Hsieh et al., 1999). El complejo Rb-MDM2 se mantiene unido a p53 cuando inhibe su actividad transcripcional y MDM2 que tiene unido a Rb no inhibe la apoptosis mediada por p53. Rb también se une a E2F1 y lo inhibe, pero cuando está unido a MDM2 es incapaz de hacerlo. MDM2 también se une a la proteína de unión a CREB (CBP, por sus iniciales en inglés) y a p300, que son co-activadores transcripcionales que se unen e incrementan la transactivación mediada por p53 (Avantaggiati et al., 1997; Gu and Roeder, 1997; Lill et al., 1997). CBP/p300 se une a MDM2 y en condiciones normales es

capaz de secuestrarlo casi por completo, pero parece ser que CBP/p300 es necesario para la degradación de p53 mediada por MDM2 (Grossman et al., 1998).

mdmx

MDMX es el homólogo de MDM2 que ha sido aislado más recientemente. Su descubrimiento se logró en una búsqueda de proteínas que se unen a p53 en una biblioteca de expresión de cDNA de embrión completo de ratón de 16 días (Shvarts et al., 1996). En los fragmentos obtenidos aquí se encontró que presentaban una alta homología con MDM2 y cuando se logró aislar la secuencia completa se observó que el cDNA de *mdmx* codifica una proteína de 489 aminoácidos, que es exactamente el mismo tamaño de la proteína MDM2 murina. Su peso molecular calculado es de 54 kDa, pero en geles de SDS-poliacrilamida MDMX migra a un peso de aproximadamente 70 kDa a diferencia de MDM2 que lo hace a 90 kDa. El nivel de homología –mas alto (49.7%) entre estas proteínas se encuentra en los primeros 111 aminoácidos donde se localiza el dominio de unión a p53, el siguiente punto de alta homología es en la parte C-terminal (41.6%) que comprende algunos dominios funcionales importantes. El nivel de identidad total entre las proteínas es de 34.0% (figura 6). Estructuralmente, MDMX además de tener el mismo sitio de unión a p53 que MDM2, también comparte otros dominios tales como unos dedos de zinc (zinc finger), unos dedos en anillo (ring finger), y un dominio de unión de ATP. Sin embargo, a pesar de que al igual que *mdm2* también posee un dominio de señalización nuclear y uno de exportación del núcleo, estos se encuentran en diferentes regiones de la proteína (Shvarts et al., 1996). Además, la señal de exportación nuclear de

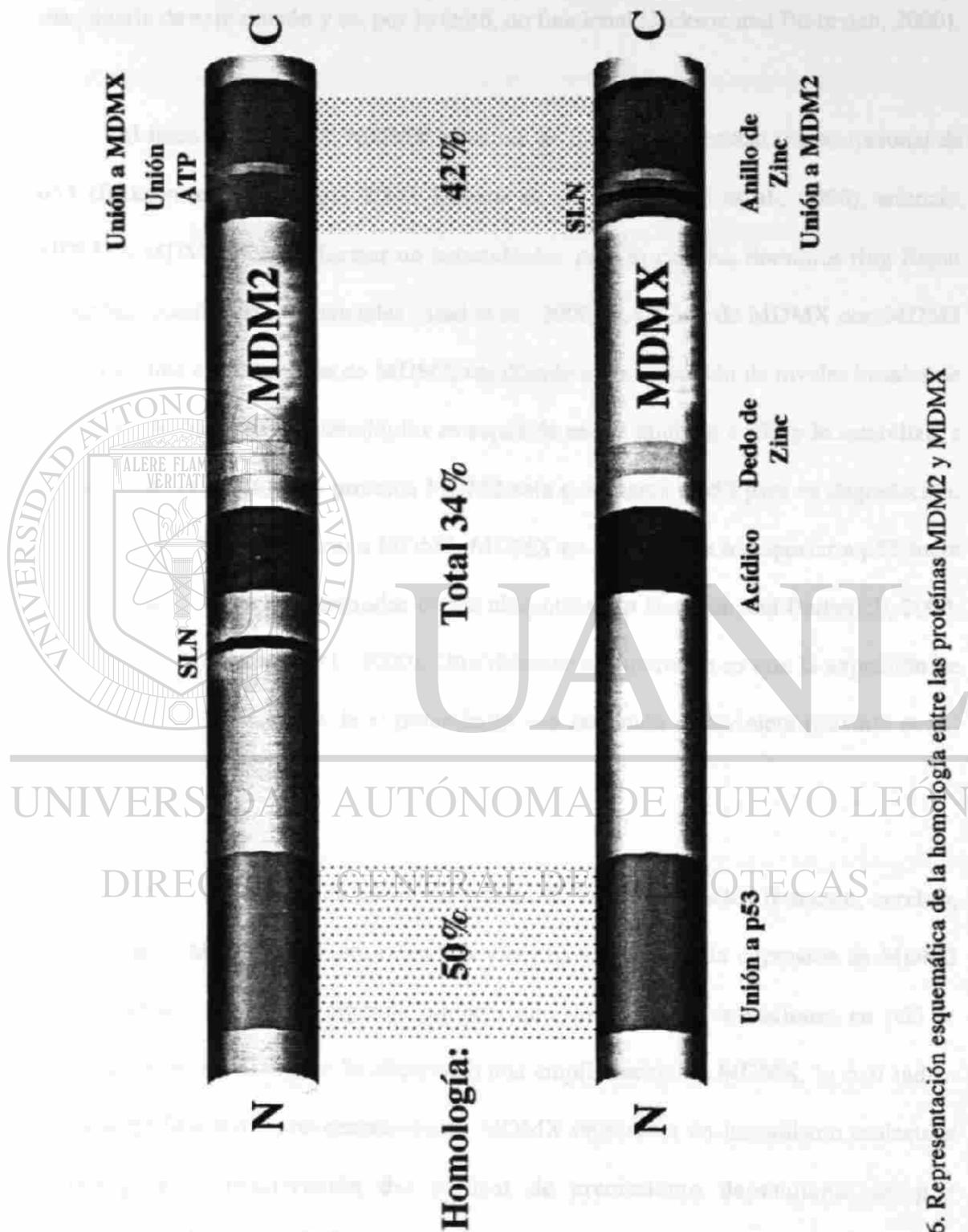


Figura 6. Representación esquemática de la homología entre las proteínas MDM2 y MDMX

MDMX parece no contener todos los elementos necesarios para interactuar con la maquinaria de exportación y es, por lo tanto, no funcional (Jackson and Berberich, 2000).

Al igual que MDM2, MDMX es capaz de inhibir la actividad transcripcional de p53 (Jackson and Berberich, 2000; Shvarts et al., 1996; Stad et al., 2000), además, MDM2 y MDMX pueden formar un heterodúplex para lo cual los dominios ring finger de ambas proteínas son esenciales (Stad et al., 2000). La unión de MDMX con MDM2 conlleva a una estabilización de MDM2, resultando en la elevación de niveles basales de la proteína MDM2. Este heterodúplex es capaz de unirse también a p53 y lo estabiliza, a diferencia de la unión de la proteína MDM2 sola que marca a p53 para su degradación, (Sharp et al., 1999). Contrario a MDM2, MDMX no es capaz de transportar a p53 fuera del núcleo ni de inducir su degradación vía ubiquitinación (Jackson and Berberich, 2000; Sharp et al., 1999; Stad et al., 2000). Otra diferencia importante es que la expresión de *mdmx* no se activa después de el tratamiento con radiación ultravioleta (Shvarts et al., 1996).

MDMX se expresa en todos los tejidos de ratón analizados (corazón, cerebro, bazo, pulmón, hígado, músculo, riñón y testículos) y es igual a la expresión de MDM2 (Shvarts et al., 1996). En algunos tumores que no presentan mutaciones en p53 ni sobreexpresión de MDM2 se ha observado una amplificación de MDMX, lo cual indica que la amplificación y sobreexpresión de MDMX representa un mecanismo molecular alternativo para la inactivación del control de crecimiento dependiente de p53 (Riemenschneider et al., 1999).

A pesar de que MDM2 y MDMX son muy similares estructuralmente, sus funciones son muy diferentes. Algunos sistemas *in vitro* han ido analizando algunas de las funciones de MDMX, pero ha sido hasta la creación de ratones carentes de MDMX que se han aclarado algunas de ellas. En este laboratorio creamos un ratón con una disrupción en el gen de *mdmx* que causa su inactivación (Parant et al., 2001). Estos ratones presentan letalidad embrionaria a los 7.5 días post-coitum. A diferencia de los ratones carentes de *mdm2*, que mueren a los 5.5 días por apoptosis (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995)(L.Amelse, datos no publicados), los ratones carentes de *mdmx* mueren por inhibición del crecimiento celular. Sorprendentemente, este fenotipo, al igual que el de *mdm2*, es también rescatado por la ausencia simultánea de p53, produciendo ratones viables y fértiles. Esto vino a demostrar la relación entre MDMX y p53 *in vivo*, así como el hecho de que MDM2 y MDMX a pesar de su gran similitud estructural no tienen funciones redundantes, ya que ninguno es capaz de cubrir la ausencia del otro durante la embriogénesis.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LcK (Lymphoid Cell Kinase)

El gen *lck* codifica una tirosina kinasa específica de linfocitos conocida como p56^{lck} (Perlmutter et al., 1989). Es un miembro de la familia de proteínas tirosina kinasas *src* (Perlmutter et al., 1989) y anteriormente era conocido como *lck* o *tsk* (Voronova and Sefton, 1986). La búsqueda de sus transcritos (RNAs), de 2.3 Kb de longitud, ha

demostrado que únicamente se expresa en órganos linfoides o en tejidos en los cuales se sabe que contienen un gran número de linfocitos. En humanos, estos transcritos aparecen en el timo alrededor de los 70 días de gestación, cuando los progenitores hematopoyéticos migran por primera vez a la región donde se desarrollará el timo. Tanto las células T CD4+ como las CD8+ de sangre periférica contienen transcritos de *lck*, lo mismo se observa en timocitos conteniendo alguno de estos dos marcadores (CD4 y CD8), ambos o ninguno. Por hibridización *in situ* se ha encontrado que la expresión del *lck* murino es máxima en la corteza externa del timo pero no en los timoblastos subcapsulares. En este caso, la expresión de *lck* parece no correlacionar con ninguno de los bien definidos estados del desarrollo de los timocitos, sino más bien estar presente en células T de todos tipos (Perlmutter et al., 1989).

Varias líneas de células B humanas y murinas también contienen transcritos de *lck*, aunque algunas otras no. Al menos algunas poblaciones normales de células B contienen mRNA de *lck*. También algunos linfocitos granulares grandes, incluyendo la mayoría de las células con un fenotipo de células NK (natural killer), contienen cantidades apreciables de transcritos de *lck* tanto en humanos como en ratas. Por lo tanto, se tienen reportes de la expresión de *lck* en todas las principales clases de linfocitos (Perlmutter et al., 1989).

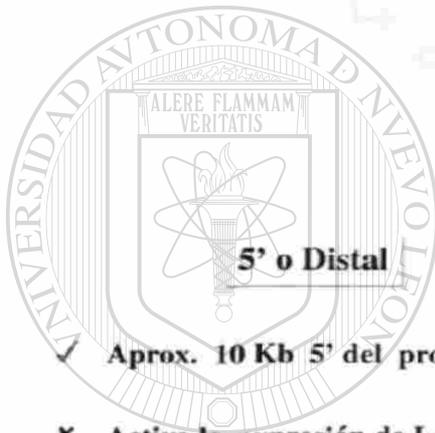
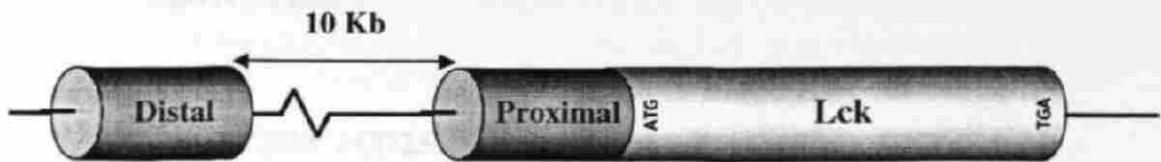
Las secuencias codificantes del gen *lck* están distribuidas en 12 exones en alrededor de 10.5 Kb de DNA en la porción distal del cromosoma 4 murino. Su expresión está regulada por dos elementos promotores no relacionados estructuralmente entre sí y

que se encuentran separados por mas de 9 Kb de DNA en el humano (Takadera et al., 1989) y al menos 10 Kb en el ratón (figura 7) (Garvin et al., 1988). Estos elementos son conocidos como 3' o distal y 5' o proximal y los transcritos derivados de ambos codifican proteínas idénticas y difieren solamente en sus regiones no traducidas 5'. La comparación entre las secuencias génicas de *lck* humana y murina revela una alta conservación (alrededor de 85% de homología entre nucleótidos) en la región de 500 pb 5' con respecto al sitio de iniciación de la transcripción, lo cual indica que aquí se ubican elementos promotores esenciales para la función del gen *lck*. Aunque ni la secuencia murina ni la humana de *lck* contienen dominios típicos de un promotor, en la posición -25 del gen murino hay una secuencia conservada TGTGAA que comparte cierta similitud con la caja TATAA encontradas frecuentemente en una posición similar en otras unidades transcripcionales de la polimerasa II. Mientras que la secuencia CCAT en la posición -69 del gen murino (y conservada en el humano) muestra cierta semejanza con las secuencias CAAT encontradas en muchos genes cerca de la posición -70.

Tampoco se presentan sitios consenso de unión para los factores de transcripción SP1, AP1 o AP2 (Garvin et al., 1988; Voronova et al., 1987).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Debido a la presencia de dos diferentes promotores para el gen *lck* y a que dicho gen se expresa en células T en diferentes estados de desarrollo, se supuso que los promotores podrían tener diferentes funciones en diferentes tejidos. Para analizar esto se estudiaron células T en sus diferentes estadios de maduración:



Aprox. 10 Kb 5' del promotor proximal.

Activa la expresión de Lck en timocitos y células T maduras.

Proximal

Adyacente al gen.

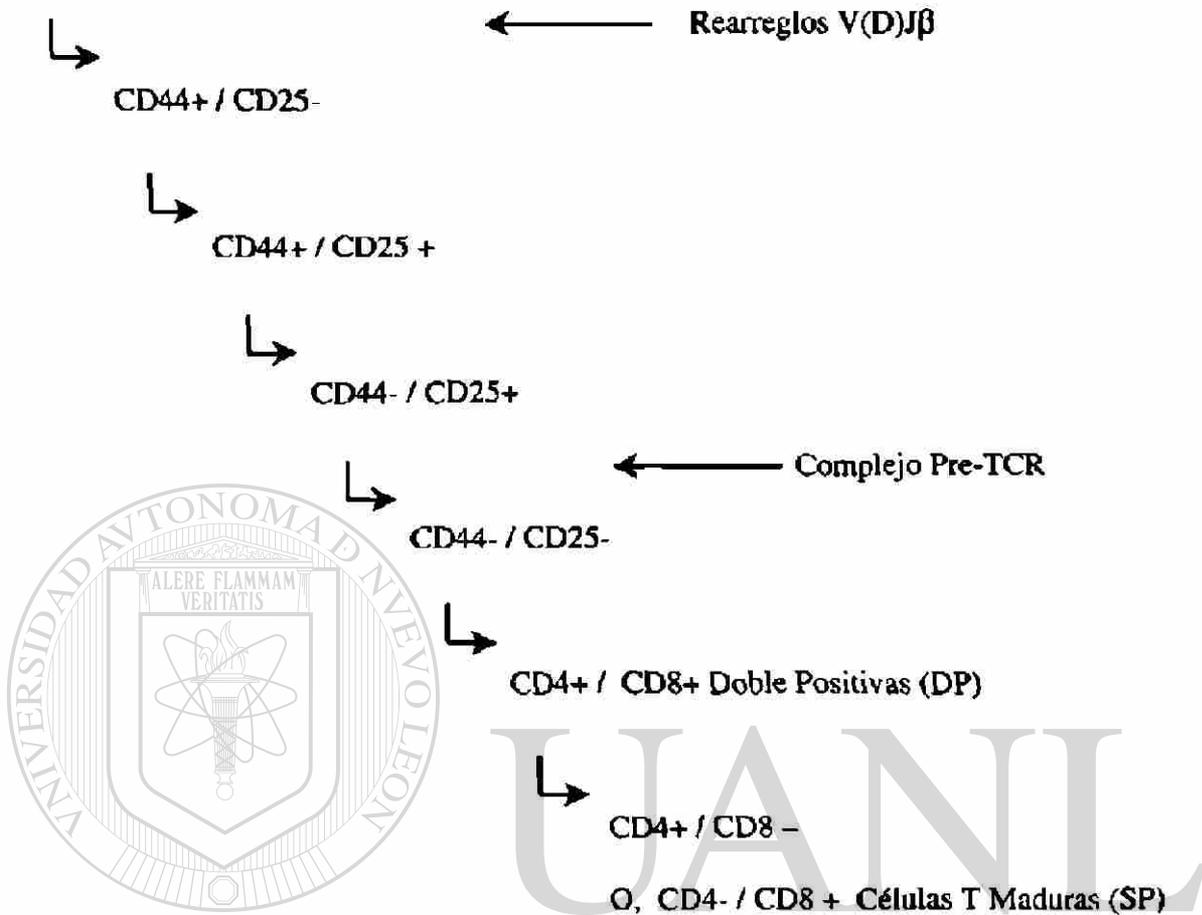
Activa la expresión de Lck en timocitos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 7. Organización de la región promotora del gen *Lck* y su patrón de expresión.

CD4⁻ / CD8⁻ Doble Negativas (DN)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Encontrándose que la proteína está ausente en el estadio CD44⁺ / CD25⁺, pero más del 90% de las células CD44⁻ / CD25⁺ y CD44⁻ / CD25⁻ lo expresan. Así también, más del 90% de las células DP y SP son positivas para la expresión de p56^{lck}. Además, alrededor del 60% de las células de los nódulos linfáticos periféricos y cerca del 30% de los esplenocitos expresan también la proteína p56^{lck}. Pero se mostró que las células que expresan *lck* en los nódulos linfáticos y en el bazo son células T (analizadas con anticuerpos específicos). Menos del 1% de las células B y macrófagos expresan p56^{lck}.

Aproximadamente 50% de las células NK y 70% de las células T $\gamma\delta$ maduras contienen también la proteína p56^{lck} (Buckland et al., 2000).

En otro estudio se encontró que tanto los timocitos como las células T maduras expresan transcritos provenientes del promotor distal. Pero al analizar los transcritos derivados del promotor proximal se encontró que estos solo se expresan en timocitos y no están presentes en células T de sangre periférica (Allen et al., 1992; Garvin et al., 1988; Reynolds et al., 1990; Wildin et al., 1991). Esto indica que existe algún mecanismo que regula el uso de estos dos promotores. En un análisis de secuencia se encontró que algunas regiones consenso son compartidas por los promotores distal y proximal, pero también se encontraron sitios de unión de proteínas presentes únicamente en el promotor proximal que podrían tener un papel de reguladores negativos de la transcripción en células T circulantes (Allen et al., 1992).

El promotor proximal de *lck* ha sido utilizado ampliamente en la generación de ratones transgénicos para la expresión específica de genes en el timo. Allen *et al.* (Allen et al., 1992) crearon un ratón transgénico que expresaba el mismo gen de *lck* pero eliminaron del transgen la porción 5' del gen que contiene el promotor distal y encontraron que el transgen se expresa específicamente en el timo y que sus transcritos no se acumulan en tejidos no linfoides. Abraham *et al.* (Abraham et al., 1991) utilizando una estrategia similar sobreexpresaron también *lck* silvestre y mutante y encontraron que una sobreexpresión de 3 o 4 veces conduce a la formación de linfomas de timo a las 8 semanas de edad. Wildin *et al.* (Wildin et al., 1991) expresaron el antígeno T grande de

SV40 bajo el promotor distal humano de *lck* en ratones y encontraron mRNA de SV40 T en timo y bazo, así como una débil expresión en corazón, mientras que en hígado y riñón la expresión fue nula. Al analizar el desarrollo de tumores en estos los ratones se encontraron tumores hemorrágicos en bazo y ganglios linfáticos, así como un crecimiento anormal del timo. Pero no se desarrollaron tumores en el corazón ni en ningún otro órgano no linfóide. Chaffin *et.al.* (Chaffin et al., 1990) crearon un ratón transgénico que expresa la subunidad S1 de *B. pertussis* bajo la influencia del promotor proximal de *lck*. La expresión de la proteína se encontró en timocitos pero no así en bazo, riñón, corazón, hígado, pulmón o cerebro.

Todos estos datos indican que el uso del promotor proximal del gen *lck* es una buena estrategia para la expresión específica de transgenes en el timo de ratones. Sin embargo, Buckland et al. (Buckland et al., 2000) crearon ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). Obtuvieron 4 diferentes líneas con expresiones relativas del transgen que van de 1 a 20 veces. Y aunque la expresión se mantuvo confinada al linaje de células T, esta no se limitó a los timocitos como era de esperarse, sino que también fue observada en células T circulantes y células NK. También Shimizu et al. (Shimizu et al., 2001) crearon un ratón similar que expresa GFP bajo la influencia del promotor proximal de *lck*. A diferencia de Buckland, aquí no se encontraron células NK que expresaran GFP, pero también se observó que las células T circulantes expresaban el transgen.

HIPOTESIS



La expresión transgénica específica de *p53* humano en el timo de ratones carentes de *p53* endógeno es capaz de inhibir el desarrollo de linfomas de timo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS

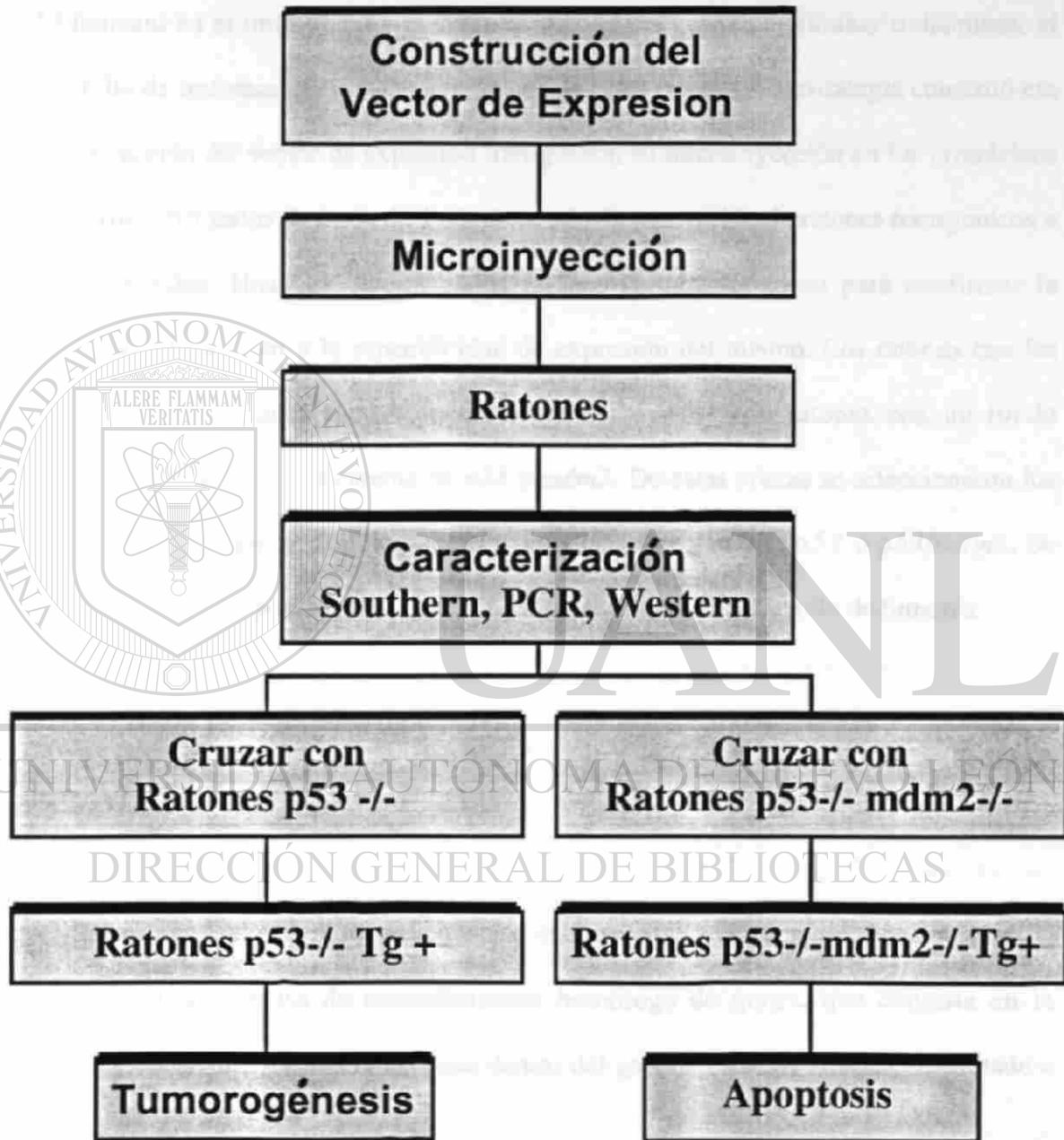
General

Determinar si la expresión de un transgen humano en el timo disminuye la frecuencia de linfoma.

Particulares

1. Construcción de un vector para la expresión de p53 humano en el timo.
2. Crear ratones transgénicos que expresen p53 humano específicamente en el timo.
3. Generar ratones transgénicos con un fondo genético carente de p53.
4. Analizar la frecuencia de tumores en los ratones transgénicos en un fondo genético carente de p53.

Plan de Trabajo



MATERIALES Y METODOS

El objetivo central de este trabajo fué determinar si la expresión transgénica de p53 humano en el timo de ratones carentes de p53 era capaz de eliminar o disminuir el desarrollo de linfomas de timo característicos de estos ratones. La estrategia consistió en: la construcción del vector de expresión transgénica, su microinyección en los pronúcleos de huevos fertilizados de ratón de 1 día de edad y la generación de ratones transgénicos a partir de ellos. Una vez obtenidos los ratones se caracterizaron para confirmar la presencia del transgen y la especificidad de expresión del mismo. Los ratones con las características deseadas fueron posteriormente cruzados con ratones con un fondo genético carente de p53 o carente de p53 y *mdm2*. De estas cruas se seleccionaron los ratones que contenían el transgen y además carecían de p53 o p53/*mdm2*. Se conformaron los grupos de estudio y se monitorearon para el desarrollo de tumores.

ANIMALES UTILIZADOS

Los ratones que utilizamos en este trabajo se citan a continuación y se obtuvieron básicamente por medio de recombinación homóloga de genes, que consiste en la introducción de una secuencia exógena dentro del gen silvestre, el cual queda mutado e inactivo.

1. Ratones carentes en *mdm2*. Creados en el laboratorio de la Dra Guillermina Lozano, Depto de Genética Molecular, Universidad de Texas, Centro de Cáncer M.D. Anderson, Houston Tx., por el Dr Roberto Montes de Oca Luna.

2. Ratones carentes en *p53*. Facilitados por el laboratorio del Dr Robert A. Weinberg, Instituto Médico Howard Hughes, Centro para la Investigación del Cáncer, Instituto de Tecnología Massachusetts, Cambridge, MA., generados por el Dr Tyler Jacks.

Además, para la generación de los ratones transgénicos se utilizaron ratones silvestres B6/D2-F1J para la obtención de los huevos fertilizados y CDI (original Swiss) como aceptores en la transferencia de los huevos microinyectados obtenidos de diferentes casas comerciales.

CONSTRUCCION DEL VECTOR DE EXPRESION TRANSGENICA

El vector de expresión transgénica fué creado a partir de dos plásmidos:

3. *plck-hGH* de 8.0 Kb que contiene 3.2 Kb del promotor del gen *LcK* murino (*LcKp*), en donde está incluido únicamente el promotor proximal del mismo. También contiene 2.1 Kb del gen de la hormona del crecimiento humano (*hGH*) que aporta la señal de poliadenilación. El vector en que están incluidos estos fragmentos es *pUC19* (2.7Kb). Este plásmido fué facilitado por el Dr Mike Knudson, Instituto Médico Howard Hughes, Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, St. Louis MO, USA.

4. *pC53-SN* de 8.15 Kb que contiene el cDNA completo del gen *p53* humano (*Hp53*) insertado en el gen de la β -globina de conejo y bajo el promotor de citomegalovirus. Este plásmido es parte de la colección de nuestro laboratorio.

Como se describe en la figura 8, ambos plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción *BamHI*. De esta manera, el fragmento de 1.8 Kb del plásmido *pC53-SN* que está conformado por el cDNA de *Hp53* es liberado y el plásmido *plck-hGH* es linearizado. Se corrió un gel de agarosa de 1.8% con el digerido de *pC53-SN* y se purificó la banda de 1.8Kb. El fragmento obtenido fué posteriormente clonado en el sitio *BamHI* del plásmido *plck-hGH*. Este nuevo plásmido fué llamado *pLckHp53* y contiene un cassette de expresión dirigido por el promotor proximal del gen *LcK*, seguido por el cDNA de *Hp53* y la señal de poli-adenilación proporcionada por el gen *hGH*. El cassette de expresión se puede purificar del vector por medio de digestión con la enzima *NotI*.

GENERACION DE LOS RATONES TRANSGENICOS

El fragmento *NotI* del plásmido *pLcKHp53* fué purificado de geles de agarosa utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit de purificación en columna (QIAGEN). El fragmento purificado fué microinyectado en los pronúcleos de huevos fértiles de ratón de 1 día de gestación obtenidos de hembras B6/D2-F1J. Los huevos microinyectados fueron transferidos quirúrgicamente a los oviductos de hembras CD1 pseudopreñadas y se permitió que los embriones se desarrollaran a término, aproximadamente entre 19 y 21

días. A los 21 días de nacidos los ratones obtenidos fueron destetados y se les cortó una porción de la cola para la extracción de DNA y su posterior genotipificación (figura 1).

AISLAMIENTO DEL DNA GENOMICO

Para la extracción de DNA genómico de los ratones se cortó una porción de la cola de aproximadamente 0.5-1 centímetro de largo cuando los ratones tenían tres semanas de edad. Se colocaron en 500 µl de un buffer de lisis (0.1M Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 0.2% SDS, 0.2M NaCl) con 15 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubaron en agitación suave a 55°C toda la noche. Se agitaron en el vortex por 1 o 2 segundos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 6 minutos. Se tomaron 400 µl del sobrenadante y se pasaron a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de fenol y se agitó por rotación durante 15 min a temperatura (temp) ambiente. Se centrifugaron por 10 min y la fase acuosa se transfirió a otro tubo. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por 15 min. Se centrifugó por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se añadió un volumen igual de cloroformo y se agitó por 15 minutos. Se centrifugó por 10 minutos y la fase acuosa se transfirió a otro tubo. Se añadió un volumen igual de isopropanol y se mezclaron por inversión hasta que se observaba precipitación del DNA. Se recolectó el DNA con una varilla de vidrio y se lavó con etanol al 70%. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se redisolviéron en 300 µl de agua o buffer. De aquí, se utilizó 1 µl de una dilución 1:10 para realizar el PCR.

DETERMINACION DEL GENOTIPO DE LOS RATONES

El genotipo de los ratones obtenidos se realizó de dos maneras: análisis de Southern Blot y por PCR.

Para el análisis de Southern Blot se eligió como sonda el fragmento *BamHI* de 1.8 Kb del plásmido *pLcKHp53*. 20 µg de DNA genómico fueron digeridos con *BamHI* por al menos 5 horas y luego fueron corridos en un gel de agarosa al 1.8% por aproximadamente 4 horas. Posteriormente, el DNA fué transferido a una membrana de nitrocelulosa por el método alcalino de capilaridad (utilizando un huffer de NaOH al 0.4%) durante toda la noche. El DNA fué fijado a la membrana por medio de calor (1 minuto en autoclave en fase de líquidos). La membrana fué pre-hibridizada con una solución de hibridación (NaCl 1M, Sulfato de Dextrano 10%, SDS 1%) y 200µg/ml de DNA de espermia de salmón por 1 hr a 65°C.

Por otro lado, de 50 a 100 ng de la sonda purificada fueron marcados radiactivamente con $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ de la siguiente manera:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9 µl de sonda

2 µl de Mezcla 10X de hexanucleótidos

3 µl de dNTPs (sin CTP)

5 µl de $\alpha^{32}\text{PdCTP}$

1 µl de enzima Klenow

La sonda se calentó a 95°C por 5 min y luego se colocó en hielo por 5 min antes de añadir el resto de los componentes de la reacción. Después se incubaron todos los

reactivos a 37°C por al menos 2 hrs (e inclusive toda la noche). Finalmente se detenía la reacción con la adición de 80 µl de TE (Tris, EDTA) y la radiactividad se cuantificaba en un contador de centelleo líquido. La membrana era hibridizada con 1x10⁶ CPM/ml de la sonda radiactiva a 65°C durante toda la noche y luego era lavada con una solución de SSC 2X / SDS 0.1% varias veces y finalmente era expuesta a una película radiográfica durante toda la noche.

Para la determinación del genotipo mediante la técnica de PCR se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos iniciadores:

Para el gen *mdm2*:

mdm04: 5'-ATCTGAGAGCTCGTGCCCTTCG-3'

mdm020: 5'-TGTGGCTGGAGCATGGGTATTG-3'

Neo3'd: 5'-GGCGGAAAGAACCAGCTGGGGC-3'

Para el gen *p53*:

p53-X6: 5'-AGCGTGGTGGTACCTTATGAGC-3'

p53-X7: 5'-GGATGGTGGTATACTCAGAGCC-3'

Neo19: 5'-GCTATCAGGACATAGCGTTGGC-3'

Para el transgen existen varias opciones que se muestran en la figura 10, pero la combinación que mejores resultados mostró fué la siguiente:

HP53LCK-1R: 5'-GGGAAGGGACAGAAGATGACAG-3'

LCKPRO-2F: 5'-GGGCTGAGGCTGAGGGTTGAC-3'

Se utilizaron 100 ng de cada oligo por reacción a un volumen total de 25µl, que contenía lo siguiente:

1 µl de DNA

1 µl de cada oligo (100 ng/µl)

2.5 µl de buffer 10X para PCR

2.5 µl de dNTPs 2.5 mM

16 µl de agua (17 µl para el transgen)

0.2 µl de Taq DNA polimerasa (Boehringer Mannheim)

Y el programa de temperaturas usado fué:

1 ciclo:

94°C durante 4 minutos

35 ciclos:

94°C durante 1 minuto

65°C durante 1 minuto (60°C para el transgen)

72°C durante 3 minutos

Finalmente:

72°C durante 7 minutos

Finalmente, los productos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa (Ultra Pure, Gibco BRL, Life Technologies) al 0.8 % en buffer TBE (Acido Bórico, Trizma Base, EDTA) mediante una tinción con bromuro de etidio. El corrimiento de las muestras fué a un voltaje constante de 80 volts por un tiempo de 1.5 horas. Se revelaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

SECUENCIACION

Para confirmar que los ratones transgénicos conservaban *Hp53* integrado a su genoma sin mutaciones se realizaron secuenciaciones de los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico. Se utilizaron 3 juegos de oligonucleótidos iniciadores para cubrir toda la secuencia de *Hp53*:

6. Región 5':

LCKPRO-2F: 5'-GGGCTGAGGCTGAGGGTTGAC-3'

GE5R: 5'-TCCAAATACTCCACACGCAA-3'

7. Región central:

C5F: 5'-TACTCCCCTGCCCTCAACAA-3'

C7R: 5'-TGATGATGGTGAGGATGGGC-3'

8. Región 3':

PI6: 5'-GCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTA-3'

hGH- LcK: 5'-GTAGCCATTGCAGCTAGGTG-3'

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

Para determinar la especificidad de expresión del transgen se extrajeron proteínas de diversos órganos de los ratones para ser analizadas por Western Blot. Se sacrificaron animales positivos para el transgen por PCR y Southern Blot dos horas después de exponerlos a radiación ionizante (2.5 Gy) para inducir la expresión de p53. Se efectuaron necropsias y se disectaron timo, pulmón, corazón, bazo, riñón, músculo, hígado, intestino y testículos. Los órganos fueron colocados inmediatamente sobre CO₂ sólido (hielo seco) y posteriormente almacenados a -80°C hasta su uso. Para la extracción de proteínas se colocaron los órganos en 700 µl de solución de lisis (Tris 0.05M pH 6.8, NaCl 0.15 M, Cocktail inhibidor de proteasas 2X) y se homogenizaron utilizando un Politrón. El tejido homogenizado fue centrifugado por 4 min a 4°C y al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteínas (los extractos se mantienen almacenados a -80°C) utilizando el Bio-Rad Protein Assay (BioRad Laboratories, Hercules, CA.). 100 µg de proteína fueron corridos en cada pozo de un gel de SDS-poliacrilamida, posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por transferencia eléctrica en un aparato semi-húmedo. Se bloquearon las membranas con una solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween20 al 0.1% por 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario Bp53-12 en una dilución 1:1000 (Santa Cruz) durante toda la noche a 4°C en agitación. Se lavaron con la solución de PBS-Tween al 0.1% 5 veces por 5 minutos en agitación y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-ratón) en una dilución 1:5000 por 1 hora a

temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente como se indicó antes y se sometieron a la detección quimioluminescente utilizando el ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra). Finalmente, las membranas se expusieron a películas radiográficas.

PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA HISTOLOGIA

Se sacrificó el ratón cuando mostraba signos de enfermedad, debilidad o tenía tumores obvios a simple vista. Se disectaron los diferentes órganos y tumores. Se colocaron en la solución fijadora (10ml Formaldehído 37% [Fisher Scientific], 90ml PBS 1X libre de Hg^{+2} y Ca^{+2} [Gibco BRL, Life Technologies]). En algunos casos una parte del tumor fue congelada y se mantiene almacenada a $-80^{\circ}C$ para su posible uso en el futuro. Las muestras fijadas se remojaron con etanol al 40% por 1 hr. Se remojaron con etanol al 50% por 1 hr. Se remojaron con etanol al 70% por 2 hrs (los tejidos se podían almacenar a $-20^{\circ}C$ en este paso). Se remojaron con etanol al 80% por 30 min. Se remojaron con etanol al 90% por 30 min. Se remojaron con etanol al 96% por 30 min y luego 1 hr. Se remojaron con etanol al 100% por 30 min y luego 1 hr. Se remojaron con Xileno por 45 min a temperatura ambiente. Se remojaron con parafina ($60^{\circ}C$) por 30 min y luego 45 min. Se embebieron en los bloques de parafina y se cortaron secciones de $7\ \mu m$ de grueso en un microtomo. Se flotaron las secciones en agua caliente ($45^{\circ}C$) y se colocaron en un portaobjetos. Se dejaron secar toda la noche sobre una placa caliente a $40^{\circ}C$.

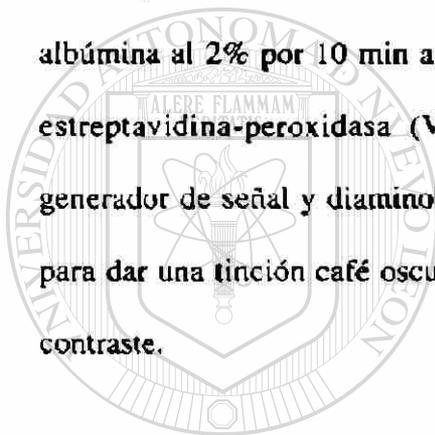
TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Para analizar la histología de los tejidos se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) en las laminillas obtenidas previamente. El protocolo es el siguiente: Se remojaron las laminillas en Xilenos por 3 minutos. Posteriormente en la siguiente serie de solventes: Xilenos sumergir y sacar. Etanol al 100% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 95% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 70% sumergir y sacar, dos veces. Agua corriente hasta que se veían "limpias" (Aprox. 2 min). Sumergir en Agua destilada. Hematoxilina de Lerner 3X por 2 minutos (Filtrarla después de usar y almacenar). Agua corriente por 2 minutos. Dos sumergidas rápidas y luego sumergir lentamente en EtOH Acido (5ml de HCl concentrado en 500ml de Etanol al 70%). Agua corriente por 2 minutos (se repetía lo anterior si aún estaba muy oscuro). 5 o 6 sumergidas en Agua Amoniacal (Hidróxido de amonio al 0.25%). Agua corriente por 2 minutos. Sumergida rápida en Eosyn-Y. Etanol al 70% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 95% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 100% sumergir y sacar. Etanol al 100% por 30 segundos. Xilenos por 1 minuto, dos veces. Se agregaba 1 gota de Permout (β -pinene polymer, [®] toluene solution. Fisher Scientific) y se cubría. Se dejaban secar las laminillas al aire.

DETERMINACION DE APOPTOSIS

Para analizar uno de los efectos esperados por la expresión del transgen (apoptosis), las muestras de tumores se sometieron a la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) para la determinación de apoptosis. Las laminillas se sometieron a

desparafinización y re-hidratación utilizando series de xilenos y alcoholes de la misma manera que en la tinción de H&E. Luego fueron sometidos a Proteínasa K 20 µg/ml por 15 min a temperatura ambiente. Se les inactivaron las peroxidasas endógenas por exposición a una solución al 3% de H₂O₂ en metanol por 5-10 min a temperatura ambiente. Se incubaron con buffer TdT (Tris 30mM, Cacodilato de sodio 140mM, CoCl₂ 1mM) por 2 min a temp ambiente. Se sometieron a la TdT (1:400) y dUTP-biotina (1:200) (Boehringer Mannheim) por 45 min a 37°C. Se lavaron con buffer TB (NaCl 300mM, Citrato de sodio 30mM) 2 veces por 5 min a temp ambiente. Se incubaron con albúmina al 2% por 10 min a temp ambiente. Y finalmente se utilizan los sistemas de estreptavidina-peroxidasa (VECTASTAIN ABC Elite Mouse Kit, Vector) como generador de señal y diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Vector) como cromógeno para dar una tinción café oscuro a las células positivas y hematoxilina como tinción de contraste.



UANL

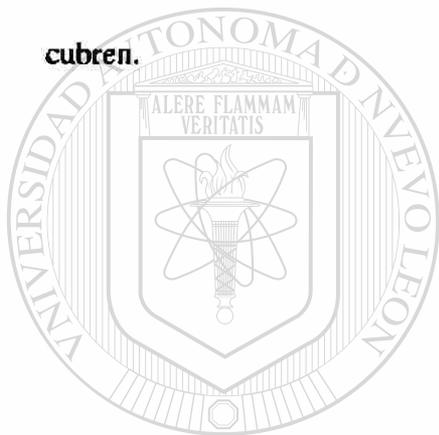
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para determinar la expresión de la proteína Hp53 *in situ* se empleó la técnica de tinción inmunohistoquímica. Las laminillas son desparafinadas y re-hidratadas como antes. Para obtener una mejor exposición de los antígenos se sometieron las laminillas a una cámara de vapor por 25 minutos en un buffer de citratos (1.05 g de ácido cítrico monohidratado en 500 ml de agua). Se incubaron 15 min en H₂O₂ en metanol por 15 min a temp ambiente. Se bloquearon con suero normal de caballo (Vector). Se añadió el anticuerpo

monoclonal primario Bp53-12 (1:1000) y se incubó por 2 hr a 37°C en una cámara húmeda. Se lavaron y se añadió el anticuerpo secundario, anti-ratón (Amersham Life Science), por 1 hr a temperatura ambiente. También se utilizan los sistemas de estreptavidina-peroxidasa (VECTASTAIN ABC Elite Mouse Kit, Vector) como generador de señal y diaminobencidina (DAB substrate kit, Vector) como cromógeno para dar una tinción café oscuro a las células positivas y una tinción final de contraste con Nuclear Red Fast (Vector) por 45 segundos. Finalmente se deshidratan pasándolas a través de series de alcoholes y xileno, se fijan con Permout (Fischer Scientific) y se cubren.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

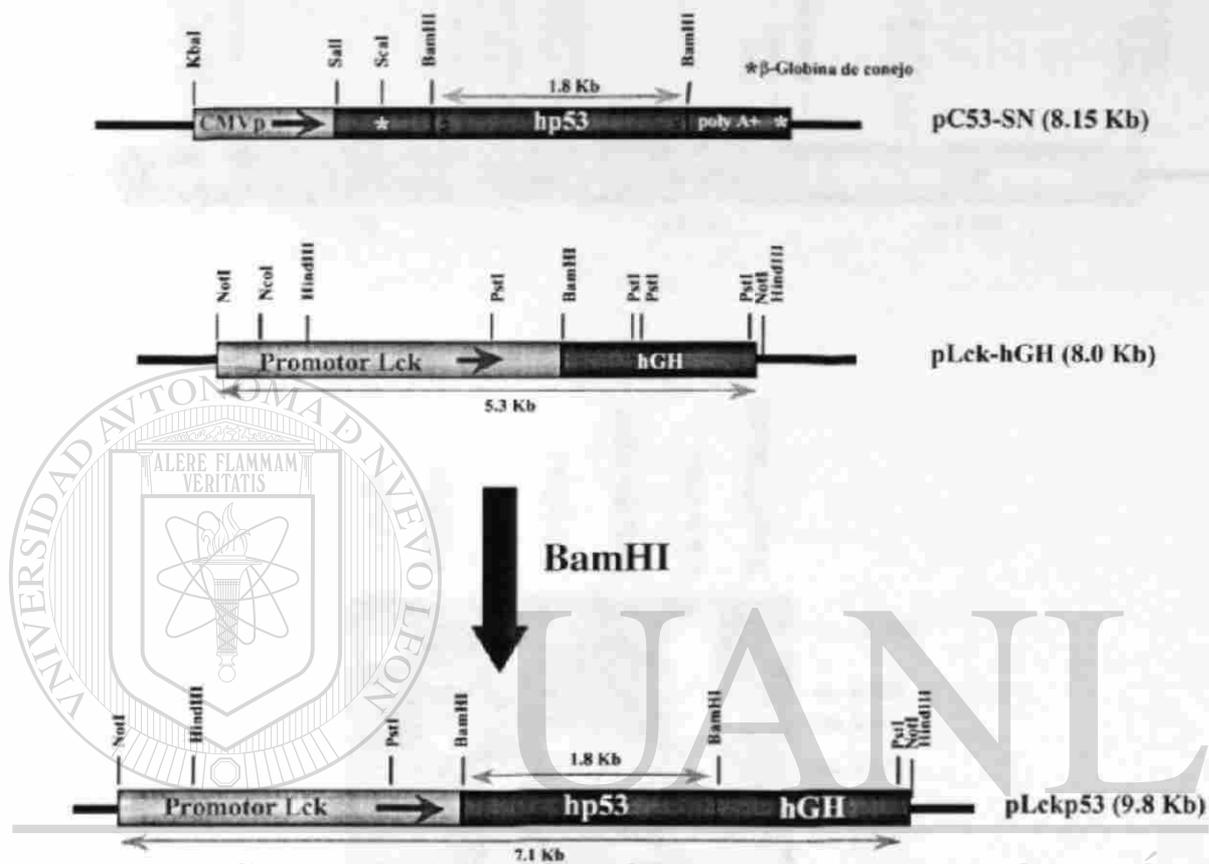
RESULTADOS

VECTOR DE EXPRESION TRANSGENICA.

El fragmento *BamHI* del plásmido *pCN53-SN* fué clonado dentro del sitio *BamHI* del vector *plck-hGH*, para generar el vector de expresión transgénica *pLcK-Hp53* (Figura 8). Para caracterizar dicho vector se sometió a digestión por varias enzimas de restricción y se obtuvieron los fragmentos esperados en cada caso (Figura 9). La restricción con *NotI* produce la liberación del cassette transgénico completo. Mientras que la digestión con *BamHI* produce un fragmento de 1.8 Kb que consiste del cDNA completo de *Hp53*. Este fragmento fué posteriormente utilizado como sonda para los análisis de Southern Blot. Por otro lado, la digestión con *SmaI* produce un fragmento de aprox. 2 Kb que sirve para comprobar la orientación correcta del cDNA (dato no mostrado).

GENERACION Y CARACTERIZACION DE LOS RATONES TRANSGENICOS

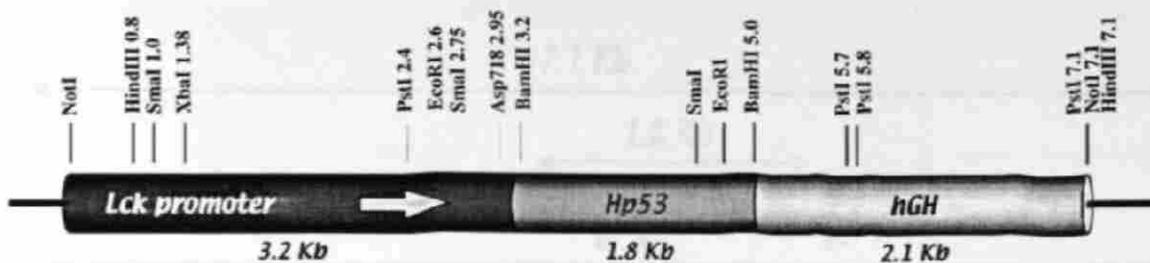
El fragmento *NotI* fué purificado de geles de agarosa y microinyectado en los pronúcleos de huevos de ratón en fase de 1 célula fertilizados. Estos huevos fueron transferidos a ratonasceptoras y los embarazos se llevaron a término. De la primera microinyección se obtuvieron 9 ratones, cuatro de los cuales al ser analizados por PCR con varias combinaciones de oligonucleótidos iniciadores (figura 10) presentaron el producto esperado. Sin embargo, cuando todos estos ratones fueron analizados por Southern Blot, solamente 3 presentaron la banda esperada (figura 11).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 8. Construcción del cassette de expresión transgénica. LcK, Kinasa de células linfoides (lymphoid cell kinase). hp53, p53 humana. hGH, hormona del crecimiento humana.

A.



B.

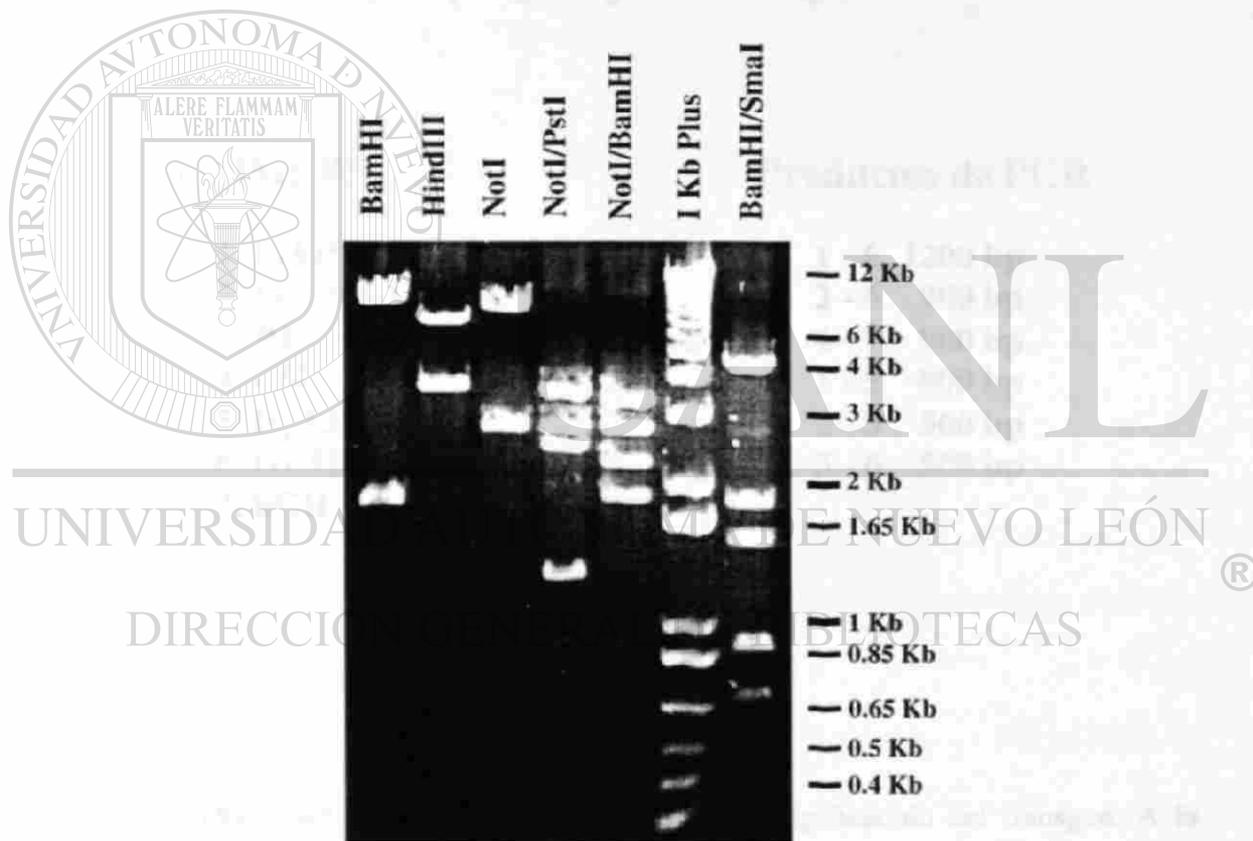
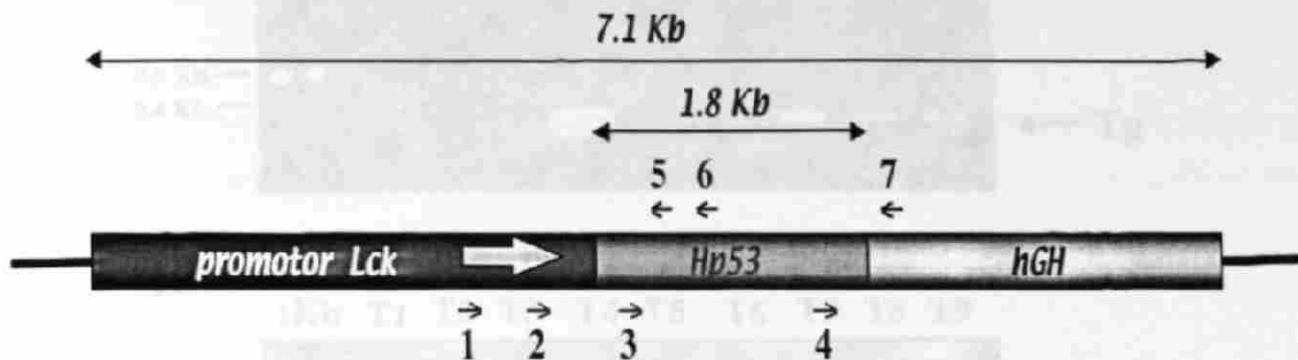


Figura 9. Caracterización del vector de expresión transgénica *pLcKHp53*. A, representación esquemática del mapa de restricción. B, Restricción del plásmido con las enzimas indicadas.



PRIMERS

1. LckPro-2F
2. LckPro-1F
3. P3
4. C8F
5. Hp53Lck-1R
6. GE5R
7. hGH

Productos de PCR

1 - 6	1200 bp
2 - 6	900 bp
4 - 7	900 bp
1 - 5	800 bp
2 - 5	500 bp
3 - 6	500 bp

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 10. Oligonucleótidos iniciadores para la genotipificación del transgen. A la derecha se indican los tamaños de producto esperados con las diferentes combinaciones de oligos. En color rojo se muestran los oligos utilizados actualmente en la genotipificación de los ratones.

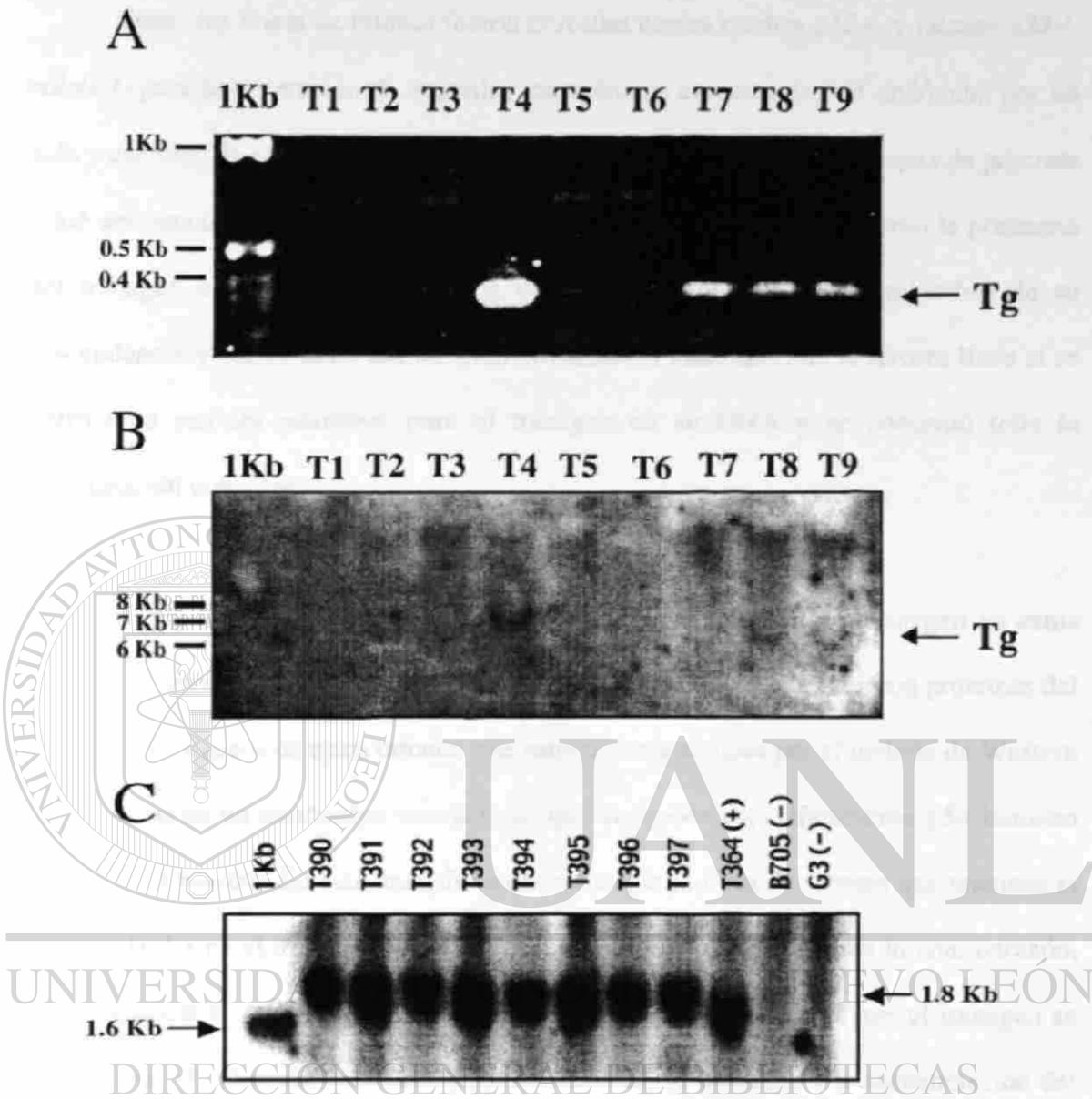


Figura 11. Genotipificación de los ratones obtenidos de la primera microinyección. A, Productos de PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores C5F y C7R. B, Análisis de Southern Blot de DNA genómico digerido con *SpeI* contra la sonda fragmento *BamHI* de *pLcKHp53*. C, Análisis de Southern Blot de DNA genómico digerido con *BamHI* contra la sonda fragmento *BamHI* de *pLcKHp53*. Color azul indica un control positivo. El color rojo indica controles negativos, DNA de ratones no transgénicos.

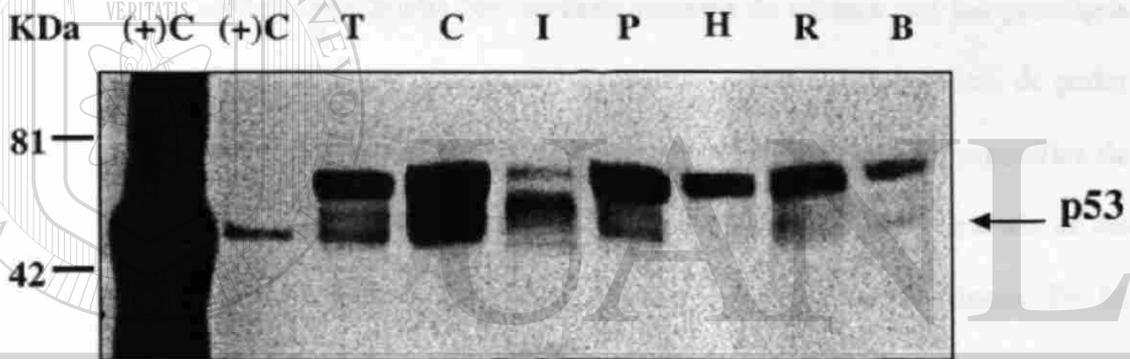
Estas tres líneas de ratones fueron cruzadas contra ratones *p53*^{-/-} y ratones *p53*^{-/}-*mdm2*^{-/} para la generación de animales transgénicos carentes de *p53* endógeno por un lado y carentes de *p53/mdm2*, por el otro. De las tres líneas, una no fué capaz de procrear y fué descartada. Una segunda línea si produjo progenie pero no se observó la presencia del transgen a nivel DNA (por PCR y Southern Blot) en ningún miembro de su descendencia y por lo tanto fué también eliminada. Finalmente, de la tercera línea sí se obtuvieron ratones positivos para el transgen en su DNA y se continuó toda la investigación con ellos.

El siguiente paso era la determinación de la expresión del transgen en estos ratones, así como la especificidad de la misma. Para tal efecto se extrajeron proteínas del timo y otros órganos de estos ratones y se sometieron a análisis por el método de Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente *p53* humano pero no *p53* murino. En este análisis se encontró que la línea de ratones que tenemos si expresa *Hp53* en el timo, pero también lo hace en otros tejidos, como lo son: corazón, pulmón, riñón y bazo (figura 12). Adicionalmente, para comprobar que el transgen se había integrado al genoma del ratón sin mutaciones, se procedió a la secuenciación del cDNA de *Hp53* por amplificación por PCR mediante el uso de 3 juegos de oligonucleótidos iniciadores que cubren la totalidad del gen. En esta secuenciación solamente se encontró una mutación puntual pero es silenciosa, por lo tanto el cDNA de *Hp53* transgénico debe ser capaz de producir una proteína normal.

A.



B.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

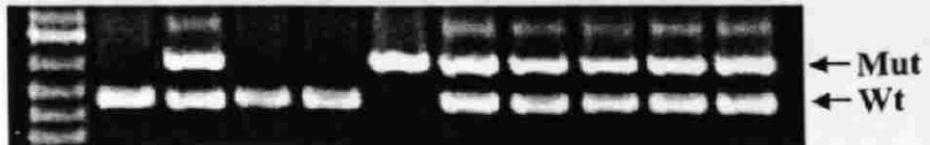
Figura 12. Determinación de la expresión del transgen en diferentes órganos de ratón por Western Blot. A. Western Blot de timos de varios ratones transgénicos sin exposición a radiación ionizante. 1 a 8 proteínas provenientes de diferentes ratones. La flecha indica la posición de la proteína p53. (+)C, control positivo, p53 humano producido en *E. coli*. T, timo. B. Western Blot de varios órganos de un ratón transgénico expuesto a radiación ionizante. C, corazón. I, intestino delgado. P, pulmón. H hígado. R, riñón. B, bazo. Kda, kilodaltones.

Los ratones utilizados en este estudio se obtuvieron de cruzas entre el ratón transgénico fundador y ratones *p53*^{-/-} y ratones *p53*^{-/-}*mdm2*^{-/-}, por lo cual para revisar el estatus de estos genes en ellos se utilizó PCR. En la figura 13 se muestra un ejemplo de los resultados que se obtienen en la genotipificación de estos ratones por medio de PCR para *p53* y *mdm2*.

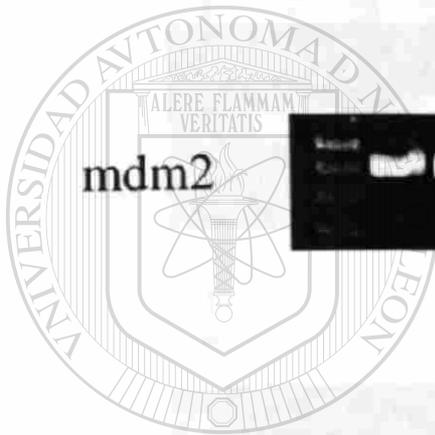
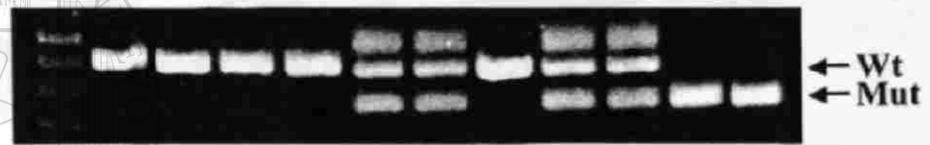
Debido a que la línea de ratones transgénicos no cumplía con el objetivo que nos habíamos planteado, inmediatamente se intentó la creación de nuevas líneas. Desafortunadamente, por problemas técnicos, esto no fué posible sino hasta recientemente. Como ya se contaba con un buen número de ratones con los genotipos deseados, se decidió realizar los experimentos planteados con ellos en espera de poder repetirlos con alguna línea nueva de transgénicos que presente expresión específica de *Hp53* en el timo. En la figura 14 se muestran los resultados de la genotipificación de las primeras dos camadas de ratones obtenidas para la creación de nuevas líneas. De 16

ratones obtenidos, 8 resultaron positivos por PCR. Se procedió entonces a analizar la expresión del transgen en las líneas positivas por PCR y los resultados del Western Blot se muestran en la figura 15 panel A. De las 8 líneas positivas por PCR 4 mostraron expresión de la proteína *Hp53* en el timo, dos de ellas con alta expresión, una con moderada y una más con baja expresión. Posteriormente se eligieron las dos líneas con la expresión mas elevada y se prosiguió a revisar la especificidad de dicha expresión. Como se muestra en la figura 15 paneles B y C, ambas líneas tienen una expresión específica en el timo, ya que no se observó la proteína en ninguno de los otros tejidos analizados. Actualmente se están realizando las mismas cruzas con estas líneas para compararlas con

p53



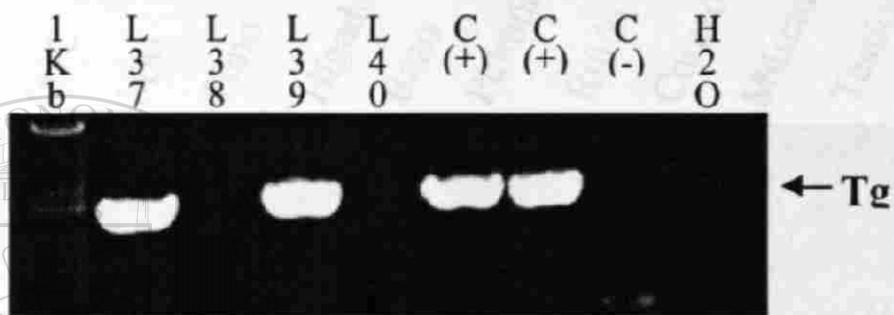
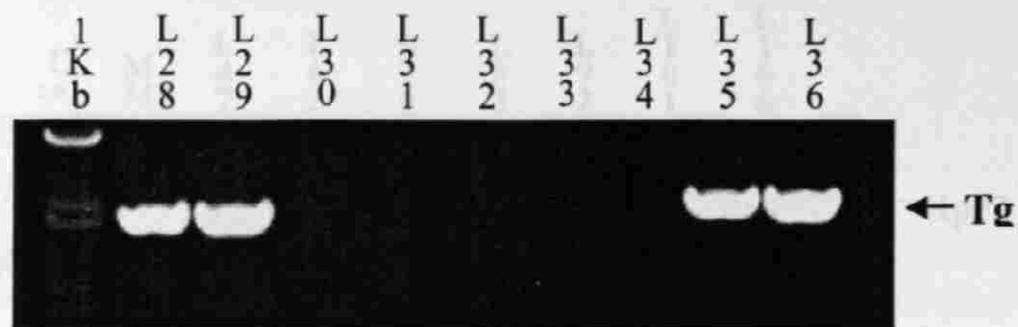
mdm2



UANL

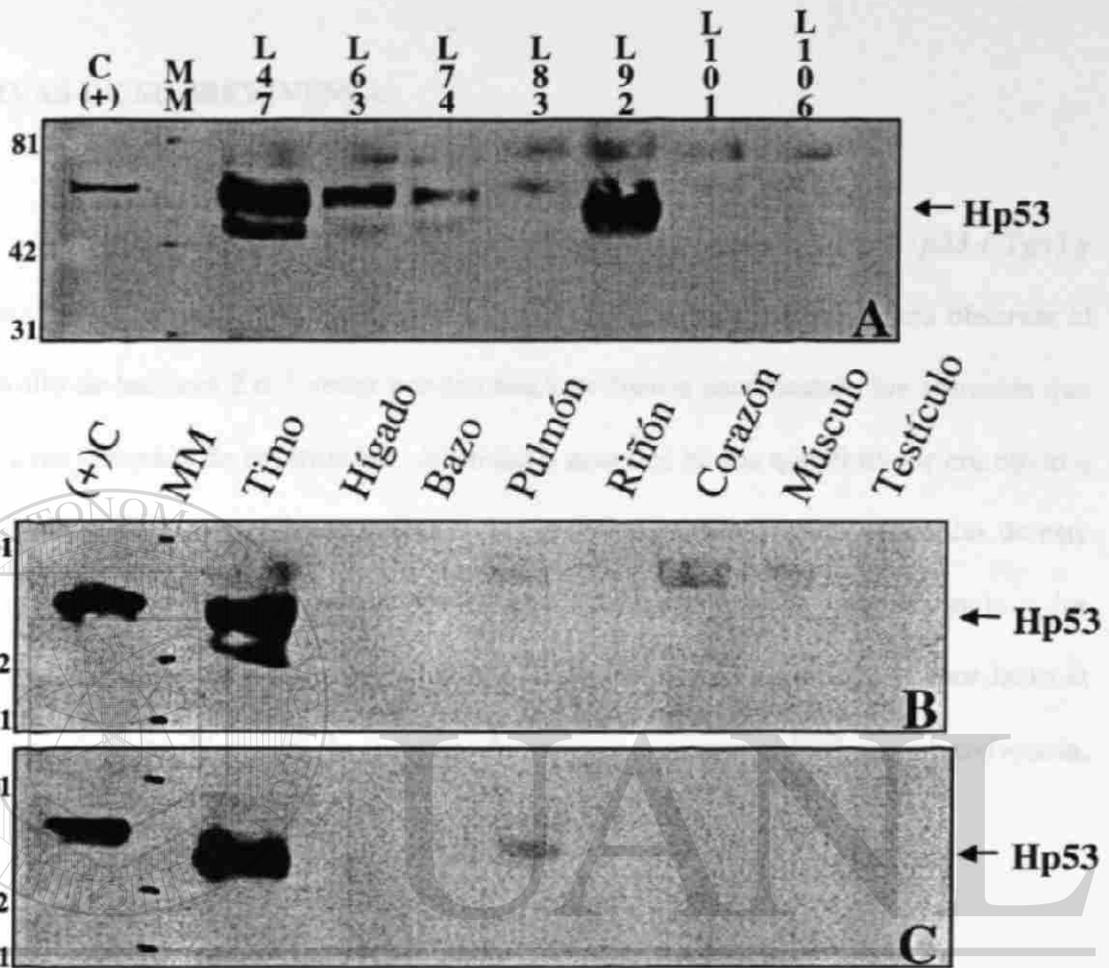
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 13. Genotipificación de los ratones por PCR. p53, Productos de PCR para el gen *p53*. *mdm2*, Productos de PCR para el gen *mdm2*. Wt, alelo wild type o silvestre; Mut, alelo mutante.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 14. Caracterización de las nuevas líneas de ratones. Genotipificación por PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores *LCKPRO-2F* y *Hp53LCK-1R*. C(+), control positivo, DNA de ratones previamente determinados como poseedores del transgen; C(-), control negativo, DNA de ratón silvestre; H₂O, control negativo sin DNA.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 15. Caracterización de las nuevas líneas de ratones transgénicos. A, análisis de Western Blot en timos de los ratones positivos por PCR. B, análisis de Western Blot en diferentes órganos del ratón L47 para determinar la especificidad de expresión. C, análisis de Western Blot en diferentes órganos del ratón L92 para determinar la especificidad de expresión. MM, marcadores de peso molecular. C(+), control positivo, proteína p53 humana producida en *E.coli*.

este trabajo.

CURVAS DE SOBREVIVENCIA

Se formaron grupos de ratones $p53^{-/-}$ y positivos para el transgen ($p53^{-/-}Tg+$) y ratones $p53^{-/-}$ negativos para el transgen ($p53^{-/-}Tg-$). Se monitorearon para observar el desarrollo de tumores 2 o 3 veces por semana y se fueron sacrificando los animales que mostraban síntomas de enfermedad, debilidad o aquellos en los que el tumor era obvio a simple vista. En la figura 16 se muestran las curvas de supervivencia obtenidas de este estudio. Ambos grupos de ratones presentan el mismo patrón de supervivencia y sus curvas se entrecruzan. Cuando se compararon estas curvas con las reportadas por Jacks et al, se observó una diferencia de aproximadamente 4 semanas al 50% de supervivencia, pero en general, las curvas son muy similares (dato no mostrado).

INCIDENCIA DE TUMORES

Cuando los ratones eran sacrificados o bien, cuando se encontraban muertos, se les practicaba una necropsia en busca de anomalías (tumores, órganos de tamaños anormales, coloraciones anormales, etc) que eran registradas en una bitácora. De cada ratón se almacenaban los tumores y demás tejidos (timo, corazón, pulmón, hígado, intestino, bazo, páncreas, testículo y en algunos casos cerebro) en una solución fijadora de formaldehído hasta su procesamiento. En el estudio patológico se encontró que la incidencia de linfomas de timo disminuyó ligeramente en el grupo $p53^{-/-}Tg+$ con

Curva de Supervivencia

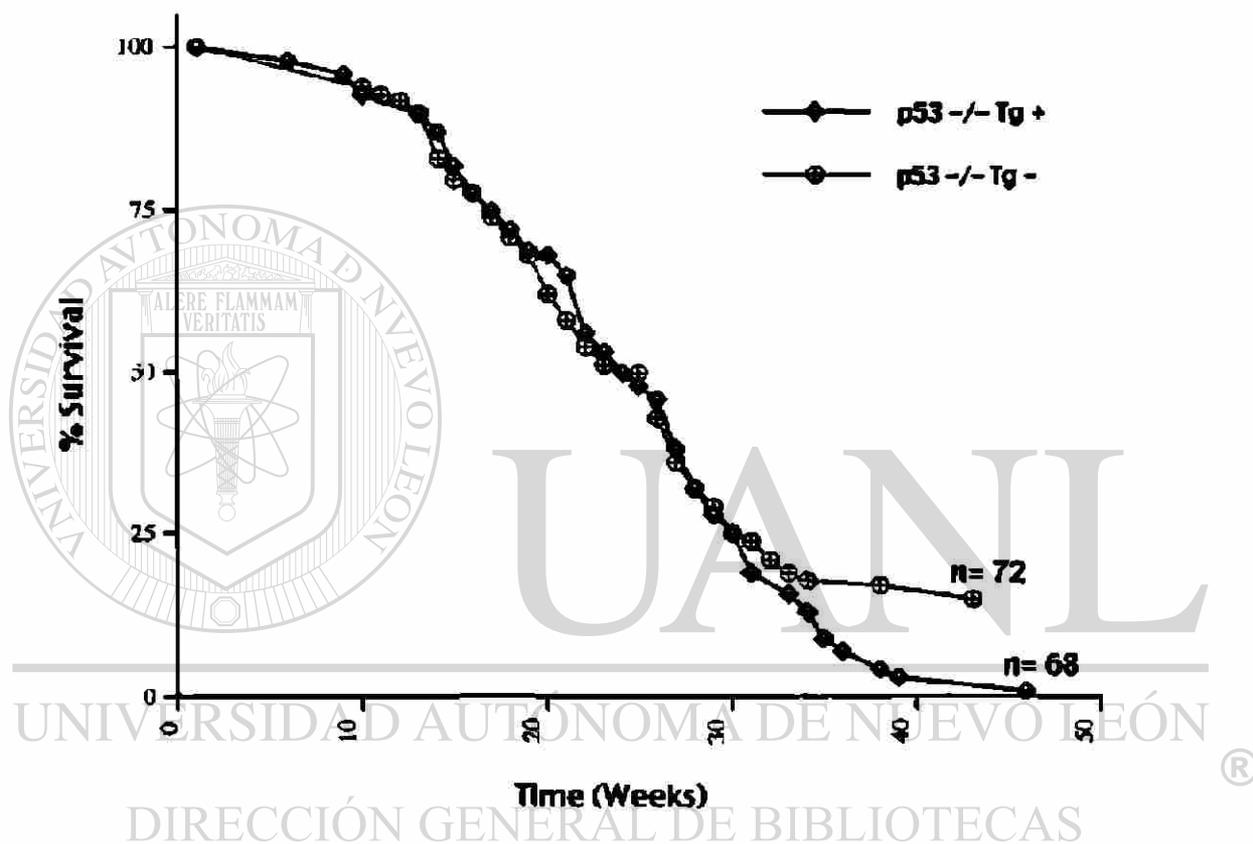


Figura 16. Comparación de las curvas de supervivencia de los ratones carentes de *p53* positivos (Tg+) y negativos (Tg-) para el transgen. N, tamaño de la muestra. Time, tiempo en semanas. % Survival, porcentaje de supervivencia.

respecto al grupo *p53^{-/-}Tg⁻*, 64% y 71% respectivamente (figura 17), pero esta diferencia no es significativa (*p*-value= 0.3990, Apéndice 1). Además se encontró que la mayoría de los ratones con linfoma de timo mostraban diseminación o metástasis de dicho tumor a otros órganos (Figuras 18A-18C). Sin embargo, un descubrimiento más interesante fue que el resto del espectro de tumores observados mostró diferencias entre ambos grupos (Figura 19). El segundo tipo de tumor más frecuentemente observado después del linfoma de timo es el hemangiosarcoma (figura 20A), con una incidencia de 33%, contra 13% observado en el grupo control. También se observaron tumores en el grupo de ratones *p53^{-/-}Tg⁺* que no se desarrollaron en el grupo control o bien, se desarrollaron en menor proporción, tales como: retinoblastoma (figura 20A), tumores en glándula mamaria (figura 20B), sarcoma (figura 20B), adenocarcinoma (figura 20C) y teratoma (figura 20D). De estos, únicamente el hemangiosarcoma y los tumores de glándula mamaria muestran diferencia significativa entre los dos grupos, *p*-value= 0.0056 y 0.0486, respectivamente (Apéndice 1). Otro dato interesante desde el punto de vista

patológico fue la identificación de un tipo de tumor del cual no existen reportes en la literatura. Se trata de un hemangiosarcoma de células gigantes (figura 21). La tabla 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos, así como la comparación con los datos reportados por Jacks et al.

RATONES *p53^{-/-}mdm2^{-/-} Tg⁺*

Otro de los objetivos centrales de este estudio era la creación de ratones transgénicos que expresaran *Hp53* en ratones con un fondo genético carente de *mdm2*. Los ratones *mdm2^{-/-}* no son viables y la única forma de conseguirlos es eliminando también a *p53*. Por esta razón no ha sido posible tener información acerca del papel de

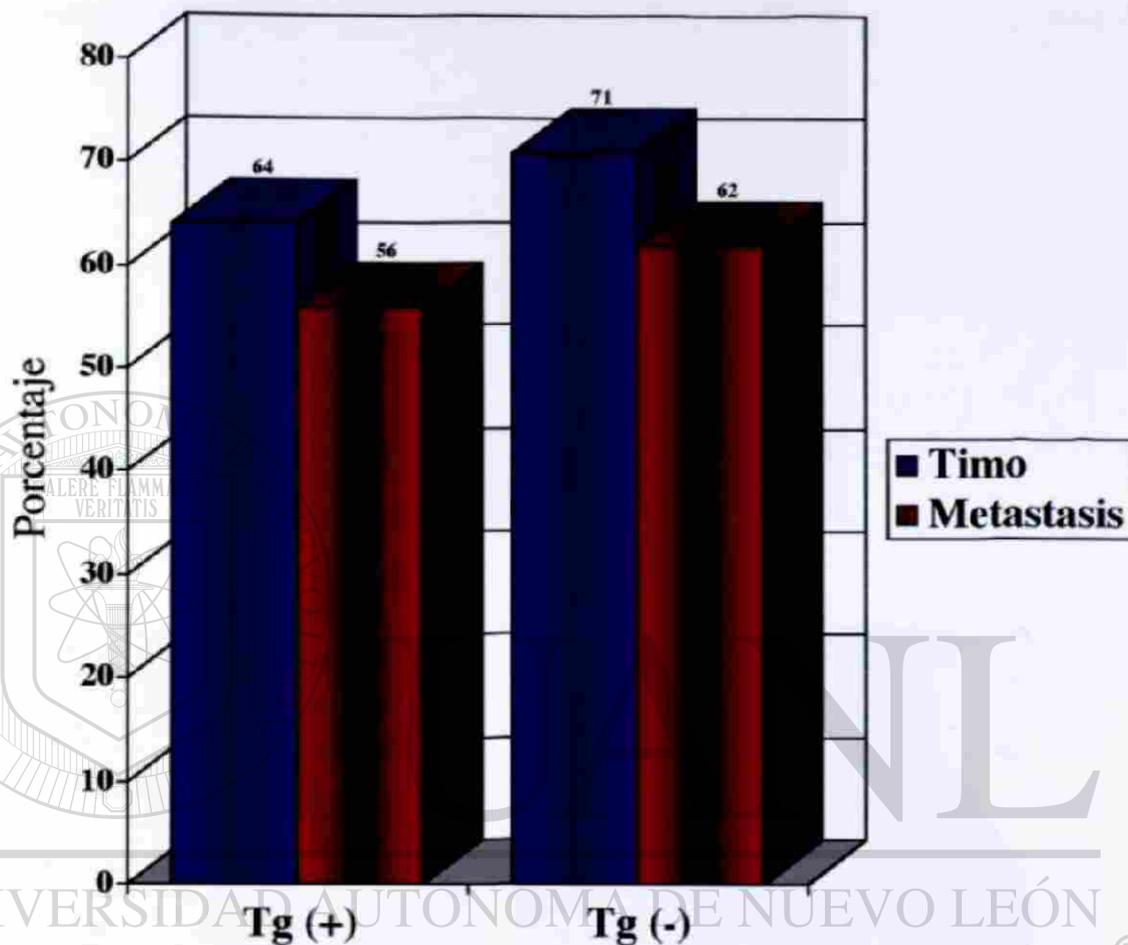


Figura 17. Incidencia de linfomas de Timo. Tg (+) es el grupo de ratones *p53*^{-/-} positivos para el transgen. Tg(-) es el grupo de ratones *p53*^{-/-} negativos para el transgen. Las barras azules indican el porcentaje de animales que desarrollaron linfoma de timo y las barras rojas indican el porcentaje de los animales con linfoma de timo que mostraron diseminación del linfoma a otros tejidos.

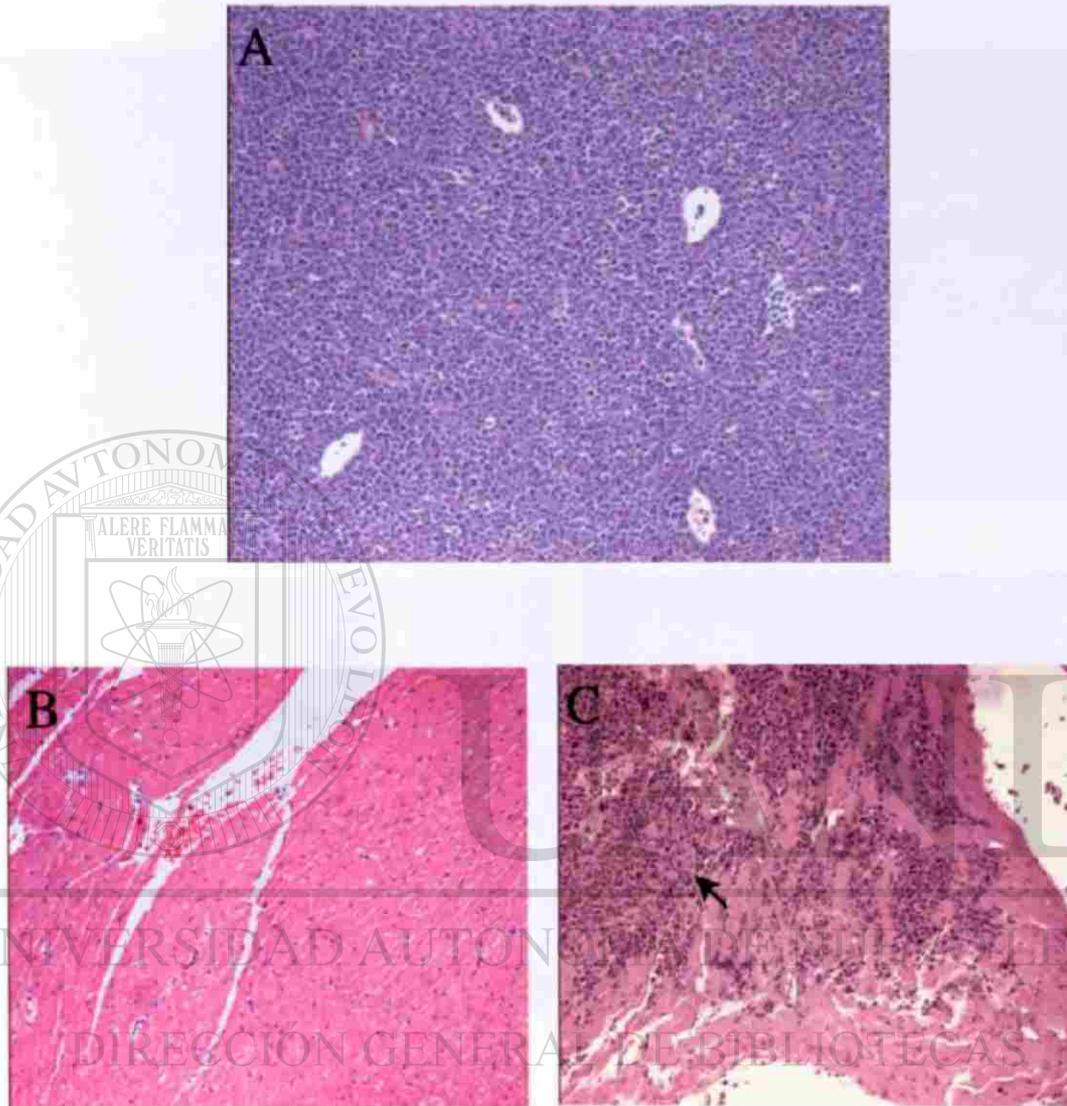
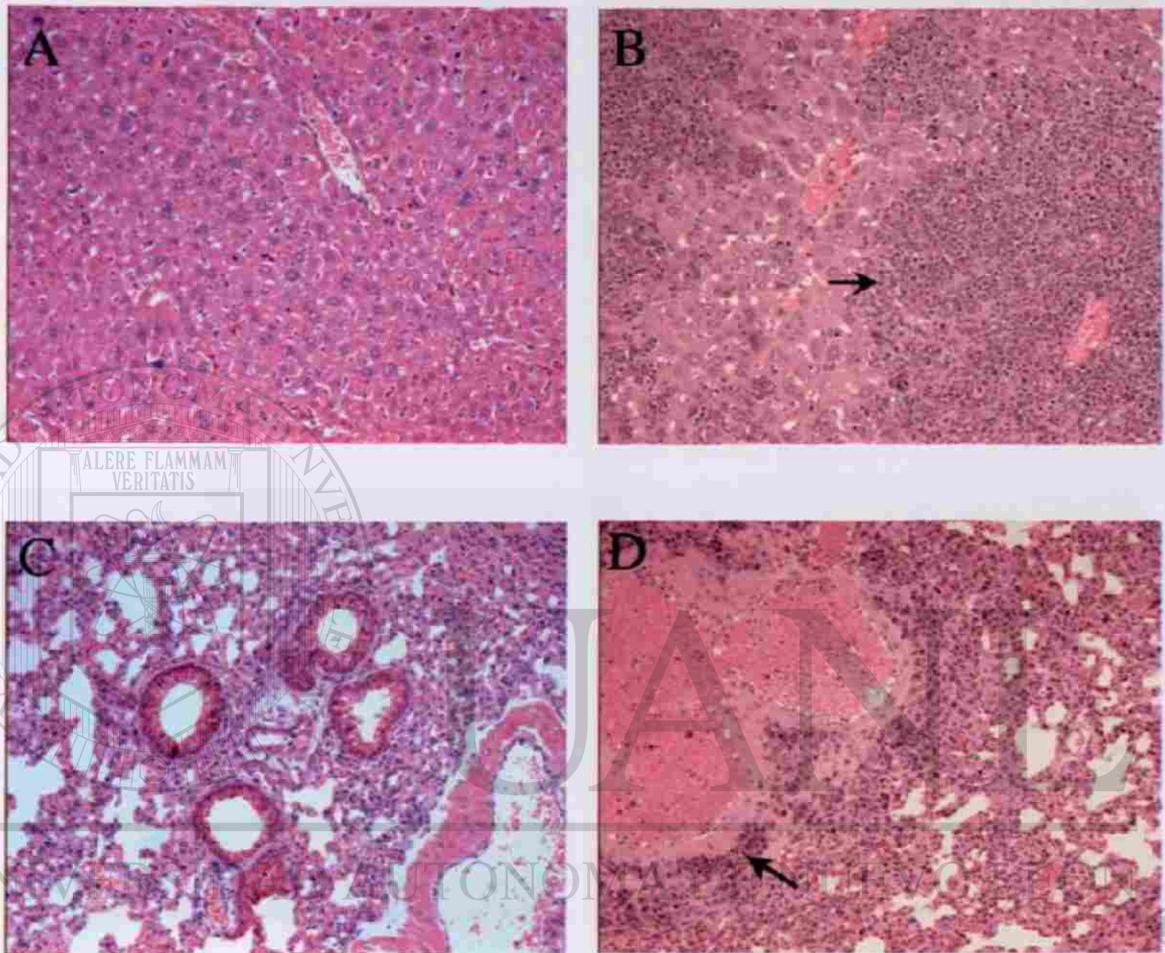
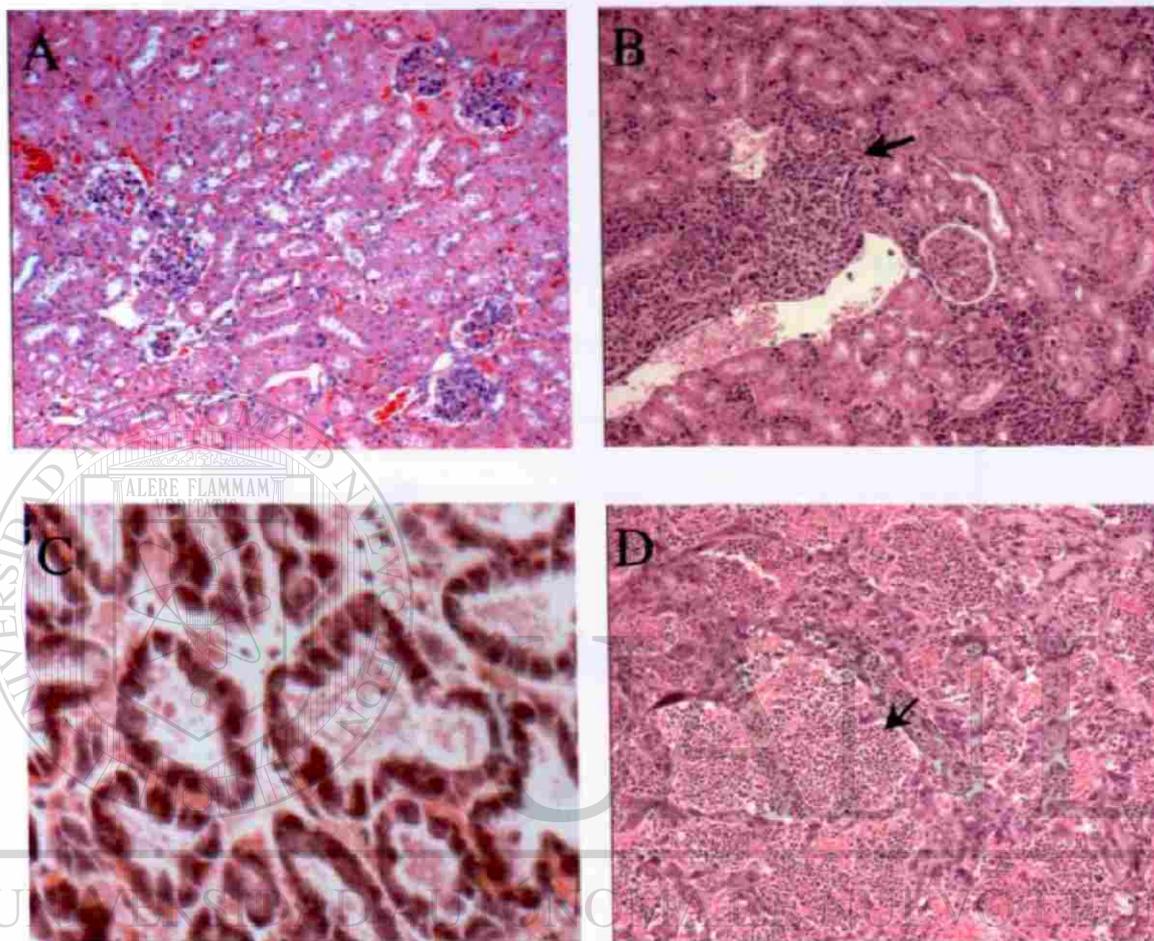


Figura 18A. Histopatología del linfoma de Timo y su diseminación a otros tejidos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Linfoma de timo. B, Corazón normal. C, Corazón invadido por el linfoma de timo. La flecha indica el lugar en donde se localiza el tumor invasor.



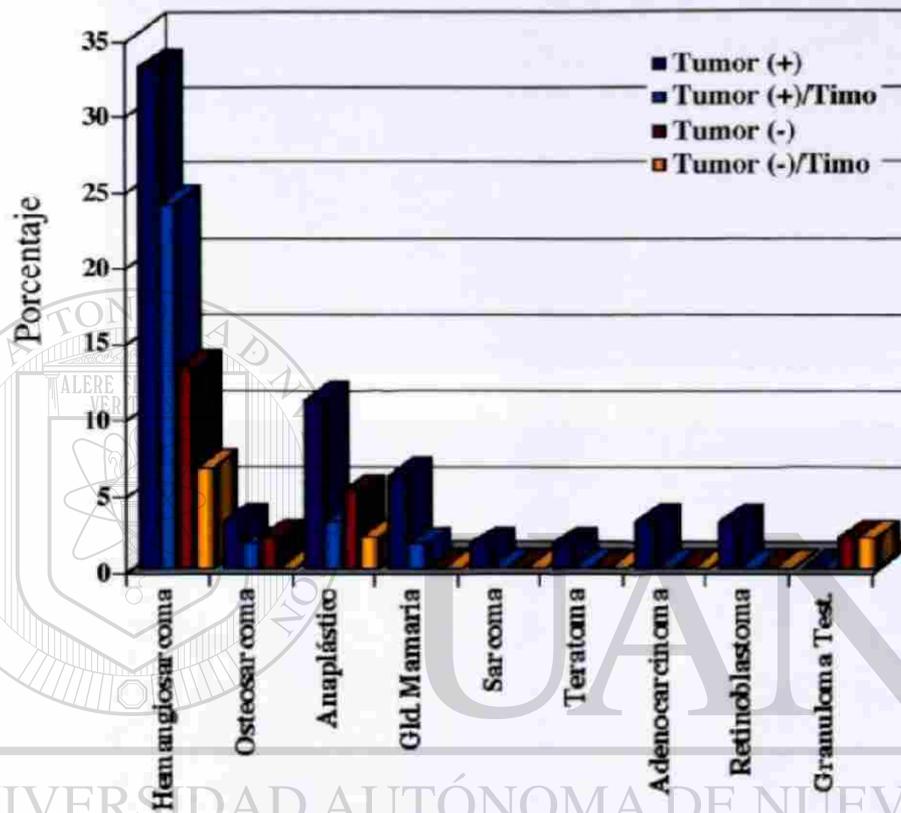
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 18B. Histopatología del linfoma de Timo y su diseminación a otros tejidos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Hígado normal. B, Hígado invadido. C, Pulmón normal. D, Pulmón invadido. Las flechas indican el lugar en donde se localiza el tumor invasor.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 18C. Histopatología del linfoma de Timo y su diseminación a otros tejidos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Riñón normal. B, Riñón invadido. C, Glándula mamaria normal. D, Glándula mamaria invadida. Las flechas indican el lugar en donde se localiza el tumor invasor.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 19. Espectro de tumores en ratones *p53*^{-/-}. Las barras azules representan los ratones positivos para el transgen. Las barras celestes representan el porcentaje de ratones positivos para el transgen que además desarrollaron linfoma de timo. Las barras rojas representan los ratones negativos para el transgen. Las barras amarillas representan los ratones negativos para el transgen que además desarrollaron linfoma de timo. Tim, timo. Test., testicular.

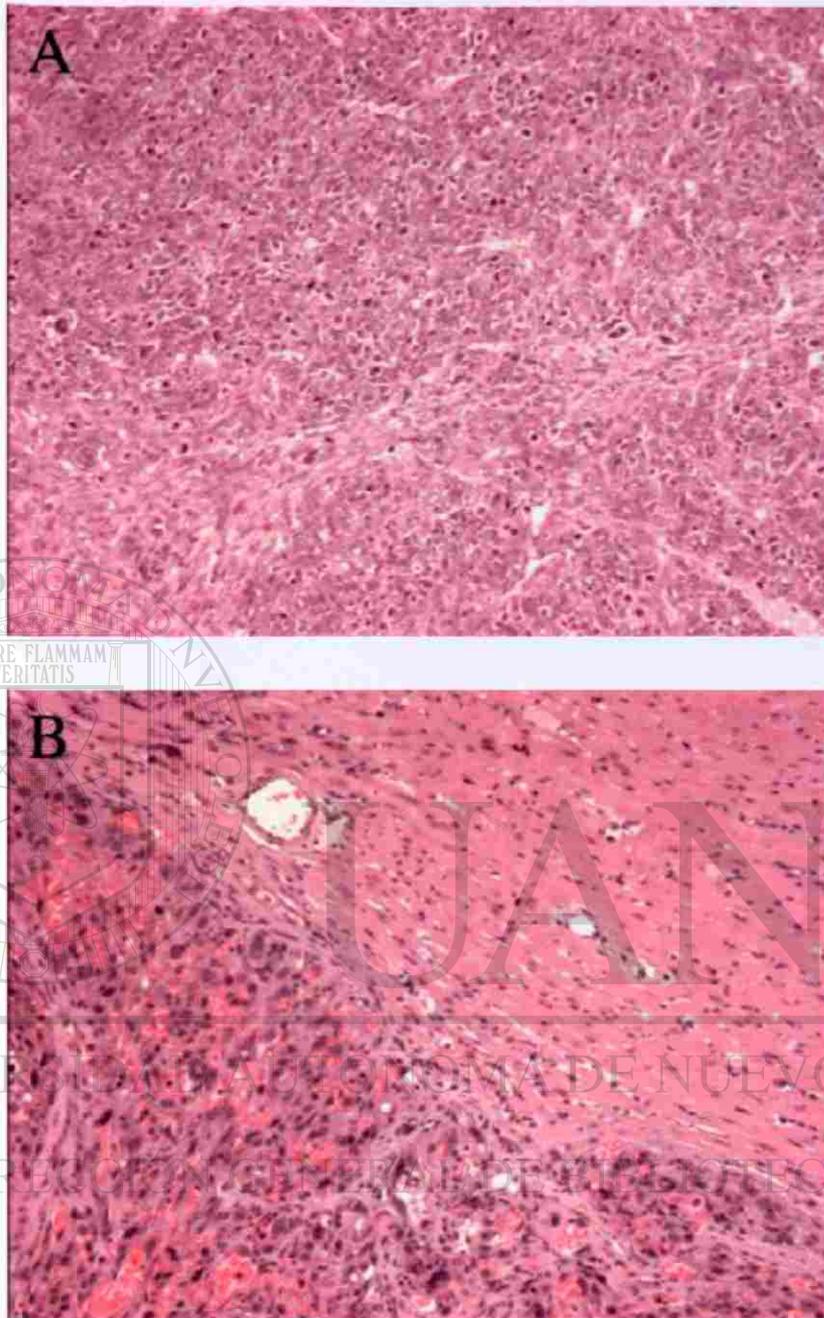


Figura 20A. Histopatología de otro tipo de tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Hemangiosarcoma. B, Retinoblastoma. 200X.

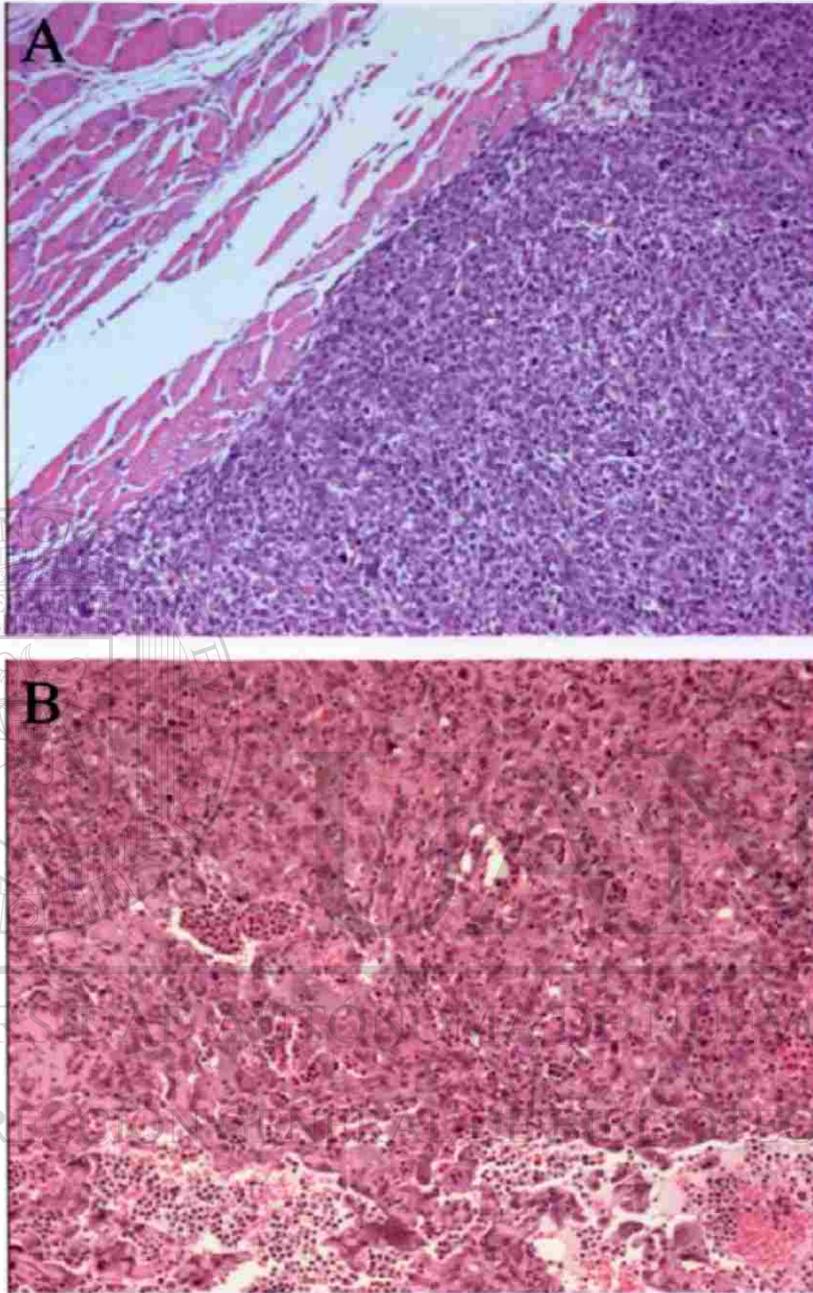


Figura 20B. Histopatología de otros tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Sarcoma. B, Hemangiosarcoma de glándula mamaria. 200X.

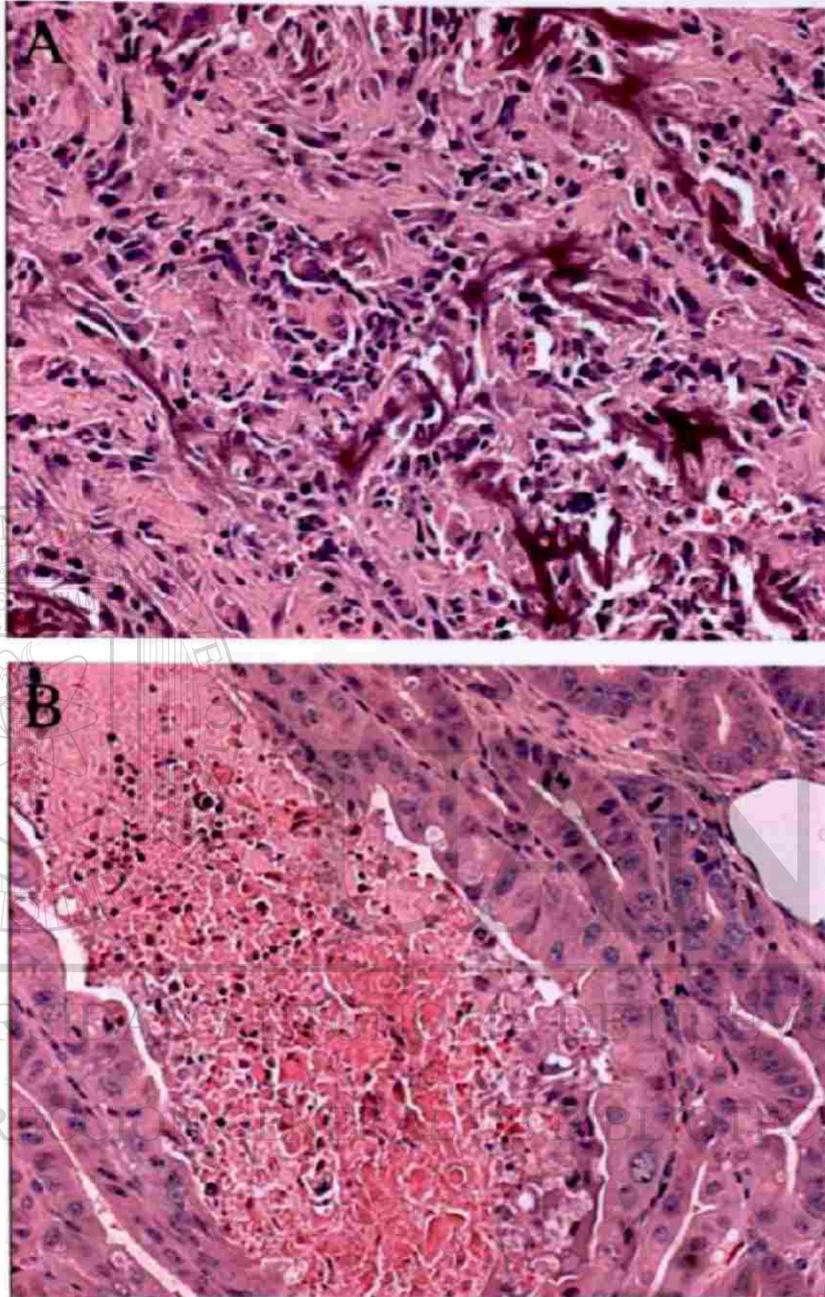


Figura 20C. Histopatología de otros tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Osteosarcoma. B, Adenocarcinoma. 200X.

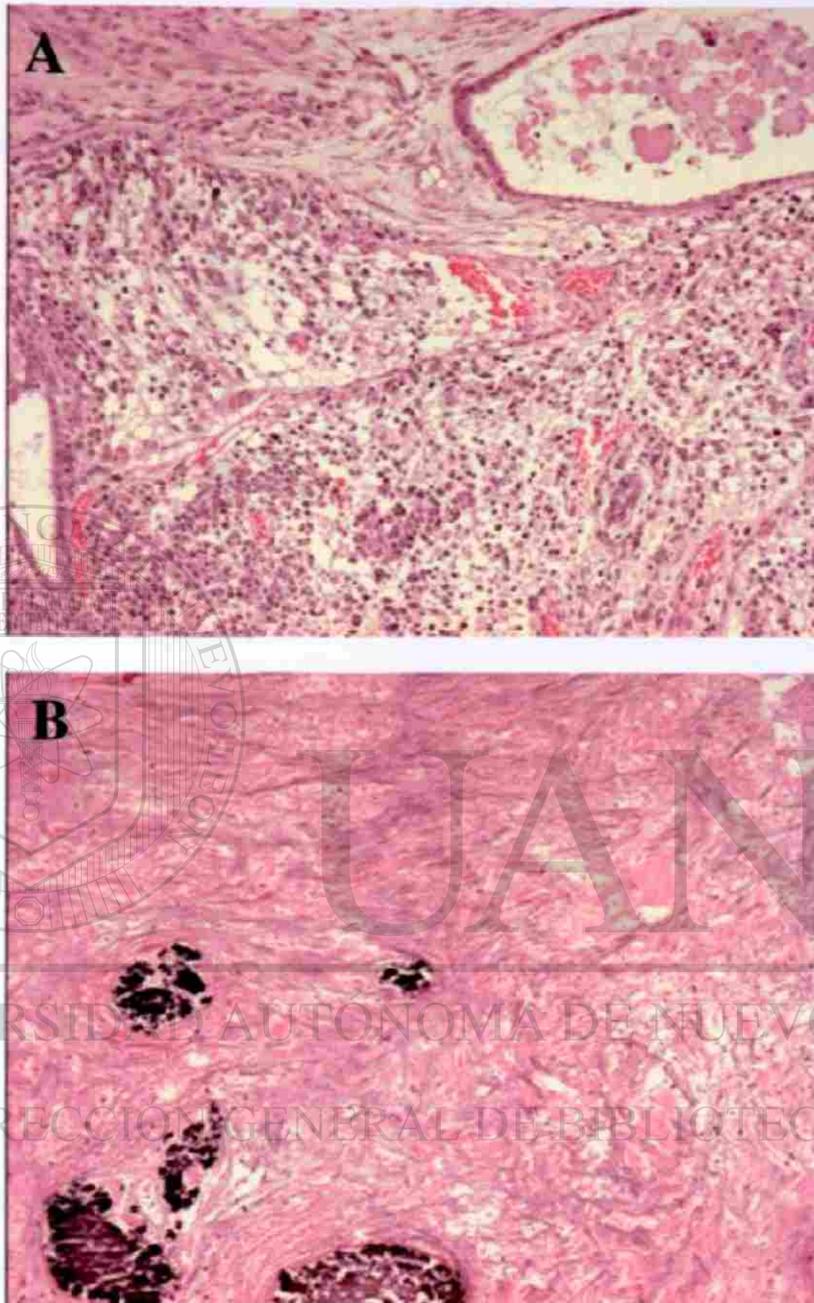


Figura 20D. Histopatología de otros tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. Diferentes áreas de un teratoma mostrando compartimentos tipo hemático (A) y tipo osteoide (B). 200X.

Fenotipo	Tyler Jacks p53-/-*	LcK-Hp53 p53-/-
50% sobrevivencia	18-19 semanas	23-24 semanas
0% sobrevivencia	9 meses	11 meses
Linfomas (timo)	71%	64%
Metastasis	??**	88%
Segundo tumor (+ timo)	12%	33%
Hemangiosarcoma	< 5%	33%
Rhabdomyosarcoma	5%	ND
Teratoma	< 5%	1.5%
Tumores en glándula mam.	0%	6%
Retinoblastoma	0%	3%
Adenocarcinoma	0%	3%

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



TABLA 3. Comparación de los fenotipos observados en este estudio y los observados en el estudio de la inactivación del gen *p53* en ratones. * (JACK). **, No se menciona el desarrollo de metástasis en ese estudio, pero si se presentó alguna no fué significativa (Tyler Jacks comunicación directa). ND, no determinado, la incidencia de Rhabdomyosarcoma no se determinó debido a histológicamente es muy parecido a otros tumores y eso lo hace muy difícil de diagnosticar sin tinciones especiales, sin embargo, parece ser similar a la observada en Jacks et al.

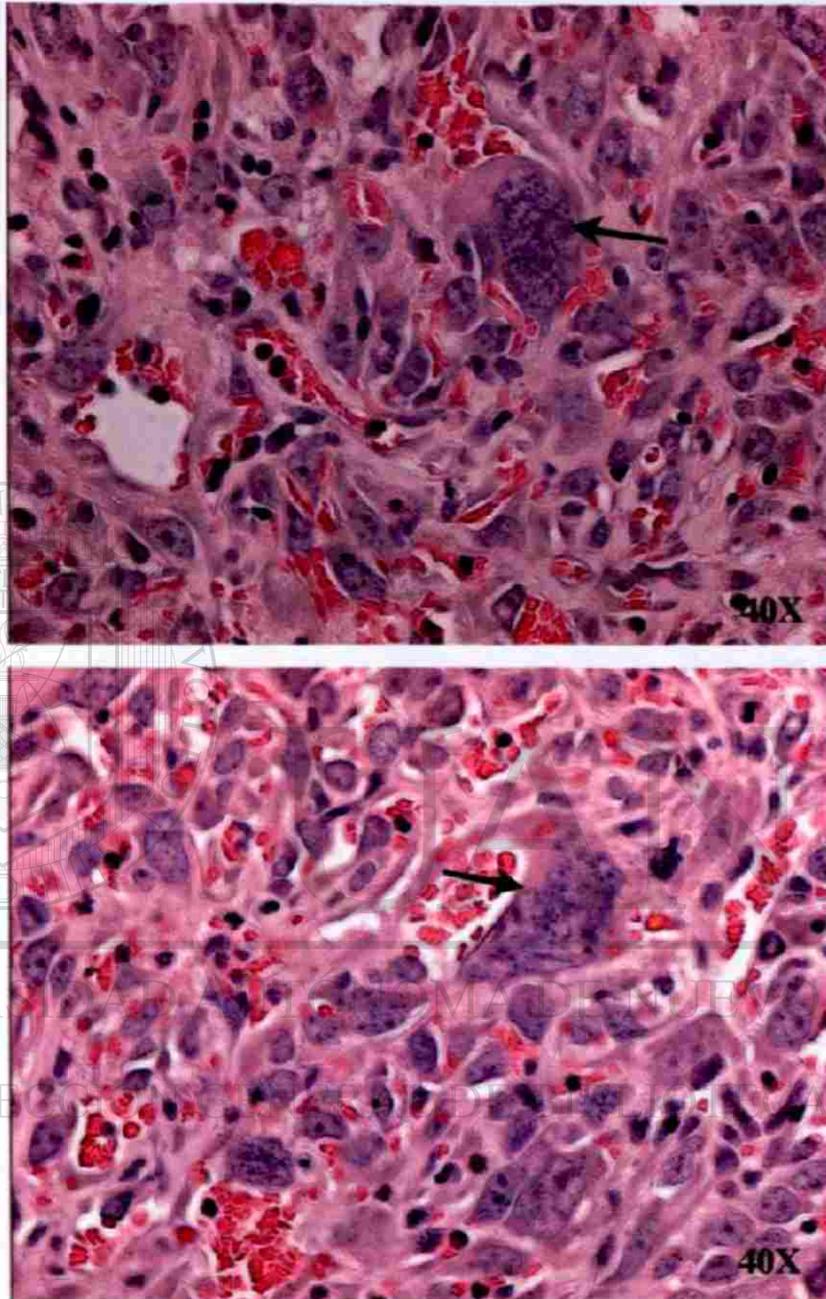


Figura 21. Hemangiosarcoma de células gigantes. Tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas muestran la localización de las células gigantes. 400X.

p53 en la ausencia de MDM2 en tejidos adultos. Para este objetivo se realizaron las cruas descritas al inicio y se logró la obtención de 6 ratones *p53^{-/-}mdm2^{-/-}Tg⁺*, pero murieron rápidamente debido al desarrollo de linfomas de timo (5 de 6) o hemangiosarcoma (1 de 6). De los 5 ratones con linfoma de timo, 3 desarrollaron metástasis. Para el grupo control se obtuvieron también 6 ratones, de los cuales 4 presentaron linfoma de timo (todos con metástasis), 1 desarrolló teratoma y 1 más no presentó formación de tumores.

Como nuestro objetivo era ver como funcionaba p53 en ausencia de MDM2 se procedió a revisar si los linfomas de timo desarrollados en los estos ratones mostraban evidencias de la función de p53 en la forma de apoptosis. Para este objetivo se sometieron a la técnica de Tunel para la determinación de apoptosis y ninguno de los tumores analizados resultó positivo, mientras que los controles positivos si lo hicieron (figura 22).

Como lo encontrado, la ausencia de apoptosis en un tejido con p53 en ausencia de su regulador MDM2, no se apegaba a lo esperado se tenía que confirmar que la proteína se seguía expresando en los tumores. Para esto se procedió a la realización de tinciones inmunohistoquímicas en las muestras existentes. De los 5 linfomas de timo provenientes de los ratones *p53^{-/-}mdm2^{-/-}Tg⁺* solamente uno mostró tinción positiva con el anticuerpo monoclonal Bp53-12 (figura 23). La tinción estaba bien delimitada a una zona del tumor y era bastante fuerte, sin embargo, esta misma zona era negativa para apoptosis. Después de un segundo análisis por parte de los patólogos se observó que el área positiva para la

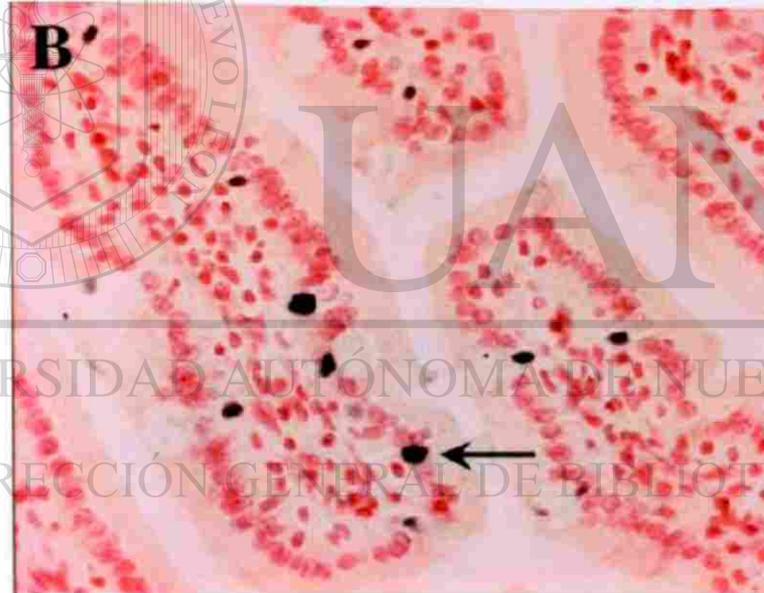
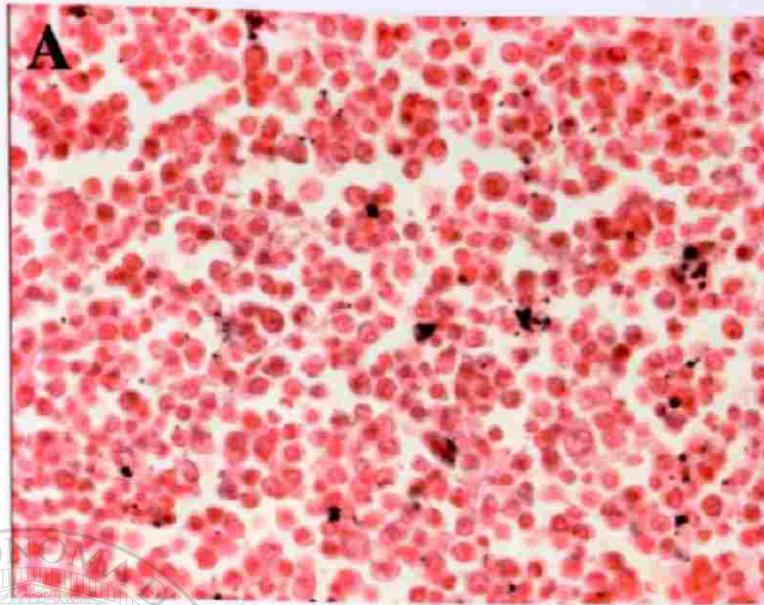


Figura 22. Análisis de TUNEL para la determinación de apoptosis. Tinción de contraste con Nuclear Red Fast. A, Linfoma de timo proveniente de un ratón *p53-/-mdm2-/-* positivo para el transgen. B, Control positivo, intestino de ratón silvestre. La flecha indica el lugar en donde se localiza una célula apoptótica. 400X.

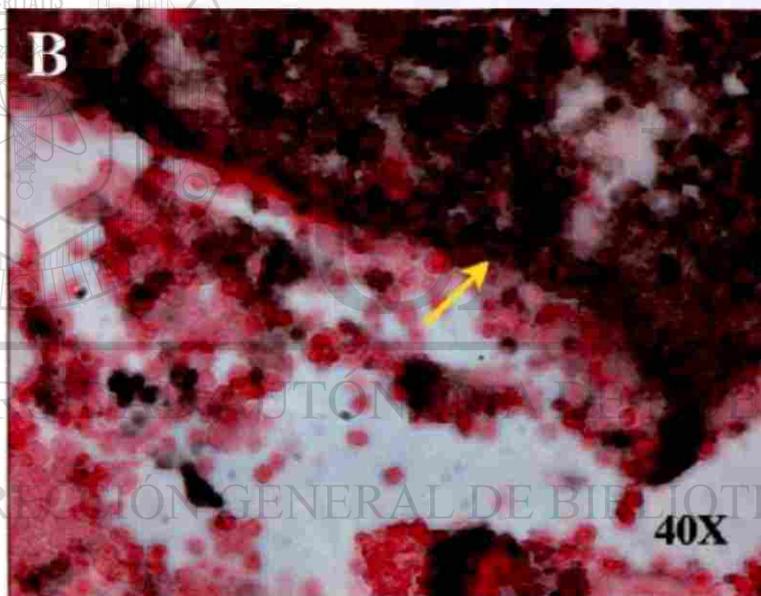
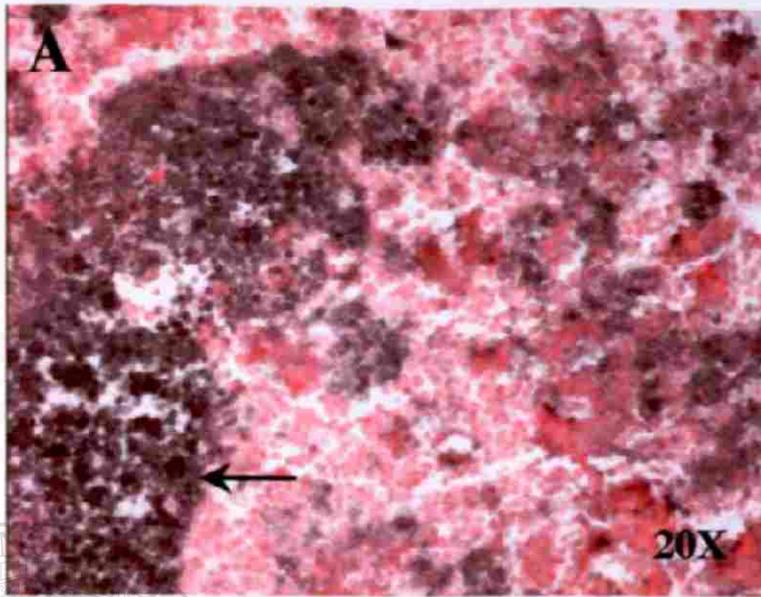
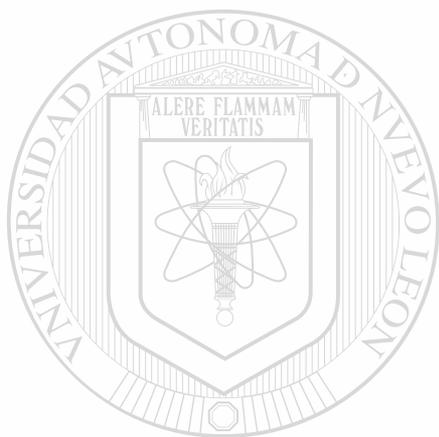


Figura 23. Tinción inmunohistoquímica de un linfoma de timo proveniente de un ratón *mdm2-/- p53-/-* positivo para el transgen. A. Tinción con el anticuerpo monoclonal específico para p53 humano Bp53-12, 200 amplificaciones. B, Mismo tejido aumentado 400 amplificaciones. Las flechas indican el área positiva para la tinción.

tinción era un área necrótica (figura 24). Tinciones posteriores en otros tejidos que mostraban necrosis confirmaron este hecho ya que también desarrollan tinción positiva con el mismo anticuerpo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

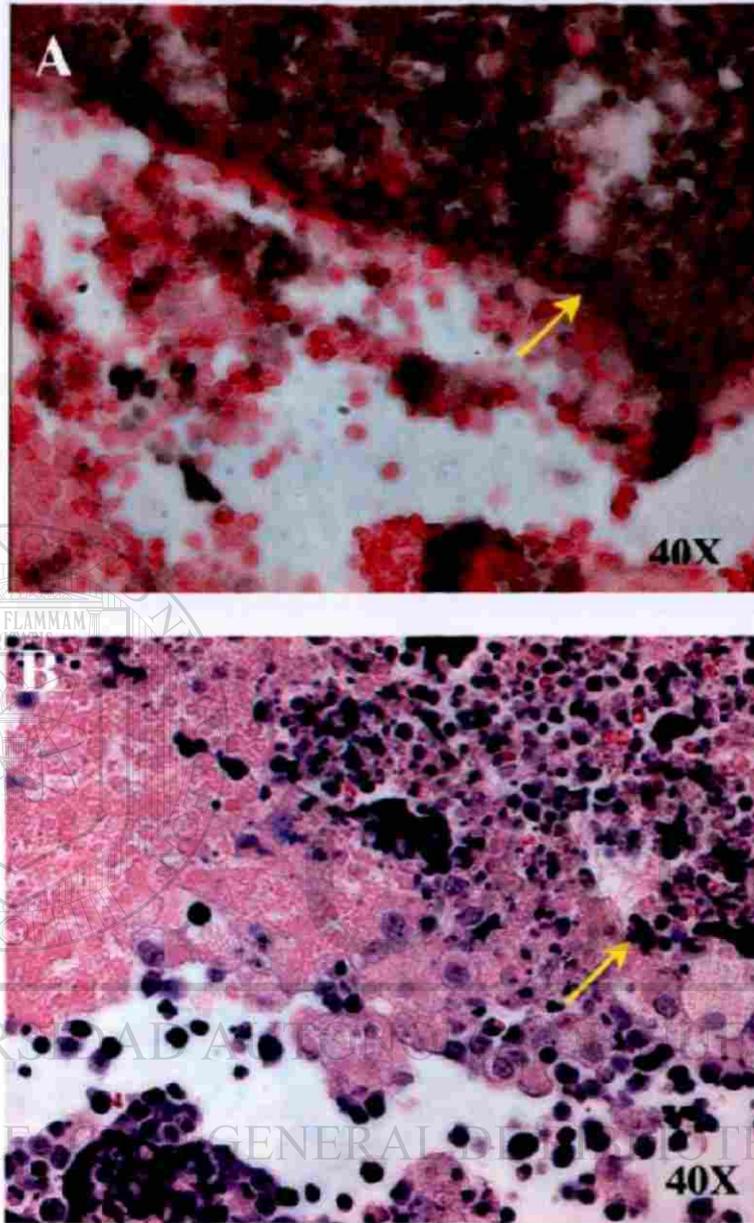


Figura 24. Tinción inmunohistoquímica de un linfoma de timo proveniente de un ratón *mdm2-/- p53-/-* positivo para el transgen. A. Tinción con el anticuerpo monoclonal específico para p53 humano Bp53-12, 400 ampliificaciones. B, Tinción de hematoxilina y eosina del mismo tejido aumentado 400 ampliificaciones. Las flechas indican el área positiva para la tinción (A) o la zona necrótica (B).

DISCUSION

En la actualidad una gran parte de la investigación científica está enfocada a la búsqueda y entendimiento de las causas del cáncer y las formas de prevenirlo. Los grandes avances en el campo de la biología y la genética moleculares han traído como resultado el descubrimiento de genes que están implicados en las vías de desarrollo del cáncer. Las herramientas utilizadas para estos fines van desde sistemas bioquímicos y biológicos *in vitro*, hasta el uso de modelos animales de experimentación. Los sistemas *in vitro* son de gran importancia porque a través del tiempo han venido produciendo grandes cantidades de información acerca de las características de determinadas moléculas. Por otro lado, los modelos animales proveen de un sistema experimental *in vivo* para estudiar todos los aspectos de los procesos biológicos.

En el estudio del cáncer y la tumorigénesis, la disponibilidad de ratones transgénicos, que sobreexpresan un oncogenoma específico, y de ratones knockout o deficientes, con deleciones de genes supresores de tumores ha traído como resultado una basta cantidad de información referente a los efectos de los diferentes eventos genéticos en el desarrollo del cáncer. El uso de modelos murinos nos permite determinar la importancia de la presencia del sistema sanguíneo y un sistema inmunológico intactos sobre la formación y el crecimiento de tumores. Además, el potencial metastásico de células con alteraciones genéticas puede analizarse en un ratón, pero no *in vitro* en cultivo de tejidos (Lozano and Liu, 1998).

En el presente trabajo se hizo uso de los ratones transgénicos y de modelos murinos con genes inactivados, para tratar de elucidar una parte más de las vías del gen supresor de tumores *p53*. Las alteraciones en *p53* se encuentran entre los eventos moleculares más frecuentemente encontrados en neoplasias, tanto en animales como en humanos (Greenblatt et al., 1994; Hainaut et al., 1998). En condiciones fisiológicas, en células normales, la proteína *p53* se expresa a niveles muy bajos y tiene una vida media muy corta. Bajo el efecto de numerosos factores, tales como daño al DNA, hipoxia, hiperoxia, hipoglicemia, carencia de nucleótidos y activación de oncogenes, *p53* se estabiliza y se activa (el-Deiry, 1998). Las respuestas que esto puede desencadenar son: inhibición del ciclo celular en la fase G1 o G2, apoptosis, envejecimiento celular, diferenciación, reparación del DNA y antiangiogénesis (El-Deiry, 1998). Estas respuestas son mediadas por diferentes genes blanco de *p53*. *mdm2* es un regulador negativo de *p53* (Kubbutat et al., 1997) que cuando se une a él, bloquea su función como activador transcripcional e induce su degradación (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1998). *p21-*

WAF1 es activado por *p53* a través de sus dos elementos de respuesta en el promotor (el-Deiry et al., 1993; el-Deiry et al., 1995), inhibiendo CDKs y produciendo así un arresto del ciclo celular en la fase G1. *bax* es un gen blanco de *p53* cuya expresión es incrementada a través de un elemento de respuesta a *p53* en su promotor (Miyashita and Reed, 1995) y produce inducción de apoptosis a nivel de liberación de citocromo C de la mitocondria (Rosse et al., 1998).

Diferentes grupos de investigación han generado ratones deficientes en *p53* y todos han obtenido resultados similares (Clarke et al., 1993; Donehower et al., 1992;

Jacks et al., 1994; Tsukada et al., 1993). La ausencia de *p53* disminuye considerablemente la sobrevivencia de estos ratones debido a un incremento en la predisposición al desarrollo de tumores. El espectro de tumores observado es similar en todos los casos, predominando los linfomas (75%) y los sarcomas (25%). Sin embargo, también ha quedado claro que el fondo genético de cada ratón es un factor importante en el desarrollo de ciertos tumores. 35% de los ratones *p53*^{-/-} 129/Sv puros desarrollan tumores testiculares mientras que solo el 9% de los ratones *p53*^{-/-} 126/Sv-C57BL/6 híbridos lo hacen (Harvey et al., 1993).

La delección de *mdm2* en ratones produce letalidad embrionaria entre los 3.5 y 5.5 días de gestación (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). La ausencia simultánea de *p53* rescata este fenotipo, demostrando que la letalidad es causada por una actividad desregulada de *p53*. Esto ha traído como consecuencia que no haya sido posible estudiar los efectos de *p53* en un tejido adulto en ausencia de MDM2. Se especula que

MDM2 es igual de importante en la regulación de la actividad de *p53* en los tejidos de un animal adulto, como lo es durante su desarrollo embrionario. Sin embargo, no existen modelos animales que logren aclarar este punto.

Uno de los objetivos de este trabajo era el comprobar si la expresión de *p53* en timo disminuía la incidencia de linfomas de timo en los ratones *p53*^{-/-}. Para este fin, dirigimos la expresión de *p53* humano (*Hp53*) en timo, desarrollando un ratón transgénico que expresa *Hp53* bajo la regulación del promotor LcK en un fondo genético

carente de p53. La hipótesis es que la presencia de Hp53 en el timo de estos ratones lograría inhibir el desarrollo de los linfomas

En el presente trabajo se logró la creación de una línea de ratones transgénicos que expresan Hp53 en el timo, pero también en otros tejidos como: corazón, pulmón, riñón y bazo (figura 12). El promotor proximal del gen LcK murino es responsable de la expresión de dicho gen en timocitos y se utiliza para la generación de ratones transgénicos con expresión específica dirigida al timo (Abraham et al., 1991; Allen et al., 1992; Chaffin et al., 1990). Sin embargo, existen dos reportes independientes que muestran que transgenes dirigidos por este promotor son expresados también en células T circulantes y presentes en otros tejidos (Buckland et al., 2000; Shimizu et al., 2001). Esto podría explicar la presencia de la proteína transgénica en los otros tejidos, ya que en todos ellos se pueden encontrar células T. Sin embargo, la expresión de p53 fue mayor en algunos de estos tejidos que en el propio timo (figura 12). Por lo tanto, es muy probable que el transgen se haya insertado en el genoma en un lugar donde quedó bajo la influencia de algún otro promotor que activa su expresión en estos tejidos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La expresión de la proteína es baja ya que no es detectable en Western Blots sino únicamente después de someter los ratones a radiación ionizante (IR). Este es un aspecto conveniente, ya que se está recapitulando la manera en que p53 actúa normalmente (el-Deiry, 1998). También se logró la creación y caracterización de dos líneas adicionales de ratones que expresan Hp53 específicamente en timo. Dicha expresión es mas elevada que

la observada en la primera línea que obtuvimos ya que en este caso la proteína es observada aún y cuando no se someten los ratones a IR.

La obtención de ratones *p53*^{-/-}*Tg*⁺ nos permitió comparar su sobrevivencia e incidencia de tumores con los observados en los ratones *p53*^{-/-} (Jacks et al., 1994). Las curvas de sobrevivencia no muestran diferencias entre estos dos modelos. Esto nos indica que la presencia del transgen no tiene efectos significativos en el desarrollo y sobrevivencia de los ratones. La disminución que se observó en la incidencia de linfomas de timo (71% a 64%) en nuestros ratones transgénicos sugiere que la presencia de *p53* humano tuvo un efecto positivo en contra del desarrollo de linfomas de timo en los ratones *p53*^{-/-}. Es probable que la razón de que los linfomas de timo no se hayan eliminado completamente en nuestros ratones sean los bajos niveles de expresión del transgen. Esto a su vez puede ser el resultado de la inserción de una sola copia del transgen al genoma de los ratones. Esto se correlacionaría de alguna manera con lo

observado en los pacientes de síndrome Li-Fraumeni (LFS), los cuales tienen mutaciones en uno de los alelos de *p53* en línea germinal. Este hecho los hace muy propensos al desarrollo de tumores, ya que solamente se requiere la mutación del otro alelo para inactivar a *p53* (Evans and Lozano, 1997). Puede ser que algo similar esté ocurriendo en este modelo. Al tener bajo número de copias del transgen en el genoma es más fácil inactivarlas que teniendo múltiples copias del mismo. Esta posibilidad podrá ser revisada al repetir los experimentos con las nuevas líneas de transgénicos que tienen un nivel de expresión más elevada y por lo tanto que es muy probable que contengan múltiples copias del transgen insertadas en el genoma.

También es posible que la presencia de p53 transgénico no lograra modificar grandemente el fenotipo de linfomas debido a la presencia de mdm2, su principal regulador negativo. Si p53 se expresa en niveles bajos y es aún capaz de activar la expresión de mdm2, entonces la presencia de mdm2 podría inactivar las funciones de p53 por alguna de las vías descritas anteriormente: exclusión nuclear (Tao and Levine, 1999), inhibición transcripcional (Barak et al., 1993; Momand et al., 1992) y ubiquitinación (Honda et al., 1997). Cualquiera de estos eventos produciría un ambiente equivalente al presentado en los ratones *p53*^{-/-} y por lo tanto fenotipos similares. Sin embargo, al ser *mdm2* un gen blanco de p53, no se esperaría que se expresara en grandes cantidades si p53 no se activa y normalmente se considera que MDM2 debe estar sobreexpresado para que sea capaz de inactivar a p53. En este contexto podrían entonces jugar un papel importante otras moléculas capaces de regular a p53 y que no son activadas transcripcionalmente por él, como es el caso de MDMX (Shvarts et al., 1996). Existen

tumores en los que p53 no presenta mutaciones y MDM2 no se encuentra sobreexpresado, pero MDMX está amplificado, lo cual indica que la sobreexpresión de MDMX puede representar un mecanismo alternativo para la inactivación de p53 (Riemenschneider et al., 1999). Esto podría ser analizado por análisis inmunohistoquímicos de los tumores, pero al momento no es posible ya que aún no existen anticuerpos específicos para MDMX que den buenos resultados en este tipo de experimentos.

Un hallazgo interesante en este trabajo fué el cambio observado en el espectro de tumores entre nuestro modelo y el de Jacks. Nuestros ratones presentaron un incremento en el desarrollo de hemangiosarcomas (33% contra < 5%). También se observó el desarrollo de tumores que no se presentan en el modelo de Jacks, como lo son: tumores en glándula mamaria (6%), retinoblastoma (3%) y adenocarcinoma (3%). Otro aspecto importante fué que la gran mayoría de los linfomas de timo (88%) se discriminaron a otros tejidos, fenómeno no observado en el modelo de Jacks. El incremento en la incidencia de hemangiosarcomas se puede deber a la diferencia entre los fondos genéticos de nuestros ratones y los que utilizó Jacks. Sin embargo, en nuestro grupo control, que son ratones *p53-/-* sin transgen provenientes de las mismas cruces que los transgénicos, la incidencia de hemangiosarcomas fué también inferior (13%). La diferencia entre nuestro grupo control y el grupo de Jacks se puede adjudicar a la diferencia de fondos genéticos (aprox. 8%). Entonces aún existe una diferencia de mas de 25% en la incidencia de hemangiosarcoma entre los dos grupos. Esta diferencia puede ser el resultado de la presencia del transgen en los ratones, lo que retrasaría la aparición de linfomas de timo y daría tiempo al desarrollo de otros tumores en los tejidos en donde no se encuentra *p53*.[®] Esto correlaciona con la hipótesis en la que se ha planteado que los ratones *p53-/-* presentan un número muy limitado de tipos de tumores debido a que el linfoma de timo se desarrolla muy rápidamente y provoca la muerte del ratón antes de que este logre desarrollar tumores en otros tejidos.

En cuanto a la diseminación del linfoma de timo a otros tejidos, esto si parece ser consecuencia de la diferencias en los fondos genéticos entre los grupos de ratones

comparados, ya que nuestro grupo control presentó dicha diseminación en proporciones similares (87%) a la observada en el grupo de transgénicos. Esto se correlaciona con otros estudios que han mostrado que cambios en el fondo genético produce cambios en los fenotipos desarrollados.

Otro aspecto de gran interés que queríamos estudiar en este trabajo era el comportamiento de p53 en tejidos adultos que carezcan de mdm2. Para esto también utilizamos los ratones transgénicos que creamos y los cruzamos con ratones *p53^{-/-}mdm2^{-/-}* hasta obtener ratones *p53^{-/-}mdm2^{-/-}* expresando el transgen *p53^{-/-}mdm2^{-/-}Tg⁺*. En estos ratones *p53^{-/-}mdm2^{-/-}Tg⁺* se quería analizar la vía de apoptosis dependiente de p53 en la ausencia de MDM2 en tejidos adultos. Desafortunadamente los pocos ratones con este genotipo que se obtuvieron murieron rápidamente debido a la formación de tumores, principalmente linfoma de timo. Se esperaba que la actividad de p53 en la ausencia de MDM2 fuera descontrolada y, como en el caso de los ratones carentes de *mdm2*, se produjera apoptosis dependiente de p53. Sin embargo, no se esperaba una letalidad embrionaria como en los ratones *mdm2^{-/-}* ya que la expresión del promotor *LcK* se inicia hasta el día 14-15 de la gestación mientras que los ratones *mdm2^{-/-}* mueren a los 5.5 días.

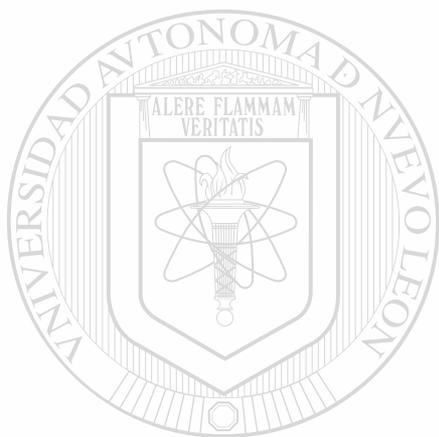
Cuando se analizaron los tumores desarrollados en estos ratones para ver si mostraban apoptosis se encontró que no lo hacían (figura 22). Una vez más, esto puede deberse a la inhibición de p53 por alguno de sus reguladores, como MDMX. Se ha propuesto que cuando p53 se expresa en bajos niveles MDMX es el encargado de su regulación negativa y que cuando la expresión es mayor, se activa la transcripción de

mdm2 y este es entonces el encargado de dicha regulación. Otra posibilidad era que p53 no se estuviera expresando en dichos tumores. Para analizar esto se sometieron los tumores a tinciones inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal específico para p53 humano. Se encontró una fuerte tinción en una área bien delimitada de uno de los tumores (figura 23), mientras que todos los demás fueron negativos. Como esta área del tumor también había sido teñida para la detección de apoptosis y era negativa, no era lógico que p53 estuviera en tan alta concentración y no estuviera induciendo apoptosis. Se volvió a revisar el tumor por parte de los patólogos y se encontró que el área con tinción positiva para p53 era una zona necrótica (figura 24). Cuando se tiñeron otras muestras con necrosis se encontró que el anticuerpo presenta reacción cruzada con algún elemento involucrados en la vía de necrosis que no es p53. También era posible que p53 sí se estuviera expresando en alta concentración y aún fuera incapaz de inducir apoptosis, el punto crucial en este modelos sería la presencia de mutaciones en p53. Para eliminar esta posibilidad se realizó una secuenciación del transgen integrado al genoma del ratón y

solo se encontró una mutación puntual pero que es silenciosa. Otro dato que indica que p53 se mantiene silvestre es que esta línea de ratones lo expresa en muy bajos niveles en condiciones normales, pero al ser sometidos a radiación ionizante p53 se estabiliza y puede ser detectada en Western Blots. Esta es una característica típica de la proteína p53 silvestre.

El presente trabajo aporta información importante en el estudio de p53 *in vivo*, así como también demuestra la importancia de los sistemas transgénicos y knock-outs en ratones como herramientas en el estudio *in vivo* de diversas moléculas. Hemos mostrado

que la expresión transgénica de p53 humano en un fondo genético carente de p53 produce cambios importantes en el espectro de tumores desarrollados en dichos ratones. Aunque no produce un cambio importante en la incidencia de linfomas de tórax, sí produce el desarrollo de otros tipos de tumores como hemangiosarcoma y tumores de glándula mamaria.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

1. Se logró la creación de varias líneas de ratones transgénicos:

Una de ellas expresa p53 humano en timo, corazón, pulmón, riñón y bazo.

Otras dos expresan p53 humano específicamente en timo.

2. Se obtuvieron ratones carentes de p53 endógeno que expresan p53 humano.

Su supervivencia es similar a aquella de los ratones p53-/-

La incidencia de linfomas de timo disminuyó de 71% a 64%

El espectro de tumores presenta cambios:

Incremento en la incidencia de hemangiosarcomas

Aparición de tumores que no se desarrollan en los ratones p53-/-

(retinoblastoma, tumores en glándula mamaria, adenocarcinoma)

Se encontró un tipo de tumor no reportado anteriormente,

hemangiosarcoma de células gigantes.

5. Se obtuvieron ratones carentes de p53 y mdm2 endógenos que expresan p53 humano.

La mayoría desarrollan linfomas de timo

Estos tumores no presentan apoptosis

No hay expresión de p53 humano en los linfomas de timo

APENDICE 1

Análisis estadístico del espectro de tumores observado.

Prueba Realizada: Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para probar si había una diferencia significativa en la proporción de ratones transgénicos y no transgénicos que presentaban tumores.

LINFOMA DE TIMO

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan linfomas de timo entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan linfomas de timo entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con linfomas de timo en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

Gráfica de Proporciones

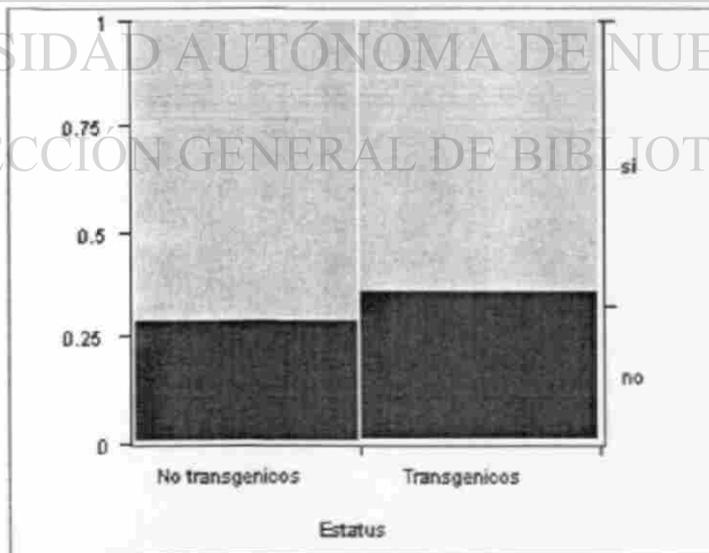
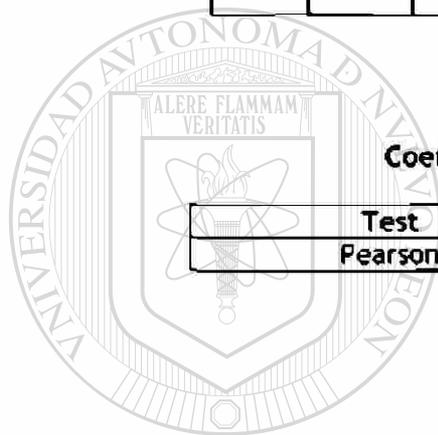


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Linfoma	no	20	26	46
		29.41 %	36.11 %	
	si	48	46	94
		70.59 %	63.89 %	
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.711	0.3990



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HEMANGIOSARCOMA

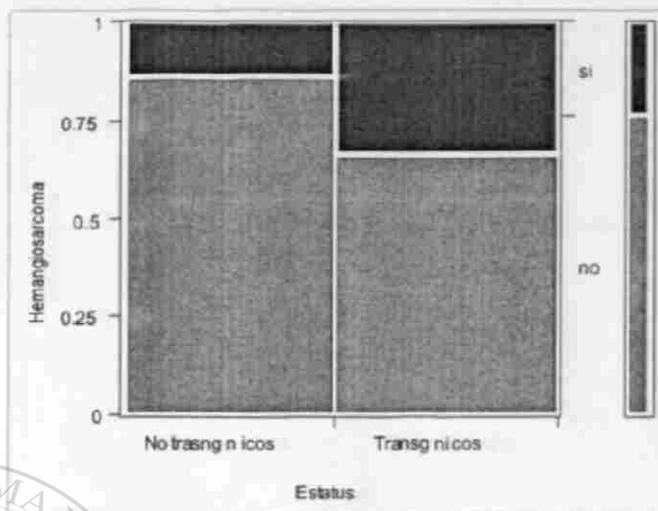


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Hemangio sarcoma	no	59 86.76 %	48 66.67 %	107
	si	9 13.24 %	24 33.33 %	33
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	7.841	0.0051

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan hemangiosarcoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan hemangiosarcoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: Rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, hay diferencias en la proporción de ratones con hemangiosarcoma en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

OSTEOSARCOMA

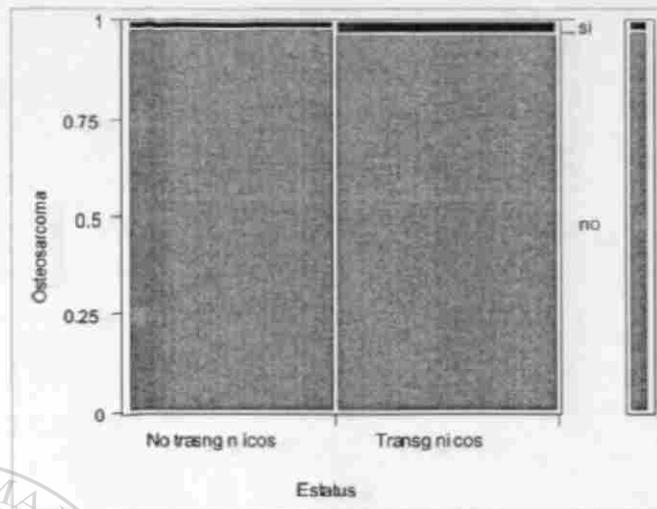


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Osteo sarcoma	no	67 98.53 %	70 97.22 %	137
	si	1 1.47 %	2 2.78 %	3
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.285	0.5935

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan osteosarcoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan osteosarcoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con osteosarcoma en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

ANAPLASTICO

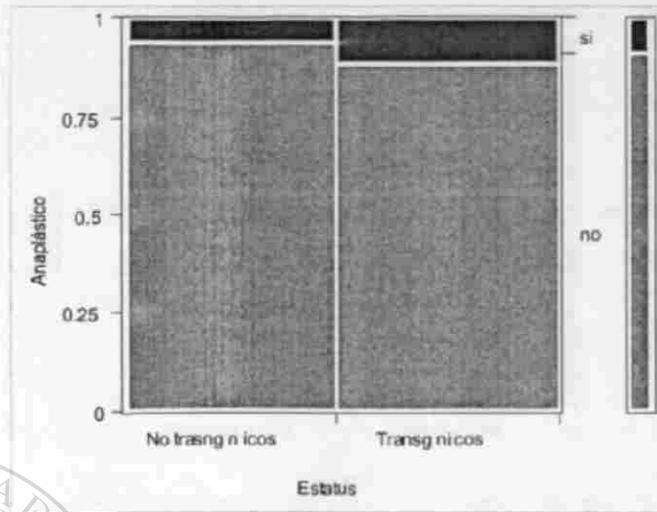


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Anaplástico	no	64 94.12 %	64 88.89 %	128
	si	4 5.88 %	8 11.11 %	12
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	1.220	0.2694

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan tumores anaplásticos entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan tumores anaplásticos entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con tumores anaplásticos en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

GLANDULA MAMARIA

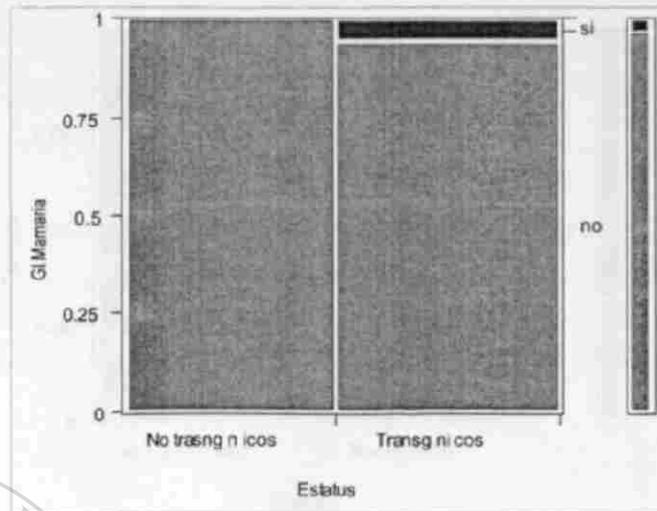


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Glándula Mamaria	no	68	68	136
		100 %	94.44 %	
	si	0	4	4
		0.00 %	5.56 %	
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	3.889	0.0486

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan tumores de glándula mamaria entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan tumores de glándula mamaria entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: Rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, hay diferencias en la proporción de ratones con tumores de glándula mamaria en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

TERATOMA

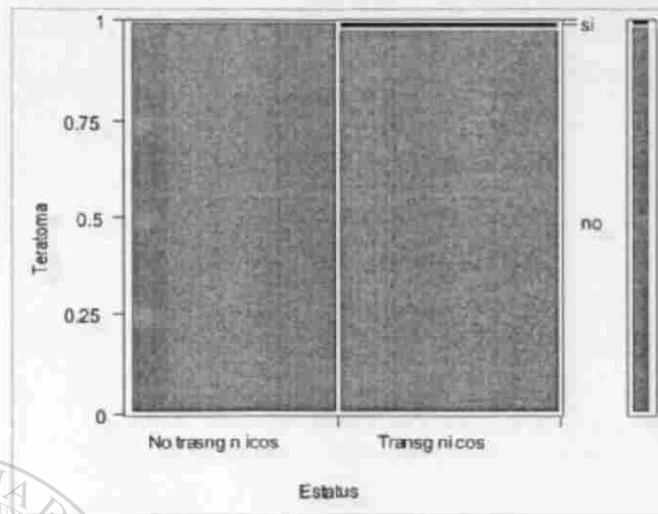


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Teratoma	no	68	71	139
		100 %	98.61 %	
si	si	0	1	1
		0.00 %	1.39 %	
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.951	0.3294

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan teratoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan teratoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con teratoma en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

SARCOMA

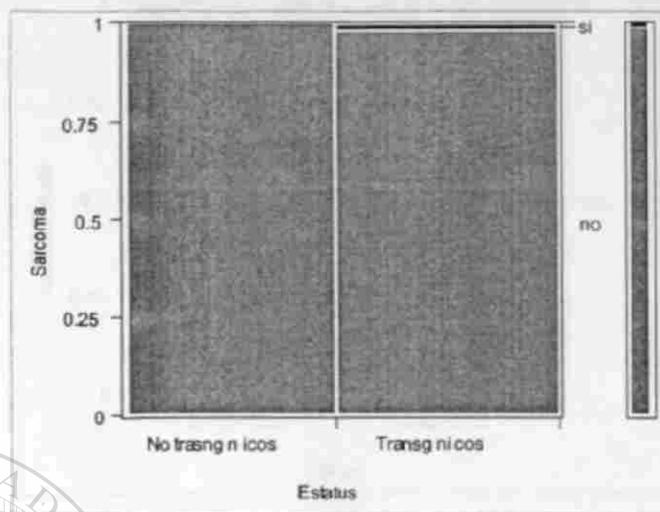


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Sarcoma	no	68 100 %	71 98.61 %	139
	si	0 0.00 %	1 1.39 %	1
		68	72	140

Coeficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.951	0.3294

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan sarcoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan sarcoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con sarcoma en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

ADENOCARCINOMA

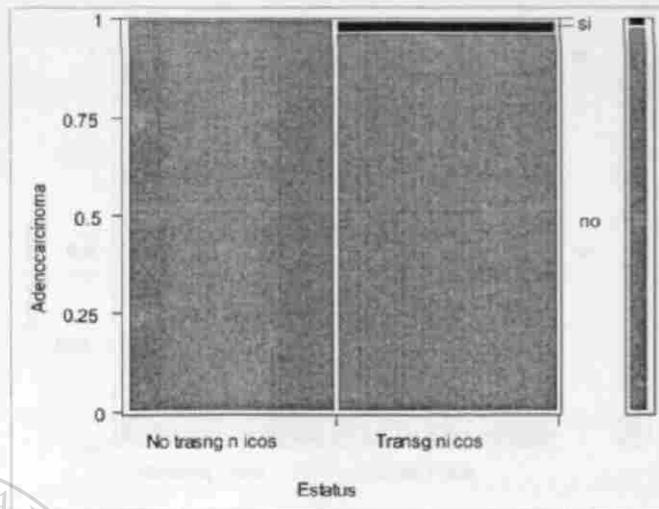


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Adeno carcinoma	no	68	70	138
		100 %	97.22 %	
	si	0	2	1
		0.00 %	2.78 %	
		68	72	140

Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	1.916	0.1663

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan adenocarcinoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan adenocarcinoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con adenocarcinoma en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

RETINOBLASTOMA

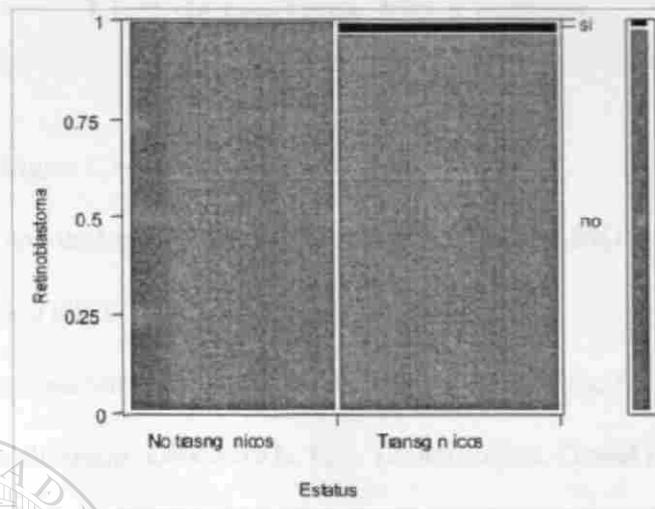


Tabla de Contingencia

		Estatus		
		No transgénicos	Transgénicos	
Retino blastoma	no	68 100 %	70 97.22 %	138
	si	0 0.00 %	2 2.78 %	1
		68	72	140

Coeficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	1.916	0.1663

Hipótesis Nula: No existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan retinoblastoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Hipótesis Alternativa: Existe una diferencia estadística significativa en la proporción de ratones que presentan retinoblastoma entre el grupo transgénico y no transgénico.

Veredicto: No rechazamos la Hipótesis Nula. Es decir, no hay diferencias en la proporción de ratones con retinoblastoma en los grupos de ratones transgénicos y no transgénicos.

APENDICE 2

Lista de reactivos, kits y buffers.

6. Acido bórico. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
7. Acido cítrico monohidratado. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
8. Acido clorhídrico (HCl). Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
9. Acido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
10. Agarosa grado ultrapuro. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
11. AmpliTaq DNA polimerasa. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
12. Anticuerpo monoclonal Bp53-12. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
13. Azul de bromofenol, sal sódica. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
14. Bicarbonato de sodio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
15. Bio-Rad Protein Assay. BioRad Laboratories, Hercules, CA.

16. Borato de sodio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
17. Bromuro de etidio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
18. Buffer de PCR IX. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
19. Cloruro de sodio (NaCl). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
20. DAB (3, 3'-Diaminobenzidina). Vector Labs, Burlingame, CA.
21. Diaminobencidina, DAB Substrate Kit. Vector Laboratories, Burlingame, CA.
22. Dodecil sulfato de sodio (SDS, CMS Chempure Ultra). Curtin Matheson Scientific, Inc. Houston, TX.
23. dUTP-biotina. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

24. ECL Western Blotting Analysis System. Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.

25. Enzima de restricción Asp718. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

26. Enzima de restricción BamHI. Roché, Indianapolis, IN.

27. Enzima de restricción EcoRI. Roché, Indianapolis, IN.

28. Enzima de restricción HindIII. Roché, Indianapolis, IN.

29. Enzima de restricción NotI. Roché, Indianapolis, IN.

30. Enzima de restricción PstI. Roché, Indianapolis, IN.

31. Enzima de restricción XbaI. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

32. Enzima Polimerasa Klenow. Roché, Indianapolis, IN.

33. Eosina Y Accustain, solución alcohólica. Sigma Diagnostics, St. Louis, MO.

34. Etanol absoluto. AAPER. Alcohol and Chemical, Co. Shelbyville, KY.

35. Fenol ultrapuro. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.

36. Formaldehído. Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.

37. Fosfato de sodio, monobásico y monohidratado. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

38. Hematoxilina modificada de Harris, con ácido acético y libre de mercurio. Fisher[®] Scientifics, Fair Lawn, NJ.

39. HEPES. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

40. Hidróxido de sodio (NaOH). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

41. Isopropanol (2-propanol, Optima). Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.

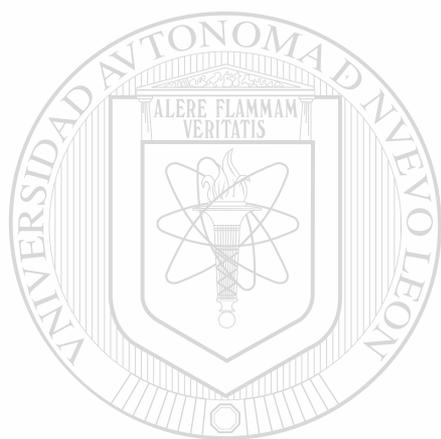
42. Kit para detección de apoptosis: In Situ cell death detection kit POD. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

43. Kit para detección inmunohistoquímica de PCNA: PCNA staining kit. Zymed Laboratories, San Francisco, CA.
44. Medio de cultivo DMEM. . Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
45. Metanol, grado HPLC. Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
46. Nuclear Red Fast. Vector Laboratories, Burlingame, CA.
47. Parafina. Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
48. PBS 1X libre de Hg⁺² y Ca⁺². Gibco BRL, Life Technologies. Grand Island, NY.
49. PCR Product Pre-Sequencing Kit. USB, Cleveland, Ohio.
50. Permout (β-Pinene Polymer, SP15-100, Toluene Solution). Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
51. Peroxido de hidrógeno, solución 30% peso/peso. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
52. Portaobjetos Superfrost Plus. Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
53. Proteínasa K. USB, Cleveland, OH.
54. QIAquick Gel Extraction Kit de purificación en columna. QIAGEN, Valencia, CA.
-
55. Sistemas de estreptavidina-peroxidasa. VECTASTAIN ABC Elite Mouse Kit. Vector Laboratories, Burlingame, CA. ®
56. Solución fijadora de Bouin. PolySciences, Inc., Warrington, PA.
57. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), libre de magnesio (+2) y libre de calcio. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
58. Suero fetal de bovino (FCS). HyClone Laboratories. Logan, UT.
59. Tritón X-100. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
60. Trizma Base. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
61. Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

62. Xilenos, grado reactivo. Stephens Scientifics, Kalamazoo, MI.

63. Xylene cyanole FF. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

64. $\alpha^{125}\text{PdCTP}$. Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abraham, K. M., Levin, S. D., Marth, J. D., Forbush, K. A., and Perlmutter, R. M. (1991). Thymic tumorigenesis induced by overexpression of p56lck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 3977-81.

Allen, J. M., Forbush, K. A., and Perlmutter, R. M. (1992). Functional dissection of the lck proximal promoter. *Molecular & Cellular Biology* *12*, 2758-68.

Attardi, L. D., Reczek, E. E., Cosmas, C., Demicco, E. G., McCurrach, M. E., Lowe, S. W., and Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. [erratum appears in *Genes Dev* 2000 Jul 15;14(14):1835]. *Genes & Development* *14*, 704-18.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S., and Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* *89*, 1175-84.

Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K., and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* *249*, 912-5.

Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T., and Oren, M. (1994). Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 8, 1739-49.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO Journal* 12, 461-8.

Barel, D., Avigad, S., Mor, C., Fogel, M., Cohen, I. J., and Zaizov, R. (1998). A novel germ-line mutation in the noncoding region of the p53 gene in a Li-Fraumeni family. *Cancer Genetics & Cytogenetics* 103, 1-6.

Bargonetti, J., Friedman, P. N., Kern, S. E., Vogelstein, B., and Prives, C. (1991). Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65, 1083-91.

Baru, M., Shlissel, M., and Manor, H. (1991). The yeast GAL4 protein transactivates the polyomavirus origin of DNA replication in mouse cells. *Journal of Virology* 65, 3496-3503.

Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A., and Peacock, J. (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 11, 505-10.

Boddy, M. N., Freemont, P. S., and Borden, K. L. (1994). The p53-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-binding domain called the RING finger. *Trends Biochem Sci* 19, 198-9.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984). Formation of germline chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-6.

Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E., and Palmiter, R. D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 836-40.

Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M., Senear, A. W., Warren, R., and Palmiter, R. D. (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27, 223-31.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-7.

Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R., and Kley, N. (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377, 646-9.

Buckland, J., Pennington, D. J., Bruno, L., and Owen, M. J. (2000). Co-ordination of the expression of the protein tyrosine kinase p56(lck) with the pre-T cell receptor during thymocyte development. [erratum appears in *Eur J Immunol* 2000 Mar;30(3):974]. *European Journal of Immunology* 30, 8-18.

Caelles, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. [see comments]. *Nature* 370, 220-3.

Chada, K., Magram, J., Raphael, K., Radice, G., Lacy, E., and Costantini, F. (1985). Specific expression of a foreign beta-globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature* 314, 377-80.

Chaffin, K. E., Beals, C. R., Wilkie, T. M., Forbush, K. A., Simon, M. I., and Perlmutter, R. M. (1990). Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO Journal* 9, 3821-9.

Chen, J., Marechal, V., and Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13, 4107-14.

Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R., and Lee, W. H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-80.

Chin, L., Pomerantz, J., and DePinho, R. A. (1998). The **INK4a/ARF** tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 291-6.

Choi, Y. W., Henrard, D., Lee, I., and Ross, S. R. (1987). The mouse mammary tumor virus long terminal repeat directs expression in epithelial and lymphoid cells of different tissues in transgenic mice. *Journal of Virology* 61, 3013-9.

Choo, K. H., Raphael, K., McAdam, W., and Peterson, M. G. (1987). Expression of active human blood clotting factor IX in transgenic mice: use of a cDNA with complete mRNA sequence. *Nucleic Acids Research* 15, 871-84.

Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways [see comments]. *Nature* 362, 849-52.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Copeland, N. G., Lock, L. F., Spence, S. E., Moore, K. J., Swing, D. A., Gilbert, D. J.,[®] and Jenkins, N. A. (1989). Spontaneous germ-line ecotropic murine leukemia virus infection: implications for retroviral insertional mutagenesis and germ-line gene transfer. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology* 36, 221-34.

Covarrubias, L., Nishida, Y., Terao, M., D'Eustachio, P., and Mintz, B. (1987). Cellular DNA rearrangements and early developmental arrest caused by DNA insertion in transgenic mouse embryos. *Molecular & Cellular Biology* 7, 2243-7.

Crook, T., Marston, N. J., Sara, E. A., and Vousden, K. H. (1994). Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell* 79, 817-27.

Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 59, 483-9.

De Fromental, C. C., and Soussi, T. (1992). Tp53 tumor supresor p53: a model for investigating human mutagenesis. *Genes, Chrom. Cancer* 4, 1-15.

de Rozieres, S., Maya, R., Oren, M., and Lozano, G. (2000). The loss of mdm2 induces p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 1691-7.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-84.

Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 87, 27-45.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-21.

Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E. (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53 [see comments]. *Nature* 365, 79-82.

el-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in Cancer Biology* 8, 345-57.

El-Deiry, W. S. (1998). Review: the p53 pathway and cancer therapy. *The Cancer Journal* 11, 229-236.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Burrell, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., and Hamilton, S. R. (1995). Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research* 55, 2910-9.

Elbrecht, A., DeMayo, F. J., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1987). Episomal maintenance of a bovine papilloma virus vector in transgenic mice. *Molecular & Cellular Biology* 7, 1276-9.

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-9.

Evans, S. C., and Lozano, G. (1997). The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Molecular Medicine Today* 3, 390-5.

Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., and George, D. L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO Journal* 10, 1565-1569.

Finlay, C. A. (1993). The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Molecular & Cellular Biology* 13, 301-6.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Foord, O. S., Bhattacharya, P., Reich, Z., and Rotter, V. (1991). A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res* 19, 5191-8.

Friedman, P. N., Kern, S. E., Vogelstein, B., and Prives, C. (1990). Wild-type, but not mutant, human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9275-9.

Furuhata, T., Tokino, T., Urano, T., and Nakamura, Y. (1996). Isolation of a novel GPI-anchored gene specifically regulated by p53; correlation between its expression and anti-cancer drug sensitivity. *Oncogene 13*, 1965-70.

Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D. P. (1990). Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J 9*, 1595-602.

Gao, C., Zou, Z., Xu, L., Moul, J., Seth, P., and Srivastava, S. (2000). p53-dependent induction of heat shock protein 27 (HSP27) expression. *International Journal of Cancer 88*, 191-4.

Garvin, A. M., Pawar, S., Marth, J. D., and Perlmutter, R. M. (1988). Structure of the murine *lek* gene and its rearrangement in a murine lymphoma cell line. *Molecular & Cellular Biology 8*, 3058-64.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., and Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83*, 9065-9.

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 54, 4855-78.

Grossman, S. R., Perez, M., Kung, A. L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z. X., Kumar, S., Howley, P. M., and Livingston, D. M. (1998). p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Molecular Cell* 2, 405-15.

Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.

Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C. C., and Montesano, R. (1998). IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Research* 26, 205-13.

Haines, D. S., Landers, J. E., Engle, L. J., and George, D. L. (1994). Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol* 14, 1171-8.

Hammer, R. E., Idzerda, R. L., Brinster, R. L., and McKnight, G. S. (1986). Estrogen regulation of the avian transferrin gene in transgenic mice. *Molecular & Cellular Biology* 6, 1010-4.

Han, H. J., Tokino, T., and Nakamura, Y. (1998). CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Human Molecular Genetics* 7, 1039-46.

Harbers, K., Soriano, P., Muller, U., and Jaenisch, R. (1986). High frequency of unequal recombination in pseudoautosomal region shown by proviral insertion in transgenic mouse. *Nature* 324, 682-5.

Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Bradley, A., and Donehower, L. A. (1993). Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB Journal* 7, 938-43.

Haupt, Y., Maya, R., Kazanietz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-9.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* 1, 3-11.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425-79.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551-5.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* 420, 25-7.

Honda, R., and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO Journal* 18, 22-7.

Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-5.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Hsieh, J. K., Chan, F. S., O'Connor, D. J., Mittnacht, S., Zhong, S., and Lu, X. (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Molecular Cell* 3, 181-93.

Hung, J., Mims, B., Lozano, G., Strong, L., Harvey, C., Chen, T. T., Stastny, V., and Tomlinson, G. (1999). TP53 mutation and haplotype analysis of two large African American families. *Human Mutation* 14, 216-21.

Iglesias, A., Lamers, M., and Kohler, G. (1987). Expression of immunoglobulin delta chain causes allelic exclusion in transgenic mice. *Nature* 330, 482-4.

Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A., and Oren, M. (1997). A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *EMBO Journal* 16, 4384-92.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., and Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology* 4, 1-7.

Jackson, M. W., and Berberich, S. J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Molecular & Cellular Biology* 20, 1001-7.

Jaenisch, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1260-4.

Jaenisch, R. (1977). Germ line integration of moloney leukemia virus: effect of homozygosity at the m-muLV locus. *Cell* 12, 691-6.

Jaenisch, R. (1975). Infection of mouse blastocysts with SV40 DNA: normal development of the infected embryos and persistence of SV40-specific DNA sequences in the adult animals. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 39 Pt 1, 375-80.

Jaenisch, R. (1980). Retroviruses and embryogenesis: microinjection of Moloney leukemia virus into midgestation mouse embryos. *Cell* 19, 181-8.

Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science* 240, 1468-74.

Jaenisch, R., and Mintz, B. (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 1250-4.

Jahner, D., and Jaenisch, R. (1980). Integration of Moloney leukaemia virus into the germ line of mice: correlation between site of integration and virus activation. *Nature* 287, 456-8.

Jimenez, G. S., Nister, M., Stommel, J. M., Beeche, M., Barcarse, E. A., Zhang, X. Q., O'Gorman, S., and Wahl, G. M. (2000). A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nature Genetics* 26, 37-43.

Johanson, P., Gray, D., Mowat, M., and Benchimol, S. (1991). Expression of wild-type p53 is not compatible with continued growth of p53-negative tumor cells. *Mol Cell Biol* 11, 1-11.

Jones, S. N., Hancock, A. R., Vogel, H., Donehower, L. A., and Bradley, A. (1998). Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15608-12.

Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-8.

Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D. L., and Oren, M. (1993). Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 8, 3411-6.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G., and Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-59.

Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-9.

Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-72.

Kubbutat, M., Ludwingubbutat, R., Ashcroft, M., and Vousden, K. (1998). Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Molecular & Cellular Biology*. 18, 5690-5698.

Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., and Evans, M. J. (1987). A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326, 295-8.

Kurokawa, K., Tanaka, T., and Kato, J. (1999). p19ARF prevents G1 cyclin-dependent kinase activation by interacting with MDM2 and activating p53 in mouse fibroblasts. *Oncogene* 18, 2718-27.

Lai, Z., Ferry, K. V., Diamond, M. A., Wee, K. E., Kim, Y. B., Ma, J., Yang, T., Benfield, P. A., Copeland, R. A., and Auger, K. R. (2001). Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31357-67.

Lane, D. P. a. C., L.V. (1979). T antigen es bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

Le Meur, M., Gerlinger, P., Benoist, C., and Mathis, D. (1985). Correcting an immune-response deficiency by creating E alpha gene transgenic mice. *Nature* 316, 38-42.

Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-6.

Lewin, B. (2000). *Genes VII* (Oxford: Oxford University Press).

Li, R., and Botchan, M. R. (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 73, 1207-21.

Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D. M. (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387, 823-7.

Lozano, G., and Liu, G. (1998). Mouse models dissect the role of p53 in cancer and development. *Seminars in Cancer Biology* 8, 337-44.

Lundgren, K., Montes de Oca Luna, R., McNeill, Y. B., Emerick, E. P., Spencer, B., Barfield, C. R., Lozano, G., Rosenberg, M. P., and Finlay, C. A. (1997). Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes & Development* 11, 714-25.

Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., and et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms [see comments]. *Science* 250, 1233-8.

Maltzman, W., and Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular & Cellular Biology* 4, 1689-94.

Maniatis, T., Goodbourn, S., and Fischer, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236, 1237-45.

Martin, K., Trouche, D., Hagemeier, C., Sorensen, T. S., La Thangue, N. B., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* 375, 691-4.

Martinez, J., Georgoff, I., and Levine, A. J. (1991). Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5, 151-9.

McDonnell, T. J., Montes de Oca Luna, R., Cho, S., Amelse, L. L., Chavez-Reyes, A., and Lozano, G. (1999). Loss of one but not two mdm2 null alleles alters the tumour spectrum in p53 null mice. *Journal of Pathology* 188, 322-8.

McMasters, K. M., Montes de Oca Luna, R., Pena, J. R., and Lozano, G. (1996). mdm2 deletion does not alter growth characteristics of p53-deficient embryo fibroblasts. *Oncogene* 13, 1731-6.

Meng, R. D., McDonald, E. R., 3rd, Sheikh, M. S., Fornace, A. J., Jr., and El-Deiry, W. S. (2000). The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-

dependent colon cancer apoptosis. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 1, 130-44.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., and Ullrich, S. J. (1990). Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6166-70.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-9.

Moll, U. M., Riou, G., and Levine, A. J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7262-6.

Momand, J., Wu, H. H., and Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242, 15-29.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-45.

Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-6.

Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* 7, 683-94.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Ng, C. C., Koyama, K., Okamura, S., Kondoh, H., Takei, Y., and Nakamura, Y. (1999). Isolation and characterization of a novel TP53-inducible gene, TP53TG3. *Genes, Chromosomes & Cancer* 26, 329-35.

Nishimori, H., Shiratsuchi, T., Urano, T., Kimura, Y., Kiyono, K., Tatsumi, K., Yoshida, S., Ono, M., Kuwano, M., Nakamura, Y., and Tokino, T. (1997). A novel brain-specific

p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 15, 2145-50.

O'Rourke, R. W., Miller, C. W., Kato, G. J., Simon, K. J., Chen, D. L., Dang, C. V., and Koeffler, H. P. (1990). A potential transcriptional activation element in the p53 protein. *Oncogene* 5, 1829-32.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-8.

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-62.

Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C. C., Taya, Y., Monden, M., and Nakamura, Y. (2001). p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Molecular Cell* 8, 85-94.

Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas [see comments]. *Nature* 358, 80-3.

Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-60.

Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823, 67-78.

Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., and Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular & Cellular Biology* 15, 3032-40.

Palmiter, R. D., Chen, H. Y., and Brinster, R. L. (1982). Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29, 701-10.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Palmiter, R. D., Norstedt, G., Gelin, R. E., Hammer, R. E., and Brinster, R. L. (1983). Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222, 809-14.

Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-51.

Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N. A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A. G., and Lozano, G. (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nature Genetics* 29, 92-5.

Perlmutter, R. M., Marth, J. D., Ziegler, S. F., Garvin, A. M., Pawar, S., Cooke, M. P., and Abraham, K. M. (1989). Specialized protein tyrosine kinase proto-oncogenes in hematopoietic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 948, 245-62.

Pietenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1998-2002.

Pinkert, C. A., Widera, G., Cowing, C., Heber-Katz, E., Palmiter, R. D., Flavell, R. A., and Brinster, R. L. (1985). Tissue-specific, inducible and functional expression of the E alpha d MHC class II gene in transgenic mice. *EMBO Journal* 4, 2225-30.

Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R. A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-23.

Ramqvist, T., Magnusson, K. P., Wang, Y., Szekely, L., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993). Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant p53. *Oncogene* 8, 1495-500.

Rassoulzadegan, M., Leopold, P., Vailly, J., and Cuzin, F. (1986). Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains. *Cell* 46, 513-9.

Raycroft, L., Schmidt, J. R., Yoas, K., Hao, M. M., and Lozano, G. (1991). Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 11, 6067-74.

Raycroft, L., Wu, H. Y., and Lozano, G. (1990). Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249, 1049-51.

Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E. E., and Collins, V. P. (1993).

Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53, 2736-9.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Reinke, V., and Lozano, G. (1997). Differential activation of p53 targets in cells treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiation Research* 148, 115-22.

Reynolds, P. J., Lesley, J., Trotter, J., Schulte, R., Hyman, R., and Sefton, B. M. (1990). Changes in the relative abundance of type I and type II lck mRNA transcripts suggest

differential promoter usage during T-cell development. *Molecular & Cellular Biology* 10, 4266-70.

Riemenschneider, M. J., Buschges, R., Wolter, M., Reifenberger, J., Bostrom, J., Kraus, J. A., Schlegel, U., and Reifenberger, G. (1999). Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Research* 59, 6091-6.

Ritchie, K. A., Brinster, R. L., and Storb, U. (1984). Allelic exclusion and control of endogenous immunoglobulin gene rearrangement in kappa transgenic mice. *Nature* 312, 517-20.

Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [see comments]. *Nature* 391, 496-9.

Sah, V. P., Attardi, L. D., Mulligan, G. J., Williams, B. O., Bronson, R. T., and Jacks, T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nature Genetics* 10, 175-80.

Sedlacek, Z., Kodet, R., Seemanova, E., Vodvarka, P., Wilgenbus, P., Mares, J., Poustka, A., and Goetz, P. (1998). Two Li-Fraumeni syndrome families with novel germline p53

mutations: loss of the wild-type p53 allele in only 50% of tumours. *British Journal of Cancer* 77, 1034-9.

Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J., and George, D. L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *Journal of Biological Chemistry* 274, 38189-96.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10, 6565-77.

Sheikh, M. S., Shao, Z. M., Hussain, A., and Fontana, J. A. (1993). The p53-binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 53, 3226-8.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Shimizu, C., Kawamoto, H., Yamashita, M., Kimura, M., Kondou, E., Kaneko, Y., Okada, S., Tokuhisa, T., Yokoyama, M., Taniguchi, M., Katsura, Y., and Nakayama, T. (2001). Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of Ick proximal promoter activity. *International Immunology* 13, 105-17.

Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R. C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A. J., and

Jochimsen, A. G. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO Journal* 15, 5349-57.

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

Soriano, P., Keitges, E. A., Schorderet, D. F., Harbers, K., Gartler, S. M., and Jaenisch, R. (1987). High rate of recombination and double crossovers in the mouse pseudoautosomal region during male meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7218-20.

Soussi, T., Caron de Fromental, C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-52.

Spence, S. E., Gilbert, D. J., Swing, D. A., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1989). Spontaneous germ line virus infection and retroviral insertional mutagenesis in eighteen transgenic Srev lines of mice. *Molecular & Cellular Biology* 9, 177-84.

Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E. H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome [see comments]. *Nature* 348, 747-9.

Stad, R., Ramos, Y. F., Little, N., Grivell, S., Attema, J., van Der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28039-44.

Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H., and Peters, G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO Journal* 17, 5001-14.

Sturzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J. R. (1992). A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene* 7, 1513-23.

Sturzbecher, H. W., Brain, R., Mainetti, T., Addison, C., Rudge, K., and Jenkins, J. R. (1988). Mouse p53 blocks SV40 DNA replication in vitro and downregulates T antigen DNA helicase activity. *Oncogene* 3, 405-13.

Suda, Y., Aizawa, S., Hirai, S., Inoue, T., Furuta, Y., Suzuki, M., Hirohashi, S., and Ikawa, Y. (1987). Driven by the same Ig enhancer and SV40 T promoter ras induced lung adenomatous tumors, myc induced pre-B cell lymphomas and SV40 large T gene a variety of tumors in transgenic mice. *EMBO Journal* 6, 4055-65.

Sun, Y., Wicha, M., and Leopold, W. R. (1999). Regulation of metastasis-related gene expression by p53: a potential clinical implication. *Molecular Carcinogenesis* 24, 25-8.

Tack, L. C., Wright, J. H., Deb, S. P., and Tegtmeyer, P. (1989). The p53 complex from monkey cells modulates the biochemical activities of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 63, 1310-7.

Takadera, T., Leung, S., Gemone, A., Koga, Y., Takihara, Y., Miyamoto, N. G., and Mak, T. W. (1989). Structure of the two promoters of the human lck gene: differential accumulation of two classes of lck transcripts in T cells. *Molecular & Cellular Biology* 9, 2173-80.

Takei, Y., Ishikawa, S., Tokino, T., Muto, T., and Nakamura, Y. (1998). Isolation of a novel TP53 target gene from a colon cancer cell line carrying a highly regulated wild-type TP53 expression system. *Genes, Chromosomes & Cancer* 23, 1-9.

Tan, M., Li, S., Swaroop, M., Guan, K., Oberley, L. W., and Sun, Y. (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *Journal of Biological Chemistry* 274, 12061-6.

Tan, M., Wang, Y., Guan, K., and Sun, Y. (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor

cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 109-14.

Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. [see comments]. *Nature* 404, 42-9.

Tao, W., and Levine, A. J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6937-41.

Townes, T. M., Lingrel, J. B., Chen, H. Y., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. (1985). Erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *EMBO Journal* 4, 1715-23.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tsukada, T., Tomooka, Y., Takai, S., Ueda, Y., Nishikawa, S., Yagi, T., Tokunaga, T., Takeda, N., Suda, Y., and Abe, S. (1993). Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 3313-22.

Urano, T., Nishimori, H., Han, H., Furuhata, T., Kimura, Y., Nakamura, Y., and Tokino, T. (1997). Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer Research* 57, 3281-7.

Varmus, H. (1982). RNA Tumor Viruses, R. Weiss, Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

Voronova, A. F., Adler, H. T., and Sefton, B. M. (1987). Two lck transcripts containing different 5' untranslated regions are present in T cells. *Molecular & Cellular Biology* 7, 4407-13.

Voronova, A. F., and Sefton, B. M. (1986). Expression of a new tyrosine protein kinase is stimulated by retrovirus promoter insertion. *Nature* 319, 682-5.

Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology* 1, 20-6.

Wildin, R. S., Garvin, A. M., Pawar, S., Lewis, D. B., Abraham, K. M., Forbush, K. A.,

Ziegler, S. F., Allen, J. M., and Perlmutter, R. M. (1991). Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 173, 383-93. ®

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G., and el-Deiry, W. S. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene [letter]. *Nature Genetics* 17, 141-3.

Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development* 7, 1126-32.

Xiao, Z. X., Chen, J., Levine, A. J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W. R., and Livingston, D. M. (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 375, 694-8.

Yamamura, K., Kikutani, H., Folsom, V., Clayton, L. K., Kimoto, M., Akira, S., Kashiwamura, S., Tonegawa, S., and Kishimoto, T. (1985). Functional expression of a microinjected Ed alpha gene in C57BL/6 transgenic mice. *Nature* 316, 67-9.

Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J. J., May, P., and Oren, M. (1993). p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 13, 1415-23.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

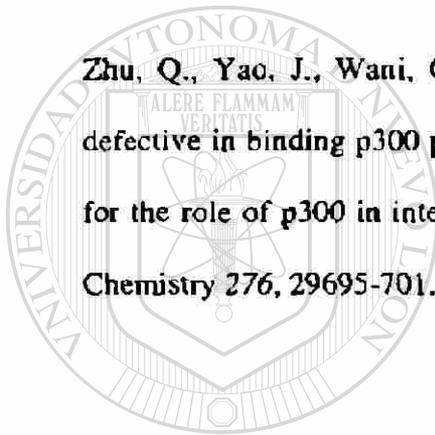
Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-7.

Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell* 7, 673-82.

Zhang, Y., and Xiong, Y. (1999). Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Molecular Cell* 3, 579-91.

Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92, 725-34.

Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M. A., and Wani, A. A. (2001). Mdm2 mutant defective in binding p300 promotes ubiquitination but not degradation of p53: evidence for the role of p300 in integrating ubiquitination and proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29695-701.

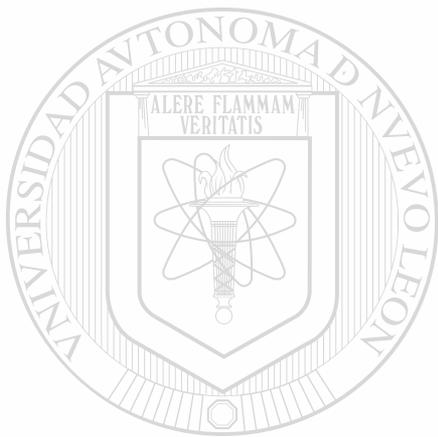


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

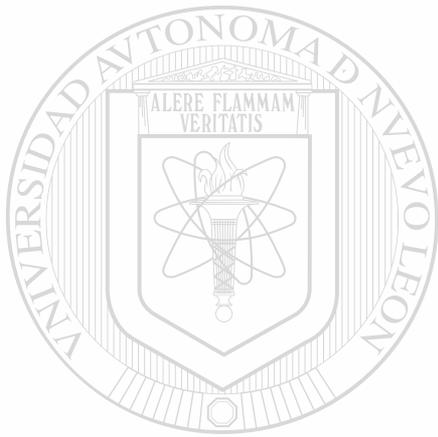
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VITAE

Arturo Chávez Reyes nació en Montemorelos, Nuevo León, México el 21 de Julio de 1970. Es el primero de tres hijos y único varón de Arturo Chávez Gutierrez y Nora Hilda Reyes Martínez. Después de completar sus estudios intermedios en la Escuela Preparatoria No. 6 de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en Montemorelos, N.L., ingresó a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en Monterrey, N.L. Obtuvo su grado de Químico Farmacéutico Biólogo con la distinción de Título Honorífico en 1992. Realizó su servicio social en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en 1991. En 1992 se unió al grupo de investigación del Dr. Reyes Tamez Guerra en el mismo laboratorio, realizando trabajo clínico en pacientes inmunocomprometidos y participando en actividades académicas en la licenciatura de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. En 1996 se unió al grupo de investigación de la Dra. Guillermina Lozano en el departamento de Genética Molecular del Centro de Cancer M.D. Anderson de la Universidad de Texas en Houston, Texas, EUA. Obtuvo su grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Inmunobiología en 1999 en el Programa de Excelencia de Postgrado de la División de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Su tesis recibió el "Premio a la Mejor Tesis de Maestría de 1999" en el área de Ciencias Naturales en la UANL.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



