

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**LA AUSENCIA DE mdm2 POTENCIA EL EFECTO
APOPTOTICO DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES
p53 EN UN MODELO *in vivo***

Por

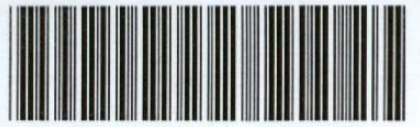
GILBERTO JARAMILLO RANGEL

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Morfología

Abril 2002

GILBERTO JARAMILLO RANGEL

TD
QH671
.J3
c.1



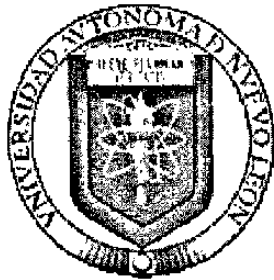
1080113753

AH07
• J3
c'



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**LA AUSENCIA DE mdm2 POTENCIA EL EFECTO APOPTÓTICO DEL GEN
SUPRESOR DE TUMORES p53 EN UN MODELO *in vivo***

Por

GILBERTO JARAMILLO RANGEL

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
Especialidad en Morfología**

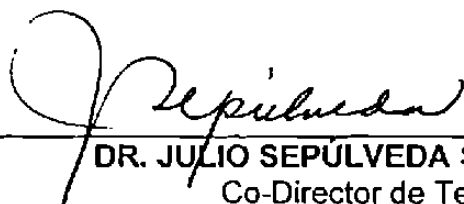
Abril 2002

LA AUSENCIA DE mdm2 POTENCIA EL EFECTO APOPTÓTICO DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53 EN UN MODELO *in vivo*

Aprobación de la Tesis:



DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Director de Tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



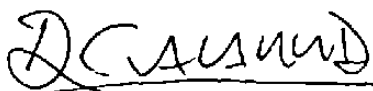
DR. NORBERTO LÓPEZ SERNA
Comisión de Tesis



DR. JUAN MANUEL SOLÍS SOTO
Comisión de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

**LA AUSENCIA DE mdm2 POTENCIA EL EFECTO APOPTÓTICO DEL GEN
SUPRESOR DE TUMORES p53 EN UN MODELO *in vivo***

Por

GILBERTO JARAMILLO RANGEL

El presente trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y la co-asesoría de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

FIRMAS

Director de tesis



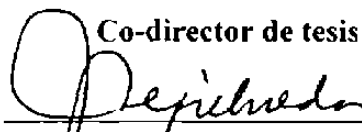
Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Co-director de tesis



Dra. Odila Saucedo Cárdenas

Co-director de tesis



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

DEDICATORIA

A Gilberto Jaramillo Cardona y Ma. Del Refugio Rangel Rosas, luchadores vencedores en la arena de la vida. Gracias por inculcarme con el ejemplo tres pilares fundamentales de una buena existencia: trabajo, honestidad, bondad.

A Lidia, Carmen, David, Cuquis y Julio, con amor. Gracias por su apoyo y amistad. Compañeros eternos de existencia.

A la siguiente generación: Rodrigo, Valeria, Alejandro y Cristina, con esperanzas de un gran futuro. Los amo.

A Elena y Miguel, complemento ideal de la familia.

Al resto de mi familia, que siempre ocupan un rincón de mi cerebro y de mi corazón.

A aquellos seres queridos cuya alma ya está en un plano superior de existencia.

A los amigos y amigas, porque los recuerdos de las alegrías que pasé a su lado endulzan mi existencia ... ¡y lo que nos falta por gozar!

A Marta, guía, apoyo, mi vida misma.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna y al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por su dirección y apoyo brindados para la realización de esta tesis. Espero que en todo este tiempo haya asimilado de ellos algo, aunque sea una mínima parte, de su gran capacidad científica.

A mi comisión de tesis: Dra. Agnès Revol, Dr. Norberto López Serna, y Dr. Juan Manuel Solís Soto, por sus excelentes comentarios con respecto al proyecto.

Al personal y compañeros de los siguientes Departamentos o Laboratorios que contribuyeron de una u otra forma en la realización de esta tesis:

Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Centro de Biotecnología del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

A la Subdirección de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por los apoyos brindados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca que me otorgó.

Los sentidos del cuerpo son superiores a la materia densa; la mente es superior a los sentidos; la inteligencia es aún superior a la mente; y el alma es aún superior a la inteligencia.

Bhagavad-gîtâ (3.42).

Lo que es la ciencia...mi compadre ya hizo volar el carro.

*Dicho por una señora, hace ya muchos años, cuando vio por vez
primera un avión. Comunicación personal de mi papá.*

Todas las cosas son fatigosas más de lo que el hombre puede expresar; nunca se sacia el ojo de ver, ni el oído de oír.

¿Qué es lo que fue? Lo mismo que será. ¿Qué es lo que ha sido hecho? Lo mismo que se hará; y nada hay nuevo debajo del sol.

¿Hay algo que se puede decir: He aquí esto es nuevo? Ya fue en los siglos que nos han precedido.

No hay memoria de lo que precedió, ni tampoco de lo que sucederá habrá memoria en los que serán después.

No hay cosa mejor para el hombre sino que coma y beba, y que su alma se alegre en su trabajo. También he visto que esto es de la mano de Dios.

Eclesiastés (1:8-11, 2:24).

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO		PAGINA
1	INTRODUCCION	
1.1	Características de las neoplasias.	1
1.2	Factores genéticos y del medio ambiente en el cáncer.	2
1.3	Oncogenes y genes supresores de tumor.	3
1.4	Aspectos generales de p53 y mdm2.	4
1.5	Estudios de la interacción de p53 y mdm2.	5
1.5.1	Estudios <i>in vitro</i> .	5
1.5.2	Estudios <i>in vivo</i> .	8
1.6	Apoptosis.	9
1.6.1	Características morfológicas de la apoptosis.	9
1.6.2	Características bioquímicas de la apoptosis.	10
1.7	El cristalino.	11
1.7.1	Ventajas de utilizar el cristalino en el estudio del mecanismo de acción de p53.	11
1.7.2	Estudios previos relacionados a p53 en el contexto del cristalino	12
1.8	Planteamiento del problema.	14
2	HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.	15
3	MATERIALES Y METODOS	
3.1	Generación del modelo.	16

CAPITULO	PAGINA
3.1.1 Ratones transgénicos para el p53 humano.	16
3.1.2 Genotipificación.	17
3.1.2.1 Aislamiento de DNA.	17
3.1.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.	18
3.1.2.3 Electroforesis.	19
3.1.3 Microscopía de luz de campo claro y electrónica.	20
3.2 Aplicación del modelo al estudio de la interacción de p53 y mdm2.	22
3.2.1 Ratones carentes de mdm2 y p53.	22
3.2.2 Obtención de ratones necesarios para poner a prueba la hipótesis.	22
3.2.3 Genotipificación.	23
3.2.4 Microscopía de luz de campo claro y electrónica.	24
 4 RESULTADOS	
4.1 Generación del modelo.	25
4.1.1 Obtención de ratones transgénicos para el cDNA de p53 humano.	25
4.1.2 El transgen p53 humano induce microftalmia únicamente cuando esta en condición homocigota.	26

CAPITULO	PAGINA
4.1.3 El transgen p53 humano induce apoptosis en el cristalino.	29
4.2 Aplicación del modelo al estudio de la interacción de p53 y mdm2.	33
4.2.1 Genotipificación del p53 endógeno y del mdm2.	34
4.2.2 Análisis del fenotipo.	35
5 DISCUSION.	42
6 CONCLUSIONES.	46
REFERENCIAS.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación del transgen p53 humano.	18
II	Programa de termociclador utilizado en la amplificación del transgen p53 humano.	19
III	Líneas de ratones obtenidas para analizar la interacción de p53 y mdm2 en el cristalino de ratón.	22
IV	Condiciones de reacción utilizadas para la genotipificación de p53 y mdm2.	23
V	Características morfológicas de los ratones analizados.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Identificación y genotipificación de ratones transgénicos por PCR.	26
2	Inducción de microftalmia en ratones transgénicos homocigotos para el gen p53 humano.	28
3	Histología de retinas de ratones normales y de ratones con microftalmia.	30
4	Morfología de cristalinos de ratones normales y de transgénicos homocigotos para p53 humano.	32
5	Genotipificación del alelo mutado y normal de p53 por PCR.	34
6	Genotipificación del alelo mutado y normal de mdm2 por PCR.	35
7	Inducción de microftalmia en ratones transgénicos para p53 humano en la ausencia de mdm2.	38

8	Alteraciones observadas por microscopía de luz de cristalinios de ratones transgénicos para p53 humano en la ausencia de mdm2.	39
9	Inducción de apoptosis en cristalinios de ratones transgénicos para p53 humano en la ausencia de mdm2.	40

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

°C	Grados centígrados
cols.	Colaboradores
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfato de desoxinucleósidos
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Fig.	Figura
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
M	Concentración molar
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
Rb	Retinoblastoma
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto

V	Voltios
UV	Ultravioleta
X	Veces la concentración

RESUMEN

Gilberto Jaramillo Rangel
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina.

Fecha de graduación: Abril 2002

Titulo del estudio:

**LA AUSENCIA DE mdm2
POTENCIA EL EFECTO
APOPTÓTICO DEL GEN
SUPRESOR DE TUMORES
p53 EN UN MODELO *in
vivo*.**

Número de páginas: 51

**Candidato para el grado de
Doctor en ciencias con
especialidad en Morfología.**

Propósito y método del estudio: El gen supresor de tumores más importante es p53. Evidencias obtenidas de estudios *in vitro* hicieron considerar al oncogén mdm2 como un regulador negativo de p53. Estudios *in vivo* de inactivación de genes por recombinación homóloga, demostraron que en la ausencia del regulador mdm2, p53 induce la muerte por apoptosis del organismo en fase embrionaria durante la implantación del blastocisto. Esto significa que desde esta etapa están presentes p53 y mdm2, y este último ejerce un control negativo de la actividad apoptótica de p53. De hecho, la inactivación de p53 en los ratones carentes de mdm2 rescata el fenotipo de muerte embrionaria. En el presente trabajo se demostró la hipótesis de que mdm2 regula a p53 en células diferenciadas *in vivo* y estos resultados mostraron que p53 potencia su efecto apoptótico en ausencia de mdm2.

Conclusiones y contribuciones: Primeramente desarrollamos un modelo de apoptosis *in vivo* dependiente de p53. Esto consistió en analizar ratones transgénicos que expresaban específicamente el gen p53 humano en el cristalino murino. Esta expresión específica se logró uniendo la secuencia codificante de dicho gen al promotor de un gen que se expresa en el cristalino, el de la α A-cristalina. La presencia del transgen en estado homocigoto indujo una reducción del tamaño del ojo (microftalmia). Los análisis de los cristalinos mediante microscopía de campo claro revelaron pérdida del ordenamiento celular, mientras que en la microscopía electrónica se observó daño celular apoptótico. Los ratones con el transgen en estado hemocigoto (en un solo locus) no mostraron ni microftalmia ni alteraciones microscópicas en el cristalino; es decir que la cantidad de mdm2 endógeno regulaba el exceso de p53 humano proveniente de un locus del transgen, no así el exceso de p53 en los ratones homocigotos. De acuerdo con nuestra hipótesis, al eliminar mdm2 en los ratones transgénicos hemocigotos para p53, esperaríamos observar una inducción de apoptosis. Efectivamente, en ratones con el gen mdm2 inactivado por recombinación homóloga, la presencia del transgen p53 humano en estado hemocigoto fue suficiente para inducir una respuesta de apoptosis en el cristalino e inducir microftalmia, pérdida del ordenamiento celular del cristalino al nivel de microscopía de campo claro y daño celular apoptótico en el mismo en la microscopía electrónica. Estos resultados comprueban nuestra hipótesis y muestran el fuerte control que ejerce mdm2 sobre p53. Así mismo indican que en aquellas terapias génicas de inducción de apoptosis por p53, es conveniente inactivar la expresión de mdm2.

DIRECTOR DE TESIS


Dr. Roberto Montes de Oca Luna

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Características de las neoplasias.

La palabra neoplasia significa literalmente "nuevo crecimiento" y el nuevo crecimiento es una "neoplasia". El término tumor se aplicó inicialmente a la hinchazón causada por una inflamación. Las neoplasias también pueden causar hinchazones, y por un precedente establecido, el uso del término "tumor" en un sentido no neoplásico ha pasado al olvido. En consecuencia, el término es ahora sinónimo de neoplasia. Cáncer es el término usual que se aplica a todos los tumores malignos.

El oncólogo británico Sir Rupert Willis es el que más se ha acercado a establecer una definición de neoplasia: "una neoplasia es una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales y no está coordinado con el mismo y persiste de esa misma manera excesiva tras el cese de los estímulos que dieron lugar al cambio". A esta definición se podría añadir que la masa anormal no sirve a ningún propósito, consume a aquello que la alberga y es virtualmente autónoma. Consume a lo que la alberga porque el crecimiento del tejido neoplásico compite con células y tejidos normales para la obtención de suministros energéticos y substratos nutritivos. Como esas masas pueden crecer en un paciente que se está consumiendo, son autónomas en cierta medida, aunque todas las neoplasias dependen en último término de su anfitrión para la obtención de sus suministros nutritivos y vasculares (1).

Cuando las células normales se transforman en cancerosas, generalmente presentan varias características distintivas: tienen una forma particular, son menos dependientes de ciertos factores específicos de su medio de crecimiento, continúan dividiéndose por un tiempo mucho mayor que sus contrapartes normales y cuando se inyectan a organismos inmunocomprometidos pueden formar tumores (2).

1.2 Factores genéticos y del medio ambiente en el cáncer.

Ciertos eventos convierten a las células normales en células transformadas. Estos eventos pueden ser iniciados por cambios genéticos o del medio ambiente. Generalmente se requiere de varios cambios para iniciar un cáncer, y algunas veces los tumores adquieren una mayor virulencia como resultado de series progresivas de cambios (3).

La mayoría de los cánceres resultan de la interacción de factores genéticos y del medio ambiente. Entre estos últimos podría mencionarse el humo del cigarro, algunos constituyentes de la dieta, pululantes, drogas, radiación y agentes infecciosos. Los residuos carcinogénicos ambientales (como los de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, generados por un proceso de combustión incompleta) alteran la secuencia del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) en genes críticos involucrados en el control del crecimiento celular, lo que finalmente conducirá a la transformación de las células (4).

Varias evidencias dieron lugar a la creencia de que el daño genético podría ser responsable de la presentación y progresión del cáncer: el reconocimiento de

predisposición hereditaria al cáncer, la detección de cromosomas dañados en células cancerosas, la conexión aparente entre la susceptibilidad al cáncer y la incapacidad de las células de reparar el DNA dañado, y la evidencia que relaciona el potencial mutagénico de algunas sustancias a su carcinogenicidad (5).

1.3 Oncogenes y genes supresores de tumor.

Después, esta creencia fue confirmada por el descubrimiento de los oncogenes y de los genes supresores de tumor. Los oncogenes fueron identificados primeramente como genes de virus que causan transformación en sus células blanco. Algunas clases de oncogenes virales tienen contrapartes celulares que están involucrados en funciones normales. Los genes celulares son llamados proto-oncogenes, y en ciertos casos su mutación o activación aberrante se asocia con la formación de tumores. A la fecha se han identificado aproximadamente 100 oncogenes. Estos se clasifican en varios grupos, los cuales representan diferentes tipos de actividades que van desde proteínas transmembranales hasta factores de transcripción. La generación de un oncogen representa una ganancia de función en la cual un proto-oncogen celular se adquiere de un virus o se activa de alguna otra manera. El cambio puede involucrar la activación constitutiva de una función que generalmente esta regulada, la expresión del gen en un tipo celular donde generalmente no se expresa, o la sobreexpresión en el tejido normal. Generalmente este cambio involucra cambios mutacionales en el producto proteico (3.6).

Los genes supresores de tumor se detectan en forma de deleciones (u otras mutaciones inactivadoras) que son tumorigénicas. Es decir, se presenta una pérdida de función en

genes que generalmente imponen algún control del ciclo o el crecimiento celular. Una de las evidencias más fuertes en cuanto a esta naturaleza se observa en ciertos cánceres hereditarios, en los cuales los pacientes que tienen la enfermedad desarrollan tumores que pierden ambos alelos y por lo tanto carecen de un gen activo (3,7). Los experimentos más concluyentes en la identificación de genes supresores de tumores los han proporcionado la metodología de inactivación de genes por recombinación homóloga en modelos murinos.

1.4 Aspectos generales de p53 y mdm2.

La pérdida del control del ciclo celular y la inestabilidad genómica son características de la mayoría de las células tumorales. La activación de los proto-oncogenes que promueven el crecimiento celular, en combinación con la inactivación de los genes supresores de tumor que funcionan inhibiendo la progresión del ciclo celular, da lugar a la progresión de un tumor y finalmente a su malignidad.

El principal gen supresor de tumores es p53. Un análisis de más de 5,000 muestras de tumores humanos, que representaban 43 tipos diferentes de tumores, reveló que del 50 al 60% de todos los cánceres tienen un gen p53 mutado (8).

El gen p53 se localiza en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 17 con un tamaño aproximado de 20 kilobases (Kb). Este gen da lugar a un transcrito de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de 2.8 Kb y codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltones (kDa), la cual contiene 393 aminoácidos. Una de las funciones biológicas primarias de p53 es evitar la acumulación de alteraciones genómicas después

de que se presenta daño en el DNA. Para llevar a cabo esta tarea, p53 inhibe el crecimiento de las células dañadas por dos mecanismos. En respuesta al DNA dañado, p53 es capaz de mediar un alto del ciclo celular en G₁, tal vez para permitir las reparaciones genómicas necesarias. Asimismo, puede causar la eliminación de las células dañadas iniciando el proceso de la muerte celular programada o apoptosis (9,10).

El gen *mdm2* fue identificado originalmente en una línea celular de fibroblastos de ratón BALB c 3T3 transformada espontáneamente. En esas células, *mdm2* se localiza en cromosomas doble minuto y está amplificado aproximadamente 50 veces (11). Este gen está localizado en el humano en 12q13-14 y da lugar a una proteína de 491 aminoácidos. La regulación de la expresión de *mdm2* es muy compleja y se expresan múltiples formas de RNA que dan lugar a proteínas Mdm2 diferentes. Aunque las funciones bioquímicas de esas formas diferentes de Mdm2 aun no han sido determinadas, su existencia sugiere que pueden llevar a cabo múltiples funciones. Más importante es, sin embargo, que la amplificación y la sobreexpresión de *mdm2* han sido detectadas en una gran variedad de tumores, lo cual indica que este oncogen tiene un papel clave en la carcinogénesis (12,13).

1.5 Estudios de la interacción de p53 y *mdm2*

1.5.1 Estudios in vitro

El mecanismo molecular a través del cual *mdm2* promueve la tumorigenicidad comenzó a aclararse cuando se descubrió que Mdm2 se unía a una proteína p53 sensible a la temperatura, en una línea celular transformada de fibroblastos embrionarios de rata

(células A1). A 39.5°C la proteína p53 se encuentra en una conformación mutante en el citoplasma y las células crecen en un rango exponencial. Pero a 32.5°C, p53 esta en su conformación tipo silvestre y se acumula en el núcleo, dando lugar a que las células se detengan en la fase G₁ del ciclo celular. Un tamizaje de las proteínas unidas a p53, mediante un análisis de inmunoprecipitación de células radiomarcadas crecidas a 32.5°C, identificó una proteína de 90 kDa que co-inmunoprecipitaba con p53. Un análisis subsecuente de esta proteína asociada dio lugar a su identificación como Mdm2 (14).

Posteriormente se investigó los efectos de la expresión de mdm2 en la capacidad de transactivación de p53, misma que correlaciona con su propiedad de supresión del crecimiento celular. La transfección de ciertas líneas celulares con un cósmido que expresaba Mdm2, evitó completamente la transactivación de p53 sobre un gen reportero que contenía un elemento de respuesta para p53. Este resultado demostró que Mdm2 actúa de un modo trans-dominante negativo para inhibir la función de transactivación de p53 (14).

Varios estudios de mapeo localizaron el sitio de unión de Mdm2 y p53 en el extremo N-terminal de ambas proteínas. A través de análisis de traducción *in vitro*, inmunoprecipitación, análisis de estructura y función, y estudios utilizando péptidos sintéticos cortos, se ha llegado a la conclusión de que Mdm2 se une a p53 en sus aminoácidos del 18 al 23 (8). Este sitio en p53 interactúa con varios factores importantes en la regulación de su función, como la proteína de enlace a la caja TATA.

Por otra parte, varios estudios que utilizaron ensayos de Northern y Western blot demostraron que la expresión de mdm2 se induce en respuesta a p53. El gen mdm2 contiene dos sitios de unión para p53 localizados en su intrón 1. Estos resultados, junto con los descritos anteriormente, establecen que existe una vía de retroalimentación autoregulatoria que modula las actividades de p53 y mdm2. El daño al DNA induce la expresión de la proteína p53, la cual transactiva sus correspondientes genes blanco, entre los que se incluye mdm2. La proteína Mdm2 inducida forma un complejo con p53 lo que resulta en un control de las actividades supresoras del crecimiento de esta última (15).

La importancia del balance entre estos dos genes ha quedado de manifiesto correlacionando los niveles de Mdm2 y p53 libres y del complejo Mdm2/p53 con el crecimiento celular y la tumorigenicidad. Por ejemplo, una línea celular que sobre expresa Mdm2 prolifera activamente y es tumorigénica. En contraste, una línea celular que sobre expresa p53 sobrepasa la inhibición de Mdm2 acumulando proteína p53 libre, lo que la lleva a detenerse en la fase G₁ del ciclo celular o inducir apoptosis (16).

La autorregulación de la función de p53 por Mdm2 parece haberse desarrollado como un mecanismo de control en contra de la actividad descontrolada del primero. La expresión constitutiva de la función de p53 podría resultar en un alto del ciclo celular o apoptosis permanentes, lo que podría ser altamente nocivo para los procesos celulares y del desarrollo normales.

1.5.2 Estudios in vivo

Algunos estudios que utilizaron ratones doble mutantes para p53 demostraron que la pérdida de función de este gen promueve la presentación y progresión de una gran variedad de tipos tumorales. Por ejemplo, Donehower y cols. observaron que los ratones homocigotos para la delección de p53 tienen un desarrollo prenatal normal, pero después del nacimiento son susceptibles al desarrollo espontáneo de una gran variedad de neoplasias antes de los seis meses de edad. Estos tumores destacan por la gran variedad de tipos celulares involucrados, su presentación relativamente temprana y su aparente malignidad (17).

Posteriormente, se realizaron estudios con ratones transgénicos para analizar las consecuencias de la pérdida de mdm2 cuando se expresa p53 normalmente. Los ratones con un alelo mutado de mdm2 (mdm2 +/-) son viables, se desarrollan normalmente y son fértiles. Las cruces entre ratones mdm2 +/- nunca dieron como resultado descendencia con el genotipo mdm2 -/- (con ambos alelos mutados), lo que sugirió que la ausencia de Mdm2 durante el desarrollo es letal. El análisis histológico de las deciduas a los 5.5 días pos coito de las cruces de los ratones mdm2 +/- reveló que aproximadamente un cuarto de ellos (probablemente las que deberían contener embriones mdm2 -/-) estaban vacías. Inmediatamente surgió la pregunta de que si la ausencia de Mdm2 induce la pérdida de viabilidad debido a la falta de regulación de la función de p53. Cuando se cruzaron ratones con genotipos para mdm2 y p53 apropiados se obtuvo como resultado ratones mdm2 -/-, p53 -/- que se desarrollaron normalmente. Estos resultados demostraron que Mdm2 tiene un papel muy importante durante el desarrollo para regular la función de p53 (18,19).

1.6 Apoptosis.

La apoptosis es un tipo de muerte celular activa, cuyo inicio depende de la expresión de genes que la célula misma posee. Se encuentra como un proceso normal durante el recambio celular y la homeostasia de los tejidos, en la embriogénesis, en la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmune, en el desarrollo del sistema nervioso y en la atrofia de los tejidos después de que cesan estímulos hormonales (20). Además, se ha descubierto un papel para este proceso en eventos tan variados como: la eliminación llevada a cabo por los linfocitos T citotóxicos de células infectadas con virus; la remoción de las células encargadas de la respuesta inmune celular, una vez que cumplen su función. para prevenir que ataquen a los constituyentes propios del organismo (se han asociado defectos de la maquinaria apoptótica con enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide); y en el mecanismo de acción de muchos agentes quimioterapéuticos en la eliminación de las células cancerosas. También, se piensa que un proceso apoptótico defectuoso podría ser el mecanismo subyacente de varios desordenes neurodegenerativos, como el síndrome de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (21,22). Apoptosis se utiliza generalmente como sinónimo de muerte celular programada, aunque el término apoptosis se introdujo inicialmente para describir un fenómeno morfológico y bioquímico más que un programa genético.

1.6.1 Características morfológicas de la apoptosis.

Las características morfológicas de la apoptosis son altamente distintivas y ocurren con un grado considerable de fidelidad, sin importar el tipo celular. Una célula apoptótica se retrae y separa de sus células vecinas y pierde algunas áreas especializadas de la

membrana celular tales como los complejos de unión y microvellosidades. Aunque la membrana celular forma estructuras semejantes a vacuolas o burbujas en etapas iniciales del proceso, en general permanece intacta. La cromatina nuclear se agrega en masas compactas periféricas. Se presenta condensación nuclear y citoplasmática y una fragmentación del citoplasma y núcleo en vesículas rodeadas por membranas (cuerpos apoptóticos), las cuales contienen ribosomas, mitocondrias y material nuclear. *In vivo*, estos cuerpos apoptóticos son reconocidos rápidamente y fagocitados por los macrófagos o las células epiteliales adyacentes. Debido a este mecanismo eficiente de la remoción de las células apoptóticas, no se presenta una respuesta inflamatoria *in vivo*. *In vitro*, los cuerpos apoptóticos y los otros fragmentos celulares se hinchan y finalmente se lisan. Esta fase terminal *in vitro* ha sido llamada también “necrosis secundaria” (20,21).

1.6.2 Características bioquímicas de la apoptosis.

Aunque las características morfológicas de la apoptosis han sido bien establecidas, no se tiene todavía una comprensión completa de los mecanismos bioquímicos y moleculares que dan lugar a esas características. Los estudios se han dificultado por la naturaleza asincrónica de la apoptosis y por el número pequeño de células apoptóticas que existen en un tejido a un tiempo determinado. El evento bioquímico de la apoptosis más estudiado hasta la fecha ha sido el corte no aleatorio del DNA nuclear. Cuando se separa el DNA de células apoptóticas mediante electroforesis en gel de agarosa, se observa un patrón de bandas característico en “escalera”. Este patrón de fragmentación del DNA surge debido a la conformación normal del DNA nuclear. En el núcleo, aproximadamente 146 pares de bases (pb) del DNA están enlazados alrededor de un

centro de proteínas histonas, formando los nucleosomas, los cuales están unidos por fragmentos de DNA de aproximadamente 60 pb. El corte del DNA puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, y algunos datos han sugerido que la endonucleasa involucrada en estos cortes podría ser similar a la DNAasa I (21). La detección de la fragmentación del DNA y la presencia de extremos de cadena sencilla en el mismo han sido utilizados en muchos estudios para detectar células apoptóticas, particularmente en tejidos intactos.

Sin duda, un aspecto central del mecanismo molecular de la apoptosis es ocupado por las proteasas caspasas. Este conjunto de enzimas inicia y lleva a cabo una cascada de eventos que deterioran una gran cantidad de funciones celulares, dando lugar a una muerte celular inevitable. El nombre genérico de esta familia de enzimas es proteinasas cisteinil-aspartato específicas, haciendo referencia al requerimiento absoluto de un residuo de ácido aspártico inmediatamente adyacente a su punto de corte. Debido a que las caspasas contienen su propio sitio de corte, se piensa que su proceso de activación es autocatalítico y en forma de cascada (23,24).

1.7 El cristalino.

1.7.1 Ventajas de utilizar el cristalino en el estudio del mecanismo de acción de p53.

El cristalino ofrece un modelo experimental muy bueno para estudiar el mecanismo de acción de los genes supresores de tumor. El cristalino está constituido principalmente por capas concéntricas de fibras, las cuales se forman durante toda la vida a partir de la diferenciación de células epiteliales que se encuentran proliferando en la zona periférica

anterior del órgano. Esta diferenciación se caracteriza por el alargamiento celular, la síntesis de las proteínas cristalinas y la degradación de todos los organelos rodeados por membrana, incluyendo el núcleo. Debido a que no existe el recambio celular en el cristalino, todas las células se retienen dentro del tejido, siendo las que se encuentran más cerca del centro las más antiguas y las cercanas a la superficie las más nuevas (25).

De esta manera, en el cristalino la división y la diferenciación celular, procesos en los que está involucrado p53, ocurren en compartimentos distintos. Esto facilita el análisis de los efectos que podría causar este gen en dichos eventos. Además, varios autores sugieren que en el cristalino pudiera presentarse apoptosis, o un mecanismo parecido, de una forma normal, aunque existe mucha controversia de si esto realmente ocurre, o del compartimiento donde pudiera presentarse. De cualquier manera, este último punto agrega una ventaja más a este modelo experimental, sobre todo al analizar el comportamiento de genes ligados al proceso de apoptosis, como el p53 (26,27).

1.7.2 Estudios previos relacionados a p53 en el contexto del cristalino.

Morgenbesser y cols. estudiaron la interacción de p53 con el gen del retinoblastoma (Rb) en el desarrollo del cristalino embrionario de ratón. Este gen ha sido implicado en la regulación negativa del crecimiento, inducción de diferenciación e inhibición de la transformación celular. Se ha demostrado que la pérdida de su función (ratones Rb -/-) esta asociada con una progresión inapropiada a través del ciclo celular de las fibras del cristalino (la salida del ciclo celular es un requerimiento para la diferenciación normal de este tipo celular). Además, en esta misma línea de ratones no se observó la expresión de los marcadores normales de diferenciación del cristalino y ocurrió apoptosis en las

células fibrosas. *Interesantemente*, en los ratones doble mutantes para Rb y p53 no se observó la apoptosis, aunque los otros hallazgos mencionados para los ratones Rb *-/-* no cambiaron. También, los ratones homocigotos para la inactivación únicamente de p53 (p53 *-/-*) fueron similares en las características morfológicas, la proliferación celular y la ausencia de apoptosis, en comparación a los ratones no transgénicos (*normales*). En base a estos resultados, los autores concluyeron que la apoptosis causada por la inactivación del gen del Rb en el cristalino es dependiente de la expresión de p53 (28).

Nakamura y cols. dirigieron la expresión del gen p53 humano, normal y mutante, de una manera específica al cristalino de ratón. Esto lo consiguieron uniendo las secuencias génicas de ambos tipos de p53 al promotor específico de cristalino α A-cristalina (un marcador específico del desarrollo temprano del cristalino) y al segundo intrón del gen β -globina del conejo. Observaron que los ratones transgénicos que expresaban p53 del tipo normal, desarrollaban microftalmia poco después del nacimiento como un resultado de apoptosis durante la diferenciación de las células fibrosas. Este efecto deletéreo fue contrarrestado en los ratones que expresaban ambos tipos de p53 (*normal y mutante*), debido a que el alelo mutante podía interferir con la función apoptótica del producto del gen tipo silvestre, aunque se observó también que no interfiere con su capacidad para activar ciertos genes, como WAF1/Cip1 y mdm2 (29).

Mediante dos trabajos realizados por Pan y cols. (30,31), y uno por Nakamura y cols. (32), se llegó a la conclusión de que las oncoproteínas E7 y E6 del virus del papiloma humano tipo 16 promueven e inhiben, respectivamente, apoptosis en el cristalino en desarrollo por vías dependientes e independientes de p53, según la etapa del desarrollo que se considere.

1.8 Planteamiento del problema.

Esta demostrado que la inactivación del gen *mdm2* por recombinación homóloga induce una muerte embrionaria a nivel de blastocisto, especialmente por apoptosis en las células totipotenciales del macizo celular interno. Esta muerte celular es dependiente de *p53*. ya que los ratones carentes de *mdm2* y *p53* sobreviven y son fértiles. Estas observaciones dieron origen a las siguientes preguntas: (1) ¿Este efecto de apoptosis de *p53* en células indiferenciadas se manifiesta en células diferenciadas carentes de *mdm2*?; (2) ¿Podría la ausencia de *mdm2* incrementar el efecto apoptótico de copias exógenas de *p53*? El presente trabajo se enfocó a responder dichas preguntas utilizando un modelo de apoptosis *in vivo* dependiente de *p53* humano en el cristalino de ratón.

CAPITULO II

HIPOTESIS

El oncogen *mdm2* regula a *p53* en células diferenciadas *in vivo* y su ausencia incrementa el efecto apoptótico de éste.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el oncogen *mdm2* regula a *p53* en células diferenciadas *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Generar un modelo de apoptosis dependiente de *p53* en el cristalino murino.
2. Determinar si la ausencia de *mdm2* potencia el efecto apoptótico del transgen *p53* humano en este modelo.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Generación del modelo.

3.1.1 Ratones transgénicos para el p53 humano.

Los ratones transgénicos para el p53 humano utilizados, fueron fabricados por Nakamura y cols. Brevemente, se realizó una construcción génica que incluía al promotor murino específico de cristalino α A-cristalina, el segundo intrón del gen β globina de conejo, la secuencia codificante del p53 humano y la secuencia de poliadenilación del SV40. Un fragmento de restricción de dicha construcción se purificó y se microinyectó a cigotos para generar los ratones transgénicos, empleando metodologías previamente descritas (29).

Una vez que obtuvimos ratones que expresan el transgen p53 humano selectivamente en el cristalino, los cruzamos con ratones de la misma cepa que no lo expresan (silvestres). Los descendientes de dichas cruzas se genotificaron como se describe mas adelante. Se incluyeron en el estudio ratones de dos meses de edad.

3.1.2 Genotipificación.

3.1.2.1 Aislamiento de DNA.

Se cortó a los ratones un fragmento de cola de aproximadamente un centímetro de largo. Este se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, junto con 500 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, EDTA 5 mM, NaCl 0.2 M, SDS 0.2%) y 10 μ L de proteinasa K a 10 mg mL. Posteriormente se incubó a 55 °C durante cuatro horas con agitación constante.

Una vez transcurrida la agitación, se centrifugó a 14 000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min. El sobrenadante se pasó a un tubo de microcentrifuga nuevo y se le agregó 500 μ L de fenol saturado. Se agitó manualmente durante 5 min. y posteriormente se centrifugó a las condiciones descritas anteriormente.

Posteriormente, el sobrenadante se colocó en otro tubo de microcentrifuga y se le agregó 500 μ L de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1). Se agitó manualmente durante 5 min. y se centrifugó a las condiciones ya mencionadas.

Por último, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se le agregó un volumen de isopropanol. Se agitó suavemente hasta obtener el precipitado de DNA. Se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 100 μ L de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

3.1.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

El DNA obtenido de cada ratón se sometió a un ensayo de PCR con oligonucleótidos específicos para una parte de la región codificante del gen p53 humano. La secuencia de dichos oligonucleótidos es la siguiente:

P3 5'-att tga tgc tgt ccc cgg acg ata ttg aac-3'

GE5R 5'-tcc aaa tac tcc aca cgc aa-3'

Las condiciones de reacción utilizadas para la amplificación del transgen p53 humano se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación del transgen p53 humano.

Reactivo	Concentración final	Volumen (μ L)
Agua ultrapura	----	16.5
Buñer PCR 10X	1X	2.5
P3 5 μ M	0.2 μ M	1
GE5R 5 μ M	0.2 μ M	1
dNTP's 2.5 mM	0.2 mM	2.5
Taq polimerasa 5 U μ L	----	0.5

El volumen total de reacción fue de 25 μ L y se añaó 1 μ L de DNA (aproximadamente 100 ng).

El programa utilizado en el termociclador se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Programa de termociclador utilizado en la amplificación del transgen p53 humano.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Evento
1	94	4	Desnaturalización prolongada
2	94	1	Desnaturalización
3	62	1	Apareamiento
4	72	3	Extensión
5	35 ciclos al paso 2		
6	72	7	Extensión prolongada

3.1.2.3 Electroforesis.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE IX (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.8), el cual una vez polimerizado se depositó en una cámara de electroforesis y se cubrió con el mismo buffer. Se mezcló 8 μ L de la muestra con 1 μ L de jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%). Esta mezcla se colocó en los carriles del gel, y junto con un marcador de peso molecular, se sometió a electroforesis a 60 V mientras se internaba el colorante en el gel y posteriormente a 100 V por 1 hora.

Concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 μ g mL por 10 min. y luego se lavó varias veces para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su visualización en un transiluminador de luz UV. Una banda de 500 pb indicaba la presencia del transgen p53 humano.

3.1.3 Microscopía de luz de campo claro y electrónica.

Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Con la ayuda de tijeras y pinzas se disecaron los ojos completos tratando de evitar en lo posible la presencia de piel y grasa peri-orbitaria. Las piezas se colocaron en solución fijadora de Karnovsky-Ito por 30 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se hizo una abertura en la parte posterior del ojo, al nivel de la salida del nervio óptico, con una navaja de rasurar y bajo el microscopio estereoscópico. Se continuó fijando por 30 min. más. Por último, se disecó el cristalino y se continuó fijando a las condiciones antes descritas por otros 30 min. El exceso de fijador se eliminó lavando en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M. pH 7.4. tres veces en tiempos de 5 min. cada uno.

Con una navaja de rasurar se cortó cada cristalino hasta en ocho o diez fragmentos. Se post-fijó en OsO_4 al 1% por 1.5 horas a temperatura ambiente. De nuevo, se eliminó el exceso de fijador con lavados iguales a los descritos anteriormente.

El contraste en bloque se realizó colocando las muestras en nitrato de uranilo al 1% por 30 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se hicieron lavados de la forma ya descrita.

La deshidratación se hizo en una serie graduada de etanol: 30%, 50%, 70%, 90%, 5 min. cada uno: y etanol al 100%, tres veces por 5 min. cada una.

Finalmente, se trató las muestras con una mezcla de etanol al 100% y resina Spurr suave, 1:1, durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, el procesamiento continuaba sometiendo las piezas a mezclas de resina y etanol, en las proporciones y tiempos que se mencionan: 2:1 por 1 hora, 3:1 por 1.5 horas, y 3:1 por 1.5 horas. Todas estas incubaciones fueron a temperatura ambiente. Por último, se dejaban durante toda la noche a 4°C en una mezcla de Spurr suave: Etanol 100%, 3:1.

Una vez transcurrido este plazo, se destapaban los frascos que contenían las muestras bajo una campana de extracción por 4 ó 5 horas, a fin de que se evaporara el etanol. Por último, se les ponía Spurr suave puro y se guardaban a 4°C durante una noche más.

Finalmente se incluían las piezas. Para esto, con la ayuda de un aplicador de madera cortado en uno de sus extremos a manera de cuchara, se colocaba cada una de ellas en los moldes de plástico en donde previamente se había vaciado resina. Se dejaban reposar por 2 horas, y finalmente se colocaban en una estufa a 60°C durante 48-72 horas.

Una vez completada la polimerización, se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor, los cuales se montaron sobre portaobjetos de vidrio, se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se observaron al microscopio de luz de campo claro. Los cortes finos se montaron en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4%, y finalmente se observaron en el microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss modelo EMI09.

3.2 Aplicación del modelo al estudio de la interacción de p53 y mdm2.

3.2.1 Ratones carentes de mdm2 y p53.

Para inactivar mdm2, se llevó a cabo una delección en el gen normal en sus exones del 6 al 12 y se introdujo por recombinación homóloga el gen Neo. Una vez hecha esta construcción, se fabricaron los ratones mutantes utilizando métodos previamente descritos (18). Cuando se tuvieron los ratones carentes de mdm2, estos se cruzaron con ratones carentes de p53 (17). Como ya se mencionó, únicamente se obtienen ratones viables provenientes de esta cruce cuando ambos genes están deletados de manera homocigota.

3.2.2 Obtención de ratones necesarios para poner a prueba la hipótesis.

llevamos a cabo las cruces necesarias de ratones carentes de mdm2 y p53 descritos en el apartado anterior, con ratones obtenidos del modelo descrito previamente, de modo que obtuvimos ratones que carecían de p53 y que tenían el transgen p53 humano en ausencia de mdm2 o en presencia de una copia del mismo (Tabla III). Se incluyeron en el estudio ratones de dos meses de edad.

Tabla III. Líneas de ratones obtenidas para analizar la interacción de p53 y mdm2 en el cristalino de ratón.

	LINEA 1 (control)	LINEA 2	LINEA 3
mdm2	-/-	-/-	+/-
transgen p53	-	+	+

3.2.3 Genotipificación.

Los procedimientos de aislamiento de DNA, la PCR para el transgen p53 humano y la electroforesis aplicadas a la genotipificación de las líneas mencionadas en el apartado anterior, fueron llevados a cabo de la misma manera a como ya se describió en la generación del modelo. A continuación se describe las técnicas de PCR empleadas en la genotipificación de p53 y mdm2.

oligonucleótidos dirigidos a p53

X6 5'-agc gtg gtg gta cct tat gag c-3'

X7 5'-gga tgg tgg tat act cag agc c-3'

Neo 19 5'-gct atc agg aca tag cgt tgg c-3'

oligonucleótidos dirigidos a mdm2

mdm20 5'-tgt ggc tgg agc atg ggt att g-3'

mdm4 5'-atc tga gag ctc gtg ccc ttc g-3'

Neo 3'd 5'-ggc gga aag aac cag ctg ggg c-3'

Las condiciones de reacción utilizadas para ambos genes fueron las mismas y se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Condiciones de reacción utilizadas para la genotipificación de p53 y mdm2.

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
Agua ultrapura	----	15.5
Buffer PCR 10X	1X	2.5
oligonucleótido 1 5 μM	0.2 μM	1
oligonucleótido 2 5 μM	0.2 μM	1
oligonucleótido 3 5 μM	0.2 μM	1
dNTP's 2.5 mM	0.2 mM	2.5
Taq polimerasa 5 U μL	----	0.5

El volumen total de reacción fue de 25 μL y se añadió 1 μL de DNA (aproximadamente 100 ng).

El programa utilizado en el termociclador para ambos genes fue el mismo que se usó para la amplificación del transgen p53 humano, y se muestra en la Tabla II.

3.2.4 Microscopía de luz de campo claro y electrónica.

Los procedimientos para llevar a cabo la microscopía de luz de campo claro y electrónica fueron los mismos que ya se describieron en la generación del modelo.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Generación del modelo.

4.1.1 Obtención de ratones transgénicos para el cDNA de p53 humano.

Nakamura y cols. obtuvieron ratones transgénicos para el DNA complementario (cDNA) del gen p53 humano, es decir que se incorporó al genoma del ratón únicamente la secuencia codificante del gen p53 humano (sin intrones) (29). Una vez que tuvimos en nuestro poder algunos machos y hembras de estos ratones, estandarizamos una reacción de PCR específica utilizando oligonucleótidos 100% complementarios para este cDNA del p53 humano (estos oligos no son complementarios al p53 endógeno del ratón). Esta reacción de PCR se diseñó para amplificar una región de 500 pb. El DNA genómico de los posibles ratones transgénicos se analizó mediante esta reacción de PCR, aquellos que si lo fueran deberían de amplificar un producto de 500 pb. En la Figura I se muestra un resultado representativo de dos ratones transgénicos en donde se observa la amplificación del producto esperado de 500 pb. Estos ratones transgénicos se cruzaron entre sí y al analizar su descendencia se encontró que si heredaron el transgen, es decir que estaba establemente integrado al genoma.

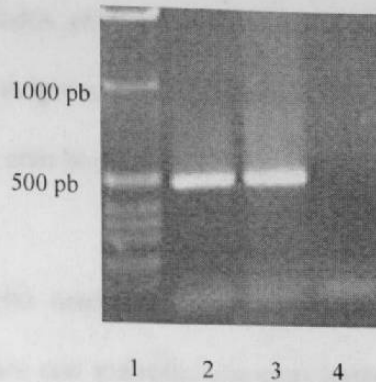


Figura 1. Identificación y genotipificación de ratones transgénicos por PCR. Se realizaron reacciones de PCR usando DNA genómico de los ratones estudiados. En el carril 1 está el marcador de peso molecular (1kb). En los carriles 2 y 3, ratones transgénicos para p53 humano. En el carril 4, ratón normal. Gel de agarosa al 0.8%.

4.1.2 El transgen p53 humano induce microftalmia únicamente cuando está en condición homocigota.

Los ratones positivos para el transgen obtenidos originalmente mostraban ojos con fenotipo normal. Estos ratones fueron cruzados con ratones silvestres obteniéndose en la primera generación (F1) ratones silvestres, y ratones transgénicos, que heredaron el transgen, con un fenotipo ocular normal. Al cruzar ratones transgénicos de la F1 entre sí se obtuvieron ratones silvestres (1/4) y ratones transgénicos (3/4) como era de esperarse. Sin embargo, a diferencia de la descendencia en F1, en esta F2 había dos tipos de fenotipos en los ratones positivos para el transgen: ratones con un fenotipo ocular normal y ratones con microftalmia. Al cruzar entre sí ratones transgénicos con microftalmia toda su descendencia era positiva para el transgen y todos tenían microftalmia.

Basándonos en estos resultados, planteamos la hipótesis de que los ratones transgénicos sin microftalmia eran hemicigotos para el transgen p53 humano y que aquellos que mostraban dicha alteración eran homocigotos para el transgen.

Esta hipótesis se comprobó mediante retrocruzas y analizando el genotipo de la descendencia. Si los ratones con microftalmia eran homocigotos para el transgen, se esperaba que al cruzarlos con ratones silvestres todos los descendientes deberían poseer un locus del transgen (hemocigotos) y no mostrar microftalmia. Por el contrario, se esperaba que en la descendencia proveniente de la cruce de ratones hemocigotos con silvestres, el 50% debería poseer el transgen y carecer de microftalmia, y el otro 50% deberían de carecer tanto del transgen como de microftalmia. Por último, todos los descendientes de la cruce entre dos ratones con microftalmia deberían de ser positivos para el transgen y presentar microftalmia.

Todos estos supuestos resultaron correctos. Toda la descendencia de las cruces de ratones microftálmicos con ratones normales resultaron positivos para la banda del transgen, pero nunca mostraron microftalmia. En cambio, en la descendencia de los ratones positivos para el transgen pero sin microftalmia apareados con ratones silvestres, hubo ratones silvestres y transgénicos con fenotipo normal. En contraste, todos los descendientes de la cruce entre ratones microftálmicos fueron positivos para el transgen y todos presentaron microftalmia (Figura 2).

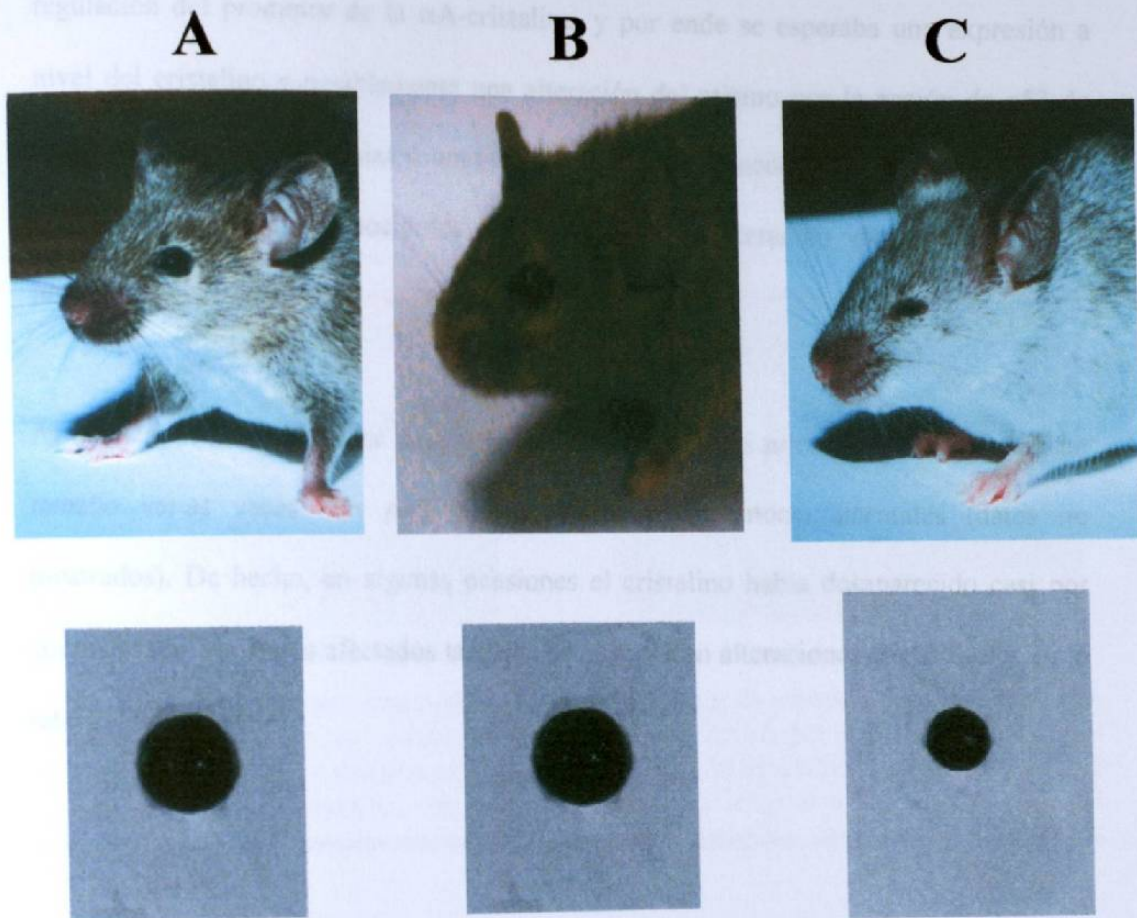


Figura 2. Inducción de microftalmia en ratones transgénicos homocigotos para el gen p53 humano. En comparación a los ratones no transgénicos (A) y a los transgénicos hemicigotos para el transgen p53 humano (B), los homocigotos para dicho transgen (C) muestran microftalmia. Debajo de cada ratón se muestra el tamaño del ojo correspondiente. Los ojos de los ratones no transgénicos y transgénicos hemicigotos, son mucho mayores que los de los transgénicos homocigotos.

4.1.3 El transgen p53 humano induce apoptosis en el cristalino.

Como se había mencionado, la expresión del transgen p53 humano esta bajo la regulación del promotor de la α A-cristalina, y por ende se esperaba una expresión a nivel del cristalino y posiblemente una alteración del mismo por la acción de p53 de inducir ya sea arresto celular o apoptosis. El hecho de encontrar microftalmia en los ratones transgénicos homocigotos ya indicaba una alteración dependiente de la presencia del p53 humano.

Al analizar los cristalinos se encontró que en los animales microftálmicos eran de un tamaño varias veces más pequeños que los de los ratones normales (datos no mostrados). De hecho, en algunas ocasiones el cristalino había desaparecido casi por completo; en estos ojos afectados también se observaron alteraciones estructurales en la retina (Figura 3).

A**B**

Figura 3. Histología de retinas de ratones normales y de ratones con microftalmia. Las retinas de los ratones control (A) muestran una histología normal con todas sus capas características, las cuales están en la proporción de tamaño correcta, mientras que en las retinas de los ratones con microftalmia (B) se observa una pérdida del orden estructural, y una desproporción de los tamaños normales de las diferentes capas (Ambas 200x).

La morfología de los cristalinos de ratones normales y de transgénicos hemicigotos para el p53 humano fue igual. Al nivel de la microscopía de campo claro se observa en los ratones normales (Fig. 4A) una cápsula externa de tejido fibrocolagenoso, debajo de la cual se extiende una capa de células epiteliales cuboideas. En la parte media del cristalino, el núcleo de dichas células se alarga y posteriormente desaparece (al igual que el resto de sus organelos), dando lugar a las células fibrosas. Estas ocupan el resto del cristalino, formando capas paralelas y altamente ordenadas. En contraste, en los ratones transgénicos homocigotos (Fig. 4B) no se distingue la cápsula, las células epiteliales forman cúmulos y su núcleo está muy condensado (apoptótico). El interior del cristalino posee una estructura altamente desordenada y se observan también núcleos apoptóticos con cromatina muy condensada. Ultraestructuralmente, en los ratones normales (Fig. 4C) y en los hemicigotos para el transgen se observa la cápsula externa de tejido fibrocolagenoso, células epiteliales con núcleos alargados de morfología normal y el acomodo ordenado de las fibras. No se encontró indicio morfológico alguno de apoptosis. En cambio, en los ratones transgénicos homocigotos (Fig. 4D) no hay un orden en el interior del órgano, observándose asimismo cuerpos apoptóticos con cromatina condensada libres, y otros ya fagocitados por células vecinas.

De esta manera, se establecieron en el modelo tres parámetros a evaluar en el análisis de la interacción de p53 con otros genes: (a) desarrollo de microftalmia, (b) pérdida del ordenamiento celular del cristalino a nivel de microscopía de luz y (c) daño celular apoptótico observado por microscopía electrónica.

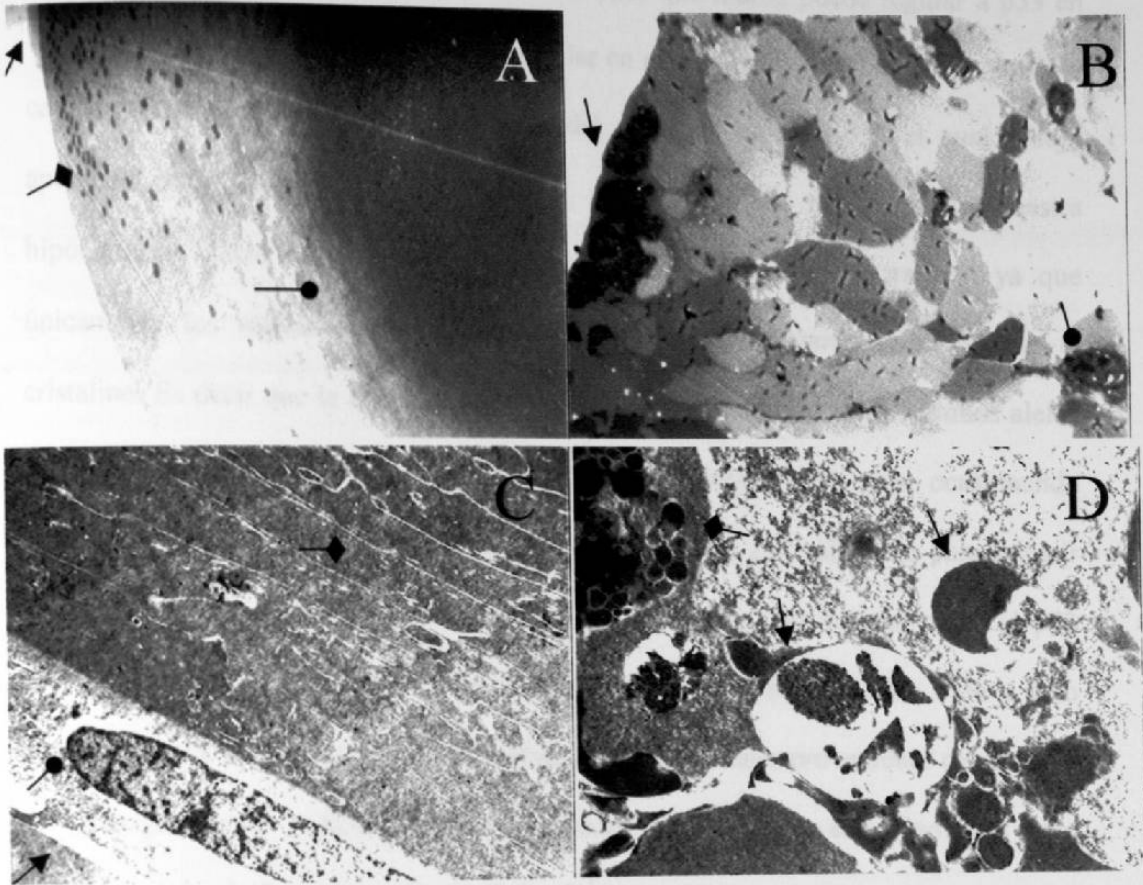


Figura 4. Morfología de cristalinos de ratones normales y de transgénicos homocigotos para p53 humano. (A) Ratón normal, microscopía de campo claro. Se observa, de afuera hacia dentro, una cápsula de tejido fibrocolagenoso (→), una capa de células epiteliales (◆), y células fibrosas en la parte más interna (●) (200X). (B) Ratón transgénico homocigoto, microscopía de campo claro. No se observa la cápsula externa, células epiteliales apoptóticas forman cúmulos (→) y se presentan núcleos apoptóticos en el interior del órgano (●) (200X). (C) Ratón normal, microscopía electrónica. Se observa la cápsula que rodea al órgano (→), células epiteliales con núcleos alargados de morfología normal (●), y las células fibrosas formando capas paralelas y altamente ordenadas (◆) (3000X). (D) Ratón transgénico homocigoto, microscopía electrónica. El interior del cristalino no presenta un orden definido. Se observan cuerpos apoptóticos con cromatina condensada libres (→), y otros ya fagocitados por una célula vecina (◆) (7000X).

4.2 Aplicación del modelo al estudio de la interacción de p53 y mdm2.

El objetivo principal del proyecto fue el demostrar que mdm2 puede regular a p53 en células diferenciadas, en este caso en particular en el cristalino. El modelo previamente caracterizado correspondió a la expresión del transgen humano p53 el cual indujo apoptosis en el cristalino. Interesantemente, y para beneficio de comprobar nuestra hipótesis, el efecto de apoptosis fue dependiente de la dosis del transgen, ya que únicamente los ratones homocigotos para el transgen mostraron apoptosis en el cristalino. Es decir que la cantidad de p53 humano sintetizada a partir de ambos alelos del transgen no pudo ser regulada por el mdm2 endógeno del ratón ocasionando apoptosis. Por el contrario, un solo alelo del transgen no fue suficiente para inducir apoptosis, es decir que el mdm2 endógeno fue suficiente para regular tanto al p53 endógeno del ratón como al p53 humano proveniente del transgen. En base a esto planteamos que al eliminar mdm2 la cantidad de p53 humano proveniente de un alelo del transgen sería suficiente para manifestar apoptosis y esto indicaría que efectivamente mdm2 regula a p53 en células diferenciadas.

Para cumplir con esto, se desarrollaron ratones transgénicos hemocigotos en un fondo genético carente de mdm2. Puesto que la carencia de mdm2 induce muerte embrionaria dependiente de p53, también se eliminó el gen p53 endógeno dejando únicamente el transgen p53 humano. Por tal motivo se cruzaron ratones transgénicos para el p53 humano con ratones que carecían tanto de mdm2 y p53 (ratones con alelos mutados generados por recombinación homóloga de células embrionarias) y la descendencia se genotipificó para estos tres genes y se seleccionaron las líneas apropiadas: transgénicos hemocigotos con y sin mdm2, ambos en un fondo carente de p53 endógeno.

4.2.1 Genotipificación del p53 endógeno y mdm2.

La presencia del transgen p53 humano se determinó, como ya se describió en la generación del modelo, mediante la amplificación de un producto de 500 pb (Figura 1).

La presencia de los alelos mutado y normal del p53 endógeno, se comprobó mediante la obtención de una banda de aproximadamente 650 pb y una banda de aproximadamente 450 pb, respectivamente, en una reacción de PCR (Figura 5).

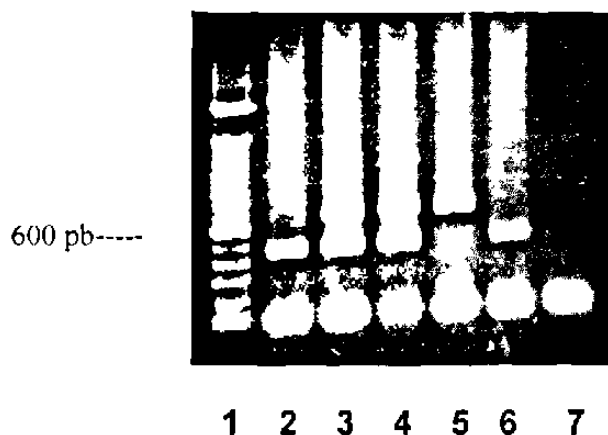


Figura 5. Genotipificación del alelo mutado y normal de p53 por PCR. Se realizaron reacciones de PCR usando DNA genómico de los ratones estudiados. En el carril 1, un marcador de peso molecular (100 pb). En los carriles 3 y 4, ratones heterocigotos para p53, presentando tanto el alelo mutado (650 pb) como el alelo normal (450 pb). En el carril 5, ratón carente de p53 (presencia solamente del alelo mutado). En los carriles 2 y 6, ratones normales (presencia solamente del alelo normal). En el carril 7, negativo de la reacción de PCR. Gel de agarosa al 1.0%.

Similarmente, se observó una banda de 284 pb para el alelo mutante de mdm2, y una banda de 415 pb para su alelo normal (Figura 6).

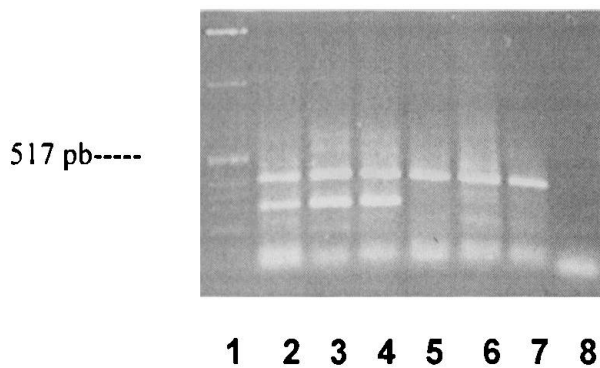


Figura 6. Genotipificación del alelo mutado y normal de mdm2 por PCR. Se realizaron reacciones de PCR usando DNA genómico de los ratones estudiados. En el carril 1, marcador de peso molecular (1 kb). En los carriles 2-4, ratones heterocigotos para mdm2, presentando tanto el alelo mutado (284 pb) como el alelo normal (415 pb). En los carriles 5, 6 y 7, ratones normales (presencia solamente del alelo normal). En el carril 8, negativo de la reacción de PCR. Gel de agarosa al 1.0%.

4.2.2 Análisis del fenotipo.

Una vez obtenidas las líneas de los ratones, procedimos a realizar el análisis correspondiente para comprobar nuestra hipótesis. Cabe recordar que todos los ratones están en un fondo carente de p53 endógeno (para permitir la sobrevivencia de los mismos en la ausencia de mdm2).

Al observar los ojos de los ratones exteriormente encontramos lo siguiente. Los ratones carentes de mdm2 (línea control), encontramos que presentaban, externamente, un tamaño de ojo similar al de un ratón normal, los ratones transgénicos homocigotos para el p53 humano tenían microftalmia y los ratones hemicigotos para el p53 humano presentaron ojos de tamaño normal (como ya se había descrito anteriormente). En contraste, estos ratones transgénicos hemicigotos para p53 humano en un fondo carente de mdm2 presentaron microftalmia, pero más pronunciada, ya que los ojos se

observaron más cerrados (pequeños) que en los ratones transgénicos homocigotos para p53. El tamaño de los ojos se confirmó al hacer una disección de los mismos de estas líneas de ratones (Figura 7). Estos resultados indicaron que efectivamente mdm2 regula a p53 en estas células diferenciadas *in vivo*, ya que con una sola copia del transgen en ausencia de mdm2 se presentó microftalmia.

Procedimos a evaluar el daño mediante microscopía de luz en cortes histológicos. Encontramos que los cristalinos de los ratones carentes de mdm2 mostraron una disposición estructural idéntica a la descrita para los ratones normales. En cambio, en los ratones transgénicos hemocigotos carentes de mdm2, el cristalino tenía un tamaño mucho menor al observado en la línea control (mdm2 $-/-$). También, presentaba una forma irregular, el interior no tenía un orden de fibras definido, y había núcleos apoptóticos con cromatina muy condensada. En los ratones transgénicos hemocigotos y heterocigotos para mdm2, se observó a este nivel una estructura del cristalino similar a la de la línea control, y por lo tanto similar a la de los ratones normales (Figura 8). Nuevamente estos resultados muestran el efecto regulatorio que ejerce el mdm2 sobre el transgen p53.

Análisis mediante microscopía electrónica, mostraron que los cristalinos de los ratones carentes de mdm2 y la de los ratones transgénicos hemocigotos para p53 y heterocigotos para mdm2 presentaron una ultraestructura idéntica a la de los ratones normales, incluyendo la falta de indicios morfológicos del proceso de apoptosis. En cambio, en los ratones transgénicos hemocigotos carentes de mdm2, se observó en las células epiteliales vacuolas al nivel de la membrana celular, condensación del citoplasma y condensación periférica de la cromatina nuclear. Asimismo, no se observó un orden definido de las

fibras en el interior. Todas estas características son indicativas de un proceso apoptótico (Figura 9).

Cabe aclarar que los hallazgos microscópicos descritos anteriormente para los ratones transgénicos carentes de *mdm2*, se hicieron con piezas obtenidas de individuos de un mes de edad, mientras que los descritos para el resto de las líneas (incluidas las de la generación del modelo, ver Materiales y Métodos) procedían de ratones de dos meses. En la Tabla V se sintetiza la información morfológica de los ratones analizados.

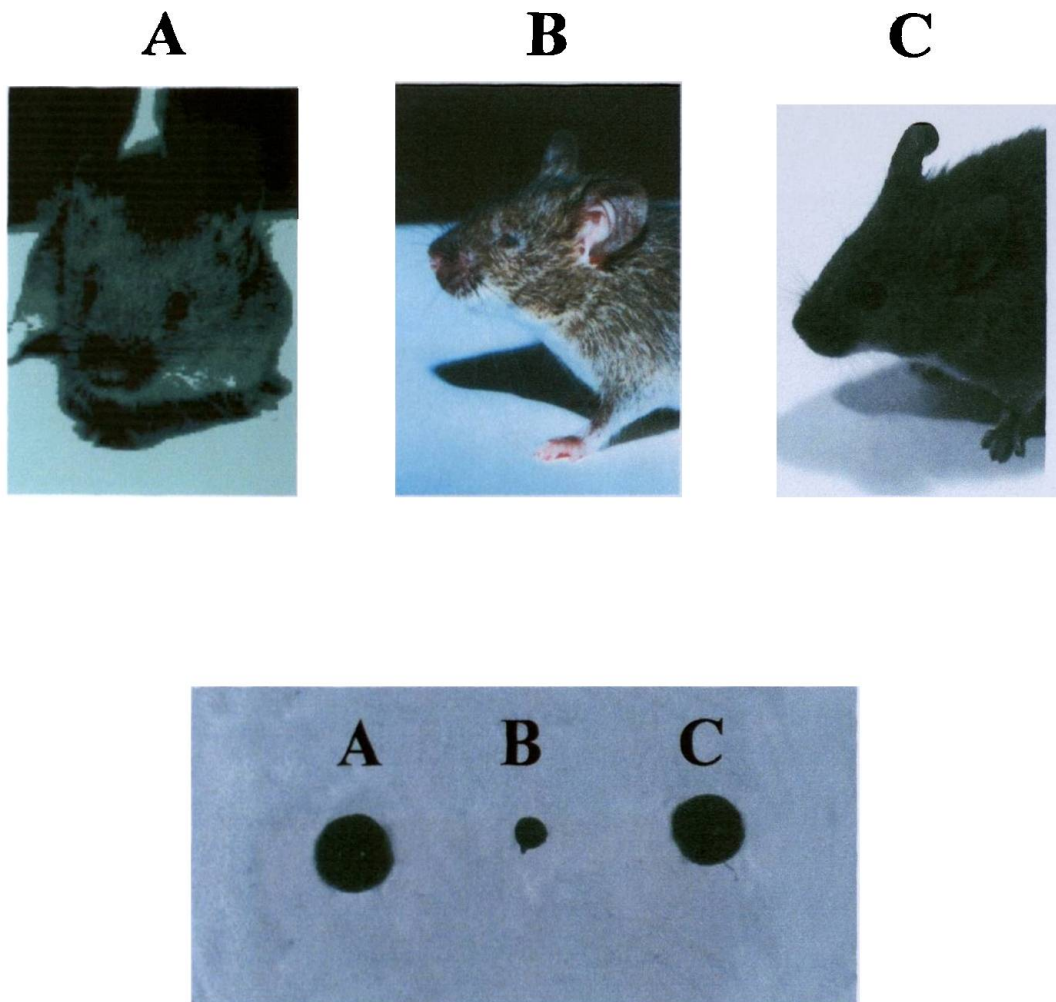


Figura 7. Inducción de microftalmia en ratones transgénicos para p53 humano en la ausencia de mdm2. Los ratones carentes de mdm2 (A) presentan un tamaño de ojo similar al de un ratón normal. En contraste, los ratones carentes de mdm2 y transgénicos hemocigotos para p53 humano presentan microftalmia (B). Los ratones heterocigotos para mdm2 y transgénicos hemocigotos para el transgen p53 (C), presentan ojos de un tamaño normal. En el panel inferior se observan los ojos correspondientes a cada uno de los ratones.

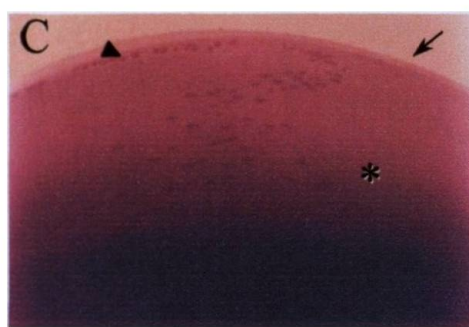
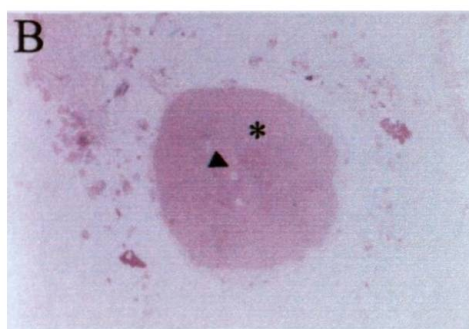
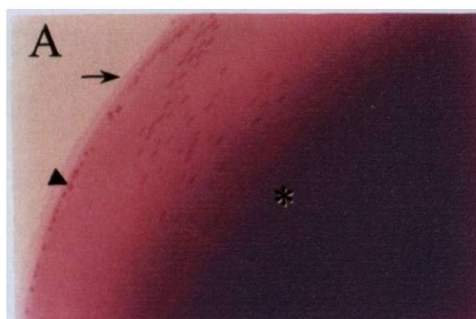


Figura 8. Alteraciones observadas por microscopía de luz de cristalinios de ratones transgénicos para p53 humano en la ausencia de mdm2. En los ratones carentes de mdm2 (A) se observa, de afuera hacia adentro, una cápsula de tejido fibrocolagenoso (flecha), una capa de células epiteliales (cabeza de flecha) y células fibrosas en la parte más interna (asterisco). En contraste, en los ratones carentes de mdm2 y transgénicos hemicigotos para p53 humano (B) el cristalino presentó una forma irregular, el interior sin un orden de fibras definido (asterisco), y núcleos picnóticos con cromatina muy condensada (cabeza de flecha). Los ratones heterocigotos para mdm2 y transgénicos hemicigotos para el transgen p53 (C), presentan una morfología normal. Todas 200x.

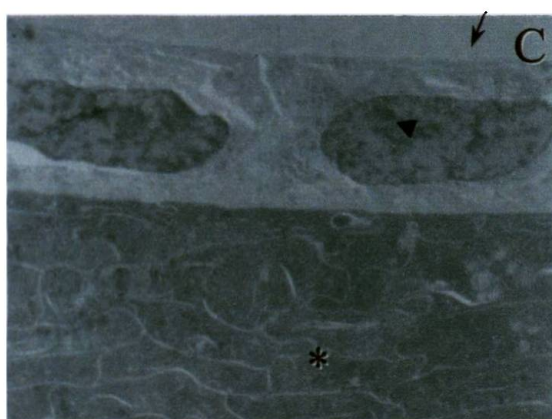


Figura 9. Inducción de apoptosis en cristalinos de ratones transgénicos para p53 humano en la ausencia de mdm2. En los ratones carentes de mdm2 (A) se observa la cápsula que rodea al órgano (flecha), células epiteliales con núcleos alargados de morfología normal (cabeza de flecha) y las células fibrosas formando capas paralelas y altamente ordenadas (asterisco) (3000x). En los ratones carentes de mdm2 y transgénicos hemicigotos para p53 humano (B) se observó en las células epiteliales vacuolas al nivel de la membrana celular (flecha), condensación del citoplasma (asterisco) y condensación periférica de la cromatina nuclear (cabeza de flecha). Asimismo, no se observó un orden definido de las fibras en el interior (4400x). Los ratones heterocigotos para mdm2 y transgénicos hemicigotos para el transgen p53 (C), presentan una ultraestructura normal (4400x).

Tabla V. Características morfológicas de los ratones analizados.

mdm-2	tg p53	Ojo normal	Microftalmia	Pérdida del ordenamiento celular	Apoptosis
++		✓			
++	+	✓			
++	++		✓	✓	✓
--		✓			
--	+		✓	✓	✓
+-	+	✓			

CAPITULO V

DISCUSION

El estudio detallado de los mecanismos empleados por p53 en su función de gen supresor de tumores, tiene grandes implicaciones en el entendimiento de la presentación y progresión del cáncer, así como en el diseño de estrategias de terapia génica contra esta enfermedad.

En este trabajo se estableció un modelo para el estudio de la interacción *in vivo* de p53 con otros genes. Mediante este modelo se caracterizaron tres parámetros indicativos de apoptosis causada por p53: (a) desarrollo de microftalmia, (b) pérdida del ordenamiento celular del cristalino observado por microscopía de campo claro y (c) daño celular apoptótico observado por microscopía electrónica.

Una de las aportaciones de este trabajo es precisamente el establecimiento de dicho modelo, el cual podrá ser utilizado también para el estudio de la interacción de p53 con genes diferentes a mdm2. Es decir, tal vez la presencia o la ausencia experimental de estos genes en los ratones transgénicos analizados, modifique la magnitud de los hallazgos aquí descritos, haciéndolos más o menos pronunciados. Si esto sucede, se podrá decir que el gen en cuestión interactúa con p53 para facilitar o, alternativamente, interferir con sus funciones.

La característica analizada más destacable fue la apoptosis. Esta provocó un daño importante en el cristalino que a final de cuentas se reflejó en el tamaño del ojo. Aquellos ratones positivos para el transgen mostraron microftalmia aun desde edades

muy tempranas. Cabe mencionar que lo anterior solo se presentó en los ratones homocigotos para el transgen. Es decir, hubo ratones que aunque mostraban una reacción positiva a la PCR, tuvieron ojos totalmente normales. Estos descendían de un padre transgénico y uno normal, por lo que sin duda alguna eran hemocigotos para el p53 humano. En cambio, los que sufrían de microftalmia provenían de dos padres transgénicos, y así muy seguramente eran homocigotos para el transgen. Estas aseveraciones fueron confirmadas mediante cruces de ratones con genotipos apropiados.

Mediante los análisis de microscopía de campo claro, se observó que los cristalinos de los ratones transgénicos homocigotos perdieron su disposición altamente ordenada. Había núcleos picnóticos (apoptóticos) en la periferia y el interior, y fibras con formas anormales y altamente variables. Ultraestructuralmente, encontramos signos claros de apoptosis: núcleos con cromatina altamente condensada, cuerpos apoptóticos aislados y otros ya fagocitados por células vecinas. Es interesante notar que en los ratones normales no se observó un solo indicio morfológico claro de apoptosis, proceso que según algunos autores, intervendría en el proceso de diferenciación normal de las fibras del cristalino (25).

En este trabajo se analizaron solo ratones adultos. Sería interesante extender los estudios a etapas embrionarias con el objetivo de conocer la secuencia de eventos que conducen a los hallazgos aquí mostrados. Esto tiene importancia también al considerar que en los ratones transgénicos analizados que mostraban daño en el cristalino, encontramos anomalías en la retina, principalmente hiperplasia de algunas de sus capas y apoptosis de muchas de sus células. Estas alteraciones podrían deberse a un efecto secundario a la destrucción del cristalino, ya que es conocido que él mismo ejerce un

control considerable sobre el desarrollo de la retina (33). Alternativamente, podría ser que el transgen estuviera también expresándose en la retina y por lo tanto causándole efectos deletéreos. Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado expresión de la α A-cristalina, cuyo promotor a su vez regula la expresión de p53 en este modelo, en tejidos diferentes al cristalino. Esto sí se ha demostrado para otras familias de cristalinas (34).

Una vez generado el modelo, este se aplicó para determinar si el oncogen mdm2 regula a p53 en células diferenciadas *in vivo*.

Fue necesario el estado homocigoto del transgen para que en presencia de mdm2 se presentara apoptosis. En cambio, el estado hemicigoto del transgen en ausencia de mdm2 fue suficiente para que se presentaran los mismos resultados. De esta manera, estábamos comprobando nuestra hipótesis de que, al igual que en etapas embrionarias, mdm2 regula a p53 en células diferenciadas *in vivo*. Para ampliar esta certeza, comprobamos que incluso una sola copia de mdm2 es suficiente para regular a p53, y por lo mismo contrarrestar los efectos deletéreos del mismo observados en nuestro sistema.

Es destacable que un solo gen, el mdm2, regule de manera tan importante al p53, considerando que este último se encuentra en la interacción de muchas vías metabólicas celulares importantes. Sin embargo, nuestros hallazgos confirman y complementan los resultados obtenidos en otros trabajos realizados en diferentes modelos de estudio (18,19). Además, resultados posteriores obtenidos utilizando nuestro modelo, confirman la importancia sobresaliente de mdm2 sobre otros genes (como bax y e2f-1) en su interacción con p53 (datos no publicados).

Todas estas consideraciones son de gran importancia desde el punto de vista práctico. El hecho de que la ausencia de mdm2 potencia el efecto apoptótico de p53, indica que las estrategias de terapia génica basadas en p53 (35) serían más efectivas al inhibirse la expresión de mdm2.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1. La expresión de p53 humano en el cristalino de ratón induce apoptosis y pérdida de la diferenciación del cristalino.
2. El transgen p53 humano mostró un fenotipo dependiente de la dosis, ya que únicamente los ratones homocigotos para el transgen mostraron microftalmia y apoptosis en el cristalino.
3. El Mdm2 endogeno fue capaz de regular al transgen p53 en el cristalino del ratón, es decir en células diferenciadas *in vivo*.
4. El transgen p53 humano mostró un efecto apoptótico más fuerte, inclusive a menor dosis, en ausencia de mdm2.

REFERENCIAS

1. Robbins S.L., Cotran R.S. Patología estructural y funcional 3ª ed. Editorial Interamericana. 1987.
2. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. Recombinant DNA 2ª ed. Scientific American Books. 1996.
3. Lewin B. Genes V. Oxford University Press. 1994.
4. Perera F.P. 1997. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* **278**: 1068-1073
5. Bishop J.M. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science* **235**: 305-311.
6. Tittle I.M. 1996. Oncogene products represent potential targets of tumor vaccines. *Cancer Immunol Immunother* **43**: 135-141.
7. Fearon E.R. 1997. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* **278**: 1043-1050
8. Momand J., Zambetti G.P. 1996. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* **63**: 1-10
9. Thut C.J., Goodrich J.A., Tjian R. 1997. Repression of p53-mediated transcription by Mdm-2: a dual mechanism. *Genes Dev* **11**: 1974-1986.

10. Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I., Weismuller L., Grosse F., Deppert W. 1999. The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* **55**: 12-27.
11. Fakharzadeh S.S., Trusko S.P., George D.L. 1991. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* **10**: 1565-1569.
12. Olson D.C., Marechal V., Momand J., Chen J., Romocki C., Levine A.J. 1993. Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm2-p53 protein complexes. *Oncogene* **8**: 2353-2360.
13. Juven-Gershon T., Oren M. 1999. Mdm2: the ups and downs. *Mol Med* **5**: 71-83.
14. Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**: 1237-1245.
15. Shair M.D. 1997. A closer view of an oncoprotein-tumor suppressor interaction. *Chem Biol* **4**: 791-794.
16. Momand J., Zambetti G.P. 1996. Analysis of the proportion of p53 bound to mdm-2 in cells with defined growth characteristics. *Oncogene* **12**: 2279-2289.

17. Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A. Jr., Butel J.S., Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**: 215-221.
18. Montes de Oca Luna R., Wagner D.S., Lozano G. 1995. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**: 203-206.
19. Jones S.N., Roe A.F., Donehower L.A., Bradley A. 1995. Rescue of embryonic lethality in mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**: 206-208.
20. Trauth B.C., Keesey J. Guide to cell proliferation and apoptosis methods. Boehringer Mannheim Corporation.
21. Collins J.A., Schandl C.A., Young K.K., Veseley J., Willingham M.C. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* **45**: 923-934.
22. Alnemri E.S. 1997. Apoptosis. *The Scientist* **11**: 12.
23. Vaux D.L., Strausser A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2239-2244.
24. Wolf B.B., Green D.R. 1999. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* **274**: 20049-20052.

25. Bassnet S., Mataic D. 1997. Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J Cell Biol* **137**: 37-49.
26. Jule Griebok Jose The lens, en Biochemistry of the eye. American Academy of Ophthalmology Manuals Program. 1983.
27. Wride M.A. 1996 Cellular and molecular features of lens differentiation: a review of recent advances. *Differentiation* **61**: 77-93.
28. Morgenbesser S.D., Williams B.O., Jacks T., DePinho R.A. 1994. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* **371**: 72-74.
29. Nakamura T., Pichel J.G., Williams-Simons L., Westphal H. 1995. An apoptotic defect in lens differentiation caused by human p53 is rescued by a mutant allele. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6142-6146.
30. Pan H., Griep M.F. 1994. Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development. *Genes Dev* **8**: 1285-1299.
31. Pan H., Griep M.F. 1995. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* **9**: 2157-2169.

- 32 Nakamura T., Williams-Simons L., Westphal H. 1997. A human papillomavirus type 18 E6 E7 transgene sensitizes mouse lens cells to human wild-type p53-mediated apoptosis. *Oncogene* **14**: 2991-2998.
- 33 Young R.W. 1984. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol.* **229**: 362-373.
- 34 Jones S.E., J. mary C., Crist J., Makwana J., Neal M.J. 1999. Retinal expression of α -crystallins in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 3017-3020.
- 35 Ohtsuka M., Kato T., Ueno H., Tanaka I., Tateishi K., Kawakami T., Koike Y., Ikehara E., Saito Y., Harada H., Omata M. 1999. Adenovirus mediated p53 tumour suppressor gene therapy for human gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Gut* **44**: 366-371.



