

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*:
p21 Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA
POR *p53* EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

Por

Q. F. B. ARTURO CHAVEZ REYES

Monterrey, Nuevo León

Diciembre de 1999

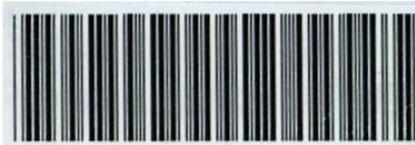
TM

RC267

.C4

1999

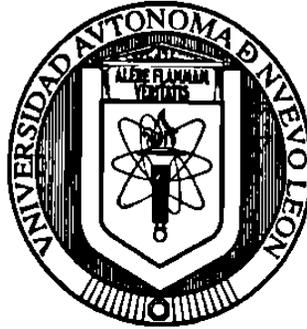
c.1



1080124391

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*: *p21*
Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA POR
p53 EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA.**

Por

Q.F.B. ARTURO CHAVEZ REYES

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre de 1999

TM

RC267

.C4

1999



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



**PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*: *p21*
Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA POR
p53 EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.**

COMISION DE EXAMEN

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
PRESIDENTE

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
SECRETARIO

Ph.D. Gulliermina Lozano
PRIMER VOCAL

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
SEGUNDO VOCAL

Dr. Pablo Zapata Benavides
TERCER VOCAL

The image shows five horizontal lines, each with a handwritten signature written above it. The signatures are in black ink and appear to be cursive. The first signature is the most prominent and matches the name of the president. The other four signatures are less legible but correspond to the names of the other members of the exam commission.

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre de 1999

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



**PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*: *p21*
Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA POR
p53 EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.**

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Roberto Montes de Oca Luna", written over a horizontal line.

Ph.D. Gulliermina Lozano
Co-Director Externo de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gulliermina Lozano", written over a horizontal line.

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Co-Director de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Cristina Rodríguez Padilla", written over a horizontal line.

Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Julia Verde Star", written over a horizontal line.

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre de 1999

"... O ya no entiendo lo que está pasando o ya pasó lo que estaba apenas entendiendo...."

Carlos Monsiváis.

LOCALIZACION

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Arturo y Nora Hilda

Gracias por todo su amor, comprensión, apoyo, esfuerzos y sacrificios que han hecho posible que haya llegado a esta etapa de mi carrera y de mi vida.

A mis hermanas:

Nora y Erika

Por el cariño y su manera tan especial de motivarme a seguir siempre adelante.

A:

Yolanda

Por estar ahí siempre.

A mi abuelita:

María

Porque sé que me sigues cuidando desde donde estas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por sus enseñanzas, por brindarme la oportunidad de continuar con su línea de investigación, por todo su apoyo y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Guillermina Lozano por darme la invaluable oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su crítica y guía durante todo este tiempo, thanks Gigi.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por apoyarme en esta aventura, por todos los consejos brindados y por la revisión del manuscrito de esta tesis.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por introducirme al mundo de la Biología Molecular enseñándome todas las bases que hicieron posible que realizara este trabajo y por su apoyo incondicional.

A los Drs. Ricardo Gomez Flores y Edgar Mendoza Gamboa por su amistad y todo el apoyo que me han brindado siempre.

A John M. Parant por toda la ayuda y por estar siempre dispuesto a compartir conmigo sus conocimientos, gracias buddy.

A la Ms.S. Lisa L. Amelse por la ayuda técnica ofrecida durante todo el proceso de esta investigación.

Al C.P. Faustino Chávez Gutierrez por haberme apoyado toda la vida, gracias tío.

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

A Silvia Treviño Moreno por su amistad y ayuda en todos los aspectos.

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Lozano: Susan, Geng, Wen, John, Betsy, Gene, Mini, Sohela, Chad, Carolyn, Jimmy, Sung-Ling, Lisa, Valerie, Joe y Sonia, por toda la ayuda 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, Pera, Bertha, Catarino, Aracely, Herminio, Reyes, Sabino, Gabriel y Juany 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 por el apoyo brindado en mi carrera.

INDICE GENERAL

	Pag.
Localización	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice general	v
Indice de tablas	vii
Indice de figuras	ix
Indice de apéndices	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumen	1
Importancia	4
Introducción	5
Antecedentes	12
I. <i>p53</i>	12
II. <i>mdm2</i>	21
III. <i>p21</i>	25
IV. <i>bax</i>	28
Hipótesis	32
Objetivos	33
Diagrama de Flujo	34
Materiales y Métodos	35

Resultados	45
Discusión	72
Conclusiones	84
Apéndices	85
Bibliografía	98
Vitae	117

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.	47
Análisis genético de ratones mutantes <i>p21/mdm2</i> .	
Tabla 2.	49
Análisis genético de ratones mutantes <i>p21/mdm2</i> .	
Tabla 3.	50
Análisis histológico y genético de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 9.5 días de gestación.	
Tabla 4.	52
Análisis histológico y genético de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 7.5 días de gestación.	
Tabla 5.	53
Análisis histológico de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Tabla 6.	56
Análisis genético de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 3.5 días de gestación.	
Tabla 7.	57
Análisis genético de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> .	

Tabla 8.	59
Análisis genético de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i>.	
Tabla 9.	60
Análisis histológico y genético de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 7.5 días de gestación.	
Tabla 10.	62
Análisis histológico de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Tabla 11.	64
Análisis histológico de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	
Tabla 12.	67
Análisis de apoptosis <i>in situ</i> en embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	
Tabla 13.	70
Análisis del ciclo celular <i>in situ</i> en embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.	3
Las vías de p53.	
Figura 2.	14
Organización de la proteína p53	
Figura 3.	22
Organización de la proteína mdm2.	
Figura 4.	27
Inhibición de kinasas dependientes de ciclina por p21.	
Figura 5.	30
Modelo de las interacciones Blc-2/Bax y la regulación de apoptosis.	
Figura 6.	46
Productos de PCR para los genes <i>mdm2</i>, <i>p21</i> y <i>bax</i>.	
Figura 7.	54
Histología de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Figura 8.	63
Histología de embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Figura 9.	66

Histología de embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	
Figura 10.	69
Determinación de apoptosis en embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación mediante la técnica de Tunel.	
Figura 11.	71
Determinación de inhibición del crecimiento celular en embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación mediante detección inmunohistoquímica de PCNA.	
Figura 12.	86
Inactivación del gen <i>mdm2</i>.	
Figura 13.	87
Inactivación del gen <i>p21</i>.	
Figura 14.	88
Inactivación del gen <i>bax</i>.	
Figura 15.	89
Inactivación de genes en ratones. Protocolo.	

INDICE DE APENDICES

	Pag
Apéndice 1.	85
Inactivación de genes en ratones.	
Apéndice 2.	90
Segregación génica.	
Apéndice 3.	91
Principio de la determinación de apoptosis por la técnica de Tunel.	
Apéndice 4.	92
Principio de la determinación de la inhibición del crecimiento celular mediante el uso del sistema Zymed para la detección inmunohistoquímica de PCNA.	
Apéndice 5.	93
Lista de reactivos, kits y buffers utilizados.	
Apéndice 6.	96
Artículo publicado.	

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje, porciento.
°C	Grados centígrados
Ab	Anticuerpo
Aprox.	Aproximadamente
BrdU	5-Bromo 2'-desoxiuridina
Ca⁺²	Ión calcio
CDKs	Kinasas dependientes de ciclina
cDNA	DNA complementario o copia
Cip-1	Cdk-interacting protein, proteína de interacción con CDKs
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 etilendiamino tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ES	Embryo Stem, Estaminal embrionaria
Etc.	Etcétera
FERs	Fibroblastos de embrión de rata
Hg⁺²	Ión mercurio

Hr.	Hora
Hrs.	Horas
I.R.	Radiación ionizante
IGF-BP3	Insuline-like growth factor binding protein 3, proteína 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IL-3	Interleucina 3
Kb	Kilobase, 1000 pares de bases.
kDA o kD	Kilodaltones
KO	Knockout, inactivación
L5	Proteína ribosomal L5
M	Molar, concentración molar, molaridad.
MA	Massachussets
mdm	Murine double minute, doble diminuto murino
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar, concentración milimolar.
MO	Missouri
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
NaCl	Cloruro de sodio
Neo	Neomicina

ng	Nanogramo
OH	Hidroxi
ORF	Open reading frame, marco abierto de lectura
Pag.	Página
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ph.D.	Doctor en Filosofía
pH	Potencial de hidrógeno
POD	Peroxidasa
prob.	Probabilidad
Rb	Retinoblastoma
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Streptavidina
Sdi1	Senescent cell DNA synthesis inhibitor, inhibidor de la síntesis de DNA en células senescentes.
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundo
SLN	Señal de localización nuclear
St.	Stret, calle
SV40	Virus de simio 40
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
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
TK	Timidina kinasa
Tris	Trizma base
Tunel	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TX	Texas
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
U.V.	Ultravioleta
WAF-1	Wild-type p53 activated fragment 1, fragmento 1 activado por p53 silvestre