

## 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. **Infeción 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.

Finalmente, los ratones transgénicos encontrados en el paso anterior son cruzados con ratones negativos o silvestres y la progenie de estas cruas 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 esperaría 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 esquématicamente 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 timida 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:

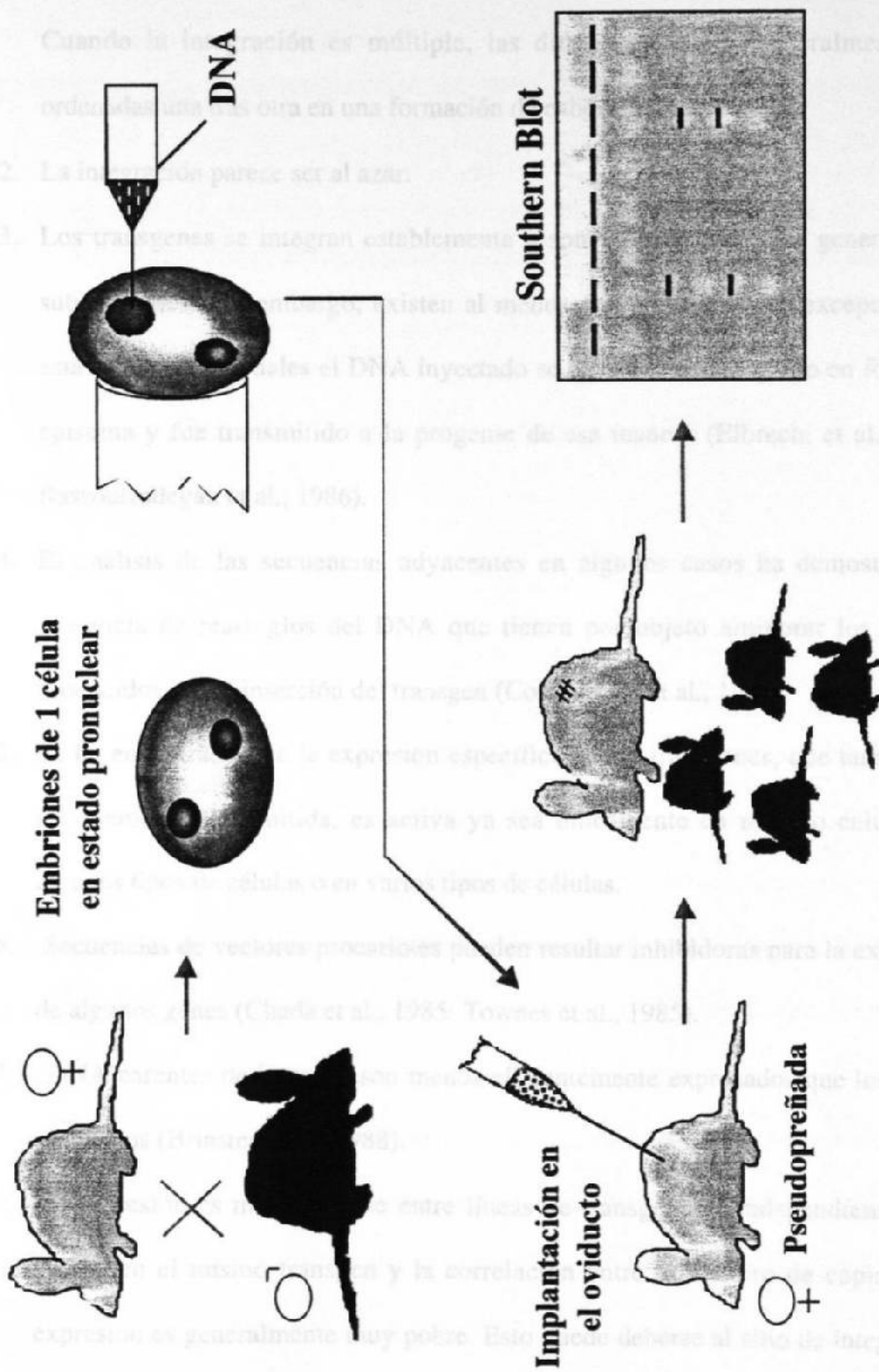


Figura 1. Protocolo seguido para la creación de los ratones transgénicos.

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 fue que la presencia de secuencias procariotas en los transgenes producía una inhibición en la expresión de algunos genes como el de  $\beta$ -globina,  $\alpha$ -actina y  $\alpha$ -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 múltiples 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<sub>α</sub> (Le Meur et al., 1985), entre otros.

#### Aplicaciones de la tecnología transgénica

*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	$\beta$ -Lactoglobulina, WAP
Espermátidas	Protamina
Páncreas	Insulina, Elastasa
Riñón	Ren-2
Hígado	Alb, AGP-A, CRP, $\alpha$ 2u-G, AAT, HBV
Saco Vitelino	$\alpha$ -Fetoproteína
Tejidos Hematopoyéticos	
▪ Células eritroides	$\beta$ -Globina
▪ Células B	$\kappa$ Ig, $\mu$ Ig
▪ Células T	Receptor de Células T, <i>lck</i>
▪ Macrófagos	M-MuLV LTR
Tejido Conectivo	MSV LTR, Colágeno, Vimentina
Músculo	$\alpha$ -Actina, Cadena Ligera de Miosina
Varios Tejidos	H-2 (HLA), $\beta$ 2-m, CuZn SOD

ATT,  $\alpha$ 1-antitripsina; AGP-A,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida; Alb, albúmina;  $\alpha$ 2u-G,  $\alpha$ 2u globulina;  $\beta$ 2-m, cadena  $\beta$ 2 de la microglubulina; 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.

TABLA1. 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 anormalidades 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 <sup>a</sup> (SVA-e-MGH)	Adenomas de cels. De isletas	Messing et.al. 1985
	SV40	Insulina II de rata (RIP1-Tag, (RIR-Tag)	Hiperplasia de cels. $\beta$	Hanahan 1985
Glándula Mamaria	c-myc	Promotor/enhancer de MMTV <sup>b</sup> (MTV/c-myc)	Adenocarcinomas	Stewart et.al. 1984
	c-myc	Promotor de la proteína ácida whey de ratón (wap-myc)	Adenocarcinomas	Schoenenberger 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 linealizado (BPV-1)	Fibropapilomas	Lacey et.al. 1986
Cerebro	SV40	Adenovirus 2 y 5 (pK4)	Glioblastomas	Kelly at.al. 1986
	SV40	Gen de fusión de metalotionefna (SV-MGH)	Papilomas en el plexus coroideo	Palmiter et.al. 1985
	SV40	Enhancer de Ig humana y promotor T de SV40 <sup>c</sup> (Ig/Tp-T)	Tumores en el plexus coroideo	Suda et.al. 1987
Sist. Nervioso Periférico	SV40	Enhancer deletado de SV (SV $\Delta$ e-MGH)	Neuropatías desmielinizantes	Messing et.al. 1985
Ojo	SV40	Promotor del $\alpha$ A-cristalino ( $\alpha$ -crys-Tag)	Tumores en las cels. Epiteliales del cristalino	Mahon et.al. 1987
Hígado	SV40	Enhancer deletado de SV <sup>a</sup> (SV $\Delta$ e-MGH)	Carcinoma	Messing et.al. 1985
Pulmón	Ha-ras	Enhancer de Ig humana (Ig/Tp-ras)	Tumores adenomatosos multicéntricos	Suda et.al. 1987
Endotelio Vascular	Región T-media de Polioma	Retrovirus no replicable (py-MT)(N-TKmt) <sup>d</sup>	Hemangiomas	Bautch et.al. 1987 Williams et.al. 1988
Células Linfoides	c-myc	Enhancer de Ig murina (E $\mu$ -myc)	Linfomas de cels.B	Adams et.al. 1985
	c-myc	Promotor/enhancer de MMTV <sup>b</sup> (MTV/c-myc)	Linfomas B, T, no-B y no-T	Leder et.al. 1986
	c-myc	Enhancer de Ig humana <sup>c</sup> (Ig/Tp-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 <sup>b</sup> (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 metalotionefna 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.

## 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 acídicos dispuestos en alfa hélice, que es un dominio común en muchos activadores transcripcionales acídicos. 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

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 silvestre (Pab246) y se vuelve

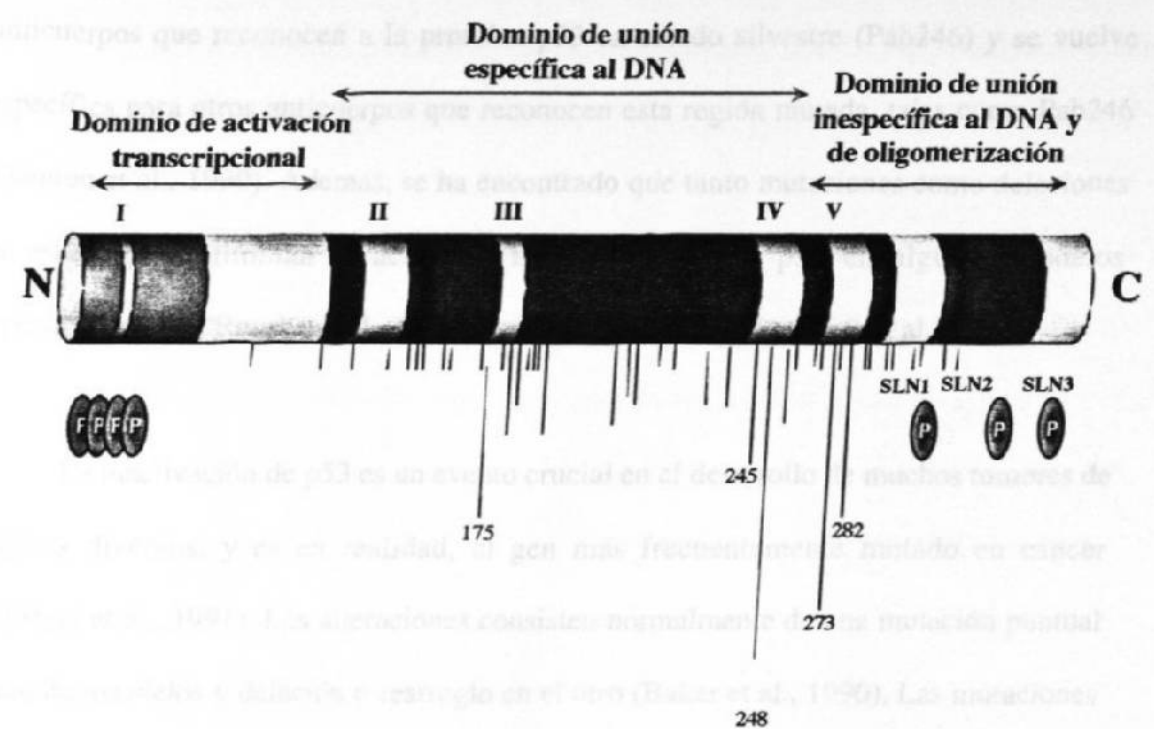


Figura 2. Estructura de la proteína p53 humana. N, terminación amino. C, terminación carboxilo. P, sitio de fosforilación. SLN, señal de localización nuclear. I, II, III, IV y V, dominios altamente conservados entre especies. Las líneas verticales indican los sitios altamente predispuestos a mutaciones.

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.

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<sup>WAF1/Cip1</sup>*, 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 $\sigma$*  (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- $\beta$*  (p53-induced Transforming Growth Factor  $\beta$ ), que se expresa altamente en placenta, está implicado en la formación de cartílago 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*<sup>DcR2/TRAIL-R4</sup>, 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 asocie a 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- $\alpha$ ), trombospondina-1, metaloproteínas 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 multidrogas 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 Glutation Peroxidasa (GPX) (Tan et al., 1999), la proteína de unión a Calcio S100A2, *TP53TG1* (Takei et al., 1998), *TP53TG3*

(Ng et al., 1995), (222) (García et al., 2004), G1/S (Fornace et al., 1988), (223) (García et al., 1993), (224) (Nishitani et al., 1997) y (225) (Fornace et al., 1988).

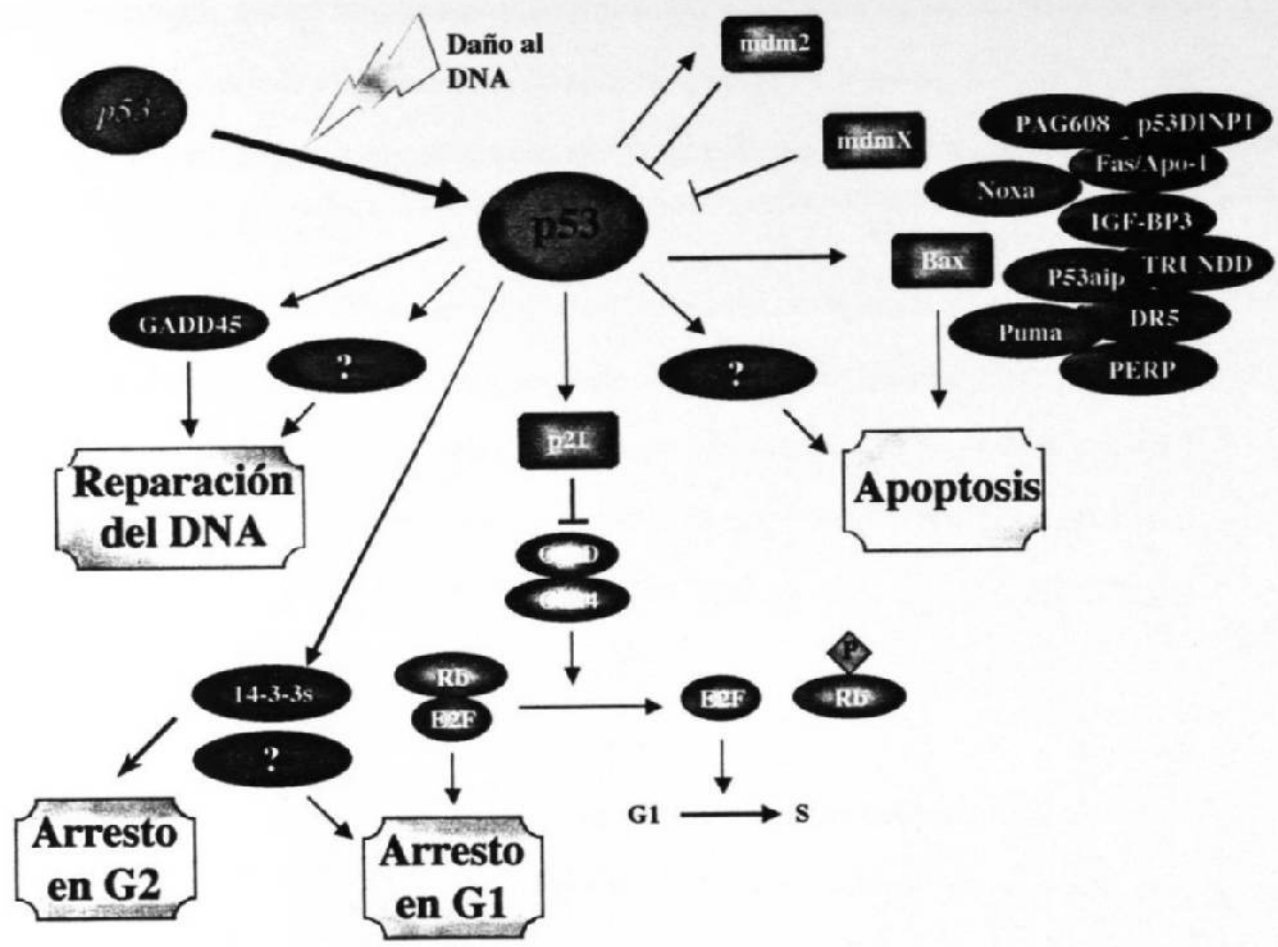


Figura 3. Las vías de p53. Las flechas (↓) representan inducción, mientras que las otras líneas (⊥) representan bloqueo.

(Ng et al., 1999), *p53R2* (Tanaka et al., 2000), *GML* (Furuhata et al., 1996), *P2XM* (Urano et al., 1997), *BAI1* (Nishimori et al., 1997) y *CSR* (Han et al., 1998).

## mdm2

El gen *mdm2* fué 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



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 (Mondani et al., 2009).

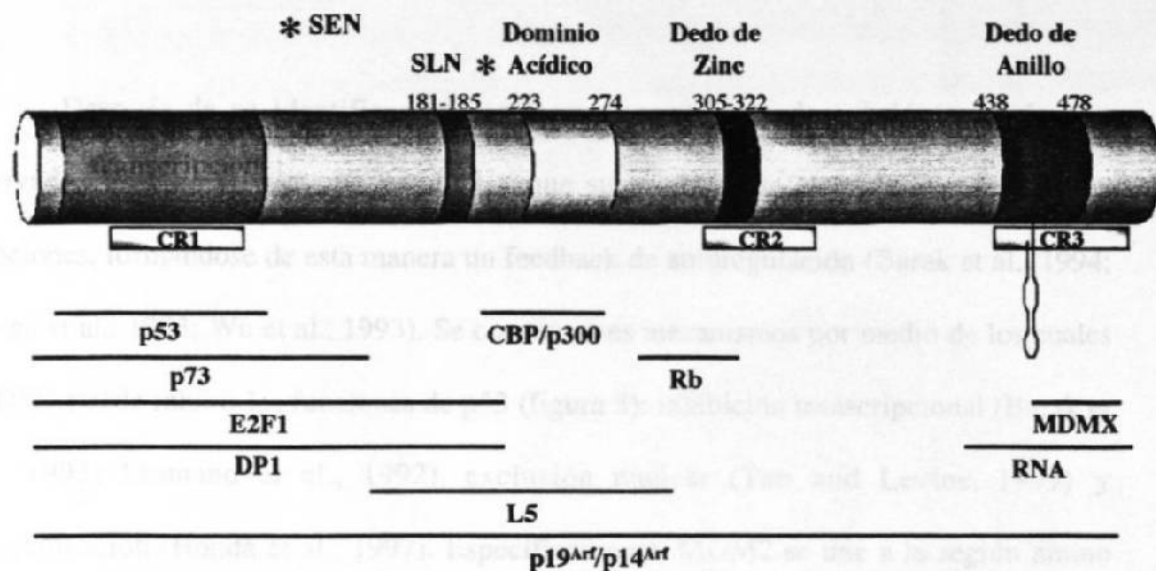


Figura 4. Organización de la proteína MDM2. SLN, señal de localización nuclear. SEN, señal de exportación nuclear. CR, regiones conservadas entre diferentes especies. Las líneas horizontales indican la región a la cual se unen las moléculas indicadas bajo cada línea.

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 yTAF60, 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

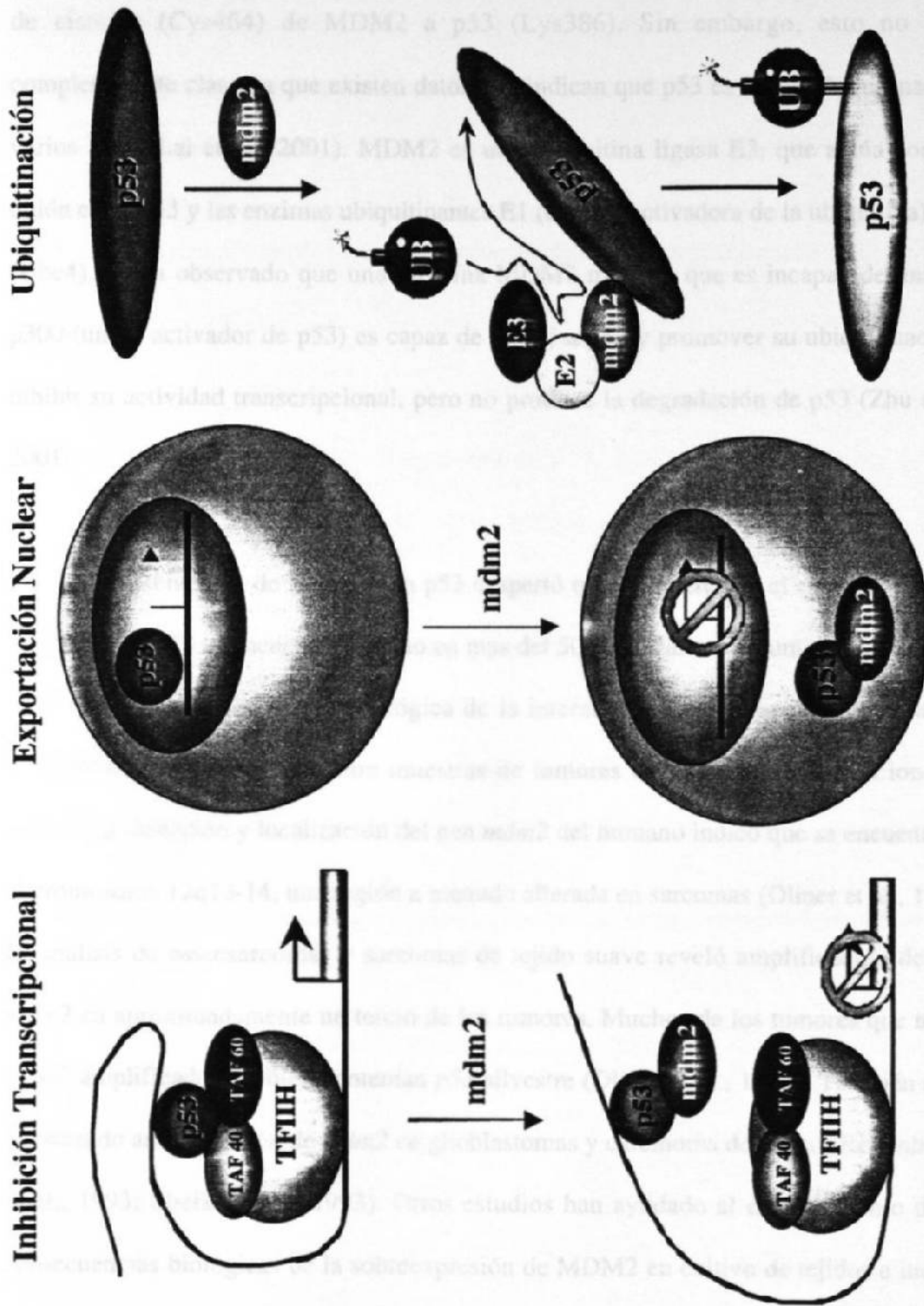


Figura 5. Mecanismos involucrados en la inactivación de p53 por MDM2.

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 mas del 50 % de cánceres humanos (Greenblatt et al., 1994). La significancia biológica de la interacción entre estas dos proteínas fué 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 cruza 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<sup>ARF</sup>/p14<sup>ARF</sup>* (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<sup>INK4a</sup>* y *p19<sup>Arf</sup>*. *P19<sup>Arf</sup>* 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<sup>Arf</sup>* 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<sup>Arf</sup> es P14<sup>Arf</sup> 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<sup>Arf</sup>, 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<sup>Arf</sup>.

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 más 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

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

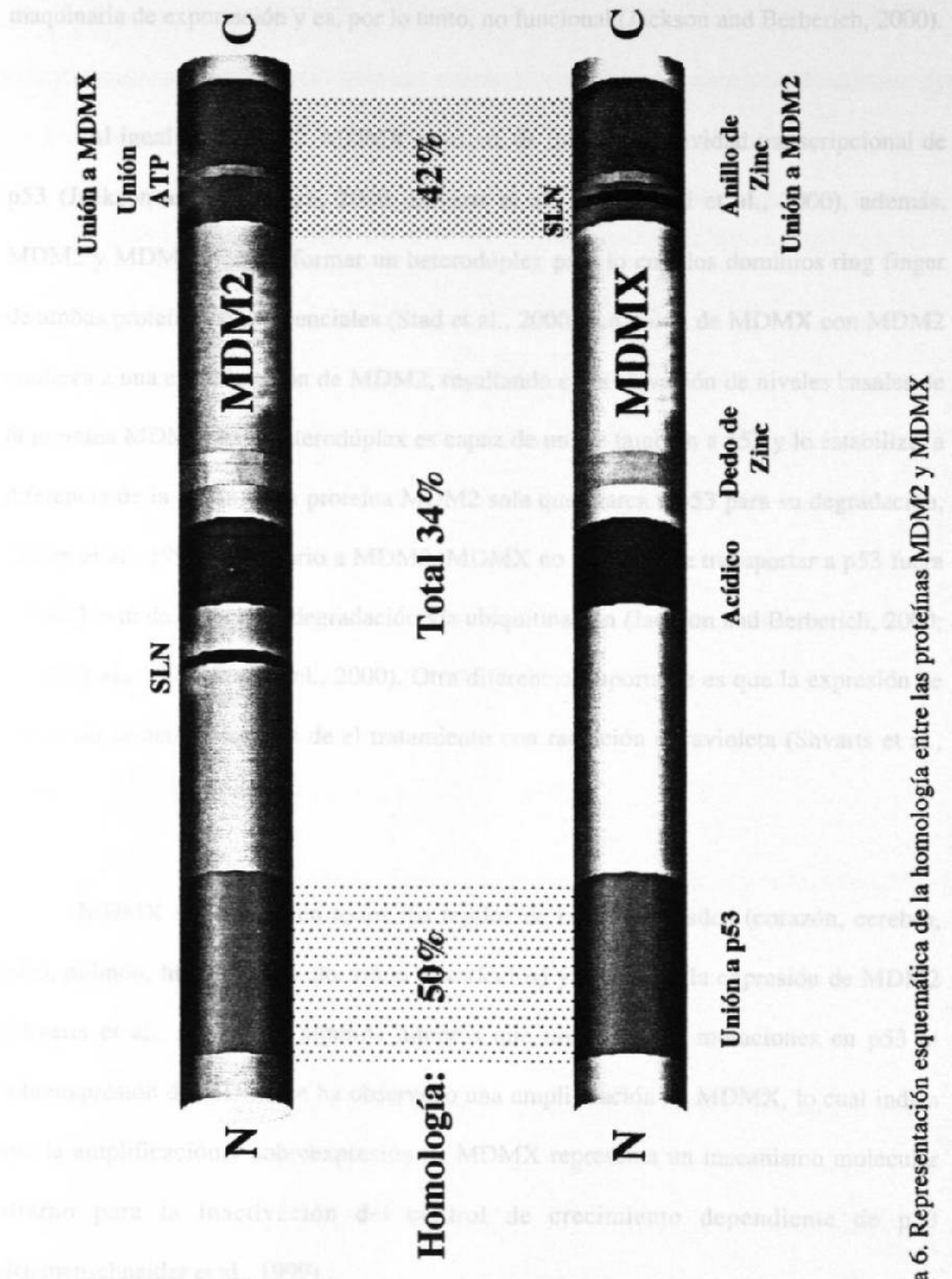


Figura 6. Representación esquemática de la homología entre las proteínas MDM2 y MDMX

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.

### **LcK (Lymphoid Cell Kinase)**

El gen *lck* codifica una tirosina kinasa específica de linfocitos conocida como p56<sup>lck</sup> (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).

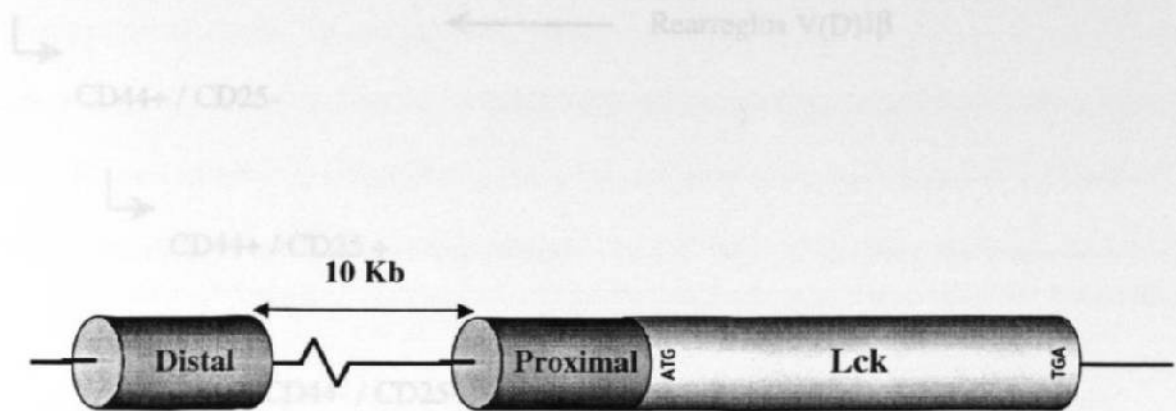
Varias líneas de células B humanas y murinas también contienen transcritos de *lck*, aunque algunas otras no. Al menos algunas poblaciones normales de células B contienen mRNA de *lck*. También algunos linfocitos granulares grandes, incluyendo la mayoría de las células con un fenotipo de células NK (natural 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).

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:

CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>-</sup> Doble Negativas (DN)



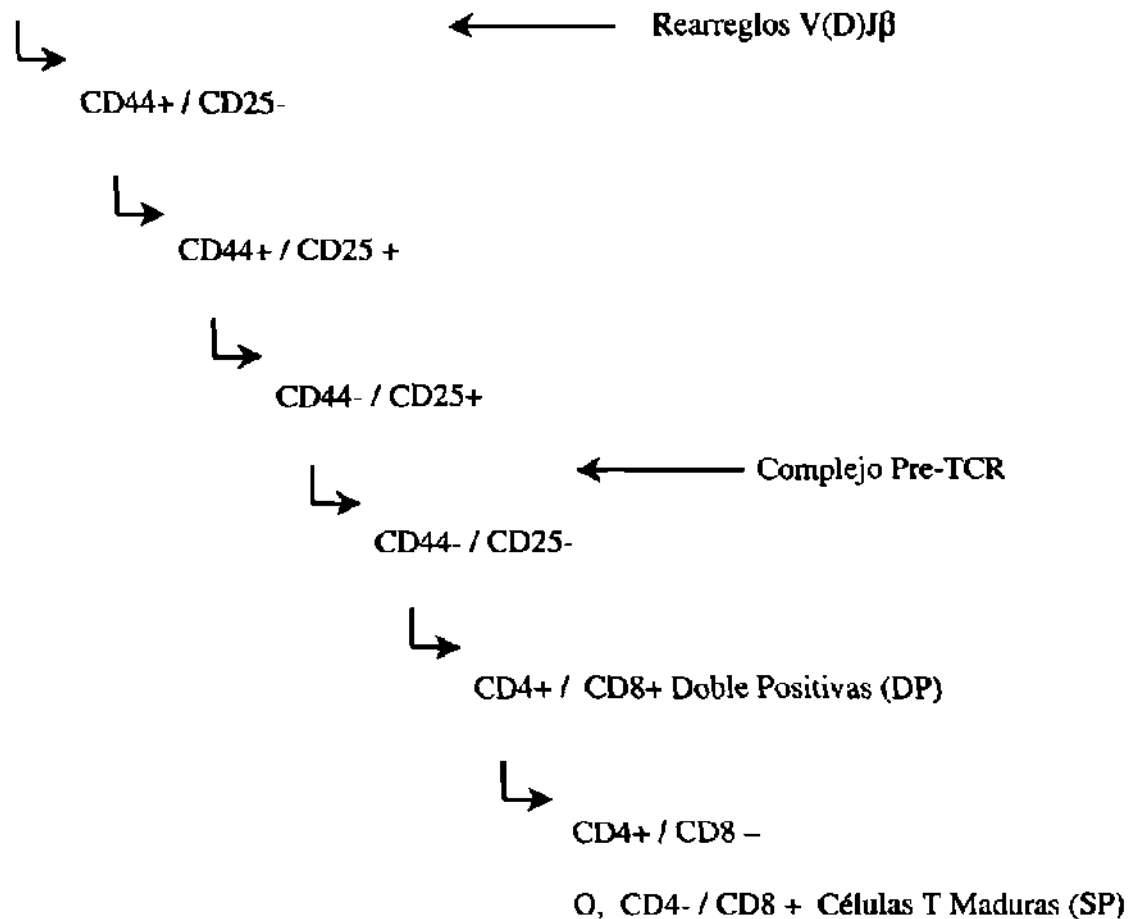
**5' o Distal**

**Proximal**

- ✓ Aprox. 10 Kb 5' del promotor proximal.
- ✓ Activa la expresión de Lck en timocitos y células T maduras.
- ✓ Adyacente al gen.
- ✓ Activa la expresión de Lck en timocitos.

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

CD4- / CD8- Doble Negativas (DN)



Encontrándose que la proteína está ausente en el estadio CD4+ / CD25+, pero más del 90% de las células CD44- / CD25+ y CD44- / CD25- lo expresan. Así también, mas del 90% de las células DP y SP son positivas para la expresión de p56<sup>lck</sup>. Además, alrededor del 60% de las células de los nódulos linfáticos periféricos y cerca del 30% de los esplenocitos expresan también la proteína p56<sup>lck</sup>. 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<sup>lck</sup>.



Aproximadamente 50% de las células NK y 70% de las células T  $\gamma\delta$  maduras contienen también la proteína p56<sup>lck</sup> (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 linfoide. 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.**

# **OBJETIVOS**

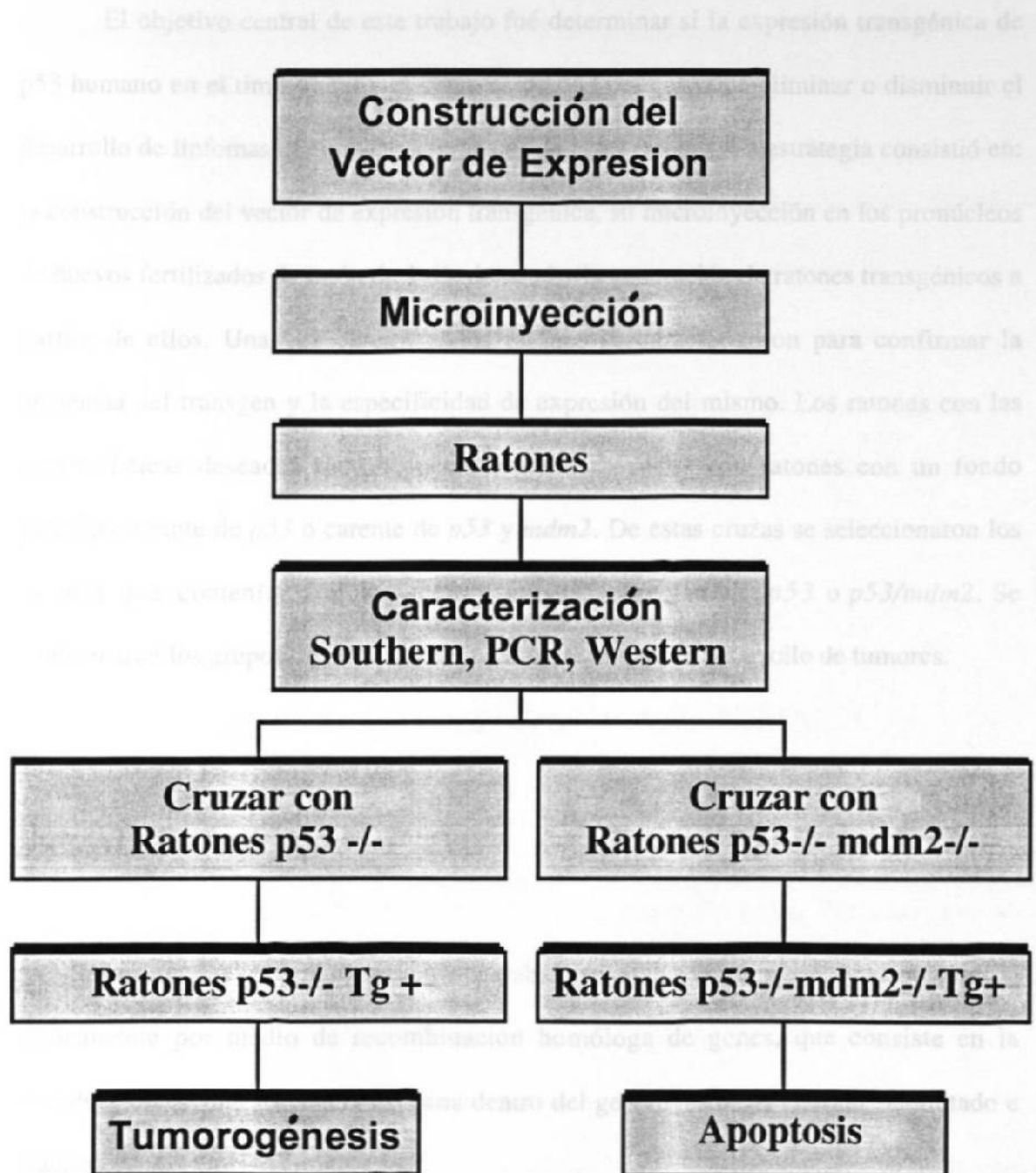
## **General**

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 cruzas 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 CD1 (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  $\beta$ -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 (QUIAGEN). 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:

- 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 1x10<sup>6</sup> 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':

P16: 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 CO<sub>2</sub> 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 fué 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 ( $\beta$ -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 Proteinasa K 20 µg/ml por 15 min a temperatura ambiente. Se les inactivaron las peroxidasas endógenas por exposición a una solución al 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 5-10 min a temperatura ambiente. Se incubaron con buffer TdT (Tris 30mM, Cacodilato de sodio 140mM, CoCl<sub>2</sub> 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.

### **TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA**

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 Permount (Fischer Scientific) y se cubren.

## **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).

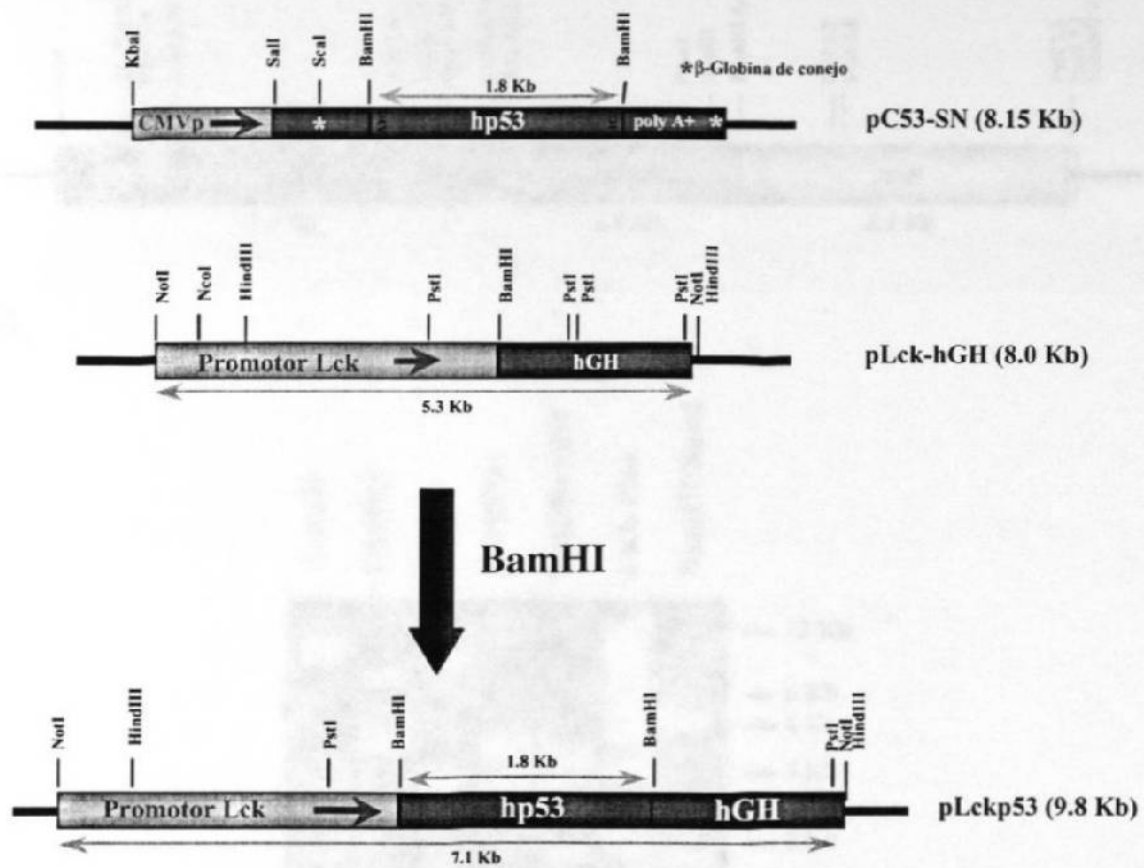
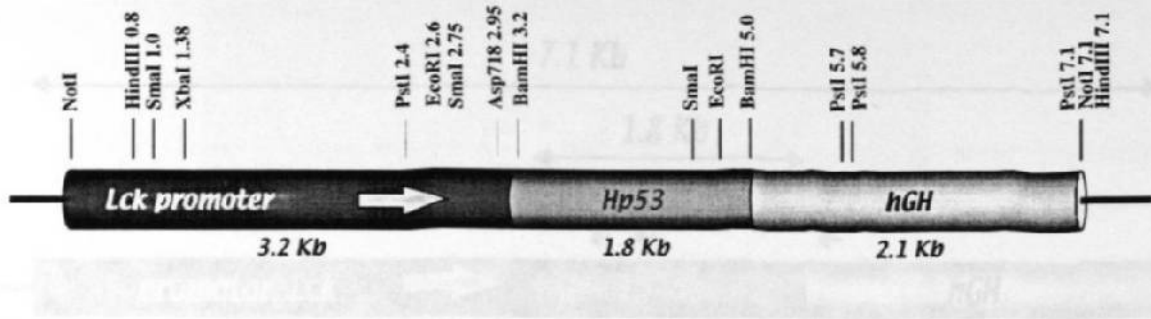


Figura 8. Construcción del cassette de expresión transgénica. LcK, Kinasa de células linfoides (lymphoid cell kinase). hp53, p53 humana. hGH, hormona del crecimiento humana.

A.



B.

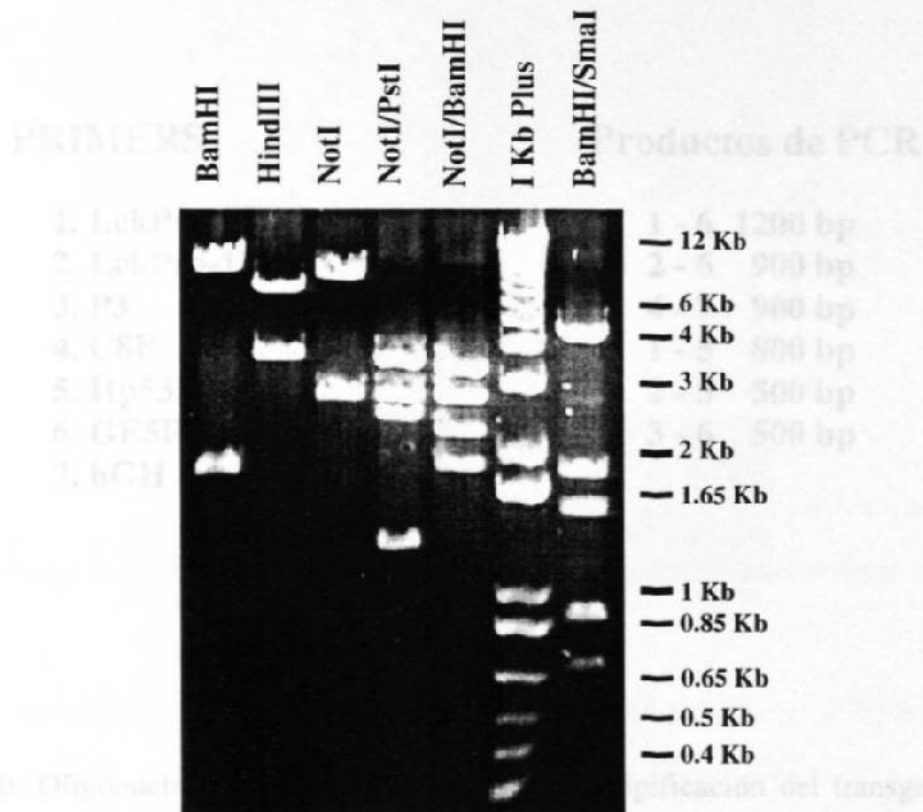


Figura 9. Caracterización del vector de expresión transgénica *pLcKHp53*. A, representación esquemática del mapa de restricción. B, Restricción del plásmido con las enzimas indicadas.

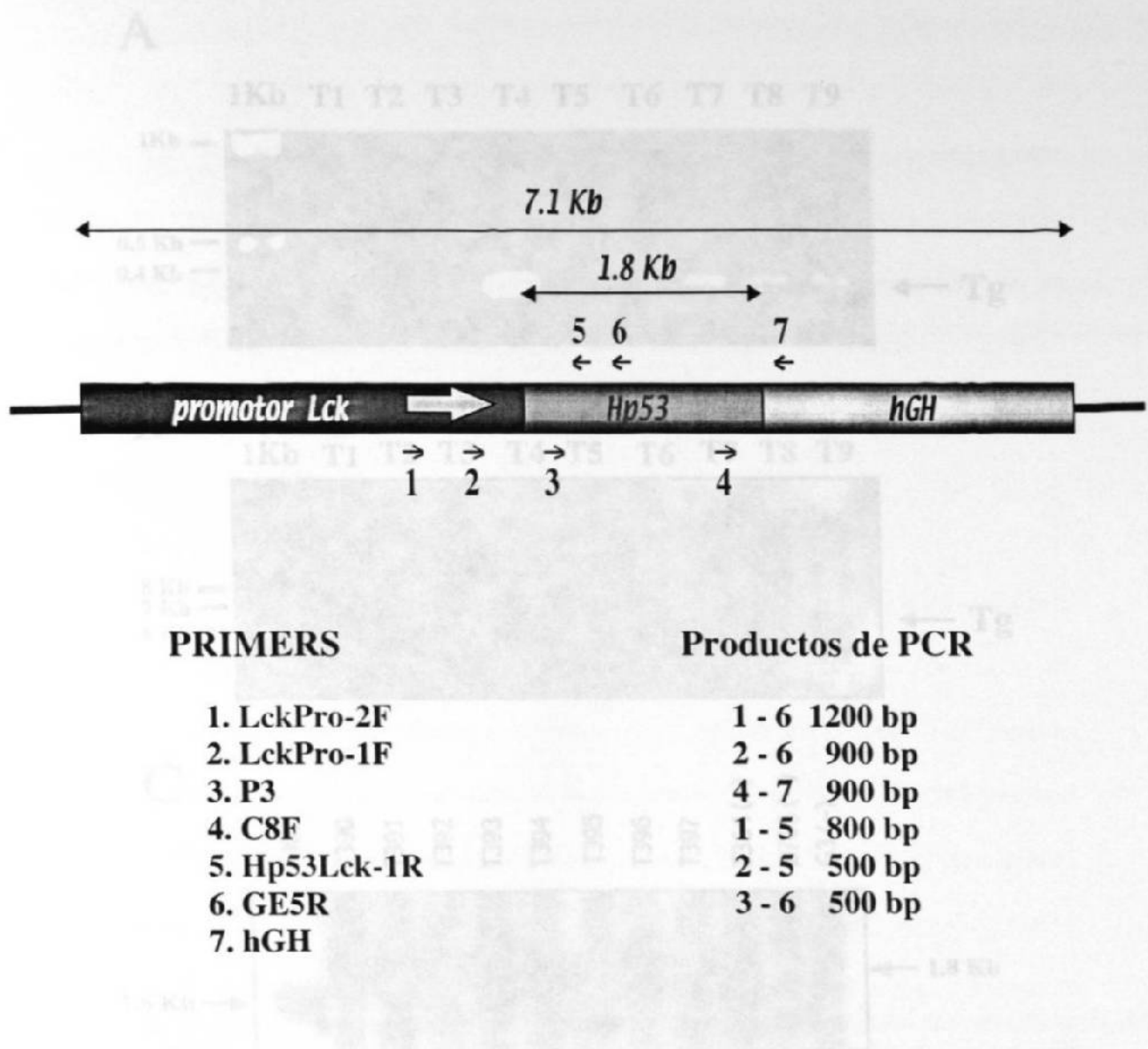


Figura 10. Oligonucleótidos iniciadores para la genotipificación del transgen. A la derecha se indican los tamaños de producto esperados con las diferentes combinaciones de oligos. En color rojo se muestran los oligos utilizados actualmente en la genotipificación de los ratones.

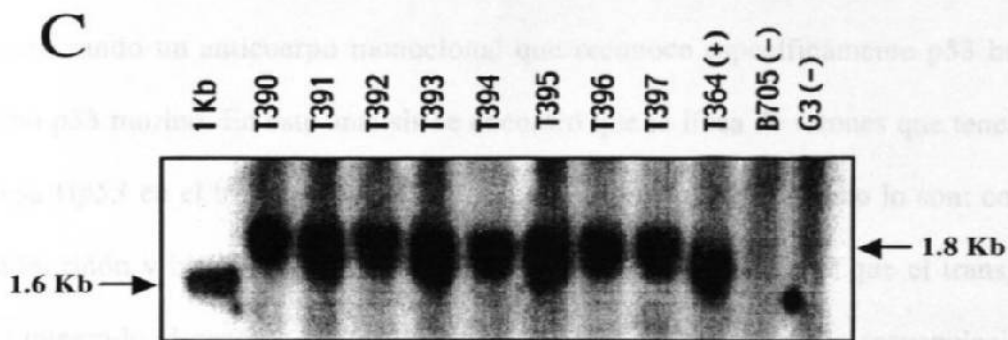
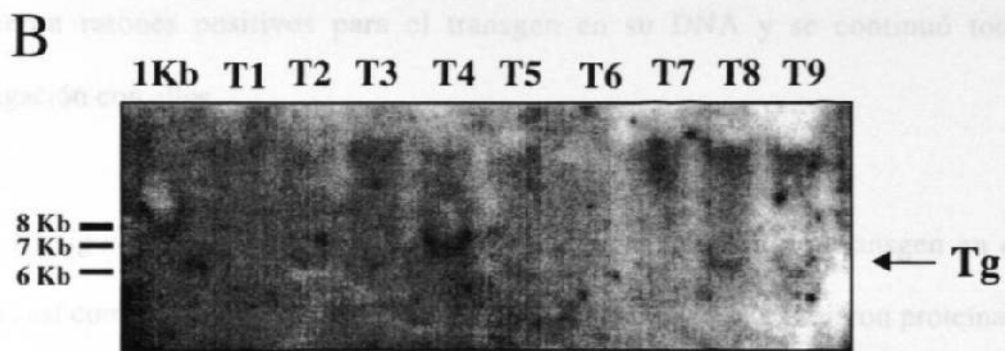
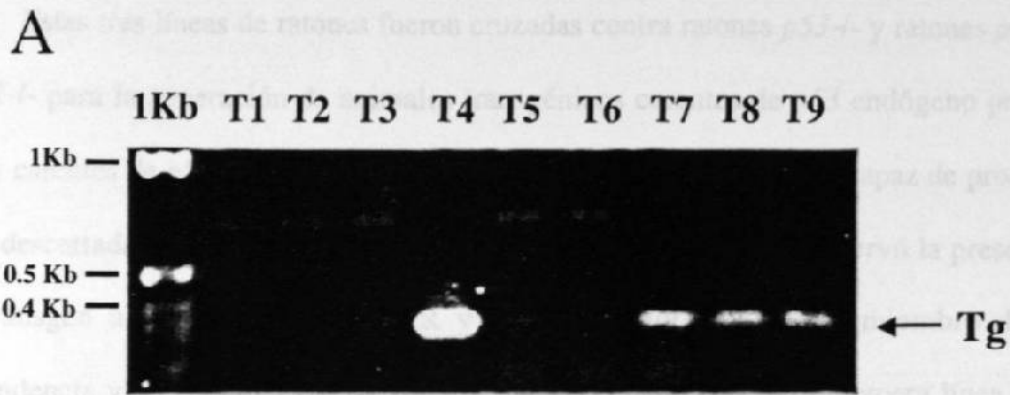


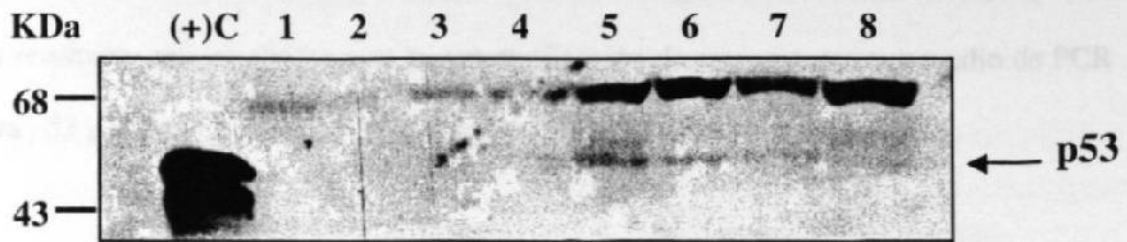
Figura 11. Genotipificación de los ratones obtenidos de la primera microinyección. A, Productos de PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores C5F y C7R. B, Análisis de Southern Blot de DNA genómico digerido con *SpeI* contra la sonda fragmento *BamHI* de *pLcKHp53*. C, Análisis de Southern Blot 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*<sup>-/-</sup> y ratones *p53*<sup>-/</sup>*mdm2*<sup>-/</sup> 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.

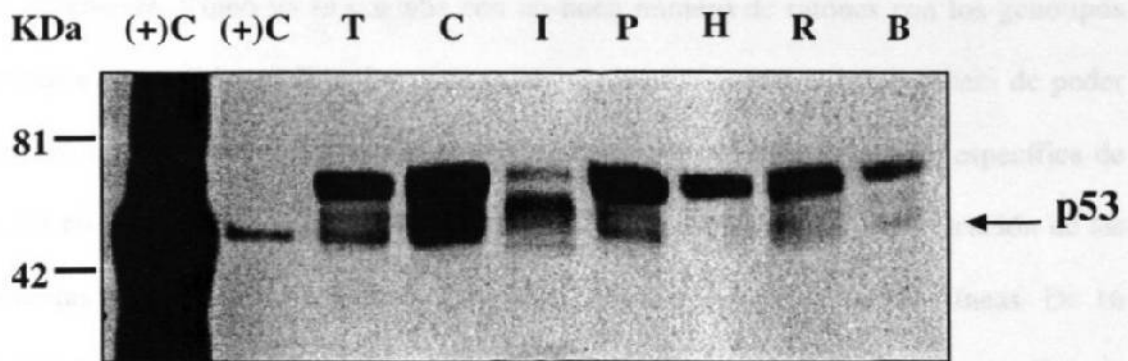


Figura 12. Determinación de la expresión del transgen en diferentes órganos de ratón por Western Blot. A. Western Blot de timos de varios ratones transgénicos sin exposición a radiación ionizante. 1 a 8 proteínas provenientes de diferentes ratones. La flecha indica la posición de la proteína p53. (+)C, 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*<sup>-/-</sup> y ratones *p53*<sup>-/-</sup>*mdm2*<sup>-/-</sup>, 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

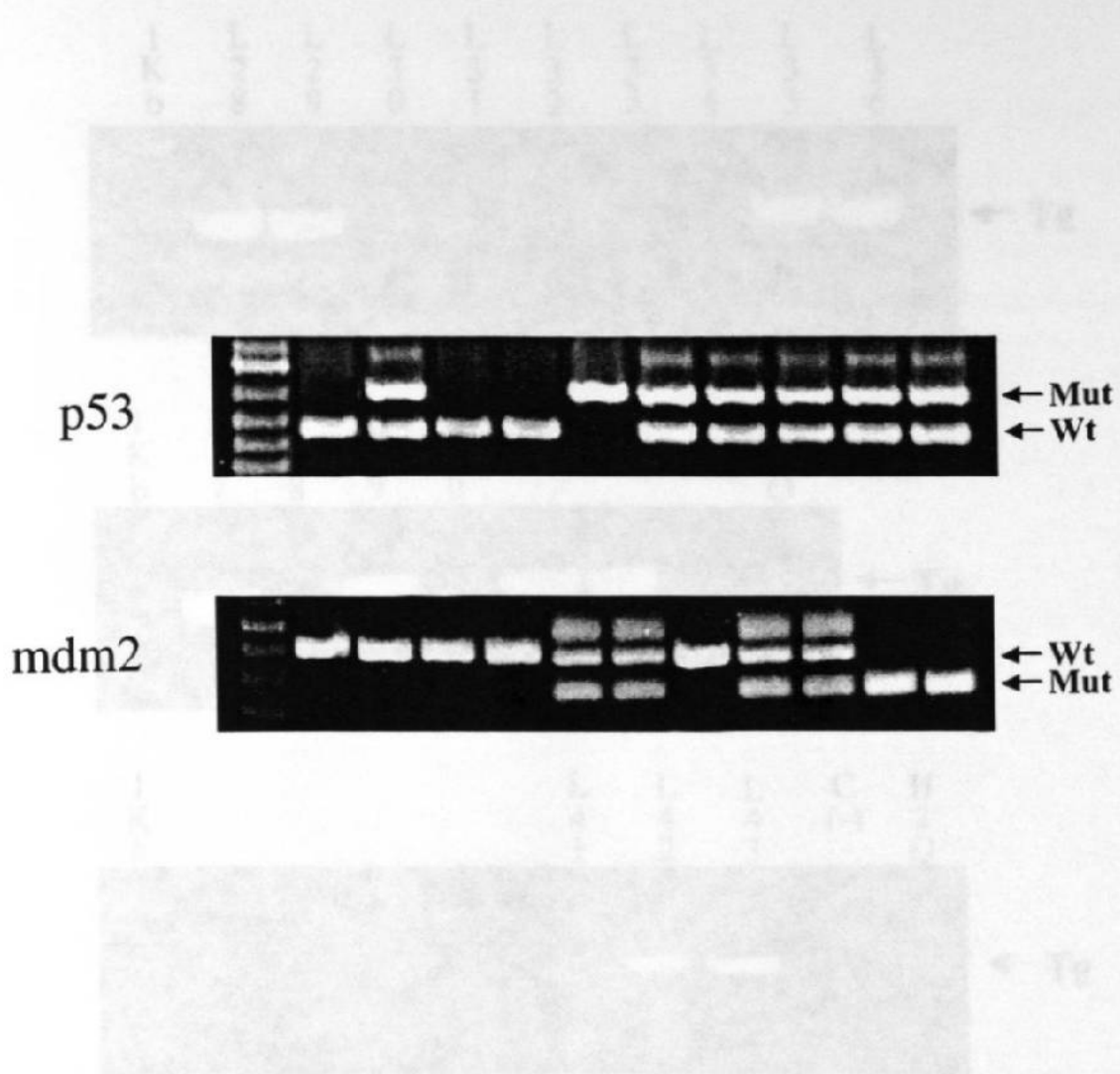


Figura 13. Genotipificación de los ratones por PCR. p53, Productos de PCR para el gen *p53*. mdm2, Productos de PCR para el gen *mdm2*. Wt, alelo wild type o silvestre; Mut, alelo mutante.

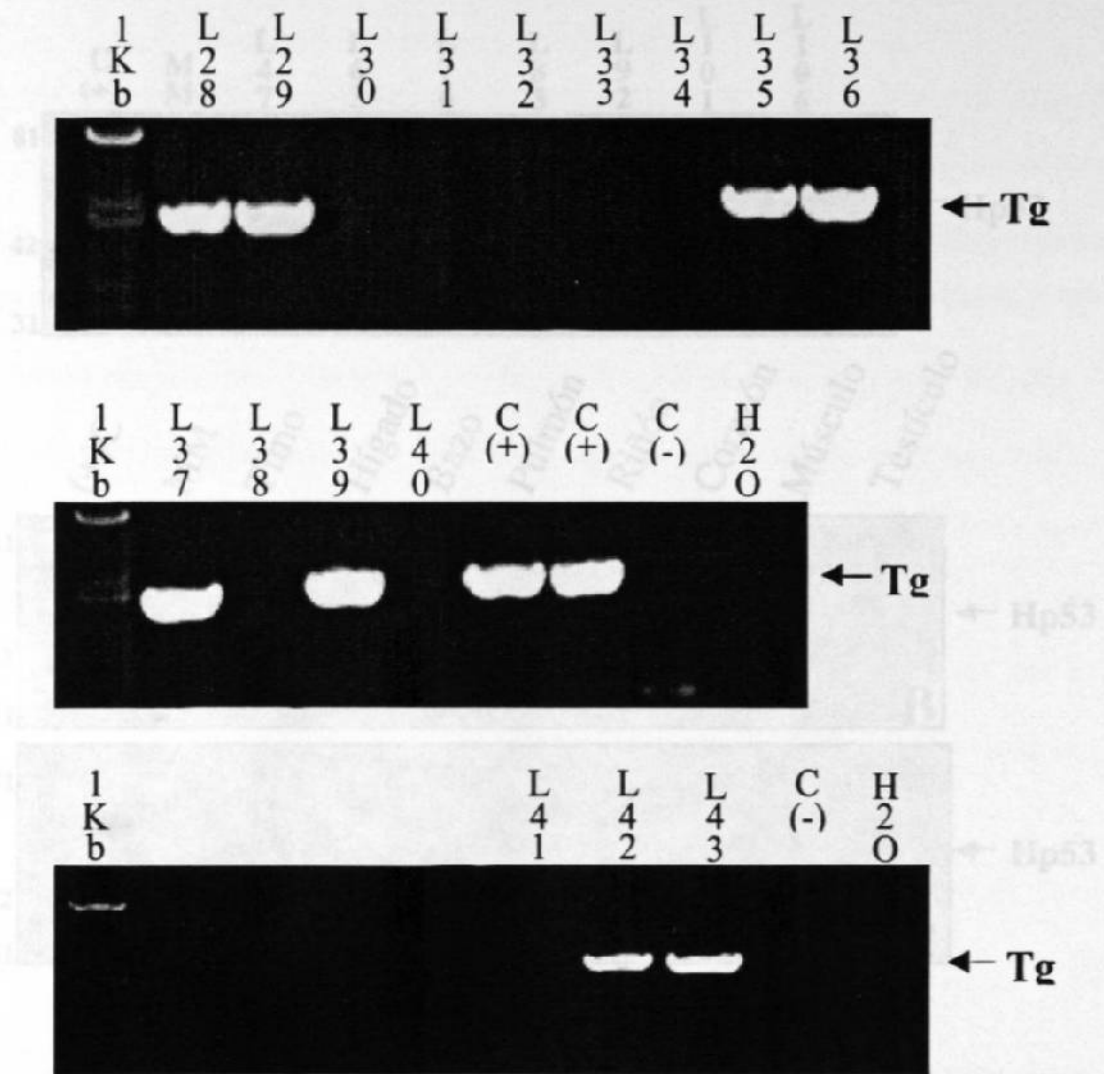


Figura 15. Caracterización de las nuevas líneas de ratones transgénicos. A, análisis de Western Blot en tiras de los ratones positivos por PCR. B, análisis de Western Blot en tiras de los ratones positivos por PCR. C, análisis de Western Blot en tiras de los ratones positivos por PCR. Genotipificación 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; H<sub>2</sub>O, control negativo sin DNA.

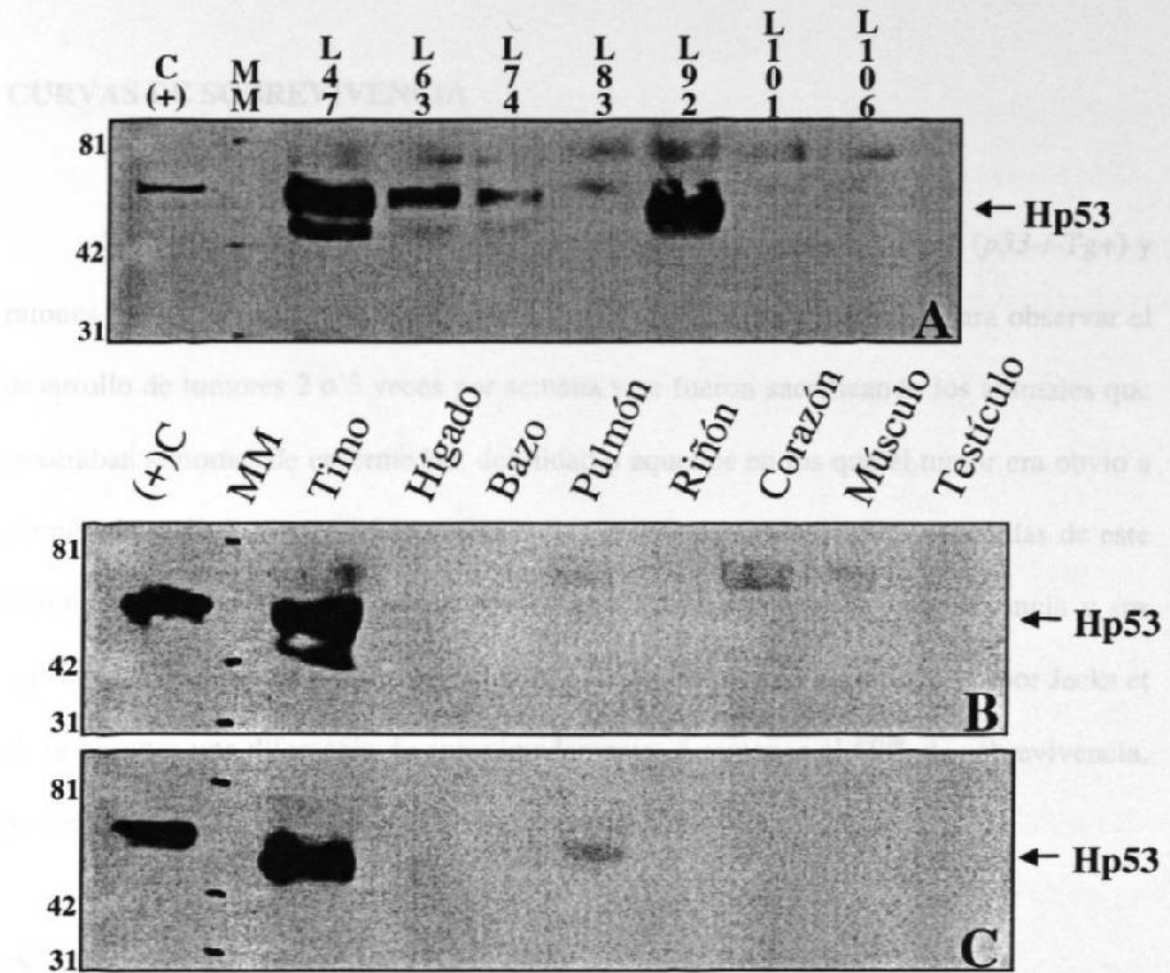


Figura 15. Caracterización de las nuevas líneas de ratones transgénicos. A, análisis de Western Blot en timos de los ratones positivos por PCR. B, análisis de Western Blot en diferentes órganos del ratón L47 para determinar la especificidad de expresión. C, análisis de Western Blot en diferentes órganos 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 sobrevivencia obtenidas de este estudio. Ambos grupos de ratones presentan el mismo patrón de sobrevivencia 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 sobrevivencia, 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

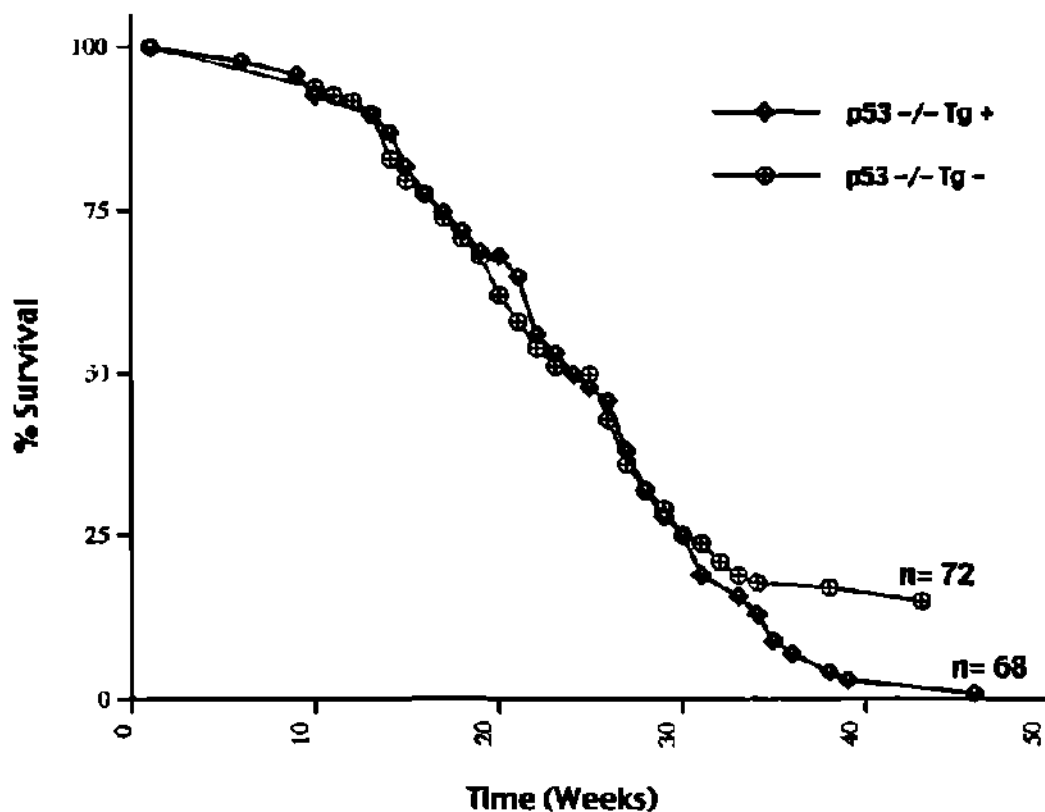


Figura 16. Comparación de las curvas de supervivencia de los ratones carentes de *p53* positivos (Tg+) y negativos (Tg-) para el transgen. N, tamaño de la muestra. Time, tiempo en semanas. % Survival, porcentaje de supervivencia.

respecto al grupo *p53<sup>-/-</sup>Tg<sup>-</sup>*, 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 fué 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<sup>-/-</sup>Tg<sup>+</sup>* 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 fué 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<sup>-/-</sup>mdm2<sup>-/-</sup> Tg<sup>+</sup>***

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<sup>-/-</sup>* 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



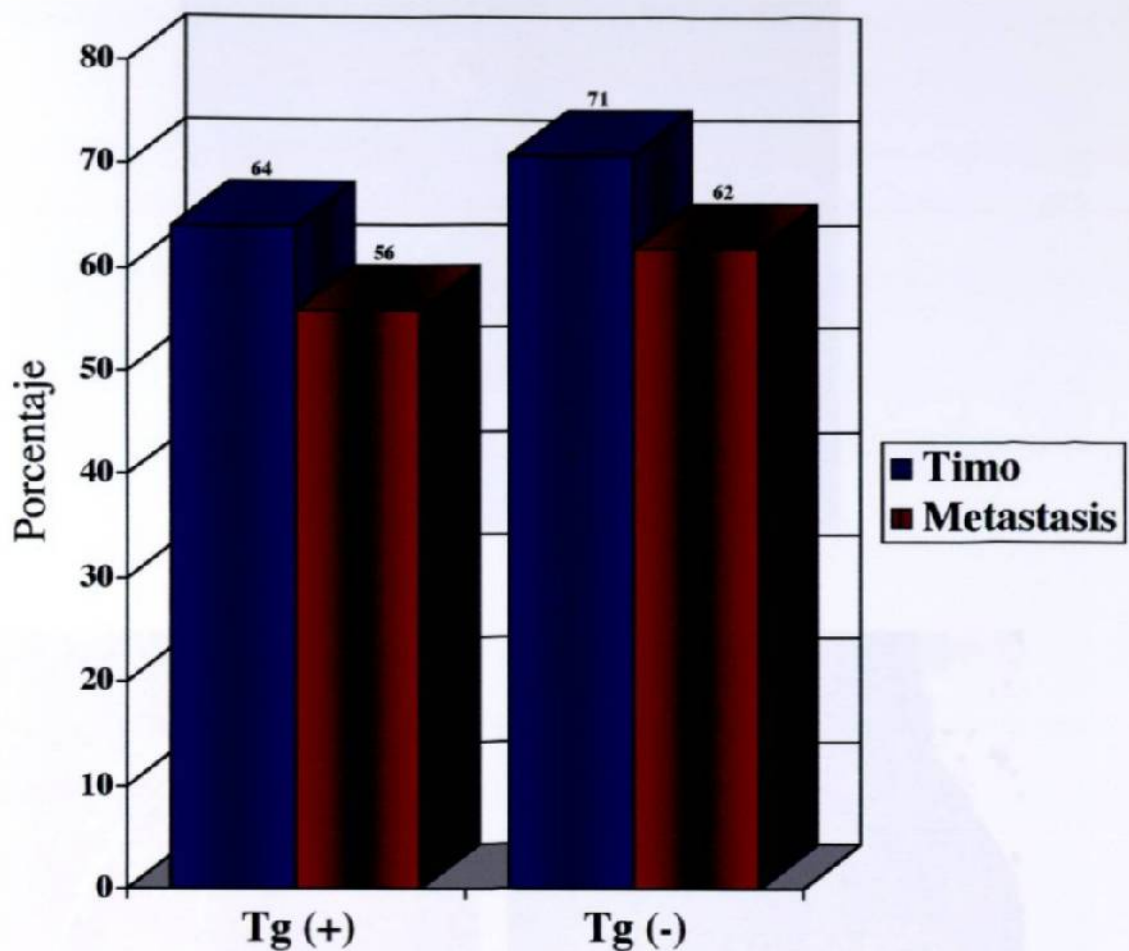
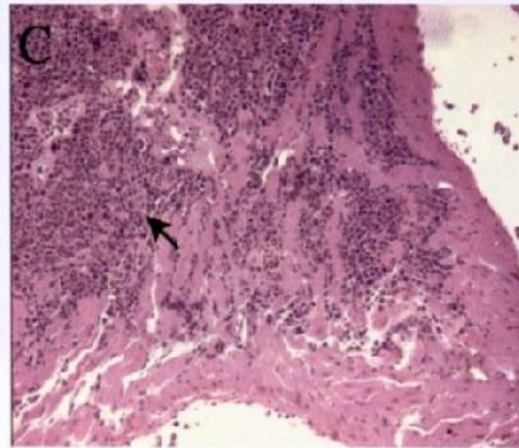
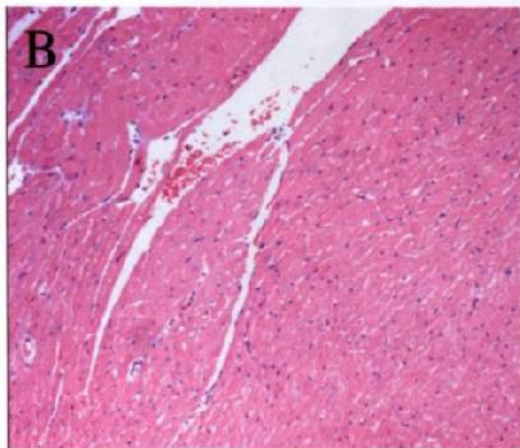
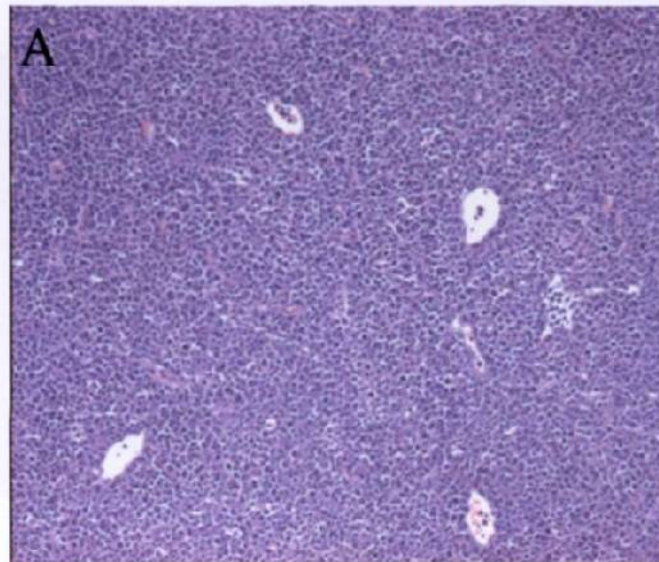


Figura 17. Incidencia de linfomas de Timo. Tg (+) es el grupo de ratones *p53*<sup>-/-</sup> positivos para el transgen. Tg(-) es el grupo de ratones *p53*<sup>-/-</sup> negativos para el transgen. Las barras azules indican el porcentaje de animales que desarrollaron linfoma de timo y las barras rojas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



*Histopatología del Linfoma de Timo y su diseminación 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.

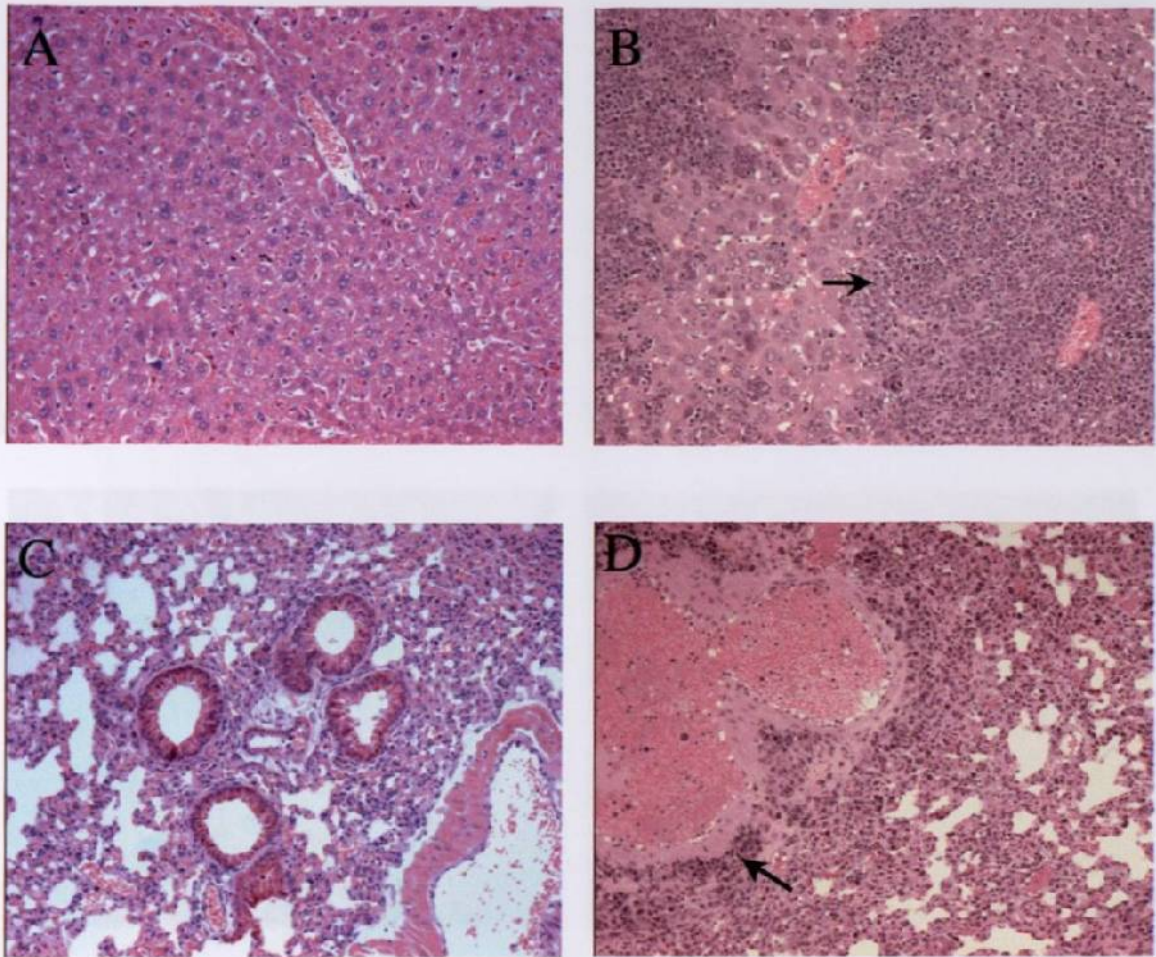


Figura 18B. Histopatología del linfoma de Timo y su diseminación a otros tejidos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Hígado normal. B, Hígado invadido. C, Pulmón normal. D, Pulmón invadido. Las flechas indican el lugar en donde se localiza el tumor invasor.

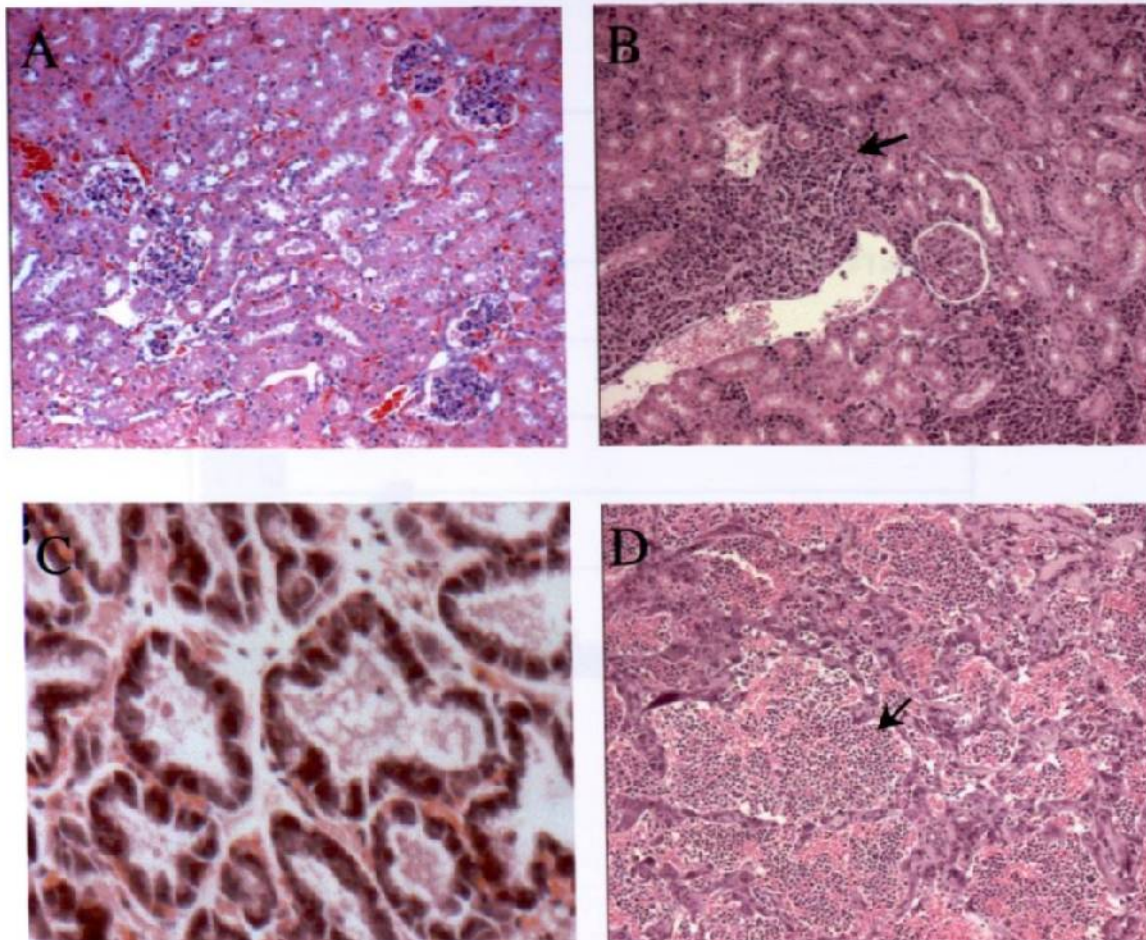


Figura 18C. Histopatología del linfoma de Timo y su diseminación a otros tejidos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Riñón normal. B, Riñón invadido. C, Glándula mamaria normal. D, Glándula mamaria invadida. Las flechas indican el lugar en donde se localiza el tumor invasor.