

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

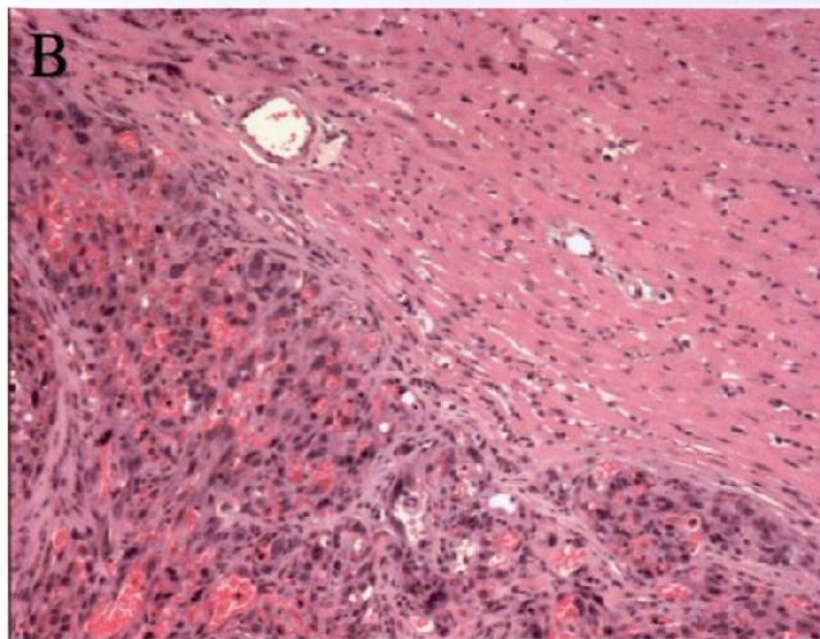
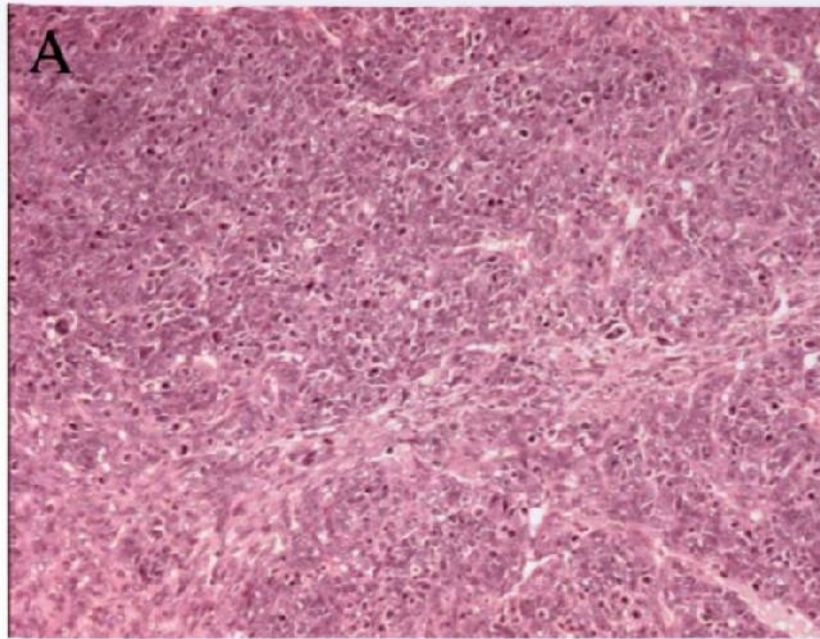


Figura 20A. Histopatología de otro tipo de tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Hemangiosarcoma. B, Retinoblastoma. 200X.



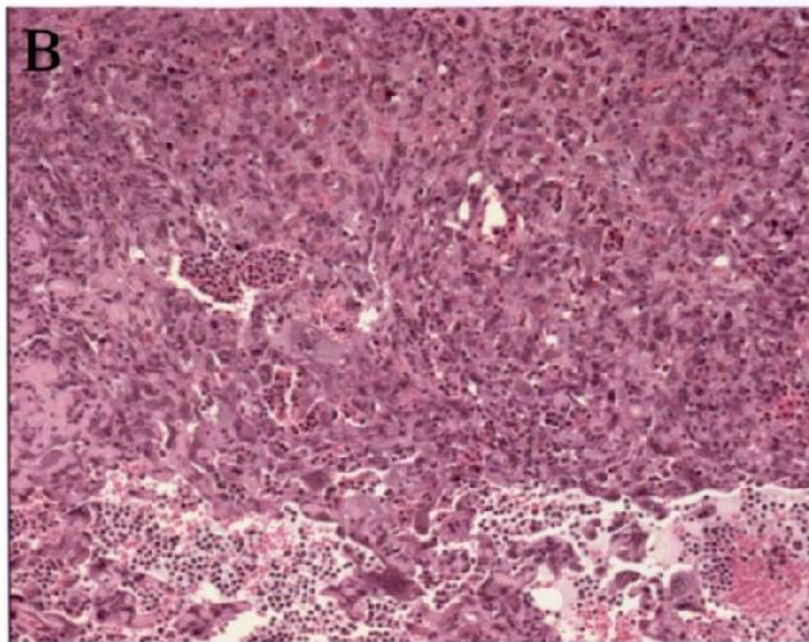
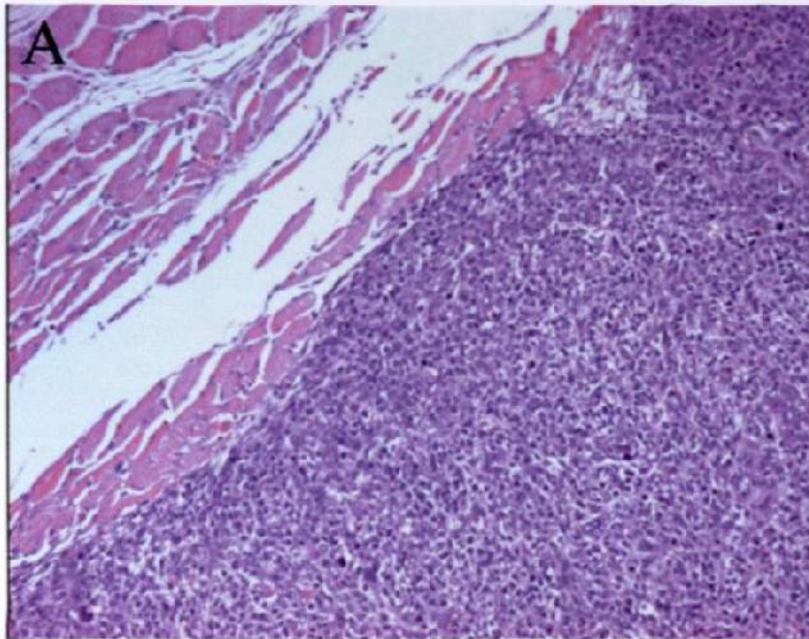


Figura 20B. Histopatología de otros tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Sarcoma. B, Hemangiosarcoma de glándula mamaria. 200X.

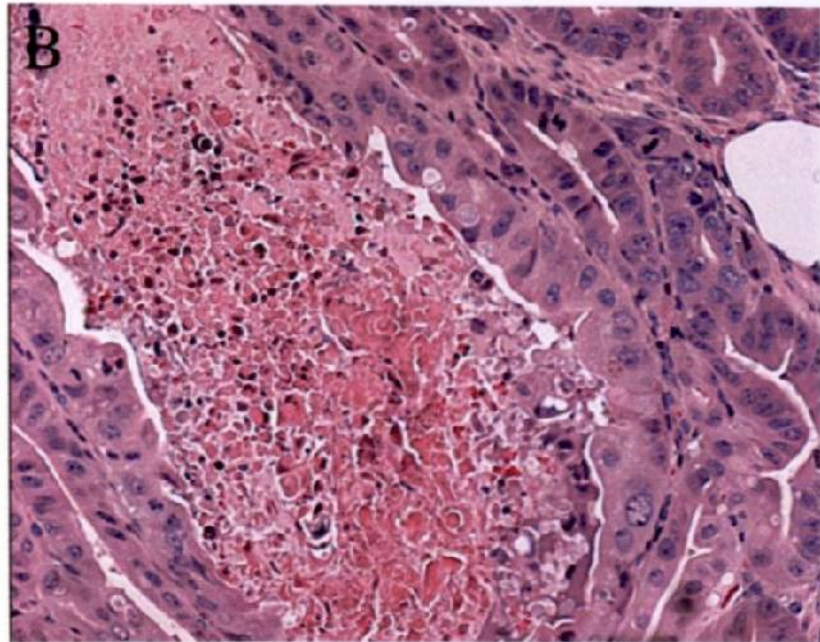
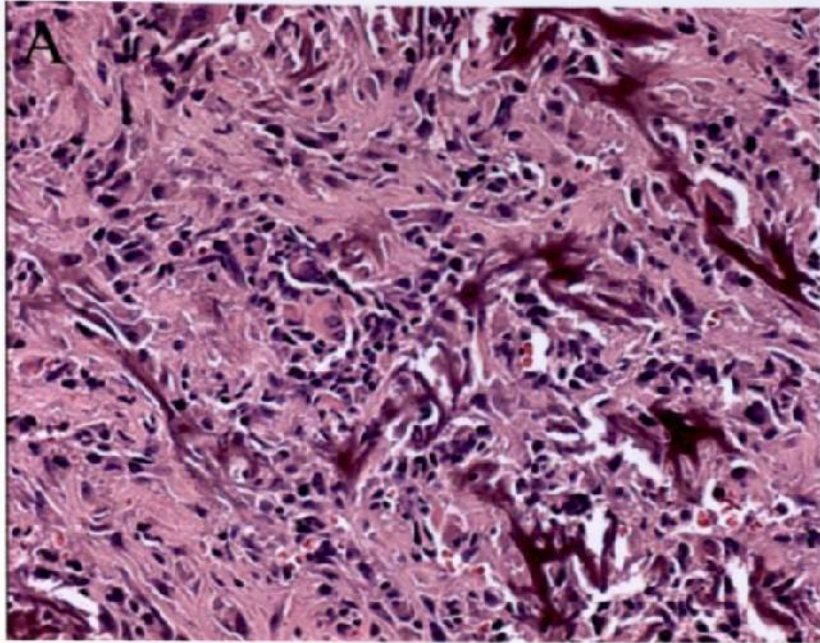


Figura 20C. Histopatología de otros tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Osteosarcoma. B, Adenocarcinoma. 200X.



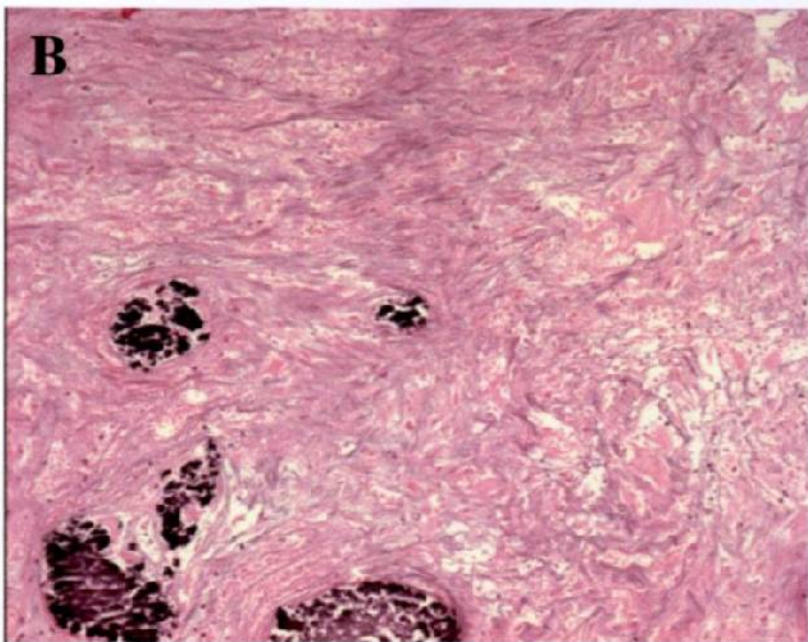
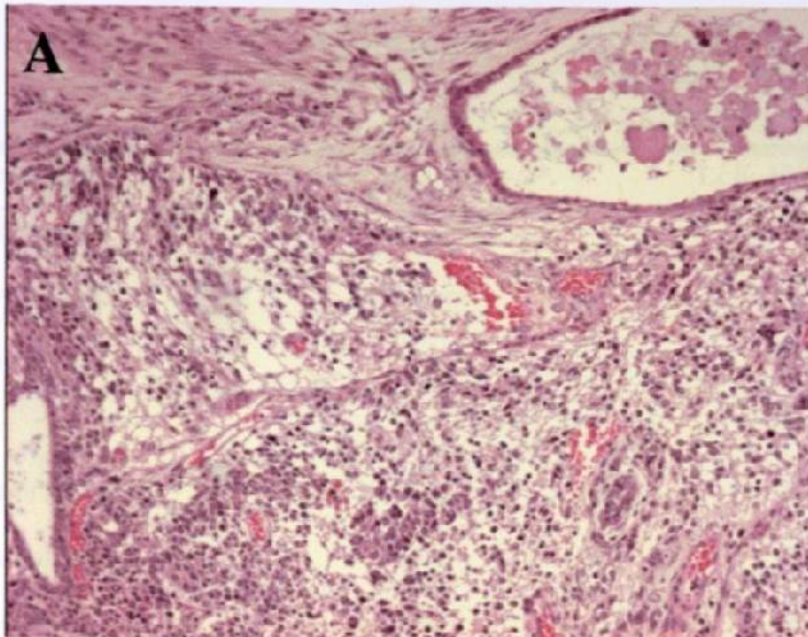


Figura 20D. Histopatología de otros tumores encontrados en los ratones transgénicos. Tinción de hematoxilina y eosina. Diferentes áreas de un teratoma mostrando compartimentos tipo hemático (A) y tipo osteoide (B). 200X.

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

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

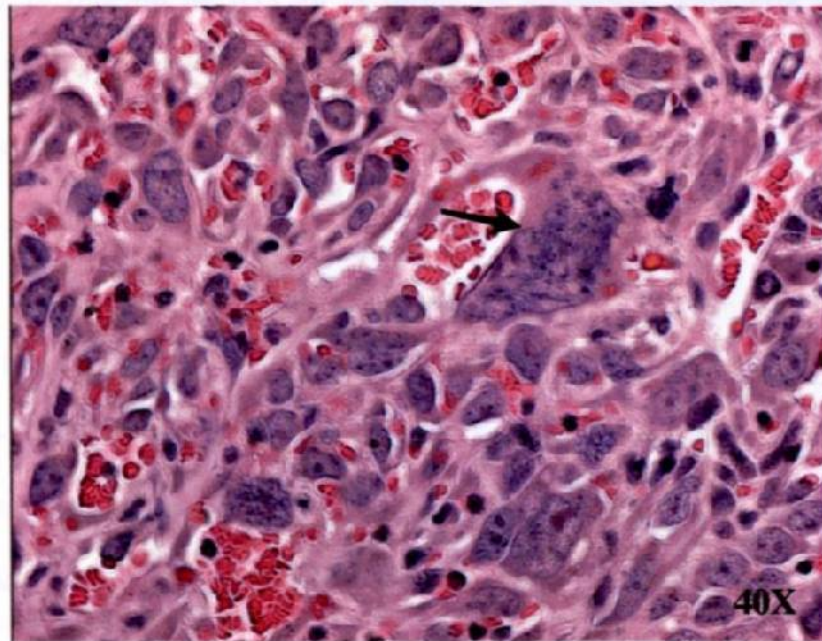
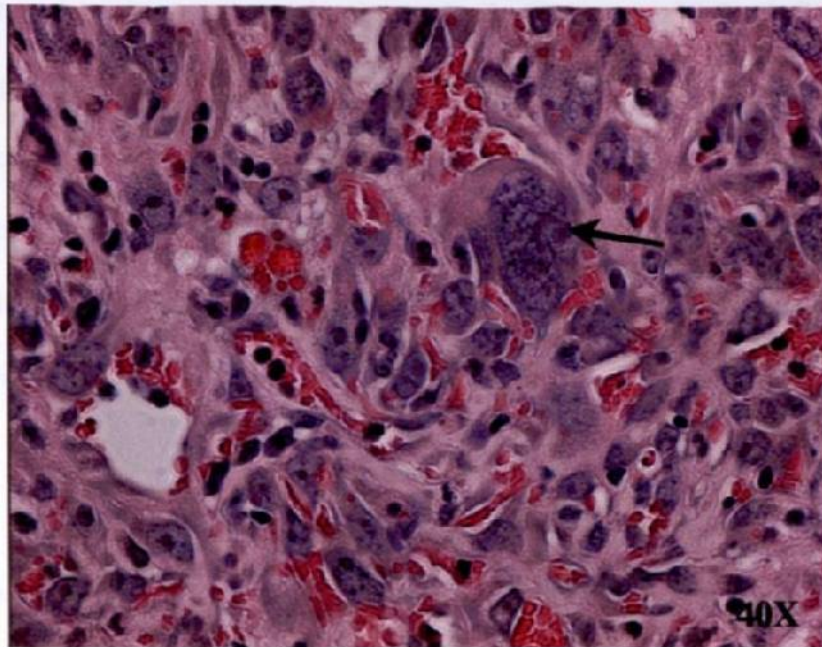


Figura 21. Hemangiosarcoma de células gigantes. Tinción de hematoxilina y eosina. Las flechas muestran la localización de las células gigantes. 400X.



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

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

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



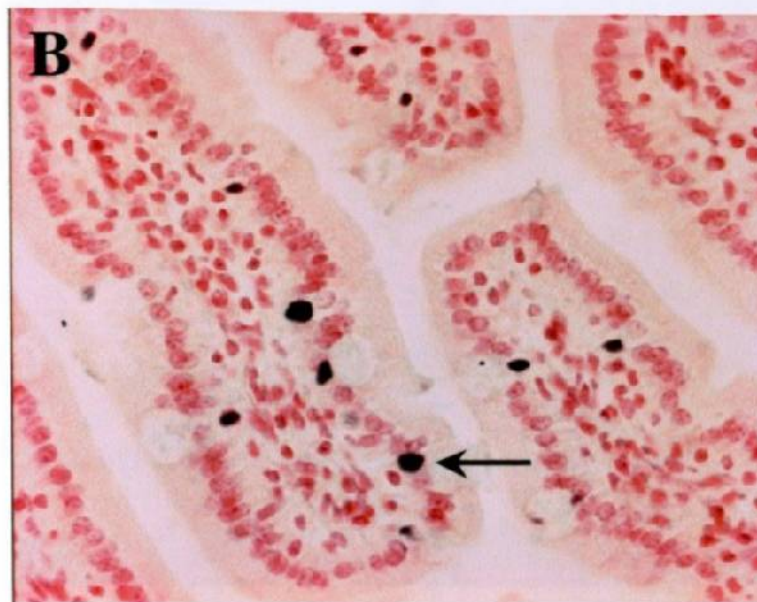
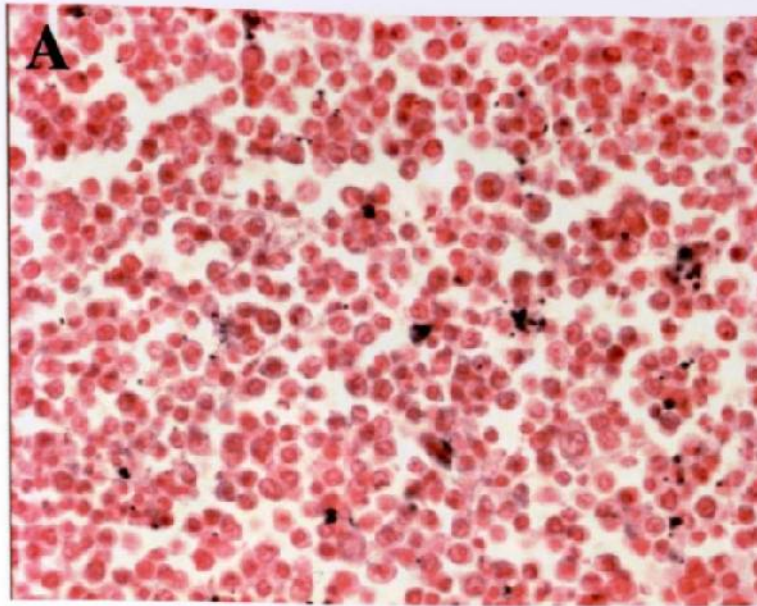


Figura 22. Análisis de TUNEL para la determinación de apoptosis. Tinción de contraste con Nuclear Red Fast. A, Linfoma de timo proveniente de un ratón *p53-/-mdm2-/-* positivo para el transgen. B, Control positivo, intestino de ratón silvestre. La flecha indica el lugar en donde se localiza una célula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

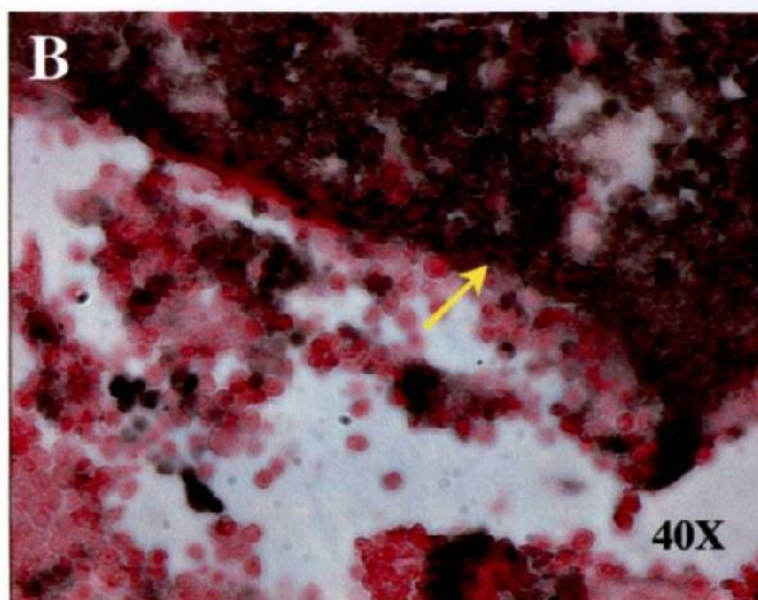
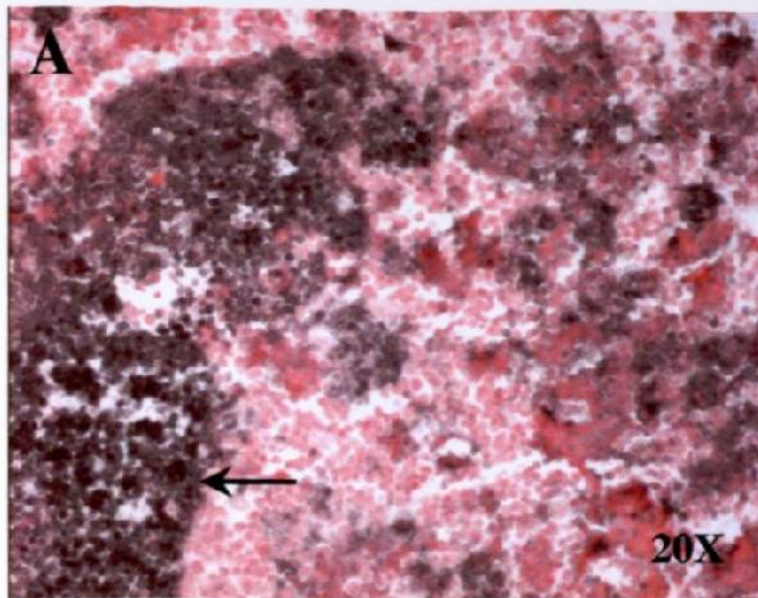


Figura 23. Tinción inmunohistoquímica de un linfoma de timo proveniente de un ratón *mdm2-/- p53-/-* positivo para el transgen. A. Tinción con al anticuerpo monoclonal específico para p53 humano Bp53-12, 200 amplificaciones. B, Mismo tejido aumentado 400 amplificaciones. Las flechas indican el área positiva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



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

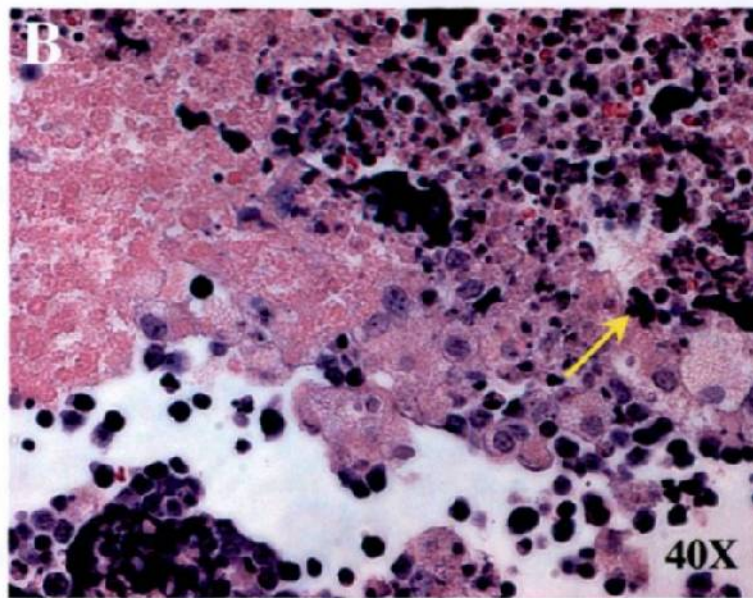
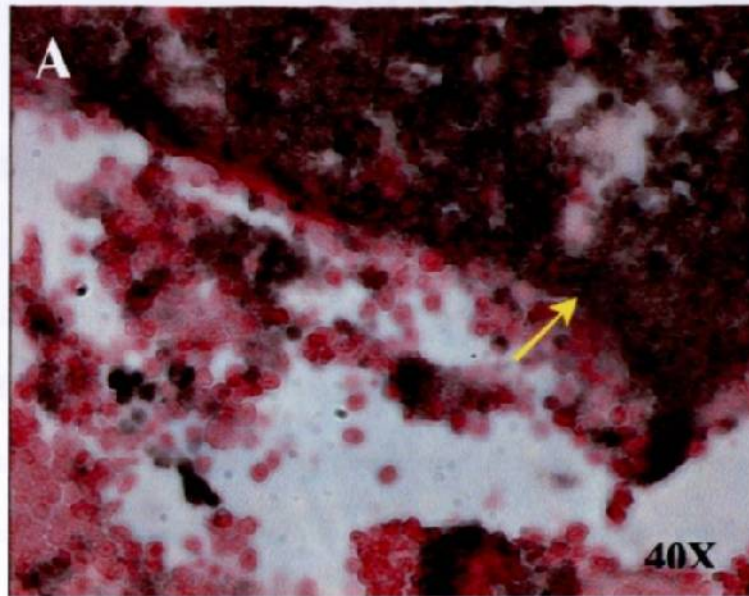


Figura 24. Tinción inmunohistoquímica de un linfoma de timo proveniente de un ratón *mdm2-/- p53-/-* positivo para el transgen. A. Tinción con el anticuerpo monoclonal específico para p53 humano Bp53-12, 400 ampliificaciones. B, Tinción de hematoxilina y eosina del mismo tejido aumentado 400 ampliificaciones.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



## DISCUSION

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

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

En el presente trabajo se hizo uso de los ratones transgénicos y de modelos murinos con genes inactivados, para tratar de elucidar una parte más de las vías del gen supresor de tumores *p53*. Las alteraciones en *p53* se encuentran entre los eventos moleculares más frecuentemente encontrados en neoplasias, tanto en animales como en humanos (Greenblatt et al., 1994; Hainaut et al., 1998). En condiciones fisiológicas, en células normales, la proteína *p53* se expresa a niveles muy bajos y tiene una vida media muy corta. Bajo el efecto de numerosos factores, tales como daño al DNA, hipoxia, hiperoxia, hipoglicemia, carencia de nucleótidos y activación de oncogenes, *p53* se estabiliza y se activa (el-Deiry, 1998). Las respuestas que esto puede desencadenar son: inhibición del ciclo celular en la fase G1 o G2, apoptosis, envejecimiento celular, diferenciación, reparación del DNA y antiangiogénesis (El-Deiry, 1998). Estas respuestas son mediadas por diferentes genes blanco de *p53*. *mdm2* es un regulador negativo de *p53* (Kubbutat et al., 1997) que cuando se une a él, bloquea su función como activador transcripcional e induce su degradación (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1998). *p21-WAF1* es activado por *p53* a través de sus dos elementos de respuesta en el promotor (el-Deiry et al., 1993; el-Deiry et al., 1995), inhibiendo CDKs y produciendo así un arresto del ciclo celular en la fase G1. *bax* es un gen blanco de *p53* cuya expresión es incrementada a través de un elemento de respuesta a *p53* en su promotor (Miyashita and Reed, 1995) y produce inducción de apoptosis a nivel de liberación de citocromo C de la mitocondria (Rosse et al., 1998).

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



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

La delección de *mdm2* en ratones produce letalidad embrionaria entre los 3.5 y 5.5 días de gestación (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). La ausencia simultánea de *p53* rescata este fenotipo, demostrando que la letalidad es causada por una actividad desregulada de *p53*. Esto ha traído como consecuencia que no haya sido posible estudiar los efectos de *p53* en un tejido adulto en ausencia de MDM2. Se especula que MDM2 es igual de importante en la regulación de la actividad de *p53* en los tejidos de un animal adulto, como lo es durante su desarrollo embrionario. Sin embargo, no existen modelos animales que logren aclarar este punto.

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

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

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

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

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

La obtención de ratones *p53*<sup>-/-</sup>*Tg*<sup>+</sup> nos permitió comparar su sobrevivencia e incidencia de tumores con los observados en los ratones *p53*<sup>-/-</sup> (Jacks et al., 1994). Las curvas de sobrevivencia no muestran diferencias entre estos dos modelos. Esto nos indica que la presencia del transgen no tiene efectos significativos en el desarrollo y sobrevivencia de los ratones. La disminución que se observó en la incidencia de linfomas de timo (71% a 64%) en nuestros ratones transgénicos sugiere que la presencia de *p53* humano tuvo un efecto positivo en contra del desarrollo de linfomas de timo en los ratones *p53*<sup>-/-</sup>. Es probable que la razón de que los linfomas de timo no se hayan eliminado completamente en nuestros ratones sean los bajos niveles de expresión del transgen. Esto a su vez puede ser el resultado de la inserción de una sola copia del transgen al genoma de los ratones. Esto se correlacionaría de alguna manera con lo observado en los pacientes de síndrome Li-Fraumeni (LFS), los cuales tienen mutaciones en uno de los alelos de *p53* en línea germinal. Este hecho los hace muy propensos al desarrollo de tumores, ya que solamente se requiere la mutación del otro alelo para inactivar a *p53* (Evans and Lozano, 1997). Puede ser que algo similar esté ocurriendo en este modelo. Al tener bajo número de copias del transgen en el genoma es más fácil inactivarlas que teniendo múltiples copias del mismo. Esta posibilidad podrá ser revisada al repetir los experimentos con las nuevas líneas de transgénicos que tienen un nivel de expresión más elevada y por lo tanto que es muy probable que contengan múltiples copias del transgen insertadas en el genoma.



También es posible que la presencia de p53 transgénico no lograra modificar grandemente el fenotipo de linfomas debido a la presencia de mdm2, su principal regulador negativo. Si p53 se expresa en niveles bajos y es aún capaz de activar la expresión de mdm2, entonces la presencia de mdm2 podría inactivar las funciones de p53 por alguna de las vías descritas anteriormente: exclusión nuclear (Tao and Levine, 1999), inhibición transcripcional (Barak et al., 1993; Momand et al., 1992) y ubiquitinación (Honda et al., 1997). Cualquiera de estos eventos produciría un ambiente equivalente al presentado en los ratones *p53*<sup>-/-</sup> y por lo tanto fenotipos similares. Sin embargo, al ser *mdm2* un gen blanco de p53, no se esperaría que se expresara en grandes cantidades si p53 no se activa y normalmente se considera que MDM2 debe estar sobreexpresado para que sea capaz de inactivar a p53. En este contexto podrían entonces jugar un papel importante otras moléculas capaces de regular a p53 y que no son activadas transcripcionalmente por él, como es el caso de MDMX (Shvarts et al., 1996). Existen tumores en los que p53 no presenta mutaciones y MDM2 no se encuentra sobreexpresado, pero MDMX está amplificado, lo cual indica que la sobreexpresión de MDMX puede representar un mecanismo alternativo para la inactivación de p53 (Riemenschneider et al., 1999). Esto podría ser analizado por análisis inmunohistoquímicos de los tumores, pero al momento no es posible ya que aún no existen anticuerpos específicos para MDMX que den buenos resultados en este tipo de experimentos.

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

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

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

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

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



*mdm2* y este es entonces el encargado de dicha regulación. Otra posibilidad era que p53 no se estuviera expresando en dichos tumores. Para analizar esto se sometieron los tumores a tinciones inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal específico para p53 humano. Se encontró una fuerte tinción en una área bien delimitada de uno de los tumores (figura 23), mientras que todos los demás fueron negativos. Como esta área del tumor también había sido teñida para la detección de apoptosis y era negativa, no era lógico que p53 estuviera en tan alta concentración y no estuviera induciendo apoptosis. Se volvió a revisar el tumor por parte de los patólogos y se encontró que el área con tinción positiva para p53 era una zona necrótica (figura 24). Cuando se tiñeron otras muestras con necrosis se encontró que el anticuerpo presenta reacción cruzada con algún elemento involucrados en la vía de necrosis que no es p53. También era posible que p53 sí se estuviera expresando en alta concentración y aún fuera incapaz de inducir apoptosis, el punto crucial en este modelos sería la presencia de mutaciones en p53. Para eliminar esta posibilidad se realizó una secuenciación del transgen integrado al genoma del ratón y solo se encontró una mutación puntual pero que es silenciosa. Otro dato que indica que p53 se mantiene silvestre es que esta línea de ratones lo expresa en muy bajos niveles en condiciones normales, pero al ser sometidos a radiación ionizante p53 se estabiliza y puede ser detectada en Western Blots. Esta es una característica típica de la proteína p53 silvestre.

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

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

## **CONCLUSIONES**

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

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

Otras dos expresan p53 humano específicamente en timo.

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

Su sobrevivencia es similar a aquella de los ratones p53<sup>-/-</sup>

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

El espectro de tumores presenta cambios:

Incremento en la incidencia de hemangiosarcomas

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

(retinoblastoma, tumores en glándula mamaria, adenocarcinoma)

Se encontró un tipo de tumor no reportado anteriormente,

hemangiosarcoma de células gigantes.

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

La mayoría desarrollan linfomas de timo

Estos tumores no presentan apoptosis

No hay expresión de p53 humano en los linfomas de timo

## APENDICE 1

### Tabla de C **Análisis estadístico del espectro de tumores observado.**

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

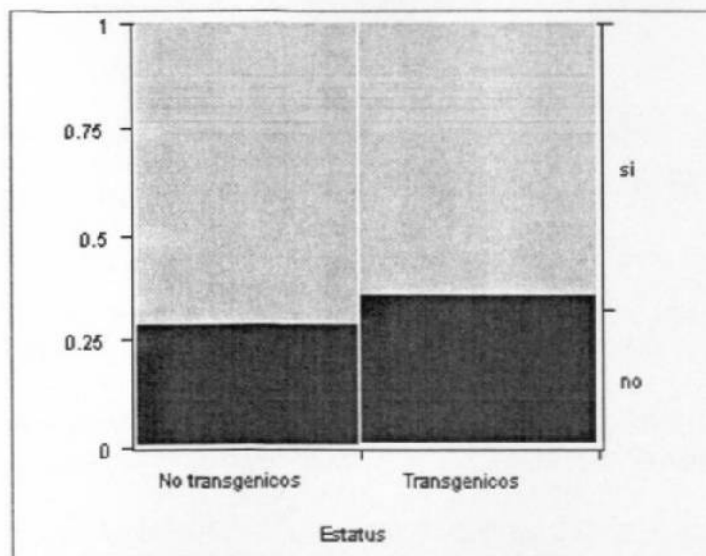
#### LINFOMA DE TIMO

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

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

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

#### Gráfica de Proporciones





**Tabla de Contingencia**

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

**Coefficiente de Correlación de Pearson**

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.711	0.3990

## HEMANGIOSARCOMA

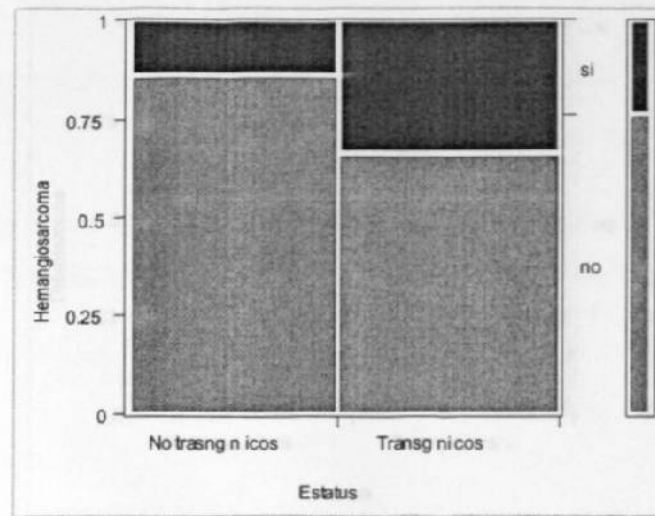


Tabla de Contingencia

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

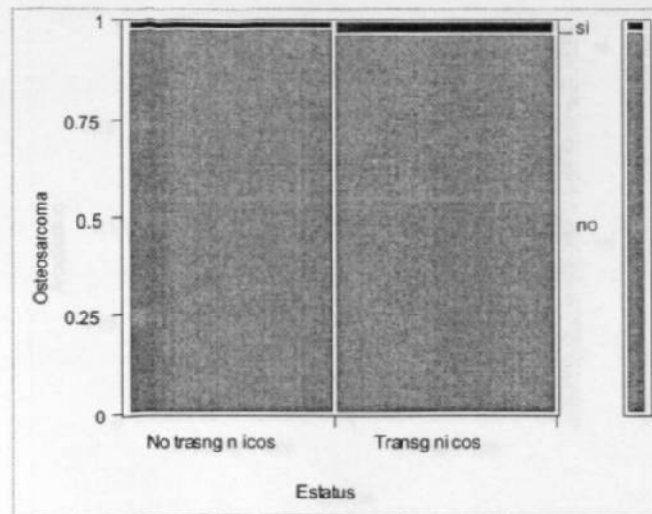
Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	7.841	0.0051

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

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

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

## OSTEOSARCOMA



**Tabla de Contingencia**

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

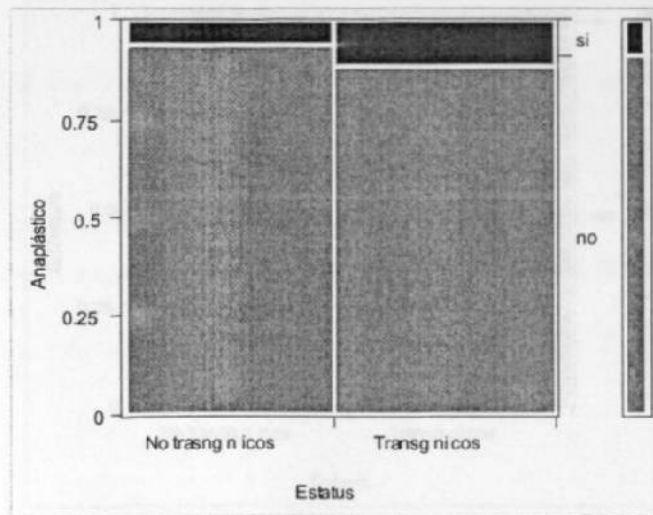
Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.285	0.5935

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

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

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

## ANAPLASTICO MARIA



### Tabla de Contingencia

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	1.220	0.2694

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

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

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



## GLANDULA MAMARIA

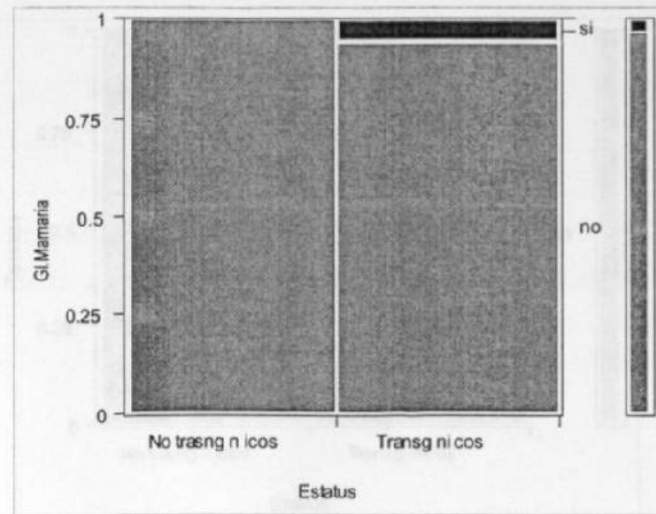


Tabla de Contingencia

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

Coefficiente de Correlación de Pearson

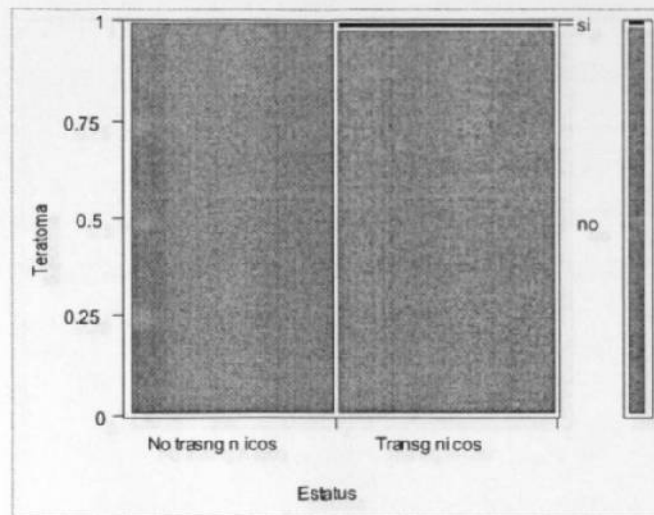
Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	3.889	0.0486

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

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

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

## TERATOMA



### Tabla de Contingencia

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.951	0.3294

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

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

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

## SARCOMA CINOMA

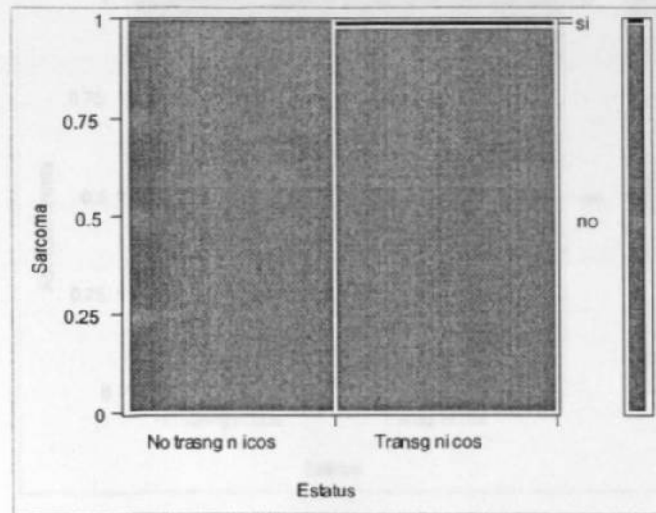


Tabla de Contingencia

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	0.951	0.3294

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

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

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

## ADENOCARCINOMA

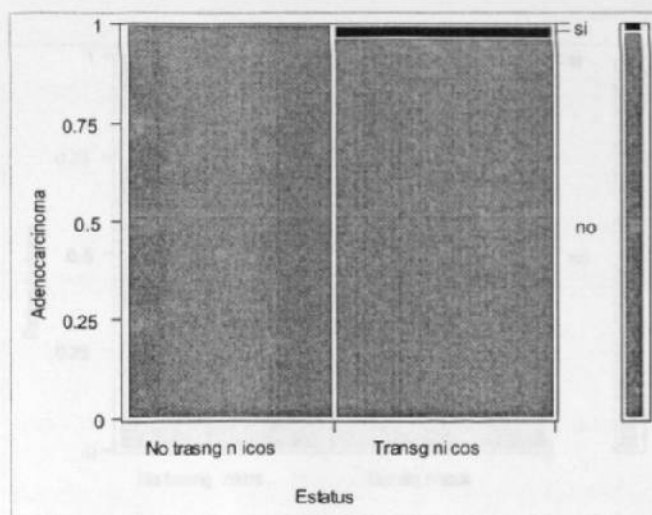


Tabla de Contingencia

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	1.916	0.1663

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

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

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



## RETINOBLASTOMA

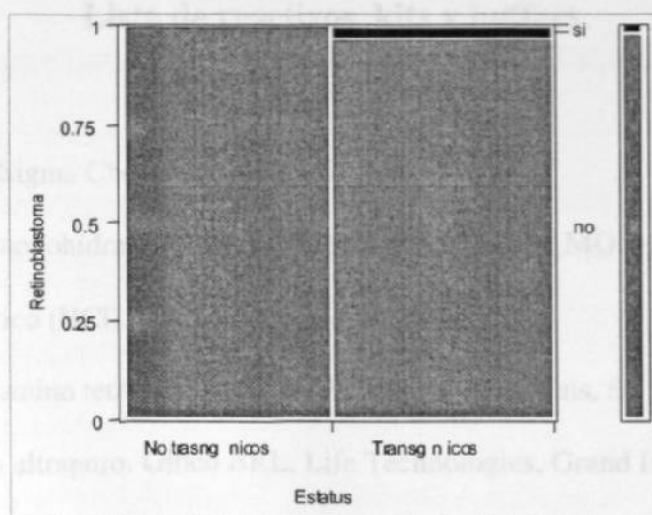


Tabla de Contingencia

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

### Coefficiente de Correlación de Pearson

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Pearson	1.916	0.1663

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

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

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

## **APENDICE 2**

### **Lista de reactivos, kits y buffers.**

6. Acido bórico. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
7. Acido cítrico monohidratado. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
8. Acido clorhídrico (HCl). Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
9. Acido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
10. Agarosa grado ultrapuro. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
11. AmpliTaq DNA polimerasa. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
12. Anticuerpo monoclonal Bp53-12. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
13. Azul de bromofenol, sal sódica. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
14. Bicarbonato de sodio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
15. Bio-Rad Protein Assay. BioRad Laboratories, Hercules, CA.
16. Borato de sodio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
17. Bromuro de etidio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
18. Buffer de PCR IX. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
19. Cloruro de sodio (NaCl). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
20. DAB (3, 3'-Diaminobenzidina). Vector Labs, Burlingame, CA.
21. Diaminobencidina, DAB Substrate Kit. Vector Laboratories, Burlingame, CA.
22. Dodecil sulfato de sodio (SDS, CMS Chempure Ultra). Curtin Matheson Scientific, Inc. Houston, TX.
23. dUTP-biotina. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

24. ECL Western Blotting Analysis System. Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.
25. Enzima de restricción Asp718. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
26. Enzima de restricción BamHI. Roché, Indianapolis, IN.
27. Enzima de restricción EcoRI. Roché, Indianapolis, IN.
28. Enzima de restricción HindIII. Roché, Indianapolis, IN.
29. Enzima de restricción NotI. Roché, Indianapolis, IN.
30. Enzima de restricción PstI. Roché, Indianapolis, IN.
31. Enzima de restricción XbaI. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
32. Enzima Polimerasa Klenow. Roché, Indianapolis, IN.
33. Eosina Y Accustain, solución alcohólica. Sigma Diagnostics, St. Louis, MO.
34. Etanol absoluto. AAPER. Alcohol and Chemical, Co. Shelbyville, KY.
35. Fenol ultrapuro. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
36. Formaldehído. Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
37. Fosfato de sodio, monobásico y monohidratado. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
38. Hematoxilina modificada de Harris, con ácido acético y libre de mercurio. Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
39. HEPES. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
40. Hidróxido de sodio (NaOH). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
41. Isopropanol (2-propanol, Optima). Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
42. Kit para detección de apoptosis: In Situ cell death detection kit POD. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

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

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

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

64.  $\alpha^{13}\text{PdCTP}$ . Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

Meng, R. D., McDonald, E. R., 3rd, Sheikh, M. S., Fornace, A. J., Jr., and El-Deiry, W. S. (2000). The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 1, 130-44.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E. E., and Collins, V. P. (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53, 2736-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wildin, R. S., Garvin, A. M., Pawar, S., Lewis, D. B., Abraham, K. M., Forbush, K. A., Ziegler, S. F., Allen, J. M., and Perlmutter, R. M. (1991). Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 173, 383-93.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## VITAE

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



DO JATI /O

