

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biología Celular y Molecular

PEDECIBA

**Identificación y análisis del efecto de mutaciones en
TP53 asociadas a la patología tumoral**

Lic. Ignacio López

Orientador: Dra. Mónica Marín

Tribunal:

Dr. Alfonso Cayota

Dra. Nora Artagaveytia

Dra. Ana Ramón

2011

Montevideo, Uruguay

Índice.

Índice general	
Índice	2
1. Resumen	5
2. Introducción	7
2.1. La patología: Cáncer	7
2.1.1. Origen de la enfermedad	8
2.1.2. Cáncer colorectal	9
2.2. Las moléculas efectoras de la célula: Las proteínas	13
2.2.1. Plegamiento de proteínas en la célula	14
2.2.2. Sistemas de control de calidad de proteínas	17
2.3. Efecto del uso de diferentes codones sinónimos en el plegamiento in vivo de proteínas	19
2.4. Edición de ARN mensajero: Splicing	21
2.4.1. El splicing: Componentes básicos	22
2.4.2. Splicing alternativo: Generador de diversidad proteica	24
2.5. Las mutaciones silenciosas tienen la palabra	26
2.5.1. Mutaciones en sitios de regulación y modificación del splicing: Base de enfermedades genéticas	26
2.5.2. Modificación de la cinética traduccional y el plegamiento de proteínas	27
2.6. Proteína supresora de tumores; P53	28
2.6.1. Estructura génica de <i>TP53</i>	29
2.6.2. P53: Organización de los dominios y funciones	29
2.6.3. Isoformas de P53	32
2.6.4. Elementos de respuesta de P53	33
2.7. Mutaciones en <i>TP53</i> en cáncer	33
3. Objetivos	35
3.1. Objetivo general	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. Análisis de la secuencia codificante de <i>TP53</i> en muestras tumorales	36
4.1. Materiales	36
4.2. Métodos	37
4.2.1. Extracción, caracterización y análisis de ácidos nucleicos	37
4.3. Resultados	39
4.3.1. Patrón de mutaciones	40
4.3.2. Efecto y posición de las mutaciones detectadas	41
4.3.3. Tipos de cambio	43
4.3.4. Polimorfismos	44
4.3.5. Posibles variantes de splicing	45
4.4. Discusión	46
4.4.1. Mutaciones detectadas	47
4.4.2. Efecto y posición de las mutaciones detectadas	49
4.4.3. Tipos de cambio	50
4.4.4. Polimorfismos	51
4.4.5. Posibles variantes de splicing	52
5. Estudio del efecto de mutaciones sinónimas sobre la estructura y función de P53	55
5.1. Materiales	55

5.1.1. Selección de las mutaciones	55
5.1.2. Vectores y construcciones plasmídicas de <i>TP53</i>	56
5.1.3. Células	58
5.1.4. Medios de cultivo	58
5.2. Métodos	58
5.2.1. Análisis del uso de codones de <i>TP53</i>	58
5.2.2. Actividad de transactivación en levaduras: FASAY	59
5.2.3. Extracción y caracterización de ácidos nucleicos	61
5.2.4. Transfección de levaduras y células humanas	63
5.2.5. Extracción, preparación y caracterización de proteínas	64
5.3. Resultados	66
5.3.1. Análisis del uso de codones de <i>TP53</i>	67
5.3.2. Actividad de transactivación en levaduras: FASAY	68
5.3.2.1. Control negativo	69
5.3.2.2. Control positivo	69
5.3.2.3. Mutantes analizados	70
5.3.2.4. Repetición del estudio para mutantes de Prolinas con ADN polimerasa sin corrección de pruebas	75
5.3.3. Variantes conformacionales de P53 en células humanas en cultivo	76
5.4. Discusión	81
5.4.1. Estudios de actividad de transactivación de P53	81
5.4.2. Variantes conformacionales de P53 en células humanas en cultivo	84
6. Conclusiones y perspectivas	87
7. Bibliografía	89
8. Anexos	97
8.1. Tablas anexas	97
8.2. Medios de cultivo	101

Índice de Figuras

Figura 1. Sistemas de control de calidad de proteínas de la célula	19
Figura 2. Señales reguladoras de splicing	22
Figura 3. Ensamblado del spliceosoma y química del splicing	23
Figura 4. Secuencias de ESEs	25
Figura 5. Esquema de la red de regulación central de P53	28
Figura 6. Estructura de P53	31
Figura 7. Amplificación de <i>TP53</i> de muestras tumorales	40
Figura 8. Patrón de mutaciones en <i>TP53</i> en CRC	42
Figura 9. Histograma de mutaciones puntuales por codón en <i>TP53</i>	43
Figura 10. Posibles variantes de splicing	46
Figura 11. Vectores utilizados para expresar la proteína en los diferentes sistemas	57
Figura 12. Cálculo del algoritmo %MinMax	60
Figura 13. Comparación del uso de codones de <i>TP53</i> en humanos y en la levadura <i>S. cerevisiae</i> utilizando el algoritmo %MinMax	67
Figura 14. Amplificación de <i>TP53</i> para FASAY	69
Figura 15. Resultado de FASAY para cepa YPH-Bax	71
Figura 16. Resultado de FASAY para cepa YPH-p21	72
Figura 17. Resultado de FASAY para cepa YPH-RGC	73

Figura 18. Resultado FASAY con enzima Taq sin corrección de prueba	77
Figura 19. Control de cantidad de proteína total	78
Figura 20. Análisis de cantidades relativas de las conformaciones de P53 expresadas en células H1299	79

Índice de Tablas

Tabla 1. Genes mutados frecuentemente en CRC esporádico	13
Tabla 2. Número de muestras con mutaciones en <i>TP53</i> en los grupos P53 positivo y negativo	41
Tabla 3. Número de mutaciones diferentes detectadas en los grupos de muestras P53 positivo y negativo	43
Tabla 4. Cambios de bases en las mutaciones puntuales	44
Tabla 5. Mutantes sinónimos estudiados	56
Tabla 6. Resultados de los ensayos de FASAY	74
Tabla A1. Cebadores utilizados	97
Tabla A2. Muestras seleccionadas	98
Tabla A3. Uso de codones de <i>Homo sapiens</i>	99
Tabla A4. Uso de codones de <i>S. cerevisiae</i>	100

1. Resumen.

La proteína supresora de tumores P53 es un factor de transcripción que induce o reprime la expresión de genes blanco vinculados a procesos celulares fundamentales, tales como el ciclo celular, la apoptosis, y la reparación del ADN. Está bien establecido que en la mitad de los cánceres humanos el gen *TP53* se encuentra mutado. De estas mutaciones, el 90% son puntuales y se localizan principalmente en el dominio de unión al ADN (DBD). Además, un número importante (5%) son sinónimas, no generando un cambio de aminoácido. Este valor es 20 a 100 veces superior al esperable para mutaciones neutras que no aportan ventajas selectivas a las células transformadas.

El objetivo general de nuestro grupo de trabajo es entender cuál es el efecto de la sustitución de codones sinónimos en la función de P53. En este sentido, estudios previos realizados *in silico* sugieren que las mutaciones sinónimas en *TP53* depositadas en la base de datos de IARC (International Agency for Research on Cancer) colocalizan con posibles potenciadores de splicing ESEs (Exonic Splicing Enhancers) y con codones que codifican para aminoácidos conservados en P53.

Con el fin de evaluar si las mutaciones sinónimas afectan la función de P53 en tumores humanos, en el presente trabajo se estudiaron 101 muestras de cáncer colorectal (CRC) almacenadas en el banco de tumores del Hospital de Cáncer de San Pablo, Brasil. En ellas se analizó la secuencia codificante de *TP53*, y se relacionó con el nivel de P53 en las células transformadas (medido por inmunohistoquímica) dividiéndose la muestra en dos grupos de estudio: Con y sin presencia de la proteína. Asimismo, algunos cambios frecuentes señalados en la base de datos y dos cambios detectados en el transcurso de este estudio fueron seleccionados para evaluar su efecto sobre la actividad y la estructura de P53 en dos sistemas eucariotas. En levaduras se estudió la actividad de transactivación sobre tres elementos de respuesta, mientras que en células humanas en cultivo se analizó la producción de variantes conformacionales de la proteína.

El análisis de la secuencia codificante de *TP53* en las muestras tumorales seleccionadas mostró que las mutaciones en el gen son un evento común: El 54,5% de las muestras están mutadas presentando 40 mutaciones diferentes. El 79,6% de las muestras P53 positivo contienen alguna mutación mientras que para el grupo P53 negativo las mismas ascienden a 30,8%. También es diferente el patrón de mutaciones entre los dos grupos. En el grupo P53 positivo, de las 39

mutaciones detectadas, 38 codifican un cambio de aminoácido y una consiste en una delección. Por otro lado, en el grupo P53 negativo se encontraron 7 inserciones/delecciones, 6 mutaciones puntuales que generan un cambio de aminoácido, 2 ocasionan un cambio sin sentido y la restante es una mutación sinónima. Es importante señalar que 2 delecciones y una inserción pueden ser explicadas como alteraciones de splicing.

En cuanto a la actividad de transactivación, los cambios sinónimos detectados en el análisis previo, 108G>A y 1014C>T, se comportaron como el gen salvaje. Sin embargo, una mezcla de mutantes sinónimos en los codones codificantes para las Prolinas 151, 152 y 153 presenta diferencias con respecto a la proteína salvaje, indicando que alguno de los mutantes tendría efecto sobre la función de P53 en levaduras. Por su parte, los estudios con anticuerpos conformacionales sugieren que los mutantes analizados en células humanas (108G>A, 1014C>T y cuatro mutantes particulares de la mezcla de mutantes de Prolinas) no presentan cambios significativos con respecto al patrón de expresión observado para la proteína salvaje.

A modo de conclusión, podemos señalar que en este estudio se obtuvo la secuencia codificante de *TP53* de muestras de CRC y se definió el patrón de mutaciones en muestras con y sin acumulación de la proteína. Se detectaron tres cambios que podrían ser considerados como alteraciones del mensajero de *TP53*. Asimismo, el análisis del efecto de mutaciones sinónimas sobre la función y estructura de P53 señaló por un lado, la ausencia de cambios significativos en la generación de variantes conformacionales entre la expresión de la proteína salvaje y sus mutantes en células humanas y por otro, la existencia de mutaciones que modifican la actividad de transactivación de P53 en levaduras, restando identificarlas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden proporcionar elementos útiles a futuras investigaciones, y contribuir a una mejor comprensión del papel de las mutaciones sinónimas de *TP53* en la patología tumoral.

2. Introducción.

Este trabajo se centró en la identificación de mutaciones en *TP53* presentes en cáncer colorectal (CRC) y en el estudio del eventual efecto que algunos cambios sinónimos pueden tener sobre la función de la proteína supresora de tumores P53. Dicha proteína es un factor de transcripción que regula la expresión de un gran número de genes vinculados a vías centrales del ciclo celular, y que pueden estar afectadas en diferentes tipos de cáncer.

2.1. La patología: Cáncer.

La palabra cáncer es un término genérico empleado para describir un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo en diferentes especies. Otro término frecuentemente utilizado es “tumor maligno”.

Una característica definitoria de este conjunto de enfermedades es la generación y propagación de células anormales. Estas células tienen la capacidad de proliferar más de lo normal, invadir zonas y tejidos sanos, y diseminarse (proceso denominado metástasis), colonizando regiones distantes al sitio de origen de la primera célula maligna. Este crecimiento descontrolado de células malignas lleva a la muerte del individuo en mayor o menor tiempo dependiendo del tipo y origen del cáncer ¹.

Este conjunto de enfermedades representa una de las principales causas de muerte en el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, 7,6 millones de personas fallecieron a causa de esta patología en el año 2008, lo que representa alrededor del 13% de las muertes reportadas en ese año. Además, se proyecta que este índice alcance los 11 millones de muertes en el año 2030 (“World Health Organization,”). Dentro de los diversos tipos de cáncer existen algunos más frecuentes que explican un alto número de los decesos mencionados, los 5 primeros son, en orden decreciente; cáncer de pulmón, de estómago, de hígado, cáncer colorectal, y cáncer de mama. En nuestro país el cáncer tiene una alta incidencia y así lo indican los datos del Ministerio de Salud Pública; entre los años 2003 y 2008 el porcentaje de defunciones en Uruguay debidas a la ocurrencia de algún tipo de cáncer representó entre 23,5% y 24,8% (“Ministerio de Salud Pública,”), siendo la segunda causa de muerte detrás de las enfermedades del aparato circulatorio.

Si bien existe una relación entre la zona geográfica, los factores de riesgo a los que están expuestas diferentes poblaciones y el acervo genético de las mismas, con la posibilidad de

contraer cáncer, la mayoría (70%) de las muertes por cáncer está reportada en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo. La falta de recursos destinados a la detección temprana y al tratamiento de las personas enfermas podría explicar el valor reportado (“World Health Organization,”).

2.1.1. Origen de la enfermedad.

El cáncer se origina en una única célula que desarrolla una transformación maligna. La transformación de una célula normal en una tumoral es un proceso con múltiples pasos que incluyen la progresión de una lesión precancerosa a la constitución de un tumor maligno. Los cambios que ocurren a la célula a lo largo de este camino son el resultado de la interacción entre la información genética del individuo y las alteraciones genéticas que va acumulando la célula, con las siguientes tres categorías de agentes externos: 1- Carcinógenos físicos, como radiaciones ultravioletas e ionizantes. 2- Carcinógenos químicos, como asbestos, componentes del tabaco, contaminantes de los alimentos (como aflatoxina), y contaminantes del agua (como Arsénico). 3- Carcinógenos biológicos, como infecciones con ciertos virus, bacterias o parásitos. Por otro lado, la incidencia de esta enfermedad aumenta drásticamente con la edad debido a la acumulación de errores a lo largo de la vida del individuo, además de la pérdida de eficiencia en los mecanismos celulares de detección y reparación de los mismos ¹.

Cambios genéticos acumulados son los que llevan al desarrollo de la patología. En la mayoría de los cánceres se ven afectados genes vinculados a vías celulares importantes, e inducen las siguientes seis alteraciones esenciales: 1- Autosuficiencia en relación a la producción de factores de crecimiento. 2- Insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento. 3- Evasión del programa de muerte celular programada o apoptosis. 4- Potencial de replicarse sin límites. 5- Posibilidad de inducir la angiogénesis. 6- Invasión de tejidos y metástasis ¹. Cada uno de los cambios fisiológicos mencionados representa un punto de control celular, de defensa del organismo contra la estabilización de la enfermedad, y el hecho de que sean varios pasos permitiría explicar por qué el cáncer es relativamente “poco frecuente” en una persona joven.

Como fue mencionado anteriormente el cáncer está asociado a mutaciones en diversos genes, cuyas funciones están relacionadas a vías centrales de regulación como apoptosis, reparación del ADN, senescencia, control del ciclo celular, entre otras. Hasta el momento se han identificado más de 1000 genes humanos que poseen mutaciones para las que se ha propuesto

una relación o posible relación con la progresión de cáncer, aunque solamente en 85 de ellos se han detectado mutaciones en al menos dos estudios ⁴.

En general, los genes asociados al desarrollo de la patología se dividen en oncogenes y genes supresores de tumores. Los primeros derivan de un protooncogén con función celular normal y específica que al ser afectado por una mutación aumenta el nivel de su función normal o adquiere una nueva función, en ambos casos con resultados oncogénicos. El segundo grupo está compuesto por genes que regulan y controlan procesos celulares normales; son los llamados genes supresores de tumores. En este último caso es la pérdida de la función normal por efecto de alguna mutación que se asocia con el desarrollo de cáncer ¹. En el caso de los protooncogenes alcanza con modificar una de las copias del genoma para generar el efecto, mientras que en el caso de los genes supresores de tumores en general es necesario inactivar ambos alelos del gen de forma de perder la función controladora. Se estima que el 80% de los genes vinculados a algún tipo de cáncer son dominantes, protooncogenes, y siendo suficiente una única modificación ⁵.

La conversión de un gen celular en un gen oncogénico puede resultar de mutaciones puntuales, por rearrreglos que alteran la estructura y función, o por rearrreglos y amplificaciones que desestabilizan la precisa regulación génica existente en condiciones normales. La inactivación de un gen supresor de tumores puede ser consecuencia de mutaciones localizadas, pérdida completa o parcial del gen o alteraciones epigenéticas que alteren su expresión ¹.

2.1.2. Cáncer colorectal.

El cáncer colorectal (CRC) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En promedio es responsable de la muerte de 665.000 personas cada año, colocándose en segundo lugar en cuanto a las muertes que origina, y en el tercer puesto en relación a la incidencia de cáncer ⁶. El CRC es curable cuando es diagnosticado en etapas tempranas, con una tasa de supervivencia de 5 años para el 90% de los pacientes a los que se les detecta la patología en la etapa I de la enfermedad. La detección temprana es poco frecuente ya que no existen síntomas asociados en las etapas iniciales y solo ocurre si el paciente se realiza un análisis de control ^{6,7}.

Los factores ambientales y los mecanismos patológicos que desencadenan su desarrollo no están del todo claros y parecen ser heterogéneos. Algunos agentes que contribuyen al desarrollo de CRC incluyen la dieta (rica en grasas insaturadas y carnes rojas y consumo excesivo de alcohol) y el estilo de vida (sedentarismo y actividad física reducida) ⁸. Por el contrario, agentes capaces de prevenir el desarrollo de CRC podrían ser drogas antiinflamatorias no esteroideas,

estrógenos, calcio, y probablemente algunas estatinas ⁹. Asimismo, exposiciones a muchas otras sustancias y eventos han sido estudiadas en cuanto a su efecto sobre el riesgo de contraer CRC, pero en la mayoría de los casos los resultados fueron ambiguos. Todo esto señala que los factores dietarios y ambientales que contribuyen al desarrollo de la patología no están claros, y adicionalmente en las personas que padecen de la enfermedad, los factores de riesgo son raramente detectados ⁹.

Por el contrario, existe mayor conocimiento acerca de las modificaciones genéticas responsables de la predisposición hereditaria a desarrollar CRC, así como también de las mutaciones somáticas en diversos genes responsables de casos de CRC esporádicos ⁹. En general, al igual que en la mayoría de cánceres, las modificaciones genéticas inducen la alteración o ganancia de función de un protooncogén, o la supresión parcial o total de la función de algún gen supresor de tumores ^{1,9}.

Se estima que aproximadamente 15% de los casos de CRC presentan un componente hereditario ¹⁰ y básicamente son atribuidos a dos síndromes; Cáncer Colorectal Hereditario No Polipósico (HNPCC, Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, o Síndrome de Lynch) y Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP, Familial Adenomatous Polyposis). Por el contrario, la gran mayoría de CRC no presenta un componente hereditario y son consecuencia de la ocurrencia de mutaciones somáticas en diferentes genes. En ambos tipos de CRC el evento principal en el desarrollo de la patología es la transición adenoma-carcinoma, esto quiere decir el momento en que un tumor epitelial benigno cuya estructura interna es semejante a la de una glándula pasa a ser un tumor cancerígeno capaz de filtrarse a los tejidos cercanos.

El epitelio intestinal presenta células madre organizadas con diferentes funciones. Dichas células madre existirían, al menos en ratón, en la base de las criptas ¹¹. Éstas se dividen una vez por día y sus descendientes se dividen a una tasa mucho mayor y migran por la cripta hasta la zona media donde adquieren funciones intestinales características. Cuando alcanzan la cima de las vellosidades ingresan en apoptosis y se desprenden hacia la luz del órgano. Se ha propuesto que las mutaciones (epi)genéticas que llevan al desarrollo de CRC ocurrirían en las células madre, debido a su capacidad de proliferación extendida y su habilidad para diferenciarse y adquirir funciones especializadas. También se ha propuesto un modelo en que la transformación ocurre en la zona media del epitelio y el proceso de displasia ocurre hacia atrás, aunque se cree que la primera sería la hipótesis correcta ¹¹, indicando que el origen del tumor está restringido a la transformación de células ancestrales.

La variedad de tumores gastrointestinales benignos es grande. Las lesiones localizadas que emergen de la superficie de la mucosa son llamados pólipos, y la gran mayoría, particularmente los pequeños (menos de 5 mm de tamaño), son hiperplásicos, los cuales se cree no son el principal precursor de CRC. Probablemente, los que sí son precursores son los pólipos adenomatosos, o adenomas. Individuos afectados por síndromes que predisponen a la presencia de adenomas, como FAP, desarrollan CRC a una edad promedio de entre 30 y 50 años si no se les extirpa el órgano afectado. De todas formas, sólo una fracción de los adenomas derivan en CRC, lo que además puede suceder en tiempos que varían de años a décadas. Este síndrome es causado por mutaciones, germinales o somáticas, del gen supresor de tumores Coli Poliposis Adenomatosa (*APC*, Adenomatous Polyposis Coli), y constituye el evento inicial y limitante en la transición adenoma-carcinoma^{9,11}, tanto en la mayoría de CRC hereditario como en la mayoría (70-80%) de los casos de CRC espontáneo.

El gen *APC* codifica para una proteína de 300 kDa que regula la adhesión celular, la migración celular, segregación cromosómica, y la apoptosis en la cresta del colon. El rol primordial de *APC* en el desarrollo del CRC depende de su capacidad de unirse y regular a la proteína β -catenina, a través de las vías de señalización canónicas o no canónicas de Wntless (Wnt). En ausencia del ligando Wnt, *APC* se une a la proteína Axina y el complejo promueve la fosforilación secuencial de residuos de Ser y Thr de la región N-terminal de β -catenina por Casein quinasa 1 y Glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β). Así, señalan a β -catenina como un sustrato de poliubiquitinación y posterior degradación por la vía del proteosoma. En condiciones fisiológicas la presencia del ligando Wnt inhibe las quinetas estabilizando la vida media de β -catenina en el citoplasma y en el núcleo.

En los casos en que *APC* está inactivado ocurre una acumulación de β -catenina en el citoplasma. En estas condiciones se ve favorecida la formación de complejos de β -catenina con proteínas de unión al ADN de la familia TCF/TLF (familia de factores potenciadores de linfocitos T), y la posterior migración al núcleo donde favorecerá la activación de la expresión de diversos genes por los factores TCF/TLF. Dentro de los genes regulados por estos factores se encuentran protooncogenes (*CMYC* y *cliclina D1*), factores de membrana (*MMP-7*, *MT1-MMP*, *laminina 5 γ 2*), factores de crecimiento (*FGF20* y *FGF9*), y reguladores de la vía de Wnt, cuya expresión irregular puede derivar en la desregulación de la célula. En los casos de CRC donde no hay inactivación de *APC*, han sido detectadas modificaciones en otros genes que modifican la vía de señalización de Wnt.

La ocurrencia de CRC no dependiente de *APC* implica que existe una modificación inicial en otros factores. En el caso de CRC hereditario denominado HNPCC, la mutación germinal iniciadora del proceso afecta algunos de los genes reparadores de falsos apareamientos (mismatch) *MSH2* o *MLH1*, que inducen la acumulación de errores en diversos genes, conduciendo así la transición por los diferentes estadios de la enfermedad. Modificaciones de estos genes también han sido detectadas en casos de CRC esporádico ⁹.

Otros síndromes pueden derivar en CRC y dependen de la presencia de mutaciones germinales en genes específicos. La modificación de los genes *SMAD4* o *BMPR1A* implicados en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante TGF- β está relacionada con la aparición de un síndrome hereditario que en el 60% de los casos deriva en CRC, y se denomina Síndrome de Poliposis Juvenil (JPS). El Síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) se caracteriza por la aparición de Pólipos hamartomatosos en el intestino delgado, colon, recto, y estómago, así como también por deposiciones de melanina mucocutánea. Esto genera un aumento en la incidencia de pólipos adenomatosos en todo el tracto gastrointestinal, y genera una predisposición al desarrollo de CRC en estos pacientes. Este fenotipo se debe fundamentalmente a la ocurrencia de mutaciones sobre el gen supresor de tumores *LKB1*, cuya inactivación origina una mayor activación de la vía de mTOR. Por otro lado, mutaciones germinales en el gen *MYH* vinculado a la reparación del ADN por escisión originan el síndrome denominado MAP (*MYH*-Associated Polyposis Syndrome). Este síndrome es la causa de algunos casos de CRC y es consecuencia del aumento de la frecuencia de transversiones producto de la falla del mecanismo de reparación.

En muchos casos de CRC, ya sean hereditarios o esporádicos, existe una pérdida de función de P53. Ésta es consecuencia de mutaciones somáticas o del mecanismo denominado pérdida de heterocigosidad (LOH, de Loss of Heterozygosity). El mecanismo de LOH del "locus" 17p, donde se encuentra codificado *TP53*, está reportado para el 70% de los casos de CRC y en general impide la expresión del alelo normal de la proteína. La pérdida del control sobre importantes "checkpoints" de la célula en G1/S y G2/M, de la capacidad de promoción de la apoptosis y de la capacidad de inhibición de la angiogénesis ejercidos por P53 constituyen un evento seleccionado en la progresión de la enfermedad. La pérdida de estas funciones juega un rol preponderante en la transición adenoma-carcinoma, permitiendo que las células se tornen malignas, presenten un crecimiento continuo y adquieran capacidades invasivas.

La aparición de CRC esporádico también se ha visto asociada a otros genes, algunos de los cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes mutados frecuentemente en CRC esporádico. Se muestran oncogenes y genes supresores de tumores, el tipo de mutación que presenten en general, la frecuencia estimada de casos de CRC en que aparecen modificados y los procesos celulares a los que se encuentran vinculados. Indels: Inserciones y deleciones que generan un cambio del marco de lectura. LOH: Pérdida de heterocigosidad. Modificado de Fearon E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. 2011 Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 6 479-507⁹.

Gen	Tipo de mutación	Frecuencia estimada	Vinculado a
Oncogenes			
<i>KRAS</i>	Puntuales	40%	Transducción de señales
<i>NRAS</i>	Puntuales	< 5%	Transducción de señales
<i>PIK3CA</i>	Puntuales	15-25%	Proliferación y migración celular, tráfico vesicular
<i>BRAF</i>	Puntuales	5-10%	Transducción de señales, proliferación celular
<i>EGFR</i>	Amplificación génica	5-15%	Transducción de señales, síntesis de ADN, proliferación, migración y adhesión celular
<i>CDK8</i>	Amplificación génica	10-15%	Ciclo celular
<i>CMYC</i>	Amplificación génica	5-10%	Factor de transcripción, proliferación celular, apoptosis
<i>CCNE1</i>	Amplificación génica	5%	Ciclo celular
<i>CTNNB1</i>	Puntuales, deleciones	< 5%	Adhesión celular
<i>NEU (HER2)</i>	Amplificación génica	< 5%	Transducción de señales, síntesis de ADN, proliferación, migración y adhesión celular
<i>MYB</i>	Amplificación génica	< 5%	Factor de transcripción, hematopoiesis
Supresores de tumores			
<i>TP53</i>	Puntuales, LOH	60-70%	Factor de transcripción, reparación de ADN, apoptosis, ciclo celular
<i>APC</i>	Indels, puntuales, LOH	70-80%	División, migración, adhesión celular
<i>FBXW7</i>	Puntuales, deleciones	20%	E3 ubiquitin ligasa, degradación de proteínas
<i>PTEN</i>	Puntuales, deleciones	10%	Ciclo celular
<i>SMAD4</i>	Puntuales, LOH	10-15%	Transducción de señales
<i>SMAD2</i>	Puntuales, deleciones, LOH	5-10%	Transducción de señales
<i>SMAD3</i>	Puntuales, deleciones	5%	Transducción de señales
<i>TGFβ1IR</i>	Indels, puntuales	10-15%	Adhesión celular
<i>TCF7L2</i>	Indels, puntuales	5%	Factor de transcripción
<i>ACVR2</i>	Indels	10%	Transducción de señales
<i>Bax</i>	Indels	5%	Apoptosis

2.2. Las moléculas efectoras de la célula: Las proteínas.

La palabra “proteína” deriva de la palabra griega *πρωτεῖος* ("proteios") que significa primario o primordial, o también relativo al dios Proteo de donde derivan las anteriores, debido a la cantidad de formas que podría adoptar para evitar tener que predecir el futuro.

Las proteínas son biomoléculas constituidas por cadenas lineales de aminoácidos. Representan las macromoléculas más abundantes y están presentes en todas las células y en todas las partes de éstas, y presentan una gran diversidad, de allí el nombre. Constituyen los productos

finales más importantes de las rutas de información a través de los que se expresa la información genética y son quienes llevan a cabo una inmensa diversidad de funciones imprescindibles para la célula.

Un péptido lineal de aminoácidos no presenta actividad. Ésta depende de una estructura particular característica. Sin embargo, la estructura primaria es clave para alcanzar la conformación tridimensional nativa, la que se logra con diferentes combinaciones de aminoácidos que poseen propiedades fisicoquímicas particulares dependiendo de la cadena lateral que contengan. La ubicación y el entorno en el que se encuentra cada uno de los aminoácidos definirán la estructura local (secundaria), que afectará la conformación global y la función que podrá adoptar esa molécula. El proceso de maduración hasta alcanzar una conformación estable tridimensional no es trivial, y en la mayoría de los casos depende de diversos factores como se describe a continuación.

2.2.1. Plegamiento de proteínas en la célula.

La observación realizada por Christian Anfinsen y colaboradores ¹³ en la década del 50 acerca del plegamiento *in vitro* de la ribonucleasa pancreática luego de desnaturalizarla, sugería fuertemente la idea de que la secuencia aminoacídica de un polipéptido contiene la información necesaria y suficiente para especificar y guiar la producción de su única estructura tridimensional funcional. Hoy en día es aceptado que la realidad es más compleja, y que existen otros factores que afectan este proceso en la célula.

La probabilidad que tiene una proteína de plegarse sobre sí misma sin “ayuda”, dependiendo de los movimientos azarosos que sus diferentes enlaces le permitan realizar resulta casi nula para la mayoría ¹⁴. Sin embargo, existen proteínas pequeñas y generalmente globulares capaces de alcanzar un estado estable (con un mínimo de energía libre) de forma espontánea como lo demostró originalmente Anfinsen y colaboradores ¹³.

Por el contrario, para proteínas grandes y complejas, con más de un dominio, o multiméricas, alcanzar el estado nativo a través del ensayo y error de diferentes estructuras tridimensionales es inviable y requeriría millones de años ¹⁵. Esta observación constituye la paradoja de Levinthal, que postula que de gobernar el azar en el plegamiento de proteínas sería imposible pensar en la vida tal cual la conocemos hoy.

Los mecanismos implicados en el plegamiento *in vivo* de proteínas son aun conocidos en forma parcial. La célula cuenta con sistemas muy conservados para facilitar el plegamiento, para

evitar la formación de agregados y también para eliminar proteínas mal plegadas^{14,16}. A pesar de ello, y por razones aun no bien establecidas, se producen y acumulan proteínas mal plegadas como las que se observan en ciertas enfermedades conformacionales (Fenilcetonuria, enfermedad de Parkinson, entre otras).

Los sistemas mencionados arriba refieren a la existencia de las chaperonas moleculares. Se trata de proteínas que interaccionan, estabilizan, “ayudan” a otras proteínas a adquirir su conformación nativa, reduciendo el riesgo de agregación, que no permanecen en la estructura final junto a la proteína blanco¹⁷.

La agregación de las proteínas es un fenómeno altamente favorecido en sistemas donde existe una alta concentración de moléculas como es la célula^{16,18}. Dentro del conjunto de chaperonas, se destacan las denominadas “Heat-Shock Proteins”-70 (Hsps70s) y las chaperoninas Hsps60s.

El blanco de las chaperonas son proteínas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas que exponen residuos aminoacídicos hidrofóbicos, que normalmente se encuentran en el interior de la molécula. Las chaperonas se unen de forma reversible a los péptidos, y la reversibilidad de la unión es un aspecto importante en el proceso, ya que las regiones hidrofóbicas son también importantes para guiar el nuevo proceso de plegamiento¹⁷.

Existen otros mecanismos en los que las chaperonas participan: Además del plegamiento *de novo* y el plegamiento de proteínas desnaturalizadas, éstas participan en la formación de oligómeros, transporte intracelular de proteínas, y asistencia en degradación de péptidos¹⁷.

Existen numerosas clases de chaperonas y no existe relación entre sus estructuras. Sin embargo, muchas de ellas son conocidas como proteínas de estrés o heat shock, ya que su expresión aumenta en condiciones de estrés celular donde la probabilidad de agregación de proteínas es mayor. En general se clasifican de acuerdo a su masa molecular, Hsps 40, 60, 70, 90, 100 y las llamadas Hsps pequeñas. Todas ellas tienen la capacidad de prevenir la agregación pero solo algunas de las Hsp100 pueden disociar los agregados activamente e inducir un nuevo ciclo de plegamiento o degradación.

Las chaperonas que actúan en el citoplasma se pueden dividir en dos tipos: Aquellas que estabilizan el péptido nascente en el ribosoma y se encargan de los pasos iniciales del plegamiento, y aquellos componentes que actúan en pasos posteriores finalizando el proceso. Las primeras establecen íntimo contacto con el ribosoma de forma de ensamblarse sobre los aminoácidos de péptidos nascentes previniendo la temprana compactación de la cadena y manteniéndolos de

forma no agregada hasta que exista suficiente información estructural para llevar a cabo los primeros pasos del plegamiento, como es el caso de Hsp70 especializada RAC (Ribosome-Associated Complex). El segundo grupo de chaperonas no se unen al ribosoma y trabajan sobre péptidos nacientes más largos, de forma co o posttraduccional en ciclos concatenados guiados por ATP. El proceso de plegamiento cotraduccional evita el contacto prematuro y erróneo entre dominios, lo que constituye un mecanismo esencial para la correcta constitución de proteínas multidominio ¹⁷. Dentro de este grupo, las Hsps70 son las organizadoras centrales de la red de chaperonas y distribuyen diferentes proteínas hacia las diferentes chaperonas que actúan a continuación, como las chaperoninas (Hsp60s) (o el sistema GroEL en bacterias) y Hsp90.

El mecanismo de acción de cada uno de los grupos es diferente. Mientras el grupo de proteínas unidas al ribosoma actúa uniéndose y disociándose reiteradas veces dependiendo de la hidrólisis de ATP y favoreciendo la adopción de diferentes conformaciones, las chaperoninas y Hsp10 asociadas a la mitocondria, cloroplasto o en el citoplasma de células procariotas, forman una cavidad en donde la proteína queda libre de plegarse durante unos segundos. Proteínas mayores al tamaño máximo de la mencionada cavidad son rescatadas por las proteínas Hsp70s de la forma descrita anteriormente ¹⁷.

Más recientemente se ha detectado que además de su función clásica en la síntesis de proteínas, los ribosomas eucariotas y procariotas están implicados en el plegamiento de proteínas de una forma independiente del proceso de traducción. Esta actividad que recibe el nombre de PFAR (de Protein Folding Activity of the Ribosome) depende del dominio V del ARNr mayor de la subunidad mayor del ribosoma (23S en bacteria, 25S en levadura, y 28S en eucariotas superiores). Este dominio posee la actividad peptidil transferasa del ribosoma. La PFAR también ha sido observada en ensayos *in vitro*, en donde ribosomas procariotas y eucariotas participan en el plegamiento de sustratos desnaturalizados. Esta observación sugiere que el ribosoma posee la actividad chaperona de forma intrínseca, y que la misma es independiente de la actividad de síntesis ^{19,20}.

El mapeo de PFAR en una región particular del ribosoma abre la puerta a varias aplicaciones biomédicas e industriales. En cuanto a la primera, una gran búsqueda en bibliotecas de sustancias químicas permitió el aislamiento de drogas que afectan específicamente la actividad chaperona del ribosoma, sin modificar el proceso de traducción. Estas nuevas sustancias interactúan con el dominio V del ARNr mayor de la subunidad mayor del ribosoma, y ejercen un

efecto sobre la formación de priones de levaduras y humanos tanto en sistemas *in vivo* e *in vitro*²¹.

Un creciente número de enfermedades están relacionadas al incorrecto plegamiento de proteínas, las que escapan al control ejercido por parte de la chaperonas y los controles de calidad de la célula. En muchos desórdenes las proteínas adquieren una nueva función tóxica, como en el caso de Alzheimer, Parkinson, Huntington, así como las enfermedades priónicas¹⁷.

2.2.2. Sistemas de control de calidad de proteínas.

Los sistemas de chaperonas presentados anteriormente junto con los sistemas de proteasas implicados en la degradación de proteínas constituyen en conjunto los sistemas de control de calidad de proteínas celulares.

Las proteasas del citosol implicadas en este sistema, cuyo representante más importante es el proteosoma, presenta una estructura particular que forma una cavidad en donde se encuentra la actividad proteolítica, y donde las proteínas correctamente plegadas no pueden acceder.

La degradación de proteínas depende de la desnaturalización de la misma previo ingreso al proteosoma. Para eso se requiere la función de las chaperonas que contienen los dominios AAA⁺ que poseen actividad ATPasa y son capaces de desplegar péptidos mal plegados²². Además, debe existir una señal que indique que la proteína debe ser degradada, lo que viene dado por el sistema de ubiquitinación. La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos que es unida covalentemente a los péptidos a degradar, pero también es empleada para señalar otros destinos, como remoción de la membrana o secuestro en el citoplasma.

La falla en los sistemas de control para detectar y degradar proteínas mal plegadas puede inducir la formación de agregados proteicos. Éstos pueden estar localizados en un único punto cercano al núcleo definiendo una estructura globular denominada “agregosoma”, o pueden ser monómeros y oligómeros solubles capaces de precipitar formando extensas fibras amiloides con forma de tubos gracias a la presencia de estructuras secundarias de hojas- β ¹⁴. Ha sido reportado que el incremento de expresión de las Hsps *in vitro* y en levaduras induce una disminución de la formación de fibras amiloides, originando la formación de agregados amorfos solubles en detergentes²³.

En el caso de la enfermedad Fenilcetonuria (PKU, Phenylketonuria) existe un cambio aminoacídico en la proteína Fenilalanina Hidroxilasa (PAH) lejos del sitio activo de la enzima que

induce una alteración del plegamiento, favoreciendo en algunos casos su agregación. La detección de esta proteína mal formada promueve su rápida degradación, lo que pone de manifiesto el fenotipo de la enfermedad por pérdida de la función enzimática. En estudios de expresión de PAH con mutaciones que promueven la agregación de la proteína se ha visto que es posible recuperar la actividad de la enzima al aumentar los niveles de chaperonas o al bajar la temperatura en *Escherichia coli* o cultivos de células COS, respectivamente, favoreciendo el correcto plegamiento²⁴.

Además de la Fenilcetonuria descrita anteriormente, otras patologías vinculadas a la agregación de proteínas en citoplasma celular son: Epidermólisis Bullosa Simple, Miopatía por Desmina, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica, asociadas a mutaciones o aumento de expresión de las proteínas queratina 5 y 14¹⁴, Hsp α B-Cristalina²⁵, α -sinucleína¹⁴, Cu, Zn Superóxido Dismutasa (SOD1)²⁶.

En el Retículo Endoplasmático (RE) también existen sistemas de control de calidad, como chaperonas especializadas y enzimas para el plegamiento (BiP, Calnexina, Calreticulina, Proteína disulfuro isomerasa, entre otras) que forman parte del denominado proceso de degradación de proteínas ERAD (ER-associated degradation). Modificaciones en la actividad de estos sistemas también puede permitir la formación de agregados proteicos y el desarrollo de enfermedades conformacionales como es el caso de la Fibrosis Quística, causada por mutaciones en un canal de cloro codificado por el gen regulador de la transmitancia de membrana de fibrosis quística (*CFTR*, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)¹⁴.

En la mitocondria también pueden ocurrir errores en los mecanismos de control y plegamiento de proteínas que conducen a patologías como la Paraplejía Espástica Hereditaria, asociada a mutaciones en dos genes que codifican proteínas componentes de los sistemas de control de la mitocondria; Paraplegina, una subunidad de la proteasa de membrana con dominio AAA⁺, y Hsp60, una chaperona de matriz mitocondrial¹⁴. Un esquema del funcionamiento de los sistemas de control de calidad de proteínas en la célula se muestra en la Figura 1.

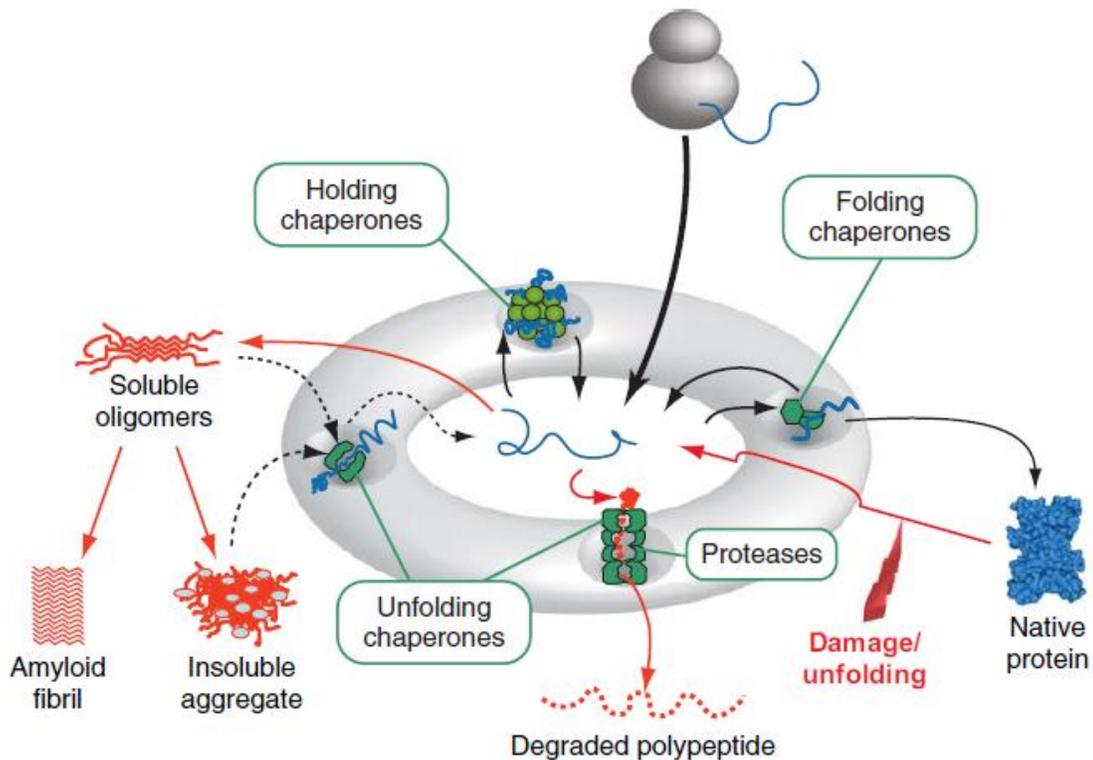


Figura 1. Sistemas de control de calidad de proteínas de la célula. Se indican los posibles destinos de un péptido recién sintetizado y los actores vinculados en cada vía, señalando el tipo de chaperonas implicadas. Tomado de Gregersen N., Bross, P., Vang, S. and Christensen, J. H. Protein Misfolding and Human Disease. 2006 Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 7 103-124 ¹⁴.

2.3. Efecto del uso de diferentes codones sinónimos en el plegamiento *in vivo* de proteínas.

Nuestro laboratorio está interesado en comprender de qué manera el contexto celular, la maquinaria de traducción y la secuencia misma del ARNm pueden afectar el plegamiento de proteínas. En particular, nos interesa comprender cuál es la contribución de estos factores en la conformación de proteínas de una determinada secuencia aminoacídica, asociadas al hecho de que la cinética de la traducción podría tener implicancias en el plegamiento de una proteína dada.

En relación a la maquinaria de traducción y a la secuencia codificante de la proteína, estudiamos cuál es el efecto del uso de diferentes codones sinónimos (aquellos que codifican para un mismo aminoácido) en la estructura y función de la proteína. El uso diferencial de los mismos podría constituir un modulador de la cinética traduccional local afectando la velocidad de desplazamiento del ribosoma, y permitiendo el plegamiento independiente de sucesivos dominios proteicos.

La hipótesis que postula que la cinética traduccional podría afectar el plegamiento de proteínas está basada en algunas características del proceso de síntesis de los péptidos. En primer lugar, el plegamiento en la célula ocurre mayormente de forma simultánea a la síntesis proteica, de forma que es un proceso cotraduccional. Además, la síntesis proteica no transcurre a velocidad constante sino que presenta pausas intermedias que la vuelven discontinua. Finalmente, el uso de codones sinónimos y la disponibilidad de sus ARNt complementarios pueden modificar la cinética traduccional y favorecer el plegamiento alternativo de un mismo péptido ¹⁶.

Existen varias confirmaciones acerca de la simultaneidad del proceso de traducción y plegamiento de las proteínas. En primer lugar se ve apoyado por el hecho de que la biosíntesis es un proceso vectorial, desde el extremo amino al carboxilo. Además, existen reportes en los que péptidos que están siendo sintetizados presentan estructuras particulares en las regiones que abandonaron el ribosoma. Esto ha sido detectado en algunos ejemplos en que el extremo amino terminal de un péptido adquiere una actividad biológica medible, lo que está asociado a la obtención de su conformación nativa ²⁷, o mediante el uso de anticuerpos conformacionales para epítopes constituidos en el extremo amino terminal de la molécula, cuando el resto del péptido permanece unido al ribosoma ²⁸.

El movimiento del ribosoma sobre el ARNm puede presentar pausas, resultando en un proceso discontinuo. Estas pausas pueden estar determinadas por la presencia de estructuras secundarias en el ARN, la utilización diferencial de codones sinónimos, y la interacción entre el péptido naciente y el ribosoma ¹⁶.

La secuencia del ARNm y la concentración de los ARNt podrían afectar la velocidad local de traducción, la primera modulándola de acuerdo a la utilización de codones sinónimos, y la segunda dependiendo de la disponibilidad celular de cada ARNt. En este contexto, aquellos codones raramente utilizados (o lentos) tenderían a disminuir la velocidad del ribosoma debido a que la concentración del ARNt complementario es baja, y por tanto el encuentro del mismo en el ambiente requerirá más tiempo. En el caso de los codones frecuentemente utilizados (rápidos), los ARNt complementarios se encuentran en una concentración mayor, de forma que el reconocimiento del codón requerirá un tiempo menor. La definición de lento o rápido para un codón varía entre las especies.

El sesgo en la utilización de codones sinónimos depende de diversos factores como selección hacia una traducción más rápida y eficiente, función del gen, tamaño del gen y contexto en el que se encuentra, composición GC del genoma, sesgo en la ocurrencia de mutaciones en las

hebras de ADN, conservación aminoacídica, hidrofobicidad de la proteína, y estructura y estabilidad del ARN ¹⁶.

En *E. coli* se ha reportado un importante sesgo en el uso de codones, particularmente en los genes de alta expresión. Esta observación refleja dos características acerca de la población de ARNt de la célula. En primer lugar, varios aminoácidos son unidos por más de una especie de ARNt con diferentes anticodones, y los codones traducidos por los ARNt más abundantes son los que serán preferentemente utilizados en genes de alta expresión. En segundo lugar, y dependiendo de la degeneración del código genético, algunos ARNt pueden traducir más de un codón pero con habilidad diferente, siendo el codón mejor reconocido por el anticodón el más utilizado en genes de alta expresión. Por tanto, conocer las características de la población de ARNt permitiría aproximarse a definir cuáles son los codones óptimos para una traducción más rápida y más fiel en un organismo. La abundancia de los ARNt ha sido medida en pocas especies, y parecería estar directamente relacionada a la cantidad de copias de los genes de ARNt.

En eucariotas existen menos estudios vinculados al efecto del uso diferencial de codones sinónimos sobre el plegamiento de proteínas. La determinación de la abundancia de los ARNts solo ha sido determinada para la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, siendo estimada por el número de copias de cada uno de ellos. Asimismo, el uso de codones sinónimos se ha estimado de acuerdo a la frecuencia en el uso en las proteínas de alta expresión ¹⁶.

La determinación de la abundancia de los ARNt en células humanas presenta dificultades técnicas mayores. Sin embargo ha sido posible estimarla en algunos tejidos del mismo organismo basados en la técnica de microarreglos, que permitió detectar variaciones de hasta 10 veces entre ellos ²⁹. La diferencia en cuanto a la expresión de los diferentes ARNt isoaceptores se relaciona significativamente con el uso de codones de genes altamente expresados en los diferentes tejidos.

2.4. Edición de ARN mensajero: Splicing.

Los genes de mamíferos están compuestos por varios exones interrumpidos por intrones. Los intrones y exones integran los transcritos primarios o pre-ARNm. Para generar el ARNm maduro correcto los exones deben ser debidamente reconocidos y unidos entre sí de forma precisa. El proceso de corte y empalme de los exones denominado splicing, requiere de la acción coordinada de moléculas de ARN pequeños nucleares, snARNs, y más de 60 péptidos. El incorrecto procesamiento del mensajero, ya sea por falso reconocimiento de los límites entre exones e

intrones, o la falla al remover un intrón o dejar presente un exón generan ARNm aberrantes que pueden ser inestables dentro de la célula o pueden codificar para proteínas defectuosas ³⁰.

2.4.1. El splicing: Componentes básicos.

La mayoría de los intrones contienen sitios específicos que intervienen en el proceso de splicing: el sitio de splicing 5' (5'ss), una secuencia de ramificación (BPS, Branch Point Sequence) seguida de pirimidinas, y el sitio de splicing 3' (3'ss) en el extremo 3' del intrón. Paradójicamente, estas son secuencias relativamente poco conservadas, al menos en eucariotas superiores, y cuanto más cerca o lejos se encuentren de las secuencias consenso serán reconocidos de mejor o peor forma por el spliceosoma. Los primeros son definidos como fuertes mientras que los restantes son denominados sitios débiles ³⁰. Un esquema de los sitios mencionados en el pre-ARNm y las secuencias consenso para cada uno de ellos se muestran en la Figura 2.

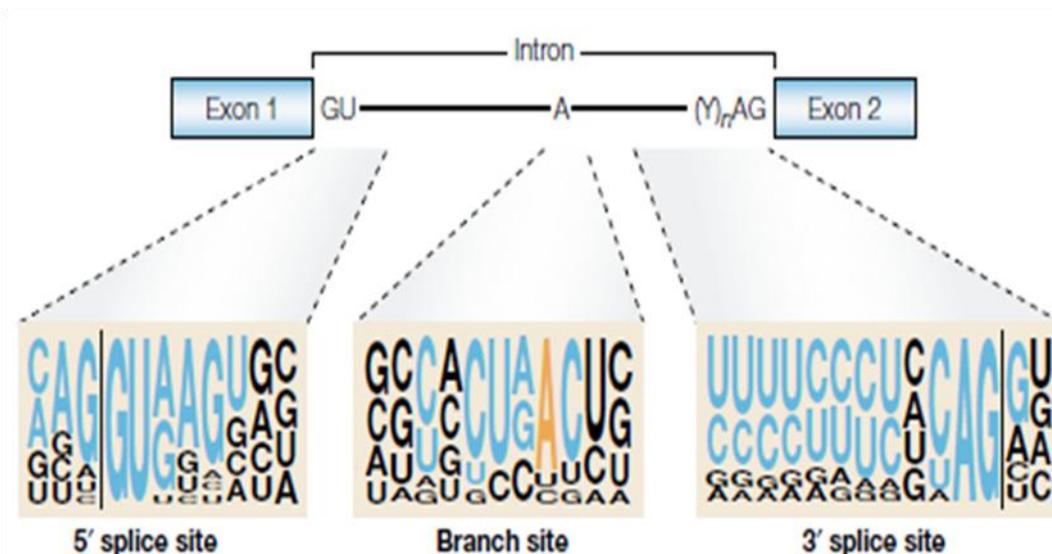


Figura 2. Señales reguladoras de splicing. Se muestran las secuencias conservadas en los sitios implicados en el splicing en intrones spliceosomales de eucariotas superiores. Los dinucleótidos conservados GU y AG localizados en los extremos 5' y 3' del intrón, respectivamente, la región de pirimidinas que precede al 3'ss, y el residuo A del sitio de ramificación se muestran en el pre-ARNm. Los motivos de secuencia que rodean a las regiones reguladoras se muestran abajo y el tamaño de las bases en una posición dada es proporcional a la frecuencia de ese nucleótido en cada posición, en alineamientos realizados con secuencias conservadas de 1683 intrones humanos. Los nucleótidos en color azul son aquellos que forman parte de las secuencias consenso definidas, excepto para la A del sitio de ramificación que se muestra en anaranjado. Tomado de Cartegni L., Chew S. L., and Krainer, A. R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* 3 285-298 ³⁰.

La maquinaria encargada de reconocer los límites de los exones, de escindir los intrones y unir los exones se denomina spliceosoma. Es un complejo formado por 5 pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) y más de 60 proteínas con funciones específicas que se unen de forma secuencial al pre-ARNm para llevar a cabo el corte y empalme de los exones. Análisis realizados por espectrometría de masas sobre spliceosomas purificados sugieren que las proteínas asociadas podrían alcanzar el número de 300³¹. Las moléculas de ARN de las snRNP interactúan con el intrón y están implicados en la catálisis. La estabilización del spliceosoma sobre el pre-ARNm se muestra en la Figura 3.

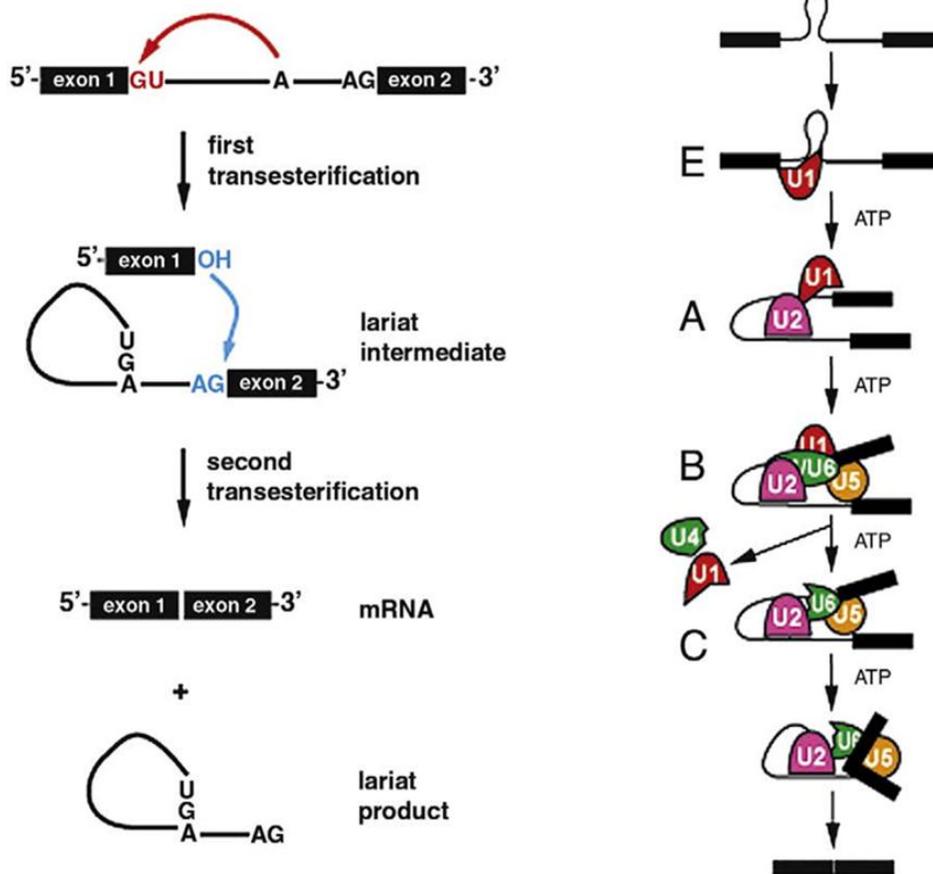


Figura 3. Ensamblado del spliceosoma y química del splicing. A la izquierda se muestran las reacciones de transesterificación secuenciales catalizadas por el spliceosoma hasta la unión de los exones y la escisión del intrón en forma de lazo. Se muestran los residuos involucrados en cada una de las reacciones. A la derecha se muestra el ensamblado secuencial de componentes del spliceosoma correspondientes a las snRNPs (U1, U2, U4/U6.U5) y los complejos formados en cada paso (E, A, B y C). Tomado de Ritchie, D. B., Schelleberg, M. J., MacMillan, A. M. Spliceosome structure: Piece by piece. 2009 *Biochimica et Biophysica Acta* 1789 624–633³².

La química del splicing involucra dos reacciones de transesterificación consecutivas. En el primer paso el extremo hidroxilo 2' de la adenina conservada en el BPS realiza un ataque nucleofílico al 5'ss de forma de dejar el exón 5' libre y un intermediario cíclico (lazo) conteniendo un enlace fosfodiéster 2'-5'. Un segundo ataque nucleofílico es realizado por el extremo hidroxilo 3' del exón 5' libre sobre el 3'ss generando la ligación de los exones involucrados y la liberación del intrón en forma de lazo³², como se ve en la Figura 3.

2.4.2. Splicing alternativo: Generador de diversidad proteica.

La idea de que en eucariotas un único transcrito primario puede guiar la producción de una única proteína ha caducado. Actualmente sabemos que el splicing alternativo, que permite que un "gen" pueda codificar para varias proteínas, no es un fenómeno poco frecuente como se suponía. En cambio, la elevada frecuencia del splicing alternativo permitiría explicar la sorprendente diferencia encontrada en el genoma humano, entre el número estimado de genes que codifican proteínas (aproximadamente 24.000) y el número de proteínas que se estima en el orden de las 100.000³³.

La determinación de qué es exón y qué es intrón depende del contexto celular, del tejido y de la etapa del desarrollo. En algunos casos, regiones que son escindidas del mensajero como intrones pueden ser secuencias codificantes en otros, por tanto formar parte de los exones. Un ejemplo muy interesante de splicing alternativo es el del gen *DSCAM* de *Drosophila melanogaster*, que codifica para una proteína de membrana involucrada en la conexión entre neuronas. Este gen contiene 24 exones con 12 posibles alternativas del exón 4, 48 versiones del exón 6, 33 versiones del 9 y 2 versiones del 17. Estas variantes a nivel del splicing pueden originar 38.016 proteínas diferentes relacionadas. Estimaciones recientes sugieren que los genes humanos que son editados mediante splicing alternativo ascenderían al 90%, valor que supera ampliamente el esperado³³.

La regulación de este mecanismo requiere estrategias y secuencias reguladoras específicas que guíen el correcto ensamblado de los ARNm, las que a su vez dependerán del estado del desarrollo o del tipo de célula en cuestión.

Más recientemente se ha identificado un grupo de elementos que regulan en *cis* el splicing alternativo, que son importantes para definir correctamente la presencia de un intrón o exón. Estas secuencias pueden actuar estimulando (potenciadores) o reprimiendo (silenciadores) el splicing, y además de actuar en el splicing general, resultan particularmente relevantes para regular el splicing alternativo. Los potenciadores de splicing de exones (ESEs, de Exonic Splicing

Enhancers) pueden estar presentes en la mayoría, sino en todos, los exones, incluyendo los constitutivos^{30,34}.

Los ESEs fueron inicialmente caracterizados como secuencias degeneradas ricas en purinas de entre 6 y 8 nucleótidos, pero actualmente han sido detectados motivos adicionales ricos en AC y ricos en pirimidinas^{35,36}. Estas secuencias son reconocidas por factores de splicing y son particularmente necesarias en exones rodeados por sitios de splicing débiles. Cada uno de los factores de splicing reconoce una secuencia de unión específica.

Los factores de splicing SR, son proteínas de unión al ARN, así denominadas por su particular riqueza en Serina y Arginina. Estas proteínas constituyen una familia de factores de splicing relacionados por la estructura y por una alta conservación, y están caracterizadas por la presencia de uno o dos dominios conservados de unión al ARN y un dominio carboxilo terminal distintivo enriquecido en dipéptidos de Ser y Arg (dominio SR). Las proteínas SR unidas a un ESE particular señalan la presencia de un exón que debe ser mantenido en el ARNm maduro. Las secuencias reconocidas por 4 proteínas SR humanas determinadas mediante el ensayo de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) se muestran en la Figura 4.

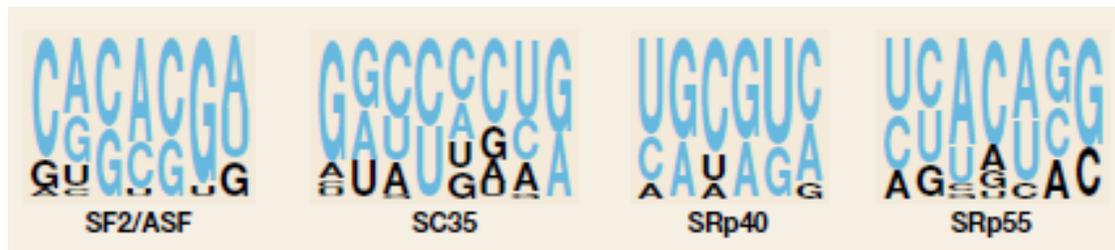


Figura 4. Secuencias de ESEs. Se muestran las secuencias consenso para 4 proteínas SR humanas, SF2/A2F, SC35, SRp40 y SRp55, obtenidas por el método de SELEX utilizando extractos de splicing S100 suplementados con cada una de las proteínas estudiadas purificadas, y un transcripto originado de un minigen de *IghM*. El tamaño de cada una de las bases en una posición dada es proporcional a la frecuencia de ese nucleótido en esa posición en alineamientos realizados al secuenciar los productos de splicing. Los nucleótidos en color azul son aquellos que forman parte de las secuencias consenso definidas. Tomado de Cartegni L., Chew S. L., and Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. 2002 Nature Reviews Genetics 3 285-298³⁰.

Los silenciadores, ESSs (de Exonic Splicing Silencers) por el contrario, se encuentran en exones que generalmente deben estar mantenidos en un estado silenciado, y que sólo deben ser expresados en circunstancias particulares. Para esto serán necesarios sitios de regulación de splicing fuertes (3' y 5'ss cercanos a los sitios consensos), y sobre todo el accionar de algún potenciador particular conjuntamente con su proteína SR asociada ³⁰.

2.5. Las mutaciones silenciosas tienen la palabra.

El 90% de la variación de la secuencia del genoma humano se debe a la ocurrencia de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), los que pueden ubicarse en diferentes zonas dentro y fuera del gen. Aquellos localizados sobre regiones codificantes pueden dividirse en sinónimos y no sinónimos. La presencia de mutaciones sinónimas ha sido considerada sin importancia por mucho tiempo asumiendo que por conservar la secuencia aminoacídica de la proteína, no tendría efecto sobre la función del gen.

En este estudio nos interesamos en comprender el rol que cumplen los codones raros en la expresión génica. La sustitución de codones sinónimos podría afectar: 1) La estructura secundaria del ARN. 2) La interacción con proteínas y la vida media del ARN. 3) El splicing del ARN. 4) La cinética local de traducción. 5) La conformación y solubilidad de la proteína.

En este trabajo nos propusimos analizar las mutaciones de *TP53*, encontradas en la patología tumoral en relación a la modificación del splicing, y al eventual efecto sobre la modificación de la velocidad de traducción vinculada a posibles cambios de conformación y función de la proteína.

2.5.1. Mutaciones en sitios de regulación y modificación del splicing: Base de enfermedades genéticas.

El efecto de las mutaciones sinónimas sobre el splicing ha sido reportado en algunas ocasiones ³⁷. Existen pocos reportes de mutaciones detectadas en elementos centrales de la maquinaria spliceosomal que resultan en enfermedades humanas. Por ejemplo, formas dominantes autosómicas de Retinosis Pigmentaria son causadas por mutaciones en los factores PRPF31/U4-61k y PRP8. La causa de esta baja detección se debe a que la presencia de defectos en componentes centrales del mecanismo no es compatible con el desarrollo de la vida ³⁸. Sin embargo, mutaciones sobre algunas de las secuencias reguladoras del splicing, ya sea del

mecanismo básico como del splicing alternativo, pueden ser toleradas por el organismo a pesar de generar diversos tipos de enfermedades genéticas.

Considerando que el splicing alternativo involucra casi el 90% de los genes humanos, es lógico pensar que cambios en el patrón de splicing inducidos por mutaciones estén frecuentemente asociados a enfermedades humanas. El problema en estos casos es definir si la modificación del patrón del splicing es responsable de la enfermedad, o si es un indicador de un defecto más profundo y anterior. El número de enfermedades reportadas que presentan asociación con modificación del splicing es elevadísimo y han sido frecuentemente revisadas^{30,34}, siendo el cáncer una de las más reportadas³⁹⁻⁴¹.

2.5.2. Modificación de la cinética traduccional y el plegamiento de proteínas.

Al contrario del sesgo hacia el uso de codones más frecuentes para maximizar la velocidad y la fidelidad del proceso de traducción, existen proteínas cuyos ARNm contienen zonas específicas en donde se concentran codones poco frecuentes o raros. Como ha sido reportado por investigadores de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias, la sustitución de codones raros de la proteína de unión a ácidos grasos de *Echinococcus granulosus*, EgFABP1 (de *Echinococcus granulosus* Fatty Acid Binding Protein 1) por codones sinónimos frecuentes, en una región bucle entre dos alfa hélices de la proteína, indujo en uno de los mutantes un incremento en la insolubilidad de la proteína, sin modificar los niveles totales de expresión en *E. coli*⁴². Además, esta acumulación de la proteína de forma insoluble indujo un incremento de 6 veces en la respuesta del gen reportero β -galactosidasa bajo el control de promotor de la respuesta a “Heat Shock”, como es el promotor de GroEL⁴².

Previamente, los estudios realizados *in silico* por Thanaraj y Argos⁴³, detectaron una correlación entre el uso de codones en el ARNm y la conformación topológica de la proteína. Así encontraron que las α -hélices tienden a estar codificadas por codones rápidos, mientras que regiones de hojas- β y conectores (“coils”) poseen preferentemente codones más lentos.

En este mismo sentido se analizaron las secuencias mayormente codificadas por codones lentos en el ARNm de 37 proteínas multidominio de *E. coli* con estructura conocida y se vio que estos codones se ubicaban preferentemente en zonas de unión entre regiones claramente estructuradas. Además, estas zonas son capaces de originar estructuras secundarias en el ARNm que podrían inducir una disminución de la velocidad de desplazamiento del ribosoma, lo que también apunta a la misma idea de enlentecimiento del proceso^{16,44}.

En eucariotas, en la levadura *S. cerevisiae*, se estudió en el gen *TRP3*, que codifica para una enzima bifuncional (Antranilato Sintasa II e Indol-Glicerol Fosfato Sintasa) constituida por dos dominios estructurales, una sustitución sinónima de codones raros por frecuentes. Esta sustitución de codón elimina una pausa en el segundo dominio, induce un descenso de la actividad del dominio en 1,5 veces, y afecta la estructura de toda la molécula ⁴⁵.

En células de eucariotas superiores los estudios son escasos. Sin embargo, existe un reporte en donde la presencia de un cambio puntual sinónimo en el gen de resistencia a Multidrogas 1 (*MDR1*, Multidrug Resistance 1) que codifica para la Glicoproteína-P (P-gp), induce alteraciones en las interacciones con drogas e inhibidores. La mutación introduce un codón raro en lugar de uno frecuente, y los autores hipotetizan acerca del efecto sobre el proceso de plegamiento co traduccional y la inserción de la proteína en la membrana, lo que alteraría la estructura de los dominios involucrados en las interacciones. Más allá de estos efectos, los niveles de expresión medidos a nivel de ARN y de la proteína no presentaron modificaciones ⁴⁶.

2.6. Proteína supresora de tumores; P53.

P53 es un factor transcripcional ubicuo que induce y/o reprime la expresión de diversos genes (ver Figura 5) vinculados a vías centrales de regulación como control del ciclo celular, apoptosis, reparación del ADN, senescencia ⁴⁷, entre otros. La activación transcripcional de P53 ocurre en respuesta a señales oncogénicas o de otro tipo de estrés celular pudiendo modular la actividad de diversas proteínas relacionadas a las funciones mencionadas anteriormente.

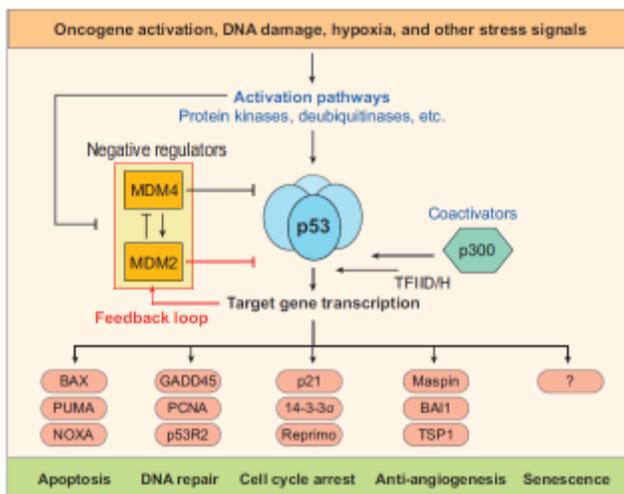


Figura 5. Esquema de la red de regulación central de P53. Se señalan algunas de las situaciones capaces de inducir la respuesta por parte de P53, así como factores co activadores de su función y reguladores negativos. Se indican también algunos de los genes blanco de P53 y los procesos a los que éstos están vinculados. Tomado de Joerger, A. C. and Fersht, A. R. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. 2008 Annu. Rev. Biochem. 77 557-582 ⁴⁷.

En los últimos años se han identificado diversos factores y situaciones que llevan a la activación de P53, como por ejemplo genotoxicidad, hipoxia, citoquinas, factores de crecimiento, estrés oxidativo, alteraciones metabólicas, contacto entre células, activación de oncogenes, acortamiento de telómeros y otras condiciones que dañan el ADN, escasez de nutrientes, falta de ribonucleótidos trifosfato en el pool celular, entre varios otros ⁴⁸.

La regulación de los niveles de P53 es compleja y abarca la transcripción, traducción y degradación proteica. En situaciones normales, P53 se encuentra unido a Hdm2, quien media su localización citoplasmática y su degradación por la vía del proteosoma, ya que se trata de su E3 ubiquitin ligasa. Frente a la señal de estrés, una serie de fosforilaciones en el dominio TAD de P53 llevan a su estabilización y escape de Hdm2. La proteína libre expone la señal NLS y migra al núcleo en donde inducirá la expresión de genes de respuesta a la señal. A su vez, Hdm2 es inducido por P53, por lo que se genera un incremento en los niveles de ésta aumentando la degradación de P53, promoviendo su monoubiquitinación y retención en el citoplasma, o poliubiquitinación y degradación por el proteosoma. Más recientemente, se ha visto que Hdm2 es capaz de interactuar con el propio ARNm de P53 favoreciendo su traducción, y esta interacción está mediada por los nucleótidos que codifican para los aminoácidos que establecen la unión a nivel proteico ⁴⁹. En la proteína Hdm2, los sitios de unión al ARNm de *TP53* y de unión a la proteína P53 están solapados, siendo el dominio RING de unión al ARN próximo al E3 ubiquitin ligasa ^{49,50}.

Los procesos involucrados en la activación de P53 derivan en general en una respuesta antiproliferativa que previene la acumulación de alteraciones genéticas. Esta acumulación de errores sucede en los casos en que las células escapan a la regulación, son capaces de replicar en condiciones no aptas, y constituyen el comienzo de la enfermedad.

2.6.1. Estructura génica de *TP53*.

El gen *TP53* mapea en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y tiene una extensión de 19.179 nucleótidos, que se distribuyen en 11 exones y los correspondientes 10 intrones. No todos los exones están representados a nivel proteico. El primer exón cumple rol regulatorio e incluye la región 5'UTR. El inicio de la traducción se ubica en el comienzo del exón número 2.

2.6.2. P53: Organización de los dominios y funciones.

P53 es un tetrámero formado por 4 monómeros idénticos de 393 aminoácidos y 43,7 kDa. Su denominación hace referencia al peso molecular aparente, estimada a partir de su migración en

SDS-Page como una molécula de 53 kDa (como consecuencia del elevado número de residuos de Prolina). Las 4 subunidades son unidas por un dominio de tetramerización ubicado en el extremo carboxilo terminal.

Cada monómero tiene la estructura característica de los factores de transcripción que incluye un dominio de transactivación mayor TADI (Trans Activation Domain) situado en el extremo amino terminal (residuos 1 a 40), seguido de uno menor TADII (residuos 43 al 73); una región rica en Prolinas (PRR, Proline Rich Region) que abarca la zona de residuos 65 a 97; un dominio central de unión al ADN (DBD, DNA Binding Domain) que incluye los residuos comprendidos entre el 102 y el 292; un dominio bisagra que contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) y que comprende los residuos 300 a 325; el dominio de tetramerización (TET, Tetramerization Domain) comprendido entre los residuos 325 y 356; finalmente una región básica carboxilo terminal definida entre el residuo 363 y el 393 final.

La estructura tridimensional del tetrámero y del monómero entero de P53 no se ha podido resolver. Sin embargo, se han obtenido cristales de algunos de los dominios y se han propuesto diversos modelos que brindan información acerca del accionar de P53, como se muestra en la Figura 6A. El dominio TAD es un sitio de unión para diversos factores. Entre ellos se encuentran algunos componentes de la maquinaria transcripcional, como los factores TAFII31, TAFII40 y TAFII60 pertenecientes al complejo de inicio de la transcripción TFIID (fundamentales para que se dé la activación de la transcripción mediada por P53). También posee zonas de interacción con coactivadores de la transcripción como p300 y CBP (CREB Binding Protein), y sitios de interacción para la proteína Hdm2 (o Mdm2 en ratones), su E3 ubiquitin ligasa y principal regulador dentro de la célula. Esta región parecería no tener un plegamiento definido, algo que es característico de proteínas que llevan a cabo su función en el centro de vías de señalización. Esta característica es particularmente notoria en factores de transcripción, de forma de facilitar la interacción y unión con muchos blancos de forma altamente específica ⁴⁷.

Como indica su nombre, la región PRR presenta varios residuos de Prolina, que en P53 humano se organizan en 5 sitios PXXP involucrados con interacciones proteína-proteína mediante unión a dominios SH3 (Src Homology 3) ⁴⁷.

La información estructural disponible acerca del dominio DBD es amplia. Diversos estudios han resuelto la estructura de esta región de la molécula en solución y en cristales, de forma libre o unida a diferentes moléculas de ADN, así como también la correspondiente a los homólogos en ratón y *Caenorhabditis elegans*, y muchos mutantes. Este dominio presenta una estructura de β -

sandwich tipo inmunoglobulina que es la base de la que emergen los motivos loop-hoja-hélice y dos loops estabilizados por un átomo de Zn, capaces de unirse al surco mayor y menor del ADN, respectivamente, como se ve en la Figura 6B.

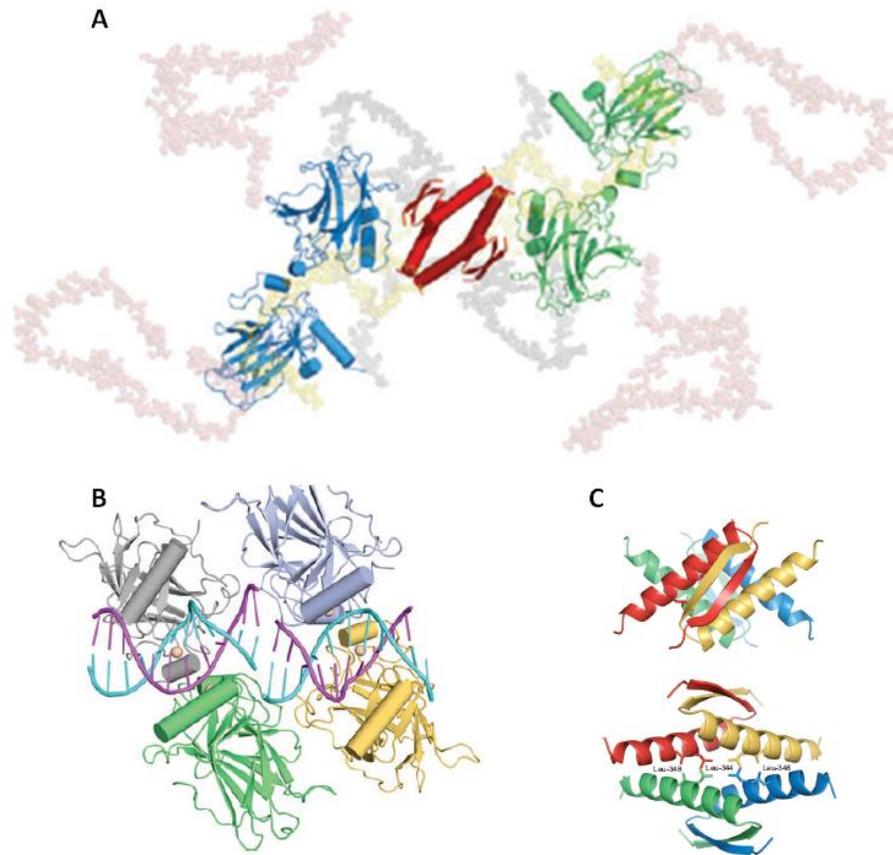


Figura 6. Estructura de P53. Se muestran modelos y estructuras resultas de diferentes dominios de la proteína. 6A: Modelo del tetramero de P53 en solución de acuerdo a datos de difracción de rayos X. Los dominios DBD (azul y verde) y TET (rojo) se representan como “cartoons”, mostrando los dominios DBD de la misma zona de la proteína en el mismo color. Zonas conectoras flexibles (gris), región N-terminal (rosado) y región C-terminal (amarillo) que no presentan conformación definida se muestran de forma semitransparente para indicar el espacio que se estima ocupan. 6B: Dominios DBD unidos a dos motivos de unión de ADN consecutivos, obtenido por difracción de rayos X sobre cristales de los complejos (número de acceso PDB 2AHI). 6C: Estructura cristalográfica del dominio TET de P53 ensamblado formando un tetrameros, mostrada en dos orientaciones diferentes (número de acceso PDB 1C26). Se muestran los residuos de Leu que estabilizan la estructura. Tomado de Joerger, A. C. and Fersht, A. R. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. 2008 Annu. Rev. Biochem. 77 557-582 ⁴⁷.

La forma activa de P53 es un tetrámero definido como un dímero de dímeros. El dominio TET localizado hacia el extremo carboxilo terminal presenta una cadena β unida a una hélice- α por una vuelta que contiene una Glicina, y del que se cuenta con información resuelta por cristalografía de rayos X ⁴⁷, la que se muestra en la Figura 6C.

El extremo carboxilo terminal es intrínsecamente desordenado pero puede describir transiciones de orden-desorden luego de unirse a proteínas o de forma inespecífica al ADN mediante interacciones electrostáticas. Esta región es el blanco de varias modificaciones post traduccionales como acetilación, ubiquitinación, fosforilación, metilación, capaces de regular la actividad de la proteína y su nivel dentro de la célula.

2.6.3. Isoformas de P53.

La proteína completa tal cual fue descrita más arriba no es el único producto del gen *TP53*. A partir de éste se producen otras proteínas, variantes transcripcionales (por la presencia de tres sitios de inicio de la transcripción posibles), de splicing y traduccionales (por la presencia de tres sitios de inicio de la traducción), cuya función y patrones de expresión aun no han sido establecidos completamente. Desde al año 2002 se han descrito 10 isoformas, algunas de las cuales juegan un rol en la modulación de la capacidad supresora de P53 y otras presentan actividades propias.

La gran mayoría de estas 10 isoformas comparten el DBD pero difieren en el extremo amino terminal (TA, ΔN y $\Delta 133$) y carboxilo terminal (α , β y γ). La forma denominada TA contiene el dominio TAD completo como diferencia de las formas ΔN y $\Delta 133$, que carecen de los primeros 39 o 132 aminoácidos, respectivamente. Con respecto a las diferencias presentes hacia el extremo carboxilo terminal, las formas α contienen el dominio TET completo, mientras que en las formas β y γ éste se encuentra truncado y reemplazado por 10 o 15 aminoácidos adicionales, respectivamente. La combinación de estos 6 extremos origina 9 combinaciones teóricas posibles: P53 canónica (TAp53 α), P53 β (TAp53 β), P53 γ (TAp53 γ), $\Delta NP53$ ($\Delta Np53\alpha$, también conocida como p44, p53/47 o $\Delta 40p53$), $\Delta NP53\beta$, $\Delta NP53\gamma$, $\Delta 133P53$ ($\Delta 133p53\alpha$), $\Delta 133P53\beta$ y $\Delta 133P53\gamma$. A éstas se le suma una décima isoforma, $\Delta P53$, a la que le falta parte del dominio DBD y TET. La producción de cada una de ellas involucra mecanismo regulatorios a nivel de transcripción, edición del ARN y traducción, y la presencia en sistemas vivos no ha sido detectada para todos los casos ⁵¹. Esta compleja red de isoformas podría explicar la diversidad de funciones que cumple P53 en la célula.

2.6.4. Elementos de respuesta de P53.

P53 es capaz de inducir la transcripción de genes específicos que contengan una secuencia de ADN doble hebra específica de dos decámeros palíndromos entre sí de la forma general 5'RRRCWWGYYY3' (R = A, G; W = A, T; Y = C, T), con una separación de entre 1 o 13 pares de bases. Cada par de decámeros son unidos por un tetrámero de P53 de forma cooperativa ⁴⁷.

La afinidad con la que P53 se une a los elementos de respuesta de diferentes genes depende de la secuencia. Los valores de afinidad no presentan estricta relación con la función del gen, aunque existe una tendencia en presentar mayor afinidad en los genes vinculados al arresto del ciclo celular y reparación del daño del ADN en comparación a los genes relacionados con la apoptosis ⁴⁷. Los tres elementos de respuesta utilizados en este estudio son los siguientes:

1) Elemento de respuesta en el gen *p21*. *p21* induce la detención del ciclo celular en la fase G1 cuando la reparación celular resulta inviable. En respuesta a señales detectadas por P53, ésta activa la transcripción de *p21* uniéndose al elemento de respuesta de 20 pb (5'-GAACATGTCCAACATGTTG-3') ubicado 2,4 kb río arriba del promotor de *p21* en humanos.

2) Elemento de respuesta del gen *Bax*. *Bax* es una proteína proapoptótica también inducible por P53 a nivel de la transcripción. Sin embargo, P53 también regula a *Bax* mediante interacciones específicas, promoviendo su activación e inserción en la membrana mitocondrial, lo que desencadena la apoptosis. El elemento de respuesta de *Bax* tiene 39 pares de bases (5'-TCACAAGTTAGAGACAAGCCTGGGCGTGGGCTATATTG-3') y se encuentra a unos 500 pb de su promotor.

3) Elemento de respuesta de RGC. El agrupamiento de genes ribosomales (RGC; Ribosomal Gene Cluster) presenta en la región espaciadora no transcripta, 3,5 kb antes del sitio de inicio del ARNr 45S, un sitio de unión para P53 de 33 bases, constituido por repetidos de TGCCT que funciona como activador transcripcional del ARNr ^{52,53}.

2.7. Mutaciones en TP53 en cáncer.

Las variaciones genéticas en el gen *TP53* están asociadas al cáncer ⁵⁴. Según el tipo de cáncer, hasta el 50% de los tumores pueden contener alguna mutación en *TP53*. La base de datos IARC TP53 (www.-p53.iarc.fr) recopila las variaciones de secuencia del gen de *TP53* reportadas en el cáncer humano ⁵⁵.

Las mutaciones que implican un cambio del marco de lectura (frameshift) o la interrupción prematura de la traducción (non sense) llevan claramente a la inactivación de la proteína. El 90% de las mutaciones identificadas en *TP53* son puntuales, y tienen como consecuencia un cambio único de amino ácido que en su mayoría altera la unión de P53 al ADN. Se concentran en la zona comprendida entre los exones 5 y 8 del gen y afectan el dominio DBD implicado en el reconocimiento y unión al ADN. En tanto que el 5% de las mutaciones puntuales son silenciosas o sinónimas ya que conservan el amino ácido. Este porcentaje es 20 a 100 veces mayor al esperado si se considera que tales mutaciones no afectan la funcionalidad de la proteína ³⁶.

Dos hipótesis encontradas intentan explicar la alta tasa de mutaciones sinónimas encontradas en *TP53* en muestras de cáncer humano. La primera señala que las mismas son efectivamente neutras y que no juegan un rol importante en la generación de la enfermedad, y que su presencia en alta frecuencia es una mera consecuencia del estado de hipermutabilidad que puede afectar a las células cancerosas ⁵⁶.

Sin embargo, una alta proporción de las mutaciones sinónimas descritas en *TP53* en tejidos tumorales se encuentra presente de forma aislada, sin otro tipo de cambio en el gen ³⁶. Esto podría explicarse considerando que las mutaciones son causadas por el estado de hipermutabilidad, y que la enfermedad es originada por mutaciones tumorigénicas presentes en otro gen vinculado al cáncer y no en *TP53* ^{36,56}.

En cualquier caso, las mutaciones sinónimas podrían afectar, como hemos visto anteriormente, diferentes procesos en la expresión de un gen. Con respecto a este estudio, ciertas mutaciones sinónimas podrían alterar el splicing normal de *TP53* a dos niveles: 1) Si alteran los sitios frontera intrón-exón, sitios donadores y aceptores de splicing, y 2) Si modifican los potenciadores de splicing o ESEs. El análisis bioinformático de las secuencias realizado previamente sugiere que no existe una asociación entre la alta frecuencia de mutaciones sinónimas y la modificación de la unión intrón-exón, pero sí con la ubicación de los posibles ESEs ³⁶. Los resultados de este estudio *in silico* podrían explicar el efecto de ciertas mutaciones sinónimas de *TP53* en relación al cáncer. Además, las mutaciones podrían afectar la estructura y función de la proteína modificando la cinética traduccional y plegamiento de P53, como ha sido expuesto más arriba.

Por tanto, en este trabajo nos propusimos buscar y comprender el eventual efecto de mutaciones sinónimas en *TP53* en cáncer a dos niveles de expresión del gen como se detalla más adelante.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

El objetivo general de este proyecto es establecer el significado de la presencia de un elevado número de mutaciones sinónimas en el gen *TP53* relacionadas al cáncer. En particular se pretende comprender el efecto de mutaciones en *TP53* a dos niveles de la expresión del gen.

3.2. Objetivos específicos.

- 1) Identificar mutaciones en la secuencia codificante de *TP53* en muestras de cáncer colorectal, y explorar si algunas de ellas pueden estar relacionadas con alteraciones de la edición del ARNm.

- 2) Estudiar el eventual efecto de algunas mutaciones sinónimas sobre la función/estructura de P53, mediante la medida de la actividad de transactivación de P53 sobre un gen reportero regulado por elementos de respuesta en levaduras, y a través de la estimación del nivel producido de diferentes variantes conformacionales en cultivos de células humanas, estimado por inmunoprecipitación con anticuerpos conformacionales.

4. Análisis de la secuencia codificante de *TP53* en muestras tumorales.

En esta parte del trabajo nos centramos en analizar la región codificante de *TP53* en muestras de cáncer colorectal (CRC), procurando identificar mutaciones asociadas a esta enfermedad. La determinación de la secuencia del ARNm de *TP53* permite caracterizar el alelo expresado en el tumor, así como detectar eventuales alteraciones del splicing.

4.1. Materiales.

Las muestras de CRC analizadas provenientes de la población brasilera se encontraban almacenadas en el banco de tumores del Hospital de Cáncer A. C. Camargo, San Pablo, Brasil.

La elección de las muestras atendió en primer lugar a la existencia de datos clínicos de los pacientes.

En segundo lugar consideramos la cantidad de células transformadas en la muestra; aquellas seleccionadas presentan más del 60% de células con fenotipo transformado. Esta cuantificación fue realizada mediante tinción con Hematoxilina y Eosina sobre cortes de tejido.

A su vez, se tomaron los datos de inmunohistoquímica (IHC) realizados por anatomopatólogos del Hospital, sobre tejidos de CRC conservados en parafina. Dichos ensayos fueron realizados usando 100 μ L de una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal anti P53 (clon DO-7, Dako), 100 μ L del sistema de amplificación de señal Advance HRP Link Polymer Amplification System (Dako), y 100 μ L de una dilución 1:50 de 3,3' diaminobenzidinetetrahydrochloride, DAB, (Dako) como cromógeno.

Aquellas muestras que contenían más del 60% de células transformadas, de las cuales menos del 20% presentaban señal positiva para P53 en el ensayo de IHC fueron definidas como negativas para este fenotipo. Basado en este criterio, fueron generados dos grupos de estudio conteniendo número similar de muestras con el fin de analizar el patrón de mutaciones en *TP53*. Así, contamos con 49 muestras con señal positiva para P53 y 51 con señal negativa (ver Tabla anexa A2: Muestras seleccionadas).

4.2. Métodos.

4.2.1. Extracción, caracterización y análisis de ácidos nucleicos.

- Extracción de ARN.

Se empleó un método estándar basado en Trizol, utilizado de rutina en el Hospital A. C. Camargo, sobre las células fenotípicamente transformadas aisladas del resto de células normales presentes en el tejido. Básicamente, la lisis de las células (50 a 100 mg de tejido) se realizó mediante la adición de 1 mL de Trizol frío en los tubos conteniendo esferas magnéticas del kit Precellys® (Bertin Technologies), y se realizaron hasta tres pulsos de 10 s (o hasta obtener una muestra homogénea) en el homogeneizador a velocidad máxima (6.500 r.p.m.). Se recuperó el lisado y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para favorecer la degradación de la matriz y membranas celulares. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y se recuperó la fase superior correspondiente al ARN, la que se transfirió a un nuevo tubo para realizar una extracción con cloroformo. Luego de centrifugar a 12.000 g a 4 °C durante 15 min, se recuperó el sobrenadante y se precipitó el ARN con 1 volumen de isopropanol y 20 µg de glicógeno durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavó el precipitado con etanol 70% (DEPC) frío, se secó y se resolubilizó en agua (DEPC) mediante incubación en baño de agua a 55 °C durante 10 min.

- Cuantificación de ARN.

Se estimó la concentración mediante medidas de absorbancia en ultravioleta ($\lambda=260$ nm) en el NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) utilizando 1 µL de muestra.

- Evaluación de la calidad de ARN.

Se analizó en un Picochip 6000 en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent), utilizando 1 µl de muestra y atendiendo a los límites de concentración establecidos en el kit. Muestras con valores de R.I.N (RNA Integrity Number) menores a 2 fueron descartadas del estudio.

- Retrotranscripción del ARN total.

Se sintetizó ADN copia utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µL conteniendo 1 µg de ARN total. Las condiciones de la reacción se eligieron siguiendo las recomendaciones del fabricante: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C, y la incubación se realizó en el equipo Mastercycler Eppgradient (Eppendorf).

- Amplificación del ADN copia (ADNc) de *TP53*.
La región codificante de *TP53* (1182 nucleótidos) fue amplificada en dos fragmentos solapantes: Fragmento 5' que abarca la zona comprendida entre los nucleótidos -54 y 654, y fragmento 3' que incluye los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 571 y 1215, definiendo como posición +1 la adenina correspondiente al codón ATG de inicio de la traducción.
Ambas reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 μ L, conteniendo 1 μ L de producto ADN copia sin purificar, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,3 μ M de cada uno de los cebadores y 1,5 U de enzima ADN polimerasa (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen). Las reacciones fueron incubadas en el equipo Mastercycler EppGradient (Eppendorf) en las siguientes condiciones: 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 30 s a 52 °C para el fragmento 5' (cebadores: E2ForE y E6RevE) y 51 °C para el fragmento 3' (cebadores: E6ForE y E11RevE) (ver Tabla anexa A1: Cebadores utilizados), y una extensión de 2 min a 72 °C.
- Purificación del producto de PCR.
El producto de PCR se purificó mediante utilización del kit ExoSAP-IT (Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de camarón, USB) atendiendo a las recomendaciones del fabricante, incubando la reacción a 37 °C durante 30 min seguidos de un paso de inactivación de las enzimas a 80 °C durante 15 min.
- Secuenciación de ADN.
Se utilizó el kit BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones; 2 μ L del ADN purificado y 0,5 μ M del cebador (E2ForI y E6RevI para el fragmento 5', y E6ForI y E11RevI para el fragmento 3' (ver Tabla anexa A1: Cebadores utilizados), y se incubó de la siguiente forma; 18 s a 95 °C, 18 s a 52 °C y 4 min a 60 °C, un total de 40 ciclos, en el equipo Mastercycler EppGradient (Eppendorf). El producto se precipitó con EDTA 0,125 mM pH 8,0, NaAc 0,3 M y 2,5 volúmenes de Etanol 100%. El ADN lavado con Etanol 70% y secado, se resolubilizó en 15 μ L de formamida altamente deionizada (Hi-Di™, Applied Biosystems), se incubó durante 3 min a 95 °C para desnaturalizar, y se inyectó en el equipo ABI PRISM 3100 Automated Genetic Analyser (Applied Biosystems), valiéndonos de la plataforma de secuenciación del Hospital de Cáncer A. C. Camargo, San Pablo, Brasil.
- Análisis de secuencias obtenidas.

Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el programa BioEdit Aligment Editor (v7.0.0). Las secuencias obtenidas de ambos fragmentos se ensamblaron utilizando la aplicación Artemis (V8). Todas las comparaciones y análisis se realizaron tomando como referencia la secuencia de *TP53* definida como salvaje depositada en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnonology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), número de acceso NC_000017.

4.3. Resultados.

Como un objetivo central del proyecto nos propusimos analizar la secuencia codificante completa de *TP53*, a través del análisis del ARNm expresado, y determinar el patrón de mutaciones en CRC.

Se optó por analizar el ARNm de *TP53* para determinar el alelo realmente expresado en cada muestra. Por otro lado, esta aproximación permite detectar eventuales modificaciones que pudiesen alterar el perfil de splicing normal de *TP53*.

A su vez, decidimos comparar el patrón de mutaciones presente en dos grupos de muestras: El grupo de muestras que presentan acumulación de P53, grupo denominado P53 positivo, y el de las que no presentan acumulación, grupo P53 negativo. Esta clasificación se realizó en base al resultado de IHC sobre cortes histológicos preservados en parafina, en muestras conteniendo más del 60% de células fenotípicamente transformadas, de acuerdo a la tinción con Hematoxilina y Eosina. Aquellas muestras que presentaron más del 20% de células con señal de P53 fueron incluidas dentro del grupo P53 positivo, mientras que valores menores resultaron en la inclusión de la muestra en el grupo P53 negativo.

Para determinar la secuencia de la región codificante de *TP53* expresado en tejidos de CRC, las muestras seleccionadas provenientes de remociones quirúrgicas fueron tratadas con Trizol y homogeneizadas. Del lisado celular se obtuvo el ARN total mediante una extracción con cloroformo. Éste fue utilizado para generar ADN copia con cebadores al azar. El producto fue utilizado como molde para amplificar por PCR la región codificante de *TP53* en dos fragmentos solapantes, utilizando cebadores específicos (ver Figura 7). Los amplicones obtenidos fueron purificados y secuenciados valiéndonos de la plataforma de secuenciación del Hospital. Las secuencias obtenidas se analizaron (con el programa BioEdit Aligment Editor (v7.0.0) y la

aplicación Artemis (V8)) y fueron comparadas con la secuencia salvaje del gen depositada en la base de datos del genbank (número de acceso NC_000017).

4.3.1. Patrón de mutaciones.

De la totalidad de muestras analizadas en este estudio (101 muestras), 55 de ellas (54,5%) presentaban al menos una mutación en la secuencia codificante de *TP53*.

El número y tipo de mutaciones detectadas para ambos grupos difiere notablemente. Dentro del grupo P53 negativo, 16 de los 52 tumores (30,8%) presentaron algún tipo de cambio en la secuencia codificante de *TP53*. Cada una de estas muestras contiene una única mutación específica que no se repite dentro de este grupo de muestras. Las mutaciones detectadas en este grupo se detallan a continuación: 6 mutaciones de cambio de aminoácido (missense), 3 inserciones y 4 deleciones, 2 mutaciones sin sentido (nonsense), y una mutación sinónima. La mayoría de las inserciones y deleciones, 3 para cada caso, generan un cambio en el marco de lectura del mensajero, mientras la restante deleción involucra una región de 21 nucleótidos que elimina 7 aminoácidos del dominio DBD sin afectar el marco de lectura. De esta manera se produce una proteína P53 más pequeña, a la que le falta una región perteneciente al dominio DBD, y es nombrada como “otras” (ver Tabla 2).

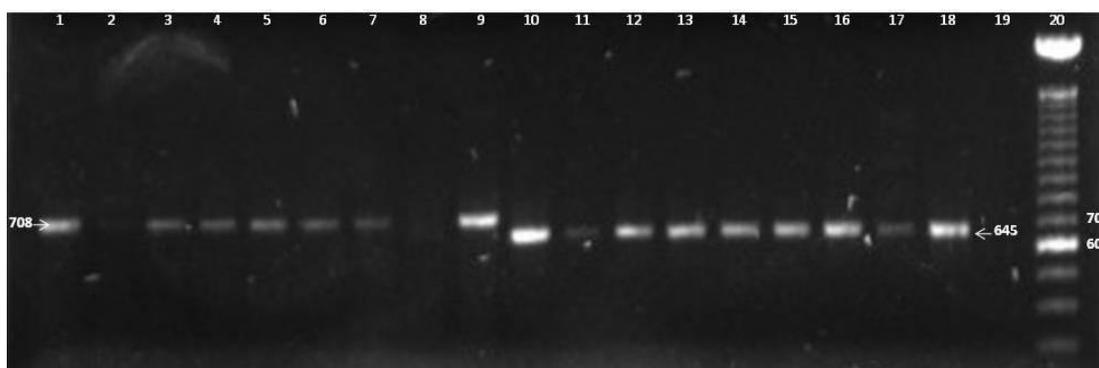


Figura 7. Amplificación de *TP53* de muestras tumorales. Se analizaron los productos de reacción de PCR utilizando como molde ADNc de muestras tumorales y los cebadores E2ForE y E6RevE para el fragmento 5' (708 pb), y E6ForE y E11RevE para el fragmento 3' (645 pb). Se sembraron 5 μ L de producto de reacción en el gel de agarosa conteniendo SyberSafe 1X. Carriles 1-9 y carriles 10-18: Fragmento 5' y 3' de *TP53*, respectivamente, de muestras 118, 129, 131,153,113, 115, 117, 123 y 125. Carril 19 vacío. Carril 20: Marcador de peso molecular, 100 pb ladder, Invitrogen.

Tabla 2. Número de muestras con mutaciones en *TP53* en los grupos P53 positivo y negativo. Se indica el número de muestras en las que se identificaron diferentes tipos de mutaciones en la secuencia codificante de *TP53*.

Tipo de mutación	P53 positivo n = 49	P53 negativo n = 52
Cambio de aminoácido	38	6
Sin sentido	0	2
Cambio de marco	1	6
Sinónima	0	1
Otras	0	1
Total	39 (79,6%)	16 (30,8%)

Mientras tanto, de las 49 muestras del grupo P53 positivo 39 contienen alguna mutación en la secuencia codificante de *TP53*, lo que representa el 79,6%. La amplia mayoría de las muestras contiene alguna mutación en *TP53* que genera un cambio de aminoácido (38 de 39, 97,4%), mientras que sólo una presenta un cambio que consiste de una delección que produce un corrimiento del marco de lectura. En este grupo de muestras se observa que algunas mutaciones se encuentran presentes en más de una muestra.

4.3.2. Efecto y posición de las mutaciones detectadas.

En las 55 muestras que contienen alguna mutación en *TP53* fueron identificadas 40 mutaciones diferentes. Excepto las mutaciones que codifican para un cambio de aminoácido, el número de mutaciones y la distribución de las mismas se corresponden con los valores expuestos más arriba para el patrón de mutaciones en los grupos P53 positivo y P53 negativo. Esto quiere decir que cada una de las mutaciones que no inducen un cambio de aminoácido fue observada una única vez en una sola muestra. Sin embargo, en el caso de las mutaciones que generan un cambio de aminoácido se observa que varias de ellas se repiten en diferentes muestras. De esta manera, se identificaron 29 mutaciones de este tipo que se distribuyen en 44 muestras, siendo algunas de las mutaciones compartidas por más de una muestra. El resto, como se describió más arriba consiste de 7 mutaciones que inducen el cambio del marco de lectura del mensajero (4 inserciones y 3 delecciones), 2 mutaciones sin sentido, 1 mutación sinónima, y 1 delección que no induce el cambio de lectura y que se nombra como “otras”, ver Figura 8.

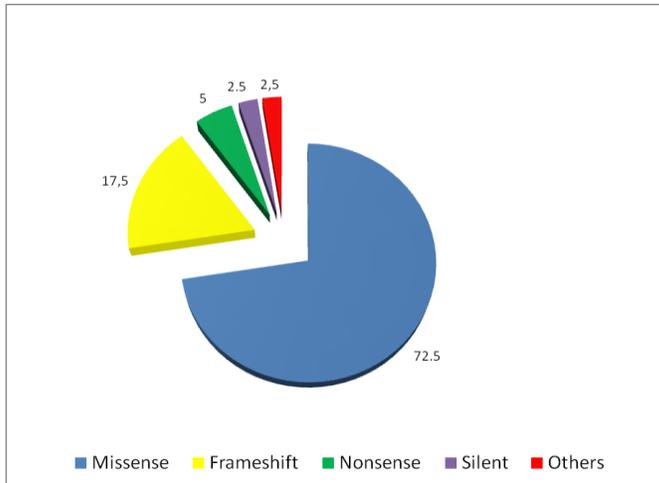


Figura 8. Patrón de mutaciones en *TP53* en CRC. Se muestra el número de mutaciones de cada tipo detectadas en este estudio. Los valores se expresan como porcentajes del número total de las diferentes mutaciones detectadas, que asciende a 40.

Como se recopila en la Tabla 3, 24 de las 40 mutaciones se encuentran solo en muestras del grupo P53 positivo, de las cuales 23 generan cambio de aminoácido y una produce una delección que cambia el marco de lectura. Todas ellas fueron localizadas en el dominio DBD. Otras 15 mutaciones fueron identificadas en muestras del grupo P53 negativo, de las cuales 5 codifican un cambio de aminoácido en el dominio DBD, 6 inducen un cambio del marco de lectura, 2 son mutaciones sin sentido (una localizada en el dominio DBD y otra en el dominio TET), una delección sobre el dominio DBD que no cambia el marco de lectura, y una mutación sinónima ubicada en el dominio TET de P53. Finalmente, una mutación de cambio de aminoácido fue observada en ambos grupos; 2 veces en el grupo P53 positivo y 1 vez en el grupo P53 negativo.

Las mutaciones puntuales se concentran en unos pocos codones. De un total de 393 codones codificantes de *TP53*, solamente 24 se ven afectados por este tipo de cambio (excluidos los polimorfismos 215C>G y 108G>A, ver más adelante). Los codones más frecuentemente alterados corresponden al dominio DBD. En relación a las muestras analizadas en este trabajo, 22 de los 24 (91,7%) codones afectados se encuentran en este dominio de la proteína, y solamente 2 (8,3%) pertenecen a otro dominio, en este caso el dominio TET. No se identificaron mutaciones puntuales en los otros dominios de la proteína (ver Figura 9).

Los codones más frecuentemente mutados son el 175, 248 y 273, que codifican los tres para Arg, pertenecen al dominio DBD, y en conjunto concentran el 36,7% de las mutaciones puntuales detectadas (6, 7 y 5 mutaciones, respectivamente).

Tabla 3. Número de mutaciones diferentes detectadas en los grupos de muestras de tumores P53 positivo y negativo. Se agrupan dependiendo del tipo de mutación.

Tipo de mutación	P53 positivo	P53 negativo	P53 positivo y negativo
Cambio de aminoácido	23	5	1
Sin sentido	0	2	0
Cambio de marco	1	5	0
Sinónima	0	1	0
Otras	0	2	0
Total	24	15	1

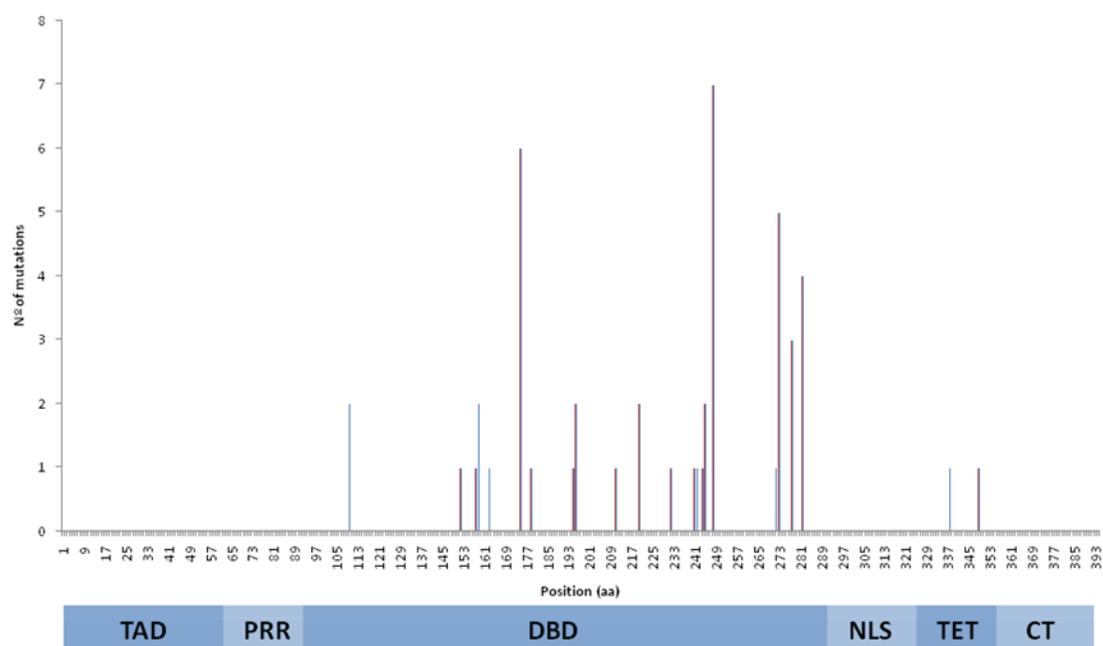


Figura 9. Histograma de mutaciones puntuales detectadas por codón en *TP53*. Se muestra el número de mutaciones detectada en relación a cada codón de P53 y a los dominios de la proteína (representados más abajo). TAD; Dominio de Transactivación, PRR; Región rica en Prolinas, DBD; Dominio de unión al ADN, NLS; Señal de localización nuclear, TET; Dominio de tetramerización, CT; Dominio carboxi terminal.

4.3.3. Tipos de cambio.

Sin considerar los cambios nucleotídicos involucrados en los polimorfismos descritos más adelante, se encontró que la alteración de secuencia más frecuente en la región codificante de *TP53* fue la transición de C>T, la que representa el 49,0%. Luego se encuentra la transición G>A, representando un 26,5%, luego la transversión G>T con el 6,1%, las transiciones T>C y A>G cada

una de ellas correspondiente al 4,1%, y finalmente las transversiones A>C, G>C, C>G, C>A y A>T, cada una de ellas sumando un 2,0% del total de cambios (ver Tabla 4). En su conjunto, los cambios de C>T y A>G representan el 75,5% de los cambios de bases detectados, un porcentaje notablemente superior al esperado para un patrón de mutaciones al azar. Este valor puede deberse a la contribución de los cambios que ocurren en sitios CpGs que mutan a una velocidad 10 veces mayor que el resto de las secuencias nucleotídicas, y que en cáncer también presentan un alto grado de variación.

Tabla 4. Cambios de bases en las mutaciones puntuales. Se muestra el número de diferentes cambios de bases detectados en la secuencia codificante de *TP53* en muestras de CRC. Se muestra el número de los diferentes tipos de mutaciones y el número total de eventos de cada cambio de base particular.

Cambio de base	Número de mutaciones	%	Número total de eventos	%
C>T	13	40,6	24	49,0
G>A	7	21,9	13	26,5
G>T	3	9,4	3	6,1
T>C	2	6,3	2	4,1
A>G	2	6,3	2	4,1
A>C	1	3,1	1	2,0
G>C	1	3,1	1	2,0
C>G	1	3,1	1	2,0
C>A	1	3,1	1	2,0
A>T	1	3,1	1	2,0
Total	32	100,0	49	100,0

4.3.4. Polimorfismos.

Respecto a la secuencia de *TP53* anotada como salvaje, en nuestro estudio detectamos 2 cambios nucleotídicos que están reportados como polimorfismos: 1) 108G>A, que consiste en un cambio sinónimo detectado en una sola muestra, y corresponde a un codón de Prolina del dominio TAD de P53. 2) 215C>G, que codifica para un cambio de Prolina a Arginina, detectado en 82 de las muestras analizadas.

El cambio 215C>G ha sido estudiado en varios tipos de cáncer. Este cambio afecta el residuo 72 de la proteína, localizado en la región rica en Prolinas (PRR), que es parte de uno de los

5 motivos PXXP constituyentes del posible dominio de unión a proteínas SH3, y su asociación con el origen y progresión de la enfermedad aun se encuentra en un intenso debate.

Las frecuencias genotípicas de la población en estudio, determinadas desde la información proporcionada por la secuenciación directa del producto de PCR, alcanzan 0,6535 para Arg/Arg, 0,1548 para Arg/Pro y 0,1881 para Pro/Pro. Los valores de las frecuencias alélicas desprendidas de las frecuencias genotípicas presentadas más arriba, para cada uno de los aminoácidos Arg y Pro son 0.7327 y 0.2673, respectivamente, en los 101 casos analizados.

4.3.5. Posibles variantes de splicing.

Dos deleciones presentadas más arriba y una de las inserciones podrían ser explicadas como variantes de splicing (ver Figura 10). La región deletada o insertada en cada uno de los casos contiene secuencias que pueden ser reconocidas como secuencias reguladoras del splicing.

La deleción, detectada en la muestra M130, elimina del ARNm de *TP53* los primeros 21 nucleótidos (376TACTCCCCTGCCCTCAACAAG396) del exón 5. Esta pérdida se traduce en la eliminación de 7 aminoácidos (126YSPAALNK132) pertenecientes al dominio de unión al ADN. Resulta fundamental notar que los nucleótidos finales de la región deletada son los mismos que se encuentran en el extremo 3' del intrón 4 salvaje. Como fue mencionado, esta deleción no altera el marco de lectura del ARNm, el que en este caso guiará la producción de una proteína más corta que la normal.

La deleción detectada en la muestra M123, lleva a un cambio en el marco de lectura del mensajero, ya que la región removida consiste de los últimos 46 nucleótidos del exón 5: 514GTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG559. De esta manera, la proteína codificada en este caso pierde su identidad, tratándose probablemente de una proteína no funcional. Nuevamente, los nucleótidos presentes en el extremo 5' de la región deletada son los mismos que se encuentran en el extremo 5' del intrón 5 salvaje.

De forma similar a los casos anteriores, la inserción de 5 nucleótidos entre las posiciones 672 y 673 (GTCTG) que ocurre en la muestra M145 lleva a un cambio en el marco de lectura de *TP53*. Esta mutación es particularmente interesante debido a que los nucleótidos insertados se corresponden con los primeros 5 nucleótidos correspondientes al intrón 6, de acuerdo al gen *TP53* anotado en genbank. Una vez más, los nucleótidos localizados en la región 5' del fragmento insertado se corresponden con los ubicados en el nuevo extremo 5' del intrón involucrado (ver Figura 10).

Es importante señalar que las muestras a las que se hizo referencia y que presentan las variaciones descritas más arriba sólo contienen dichas mutaciones, y no presentan ninguna otra modificación de la secuencia codificante de *TP53* que permita explicar el patrón observado. No fue determinada la secuencia de los intrones en ninguna de las muestras analizadas.

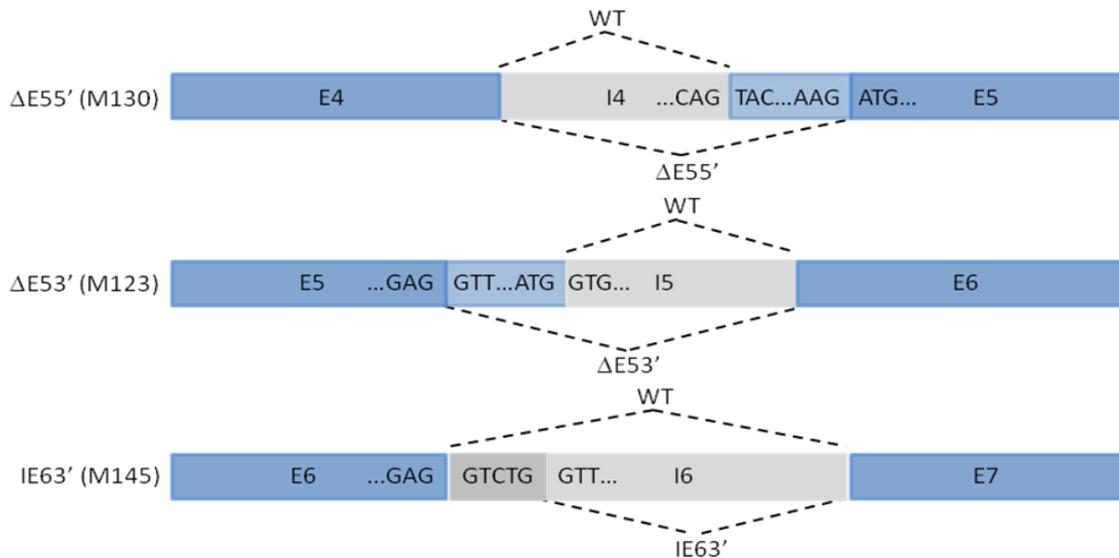


Figura 10. Posibles variantes de splicing. Esquema de las deleciones e inserciones consideradas como posibles alteraciones de splicing en CRC. Se muestra el patrón normal (wt) y mutante (AE55', AE53' e IE63') en cada caso. Las regiones detectadas en cada muestra están representadas con azul (exones) y gris (intrones) oscuros, mientras que las regiones que no estaban presentes se representan con azul claro (exones) y gris claro (intrones). Secuencias circundantes a los posibles sitios de splicing están señaladas en los exones e intrones involucrados. AE55': Deleción de 7 aminoácidos del extremo 5' del exón 5. AE53': Deleción de 46 nucleótidos del extremo 3' del exón 5. IE63': Inserción de 5 nucleótidos a la región 3' del exón 6. E4, E5, E6 y E7: Exones 4, 5, 6, y 7, respectivamente. I4, I5 e I6: Intrones 4, 5 y 6, respectivamente.

4.4. Discusión.

Los resultados experimentales expuestos anteriormente muestran que es posible analizar la secuencia codificante de *TP53* con la estrategia experimental establecida. Esto resulta importante ya que los ensayos preliminares se realizaron utilizando células en cultivo, que son homogéneas y de donde se puede extraer mayor cantidad de ARN total, paso que considerábamos

que podía ser limitante. Además, originalmente se planteó la posibilidad de realizar una amplificación anidada (“nested”) con dos juegos de cebadores, paso que no fue necesario considerando el rendimiento obtenido para la primera amplificación de cada uno de los segmentos del gen, como se muestra en la Figura 7.

4.4.1. Mutaciones detectadas.

En este estudio detectamos 40 mutaciones diferentes previamente descritas en el gen *TP53* en CRC en una población brasilera. Estas mutaciones fueron encontradas en 54,5% de las muestras analizadas, y este valor está de acuerdo con el promedio de muestras mutadas en todos los tipos de tumores humanos ^{47,55,57,58}. Particularmente, la frecuencia de mutaciones en *TP53* en CRC es aproximadamente 40% a 50% ⁵⁹. Nuevamente, el valor detectado en este estudio es cercano al reportado en la literatura siendo por tanto, confiable.

La pérdida de función de P53, ya sea por mutaciones somáticas o por pérdida de heterocigosidad (LOH, de Loss of Heterozygosity) están asociadas al desarrollo de CRC. El mecanismo de LOH del “locus” 17p, donde se encuentra codificado *TP53*, está reportado para el 70% de los casos de CRC y en general impide la expresión del alelo normal de la proteína. Esta pérdida de función juega un rol importante en la transición de los tumores de adenoma a carcinoma durante el desarrollo del cáncer ^{9,59,60}.

Pero además, no solo la pérdida de función como inductor de genes asociados a la apoptosis, reparación del ADN, y detención del ciclo celular es importante, sino que se ha visto que tumores en los que se mantiene la expresión de un alelo mutante son más invasivos que aquellos en los que no se produce P53. Esta observación puede explicarse como una ganancia de función de la proteína P53 mutada, que contribuye al fenotipo y avance del tumor a través de varios mecanismos no mutuamente excluyentes, como efectos en la proliferación de las células tumorales, disminución de la apoptosis, incremento en la capacidad de guiar la angiogénesis, reducción de la hipoxia, efectos sobre la autofagia, y alteración del procesamiento de microARNs ⁹. El efecto sobre la autofagia está bien reportado. P53 salvaje es capaz de inducir la autofagia a nivel de la transcripción de genes implicados en el proceso, pero también es capaz de inhibirla mediante interacciones específicas proteína-proteína en el citoplasma. Sin embargo, mutaciones de P53 que inciden sobre la unión al ADN inducen una pérdida de la actividad transcripcional, sin afectar la interacción con proteínas en el citoplasma, generando un balance en donde la autofagia se ve inhibida, y por tanto, la progresión del tumor facilitada ^{9,61}.

En este estudio también analizamos la relación entre el nivel de expresión de P53 y el patrón de mutaciones en *TP53* en células tumorales. Como la expresión de P53 en células normales no estresadas es baja, y su vida media es de entre 6 a 20 min⁶², P53 no es detectada normalmente usando técnicas convencionales de IHC (Cooper & Haffajee, 1997; Renninson et al., 1994). Sin embargo, este patrón puede verse afectado por mutaciones en *TP53* o en otros genes relacionados con sus vías de señalización.

La mayoría de las mutaciones se localizan en el dominio DBD de la proteína, y son asociadas a un incremento de la estabilidad de la proteína que lleva a que sea posible detectarla por IHC, como ha sido demostrado previamente en cáncer de pulmón primario⁶⁶. Esta característica es comúnmente utilizada como marcador de alteraciones de P53 en tumores (Rodrigues et al., 1990).

Estudios previos sugieren que la estabilización de P53 no es un evento general en los diferentes tipos de cáncer. Es posible encontrar diferencias en la expresión en tumores desarrollados en lugares específicos, como el recto y el colon izquierdo (pero no en el colon derecho), lo que indica un patrón diferente de crecimiento del tumor en relación al estatus de P53^{59,69}. Esto se debe a las diferentes funciones de las regiones del intestino grueso, en cuanto a la absorción y permanencia de nutrientes, sustancias tóxicas y agua. Estos componentes tienen efectos notablemente diferentes sobre la ocurrencia de mutaciones y modificaciones epigenéticas, como es el caso de metilaciones en el gen *MGMT*, que están asociadas a transiciones en los genes *KRAS*, *PIK3CA* y *TP53*. Por tanto, la observación de una señal positiva de P53 en cortes de tejidos cancerosos puede depender de la localización del tumor así como también del número y tipo de mutaciones localizadas en el gen o en otros genes que codifican para proteínas relacionadas a las vías de P53⁶⁵. En este trabajo analizamos muestras provenientes de tumores desarrollados a lo largo de todo el colon y recto, y fueron estudiadas como un único grupo.

Al comparar los grupos P53 negativo y positivo vemos que existe una diferencia en el porcentaje de muestras mutadas. Esta diferencia era esperada ya que las mutaciones en *TP53*, y particularmente las que codifican un cambio de aminoácido, están fuertemente asociadas a la acumulación de la proteína en cáncer⁶⁵.

En el grupo P53 positivo, 79,6% de las muestras contienen una mutación en *TP53*, siendo la mayoría mutaciones de cambio de aminoácido, aunque también fue observada una inserción que genera un cambio en el marco de lectura. En relación a las demás muestras de este grupo, aquellas que exhibían un patrón de expresión alterado de P53 y que no contenían ninguna

mutación en el gen, es concebible que otras proteínas que regulan la expresión de P53 podrían estar afectadas, como Hdm2, Hdm4, Cop-1, Pirh-2, entre otras, lo que lleva a un incremento en la cantidad de P53 ⁷⁰.

Por otro lado, solo 30,8% de las muestras P53 negativas contienen mutaciones en la secuencia codificante de *TP53*. Este grupo contiene 6 mutaciones de cambio de aminoácido, 6 alteraciones que generan cambio de marco de lectura, 2 mutaciones sin sentido, 1 sustitución sinónima y 1 deleción que no genera un cambio en el marco abierto de lectura de la proteína, siendo cada una de estas mutaciones detectadas en una única muestra. Es importante señalar que estas mutaciones no inducen la sobreexpresión ni incrementan la estabilidad de P53 indicando que sus mecanismos de acción pueden ser sustancialmente diferentes. Para la mutación de cambio de aminoácido, este resultado puede reflejar un efecto específico de mutaciones que fallan en cuanto a la estabilización de la proteína, como ha sido reportado previamente ⁶⁶. Las proteínas conteniendo una deleción o aquellas truncas producidas por moldes con mutaciones sin sentido o con deleciones que generan un cambio del marco de lectura, normalmente no son detectadas por IHC porque son muy inestables en la célula ⁷¹.

4.4.2. Efecto y posición de las mutaciones detectadas.

La mayoría de las mutaciones identificadas en *TP53* son puntuales y generan un cambio de aminoácido como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 8, y concuerda con lo visto en estudios previos en diferentes tipos de cáncer humano como carcinoma hepatocelular, cáncer epitelial de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer sinonasal, carcinoma de células escamosas de esófago, entre otros ⁵⁵.

En relación a la distribución espacial de las mutaciones en *TP53*, en esta población de muestras de CRC las mutaciones puntuales se localizaron principalmente en sitios comúnmente mutados en otros cánceres humanos, ver Figura 9. Las mutaciones puntuales se concentran en unos pocos codones. De un total de 393 codones codificantes de *TP53*, solamente 24 se ven afectados por este tipo de cambio (excluidos los polimorfismos 215C>G y 108G>A, ver más adelante). Los codones más frecuentemente alterados corresponden al dominio DBD. En relación a las muestras analizadas en este trabajo, 22 de los 24 (91,7%) codones afectados se encuentran en este dominio de la proteína, y solamente 2 (8,3%) pertenecen a otro dominio, en este caso el dominio TET.

Por ejemplo, los codones 175, 248 y 273, que son las más frecuentemente mutados en esta población, son también frecuentemente mutados en la mayoría de los tumores y están asociados con la pérdida de la función de P53, siendo una posible causa de la transformación celular^{55,72}. Los tres codones codifican para Arg que forman parte de la estructura de dedos de Zn involucrados en el contacto con el surco menor del ADN. La primera de las Arg es fundamental para mantener la arquitectura del motivo, mientras que las restantes establecen contacto directo con la molécula de ADN⁴⁷. La concentración de mutaciones en la zona del DBD brinda más soporte a la idea general aceptada acerca de que la pérdida de habilidad de unión de P53 a la secuencia de reconocimiento podría ser un evento importante en el desarrollo de la enfermedad.

Los 2 codones afectados fuera del DBD están localizados en el dominio TET. Éstos podrían interferir con la formación del dímero y el tetrámero: La mutación sin sentido 1045G>T debido a la generación de monómeros trancos incapaces de establecer contactos correctos, mientras que la mutación sinónima en este dominio podría afectar la estructura y la dinámica de la estabilización del dímero durante la producción de la proteína, ya que ambos mecanismos son simultáneos⁷³. Por tanto, estos dos codones pueden estar implicados, de alguna manera, con la pérdida de la función de P53 en células malignas mutadas. No se identificaron mutaciones puntuales en ninguno de los otros dominios de la proteína (ver Figura 9).

4.4.3. Tipos de cambio.

Aquí hemos detectado que el cambio de base más común fue la transición C>T, contabilizando un 49,0% de las mutaciones puntuales, seguido por la transición G>A que representa 26,5%. Ha sido reportado que entre las sustituciones nucleotídicas en todos los tipos de cáncer, cerca del 25% son sustituciones C:G>T:A están localizados en sitios CpG⁷⁴.

Es importante señalar que las citosinas metiladas de los nucleótidos CpG mutan a timina con una tasa 10 veces mayor que otros nucleótidos⁷⁵. Entre 3% a 5% de las citosinas del genoma humano son metiladas en la posición 5' por un mecanismo post replicativo que está restringido a los dinucleótidos CpG y es catalizado por ADN metiltransferasas. La 5' metilcitosina (5mC) es menos estable que la citosina y sufre deaminación espontánea originando una timina a una tasa 5 veces mayor que la base sin metilar. Este proceso es potenciado por radicales de oxígeno y nitrógeno, lo que lleva a un número mayor de transiciones en CpG en cáncer^{74,76}.

Además, entre los 22 CpG localizados en el dominio de unión al ADN de P53, tres hotspots de mutaciones (codones 175, 248 y 273) concentran el 60% de las mutaciones en sitios CpG en

cáncer, y otros 5 codones (196, 213, 245, 282 y 306) explican otro 26% ⁷⁴. La mayoría de estos sitios están mutados en la población brasilera analizada en este trabajo, lo que concuerda con observaciones previas.

4.4.4. Polimorfismos.

Además de los cambios definidos como mutaciones, en este estudio también detectamos dos polimorfismos: 1) 108G>A, que consiste en un cambio sinónimo detectado en una sola muestra, y corresponde a un codón de Prolina del dominio de transactivación de P53. 2) 215C>G, que codifica para un cambio de Prolina a Arginina, detectado en 82 de las muestras analizadas.

Por tratarse de una modificación de tipo sinónima y definida como polimorfismo, el cambio 108G>A no ha sido analizado en cuanto a un eventual efecto de P53. Por tanto, en este estudio decidimos aproximarnos a posibles efectos del mencionado cambio como se muestra en el capítulo siguiente “Estudio del efecto de mutaciones sinónimas sobre la estructura y actividad de P53”.

El cambio 215C>G ha sido estudiado en varios tipos de cáncer y existe aún hoy controversia acerca de su rol en el origen y progresión de la enfermedad. Este cambio afecta el residuo 72 de la proteína, localizado en la región PRR, que es parte de uno de los 5 motivos PXXP constituyentes del posible dominio de unión a proteínas SH3. A pesar de que este cambio no induce alteraciones en la conformación de la proteína ni modificación de la actividad de unión al ADN, ambas variantes conteniendo Pro o Arg en este sitio tienen algunas diferencias funcionales y bioquímicas que no pueden ser obviadas ⁷⁷. Ambas variantes generan una proteína estructuralmente salvaje de acuerdo al uso de anticuerpos conformacionales y presentan similar interacción con algunas, pero no todas las secuencias de reconocimiento de P53. Sin embargo, la variante que contiene Pro tiene mayor afinidad por los factores TAFII32 y TAFII70, lo que en parte podría explicar las diferencias antes mencionadas. Además, la variante con Arg es capaz de inhibir el crecimiento de células transformadas con expresión de oncogenes en mayor medida (2 veces más) que P53 con Pro en esa posición. Finalmente, la variante con Arg es más susceptible a la degradación por parte de la proteína E6 del virus HPV, sugiriendo una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer asociado a este virus en individuos homocigotas para esta variante.

A pesar de las diferencias, no se ha mostrado la existencia de una asociación entre este polimorfismo y el riesgo de presentar varios tipos de cáncer, como son cáncer de mama ⁷⁸, cervical ⁷⁹, carcinoma escamoso de cabeza y cuello de útero ⁸⁰ y carcinoma colorectal ^{81,82}. Sin embargo,

otros estudios sugieren una posible relación entre este sitio polimórfico y el riesgo de contraer la enfermedad, como se reportó para el de mama ⁸², cáncer cervical ⁸³, cáncer de pulmón ⁸⁴, cáncer colorectal ⁸⁵, cáncer de cerebro ⁸⁶, carcinoma faríngeo ⁸⁷.

Es importante señalar que los resultados aparentemente contradictorios presentados más arriba podrían ser explicados considerando la heterogeneidad de las muestras y la aproximación empleada para realizar el análisis. En ello, pueden incidir el “background” genético de la población y las diferencias étnicas, ya que se ha visto que las frecuencias de este polimorfismo varían étnica y geográficamente. Asimismo, la característica de la muestra misma y la metodología elegida para realizar el estudio pueden enmascarar algunos tipos de cambio.

La gran mayoría de los estudios citados anteriormente se basan en el análisis de las frecuencias alélicas y la comparación entre poblaciones afectadas con cáncer y personas normales control. En nuestro caso, el estudio sólo consideró muestras tumorales y por tanto no es posible realizar tal comparación. Las frecuencias genotípicas de la población de estudio, determinadas desde la información proporcionada por la secuenciación directa del producto de PCR, son 0,6535 para Arg/Arg, 0,1548 para Arg/Pro y 0,1881 para Pro/Pro.

Los valores de las frecuencias alélicas desprendidas de las frecuencias genotípicas presentadas más arriba, para cada uno de los aminoácidos Arg y Pro son 0.7327 y 0.2673, respectivamente, en los 101 casos analizados.

Resulta importante destacar que la detección de ambos alelos está supeditada al nivel de expresión de los mismos, lo que se ha visto que puede estar modificado en cáncer, debido al fenómeno LOH, descrito anteriormente. Esta pérdida puede deberse a la propia remoción de uno de los alelos de *TP53*, ya sea por delección, recombinación, inserción, o algún otro mecanismo, o por las diferencias en la expresión *per sé*, aún cuando ambas variantes no presenten mayores modificaciones que el polimorfismo en cuestión ⁹.

4.4.5. Posibles variantes de splicing.

Dos delecciones presentadas anteriormente y una inserción podrían ser explicadas como variantes de splicing (Figura 10). Las delecciones detectadas en las muestras M130 (21 nucleótidos del comienzo del exón 5 que no alteran el marco de lectura) y M123 (46 nucleótidos del final del exón 5, que cambian el marco de lectura), así como la inserción detectada en la muestra M145 (5 nucleótidos sobre el final del exón 6 que cambian el marco de lectura), tienen características que las señalan como posibles modificaciones del splicing.

En los tres casos las regiones deletadas o insertadas tienen en sus extremos las mismas secuencias que se encuentran en la región que normalmente es escindida (intrón) para el caso de las deleciones, o retenida en el mensajero (exón) para la inserción. Concretamente, para el caso de la deleción en la muestra M130, las últimas dos bases de la región deletada correspondientes al extremo 5' del exón 5 son AG, las mismas que se encuentran en el extremo convencional 3' del intrón 4 y que normalmente son utilizadas como 3'ss. Así, las bases localizadas en las últimas posiciones de la deleción podrían actuar como un nuevo sitio 3'ss. De las tres mutaciones posiblemente vinculadas con el splicing, ésta es la más reportada y fue vista en diferentes tipos de cáncer y líneas celulares provenientes de diferentes tumores, como cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas, mama, neoplasmas de astrocitos, carcinoma hepatocelular, pulmón, cáncer colorectal y tumores de linfocitos B⁵⁵.

De forma similar, los nucleótidos escindidos en la muestra M123, localizados sobre el extremo 3' del exón 5, tienen sobre su extremo 5' las mismas bases, GT, que se localizan en el comienzo del intrón 5 y que actuarían como sitio 5'ss. Esta deleción ha sido detectada en cáncer de mama, carcinoma de células escamosas, carcinoma hepatocelular, y en líneas celulares derivadas de cáncer de faringe⁵⁵.

Resulta interesante señalar que en los casos de las deleciones descritas arriba, no podemos afirmar que el patrón observado se deba a un error de splicing, ya que de acuerdo a nuestra aproximación no hemos analizado la secuencia de los intrones involucrados en cada caso. Es posible que existan mutaciones en los intrones que alteren algunas de las secuencias reguladoras, el sitio 3'ss normal en el caso de M130 o el sitio 5'ss de la muestra M123, que lleven a la destrucción de los mismos y permitan explicar más fácilmente el patrón observado. Asimismo, los estudios en los que han sido detectadas las deleciones también fueron realizados utilizando solamente ARN como molde inicial, de forma que no existen estudios a nivel del ADN genómico. Esta observación apoya la idea de que sean realmente variantes o errores de la edición del mensajero.

De forma similar a los casos anteriores, la inserción de 5 nucleótidos entre las posiciones 672 y 673 (GTCTG) que ocurre en la muestra M145 lleva a un cambio en el marco de lectura de *TP53*. Esta mutación es particularmente interesante debido a que los nucleótidos insertados se corresponden con los primeros 5 nucleótidos del intrón 6, de acuerdo al gen *TP53* anotado en genbank. Una vez más, los nucleótidos localizados en la región 5' del fragmento insertado se corresponden con los ubicados en el nuevo extremo 5' del intrón involucrado (ver Figura 10). El

único trabajo en donde se reporta una inserción de 5 nucleótidos entre las posiciones 672 y 673 analizó la secuencia de *TP53* en muestras de cáncer de mama y detectó la inserción CTCTG⁸⁸, que no se corresponde con la inserción GTCTG detectada en este estudio y que coincide con las primeras 5 bases del intrón 6. Por tanto, este estudio es el primero en reportar la inserción mencionada.

El hecho de que las bases insertadas se correspondan con la secuencia inicial del intrón siguiente sugiere de manera categórica la idea de que el error se deba a modificaciones de la edición del mensajero en un número importante de células, sin ser un evento aislado. El por qué de tal modificación escapa al alcance de este estudio, pero sin dudas representa una pregunta muy interesante de responder.

Considerando que los trabajos que reportan estas mutaciones trabajan sólo con ARN, en nuestro caso intentamos amplificar el ADN genómico de *TP53* para las regiones involucradas a partir del material extraído de las muestras. En estos experimentos fue posible obtener amplicones de diferentes tamaños, sugiriendo la presencia de más de un molde en la reacción. Los amplicones fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa, purificados, y utilizados como molde para secuenciación de ácidos nucleicos. Las condiciones de purificación y secuenciación se repitieron 3 veces con algunas variaciones sin obtener resultados. El definir claramente la secuencia de estos intrones constituye un objetivo importante y esperamos poder resolverlo a la brevedad. La información proporcionada por ese análisis contribuirá a explicar el mecanismo implicado en estas mutaciones.

Si bien no detectamos variaciones del mecanismo de splicing asociadas a una mutación particular, y más específicamente a una mutación localizada en sitios reguladores del splicing, el trabajo sí detectó posibles errores vinculados a este mecanismo. Además, la población analizada compuesta solamente por 101 muestras constituye un pequeño universo de casos de cáncer, los que adicionalmente proviene únicamente de CRC. Sería por demás interesante ampliar el tamaño de la muestra de forma de maximizar la detección de modificaciones asociadas a splicing, pero también realizar la misma aproximación en otros tipos de cáncer. Así, sería posible no sólo comparar el perfil de mutaciones general en cada caso, sino que permitiría evaluar cómo se expresan estos posibles errores de splicing en cada uno de ellos, apuntando a definirlos como variantes del mensajero maduro de *TP53*.

5. Estudio del efecto de mutaciones sinónimas sobre la estructura y actividad de P53.

En esta parte del trabajo, nos centramos en la caracterización de la funcionalidad de *TP53* cuando es codificada por moldes conteniendo mutaciones sinónimas. Nuestro objetivo consistía en buscar evidencias de que el uso de codones sinónimos podía afectar la conformación, o la funcionalidad de P53, cuando es expresada en sistemas eucariotas. Para ello, se estudiaron mutaciones que habían sido identificadas en muestras tumorales de CRC (capítulo anterior) y otras que fueron reportadas con frecuencia en los bancos de datos. La conformación y funcionalidad de P53 fue estudiada en levaduras y en células de mamífero en cultivo.

5.1. Materiales.

5.1.1. Selección de mutaciones.

Realizamos una búsqueda en la base de datos de *TP53* IARC (International Agency for Research on Cancer, <http://www-p53.iarc.fr/>) y seleccionamos algunos cambios sinónimos. El criterio seguido para realizar tal elección consideró la frecuencia de mutaciones registrada para una posición dada, atendiendo a aquellas que estuviesen más representadas en cáncer. Particularmente, elegimos estudiar mutaciones sinónimas (obtenidas de forma azarosa) en la tercera base de los codones consecutivos correspondientes a 3 Prolinas ubicadas en la región rica en Prolinas (PRR) de P53, en las posiciones 151, 152 y 153 de la cadena aminoácida de la proteína. De esta forma se originan tantos mutantes como posibles combinaciones considerando 3 codones que pueden variar entre 4 opciones, CCC, CCA, CCU, CCG; 64 mutantes. Dichas posiciones concentran el 4,13% de las mutaciones sinónimas descritas en *TP53* según la versión R15 (noviembre 2010) de la base de datos de IARC (18, 17 y 14 sustituciones sinónimas en la tercer posición de los codones 151, 152 y 153, respectivamente)⁵⁵.

Para el estudio funcional en levaduras se utilizó la mezcla de mutantes en las 3 Prolinas mencionadas, de la cual desconocemos su composición por tratarse del producto de la reacción de mutagénesis con cebadores degenerados (ver métodos de la sección “Mutagénesis sitio dirigida” más adelante). Mientras tanto, para los estudios estructurales en cultivos celulares se emplearon 4 mutantes específicos originados a partir de la mutagénesis con cebadores degenerados anteriormente mencionada (ver métodos de la sección “Mutagénesis sitio dirigida” más adelante). Además, también consideramos para todos los experimentos con los dos sistemas los cambios

sinónimos detectados en el análisis previo sobre muestras de cáncer colorectal: 108G>A (tercera base del codón número 36 codificante para una Prolina del dominio TAD de P53) y 1014C>T (tercera base del codón número 338 codificante para una Fenilalanina del dominio TET de la proteína) (ver resultados de la sección “Análisis de la secuencia codificante de *TP53* en muestras tumorales” presentados anteriormente).

Las mutaciones estudiadas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Mutantes sinónimos estudiados. Se muestran los codones afectados, la secuencia codificante de los codones salvajes en cada posición, así como la secuencia mutante para cada uno de ellos, cuando corresponde. También se muestra la frecuencia de utilización de cada uno de los codones por cada 1000 codones utilizados en humanos, según el uso de codones de las proteínas ribosomales (ver sección “Análisis del uso de codones de *TP53*” más adelante).

Mutante	Codones (Frecuencia/1000)				
	36	151	152	153	338
WT	CCG (4,2)	CCC (15,2)	CCG (4,2)	CCC (15,2)	TTC (17,7)
Pro1		CCA (10,4)	CCA (10,4)	CCC (15,2)	
Pro2		CCU (16,0)	CCG (4,2)	CCG (4,2)	
Pro3		CCC (15,2)	CCG (4,2)	CCA (10,4)	
Pro4		CCG (4,2)	CCU (16,0)	CCG (4,2)	
108G>A	CCA (10,4)				
1014C>T					TTT (12,1)

5.1.2. Vectores y construcciones plasmídicas de *TP53*.

- Plásmido de expresión en células humanas.

La secuencia codificante de *TP53* salvaje clonada en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen) (pcDNA3-*TP53*wt) (Figura 11) así como la del mutante de sustitución de Arginina a Histidina en la posición 175 (pcDNA3-*TP53*R175H) fueron cordialmente cedidos por el Dr. Robin Fåhræus, Institut de Génétique Moléculaire, Hôpital St. Louis, Université Paris 7, Paris, France.

- Plásmido de expresión en levaduras.

El plásmido pSS16 conteniendo los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de *TP53* (Figura 11) fue cordialmente cedido por el Dr. Marc Blondel, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

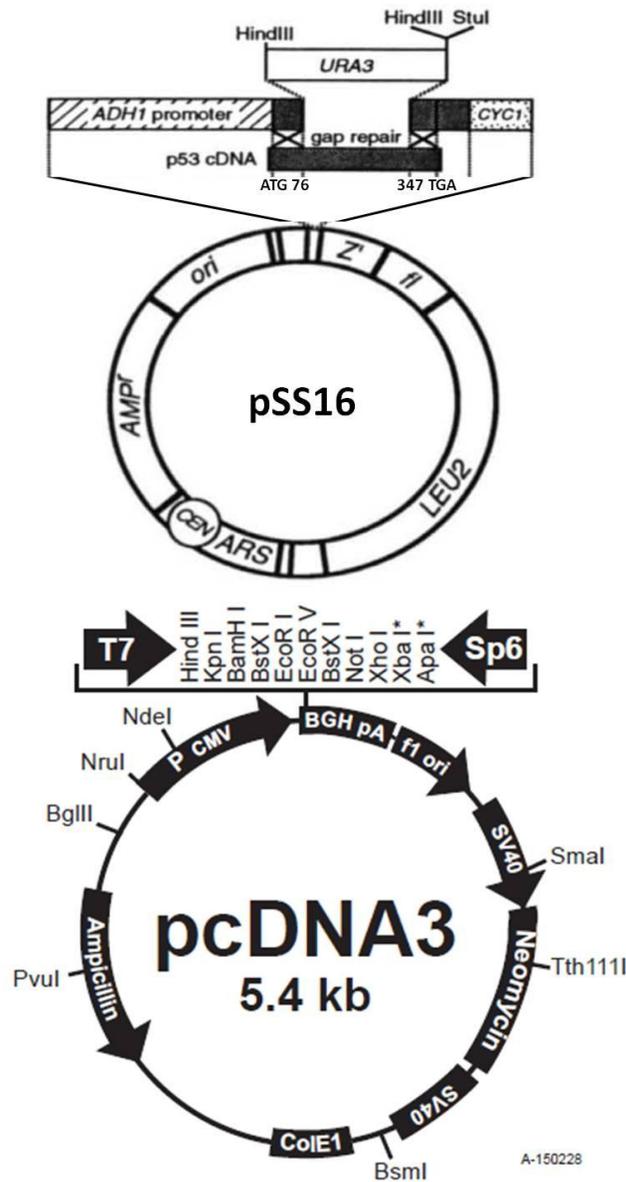


Figura 11. Vectores utilizados para expresar la proteína en los diferentes sistemas. Se muestran las características de cada uno de ellos. pSS16: Plásmido para expresión de P53 en levaduras. AMP^r; resistencia a ampicilina, gen de *β-lactamasa*. ori; secuencia de origen de replicación bacteriano. Z'; gen de *B-galactosidasa*. ADH1 promoter; promotor de la enzima Alcohol Deshidrogenasa 1. URA3; gen *URA3*, orotodine 5-fosfato decarboxilasa (ODCasa), utilizado como interruptor de la secuencia de *TP53*. *CYC1*; terminador del gen de citocromo c1. CEN/ARS; secuencia centromérica CEN6 y secuencia de replicación autónoma de levaduras para replicar el plásmido y mantenerlo en bajo número de copias. LEU2; gen *LEU2*, Beta-Isopropilmalato Deshidrogenasa (IMDH). pcDNA3: Plásmido para expresión de P53 en células humanas, y utilizado como molde para obtener los mutantes estudiados. Ampicillin; resistencia a ampicilina, *β-lactamasa*. T7; promotor de transcripción para la ARN polimerasa del fago T7. SP6; promotor para la ARN polimerasa de SP6 gen. F1 ori; origen de replicación del fago F1. SV40; secuencia promotora y terminadora del virus SV40. Neomycin; resistencia a neomicina, aminoglucósido fosfotransferasa. P CMV; promotor de Citomegalovirus. BGH pA; señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH). ColE1; factor colicinogénico.

5.1.3. Células.

- Bacterias.

Para propagar los vectores se utilizaron las siguientes cepas de la bacteria *E. coli* quimiocompetentes, dependiendo de la disponibilidad de stock: XL-1 Blue, Top10 y DH5- α .

- Levaduras.

Para el estudio de función de P53 se utilizaron cepas YPH de *S. cerevisiae*, conteniendo los tres elementos de respuesta estudiados, YPH-Bax, YPH-p21⁸⁹, YPH-RGC⁵², derivadas de la cepa YPH500 descrita por Sikorski y Hieter⁹⁰. Dichas células son mantenidas en medio YPD sólido (ver Anexo Medios de cultivo), y fueron cordialmente cedidos por el Dr. Marc Blondel.

- Células humanas.

El análisis de la conformación de P53 se realizó mediante la expresión de la proteína en células H1299, línea establecida de carcinoma de pulmón (non-small cell lung carcinoma) derivadas del nodo linfático. Esta línea celular no presenta expresión endógena de P53 debido a que posee una delección parcial del gen en ambos alelos. Dichas células son mantenidas en medio RPMI 1640 completo (ver Anexo Medios de cultivo).

5.1.4. Medios de cultivo.

- Medio para bacterias LB (Luria-Bertani) con Ampicilina.
- Medio mínimo para levaduras MML.
- Medio rico para levaduras YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose).
- Medio selectivo para levaduras Yeast –L,a sólido.
- Medio para cultivos de células de mamífero RPMI 1640 (Gibco).

5.2. Métodos.

5.2.1. Análisis del uso de codones de TP53.

La frecuencia de utilización del uso de codones de humanos y de la levadura *S. cerevisiae* fue estimada con el software CodonW utilizando como base de datos (“input”) las secuencias

nucleotídicas de las proteínas ribosomales para cada uno de los organismos, las que se descargaron de la base de datos RPG (Ribosomal Protein Gene Database, <http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/>)⁹¹. Los datos obtenidos para caso se muestran en las Tablas anexas A3 y A4: Uso de codones de *Homo sapiens* y *S. cerevisiae*, respectivamente, donde se representan como frecuencia de cada codón particular cada 1000 codones utilizados.

En base a estos resultados se analizó la frecuencia de utilización de cada uno de los codones codificantes de *TP53*, de forma de definir el comportamiento de cada uno de ellos en los dos organismos. Dicho análisis fue realizado para aproximarnos a la velocidad local de traducción del ARNm en ambos sistemas, buscando agrupaciones de codones frecuentes e infrecuentes, asumiendo que los primeros serán traducidos a mayor velocidad, contrario a lo que sucederá con los codones utilizados en menor frecuencia. Este análisis fue fijado como forma de validar, *a priori*, la aproximación experimental planteada para analizar el efecto de las mutaciones sinónimas sobre un gen humano como es *TP53* expresado en levaduras.

El algoritmo empleado se denomina %MinMax y fue reportado por Clarke et al.⁹². Este algoritmo define la relación entre la secuencia de un ARNm dado y las secuencias hipotéticas que codifiquen para la misma proteína usando los codones más infrecuentes (mínimo) o los más frecuentes (máximo), como una función del promedio de la frecuencia de todos los codones posibles. El mencionado trabajo describe puntillosamente cómo efectuar el mencionado algoritmo y un esquema se muestra en la Figura 12.

5.2.2. Actividad de transactivación en levaduras: FASAY.

El sistema empleado para estudiar la función de transactivación de P53 en levaduras sobre tres elementos de respuesta provenientes de genes regulados por la proteína (Bax, p21, RGC), se denomina FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast) y fue reportado por Ishioka y colaboradores^{93,94}. Básicamente, este análisis permite evaluar la actividad transcripcional de P53 *in vivo* mediante la generación de diferentes colores de levaduras. La aparición (y los matices) de color dependen del estatus de P53, encontrando variaciones de color desde blanco para una colonia que expresa la proteína totalmente funcional, a rojo para colonias en las que la transactivación de P53 no es funcional.

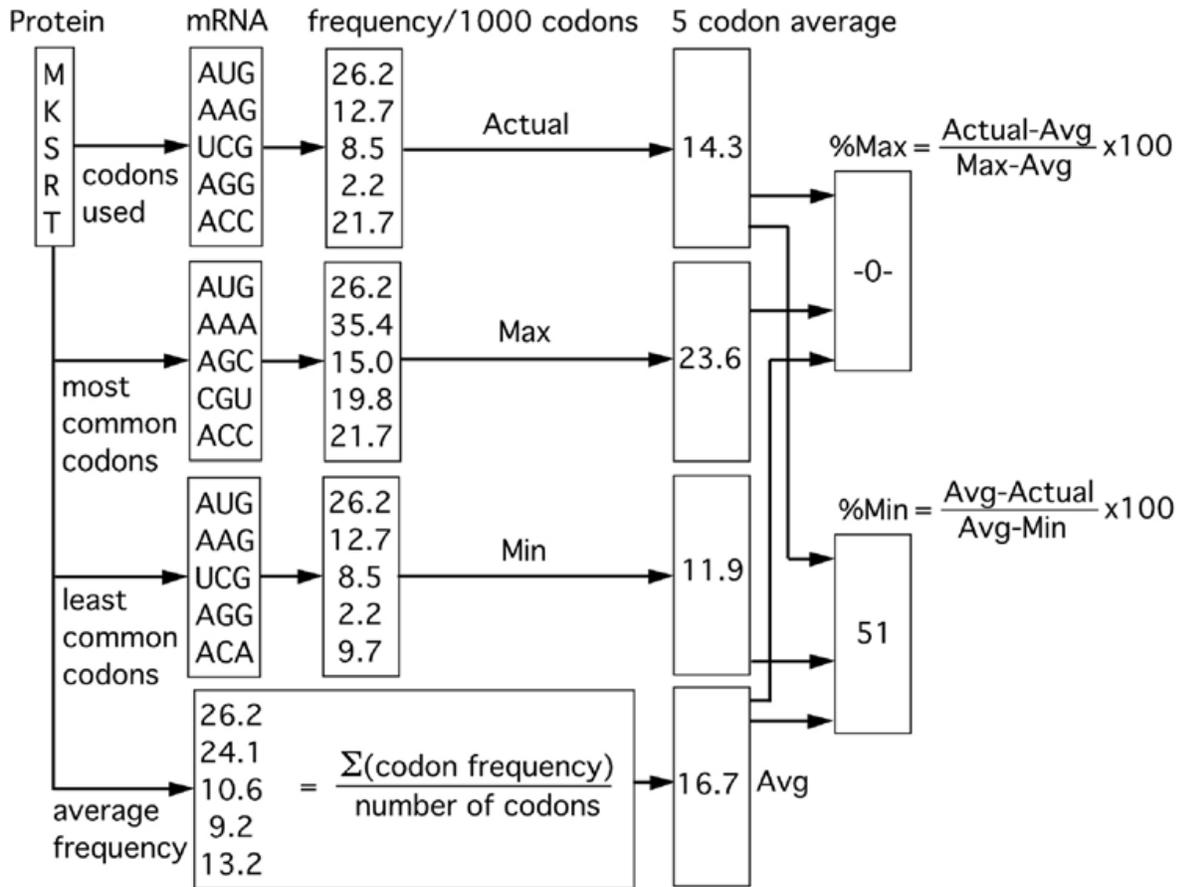


Figura 12. Cálculo del algoritmo %MinMax. Análisis de %MinMax para el pentapéptido MKSRT, codificado por AUGAAGUCGAGGACC (número total de codones por aminoácido: M, 1; K, 2; S, 6; R, 6; T, 4). Se muestran tabuladas tres frecuencias absolutas para cada codón de *E. coli* obtenidas con KazUSA: (i) Frecuencia con que este codón particular es usado en el genoma completo de *E. coli* (Actual), (ii) Frecuencia del condón más frecuente para ese aminoácido (Max), y (iii) Frecuencia del codón menos utilizado para ese aminoácido (Min). También se calcula una frecuencia de uso promedio (Avg) para cada residuo, sumando las frecuencias individuales de cada codón y dividiéndola por el número de codones (para cada residuo). Los valores obtenidos son típicamente promediados en una ventana de 18 aminoácidos (en este ejemplo se usa una ventana de 5). Esas cuatro frecuencias son utilizadas para calcular el %Max y %Min utilizando las ecuaciones mostradas. Notar que solo se reportan los valores positivos. Un valor de %Min de 50 significa que esa secuencia está aproximadamente a la mitad entre la máxima rareza de codones y la secuencia promedio sin desvíos para esa región, pero es graficado como -50. Tomado textualmente de Clarke T. F. IV, Clark P. L. Rare Codons Cluster. 2008 PLoS ONE 3(10) ⁹².

La generación de color se debe a la oxidación del metabolito P-ribosilaminoimidazol (AIR), intermediario de la vía de síntesis de la Adenina, cuando las células carecen de la enzima que

cataliza su pasaje a P-ribosilaminoimidazolcarboxilato, la fosforibolsilamino-imidazol-carboxilasa, codificada por el gen *ADE2*. En este sistema, el gen *ADE2* se encuentra bajo el control transcripcional de los elementos de respuesta de *Bax*, *p21*, y *RGC*, los tres inducibles por P53. De esta manera, células que carecen de P53, o cuya función está alterada, no serán capaces de expresar la enzima codificada por *ADE2* y por tanto estarán imposibilitados de metabolizar AIR, el que se acumulará en la célula. En condiciones aerobias, AIR es oxidado por el oxígeno dando un producto de color rojo que tiñe las células. Caso contrario, donde P53 no está afectada, se inducirá la expresión del gen *ADE2* quien catalizará el paso arriba mencionado evitando que se acumule AIR, y por tanto manteniendo el color blanco normal de las colonias de levaduras.

Los elementos de respuesta estudiados fueron aislados de la región reguladora 5' de genes vinculados con vías particulares e importantes dentro de la célula: *Bax* es una proteína proapoptótica, *p21* es un regulador del ciclo celular, capaz de inducir la interrupción del mismo en G1, y *RGC* es un cluster de proteínas ribosomales. La utilización de tres reguladores permite analizar y comparar la funcionalidad de los diferentes mutantes en distintas situaciones.

Este abordaje requiere que las cepas de la levadura *S. cerevisiae* sean transformadas con el plásmido (pSS16, ver Figura 11) lineal capaz de recombinar *in vivo* con productos de PCR de *TP53* ("gap repair") y expresar la proteína codificada por éstos, los que son transformados conjuntamente con el plásmido.

5.2.3. Extracción y caracterización de ácidos nucleicos.

- Mutagénesis sitio dirigida.

Las mutaciones fueron generadas utilizando el Kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. El plásmido conteniendo *TP53*wt (pcDNA3-*TP53*wt) fue amplificado por PCR en un volumen final de 50 µL. Se utilizaron 50 ng de ADN, 125 ng de cada uno de los cebadores (ver Tabla anexa A1: Cebadores utilizados), 1 µL de la mezcla de dNTPs y 2,5 U de ADN polimerasa (PfuUltra HF DNA polymerase, Stratagene). Se incubó 30 s a 95 °C, y luego 20 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 53 °C y 7 min a 68 °C en un equipo GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Luego, se agregaron 10 unidades de *DpnI* para degradar el ADN parental original y se incubó la reacción durante 1h30 a 37 °C. Se emplearon 40 µL de células *E. coli* XL-1 Blue competentes proporcionadas en el kit para la transformación con 2

μl de ADN de la reacción mediante shock térmico. Los transformantes fueron seleccionados en placas LB-Ampicilina. A partir de colonias seleccionadas, se extrajo el ADN plasmídico y las mutaciones generadas fueron confirmadas por secuenciación del ADN.

- Extracción de ADN.

Se emplearon diferentes métodos de purificación de ADN dependiendo de la disponibilidad de reactivos y de la utilización posterior. Por tanto realizamos minipreparaciones de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina, o mediante utilización del Kit Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel). El ADN para las transfecciones de células H1299 se obtuvo a través de una maxipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit Endo Free® Plasmid Purification (QIAGEN). En los casos en que fue necesario purificar un fragmento de ADN específico de una mezcla de moléculas se empleó el kit Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel), a partir de ADN resuelto mediante electroforesis en geles de agarosa.

- Electroforesis en geles de agarosa.

Dependiendo de la disponibilidad de reactivos el ADN fue detectado utilizando Good View 1X (SBS) o Bromuro de Etidio 0,5 μg/mL.

- Secuenciación de ADN.

Se contrató el servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

- Amplificación por PCR de los mutantes de *TP53* para estudios funcionales en levaduras.

Los amplicones de *TP53**wt*, *TP53*R175H, *TP53*108G>A y *TP53*1014C>T se obtuvieron por reacción de PCR utilizando como molde los plásmidos pcDNA3 conteniendo el gen específico para cada caso obtenido por mutagénesis sitio dirigida y empleando los cebadores *TP53* P3N y *TP53* P4 (ver Tabla anexa A1: Cebadores utilizados). Para el caso de los mutantes al azar en las Prolinas 151, 152 y 153, se realizó la reacción de PCR propia del ensayo de mutagénesis del kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) (ver apartado “Mutagénesis sitio dirigida”), con el par de cebadores degenerados diseñados para este caso, *TP53* Pro151-152-153-F y *TP53* Pro151-152-153-R (ver Tabla anexa A1: Cebadores utilizados), se digirió el ADN parental, y sin realizar transformación,

los productos de PCR se reamplificaron de la misma forma en que se realizó para las mutaciones puntuales. Esta reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 1,5mM de MgCl_2 , 0,8 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,8 μM de cada cebador y 2 unidades de polimerasa de ADN (Taq DNA polymerase, Roche) para el caso de la mezcla de mutantes en las Prolinas y *TP53wt*, y 4 unidades de ADN polimerasa (Expand Long Template PCR System, Pfu, Roche) para el caso de las mutaciones puntuales, *TP53wt* y *TP53R175H*. Para estos últimos, se utilizaron 100 ng de ADN como molde, mientras que para la mezcla de mutantes de Prolinas se emplearon 1,25 μL de la reacción de amplificación de mutagénesis del paso anterior. Todas las reacciones se incubaron en el termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer-Applied Biosystems) de la siguiente manera: 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 50 °C y 80 s a 68 °C, con una extensión final de 10 min a 68 °C.

- Digestión del plásmido pSS16.

En 50 μL de reacción se utilizaron 5 μg de pSS16 y 20 unidades de *StuI* (Invitrogen) en buffer B de Roche, y se incubó a 37 °C durante 2 hs. A continuación, se agregaron 20 unidades de *HindIII* (Roche), completando el volumen total a 60 μL con buffer B de Roche y agua destilada. Esta reacción se volvió a incubar durante 2 hs a 37 °C. El producto de interés se purificó luego de ser separado mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.2.4. Transfección de levaduras y células humanas.

- Transformación de levaduras para FASAY.

Se utilizan levaduras frescas con un máximo de una semana de crecimiento. Las líneas de levaduras son mantenidas mediante pasaje en medio YPD sólido, incubándolas a 29 °C. El protocolo de transformación está basado en el reportado por Ishioka y colaboradores⁹³. Se realizó un precultivo de 5 mL de YPD líquido y se incubó a 29 °C y 220 r.p.m. O.N. A partir de éste, se inició un cultivo en 10 mL en medio YPD con una concentración inicial de levaduras de DO_{600} de 0,15-0,20, y se incubó a 29 °C y 220 r.p.m. hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6-0,8. Para volverlas competentes, se recuperaron las células mediante centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 5 min, se resuspendieron en 1 mL de buffer TE/LiAc (TrisHCl 10 mM, Acetato de Litio 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,5, esterilizado por filtración,

0,22 μm) y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga, donde se repitió el paso anterior. Nuevamente se recuperaron las células por centrifugación a 5.000 r.p.m. y se resuspendieron suavemente en 100 μL (1/100 del volumen inicial de cultivo) de TE/LiAc. Esta suspensión celular se mezcló suavemente con 10 μL de ADN de esperma de salmón (ADN SS, 10 mg/mL, Sigma Aldrich), 100 ng de plásmido pSS16 digerido y purificado, 550 μL de buffer PEG/TE/LiAc (PoliEthyleneGlycol MW 3.500 40% (w/v) en buffer TE/LiAc, esterilizado por filtración, 0,22 μm) y 10 μL de producto de PCR. La mezcla se incubó a 30 °C (puede también realizarse a RT) durante 30 min con agitación suave. Posteriormente, se incubó en baño de agua a 42 °C durante 15 min para efectuar un choque térmico. Las células se recuperan por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 min y se resuspenden en 200 μL de medio mínimo MML (ver anexo medios de cultivo). Se plaqueó el volumen necesario (típicamente entorno a 50 μL) en medio sólido selectivo sin Leucina, Yeast –L, a (ver Anexo Medios de cultivo) y se incubó a 29 °C hasta observar el desarrollo de color.

- Transfección de células H1299.

La transfección de ADN se realizó en placas de 10 cm de diámetro conteniendo células H1299 con un crecimiento de entre 70 y 90 % de confluencia. Dicho estado se alcanzó luego de incubar la placa sembrada con 1×10^6 en 10 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) completo durante aproximadamente 48 hs a 37 °C en atmósfera controlada con 5 % de CO_2 . 400 μL de medio RPMI 1640 (Gibco) libre de aditivos, previamente incubado a 37 °C, fueron mezclados con 10 μL de Genejuice (Novagen), e incubados a temperatura ambiente durante 5 min. A esta mezcla se le agregó 7,5 μL de ADN (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se mezcló gentilmente y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, el volumen fue transferido a la placa de 10 cm de diámetro conteniendo las células, y se incubaron durante 48 hs a 37 °C en atmósfera controlada con 5 % de CO_2 .

5.2.5. Extracción, preparación y caracterización de proteínas.

- Lisis de células H1299.

Se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 15 mL de PBS 1X frío. Se descartó completamente el PBS, y las placas secas se sellaron con parafilm y se incubaron a -80 °C O.N. Se agregaron 300 μL de buffer de lisis (20 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl,

1 % NP40, adicionado con una tableta de cóctel de inhibidores de proteasas, Protease inhibitor complete (Roche), cada 15 mL de buffer) asegurándose de distribuirlo homogéneamente por toda la placa. Las células fueron removidas de la placa con un rastrillo y se transfirió el lisado celular a un tubo eppendorf. Se incubó en hielo durante 90 min con ciclos de vórtex cada 10 min y finalmente, se incubó a -20 °C O.N. El lisado se centrifugó a máxima velocidad durante 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

- Cuantificación de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford con el reactivo Bio-Rad Protein Assay, utilizando 1 mL del mismo y 4 µL de muestra o de solución estándar de BSA para realizar la curva de calibración. Se incubaron 5 min a temperatura ambiente. La determinación de la concentración de proteínas se realizó por triplicado mientras que las de los puntos de calibración se realizaron por duplicado. 20 µL de la mezcla se utilizaron para leer la absorbancia a 595 nm en lector de placa FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Alemania).

- Inmunoprecipitación.

Por cada ensayo de inmunoprecipitación (IP) se utilizaron 100 µg de proteínas totales alicuotadas en un volumen final de 500 µL completado con buffer de lisis. Para preclarificar el extracto proteico se agregaron 20 µL de esferas de sefarosa unidas a proteína G, previamente lavadas 3 veces con PBS 1X frío y resuspendidas en buffer de lisis en el mismo volumen que el tomado originalmente, y 2 µL de suero normal de ratón o conejo (Dako), y se incubó con rotación suave durante 30 min a 4 °C. Se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 2 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante preclarificado a un nuevo tubo, al que se le agregó 30 µL de esferas sefarosa-proteína G y 1 µg de anticuerpo en el caso CM-1 y Ab240, y 1,5 µg para el caso de Ab1620, y se incubó la mezcla O.N. con rotación a 4°C. El inmunoprecipitado se recuperó por centrifugación a 8.000 r.p.m. durante 2 min a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 300 µL cada uno de la siguiente manera; lavado 1: 2/3 de buffer de lisis y 1/3 de PBS 1X; lavado 2: 1/3 de buffer de lisis y 2/3 de PBS 1X; lavado 3: 1/6 de buffer de lisis y 5/6 de PBS 1X. En todos los lavados los componentes se encontraban a 4 °C, y entre ellos se realizó una centrifugación a 8.000 r.p.m. y 4 °C durante 2 min. Se descartó el sobrenadante con cuidado para minimizar el arrastre de complejos precipitados. Finalmente, los complejos formados se resuspendieron en 50 µL de buffer de

muestra 2X (125 mM Tris pH 6,8, 20% (v/v) Glicerol, 2% (w/v) SDS, 2% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0,001% (w/v) Bromofenol Blue) para SDS-Page.

- SDS-Page.

Las muestras de proteína de IP (15 µL) y de extractos totales (10 µg de proteínas totales) se resolvieron en geles pre empaquetados con gradiente de poliacrilamida de 4 a 12 % (Invitrogen).

- Western blot.

Las proteínas resueltas en la electroforesis se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa BioTrace™ NT Transfer Membrane (PALL Life Sciences, Estados Unidos) por medio de una transferencia semihúmeda a 110 mA durante 120 min. Anticuerpos específicos (monoclonal anti P53, clon DO1 (Dako) y monoclonal anti actina) se utilizaron para detectar la localización de las proteínas de interés, y anticuerpos secundarios unidos a Peroxidasa de rábano (HRP) se emplearon para detectar la localización de los anticuerpos primarios. La detección se realizó empleando el reactivo quimioluminiscente ECL (GE Healthcare) y se reveló en el equipo AGFA CURIX-60 (Agfa HealthCare Corporation, Estados Unidos).

5.3. Resultados.

Se eligieron dos sistemas, levadura y cultivo de células humanas, para abordar el efecto de algunas mutaciones sinónimas sobre la estructura/actividad de P53; 108G>A, 1014C>T, y Pro1, Pro2, Pro3 y Pro4 en el caso de las conformaciones generadas en cultivos celulares, y de una mezcla de combinaciones de mutaciones sinónimas en los codones de las Prolinas 151, 152 y 153 para el estudio de la función de activación transcripcional de P53 en levaduras (ver sección “Métodos”).

Cada uno brinda información diferente acerca de la estructura y función de P53. El método de FASAY en levaduras permite evaluar la actividad de P53 como factor de transcripción de ciertos promotores blanco vinculados a vías celulares centrales; *Bax*, *p21*, *RGC*.

La expresión de los diferentes mutantes en cultivo de células humanas H1299, y la posterior inmunoprecipitación utilizando anticuerpos conformacionales (salvaje y desnaturalizada

o parcialmente desnaturalizada) constituye la metodología empleada para aproximarnos de forma más directa a la posible variación de la conformación de P53.

5.3.1. Análisis del uso de codones de TP53.

Los resultados de la comparación del uso de codones de TP53 en humanos y en la levadura *S. cerevisiae* se muestran en la Figura 13. Para realizar este algoritmo, tomamos la frecuencia de utilización de los diferentes codones en proteínas de alta expresión (proteínas ribosomales) en cada uno de los organismos, y aplicamos lo obtenido a la secuencia codificante de TP53. De esta manera podemos detectar zonas en las que se agrupan codones frecuentes (rápidos) o infrecuentes (lentos), y definir para un codón particular de TP53 el comportamiento que tendría en ese organismo.



Figura 13. Comparación del uso de codones de TP53 en humanos y en la levadura *S. cerevisiae* utilizando el algoritmo %Min/Max. Se muestra el gráfico del valor de Min/Max calculado en ventanas de 18 codones de acuerdo a la frecuencia de uso del mismo en cada organismo en función del número de codón. Se indica la extensión de cada dominio de la proteína bajo el gráfico. El gráfico en azul corresponde a humanos mientras que el bordeado a levaduras.

De acuerdo a la figura, vemos que existen diferencias en cuanto a la frecuencia de utilización de codones entre humanos y levaduras. Sin embargo, exceptuando tres zonas particulares (codones 1 a 30, 131 a 150 y 193 a 221), y sin considerar los valores absolutos obtenidos, podemos decir que la tendencia en cuanto a la “velocidad” de traducción local se mantiene, lo que está dado por la forma que describen ambos gráficos en la mayor parte de la secuencia codificante de TP53. Esa tendencia sugeriría que al menos la variación de la cinética local de la traducción sería parecida.

5.3.2. Actividad de transactivación en levaduras: FASAY

El sistema FASAY permite estudiar la función de transactivación de P53 en levaduras sobre tres elementos de respuesta provenientes de genes regulados por la proteína (*Bax*, *p21*, *RGC*). Básicamente, la técnica permite evaluar la funcionalidad de P53 a través de la coloración que adquiere la colonia de levadura. La aparición (y las variantes) de color dependen del estatus de P53, el que puede ir desde color blanco a rojo como consecuencia de la expresión o no del gen reportero *ADE2*. Dicho gen se encuentra bajo el control transcripcional de los elementos de respuesta de *Bax*, *p21*, y *RGC*, los tres inducibles por P53. El producto del gen *ADE2*, la enzima fosforibosilamino-imidazol-carboxilasa, es sintetizado cuando P53 es funcional, generando colonias de color blanco, mientras que las colonias de color rojo se originan cuando la transactivación por parte de P53 no es funcional.

La utilización de tres cepas con elementos de respuesta provenientes de tres genes inducibles por P53 permite comparar la actividad de los distintos mutantes en relación a las diferentes vías, lo que depende de la interacción particular entre P53 y el promotor, pero también de la interacción con factores de transcripción accesorios vinculados con algunas de las vías estudiadas.

Metodológicamente, es necesario transformar las levaduras *S. cerevisiae* cepa YPH-Bax, YPH-p21 y YPH-RGC, con un plásmido capaz de recombinar con amplicones de *TP53* (mecanismo denominado "gap repair") y expresar la proteína, junto con los productos de *TP53* de interés amplificadas por PCR. El plásmido de expresión en levaduras utilizado fue el pSS16. Dicho vector contiene el marcador de selección *Leu2*, el promotor del gen *ADH2* que se encuentra hacia el 5' de la secuencia codificante de *TP53*, y regula su expresión, y hacia el extremo 3' de la secuencia de *TP53* se encuentra el terminador *CYC1* (ver Figura 11). La región codificante de *TP53* se encuentra interrumpida por el marcador *URA3* entre los codones 67 y 346 (ver Figura 11). pSS16 fue digerido con las enzimas *HindIII* y *StuI*, lo que libera el marcador *URA3* y origina la linearización de pSS16 que contiene parte de la secuencia de *TP53* en cada uno de los extremos y que actuarán como zona de homología en la recombinación. Este plásmido digerido fue purificado de un gel de agarosa, e introducido en las levaduras junto con el producto de PCR de *TP53* de interés (ver Figura 14), y ADN de esperma de salmón como "carrier". En este trabajo, se estudió la funcionalidad de P53 conteniendo los dos cambios sinónimos detectados en el análisis de la secuencia codificante de muestras tumorales provenientes del Hospital de Cáncer A. C. Camargo,

el polimorfismo 108G>A y el cambio 1014C>T, y la mezcla de mutantes sinónimos con las 64 combinaciones posibles para los 3 codones de las Prolinas 151, 152 y 153.

Las levaduras transformantes fueron seleccionadas en el medio Yeast –L, a, las que se incubaron durante 5 días a 29 °C para que se genere el color.

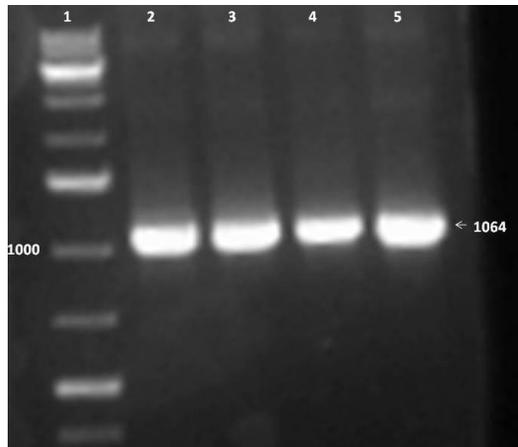


Figura 14. Amplificación de *TP53* para FASAY. Se utilizaron como molde los plásmidos pcDNA3-*TP53* conteniendo las diferentes mutantes y controles. 5 μ L de los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, Bromuro de Etidio 0,5 μ g/mL, revelando la presencia del amplicón esperado de 1064 pb señalado en la figura (cebadores *TP53* P3N y *TP53* P4). Carril 1: Marcador de peso molecular, 1 Kb ladder, Fermentas. Carriles 2, 3, 4 y 5: p53 wt, R175H, 108G>A y 1014C>T, respectivamente.

5.3.2.1. Control negativo.

El ensayo para cada una de las sustituciones puntuales se realizó 4 veces de forma independiente. En cada ensayo el control negativo representado por la sustitución aminoacídica R175H que induce la pérdida de la capacidad de unión de la proteína al elemento de respuesta, originó mayormente colonias de color rojo. Este fenotipo es consecuencia de la ausencia de P53 funcional dentro de la célula quien es incapaz de guiar la expresión del gen *ADE2* (ver Figuras 15, 16 y 17). Las colonias de color blanco detectadas en estos ensayos, de menor tamaño que las colonias normales, se denominan mutantes “petites” y son producto de mutaciones en alguno de los genes de la respiración. Estas colonias no son consideradas en el conteo de transformantes.

5.3.2.2. Control positivo.

Las colonias obtenidas en la transformación con el gen salvaje resultaron mayormente colonias de color blanco, reflejo de la expresión del gen *ADE2* como consecuencia de la inducción por parte P53. Este fenotipo de colonias fue claramente visible para las cepas conteniendo los elementos de respuesta *p21* y *RGC*, donde 93,8% y 94,9% de las colonias transformantes

resultaron de color blanco, respectivamente. Los transformantes de la cepa conteniendo el promotor de *Bax* demostraron un color rosado-rojizo típico de una situación en la que la función de P53 no es normal, en el 100% de los casos. Este patrón de coloración sugiere una falta de capacidad del elemento de respuesta de *Bax* de reclutar los factores necesarios para llevar a cabo la transcripción del gen *ADE2*, particularmente el reclutamiento de P53 en el sistema de levaduras (ver Figuras 15, 16 y 17).

5.3.2.3. Mutantes analizados.

El resultado obtenido para los cambios puntuales sinónimos y la mezcla de mutantes al azar en la zona de las Prolinas 151, 152 y 153, muestra colonias rosado-rojizo en el 100% de los casos para la cepa YPH-*Bax* (Figura 15). La presencia de colonias con este fenotipo sugiere, en general, la ocurrencia de la pérdida de función de P53. Sin embargo, al considerar el resultado de la transformación de la cepa YPH-*Bax* con el control positivo presentado más arriba (100% de células de color rosado-rojizo) apoya la idea de que el elemento de respuesta de *Bax* no reclutaría a P53 en estas condiciones.

Por otro lado, las cepas conteniendo los elementos de respuesta de *p21* y *RGC* transformadas con *TP53*108G>A y *TP53*1014C>T originaron colonias transformantes de color blanco en los diferentes ensayos independientes realizados (YPH-*p21*/108G>A; 93,8%, YPH-*p21*/1014C>T; 95,5%, YPH-*RGC*/108G>A; 94,9%, y YPH-*RGC*/1014C>T; 94,3%, ver Figuras 16 y 17 y Tabla 6), similares a lo observado para el control positivo de cada transformación, pero notablemente diferentes al resultado alcanzado con el control negativo de cada ensayo. En las placas también se formó una pequeña cantidad de colonias de color rojo, en torno al 5% en todos los casos. Estas colonias se asumen como consecuencia de transformaciones con amplicones de *TP53* conteniendo posibles errores introducidos en la amplificación por PCR. Estos errores en general originan la pérdida de función de P53, como ha sido reportado anteriormente^{94,95}.

El hecho de que la gran mayoría de las colonias obtenidas en las transformaciones con *TP53* conteniendo mutaciones sinónimas puntuales (108G>A y 1014C>T) indica que éstas no producen una modificación detectable de la capacidad de P53 de activar la transcripción de *p21* y *RGC*, en las condiciones experimentales ensayadas.

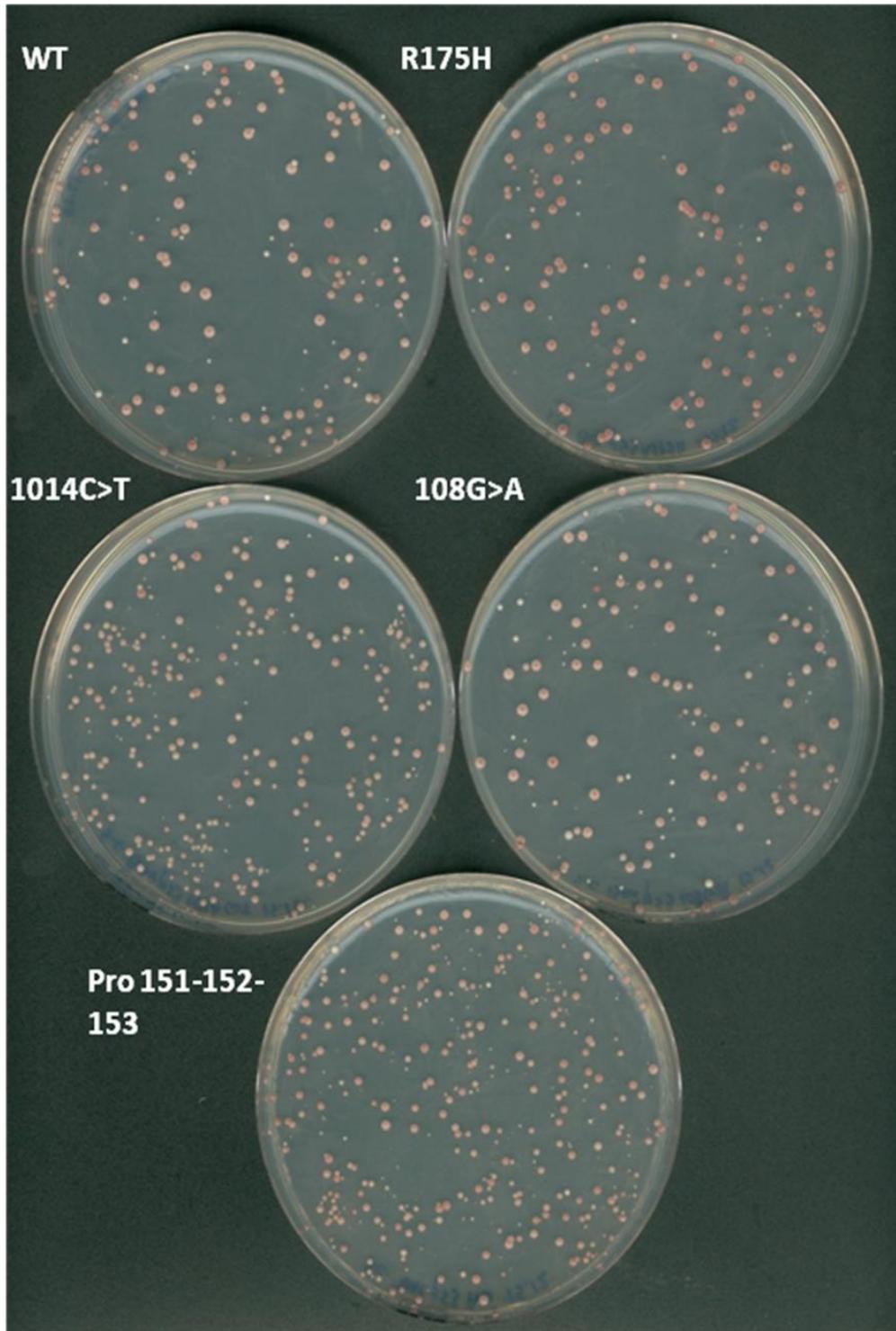


Figura 15. Resultado de FASAY para cepa YPH-Bax.. Se muestran las placas obtenidas al realizar una de las transformaciones de las levaduras *S. cerevisiae* conteniendo el elemento de respuesta del gen *Bax* con los productos de PCR de los diferentes mutantes de *TP53*. 50 μ L de la mezcla de transformación fueron plaqueados en medio selectivo Yeast -L,a, e incubado a 29°C durante 5 días. El mutante analizado en cada caso se señala en la figura.

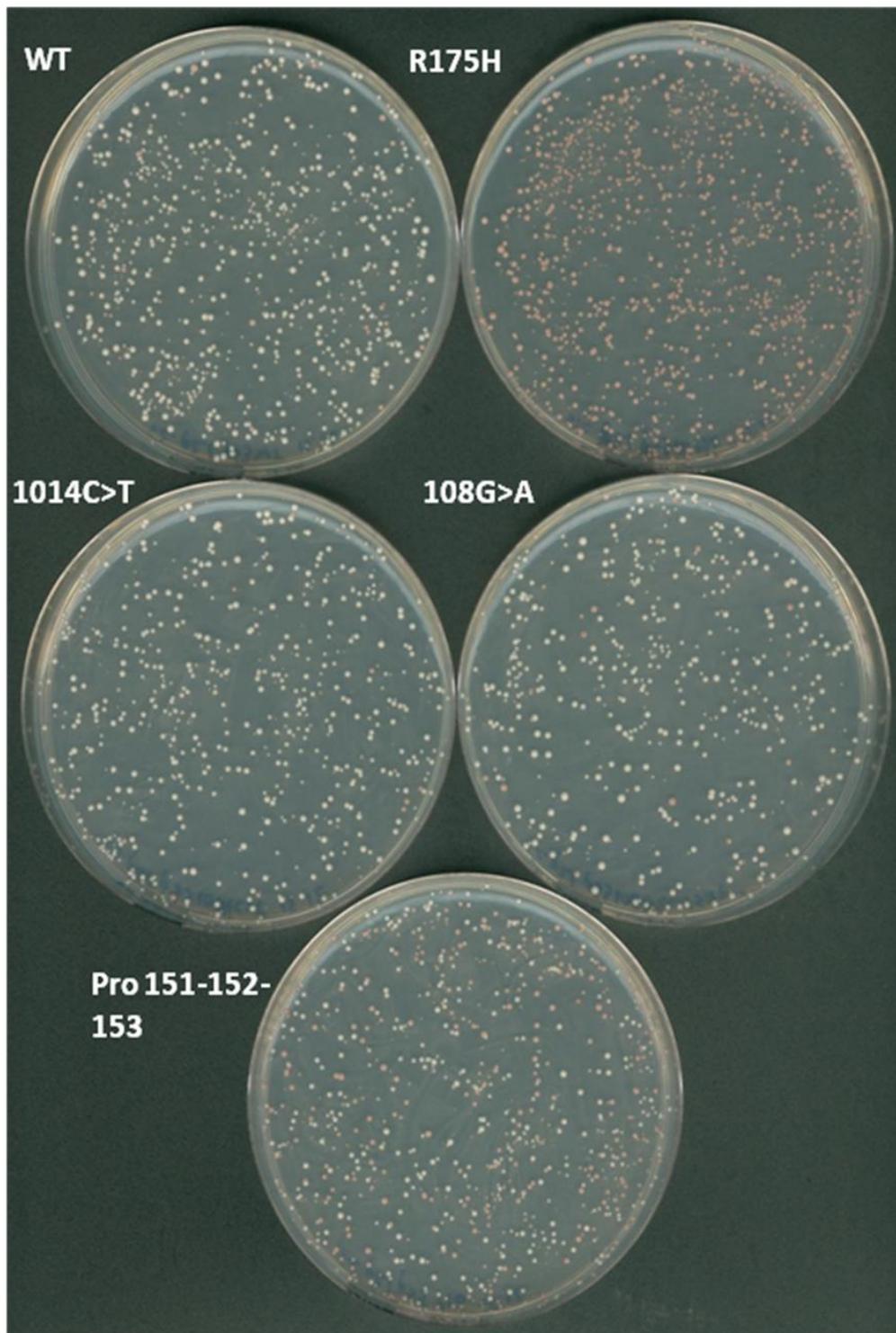


Figura 16. Resultado de FASAY para cepa YPH-p21.. Se muestran las placas obtenidas al realizar una de las transformaciones de las levaduras *S. cerevisiae* conteniendo el elemento de respuesta del gen *p21* con los productos de PCR de los diferentes mutantes de *TP53*. 50 μ L de la mezcla de transformación fueron plaqueados en medio selectivo Yeast -L,a, e incubado a 29°C durante 5 días. El mutante analizado en cada caso se señala en la figura.

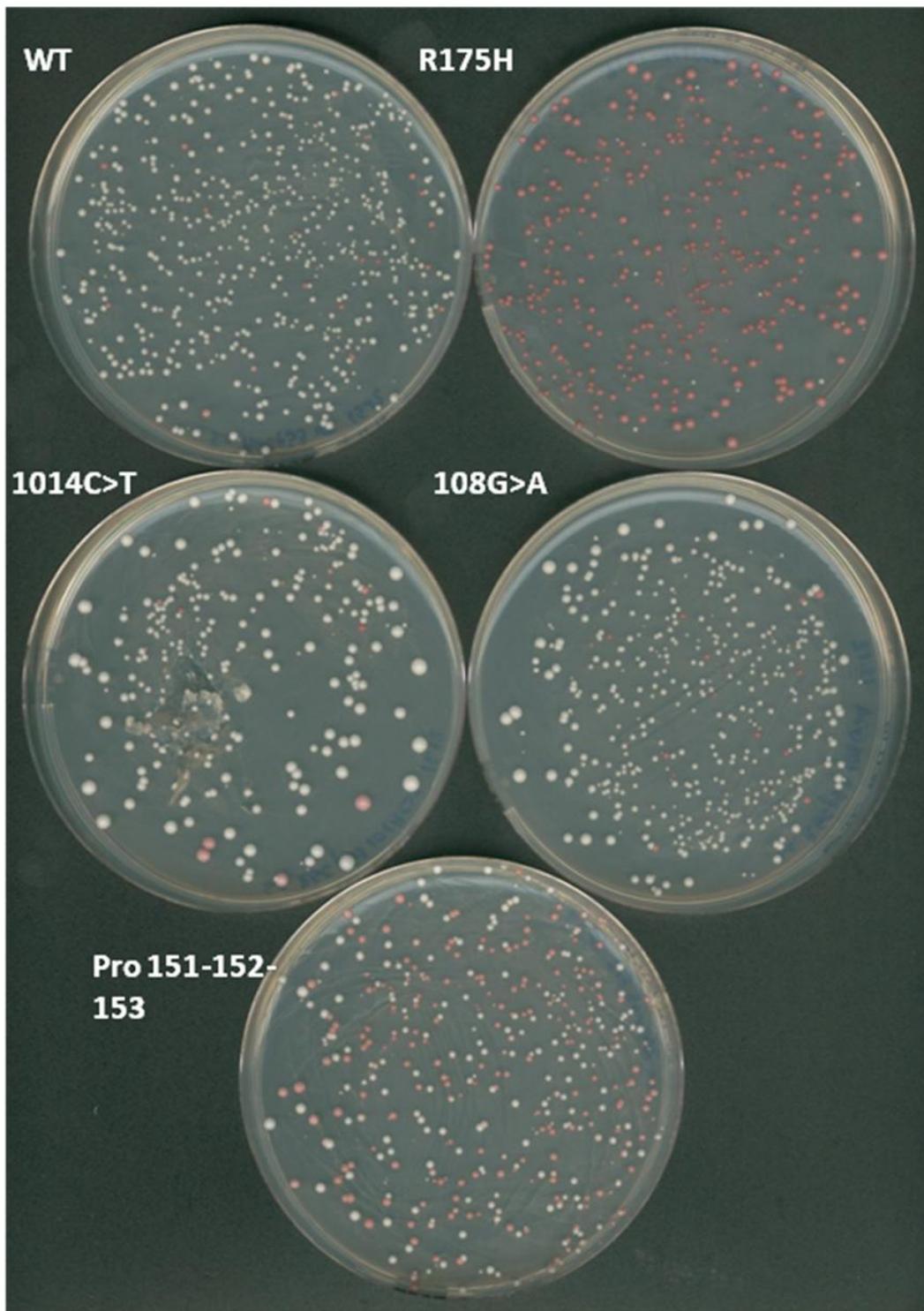


Figura 17. Resultado de FASAY para cepa YPH-RGC.. Se muestran las placas obtenidas al realizar una de las transformaciones de las levaduras *S. cerevisiae* conteniendo el elemento de respuesta del gen *RGC* con los productos de PCR de los diferentes mutantes de *TP53*. 50 μ L de la mezcla de transformación fueron plaqueados en medio selectivo Yeast -L,a, e incubado a 29°C durante 5 días. El mutante analizado en cada caso se señala en la figura.

Tabla 6. Resultados de los ensayos de FASAY. Se muestran los porcentajes de colonias blancas y rojas transformantes obtenidas para cada cepa con cada uno de los amplicones de *TP53* utilizados para dos diferentes ensayos. Se muestra el promedio y el desvío estándar para cada uno de los valores. Transf. A y Transf. B representan dos de las transformaciones realizadas, para las que se cuenta con el número de colonias obtenidas. Para el caso de los mutantes de Prolinas, una de las transformaciones fue realizada junto con el resto de los mutantes y controles utilizando las diferentes enzimas polimerasas de ADN dentro del mismo ensayo como describe el texto, mientras que la restante fue realizada junto con el control positivo *TP53wt* solamente, y utilizando en ambos casos la enzima polimerasa con la que se pudo amplificar los mutantes de Prolina (Taq DNA polymerase, Roche).

Cepa	<i>TP53</i>	Nº de colonias Blancas				Nº de colonias rojas			
		Trasnf. A	Transf. B	Promedio	Desvío	Transf. A	Transf. B	Promedio	Desvío
	wt	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	R175H	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0
<i>Bax</i>	108G>A	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	1014C>T	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	Pro*	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	Wt	94,2	93,4	93,8	0,4	5,8	6,6	6,2	0,4
	R175H	0,0	0,2	0,1	0,1	100,0	99,8	99,9	0,1
<i>p21</i>	108G>A	92,7	94,8	93,8	1,0	7,3	5,2	6,2	1,0
	1014C>T	96,5	94,4	95,5	1,0	3,5	5,6	4,5	1,0
	Pro*	54,4	68,3	61,3	6,9	45,6	31,7	38,7	6,9
	wt	95,5	94,4	94,9	0,6	4,5	5,6	5,1	0,6
	R175H	0,0	0,7	0,3	0,3	100,0	99,3	99,7	0,3
<i>RGC</i>	108G>A	95,3	94,4	94,9	0,5	4,7	5,6	5,1	0,5
	1014C>T	93,3	95,4	94,3	1,0	6,7	4,6	5,7	1,0
	Pro*	48,5	45,1	46,8	1,7	51,5	54,9	53,2	1,7

Sin embargo, el resultado de la transformación de las cepas conteniendo los elementos de respuesta de *p21* y *RGC* con el producto de amplificación de los mutantes en las Prolinas 151, 152 y 153 muestra un patrón diferente. El número de colonias blancas y rojas en cada uno de los ensayos es similar, y los valores son alejados de los esperados si las mutaciones no indujeran cambios en la actividad de P53: Las colonias rojas alcanzan el 31,7% y el 54,9% de las totales para el ensayo con YPH-*p21* e YPH-*RGC*, respectivamente (Figuras 16 y 17 y Tabla 6). Este resultado sugiere que al menos en algunas de esas colonias de color rojo existe una modificación que afecta

la función de P53 de activador de la transcripción a partir de los elementos de respuesta mencionados en el sistema empleado.

Considerando que la enzima ADN polimerasa utilizada para amplificar los mutantes en las Prolinas (Taq DNA polymerase, Roche) no es la misma que la empleada en los casos anteriores para los mutantes puntuales y los controles *TP53*wt y *TP53*R175H (Expand Long Template PCR System, Pfu, Roche), se realizó una amplificación de *TP53*wt en estas mismas condiciones para verificar que no exista un efecto del diferente grado de fidelidad de cada una de las enzimas.

5.3.2.4. Repetición del estudio para mutantes de Prolinas con ADN polimerasa sin corrección de pruebas.

Luego de transformar las levaduras con los diferentes productos de amplificación se determinó el número de colonias rojas originadas en el ensayo realizado con amplicones de mutantes de Prolinas originados con la enzima Taq DNA polymerase (Roche) (Transf. B, 31,7% para YPH-p21 y 54,9% para YPH-RGC). Se estableció que el número de colonias sin función de P53 es similar al observado anteriormente (Transf. A, 45,6% para YPH-p21 y 51,5%) (Tabla 6). Además, en ambos casos la cantidad de colonias rojas resultantes representan un valor mayor al esperado para ser atribuidas a errores de amplificación por PCR en presencia del gen normal.

Para el caso de las transformaciones con amplicones *TP53*wt originados con ambas enzimas, los resultados en ambos casos presentan un patrón similar; la mayoría de las colonias obtenidas son de color blanco, aunque el número de colonias rojas se ve levemente incrementado al utilizar la enzima sin corrección de pruebas, ver Figuras 16, 17 y 18.

Los resultados expuestos más arriba donde fueron apreciadas diferencias de color entre las levaduras transformadas con diferentes construcciones de *TP53* corresponden a los ensayos realizados con los elementos de respuesta de *p21* y *RGC*. Por el contrario, los experimentos realizados con el elemento de respuesta de *Bax* y amplicones producidos con la enzima Taq DNA polymerase (Roche) arrojaron en su totalidad transformantes de color rojizo-rosado. Este resultado es el mismo que el presentado más arriba para transformaciones realizadas con el gen salvaje, con las mutaciones puntuales y con la mezcla de mutantes (ver Figura 18). Estos resultados indican que las diferencias en el número de colonias rojas/blancas entre las transformaciones realizadas con *TP53*wt y con la mezcla de mutantes de Prolinas, al utilizar cualquiera de las dos ADN polimerasas, no se deberían a errores introducidos en la reacción de amplificación.

Además, el número de colonias rojas observado se encuentra muy por encima del valor umbral de colonias rojas que se obtienen por errores de amplificación introducidos por las enzimas polimerasas, el que alcanza el 5 %^{94,95}. Este resultado ofrece más confianza a la hipótesis del posible efecto de algunas de las mutaciones introducidas en la región rica en Prolinas sobre la función de transactivación de P53 en muchas de las colonias rojas resultantes.

Considerando que algunas de las mutaciones generadas podrían generar la diferencia señalada anteriormente, intentamos identificarlas mediante la recuperación del ADN de las colonias de color rojo y la secuenciación el gen de *TP53*. Este hito se intentó completar pero no se logró purificar ADN de calidad para someterlo a secuenciación. Para alcanzar este objetivo se realizarán nuevas transformaciones de la forma descrita anteriormente con los amplicones correspondientes a la mezcla de mutantes de Prolinas, y las colonias rojas serán sometidas a extracción de ADN plasmídico (pSS16-*TP53*). La región de *TP53* será secuenciada de forma de identificar la mutación responsable del fenotipo, lo que estimamos concluir a la brevedad.

5.3.3. Variantes conformacionales de P53 en células humanas en cultivo.

En este trabajo propusimos estudiar el efecto que podrían tener algunas mutaciones sinónimas sobre la estructura de P53, mediante la utilización de anticuerpos conformacionales específicos. Para esto, se expresó P53 *in vivo* en células humanas H1299 que no presentan expresión endógena de P53. Estas células fueron transfectadas con las construcciones *TP53wt*, *TP53R175H*, *TP53108G>A*, *TP531014C>T*, *TP53Pro1*, *TP53Pro2*, *TP53Pro3* y *TP53Pro4*, como se describió anteriormente. Transcurridas 48 hs, tiempo en el que se expresa la proteína, se lisaron las células y se obtuvieron los extractos totales, que fueron utilizados en ensayos de IP con anticuerpos conformacionales.

En este trabajo se utilizaron 3 anticuerpos. CM-1 es un anticuerpo policlonal, que se une a la molécula P53 en cualquier conformación y será utilizado para estimar la cantidad total de P53. Para reconocer la conformación nativa utilizamos el anticuerpo monoclonal Ab1620 que tiene baja afinidad por conformaciones desnaturalizadas. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal Ab240 se une específicamente a un epítipo lineal (aminoácidos 213 a 217) normalmente “enterrado” en el interior de P53. Este epítipo queda expuesto en moléculas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas^{96,97}.

WT

Mutantes Pro

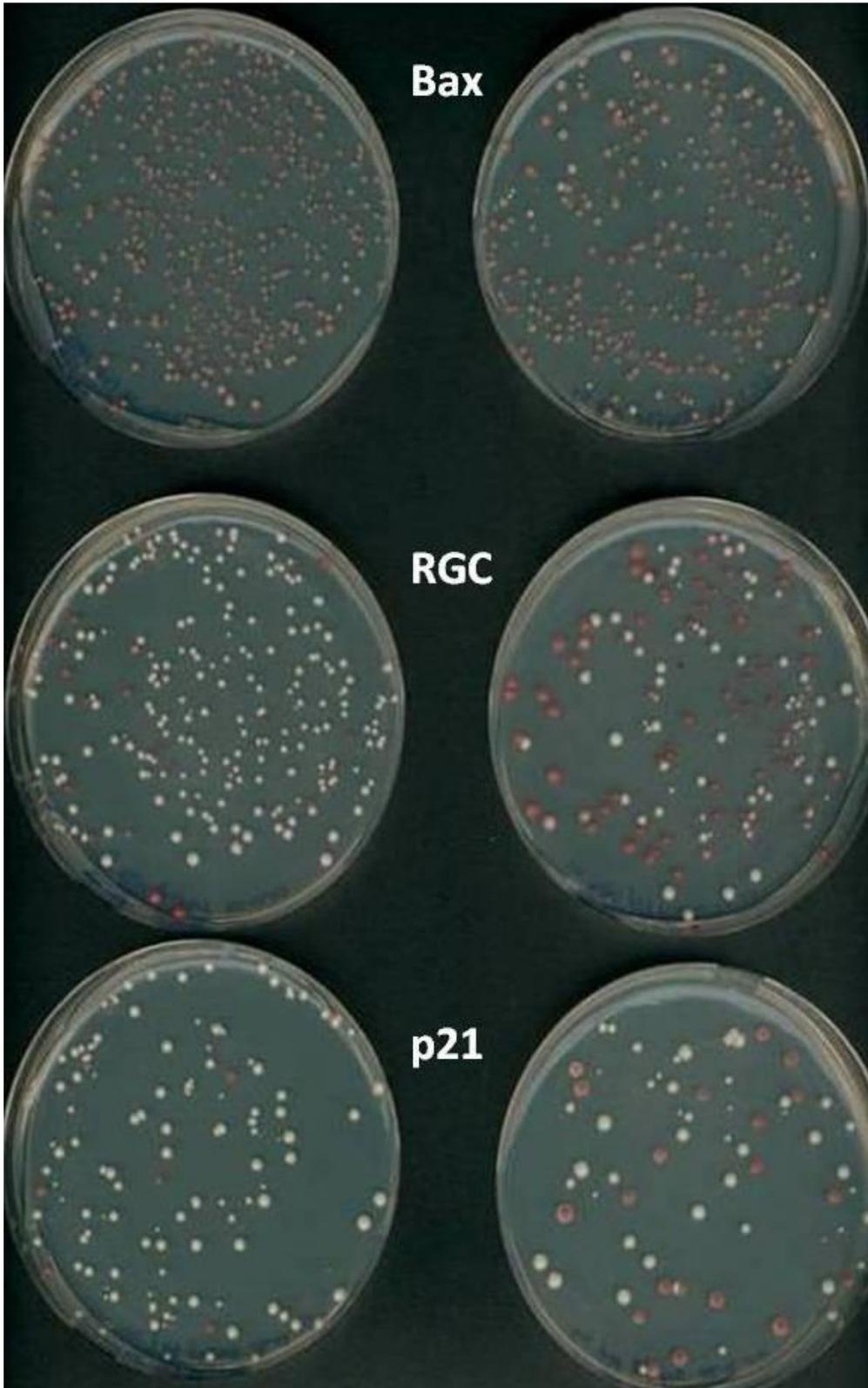


Figura 18. Resultado FASAY con enzima Taq sin corrección de prueba. Se muestran las placas obtenidas al transformar las levaduras *S. cerevisiae* conteniendo los diferentes elementos de respuesta, con los productos de PCR de los mutantes de las Prolinas 151, 152, y 153 de *TP53*, amplificados con la enzima Taq DNA polymerase, Roche. 50 μ L de la mezcla de transformación fueron plaqueados en medio selectivo Yeast -L,a, e incubado a 29°C durante 5 días. El elemento de respuesta y el mutante analizado en cada caso se señalan en la figura.

Los ensayos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo utilizando esferas de sefrosa unidas a Proteína G a partir de cantidades iguales de proteínas totales. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron las cantidades relativas de cada conformación por western blot (como se describe en materiales y métodos). Este procedimiento se repitió 5 veces de manera independiente. Los primeros 4 dieron resultados poco coherentes y fueron descartados del análisis. Por tanto, nos concentraremos en analizar los datos obtenidos en un único ensayo coherente.

La cantidad de proteína de los extractos totales utilizada para cada inmunoprecipitación se mantuvo constante. Ésta fue estimada por el método de Bradford y controlada mediante detección de actina, por western blot, como se muestra en la Figura 19.

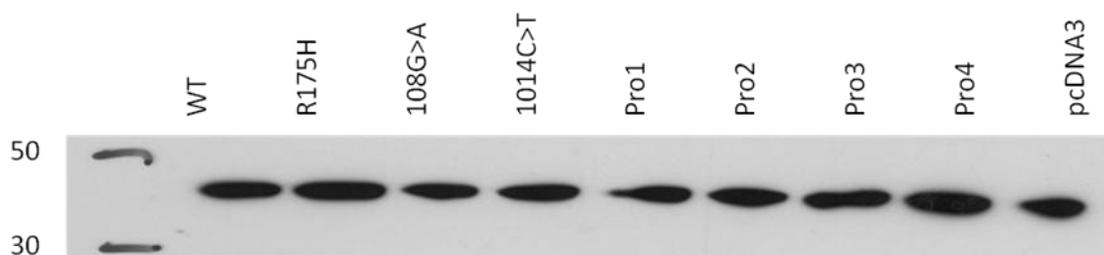


Figura 19. Control de la cantidad de proteína total. Se muestra el resultado de la detección de actina para el extracto total de cada una de las transfecciones con los diferentes constructos de *TP53*, como control de la cuantificación de proteínas. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales y la actina se detectó sobre la membrana de Nitrocelulosa con una dilución 1:5000 del anticuerpo primario y dilución 1:2000 del anticuerpo secundario.

La Figura 19 muestra que el nivel de actina se mantiene constante en los extractos proteicos de las células transfectadas con las diferentes construcciones de *TP53*. De esta manera podemos considerar que la cantidad de proteínas totales utilizada para los ensayos de inmunoprecipitación es equivalente y no afectaría los resultados.

La cantidad de P53 en los extractos totales y en los inmunoprecipitados fue estimada por western blot. Se utilizó el anticuerpo policlonal CM-1 para las inmunoprecipitaciones con anticuerpos conformacionales y DO-1 para la IP con CM-1.

Los resultados se muestran en la Figura 20. En todos los casos se observa la presencia de una banda en el entorno de los 50 kDa correspondiente al monómero de P53 (de tamaño molecular aparente de 53 kDa) como se esperaba. El control negativo, la transfección con el

plásmido de expresión sin el inserto de *TP53*, no reveló la presencia de P53 en ninguno de los casos como se esperaba.

Es de destacar la variación en los niveles de expresión de P53 para las diferentes construcciones analizadas. Aunque no es posible realizar una cuantificación del nivel de proteína presente en cada caso, sí podemos comparar la intensidad de las bandas en el ensayo. El análisis de la fracción total muestra que P53 se encuentra, de forma muy notoria, muy expresada en el caso de la mutación utilizada como control negativo, *TP53R175H*. Este resultado es el esperado ya que el cambio de Arg por His en esa región induce un cambio de conformación de P53 que resulta más estable.

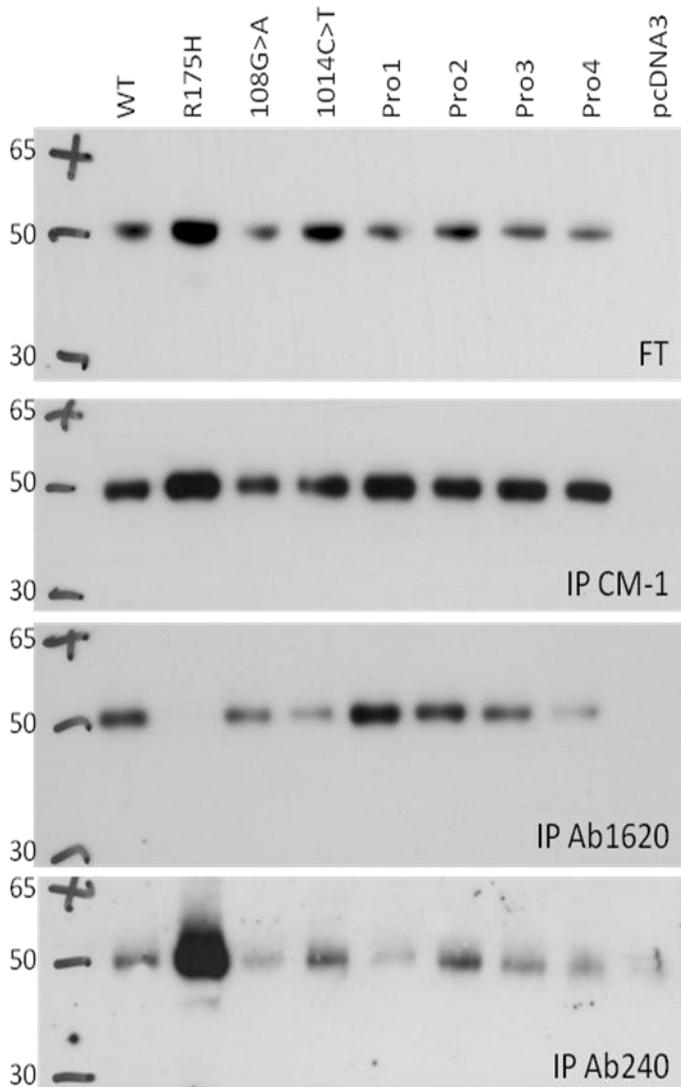


Figura 20. Análisis de las cantidades relativas de las conformaciones de P53 expresadas en células H1299. Se muestran ensayos de WB contra la proteína P53 inmunoprecipitada (IP) con diferentes anticuerpos: CM-1, anticuerpo policlonal; Ab1620; anticuerpo monoclonal contra P53 salvaje; Ab240, anticuerpo monoclonal contra P53 desnaturalizada o parcialmente desnaturalizada. FT, Extracto total de proteínas. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales del extracto total y 15 μ L de cada inmunoprecipitación.

Las cantidades de P53 obtenidas al expresar los mutantes sinónimos y *TP53wt* son similares. Aunque es posible notar que el nivel de P53 detectado para las construcciones *TP53wt*, *TP531014C>T* y *TP53Pro2* es mayor en comparación a las restantes *TP53108G>A*, *TP53Pro1*, *TP53Pro3* y *TP53Pro4*, en ningún caso se comparan con lo observado para la mutación R175H.

El resultado de la inmunoprecipitación con el anticuerpo CM-1 utilizado como control de la cantidad de P53wt y mutantes muestra variaciones. De la misma forma como ocurrió con el extracto total, P53 conteniendo el cambio R175H se detecta en mayor cantidad que la codificada por *TP53wt* y los demás mutantes. Sin embargo, el mutante que le sigue al control *TP53R175H* en nivel de expresión es *TP53Pro1*, el que se encontraba dentro del grupo de los menos representados en la fracción total. En un mismo nivel de proteína expresada se encuentran las construcciones *TP53wt*, *TP53Pro2*, *TP53Pro3* y *TP53Pro4*, y finalmente las mutantes sinónimas puntuales *TP53108G>A* y *TP531014C>T*, lo que en algunos casos está en desacuerdo con lo observado en el análisis del extracto total. Las variaciones en el nivel de expresión pueden afectar el resultado de las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos conformacionales, siendo necesaria una normalización respecto a los niveles de P53 en el extracto de proteínas totales.

Los resultados de las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos Ab1620 y Ab240 muestran que la proteína salvaje y conteniendo la mutación R175H se distribuyen de diferente manera: P53 codificada por el gen salvaje es reconocida mayormente por el anticuerpo Ab1620, mientras que la señal de la mutante R175H inmunoprecipitada con este anticuerpo es nula. Por el contrario, el anticuerpo Ab240 que reconoce la proteína desnaturalizada o parcialmente desnaturalizada revela gran cantidad de P53 conteniendo la mutación R175H, y la diferencia con respecto a la cantidad unida por los mutantes y el gen salvaje es significativa. En relación a la IP de la proteína salvaje con el anticuerpo Ab240 se observa que existen moléculas que no adoptan la conformación nativa y que exponen el epítipo relacionado a la pérdida de estructura nativa, lo que no pasa al expresar la mutante R175H e inmunoprecipitar con Ab1620. La mutación R175H produce mayormente la proteína mal plegada.

Para el caso de las mutaciones sinónimas se observa que P53 se expresa adoptando ambas conformaciones, nativa y desnaturalizada (Figura 20), como muestra la presencia de señal en los western blots correspondientes a las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos Ab1620 y Ab240. Además, se observa que la cantidad relativa de cada una de las conformaciones de P53 expresada por la secuencia wt y las mutantes es variable. En particular se observa que la cantidad de proteína en la conformación desnaturalizada producida por las mutaciones sinónimas en ningún caso se

acerca al patrón descrito por el mutante *TP53R175H*, e incluso no superan el nivel detectado para el gen salvaje.

De los resultados presentados más arriba es importante resaltar lo observado para la mutación 1014C>T. En este caso, el nivel de P53 detectado en el extracto total y en la inmunoprecipitación con-CM-1 son similares al de P53 WT. Sin embargo, parecería existir una diferencia en los resultados de las inmunoprecipitación con Ab1620 e inmunoprecipitación con Ab240. La conformación está menos representada que la generada por *TP53wt*, y por el contrario la conformación desnaturalizada parece producirse en igual o mayor cantidad que la generada por la construcción salvaje. Esto podría reflejar un efecto de esta mutación sobre la estructura de P53 en las condiciones del ensayo.

5.4. Discusión.

Algunas mutaciones que implican un cambio de aminoácido pueden afectar la función de una proteína. Este tipo de mutaciones puede modificar un sitio de interacción esencial para la función, ya sea con otras proteínas o con diferentes moléculas. También, puede alterar sitios blanco de modificaciones post traduccionales imprescindibles para el correcto accionar de la proteína. Además, otra forma en que la ocurrencia de estas mutaciones puede alterar la actividad normal es mediante la inducción de un cambio conformacional en una región particular de la molécula, o incluso modificando la conformación global, lo que ha sido propuesto en algunos trabajos ^{96,97}. Las mutaciones sinónimas han sido relegadas en cuanto al posible efecto sobre la estructura de proteínas. Se las ha considerado “silenciosas” por el hecho de conservar la secuencia aminoacídica, y son escasos los trabajos que abordan el estudio del efecto que puedan tener en la estructura y funcionalidad de las proteínas. En este trabajo analizamos el posible efecto de mutaciones sinónimas sobre la función/estructura de P53 con dos aproximaciones experimentales empleando dos sistemas de expresión eucariotas.

5.4.1. Estudios de actividad de transactivación de P53.

En la levadura *S. cerevisiae* se estudió la capacidad de transactivación de P53 sobre tres elementos de respuesta que están asociados a la expresión de Bax, p21 y RGC. En el sistema FASAY empleado, estos elementos de respuesta regulan la expresión del gen reportero *ADE2* cuyo producto es necesario para evitar la acumulación de un metabolito que tiñe la colonia de rojo, lo

que ocurre cuando P53 no es funcional. El número de colonias rojas y blancas producidos por la proteína P53 conteniendo las mutaciones analizadas se comparó con lo obtenido por el gen salvaje (control positivo) y por un control negativo en el cual P53 carece de capacidad de unión al ADN.

Los resultados obtenidos indican que el elemento de respuesta de *Bax* no presenta el comportamiento esperado. Esta conclusión se extrae del resultado de la transformación con todos los mutantes y controles utilizados, en las que se obtuvo solamente levaduras de color rosado-rojizo. Este fenotipo podría ser explicado por la expresión de P53 con alguna modificación de la actividad. Sin embargo en este caso, la “debilidad” del elemento de respuesta de *Bax* para iniciar la transcripción en relación a otros como el de *p21* podría explicar el resultado descrito. El elemento de respuesta de *Bax* sería ineficaz en reclutar la maquinaria transcripcional en las condiciones en que se realizaron los experimentos. Este comportamiento ha sido reportado para mutaciones que generan un cambio de aminoácido, como R181L y R283H, que son capaces de inducir la expresión del gen reportero bajo el control del elemento de respuesta de *p21* pero no cuando se utiliza el elemento de respuesta de *Bax*, obteniendo levaduras de color blanco y rojo en el FASAY, respectivamente. Además, experimentos de retardo en gel realizados para evaluar la afinidad de las diferentes mutantes de P53 por estos elementos de respuesta también presentaron variaciones con respecto a la proteína salvaje: Los mutantes R181L y R283H presentaron similar afinidad por el elemento de respuesta de *p21* que la proteína salvaje, mientras que su capacidad de unión era menor al utilizar el elemento de respuesta de *Bax*⁸⁹. Estos resultados sugieren que la falta de actividad se debe a una alteración de la unión de P53 a este elemento de unión en el ADN^{89,96}.

El comportamiento diferencial descrito más arriba podría señalar distintas formas de acción de P53 en cada una de las vías; mientras el efecto sobre *p21* es esencial para detener el ciclo celular, la inducción de la apoptosis mediada por expresión de *Bax* puede ser suplantada por otros mecanismos mediados por interacciones proteína-proteína^{89,98}.

Probablemente, la “debilidad” descrita para el elemento de respuesta de *Bax*, incluso con la proteína wt, se deba a diferencias entre las secuencias de los elementos de respuesta. En el caso de *p21*, el elemento de respuesta es GAACATGTCC/CAAG, que contiene dos cambios con respecto a la secuencia consenso, mientras que en el caso de *Bax*, TCACAAGTTA/G/AGACAAGCCT, existen tres cambios con respecto a la secuencia consenso, que podrían modificar en mayor medida la interacción ADN-proteína⁸⁹.

De todas formas, la falta de reconocimiento del elemento de respuesta de *Bax* por parte de las proteínas incluyendo *TP53*wt podría deberse también a la existencia de otros actores que podrían estar involucrados en el mecanismo de reconocimiento, unión, y activación de un elemento de respuesta.

La idea de utilizar tres elementos de respuesta de genes implicados en diferentes vías reguladas por P53 apuntaba a comparar la respuesta de cada uno de ellos a la actividad de P53 wt y mutante. Como se describió antes, la respuesta desencadenada a partir de los elementos de respuesta depende de mutaciones que generan un cambio de aminoácido en P53 y por tanto, cambios particulares podrían afectar de diferente manera el destino de la célula. Esta idea fue puesta a prueba en este estudio utilizando mutaciones sinónimas. Los resultados obtenidos para el elemento de respuesta de *Bax* no permiten inferir acerca del comportamiento de las mutaciones en P53 y por tanto fueron excluidos del análisis. De todas formas, el fenotipo observado en las levaduras con ese elemento de respuesta es coherente con la información reportada en trabajos previos.

Para el caso de los elementos de respuesta de *p21* y *RGC*, se evidenciaron diferencias entre los controles. Las colonias obtenidas en todas las transformaciones con *TP53*wt para ambos elementos rindieron colonias mayormente blancas. El bajo porcentaje de colonias rojas es seguramente debido a posibles errores en la amplificación del gen y tomado como “background”. Por el contrario, en las transformaciones realizadas con *TP53R175H* el rendimiento fue de colonias rojas, como era esperado. Estos resultados son coherentes y señalan la viabilidad del sistema para el estudio planteado.

Los experimentos con los mismos dos elementos de respuesta utilizando los cambios sinónimos 108G>A y 1014C>T brindaron mayormente colonias de color blanco, igual que la secuencia wt. Esto sugiere que estos cambios no afectarían la función de P53 en el sistema de levaduras en las condiciones experimentales planteadas.

En el caso de 108G>A, el codón presente en la secuencia salvaje, CCG, es poco frecuente en levaduras y humanos mientras que el codón CCA presente en el mutante, es utilizado con mayor frecuencia en los dos organismos. Más allá de que la diferencia de frecuencia es mayor en el caso de la levadura, el patrón se mantiene. Para el caso de la mutación 1014C>T el codón salvaje TTC es frecuentemente utilizado en los dos organismos, mientras que el codón del mutante TTT se utiliza en menor frecuencia, siendo la diferencia de frecuencias mayor para el caso de la levadura, pero manteniendo también el patrón. Si bien se podría comparar el uso de codones de los dos

organismos, en el estudio planteamos analizar el efecto de estos cambios sinónimos en levaduras como una aproximación al problema de la cinética vinculada al uso de codones.

Por el contrario, la transformación de las cepas YPH-p21 e YPH-RGC con amplicones de *TP53*wt y la mezcla de mutantes de Prolinas generados con dos ADN polimerasas empleadas muestran diferencias significativas. El porcentaje de colonias rojas en los ensayos realizados con los mutantes es de 3 a 6 veces mayor que el obtenido con el gen salvaje. Esto sugiere que esas colonias rojas serían producto de una transformación con una molécula de ADN mutante en alguna de las Prolinas analizadas, y no debido a un error experimental.

Considerando que la mezcla de mutantes de Prolinas incluye 64 combinaciones de codones en *TP53*, es posible pensar que no todos los codones inducen un cambio en la respuesta del sistema, lo que se traduciría en la obtención de la totalidad de colonias rojas en el FASAY. Es esencial identificar cuál (o cuáles) es la secuencia de *TP53* presente en las colonias rojas, de forma de identificar qué cambios inducen la generación de color de las levaduras.

Estos resultados permitirán concluir qué codones sinónimos, con determinada localización en el ARNm, afectan diferencialmente la estructura o la actividad de *TP53*, en condiciones en las que la alteración del splicing está descartada. La identificación de los codones sinónimos de las Prolinas que afectan (y de los que no afectan) la actividad transcripcional de P53 sería válida cuando es expresada en levaduras. Quedaría aun por establecer por qué los codones que se identificaron afectan la funcionalidad, si es por la formación de estructuras secundarias en el ARN, por cambios en la interacción del ARN con alguna proteína, o porque se ve afectada la cinética de traducción y el plegamiento de P53.

Asimismo, entendemos que las conclusiones que se saquen del estudio empleando el sistema FASAY en levaduras, no puede extrapolarse a las células de mamífero. Posibles diferencias entre el sistema FASAY en levaduras y las células humanas en donde P53 funciona normalmente, como factores de la maquinaria transcripcional, diferencia en el uso de codones, falta de regiones reguladoras en el molde, entre otras, impiden realizar tal extrapolación.

5.4.2. Variantes conformacionales de P53 en células humanas en cultivo.

Los estudios realizados en células humanas en cultivos permitieron abordar más directamente la variación de la conformación de P53 utilizando anticuerpos conformacionales. Esta aproximación resultó difícil de poner a punto, aunque es una técnica de rutina en el laboratorio en donde se realizó.

De los 5 experimentos realizados en forma independiente, sólo 1, el último, dio resultados coherentes, y por tanto fue el único considerado en este trabajo.

Los resultados indican que existe una variación en el nivel de expresión de P53 según su detección en el extracto total de proteínas así como en la inmunoprecipitación con CM1 utilizada como control. Esta variación no debería atribuirse a diferencias en la cantidad de proteínas totales utilizadas en el análisis del extracto total ni en las inmunoprecipitaciones. La concentración de proteínas en los extractos fue determinada por el método de Bradford y se procuró partir siempre de la misma cantidad de proteínas en los diferentes casos. Esto fue verificado mediante la estimación de cantidad de actina en los extractos proteicos por western blot y se vio que los niveles de ésta fueron similares en todos los casos. Por tanto, las variaciones en la cantidad de P53 observada en estos ensayos señalan diferencias en el nivel de expresión y en la estabilidad de la proteína portadora de las mutaciones estudiadas.

La expresión de P53 portadora de la mutación R175H, utilizada como control negativo, produce un mayor nivel de P53, como ha sido reportado previamente, siendo que el cambio de Arg por His induce una alteración de la conformación, que implica una desnaturalización parcial de P53, y que resulta más estable ⁶⁵.

El análisis de la conformación de P53 empleando los anticuerpos conformacionales en los controles positivo (*TP53wt*) y negativo (*TP53R175H*) dieron el resultado esperado. El control negativo guió solamente la producción de la conformación desnaturalizada reconocida por Ab240, mientras que la señal de detección de P53 en el western blot es nula en la inmunoprecipitación con el anticuerpo Ab1620 que reconoce la estructura nativa de P53. El patrón es el inverso para *TP53wt*. La proteína producida utilizando el molde wt es detectada mayormente en la inmunoprecipitación con Ab1620 aunque en este caso también se detecta una señal correspondiente a la conformación parcialmente desnaturalizada. Esto sugiere que esta conformación “mal plegada” ocurre normalmente en la célula ⁹⁶.

La presencia de ambas conformaciones de P53 cuando es codificado por el molde wt apoya la idea de que las conformaciones mal plegadas de las proteínas existen normalmente, y que los mecanismos de detección y eliminación de las mismas juegan un rol preponderante para mantener la homeostasis celular ²⁸.

La expresión de P53 a partir de moldes portadores de mutaciones sinónimas y el análisis de la conformación empleando los anticuerpos conformacionales requiere ser repetido en ensayos independientes y coherentes para poder sacar conclusiones. En primer lugar el hecho de presentar

variación de la expresión de cada mutante sinónimo de *TP53* en el extracto total y detectada con el anticuerpo CM1 indica que las diferencias observadas en las inmunoprecipitaciones pueden no ser significativas, pudiendo deberse a diferencias en la expresión e incluso en la eficiencia de transfección. En cualquier caso, en los mutantes sinónimos fue posible evidenciar la presencia de la conformación salvaje y la desnaturalizada en todos los casos como ocurre con *TP53wt*, resultado que apoya la idea de la generación de proteínas con estructuras anómalas es un hecho normal en las células, como también ha sido visto en levaduras⁹⁶.

Varios trabajos basados en esta metodología han permitido estudiar el comportamiento de mutantes en diversos sistemas de expresión^{49,96}. Por tanto, consideramos importante repetir estos ensayos, asegurando la utilización de la misma cantidad de proteína y en condiciones de inmunoprecipitación puestas a punto de forma de poder obtener resultados coherentes y cuantificables. Realizar este ensayo en condiciones óptimas resulta esencial para el estudio de mutaciones sinónimas de acuerdo a la capacidad del experimento de detectar modificaciones de la estructura de la proteína y el grado del mismo, las que pueden no ser tan obvias al trabajar con este tipo de cambios. Consideramos, que la identificación de diferentes variantes de P53 con anticuerpos conformacionales puede llegar a ser una herramienta valiosa para analizar el efecto de mutaciones sinónimas sobre la estructura final de las proteínas, posiblemente ligadas a variaciones del plegamiento de las mismas durante la traducción y afectados por cambios en la cinética local de la traducción. Procurar más evidencias de esta posible asociación resulta un área de investigación abierta, que podría aportar conocimiento básico, e incluso brindar respuestas a algunas enfermedades genéticas asociadas a estas mutaciones.

6. Conclusiones y perspectivas.

En el presente trabajo fue posible determinar la secuencia codificante del alelo expresado de *TP53* en muestras de CRC. Así, pudimos detectar 40 mutaciones mayormente puntuales y localizadas sobre el dominio DBD de P53. Como ha sido visto anteriormente, observamos que el número y el patrón de mutaciones en muestras con y sin acumulación de P53 difieren, conteniendo en el primer caso más mutaciones, que en general implican un cambio de aminoácido. Estas mutaciones podrían estar asociadas a la acumulación de P53 en las células.

En las 101 muestras tumorales analizadas no encontramos mutaciones en regiones reguladoras del splicing asociadas a modificaciones del patrón normal de edición. En cambio, identificamos tres cambios posiblemente asociados a este fenómeno. Dos deleciones y una inserción podrían ser consecuencia de alteraciones de la edición del mensajero de *TP53*, de acuerdo a las similitudes que presentan las regiones modificadas con los sitios canónicos de splicing. Para verificar esta hipótesis, si las alteraciones del transcripto de *TP53* son alteraciones de splicing o si se encontraban ya en el genoma, es necesario determinar la secuencia genómica de *TP53* en estas muestras, incluyendo los intrones adyacentes. Pero, a nivel más general, para poder concluir sobre la pregunta inicial que motivó el comienzo de este trabajo, si el número elevado de mutaciones sinónimas encontradas en *TP53* se debía a que afectaban el splicing, sería necesario analizar un número mucho mayor de muestras. La muestra estudiada resultó pequeña para este objetivo y no fue viable su ampliación en plazos razonables.

Más aun, resultaría muy interesante realizar la misma aproximación en cáncer de mama y otros tipos de cáncer, y analizar el perfil de alteraciones del mensajero de *TP53* en cada uno, con el fin de establecer si las variantes del splicing son específicas de un tejido o de un tipo de cáncer particular.

Por otro lado, pudimos detectar que la actividad de transactivación sobre elementos de respuesta puede ser modificada por la ocurrencia de mutaciones sinónimas, como señala el resultado de la transformación de levaduras con la mezcla de mutantes en las Prolinas 151, 152 y 153. Sin embargo, el sistema FASAY empleado para evaluar la actividad de transactivación de P53 permite detectar cambios en dicha actividad pero podría resultar poco sensible si la modificación inducida por la mutación no es drástica. Para los fines buscados el sistema proporcionó evidencias de que al menos alguna mutación altera P53 de tal manera que afecta su actividad en levaduras. Este resultado es importante y estimula a continuar en el mismo camino para contribuir al

conocimiento acerca del efecto de este tipo de mutaciones en diferentes enfermedades. Para eso, el primer paso es identificar cuál o cuáles de las mutaciones son las responsables del cambio reportado y abordar el problema en otros sistemas eucariotas.

La aproximación experimental empleada basada en la expresión de P53 en células humanas en cultivo e inmunoprecipitación con anticuerpos conformacionales no permitió poner en evidencia variaciones de conformación de P53 cuando es codificada por mutaciones sinónimas. El estudio conformacional de P53 comparando los resultados para la proteína wt y mutantes sinónimos expresados en células humanas en cultivo representa una herramienta muy valiosa para detectar el cambio de P53 hacia una estructura desnaturalizada no funcional. Si bien en este estudio no detectamos la generación de esa conformación en cantidades que permitan concluir que la mutación induce la pérdida de estructura y función de P53, no podemos descartar que alguna de ellas induzca otro cambio en la conformación nativa aún no reportado, o afecten la expresión de la proteína a otro nivel. Considerando los problemas técnicos ocurridos, resulta esencial repetir los experimentos de expresión en células humanas en cultivo e inmunoprecipitación con las mismas mutaciones (y otras), de forma de poder responder a las preguntas planteadas y abarcar un universo mayor de modificaciones del gen.

El estudio de las mutaciones sinónimas ha sido relegado con respecto a otros tipos de mutaciones. De mediar cambios en las conformaciones de las proteínas podrían afectar muchos aspectos de la actividad biológica de las mismas. Por esa razón, hemos iniciado con los mismos mutantes analizados en este trabajo estudios de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) entre P53 y su principal regulador celular, su E3-ubiquitin ligasa Hdm2. Los resultados preliminares sugieren que podrían existir diferencias con uno de los mutantes, lo que nos motiva a continuar investigando en esa dirección.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden proporcionar elementos útiles a futuras investigaciones, y contribuir a una mejor comprensión del papel de las mutaciones sinónimas de *TP53* en la patología tumoral. Por tanto, continuar en esta línea resulta fundamental para elucidar el rol de este tipo de mutaciones en la expresión de genes, y particularmente la eventual relación con diversas enfermedades genéticas.

7. Bibliografía.

1. Hanahan, D., Weinberg, R.A. & Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Hormone Research* **100**, 57-70(2000).
2. World Health Organization. at <<http://www.who.int/en/>>
3. Ministerio de Salud Pública. at <http://www.msp.gub.uy/index_1.html>
4. Ciccarelli, F.D. The (r)evolution of cancer genetics. *BMC biology* **8**, 74(2010).
5. Stratton, M.R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science (New York, N.Y.)* **331**, 1553-8(2011).
6. Hollande, F., Pannequin, J. & Joubert, D. The long road to colorectal cancer therapy: searching for the right signals. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **13**, 44-56(2010).
7. Jenkinson, F. & Steele, R.J.C. Colorectal cancer screening - methodology. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* **8**, 164-71(2010).
8. Huxley, R.R. et al. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 171-80(2009).
9. Fearon, E.R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology* **6**, 479-507(2011).
10. Taylor, D.P. et al. Population-based family-history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology* **138**, 877-885(2011).
11. Fodde, R. The stem of cancer. *Cancer cell* **15**, 87-9(2009).
12. Shih, I.-ming et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *PNAS* (2001).
13. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230(1973).
14. Gregersen, N. et al. Protein misfolding and human disease. *Annual review of genomics and human genetics* **7**, 103-24(2006).
15. Levinthal, C. Are there pathways for protein folding? *Journal of Medical Physics* **65**, 44-45(1968).

16. Marin, M. Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnology journal* **3**, 1047-57(2008).
17. Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature structural & molecular biology* **16**, 574-81(2009).
18. Vabulas, R.M. et al. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a004390(2010).
19. Pal, D. et al. Reactivation of denatured proteins by domain V of bacterial 23S rRNA. *Nucleic acids research* **25**, 5047-51(1997).
20. Voisset, C., Saupe, S.J. & Blondel, M. The various facets of the protein-folding activity of the ribosome. *Biotechnology journal* **6**, 668-73(2011).
21. Tribouillard-Tanvier, D. et al. Protein folding activity of ribosomal RNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs. *PloS one* **3**, e2174(2008).
22. Maurizi, M.R. & Li, C.C. AAA proteins: in search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins. *EMBO reports* **2**, 980-5(2001).
23. Muchowski, P.J. et al. Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 7841-6(2000).
24. Gámez, a et al. Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *The Journal of biological chemistry* **275**, 29737-42(2000).
25. Olivé, M. et al. Desmin-related myopathy: clinical, electrophysiological, radiological, neuropathological and genetic studies. *Journal of the neurological sciences* **219**, 125-37(2004).
26. Bruijn, L.I. Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. *Science* **281**, 1851-1854(1998).
27. Kolb, V.A., Makeyev, E.V. & Spirin, A.S. Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *The EMBO journal* **13**, 3631-7(1994).
28. Komar, A. a A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends in biochemical sciences* **34**, 16-24(2009).
29. Dittmar, K. a, Goodenbour, J.M. & Pan, T. Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. *PLoS genetics* **2**, e221(2006).

30. Cartegni, L., Chew, S.L. & Krainer, A.R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews. Genetics* **3**, 285-98(2002).
31. Rappsilber, J. et al. Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. *Building* 1231-1245(2002).doi:10.1101/gr.473902.
32. Ritchie, D.B., Schellenberg, M.J. & MacMillan, A.M. Spliceosome structure: piece by piece. *Biochimica et biophysica acta* **1789**, 624-33(2009).
33. Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature reviews. Genetics* **11**, 345-55(2010).
34. Hastings, M.L. & Krainer, a R. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current opinion in cell biology* **13**, 302-9(2001).
35. Fairbrother, W.G. et al. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science (New York, N.Y.)* **297**, 1007-13(2002).
36. Lamolle, G., Marin, M. & Alvarez-Valin, F. Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. *Mutation research* **600**, 102-12(2006).
37. Hunt, R. et al. Single Nucleotide Polymorphisms. *Methods in Molecular Biology* **578**, 23-39(2009).
38. Tazi, J., Bakkour, N. & Stamm, S. Alternative splicing and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 14-26(2009).
39. David, C.J. & Manley, J.L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer : pathways and programs unhinged. *Genes & Development* 2343-2364(2010).doi:10.1101/gad.1973010.in
40. Venables, J.P. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer research* **64**, 7647-54(2004).
41. Venables, J.P. et al. Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology* **16**, 670-6(2009).
42. Cortazzo, P. et al. Silent mutations affect in vivo protein folding in Escherichia coli. *Biochemical and biophysical research communications* **293**, 537-41(2002).
43. Thanaraj, T. a & Argos, P. Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein science : a publication of the Protein Society* **5**, 1973-83(1996).

44. Thanaraj, T. a & Argos, P. Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization. *Protein science : a publication of the Protein Society* **5**, 1594-612(1996).
45. Crombie, T. et al. The folding of the bifunctional TRP3 protein in yeast is influenced by a translational pause which lies in a region of structural divergence with Escherichia coli indoleglycerol-phosphate synthase. *European journal of biochemistry / FEBS* **226**, 657-64(1994).
46. Kimchi-Sarfaty, C. et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science (New York, N.Y.)* **315**, 525-8(2007).
47. Joerger, A.C. & Fersht, A.R. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual review of biochemistry* **77**, 557-82(2008).
48. Li, Y. & Prives, C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* **26**, 2220-5(2007).
49. Candeias, M.M. et al. p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nature cell biology* **10**, (2008).
50. Naski, N. et al. The p53 mRNA-Mdm2 interaction ND ES NO ST ND ES OS NO. *Cell Cycle* 31-34(2009).
51. Marcel, V. & Hainaut, P. P53 Isoforms - a Conspiracy To Kidnap P53 Tumor Suppressor Activity? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, 391-406(2009).
52. Schärer, E. & Iggo, R. Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. *Nucleic acids research* **20**, 1539-45(1992).
53. Kern, S.E. et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science (New York, N.Y.)* **252**, 1708-11(1991).
54. Petitjean, a et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* **26**, 2157-65(2007).
55. Petitjean, A. et al. Impact of Mutant p53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype : Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database. *Human Mutation* **28**, 622-629(2007).
56. Strauss, B.S. Hypermutability in carcinogenesis. *Genetics* **148**, 1619-26(1998).
57. Guimaraes, D.P. & Hainaut, P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* **84**, 83-93(2002).

58. Soussi, T. & Wiman, K.G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer cell* **12**, 303-12(2007).
59. Iacopetta, B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Human mutation* **21**, 271-6(2003).
60. Russo, A. et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 7518-28(2005).
61. Tasdemir, E. et al. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 810-814(2008).
62. Filippini, G. et al. A novel flow cytometric method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry* **31**, 180-6(1998).
63. Cooper, K. & Haffajee, Z. Bcl-2 and P53 Protein Expression in Follicular Lymphoma. *The Journal of pathology* **182**, 307-10(1997).
64. Harris, S.L. & Levine, A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899-908(2005).
65. Renninson, J. et al. Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in epithelial ovarian cancer using polyclonal antibody CMI: correlation with histopathology and clinical features. *British journal of cancer* **69**, 609-12(1994).
66. Steele, R. p53 in cancer: A paradigm for modern management of cancer. *The Surgeon* **3**, 197-205(2005).
67. Rodrigues, N.R. et al. p53 mutations in colorectal cancer. *October* **87**, 7555-7559(1990).
68. Walker, C. et al. p53 expression in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Cancer Research* 297-303(1994).
69. Paluszkiwicz, P. et al. P53 Protein Accumulation in Colorectal Cancer Tissue Has Prognostic Value Only in Left-Sided Colon Tumours. *Cancer detection and prevention* **28**, 252-9(2004).
70. Levine, a J., Hu, W. & Feng, Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell death and differentiation* **13**, 1027-36(2006).
71. Greenblatt, M.S. et al. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis U G : CtoC : G â €¢ G : CtoT : A â €¢ G : CtoA : T â €¢ A : TtoT : Aâ €¢ A : Tto G : C U A : T to C : G U-Non-CpG â €¢ CC : TT to ThAA Othir. *Building* 4855-4878

72. Kato, S. et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8424-9(2003).
73. Nicholls, C.D. et al. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *The Journal of biological chemistry* **277**, 12937-45(2002).
74. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001008(2010).
75. Jones, P.A. et al. Methylation, mutation and cancer. *BIOESSAYS* **14**, 33-36(1992).
76. Vaninetti, N.M. et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Molecular Carcinogenesis* **47**, 275-285(2008).
77. Thomas, M. et al. Two Polymorphic Variants of Wild-Type p53 Differ Biochemically and Biologically. *Society* **19**, 1092-1100(1999).
78. Baynes, C. et al. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast cancer research : BCR* **9**, R27(2007).
79. Klug, S.J. et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer : a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncology* **10**, 772-784(2009).
80. Mojtahedi, Z. et al. P53 Codon 72 Polymorphism Association With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* **76**, 316-20(2010).
81. Tang, N.-P. et al. Systematic review and meta-analysis of the association between P53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **36**, 431-8(2010).
82. Langerød, A. et al. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **11**, 1684-8(2002).
83. Klug, S.J. et al. TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American*

Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology **10**, 1009-12(2001).

84. Li, Y. et al. A meta-analysis of TP53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk: evidence from 15,857 subjects. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **66**, 15-21(2009).
85. Mammano, E. et al. Association of p53 polymorphisms and colorectal cancer: modulation of risk and progression. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **35**, 415-9(2009).
86. Parhar, P. et al. Possible association of p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to adult and pediatric high-grade astrocytomas. *Brain research. Molecular brain research* **137**, 98-103(2005).
87. Twu, C.-W. et al. Association of p53 Codon 72 Polymorphism with Risk of Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* **105**, 99-104(2006).
88. Deissler, H. et al. Spectrum of p53 mutations in biopsies from breast cancer patients selected for preoperative chemotherapy analysed by the functional yeast assay to predict therapeutic response. *Oncology reports* **11**, 1281-6(2004).
89. Flaman, J.M. et al. Identification of human p53 mutations with differential effects on the bax and p21 promoters using functional assays in yeast. *Oncogene* **16**, 1369-72(1998).
90. Sikorski, R.S. & Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27(1989).
91. Nakao, A., Yoshihama, M. & Kenmochi, N. RPG: the Ribosomal Protein Gene database. *Nucleic acids research* **32**, D168-70(2004).
92. Clarke, T.F. & Clark, P.L. Rare codons cluster. *PloS one* **3**, e3412(2008).
93. Ishioka, C. et al. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nature genetics* **5**, 124-129(1993).
94. Flaman, J.M. et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3963-7(1995).
95. Flaman, J.M. et al. A rapid PCR fidelity assay. *Nucleic acids research* **22**, 3259-60(1994).

96. Grochova, D. et al. Analysis of transactivation capability and conformation of p53 temperature-dependent mutants and their reactivation by amifostine in yeast. *Oncogene* **27**, 1243-52(2008).
97. Gannon, J.V., Greaves, R. & Lane, D.P. Activating conformational monoclonal. **9**, 1595-1602(1990).
98. Campomenosi, P. et al. p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene* **20**, 3573-9(2001).

8. Anexos.

8.1. Tablas anexas.

Tabla A1: Cebadores utilizados. Se muestran los cebadores utilizados para cada ensayo del estudio, la secuencia de cada uno de ellos y la posición de hibridación con respecto al ARN codificante de *TP53*, siendo el sitio +1 la base adenina correspondiente al inicio de la traducción. Para el caso de los cebadores utilizados en la mutagénesis se muestran en color rojo las bases involucradas en el cambio (siendo la que aparece en el cebador la base mutante).

Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición de hibridación	Ensayo
E2ForE	GACGGTGACACGCTTCCCTG	-54 a -35	Amplificación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 5')
E6RevE	CACCACCACACTATGTGC	637 a 654 C	Amplificación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 5')
E6ForE	CCTCAGCATCTTATCCGAG	571 a 589	Amplificación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 3')
E11RevE	AGGCTGTCAGTGGGGAAC	1198 a 1215 C	Amplificación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 3')
E2ForI	CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTC	-28 a -7	Secuenciación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 5')
E6RevI	CTGTCATCCAATACTCCACACG	557 a 579 C	Secuenciación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 5')
E6ForI	GGAAATTTGCGTGTGGAG	595 a 612	Secuenciación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 3')
E11RevI	CAAGAAGTGGAGAATGTC	1181 a 1198 C	Secuenciación de <i>TP53</i> de muestras tumorales (fragmento 3')
<i>TP53</i> 108G>A-F	GTTCTGTCCCCTTGCCATCCCAAGCAATGGATG	91 a 124	Mutagénesis. Mutante 108G>A
<i>TP53</i> 108G>A-R	CATCCATTGCTTGGGATGGCAAGGGGACAGAAC	91 a 124 C	Mutagénesis. Mutante 108G>A
<i>TP53</i> 1014C>T-F	GTGGGCGTGAGCGCTTGAGATGTTCCGAGAG	998 a 1029	Mutagénesis. Mutante 1014C>T
<i>TP53</i> 1014C>T-R	CTCTCGGAACATCTCAAGCGCTCACGCCAC	998 a 1029 C	Mutagénesis. Mutante 1014C>T
<i>TP53</i> Pro151-152-153-F	GTTGATTCCACACCCNCCNCCNGGCACCCGCTCC	439 a 472	Mutagénesis. Mutantes Pro151-152-153
<i>TP53</i> Pro151-152-153-R	GGACGCGGGTGCCNCCNCCNGGNGGTGTGAATCAAC	439 a 472 C	Mutagénesis. Mutantes Pro151-152-153
<i>TP53</i> P3N	CAGACCTATGGAACTACTTCCTG	59 a 82	Amplificación de <i>TP53</i> para FASAY
<i>TP53</i> P4	ACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTG	61 a 90 C	Amplificación de <i>TP53</i> para FASAY

Tabla A2: Muestras seleccionadas. Se muestran los nombres de las muestras utilizadas en el estudio, el porcentaje de células fenotípicamente transformadas en el corte (según tinción con Hematoxilina y Eosina), el porcentaje de células con acumulación de P53 (según IHC) y la calidad del ARN total extraído expresado como R.I.N. (RNA Integrity Number).

Muestra	% de células P53 +	% de células tumorales	R.I.N.	Muestra	% de células P53 +	% de células tumorales	R.I.N.
LC6T	0	70	7,2	LC130T	0	90	7,3
LC9T	0	70	7,4	LC131T	30	80	8,4
LC14T	0	80	8,5	LC132T	80	60	3,4
LC18T	90	70	5,7	LC137T	80	60	6,5
LC20T	0	60	8,6	LC138T	90	60	6,9
LC24T	80	90	7,5	LC141T	90	90	4,4
LC29T	0	80	7,4	LC142T	0	90	6,7
LC30T	0	80	6,8	LC145T	20	90	4,1
LC31T	90	70	7,9	LC148T	0	70	5,0
LC34T	0	70	6,5	LC149T	60	70	6,2
LC36T	0	70	4,3	LC150T	60	70	5,2
LC37T	0	60	5,3	LC151T	20	80	5,5
LC39T	0	70	3,9	LC152T	0	90	7,2
LC40T	80	70	7,3	LC153T	90	70	6,3
LC42T	0	80	7,2	LC154T	80	60	6,5
LC43T	70	90	8,0	LC155T	0	70	7,7
LC46T	0	90	5,1	LC156T	0	80	7,2
LC47T	90	80	7,9	LC157T	70	80	8,3
LC53T	90	90	8,1	LC158T	90	70	7,7
LC54T	60	70	6,5	LC160T	0	70	6,7
LC55T	100	70	8,5	LC162T	100	80	7,8
LC56T	0	80	6,8	LC165T	0	90	7,4
LC57T	70	90	8,6	LC166T	80	70	4,4
LC58T	90	90	7,5	LC169T	0	60	7,3
LC60T	0	80	8,4	LC170T	100	70	8,4
LC61T	100	70	3,7	LC171T	80	90	6,7
LC64T	0	70	7,3	LC172T	0	90	4,2
LC65T	0	90	7,6	LC173T	0	70	2,8
LC66T	80	60	7,3	LC180T	0	90	8,5
LC67T	30	90	7,1	LC181T	0	70	5,6
LC70T	0	60	7,1	LC184T	0	70	6,7
LC75T	90	80	8,1	LC185T	30	70	7,7
LC76T	30	70	7,2	LC186T	60	90	6,8
LC78T	0	70	5,9	LC187T	80	70	6,1
LC80T	90	80	5,3	LC188T	0	90	8,5
LC83T	100	90	5,8	LC189T	30	70	6,9
LC90T	0	60	4,2	LC192T	0	60	3,3
LC96T	40	60	7,3	LC194T	70	90	6,0
LC98T	0	70	6,3	LC196T	0	80	5,5
LC100T	0	70	4,7	LC197T	0	80	6,5
LC103T	0	60	6,3	LC199T	0	90	6,8
LC112T	0	60	7,1	LC200T	90	90	5,5
LC113T	0	70	6,3	LC201T	90	70	6,1
LC115T	80	70	5,3	LC203T	0	80	6,8
LC117T	90	80	6,8	LC204T	0	80	6,4
LC118T	0	90	7,1	LC205T	100	70	5,1
LC121T	0	90	4,7	LC206T	0	70	4,6
LC123T	0	70	6,8	LC208T	0	80	4,8
LC125T	80	90	7,8	LC210T	20	90	6,9
LC127T	90	70	5,9	LC212T	0	90	7,8
LC129T	0	80	8,2				

Tabla A3: Uso de codones de *Homo sapiens*. Se muestra cada codón junto a su frecuencia de uso cada mil codones expresados en humanos, estimada con el programa CodonW (Versión 1.4.2) y utilizando las secuencias codificantes de las proteínas ribosomales como "input", según base de datos de RPGB. Se contabilizaron un total de 13714 codones.

Aminoácido	Codón	Nº de codones	Frecuencia por mil	Aminoácido	Codón	Nº de codones	Frecuencia por mil
Phe	UUU	166	12,1	Ser	UCU	156	11,4
	UUC	243	17,7		UCC	181	13,2
Leu	UUA	36	2,6		UCA	61	4,4
	UUG	134	9,8		UCG	27	2
	CUU	173	12,6	Pro	CCU	219	16
	CUC	192	14		CCC	208	15,2
	CUA	53	3,9		CCA	143	10,4
Ile	CUG	424	30,9	CCG	58	4,2	
	AUU	298	21,7	Thr	ACU	202	14,7
	AUC	410	29,9		ACC	268	19,5
	AUA	45	3,3		ACA	140	10,2
Met	AUG	330	24,1		ACG	59	4,3
Val	GUU	213	15,5	Ala	GCU	387	28,2
	GUC	262	19,1		GCC	441	32,2
	GUA	106	7,7		GCA	195	14,2
	GUG	425	31		GCG	66	4,8
Tyr	UAU	160	11,7	Cys	UGU	90	6,6
	UAC	222	16,2		UGC	100	7,3
TER	UAA	54	3,9	TER	UGA	17	1,2
	UAG	9	0,7	Trp	UGG	106	7,7
His	CAU	106	7,7	Arg	CGU	166	12,1
	CAC	223	16,3		CGC	302	22
Gln	CAA	91	6,6		CGA	163	11,9
	CAG	371	27,1		CGG	221	16,1
Asn	AAU	204	14,9	Ser	AGU	76	5,5
	AAC	288	21		AGC	121	8,8
Lys	AAA	546	39,8	Arg	AGA	217	15,8
	AAG	1132	82,5		AGG	196	14,3
Asp	GAU	269	19,6	Gly	GGU	261	19
	GAC	254	18,5		GGC	382	27,9
Glu	GAA	294	21,4		GGA	197	14,4
	GAG	411	30		GGG	144	10,5

Tabla A4: Uso de codones de *S. cerevisiae*. Se muestra cada codón junto a su frecuencia de uso cada mil codones expresados en la levadura, estimada con el programa CodonW (Versión 1.4.2) y utilizando las secuencias codificantes de las proteínas ribosomales como "input", según base de datos de RPGB. Se contabilizaron un total de 21462 codones.

Aminoácido	Codón	Nº de codones	Frecuencia por mil	Aminoácido	Codón	Nº de codones	Frecuencia por mil
Phe	UUU	133	6,2	Ser	UCU	675	31,5
	UUC	551	25,7		UCC	481	22,4
Leu	UUA	263	12,3		UCA	46	2,1
	UUG	1209	56,3		UCG	5	0,2
	CUU	23	1,1	Pro	CCU	91	4,2
	CUC	2	0,1		CCC	4	0,2
	CUA	100	4,7		CCA	727	33,9
	CUG	3	0,1	CCG	1	0	
Ile	AUU	478	22,3	Thr	ACU	584	27,2
	AUC	627	29,2		ACC	503	23,6
	AUA	4	0,2		ACA	28	1,3
Met	AUG	305	14,2		ACG	0	0
Val	GUU	1036	48,3	Ala	GCU	1434	66,8
	GUC	719	33,5		GCC	498	23,2
	GUA	15	0,7		GCA	37	1,7
	GUG	21	1		GCG	9	0,4
Tyr	UAU	71	3,3	Cys	UGU	132	6,2
	UAC	554	25,8		UGC	15	0,7
TER	UAA	116	5,4	TER	UGA	8	0,4
	UAG	12	0,6	Trp	UGG	149	6,9
His	CAU	111	5,2	Arg	CGU	330	15,4
	CAC	355	16,5		CGC	6	0,3
Gln	CAA	796	37		CGA	0	0
	CAG	7	0,3	CGG	3	0,1	
Asn	AAU	117	5,5	Ser	AGU	19	0,9
	AAC	728	33,9		AGC	23	1,1
Lys	AAA	385	17,9	Arg	AGA	1465	68,3
	AAG	1981	92,3		AGG	18	0,8
Asp	GAU	335	15,6	Gly	GGU	1371	63,9
	GAC	461	21,5		GGC	55	2,6
Glu	GAA	1174	54,7		GGA	18	0,8
	GAG	32	1,5		GGG	3	0,1

8.2. Medios de cultivo.

- Luria-Bertani (LB):
10 g de Triptona
5 g de Extracto de Levadura
10 g de NaCl
Agua destilada c.s.p. 1 L
Sólido: 15 g de agar
Esterilizar por autoclave
- Medio mínimo de levaduras (MML):
6,7 g Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos.
Agua destilada c.s.p. 1 L
Esterilizar por autoclave.
- Yeast Extract, Peptone, Dextrose (YPD):
10 g de Extracto de Levadura
20 g de Bacto Peptona
2% (w/v) de Glucosa (D+), agregar después de autoclavado
Sólido: 20 g de Bacto Agar
Agua destilada c.s.p. 1 L
Esterilizar por autoclave
- Medio selectivo Yeast –L,a sólido:
6,7 g de Yeast Nitrogen Base (YNB)
0,7 g de Dropout sin Leucina (DO – Leu)
2 % (w/v) de Glucosa (D+), agregar después de autoclavado
25 g de Bacto Agar
Agua destilada c.s.p. 1 L
Esterilizar por autoclave

- RPMI 1640 (Gibco), adicionado con los siguientes componentes para obtener el medio completo:
 - 10 % de suero fetal de cabra
 - Penicilina 100 U/mL
 - Estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - L-Glutamina 2 mM
- Esterilizado por filtración por poro de 0,22 μm