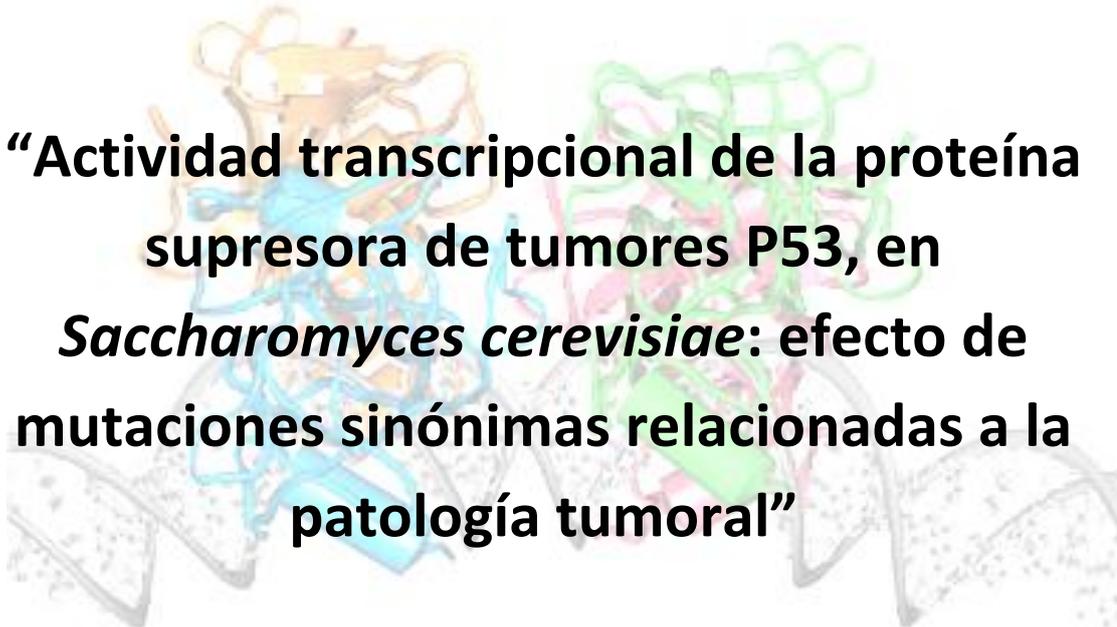


Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biología Celular y Molecular

PEDECIBA Biología



**“Actividad transcripcional de la proteína  
supresora de tumores P53, en  
*Saccharomyces cerevisiae*: efecto de  
mutaciones sinónimas relacionadas a la  
patología tumoral”**

**Lic. María José Lista**

Tutora: Dra. Mónica Marín

Sección Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias

Tribunal:

Dra. Estela Castillo

Dra. Leda Roche

Dr. José Sotelo

Montevideo, Uruguay

2013

# Índice de contenidos

1 Resumen .....	1
2 Introducción.....	3
2.1 Uso de codones y mutaciones sinónimas:.....	7
2.1.1 Las mutaciones sinónimas y el splicing. ....	10
2.1.2 Las mutaciones sinónimas y la estabilidad del ARNm. ....	10
2.1.3 Las mutaciones sinónimas y estructura de proteínas.....	11
2.2 Proteína Supresora de Tumores: P53 .....	12
2.2.1 Estructura de P53. ....	13
2.2.3 Elementos de respuesta a P53. ....	16
2.2.1 Estructura del gen TP53. ....	16
2.2.4 Isoformas de P53. ....	17
2.3 Mutaciones en TP53 relacionadas a la patología tumoral. ....	18
2.3.1 Método de detección de mutaciones en TP53. ....	20
2.4 Antecedentes del grupo de investigación .....	23
3 Objetivos.....	25
3.1 Objetivo General.....	25
3.2 Objetivos Específicos. ....	25
4 Materiales.....	26
4.1 Células .....	26
4.1.1 Levaduras .....	26
4.1.2 Bacterias.....	26
4.2 Medios de cultivos .....	26
4.3 Plásmidos .....	26
4.3.1 pSS16.....	26
4.3.2 pCDNA-3.....	26
4.4 Mutaciones seleccionadas.....	28
4.5 Marcadores de peso molecular. ....	29
4.6 Anticuerpos utilizados.....	29
4.6.1 Anticuerpos utilizados anti-P53 .....	29
4.6.2 Anticuerpo utilizado anti-actina.....	30

4.6.3	Anticuerpo anti-IgG de ratón .....	30
5	Métodos.....	31
5.1	Actividad de Transcripción de P53 en levaduras .....	31
5.2	Extracción y caracterización de ADN. ....	31
5.2.1	Mutagénesis sitio-dirigida .....	31
5.2.2	Preparaciones de ADN plasmídico .....	32
5.2.3	Preparaciones de ADN plasmídico a mediana escala .....	33
5.3.4	Extracción de ADN genómico de levaduras .....	33
5.3.5	Electroforesis en gel de Agarosa .....	33
5.3.6	Purificación de ADN a partir de gel de agarosa .....	33
5.3.7	Secuenciación de ADN.....	33
5.3.8	Reacción de amplificación de P53 por PCR para transformar levaduras.....	35
5.3.9	Digestión del plásmido pSS16 .....	35
5.4	Transformación de levaduras para FASAY .....	35
5.5	Extracción y caracterización de proteínas .....	36
5.5.1	Extracción de proteínas totales.....	36
5.5.2	Cuantificación de proteínas .....	37
5.5.3	Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.....	38
6	Resultados y Discusión .....	39
6.1	Construcción de mutantes de P53.....	40
6.1.1	Preparación del vector pSS16 .....	41
6.2	Análisis de la actividad de transcripción de P53 en los promotores RGC y p21 en levaduras.....	43
Ensayo FASAY en dos cepas de <i>S. cerevisiae</i> , YPH-RGC e YPH-p21. ....		43
6.2.1	Mutantes seleccionados en la base de datos IARC:.....	43
6.2.2	Mutantes sinónimos de los codones de prolina 151-152-153.....	47
6.2.3	Ensayo de transformación de levaduras (YPH-RGC, YPH-p21) con p414 y p414- P53 salvaje. ....	52
Resumen: Resultados del ensayo de funcionalidad de P53 (FASAY) .....		54
6.3	Evaluación de los niveles de expresión de P53 en levadura.....	56
6.3.1	Mutantes región de prolinas 151-152-153 .....	56
6.3.2	Mutante IARC G510T.....	63

6.33 Análisis de la presencia de P53 en colonias rojas producto de la transformación de levaduras con p414-P53 salvaje. ....	65
Resumen: Evaluación de los niveles de expresión de P53.....	66
7 Discusión General y Conclusiones .....	68
8 Bibliografía.....	73
9 Anexos .....	80
9.1 Cuantificación de proteínas .....	80
9.21 Tablas de uso de codones en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	81
9.22 Tablas de uso de codones en <i>Homo sapiens</i> . ....	82
9.3 Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de síntesis de mutantes sinónimos IARC y en la región rica en prolinas 151-152-153 .....	83
9.4 Vector de expresión en levaduras p414-ADH.....	84
9.6 Medios de cultivo.....	84
9.7 Cuantificaciones de cantidades relativas de P53 en colonias rojas y blancas de mutantes sinónimos en la región de prolinas 151-152-153.....	86

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Panorama energético de plegamiento y agregación de proteínas .....	6
<b>Figura 2.</b> Mecanismos moleculares por los cuales las mutaciones sinónimas pueden alterar los niveles y conformación de las proteínas.....	9
<b>Figura 3.</b> Estructura del dominio de unión al ADN (DBD) de P53 .....	15
<b>Figura 4.</b> Isoformas de P53 .....	18
<b>Figura 5.</b> Organización de dominios estructurales de P53 y localización de mutaciones en TP53 asociadas a la patología tumoral .....	19
<b>Figura 6.</b> Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast (FASAY).....	22
<b>Figura 7.</b> Estructura cristalográfica del dominio de unión al ADN de P53 .....	24
<b>Figura 8.</b> Vectores utilizados para propagación y expresión de la proteína.....	27
<b>Figura 9.</b> Epítopes de los anticuerpos anti-P53 utilizados (DO-1, SAPU) .....	30
<b>Figura 10.</b> Análisis de las preparaciones de ADN plasmídico de los mutantes de prolina y amplificaciones de la secuencia codificante de TP53 .....	41
<b>Figura 11.</b> Análisis de la digestión de pSS16 .....	42
<b>Figura 12.</b> Ensayo FASAY en <i>S. cerevisiae</i> para la cepa YPH-p21. ....	44
<b>Figura 13.</b> Ensayo FASAY en <i>S. cerevisiae</i> para la cepa YPH-RGC.....	45
<b>Figura 14.</b> Resultados de los ensayos de FASAY, para las mutaciones sinónimas seleccionadas en la base de datos IARC.....	46
<b>Figura 15.</b> Ensayo FASAY en <i>S. cerevisiae</i> para la cepa YPH-RGC.....	49
<b>Figura 16.</b> Ensayo FASAY en <i>S. cerevisiae</i> para la cepa YPH-p21. ....	50
<b>Figura 17.</b> Resultados de los ensayos de FASAY, para las mutaciones sinónimas seleccionadas en la región rica en Pro 151-152-153.....	51
<b>Figura 18.</b> Ensayo FASAY en <i>S. cerevisiae</i> para la cepa YPH-p21, YPH-RGC.....	53
<b>Figura 19.</b> Curva de calibración de BSA para cuantificación de proteínas mediante método de Bradford .....	56
<b>Figura 20.</b> Puesta a punto de los anticuerpos anti-actina utilizado para la normalización de las muestras.....	57

<b>Figura 21.</b> Puesta a punto de los anticuerpos utilizados para el revelado de P53 en levadura.....	58
<b>Figura 22.</b> Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de mutantes Pro, en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC. ....	59
<b>Figura 23.</b> Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de los mutantes Pro 7 y Pro8, en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC.....	61
<b>Figura 24.</b> Ensayo de Western Blot utilizando el anticuerpo anti-P53 SAPU, (Pro7 y Pro8) .....	62
<b>Figura 25.</b> Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas del mutante G510T, en las cepas conteniendo los elementos de respuesta RGC y p21 (DO-1).....	63
<b>Figura 26.</b> Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas del mutante G510T, en las cepas conteniendo los elementos de respuesta RGC y p21 (SAPU).....	64
<b>Figura 27.</b> Ensayo de Western Blot en colonias rojas producto de la transformación de levaduras con p414-P53 salvaje .....	65

# 1 Resumen

La proteína supresora de tumores P53 es un factor de transcripción que regula vías celulares centrales como el ciclo celular, la apoptosis y la senescencia. El gen *TP53* se encuentra mutado en más del 50% de los pacientes con cáncer. 90% de las mutaciones son puntuales y afectan principalmente el dominio de unión al ADN. Las mutaciones sinónimas, que no generan un cambio de aminoácido en la proteína, representan un 5 % del total. Este valor es entre 20 y 100 veces más elevado de lo esperado si consideráramos este tipo de mutaciones como neutras.

El objetivo general de nuestro trabajo es contribuir al estudio del efecto de mutaciones sinónimas en la estructura y función de proteínas. En este trabajo, se utilizó como modelo de estudio la proteína supresora de tumores P53 expresada en la levadura *S.cerevisiae*. Nos propusimos evaluar el efecto de algunas mutaciones sinónimas reportadas en cáncer (seleccionadas a partir de su aparición en la base de datos IARC y en una región rica en prolinas 151-152-153), en la actividad de transcripción de P53, en dos de sus elementos de respuesta, RGC y p21.

Los resultados obtenidos muestran que los mutantes sinónimos G510T y C678T presentan una disminución del 6% en la actividad de transcripción de P53 en el elemento de respuesta RGC en comparación con la proteína salvaje. Así mismo todas las mutaciones sinónimas evaluadas en la región de prolinas 151-152-153 presentan un disminución del 15% en la actividad de transcripción de P53 en los promotores RGC y p21.

Para evaluar si la variación de la actividad de P53 se debía a diferencias en el nivel de expresión de P53 en cada uno de los mutantes, se realizaron ensayos de western blot. Los ensayos realizados para el mutante G510T mostraron una diferencia en los niveles de expresión de P53 en colonias blancas y rojas, lo cual explicaría la disminución de la actividad de transcripción en dichas colonias. Por otro lado, los ensayos realizados en los mutantes de la región de prolinas, en su mayoría no mostraron diferencias en cuanto a los niveles de expresión de P53. Por tanto, planteamos que la disminución de la actividad transcripcional podría deberse a cambios en la conformación adoptada por la proteína.

Los resultados de este trabajo son prometedores y contribuyen a una mayor comprensión del efecto de mutaciones sinónimas en el factor supresor de tumores P53, en relación a la patología tumoral. Resulta de interés continuar esta línea de investigación con el fin de determinar el papel de dichas mutaciones en la funcionalidad y estructura de P53, en relación a las interacciones proteína-ADN y proteína-proteína.

## 2 Introducción

Las proteínas constituyen las macromoléculas más esenciales en las células y se presentan en gran diversidad. Cumplen diversas funciones en la célula como: en la organización y estructura de la célula, el transporte y almacenamiento de moléculas, la respuesta a estímulos, la coagulación sanguínea y la respuesta inmune, entre otras. Muchas actúan a través de la unión reversible a ligandos, como por ejemplo la hemoglobina y la mioglobina, encargadas del transporte de oxígeno a través del torrente sanguíneo. Existen proteínas que participan en la respuesta inmunitaria, como las inmunoglobulinas, otras que constituyen el aparato motor, como la actina y la miosina, y otras con actividad enzimática que aceleran los procesos celulares, como por ejemplo en reacciones metabólicas.

La biosíntesis de proteínas implica la traducción del mensaje encriptado en el ARNm en una secuencia de residuos de aminoácidos, y es llevada a cabo por complejos nucleoproteicos llamados ribosomas y más de 100 factores asociados (factores de iniciación, elongación, terminación, aminoacil-ARNt transferasas, etc.). En su conjunto constituyen la maquinaria de traducción.

Los mecanismos involucrados en la adquisición de la estructura nativa de las proteínas, su plegamiento, constituye un área de gran interés y debate desde hace ya más de 50 años.

Los primeros estudios realizados por Anfinsen y colaboradores en la década de los 60 (Anfinsen 1973) sobre la renaturalización *in vitro* de la RNasa A mostraron que la secuencia primaria (ordenamiento de aminoácidos) contiene la información necesaria para la adquisición de la estructura tridimensional de la proteína. En estos trabajos se puso en evidencia que las proteínas son capaces de adquirir la estructura nativa *in vitro* y recuperar la actividad enzimática luego de haber sido completamente desnaturalizadas.

Sin embargo, la renaturalización *in vitro* de proteínas no es algo sencillo; se logra con relativa facilidad luego de desnaturalizar proteínas pequeñas y globulares y en solución en baja concentración. Por el contrario, para proteínas más complejas con

más de un dominio o multiméricas, el proceso de renaturalización *in vitro* es menos probable (Deuerling and Bukau 2004).

En la célula, la concentración de macromoléculas es muy elevada, por lo cual el plegamiento de las proteínas requiere la participación de proteínas auxiliares. Las chaperonas moleculares se unen a regiones hidrofóbicas de proteínas expuestas durante su biosíntesis o después de una situación de estrés que pudo originar una desnaturalización. Esa unión es transitoria y no covalente, y evita otras interacciones proteína-proteína “incorrectas” (Craig, Gambill et al. 1993) (Ellis and Hartl 1996).

Entre las familias de chaperonas moleculares que asisten el plegamiento *in vivo* de proteínas se destacan las familias de las Hsp-60 y Hsp-70 (Heat-Shock-Proteins). La familia de las Hsp-70 es la más conservada a lo largo de la evolución y se encuentra en todos los organismos procariontes y eucariontes, en los diferentes compartimentos celulares. Las Hsp-70s cumplen diversas funciones en el mantenimiento de la homeostasis celular. Algunos miembros de dicha familia se encuentran unidos al ribosoma en el sitio de salida de la cadena polipeptídica naciente, a la que se unen y asisten en la adquisición de su estructura nativa (Jha and Komar 2011). Así mismo, previenen la formación de agregados proteicos que podrían resultar tóxicos para la célula y también cumplen funciones de “housekeeping” manteniendo la homeostasis celular (Murphy 2013).

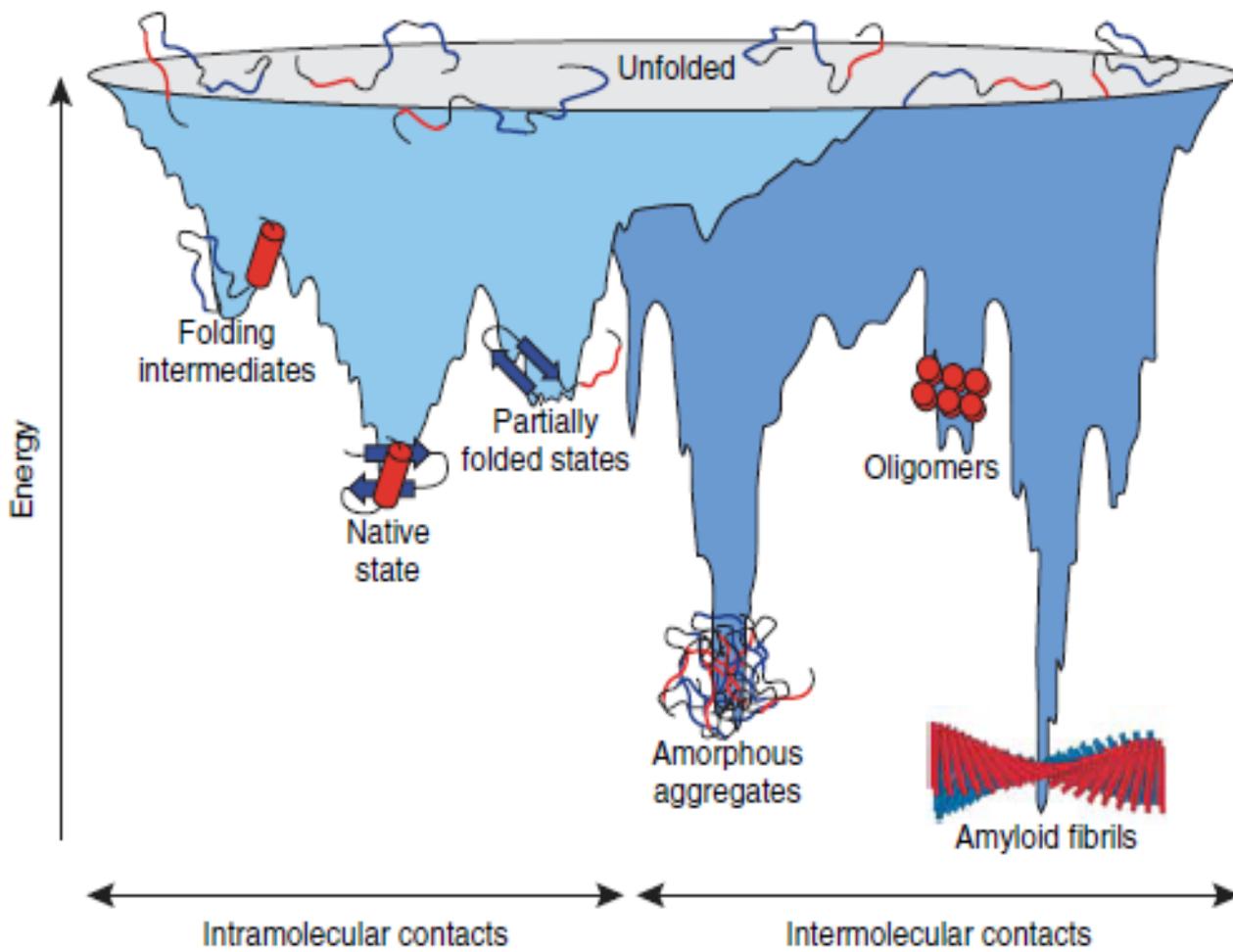
Más recientemente se ha encontrado actividad chaperona en otras familias de proteínas y macromoléculas. En particular se ha mostrado que la subunidad mayor del ribosoma contiene en el dominio V del ARN 28S una actividad chaperona de proteínas (Protein Folding Activity of the Ribosome, PFAR) (Voisset, Saupe et al. 2011). Dicho dominio del ARN es capaz de asistir el plegamiento de proteínas a medida que estas están siendo sintetizadas y emergen del ribosoma al espacio intracelular.

A pesar de los sistemas moleculares que evitan la formación de agregados y favorecen el correcto plegamiento de las proteínas, las células cuentan con un control de calidad de proteínas que hace que proteínas mal plegadas sean degradadas (Figura 1). El proteosoma constituye un sistema de proteínas que forman un complejo capaz de reconocer proteínas que hayan sido marcadas para su degradación. El marcaje

viene dado por la adición de unidades de la proteína ubiquitina (Navon and Ciechanover 2009).

Aun así, una falla en los sistemas de control de calidad de proteínas podría causar la formación de agregados proteicos encontrados en algunas patologías. Por ejemplo, en las llamadas “enfermedades conformacionales”. Entre ellas, en la enfermedad de Parkinson se observa la formación de agregados de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro, lo que está asociado al proceso de neurodegeneración que presentan los pacientes. Casos tempranos y recesivos de pacientes con enfermedad de Parkinson se asocian a variaciones genéticas en genes (como ser *PARKIN*, *UCH-L1*, *DJ-1* y *PINK1*) involucrados en la ubiquitinación de la  $\alpha$ -sinucleína así como también en los sistemas de control de calidad (Gregersen, Bolund et al. 2005). En la patología llamada Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también se ha observado la aparición de agregados de la proteína SOD1 (Superóxido Dismutasa) en cerebro y médula espinal de pacientes afectados, junto a otras proteínas (Karch, Prudencio et al. 2009).

Nuestro laboratorio se ha interesado en comprender los mecanismos involucrados en el plegamiento de proteínas *in vivo*. En particular la investigación de nuestro grupo se ha centrado en estudiar la incidencia de la maquinaria de traducción, y del uso de codones sinónimos en la conformación adoptada por las proteínas en el contexto celular donde son sintetizadas.



**Figura 1.** Panorama energético de plegamiento y agregación de proteínas. La zona en celeste muestra la serie de conformaciones intermedias que se dan hasta la formación del estado nativo mediante interacciones intramoleculares, y la zona azul las interacciones intermoleculares que se dan hacia la formación de agregados proteicos. La formación de agregados puede darse a partir de intermediarios de plegamiento o por la desestabilización del estado nativo.

Extraído de Vabulas et al 2010 (Vabulas, Raychaudhuri et al. 2010).

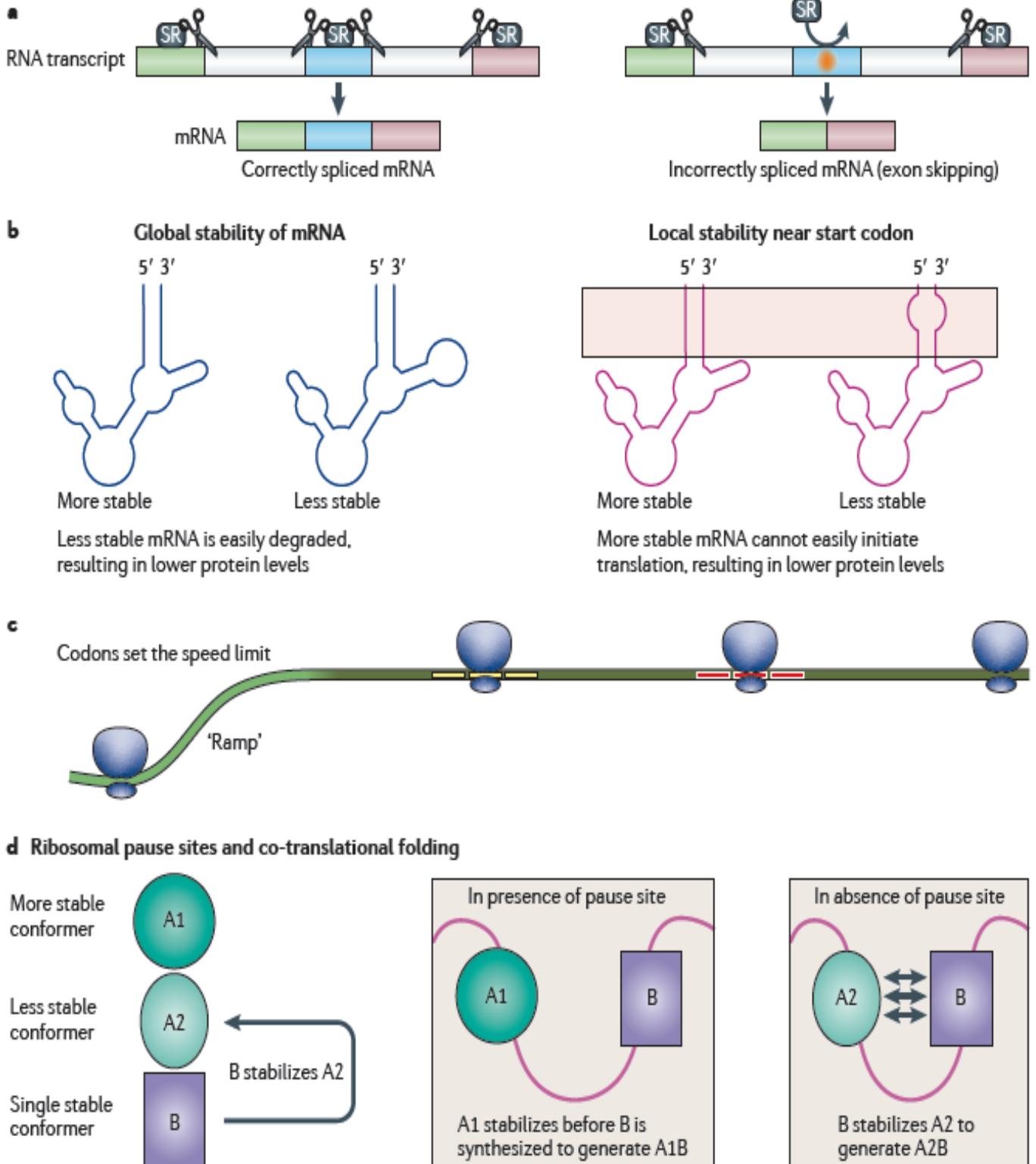
## **2.1 Uso de codones y mutaciones sinónimas:**

El Código Genético es definido como el lenguaje que permite traducir la información contenida en el ARNm (en forma de tripletes, o codones), en los residuos de aminoácidos que forman las cadenas polipeptídicas. Dentro de las características del código genético se destacan la universalidad y la degeneración. La primera implica que los codones que codifican los distintos aminoácidos son idénticos para todas las especies (con pequeñas excepciones), lo que muestra la conservación del mismo a lo largo de la evolución. Por otro lado la degeneración del código significa que la mayoría de los 20 aminoácidos es codificado por más de un codón (con excepción del aminoácido metionina y triptófano); los codones que codifican un mismo aminoácido son llamados codones sinónimos. Cada codón para ser traducido debe ser reconocido por un anticodón contenido en un ARNt, siendo que varios codones pueden ser reconocidos por un mismo ARNt isoceptor.

Para codificar un mismo aminoácido, los codones sinónimos no son utilizados de igual manera, sino que son utilizados con diferente frecuencia. Existe en los organismos una “preferencia” o “tendencia” a utilizar algunos codones con mayor frecuencia que otros. A esta “tendencia” se le llama “uso de codones”. El uso de codones es una característica de cada organismo. Se ha visto que el uso de codones depende no solamente de cada organismo y especie sino que también de la abundancia con la que se expresa cada proteína en la célula (Novoa and Ribas de Pouplana 2012). En general, aquellas proteínas celulares que se sintetizan en grandes cantidades en la célula (como por ejemplo las proteínas ribosomales) son traducidas por codones cuyas cantidades relativas de ARNt son mayores. En base a ello, se dice que un codón es “frecuente” o “rápido”.

Con el propósito de comprender el rol del uso de codones en la actividad de proteínas, y la presencia de codones “poco frecuentes” en la secuencia codificante, se ha estudiado su distribución en las secuencias codificantes de proteínas y se han realizado estudios experimentales sobre su efecto a diferentes niveles. En conjunto, se han reportado evidencias que indican que las mutaciones sinónimas pueden alterar tanto los niveles de proteína como su conformación (Plotkin and Kudla 2011) (Chamary, Parmley et al. 2006). Pueden modificar sitios de splicing, la estabilidad local

o global del ARNm, la cinética de traducción, la solubilidad y el plegamiento (Sauna and Kimchi-Sarfaty 2011).



**Figura 2.** Mecanismos moleculares por los cuales las mutaciones sinónimas pueden alterar los niveles y conformación de las proteínas. A) Edición del ARNm. Las mutaciones sinónimas pueden llevar a una falla en el reconocimiento de las proteínas reguladores del splicing (SR), provocando una falla en la edición del mensajero. B) Estabilidad local o global del ARNm. Si las mutaciones sinónimas llevan a una pérdida de estabilidad del ARNm, tendrá como resultado menores niveles de proteína. C) Cinética traduccional. D) Plegamiento. La presencia o ausencia de una pausa en el ribosoma puede causar la formación de una proteína menos estable. Extraído de (Sauna and Kimchi-Sarfaty 2011).

### 2.1.1 Las mutaciones sinónimas y el splicing.

Los pre-ARNm de genes eucariotas están compuestos por varios fragmentos codificantes llamados exones, separados por fragmentos génicos no codificantes llamados intrones. La maduración del ARNm implica la unión de exones y la escisión de intrones. Este proceso es conocido con el nombre de empalme (splicing) del ARNm. Involucra la acción coordinada de 5 pequeños snARN (U1, U2, U4-U6) y más de 60 proteínas, que constituyen lo que llamamos maquinaria de empalme o spliceosoma (Ritchie, Schellenberg et al. 2009).

Este proceso está altamente regulado en cis por secuencias presentes en el transcripto, como son los sitios dadores y aceptores de splicing, el sitio de ramificación, y los potenciadores y silenciadores. La falla en la detección de un sitio de empalme o la permanencia (no deseada) de un intrón pueden producir un ARNm maduro alterado, inestable, o la producción de proteínas abortivas (Figura 2).

Las mutaciones sinónimas localizadas en estos sitios de regulación podrían alterar el patrón de splicing. Esto sucede en la proteína asociada a microtúbulos *tau*, codificada por el gen MAPT. Mutaciones en dicha proteína han sido asociadas a demencia frontotemporal asociada a Parkinson en el cromosoma 17 (FTDP-17). A partir del pre-ARNm de MAPT pueden formarse dos isoformas maduras de la proteína, una forma más larga que contiene todos los exones llamada 4R-*tau* y una que no contiene el exón 10, denominada 3R-*tau*. En individuos normales ambas isoformas se encuentran en determinada proporción. Sin embargo, cambios en los niveles de expresión que alteren esta proporción pueden llevar al desarrollo de la enfermedad (Cartegni, Chew et al. 2002). D'Souza y colaboradores mostraron que algunas mutaciones sinónimas son capaces de generar el síndrome FTDP-17 al alterar los sitios de regulación del splicing presentes en el exón 10 (D'Souza, Poorkaj et al. 1999).

### 2.1.2 Las mutaciones sinónimas y la estabilidad del ARNm.

Mutaciones sinónimas en regiones del ARNm que sean determinantes en la formación de estructuras secundarias, podrían llevar a cambios locales o globales de estructura y estabilidad del ARNm. Estos cambios podrían modificar la frecuencia de

degradación de dicho mensajero, la unión a proteínas específicas y también la accesibilidad a la RNAsa, entre otras (Figura 2). A modo de ejemplo, se ha visto que en los estudios realizados con el receptor de dopamina D2 ciertas mutaciones sinónimas en una región del ARNm determinante de la estructura secundaria llevan a un aumento de la degradación del mismo (Duan, Wainwright et al. 2003).

### 2.1.3 Las mutaciones sinónimas y estructura de proteínas

Con diferentes aproximaciones se ha buscado cual es el rol del uso de codones en la estructura de proteínas. Considerando que la adquisición de la conformación nativa de una proteína se basa únicamente en la secuencia de aminoácidos (estructura primaria), es de esperar que la elección del codón utilizado para codificar un determinado aminoácido no afecte la estructura final adaptada.

En ese contexto, se ha analizado la distribución de codones poco frecuentes en secuencias codificantes. Por ejemplo, agrupamientos de codones poco frecuentes se han visto preferencialmente ubicados en secuencias que codifican regiones de unión entre dominios, incluso en proteínas que son altamente expresadas (Angov 2011). Los trabajos realizados *in silico* por Thanaraj y Argos en 1996, mostraron un sesgo en el uso de codones sinónimos en relación a la estructura secundaria de la proteína. Regiones que involucran motivos estructurales de hélice  $\alpha$ , en general implican codones frecuentes, mientras que los motivos estructurales hoja  $\beta$  y loops, involucran la utilización de codones raros (Thanaraj and Argos 1996).

Con una aproximación experimental se ha mostrado la importancia de la presencia de codones raros en la secuencia codificante de péptidos señal en proteínas que son secretadas en *E.coli*. Zalucki y Jennings mostraron un sesgo particular en estas regiones del ARNm. Estos autores estudiaron el efecto de la sustitución de codones sinónimos raros por frecuentes en la secuencia del péptido señal de la proteína de unión a maltosa (MBP). Se mostró que dicha sustitución produce una alteración de la conformación de la proteína y un aumento de la degradación por proteasas citoplasmáticas y periplásmicas (Zalucki and Jennings 2007)

Trabajos realizados en eucariotas por Crombie y colaboradores en el año 1994 mostraron en levaduras que un cambio sinónimo de un codón raro a uno frecuente produce la eliminación de una pausa traduccional en la enzima bifuncional codificada por el gen TRP3 (vinculada a la síntesis del aminoácido triptofano). Esto ocasiona una pérdida de la actividad de la enzima (Crombie, Boyle et al. 1994) además de afectar la estructura de la proteína.

En sistemas eucariotas es de destacar el estudio realizado por Kimchi-Sarfaty y colaboradores en el año 2007. Los trabajos realizados en células de mamífero, en el gen MRD1 (Multi-Drug Resistente 1.) que codifica para la Glicoproteína-P (gl-P), muestran que un único cambio sinónimo en la secuencia codificante es capaz de alterar interacciones con drogas e inhibidores. En este caso se produce un cambio de un codón raro a uno frecuente, los autores plantean como puede afectar dicha sustitución al plegamiento co-traduccional y a la inserción de la proteína en la membrana. Sin embargo este cambio no provoca alteraciones en el nivel del ARNm ni de la proteína (Kimchi-Sarfaty, Oh et al. 2007).

En el presente trabajo se busca contribuir a establecer cual es el rol de las mutaciones sinónimas en la estructura y función de proteínas. Para ello, como se mencionó anteriormente, se abordó el estudio del efecto de mutaciones sinónimas en la actividad transcripcional del factor supresor de tumores P53 en relación a la patología tumoral.

## **2.2 Proteína Supresora de Tumores: P53**

La proteína supresora de tumores P53 es un factor transcripcional capaz de inducir o reprimir la expresión de genes blanco involucrados en vías celulares centrales, como control del ciclo celular, senescencia, apoptosis, entre otros. Diversos factores y situaciones de estrés celular llevan a su activación, como por ejemplo daño en el ADN, hipoxia, presencia de citoquinas y factores de crecimiento, estrés oxidativo, alteraciones metabólicas, contacto entre células, activación de oncogenes, acortamiento de telómeros, etc (Levine 1997).

La regulación de la actividad de P53 es muy compleja y se encuentra regulada a múltiples niveles de la expresión génica, siendo los más relevantes la transcripción, el splicing, la traducción, modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, etc.), la localización sub-celular, la degradación. En condiciones normales P53 se encuentra unida a su principal regulador negativo, Hdm2. Hdm2 tiene actividad E3 ubiquitin ligasa y es responsable de la retención de P53 en el citoplasma mediante monoubiquitinación, y de la poli-ubiquitinación de P53 y posterior degradación en el proteosoma (Kruse and Gu 2009).

Por el contrario, en condiciones de estrés celular, una serie de fosforilaciones en sitios específicos en el dominio de transactivación (TAD1) de P53 inducen su activación y separación de Hdm2 (Sakaguchi, Saito et al. 2000). Esto lleva a la exposición de señales de localización nuclear (NLS) y por lo tanto a la translocación de P53 al núcleo (Pei, Zhang et al. 2012). A su vez P53 es capaz de inducir la transcripción de Hdm2, lo que constituye un mecanismo de autocontrol destinado a limitar su actividad una vez eliminado el estrés.

Más recientemente, se ha visto que Hdm2 es capaz de interactuar con el propio ARNm de P53 favoreciendo su traducción. Esta interacción está mediada por los nucleótidos en el ARNm que codifican para los aminoácidos que establecen la unión a nivel proteico con Hdm2. Además, los sitios de Hdm2 responsables de la unión al ARNm y a la proteína P53 están solapados, lo que contribuye al control como regulador positivo o negativo dependiendo del contexto celular (Wade, Li et al. 2013).

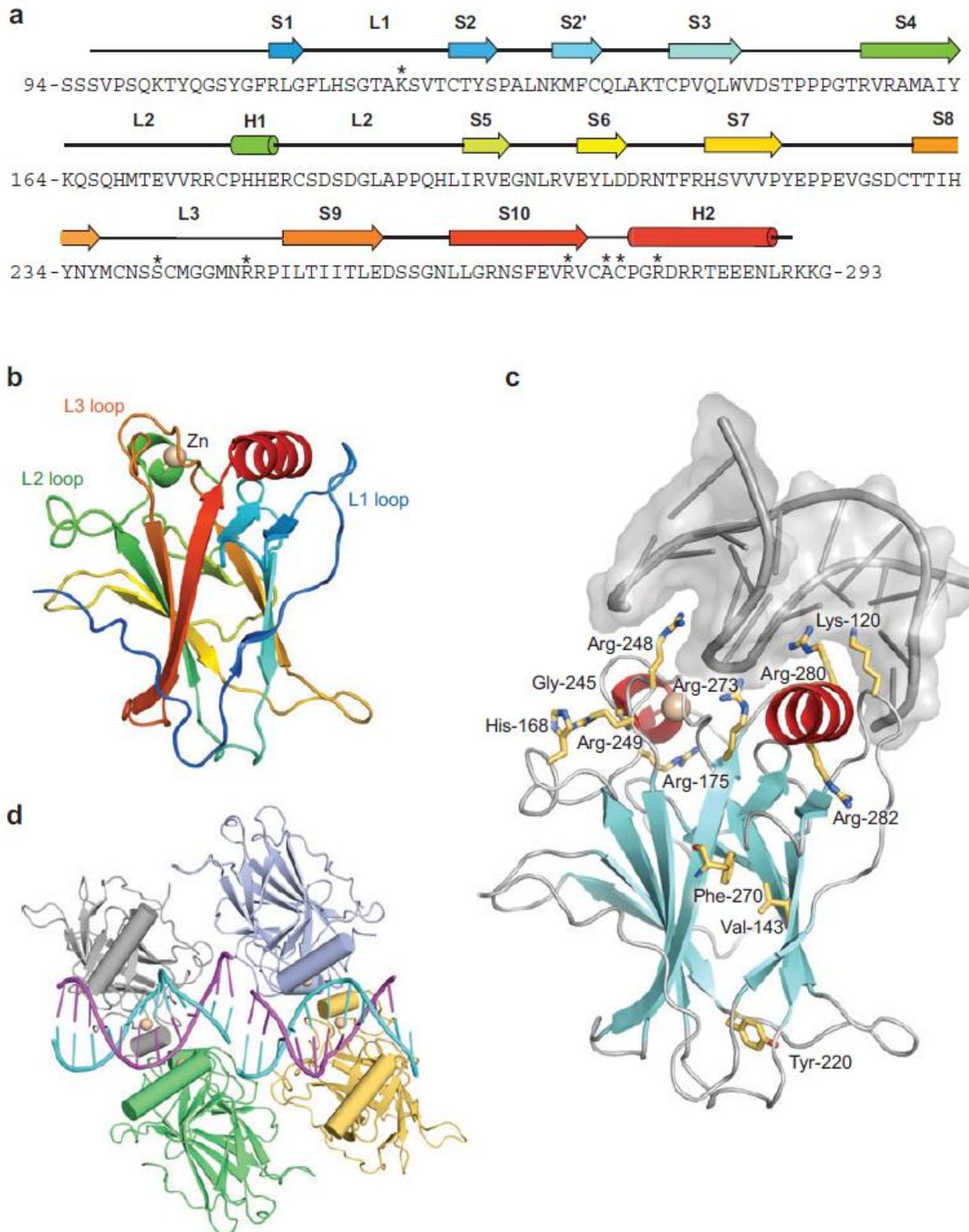
### *2.2.1 Estructura de P53.*

La forma activa de P53 es un tetrámero, formado por 4 monómeros idénticos de 393 aminoácidos y un peso molecular aparente de 53 kDa. Presenta una organización proteica clásica de factores de transcripción secuencia específica. En el extremo N-terminal se ubican los dos dominios de transactivación, uno mayor TADI (comprendido entre los aminoácido 1-40) y uno menor TADII (aminoácidos 42-73). En la región central se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD, comprendido entre los aminoácidos 102-292) y en el extremo C-terminal residen las funciones regulatorias

y de oligomerización (dominio TET, aminoácidos 325-353)(Hamzehloie, Mojarrad et al. 2012).

El dominio N-terminal de P53 no presenta un plegamiento definido sino que es intrínsecamente indefinido. Por el contrario, el dominio central de unión al ADN, presenta una estructura definida que ha podido ser resuelta mediante cristalografía de rayos X (Cho, Gorina et al. 1994). Está constituido por dos hojas beta antiparalelas unidas por una serie de loops y hélices alfa. Los loops de dicha estructura se encuentran coordinados por un átomo de zinc con importantes funciones en la estructura y estabilidad de la molécula (Guimaraes and Hainaut 2002).

El dominio TET presenta una cadena  $\beta$  unida a una hélice-  $\alpha$  por una vuelta que contiene una glicina. Por último, el extremo C-terminal es también intrínsecamente desordenado, aunque es capaz de atravesar transiciones orden-desorden al unirse a proteínas o al ADN de forma no específica (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura del dominio de unión al ADN (DBD) de P53. A) Secuencia y estructura secundaria del dominio de unión al ADN. Con asteriscos se señalan los residuos de contacto con el ADN. B) Estructura del DBD libre. C) Estructura del DBD unido al ADN. D) Estructura cuaternaria del tetrámero de DBDs unidos al ADN en su secuencia consenso. Extraído de Joerger et al 2008.

### 2.2.3 Elementos de respuesta a P53.

P53 es capaz de inducir o reprimir la transcripción de genes blancos mediante la unión a sus promotores. El sitio específico de unión consiste en una secuencia de ADN doble hebra que incluye dos decámeros palindrómicos de la forma 5'RRRCWWGYYY3' (R = A, G; W = A, T; Y = C, T), con una separación de entre 1 o 13 pares de bases (Joerger and Fersht 2008).

Se han reportado más de 50 promotores que podrían ser regulados por P53, vinculados a diferentes vías celulares. Por ejemplo, algunos promotores se encuentran regulando el ciclo celular como ser p21 (produce la detención del ciclo celular en fase G1) o GADD45 (G2/M). Otros participan en la vía de la apoptosis (como ser Bax, PUMA, NOXA), en la senescencia, reparación del ADN y autorregulación de P53 (MDM2/MDMX) (Wang, Xiao et al. 2010).

En este trabajo, se utilizaron los siguientes elementos de respuesta a P53:

- Elemento de respuesta en el gen p21. La activación de dicho gen desencadena la detención del ciclo celular en fase G1 cuando la reparación celular no es posible. En respuesta a señales de estrés, P53 activa la transcripción de p21 mediante su unión a una secuencia específica de 20 pb (5'-GAACATGTCCCAACATGTTG-3'), ubicada 2,4 kb corriente arriba del gen p21 en humanos.
- Elemento de respuesta de RGC. El promotor controla la expresión de un cluster de proteínas ribosomales, que actúan como activadores del ARN ribosomal. Dicho elemento está formado por 33 pb de repetidos TGCCT y se ubica 3,5 kb antes del sitio de inicio del ARNr 45S (Scharer and Iggo 1992).

### 2.2.1 Estructura del gen TP53.

El gen TP53 se encuentra localizado en el cromosoma 17 p13 y está constituido por 11 exones y 10 intrones. No todos los exones forman parte de la estructura proteica, el inicio de la traducción se localiza en el exón 2, mientras que el exón 1 constituye la región reguladora 5'UTR.

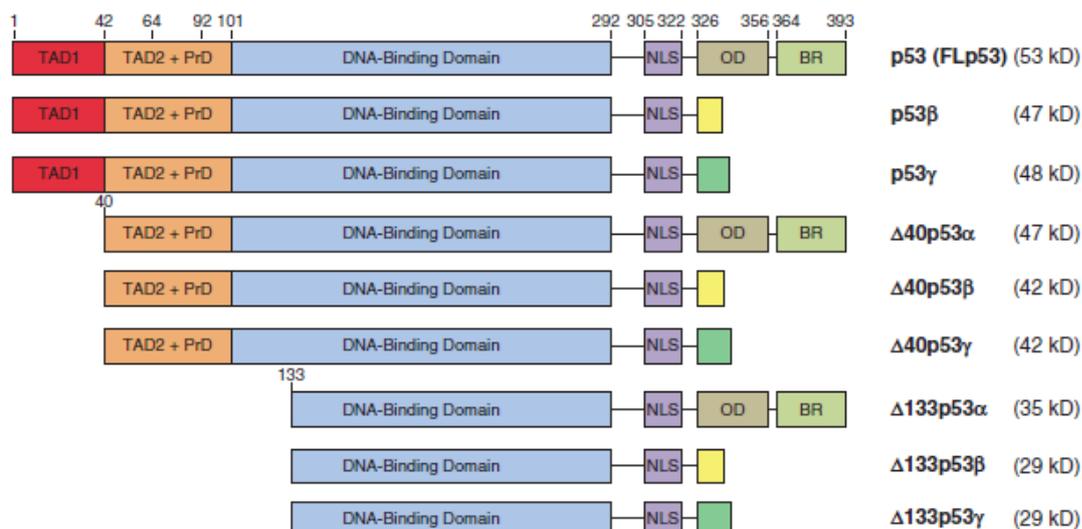
A partir del gen TP53 no solamente se produce la proteína completa de 53 kDa, sino que también existen más de 10 isoformas producto de variantes transcripcionales (tres sitios de iniciación), de splicing y traduccionales (tres sitios de iniciación). La isoforma que será sintetizada dependerá del contexto celular presente al momento de la síntesis (Hollstein and Hainaut 2010).

#### 2.2.4 Isoformas de P53.

A partir del gen TP53 pueden producirse más de 10 isoformas distintas, producto de la presencia de tres sitios de inicio de la transcripción, sitios de splicing alternativos y tres sitios de inicio de la traducción.

Todas ellas conservan el DBD y difieren principalmente en la porción N-terminal (TA,  $\Delta N$  y  $\Delta 133$ ) y en la región C-terminal (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La isoforma TA contiene el dominio TAD completo mientras que las isoformas  $\Delta N$  y  $\Delta 133$  contienen el dominio de transactivación truncado.  $\Delta N$  carece de los primeros 39 aminoácidos y  $\Delta 133$  de los primeros 132 aminoácidos.

En referencia a las isoformas en el dominio C-terminal, solamente la isoforma  $\alpha$  contiene el dominio TET completo, mientras que en las restantes se encuentra truncado y también reemplazado por 10 (la isoforma  $\beta$ ) o 15 aminoácidos (isoforma  $\gamma$ ). La combinación de estas variantes genera nueve isoformas teóricas posibles a las cuales se le suma una décima isoforma denominada  $\Delta P53$ , la cual carece de parte de los dominios DBD y TET (Figura 4) (Khoury and Bourdon 2010) (Hollstein and Hainaut 2010).



**Figura 4.** Isoformas de P53. En la figura se muestran las diferentes isoformas de P53 y sus pesos moleculares. Extraído de (Khoury and Bourdon 2010).

### **2.3 Mutaciones en TP53 relacionadas a la patología tumoral.**

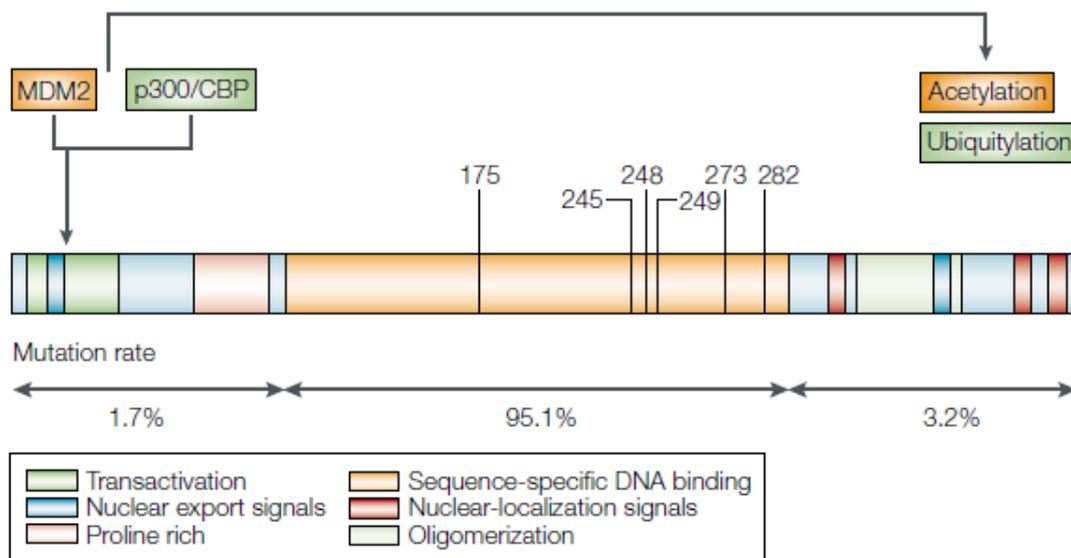
El gen TP53 se encuentra modificado en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos (Vousden and Lu 2002). La base de datos IARC (<http://www.iarc.fr/>) recompila las variaciones genéticas encontradas hasta el momento en el gen TP53 y cuenta actualmente con 29575 eventos mutacionales registrados (Petitjean, Mathe et al. 2007). Las alteraciones encontradas con mayor frecuencia incluyen: la pérdida de alelos, mutaciones puntuales, o inactivación de la proteína mediante el secuestro por antígenos virales o proteínas celulares (Guimaraes and Hainaut 2002).

De las mutaciones reportadas, el 90% son puntuales y principalmente están localizadas en el dominio de unión al ADN (DBD), entre los exones 5 y 8. La mayoría de éstas son mutaciones de pérdida de sentido, es decir que implican la sustitución de un aminoácido por otro. Sin embargo, las mutaciones puntuales también pueden causar alteraciones en el splicing, la creación de codones stop prematuros, entre otros efectos (Hamzehloie, Mojarrad et al. 2012).

Un 28% de estas mutaciones representan los denominados “hot spots” correspondientes a seis residuos localizados en el dominio de unión al ADN (DBD); son los residuos, 175, 245, 248, 249, 273 y 282, los cuales afectan la habilidad de P53 de

unirse a sus secuencias promotoras en el ADN (Figura 5) (Freed-Pastor and Prives 2012) (Vousden and Lu 2002).

Sin embargo, un 5% de las mutaciones puntuales reportadas en el cáncer son sinónimas, es decir que no implican una sustitución de aminoácido. Este valor es de 20-100 veces mayor a lo esperado si estas mutaciones son consideradas como neutras. (Lamolle, Marin et al. 2006).



**Figura 5.** Organización de dominios estructurales de P53 y localización de mutaciones en TP53 asociadas a la patología tumoral. Se muestra en la figura los dominios estructurales de P53, así como también la localización de las seis mutaciones "hotspots". Así mismo se indican los porcentajes de mutaciones encontradas en el dominio N-terminal (transactivación), en el DBD y en el dominio C-terminal (oligomerización). La interacción del dominio N-terminal con proteínas como MDM2 o p300 lleva a modificaciones post-traduccionales en el dominio C-terminal que produce, por ejemplo, el marcaje de P53 para su posterior degradación en el proteosoma.

Extraído de Vousden et al 2002 (Vousden and Lu 2002)

### 2.3.1 Método de detección de mutaciones en TP53.

- Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast (FASAY).

Debido a que P53 se encuentra mutado en la mayoría de los cánceres humanos, se han desarrollado varios métodos para el analizar la secuencia de TP53 en muestras clínicas. Las estrategias más utilizadas se basan en la secuenciación directa de TP53 o en el screening con anticuerpos anti-P53 que permitan detectar sobreexpresión de proteína mutada. Sin embargo, ambos métodos presentan limitaciones. En general estos métodos resultan costosos y laboriosos, y en su mayoría no permiten distinguir entre polimorfismos, mutaciones sinónimas y de pérdida de sentido (Benchimol, Pim et al. 1982) (Hayashi 1991).

Ishioka y colaboradores desarrollaron un método experimental funcional simple en levaduras, que permite detectar mutaciones en P53 que produzcan pérdida de la función de transcripción en sus elementos de respuesta (Ishioka, Frebourg et al. 1993) (Flaman, Frebourg et al. 1995). Este método implica la co-transformación de levaduras con elementos de respuesta específicos a P53 (como p21, Bax o RGC), con un plásmido de expresión en levaduras (pSS16), conteniendo los extremos 5' y 3' de P53 y con las secuencias amplificadas de cada uno de los mutantes a analizar (Figura 6). En la levadura ocurre la integración de la secuencia codificante de P53 mediante recombinación homóloga. A través de la formación de colonias blancas o rojas se puede determinar si P53 activa (o no) la transcripción de los mencionados promotores. El color de las colonias de levaduras dependerá del status de P53, las mismas serán blancas o rojas dependiendo de si la proteína es funcional o no.

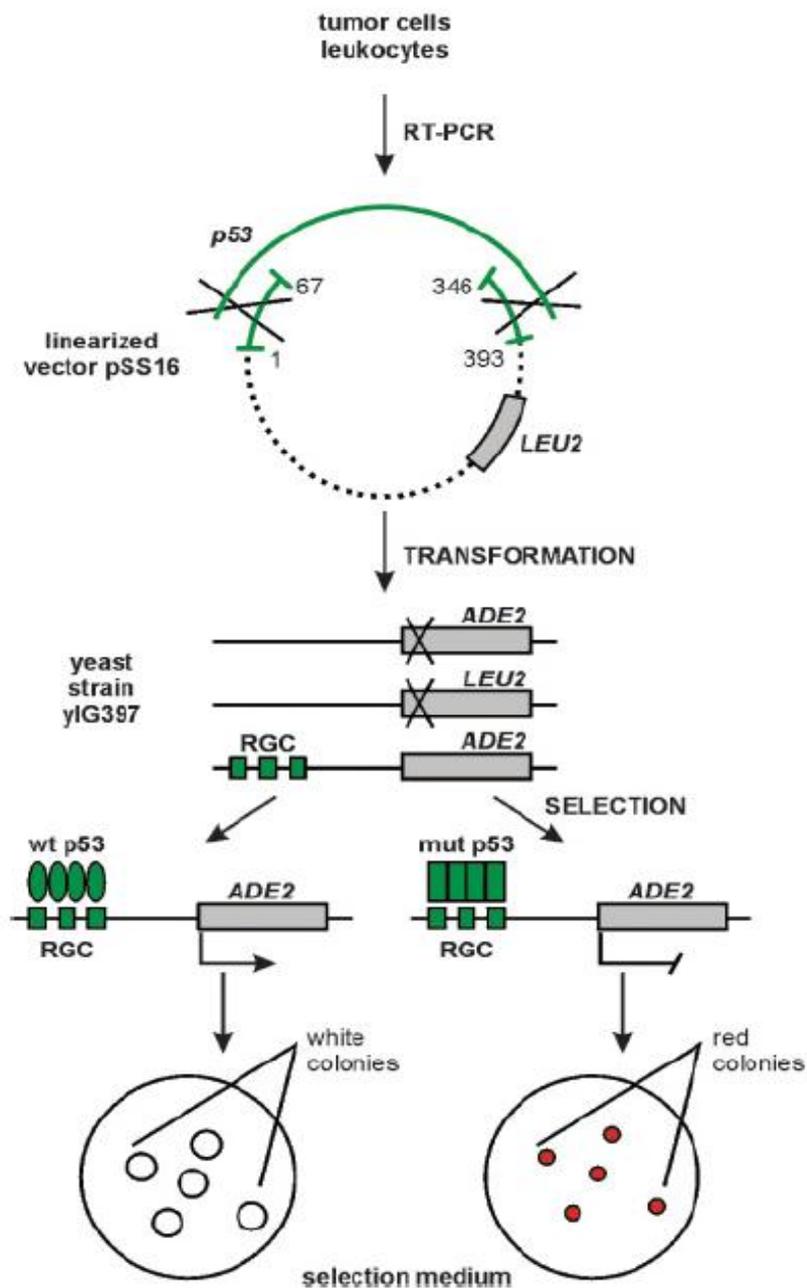
Este ensayo ha sido ampliamente utilizado para analizar el efecto de mutaciones de P53 en tumores de pacientes que presenten distintos síndromes de cáncer. En el año 2000, Duddy. P y colaboradores, determinaron con éxito la presencia de mutaciones en P53 en pacientes que presentaban cáncer de mama. En este estudio se evalúa el status de P53 en muestras de pacientes mediante tres métodos distintos, FASAY, inmunohistoquímica y secuenciación, de forma de evaluar la fidelidad del ensayo FASAY. Los autores muestran que el ensayo funcional en levaduras es un método que presenta alta sensibilidad, que permite distinguir polimorfismos y

mutaciones de pérdida de funcionalidad, mientras que en otros métodos algunas mutaciones pasan inadvertidas (Duddy, Hanby et al. 2000)

Más recientemente en el año 2012, Van der Vorst y colaboradores, mediante la utilización de FASAY han podido determinar la presencia de mutaciones en P53 en pacientes que presentaban carcinoma epicelular de cabeza y cuello (Van der Vorst, Dekairelle et al. 2012).

Este sistema de screening de mutaciones presenta numerosas ventajas con respecto al resto de los sistemas disponibles: es un método de alta sensibilidad, permite analizar ambos alelos y distinguir entre mutaciones totalmente inactivadoras de la función y parcialmente inactivadoras. Además es un método relativamente rápido y de bajo costo.

Entre las limitantes de este sistema se encuentran, el hecho de que no es posible detectar mutaciones existentes en la región promotora, en los extremos 5' y 3' así como tampoco mutaciones que alteren el patrón de splicing (Smardova, Smarda et al. 2005).



**Figura 6.** Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast (FASAY). La secuencia codificante de P53 es amplificada mediante RT-PCR de muestras extraídas ya sea de células o muestras de tejido. Posteriormente se realiza la co-transfección de las levaduras con la secuencia amplificada y el plásmido de expresión pSS16 (conteniendo los extremos de 5' y 3' de P53), y se plaquean las levaduras en medio selectivo DO-leucina.

Extraído de Smardová 2005 (Smardova, Smarda et al. 2005).

## **2.4 Antecedentes del grupo de investigación**

Como se mencionó anteriormente, nuestro laboratorio se ha interesado en el estudio del plegamiento *in vivo* de proteínas. En particular, el propósito ha sido establecer el efecto de mutaciones sinónimas en la estructura y funcionalidad de proteínas.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en *E.coli* han mostrado que cambios sinónimos en la proteína de unión a ácidos grasos EgFABP1 de *Echinococcus granulosus* pueden afectar la solubilidad de la proteína (Cortazzo, Cervenansky et al. 2002), sin afectar los niveles de expresión de la proteína.

Posteriormente los estudios se enfocaron en comprender el efecto de mutaciones sinónimas en células eucariotas. En ese contexto, durante su tesis de maestría, Ignacio López estudió en el dominio de unión al ADN de p53, el efecto de mutaciones sinónimas en una región rica en prolinas, las prolinas 151-152-153 (Figura 7). Dicha región rica en prolinas es de particular interés ya que se encuentra formando parte de un dominio SH3 involucrada a la interacción con proteínas. Además, los codones mencionados de prolinas (151-152-153) concentran un 4,13% de las mutaciones sinónimas reportadas en cáncer en la base de datos de IARC (<http://www.iarc.fr/>, (Petitjean, Mathe et al. 2007)). Más aun, los residuos de prolina son interesantes en relación al plegamiento de proteínas, ya que imponen cierta curvatura a los péptidos, debido a su estructura cíclica característica.

Los trabajos realizados en el laboratorio con el modelo de levadura (FASAY), muestran que una mezcla de variantes sinónimas en dicha región 151-152-153 (realizada mediante mutagénesis sitio-dirigida con primers degenerados) presenta una reducción significativa de actividad transcripcional de P53 en los promotores RGC y p21 en comparación con la proteína salvaje. Sin embargo no se han analizado estas variantes de forma individual. Dichos resultados fueron muy alentadores, y llevaron al interés de analizar algunas variantes sinónimas de manera individual.



**Figura 7.** Estructura cristalográfica del dominio de unión al ADN de P53. En la figura se indican con color azul la región de prolina 151-152-153 (P), en naranja se presentan los residuos de glicina 154, 226, 244 y 245 (G), en violeta el residuo de arginina 248 (R), en amarillo el residuo de treonina (T) 170, en rojo el residuo de valina 172 (V) y en celeste el residuo de asparagina 247 (N), los cuales serán blanco de las mutaciones sinónimas seleccionadas. Estructura cristalográfica extraída del Protein Data Bank (PDB) 2OCJ.

## 3 Objetivos

### **3.1 Objetivo General.**

Este proyecto se enmarca en una línea de investigación que busca establecer cuál es el efecto del uso de codones sinónimos (codones que codifican para el mismo aminoácido) en la función y estructura de P53, en relación a la patología tumoral.

El propósito de este trabajo es contribuir a comprender el por qué del elevado número de mutaciones sinónimas de P53 reportadas en el cáncer en la base de datos IARC, y en particular en los codones de prolina 151-152-153.

### **3.2 Objetivos Específicos.**

Concretamente aquí se propone analizar el efecto de codones sinónimos en la actividad transcripcional de P53, en 9 variantes sinónimas reportadas en el cáncer (base de datos IARC) y en 12 mutaciones sinónimas de la región prolinas 151-152-153 antes mencionada.

Para ello se propone:

- Generar mediante mutagénesis sitio dirigida mutantes sinónimos de interés.
- Comparar la actividad de transcripción de los mutantes sinónimos en relación a la proteína salvaje, mediante el uso del sistema FASAY en levaduras.
- Analizar el nivel de expresión de P53 en los distintos mutantes en comparación a la proteína salvaje, mediante western blot.

## 4 Materiales.

### 4.1 Células

#### 4.1.1 Levaduras

Para el estudio de la actividad de transcripción de P53 se utilizó la cepa de levadura YPH de *S. cerevisiae*, conteniendo los elementos de respuesta a P53 a estudiar p21 y RGC (Ribosome Gene Cluster) derivadas de la cepa YPH500 descrita por Sikorski y Hieter (Sikorski, Michaud et al. 1995).

Las células son mantenidas en medio YPD sólido (Yeast-Peptone-Dextrose), y fueron cedidas por el Prof. Dr Marc Blondel de la Faculté de Médecine e Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidental (UBO), Brest, France.

#### 4.1.2 Bacterias

Para la propagación de los distintos plásmidos se utilizaron células *E.coli* One Shot TOP10 Chemically Competent de Invitrogen (N°Cat. C4040-10).

### 4.2 Medios de cultivos (Ver anexo 10.6, composición de medios)

- Medio rico para levaduras YPD.
- Medio rico para bacterias LB (Luria Broth).
- Medio mínimo para levaduras MML.
- Medio selectivo para transformantes de levaduras Drop Out-Leucina.
- Medio selectivo para transformantes de levadura Drop Out-Triptofano.

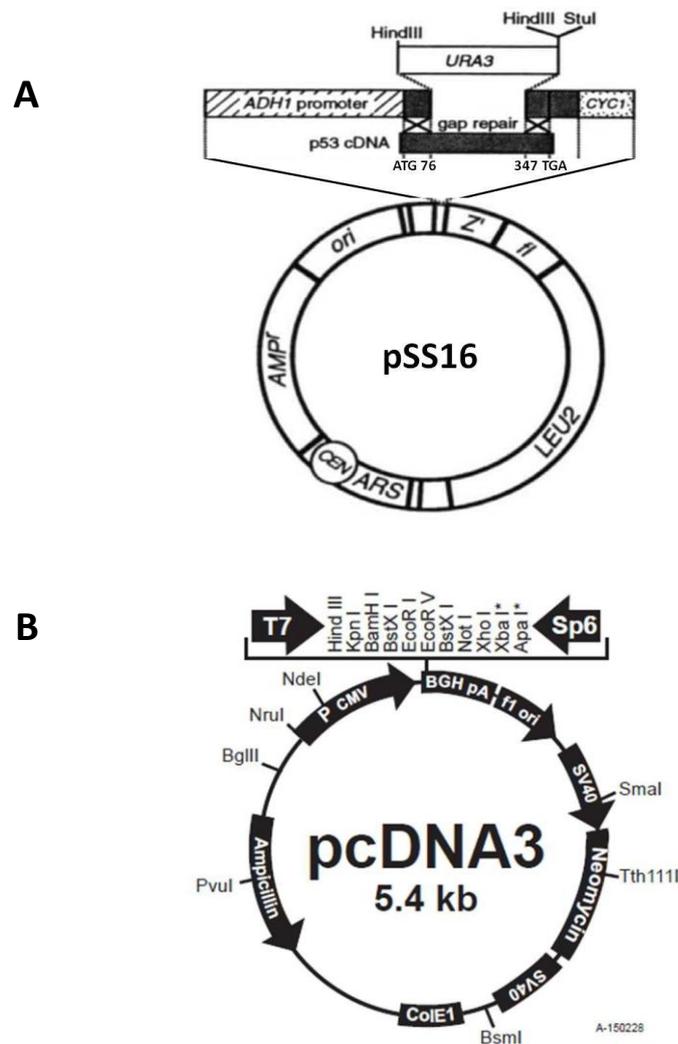
### 4.3 Plásmidos

#### 4.3.1 pSS16, utilizado para la expresión de P53 en levaduras.

Contiene los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de P53, y fue cedido cordialmente por el Prof. Dr Marc Blondel, Université de Bretagne Occidental (UBO), Brest, France (Figura 8A).

#### 4.3.2 pCDNA-3, utilizado para las construcciones de P53 y la propagación en bacterias.

Los plásmidos conteniendo las secuencias codificantes de P53 wild type y el mutante de sustitución Arginina por Histidina en la posición 175, fueron cordialmente cedidos por el Dr. Robin Fåhræus, Institut de Génétique Moléculaire, Hôpital St. Louis, Université Paris 7, Paris, France (Figura 8B).



**Figura 8.** Vectores utilizados para propagación y expresión de la proteína. A) pSS16: Plásmido para expresión de P53 en levaduras. AMP<sup>r</sup>; resistencia a ampicilina, gen de  $\beta$ -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). B) pcDNA3: Plásmido utilizado para propagación en bacterias, y utilizado como molde para obtener los mutantes estudiados. Ampicilín; resistencia a ampicilina,  $\beta$ -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). CoIE1; factor colicinogénico.

#### 4.4 *Mutaciones seleccionadas.*

##### *Mutantes seleccionados según su aparición en la base de datos IARC.*

Entre las mutaciones sinónimas contenidas en la base de datos IARC (1188 registros), se seleccionaron las que presentaban un porcentaje de aparición mayor o igual al 1% del total de cambios sinónimos.

**Tabla 1.** Mutantes de P53 seleccionados a partir de su aparición en la base de datos IARC. En la tabla se muestra, el nombre de los mutantes (incluye el nucleótido afectado), el aminoácido afectado, el porcentaje de aparición de la mutación en IARC y el motivo estructural dentro del dominio DBD afectado.

Nombre	Aminoácido	% aparición en IARC	Motivo estructural (DBD)
C462T	154Gly	1,684	NDBL-hoja $\beta$
G510T	170Tre	1,01	L2/L3
T516G	172Val	0,926	L2/L3
C678T	226Gly	1,515	NDBL-hoja $\beta$
C732A	244Gly	1,515	L2/L3
C732A/C735T	244Gly/245Gly	/	L2/L3
C735T	245Gly	1,347	L2/L3
C741T	247Asn	1,431	L2/L3
G744A	248Arg	1,515	L2/L3

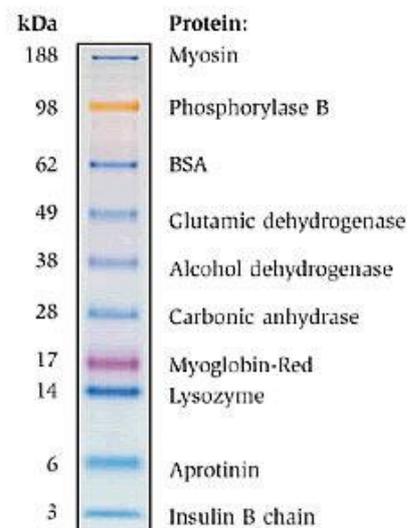
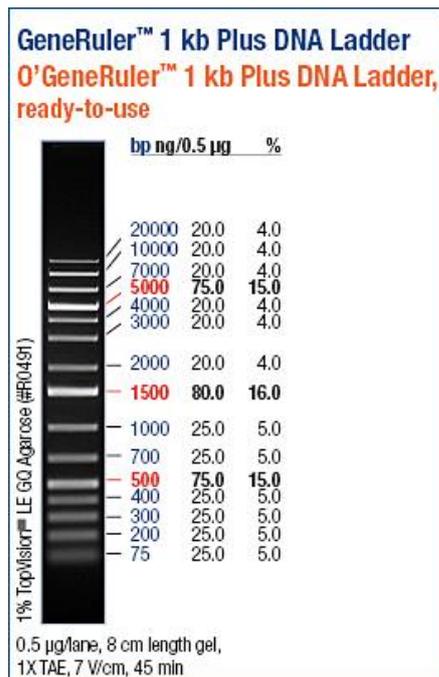
##### *Mutantes seleccionados en la región rica en Prolinas comprendida entre los aminoácidos 151-152-153.*

**Tabla 2.** Mutantes de P53 seleccionados en la región rica en Prolinas 151-152-153. En la tabla se muestra, el nombre de los mutantes, los codones afectados y las frecuencias de cada codón en humanos.

Nombre	Codones (Frecuencias/1000)		
	151	152	153
<b>WT</b>	<b>CCC (15.2)</b>	<b>CCG (4.2)</b>	<b>CCC (15.2)</b>
Pro 1	CCA (10.4)	CCA (10.4)	CCC (15.2)
Pro 2	CCU (16.0)	CCG (4.2)	CCG (4.2)
Pro 3	CCC (15.2)	CCG (4.2)	CCA (10.4)
Pro 4	CCG (4.2)	CCU (16.0)	CCG (4.2)
Pro5	CCG (4.2)	CCG (4.2)	CCG (4.2)
Pro6	CCU (16.0)	CCG (4.2)	CCU (16.0)
Pro7	CCU (16.0)	CCU (16.0)	CCU (16.0)
Pro8	CCG (4.2)	CCA (10.4)	CCC (15.2)
Pro9	CCC (15.2)	CCA (10.4)	CCG (4.2)
Pro10	CCG (4.2)	CCA (10.4)	CCG (4.2)
Pro11	CCU (16.0)	CCA (10.4)	CCG (4.2)
Pro12	CCG (4.2)	CCU (16.0)	CCC (15.2)

#### 4.5 Marcadores de peso molecular.

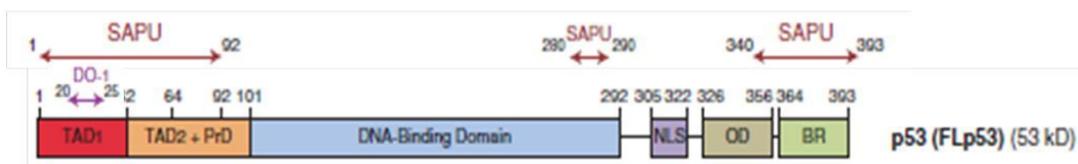
Para este trabajo se utilizó un marcador de peso molecular de ácidos nucleicos, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder de Fermentas (N° de Cat. # SM1332) y un marcador de peso molecular de proteínas pre-teñidas, SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (N° de Cat. LC5925).



#### 4.6 Anticuerpos utilizados.

##### 4.6.1 Anticuerpos utilizados anti-P53

Para el revelado de P53 en los ensayos de western blot se utilizaron dos anticuerpos distintos anti-P53, en primer lugar el anticuerpo monoclonal DO-1 (cedido por el Dr. Robin Fåhræus) y en segundo lugar el anticuerpo policlonal SAPU (cedido por el Dr. Marc Blondel). Los epítopes de cada uno de los anticuerpos se muestran en la figura 9.



**Figura 9. Epítopes de los anticuerpos anti-P53 utilizados (DO-1, SAPU).** En la figura se muestra la estructura génica de P53. En rojo se muestra el dominio de trasactivación 1 (TAD1), en naranja el dominio de transactivación 2 (TAD2) y la región rica en prolina (PRR), en celeste el dominio de unión al ADN (DBD), en violeta la señal de localización nuclear (NLS), en gris el dominio de oligomerización (OD) y en verde el dominio C-terminal (BR). Las regiones de reconocimiento del anticuerpo policlonal SAPU se indican con flechas rojas y la región de reconocimiento del anticuerpo monoclonal DO-1 se indica con una flecha violeta.

Extraído de P. Khoury, 2010

#### 4.6.2 Anticuerpo utilizado anti-actina

Para el revelado de los ensayos de western blot anti-actina, se utilizó el anticuerpo Anti-actin Mouse Monoclonal antibody de Calbiochem (N° Cat.CP01-1EA).

#### 4.6.3 Anticuerpo anti-IgG de ratón

Se utilizó para el revelado de los ensayos de western blot anti-P53 un anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse IgG-HRP conjugate comercial (Calbiochem, N° Cat.AP308P).

#### 4.6.4 Anticuerpo anti-IgM de ratón

Se utilizó para el revelado de los ensayos de western blot anti-actina un anticuerpo secundario Goat Anti-mouse IgM, H y L Chain Specific HRP-conjugate comercial (Calbiochem, N° Cat.AP128P).

## 5 Métodos

### **5.1 Actividad de Transcripción de P53 en levaduras**

Para evaluar la actividad de transactivación de P53 se utilizó el ensayo FASAY (Funcional Analysis of Separated Alleles in Yeast) (Ishioka, Frebourg et al. 1993, Flaman, Frebourg et al. 1995). En este estudio se usó la cepa de levadura de *S.cerevisiae* YPH conteniendo los dos elementos de respuesta, YPH-p21 (involucrado en la detención del ciclo celular) e YPH-RGC (Ribosome Gene Cluster) (Smardova, Smarda et al. 2005). Además en esta cepa fue deletado el gen ADE2, involucrado en la vía de síntesis de la adenina.

Básicamente el análisis consiste en realizar una co-transfección de la levadura con la secuencia de TP53 (amplificada) y el plásmido de expresión de levaduras pSS16 (conteniendo los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de TP53 y el cassette de selección que permite el crecimiento en medio deficiente en Leucina, LEU). pSS16 contiene la secuencia codificante del gen ADE2 (phosphoribosylamino-imidazolecarboxylase) involucrado en la vía de síntesis de la Adenina, bajo el control de un promotor inducible por P53. En esta vía, si existe una mutación en P53 y la levadura se encuentra en un medio con baja concentración de este metabolito, se produce la acumulación de un compuesto intermediario de color rojo. De esta forma si las levaduras son transformadas con la secuencia wild type, ADE2 es activado, no se acumula el metabolito intermediario y las levaduras son por lo tanto de color blanco. De lo contrario si la secuencia de P53 se encuentra mutada de tal forma que se alterara su funcionalidad, ADE2 no es activado, se produce la acumulación del metabolito y por lo tanto las colonias de levadura serán de color rojo.

### **5.2 Extracción y caracterización de ADN.**

#### **5.2.1 Mutagénesis sitio-dirigida**

Como molde para la mutagénesis se utilizó el plásmido pCDNA-3 (Invitrogen) conteniendo la secuencia salvaje de P53, cedido por el Dr. Robin Fåhræus, Institut de

Génétique Moléculaire, Hôpital St. Louis, Université Paris 7, Paris, France. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de síntesis de todos los mutantes sinónimos se resumen en el anexo 10.3.

Se diseñaron un total de 9 mutantes sinónimos seleccionados a partir de su aparición en la base de datos IARC y 12 mutantes en la región rica en prolinas 151-152-153 teniendo en cuenta el uso de codones de humanos.

La mutagénesis se realizó con el kit de Stratagen Quick Change Site Directed Mutagenesis. Para cada reacción de mutagénesis se utilizan 5  $\mu$ L de buffer de reacción 10X, 125 ng de cada oligonucleótido, 10  $\mu$ M de dNTPs mix, 1  $\mu$ L PfuI (2,5U/ $\mu$ L), 50 ng de ADN molde y agua c.s.p 50  $\mu$ L. Se realiza un ciclado 20 ciclos, tal cual se describe, 95 °C 1 minuto, 95 °C 50 segundos, 60 °C 1 minuto, 68 °C 6 minutos 50 segundos, 68 °C 7 minutos.

Luego de la reacción de síntesis se realiza una digestión del ADN parental con DpnI. Para esto se agrega a la mezcla de amplificación 10 U de DpnI y se incuba 2 horas a 37 °C.

Por último se realiza una transformación del producto en *E.coli* TOP10 supercompetentes. Para esto se agrega a una alícuota de 50  $\mu$ L de células, 2  $\mu$ L de la mezcla de mutagénesis, y se incuban 20 minutos en hielo. Posteriormente se realiza un shock térmico de 30 segundos en baño de agua a 42 °C y se incuban 2 minutos en hielo. Se agregan 300  $\mu$ L de medio S.O.C (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> y 20mM de glucosa) y las células se incuban a 37 °C con agitación durante 50 minutos. Por último las células se plaquean en dos placas de medio LB sólido conteniendo 100  $\mu$ g/mL de Ampicilina.

### 5.2.2 Preparaciones de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico, a partir de un cultivo de 3 mL en medio LB, se realiza mediante lisis alcalina, utilizando el kit comercial NucleoSpin Plasmid (N°. Cat. 740588.10) de Macherey Nagel (MN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.2.3 Preparaciones de ADN plasmídico a mediana escala**

Las preparaciones de ADN plasmídico, a partir de un cultivo de 200 mL en medio LB, se realizan mediante el método de lisis alcalina, utilizando el kit comercial NucleoBond Xtra/Midi (N°. Cat. 740410.10) de Macherey Nagel (MN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.3.4 Extracción de ADN genómico de levaduras**

Un precultivo de levaduras a 29 °C en medio YPD (2 mL) crecido durante toda la noche, se centrifuga y el precipitado se resuspende en 200 µL de agua. Se agregan bolitas de vidrio (aproximadamente 1 mm por debajo del nivel del líquido), 300 µL de una mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), y se vortexea a máxima velocidad durante 2 minutos. Se centrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente y se transfiere la fase acuosa a otro tubo. Se agregan 200 µL de cloroformo, se vortexea a máxima velocidad durante 2 minutos y se centrifuga a máxima velocidad también durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se transfiere la fase acuosa a otro tubo.

### **5.3.5 Electroforesis en gel de Agarosa**

Electroforesis de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X conteniendo Bromuro de Etidio 5µg/mL como agente intercalante. Se realiza una corrida de 25 minutos a 200 Volts.

### **5.3.6 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa**

Para realizar la purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa, se utilizó el kit comercial de Macherey-Nagel (MN) NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (N° Cat. 740609.50), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.3.7 Secuenciación de ADN**

La secuenciación del ADN de los plásmidos obtenidos por mutagénesis fue realizada mediante el método de Sanger. Para esto en primer lugar se realiza una

reacción de eliminación de dNTPs con ExoSap, seguido de una reacción de inserción de dNTPs marcados con la enzima BigDye.

En la reacción de eliminación de dNTPs se utilizan 10 µL de producto de PCR por cada microlitro de ExoSap, se incuba la reacción 15 minutos a 37 °C y posteriormente 15 minutos a 80 °C. Seguidamente se agregan buffer de reacción 5X, primer de secuenciación, agua c.s.p y por último la enzima BigDye. Se realiza un ciclado de 25 ciclos, 96 °C 10 segundos, 50 °C 5 segundos y 60 °C 4 minutos. Para finalizar la preparación antes de pasar al secuenciador, se purifican los productos mediante cromatografía de gel filtración utilizando el kit comercial de General Electric (GE) AutoSeq G-50 (N°. Cat. e28-9175-28AA). Para la reacción de secuenciación se utilizaron los siguientes oligonucleótidos que permiten obtener la secuencia completa de P53:

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación completa de P53.

Nombre	Secuencia
p53-1F	ATGGAGGAGCCGAGTCAGATCC
p53-133F	CTGTCCCCGGACGATATTGAAC
p53-179R	GGACCTGGGTCTTCAGTGACCC
p53-332R	AGACGGAAACCGTAGCTGCCCTGG
p53-336F	CTTCTTGCACTTCTGGGACAGCC
p53-533R	TGGGGGCAGCGCCTCACA
p53-534F	CCATGAGCGCTGCTCAGATAGCG
p53-757R	TGAGGATGGGCCTCCGGTTCA
p53-758F	CCATCATCACACTGGAAGACTCC
p53-974R	CCATCCAGTGGTTTCTTCTTTGGC
p53-975F	AGAATATTTACCCTTCAGATCC
p53-1182R	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG

### 5.3.8 Reacción de amplificación de P53 por PCR para transformar levaduras

Para la reacción de amplificación de TP53 codificante (1182 nucleótidos) salvaje y los mutantes sinónimos, se utilizó la enzima Expand High Fidelity Taq DNA Polymerase de Roche (N°. de Cat. 11732650001).

Se realizaron reacciones conteniendo buffer de reacción Expand High Fidelity Buffer 10X conteniendo 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 10 mM, primer forward P3 (5'-ATT-TGA-TGCTGT-CCC-CGG-ACG-ATA-TTG-AA(S) C-3), primer reverse P4 (5'-ACC-CTT-TTT-GGA-CTT-CAG-GTG-GCT-GGA-GT(S)G-3') 10 mM, ADN molde 100 ng, Expand High Fidelity Taq DNA Polimerasa 1,25U y agua c.s.p 50 µL.

Se realizó una incubación inicial a 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos a las siguientes temperaturas: 94 °C, 30 segundos; 62 °C, 1 minuto; 68 °C 2 minutos, y una incubación final a 68 °C durante 10 minutos.

### 5.3.9 Digestión del plásmido pSS16

En 50 µL de reacción se utilizaron 5 ng de pSS16 (2 µg/µL) y 20 unidades de *StuI* (New England Biolabs, NEB) en 1X buffer 2 de NEB, 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 1X buffer 2 de NEB y agua. Esta reacción se volvió a incubar durante 2 hs a 37 °C. El producto de interés se purificó (NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, N°. Cat: 740609.50, Macherey Nagel, MN) luego de la electroforesis en gel de agarosa.

## 5.4 Transformación de levaduras para FASAY

Para la transformación de las levaduras se realiza un precultivo en 5mL de medio YPD con 4 o 5 colonias de levadura aisladas de una placa. Se incuba el precultivo durante toda la noche a 30 °C con agitación.

Al día siguiente se mide la densidad óptica (D.O) a 600nm y se siembran matraces con medio YPD (10mL de medio por cada transformación) y una D.O<sub>600nm</sub> inicial de 0.3. Se incuban a 30 °C con agitación hasta que el cultivo alcance una DO<sub>600nm</sub> de 0,6-0,8 (tiempo aproximado de replicación de levaduras 1.5 horas).

Se centrifuga el cultivo a 4000rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspende en 1 mL de buffer Tris-EDTA (Buffer TE 10X: 100 mM

Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0)/ Acetato de litio (10% LiAc 1 M, 10% TE 10X). Se repite la resuspensión y centrifugado dos veces y por último se resuspende el precipitado en buffer TE/LiAc (100  $\mu$ L por cada transformación).

Para la transformación se agrega a cada tubo conteniendo 100  $\mu$ L de células: 10  $\mu$ L de ADN de esperma de salmón a 10 mg/mL (SIGMA, N° de Cat. D1626), 50 ng de plásmido pSS16 digerido, 550  $\mu$ L de TE/LiAc-PEG (polyetilen glicol, MW 3350, SIGMA) y 2  $\mu$ L de cada producto de PCR purificado. Las transformaciones se incuban 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se realiza un shock térmico de 15 minutos a 42 °C. Se efectúa una centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspende el precipitado en 200  $\mu$ L de medio mínimo MML.

Para finalizar se plaquea en medio selectivo DO-Leu 100  $\mu$ L de cada transformación y se incuba durante 5 días en estufa a 30 °C, hasta observar la aparición de color.

## 5.5 Extracción y caracterización de proteínas

### 5.5.1 Extracción de proteínas totales

#### Protocolo 1:

Se crece un precultivo de levadura durante toda la noche a 29 °C, conteniendo 5 mL de medio selectivo DO-Leu y una colonia aislada de levadura. Al día siguiente se realiza una dilución del mismo en 20 mL de medio selectivo DO-Leu conteniendo una  $DO_{600nm}$  inicial de 0,3. Se incuba el cultivo a 29 °C y 220 rpm hasta que llegue a una  $DO_{600nm}$  de 0,8-1,0. A continuación se utilizan 5 mL de cultivo para la realizar la extracción de proteínas, 2 mL para extracción de ADN y secuenciación, 200  $\mu$ L para un stock de células a -80 °C, y el resto se centrifuga también y se conserva a -80 °C, para el caso en caso de tener que repetir alguna extracción.

Los 5 mL de cultivo se centrifugan a 3500g durante 10 minutos y se resuspende el precipitado, para extracción de proteínas, en 250  $\mu$ L de buffer de lisis (0,1 M de NaCl, 0,025 M de Tris-HCl pH 7,4, 0,1 M de EDTA pH 8,0, 0,1% de Tritón y agua en c.s.p) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Se agregan esferas de

vidrio y se realiza la lisis celular mediante homogenización durante 4 minutos a 25 Hz en Retsch MM400. Se centrifuga el cultivo a 800 rpm durante 3 minutos a 4 °C y se recupera el sobrenadante en un nuevo eppendorf.

### **Protocolo 2:**

Se crece un precultivo de levadura durante toda la noche a 29 °C, en 5 mL de medio selectivo DO-Leu con una colonia aislada de levadura. Al día siguiente se realiza una dilución del mismo en 5 mL de medio selectivo DO-Leu conteniendo una  $DO_{600nm}$  inicial de 0,3. Se incuba el cultivo a 29 °C y 220 rpm hasta que llegue a una  $DO_{600nm}$  de 0,6-0,8. Posteriormente se centrifuga la totalidad del cultivo a 3500 g durante 10 minutos y se resuspende el precipitado en buffer de carga (0,025 M de Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% SDS, 8 M de urea, azul de bromofenol y agua en c.s.p). Se incuba la muestra en baño de ultrasonido (40 kHz) durante 15 minutos, seguido de una incubación de la misma a 99 °C durante 10 minutos y por último se repite el ciclo de sonicado inicial. En el ensayo SDS-PAGE y Western Blot se siembra el mismo volumen de cada una de las muestras.

### **5.5.2 Cuantificación de proteínas**

Se realiza la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

La curva de calibración se realiza por duplicado con las siguientes concentraciones de proteína BSA estándar: 0mg/mL, 5mg/mL, 10mg/mL y 20mg/mL.

La cuantificación de las muestras se realiza por triplicado, se utilizan 5  $\mu$ L de cada muestra y se agrega 1 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, N° de Cat. 5000006). Se registra la DO a 595nm.

Se calcula la concentración de proteínas totales de cada muestra de manera de sembrar la misma cantidad de proteínas en un western blot (protocolo 1). Se preparan las muestras con buffer de carga 4X (0,25M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 4%  $\beta$ -mercaptoetanol, 40% glicerol, Azul de Bromofenol y agua en c.s.p), y se incuba 10 minutos en baño con ultrasonido (potencia 40 kHz), posteriormente se desnaturalizan las proteínas 5 minutos a 95 °C.

### 5.5.3 Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Para la electroforesis se utilizan geles pre-cast de Invitrogen Cassetes 1,0mm 10% poliacrilamida. Como buffer de corrida se utiliza el buffer comercial NuPAGE MES 1X de Invitrogen. La corrida se realiza durante 35 minutos a 200 volts.

La transferencia a una membrana de nitrocelulosa Hybond C (GE) se realiza en buffer de transferencia (1X Buffer Tris-Glicina, 20% Etanol, 0,4% SDS), a 400mA durante 45 minutos.

El bloqueo de la membrana se realiza con buffer de bloqueo (5% Leche en polvo descremada, 1% BSA, en buffer PBS-IgPal) durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. A continuación se incuba la membrana con un anticuerpo primario específico anti-P53 (DO-1 policlonal, cedido por el Laboratorio del Dr. Robin Fåhraeus, Cibles Thérapeutiques du Cancer, IGM Hôpital St. Louis), diluido en buffer de bloqueo (1/1000), durante toda la noche a 4 °C con agitación. El epítotope de dicho anticuerpo se localiza en el dominio N-terminal, entre los aminoácidos 11-25.

Al día siguiente se efectúan 5 lavados de la membrana con buffer PBS-IgPal, de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente con agitación. A continuación se realiza la incubación con el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse IgG-HRP conjugate (dilución 1/3000, Calbiochem), 45 minutos a temperatura ambiente con agitación.

Luego de los lavados se realiza el revelado quimioluminiscente de la membrana con reactivo preparado en el laboratorio (100mM de buffer Tris-HCl pH 8.5, 0.015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luminol y ác. Crománico).

Al finalizar el revelado anti-P53 se lava la membrana 5 veces con PBS-IgPal durante 10 minutos con agitación y se bloquea nuevamente con buffer de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

Como control de siembra la membrana se incubó con anti-actina, de la siguiente manera: se incuba la membrana con un anticuerpo primario específico para actina (Anti- actin Mouse Monoclonal de Calbiochem), en una dilución 1/5000 y se incuba durante toda la noche a 4 °C con agitación. Al día siguiente se sigue el mismo procedimiento que se realizó para el revelado anti-P53, utilizando como anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse IgM, H y L Chain Specific Peroxidase conjugate, de Calbiochem.

## 6 Resultados y Discusión

Con el objetivo de evaluar el efecto de mutaciones sinónimas en la funcionalidad de la proteína supresora de tumores P53, se procedió a realizar la construcción plasmídica de los mutantes seleccionados. Con las construcciones se realizaron los ensayos funcionales (FASAY) y luego se evaluó el nivel de expresión de P53 en cada uno de los mutantes.

Para evaluar el efecto de los mutantes en la actividad de transcripción de P53, se utilizó el ensayo FASAY. Como se explica en materiales y métodos, dicho ensayo consiste básicamente, en la co-transformación de levaduras con un vector linealizado conteniendo los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de TP53 (pSS16), y con un fragmento de la secuencia amplificada de TP53 a analizar. En la levadura ocurre la recombinación homóloga y por lo tanto la inserción del fragmento de P53 amplificado en el vector.

Las cepas de levadura utilizadas contienen un elemento de respuesta a P53 el cual se encuentra controlando la expresión de un gen reportero *ADE2*, vinculado a la vía de síntesis de la adenina. El estatus de P53 (funcional o no funcional) puede visualizarse mediante la coloración que presentan las colonias de levadura. La activación del gen reportero producirá colonias blancas y la activación parcial o inactivación producen colonias rosadas o rojas, respectivamente, debido a la acumulación del metabolito intermediario fosforibosilamino-imidazol-carboxilasa.

Los resultados de este trabajo se presentan en tres partes. En la primera parte se presenta la construcción de los mutantes. En la segunda parte se muestran los resultados de los ensayos de FASAY en dos elementos de respuesta a P53 estudiados (RGC y p21) y en la tercera parte se presentan los resultados que se obtuvieron del estudio del nivel de expresión de P53 mediante ensayos de western blot.

## **6.1 Construcción de mutantes de P53.**

Con el objetivo de evaluar el efecto de mutaciones sinónimas en P53 que afecten su funcionalidad, se realizaron las construcciones plasmídicas correspondientes a los mutantes seleccionados en la región rica en Prolinas 151-152-153 y los mutantes seleccionadas en la base de datos IARC. Para esto, como se describe en materiales y métodos, a partir del plásmido pCDNA-3 conteniendo la secuencia salvaje de P53 y utilizando primers adecuados, se realizó una mutagénesis sitio dirigida. Para ello se utilizó el kit comercial de mutagénesis sitio-dirigida de Stratagene. El método consiste en realizar una reacción de PCR, durante la cual se introduce la mutación deseada, utilizando como vector parental el que contiene la secuencia salvaje de P53 (pCDNA3). A continuación se realiza una digestión con la enzima DpnI la cual permite eliminar mayormente el plásmido “parental”. Por último se realiza una transformación de *E.coli* con el producto de mutagénesis. Luego de la transformación, se amplifican los plásmidos resultantes por el método de lisis alcalina. La secuencia codificante de P53 en cada uno de los mutantes sinónimos se verificó mediante secuenciación de ADN.

De esta forma se construyen los mutantes de P53 llamados C462T, G510T, T516G, C678T, C732A, C732A/C735T, C735T, C741T, G744A; y los mutantes Pro1 a Pro12 de la región de prolinas 151-152-153 en el vector pCDNA3.

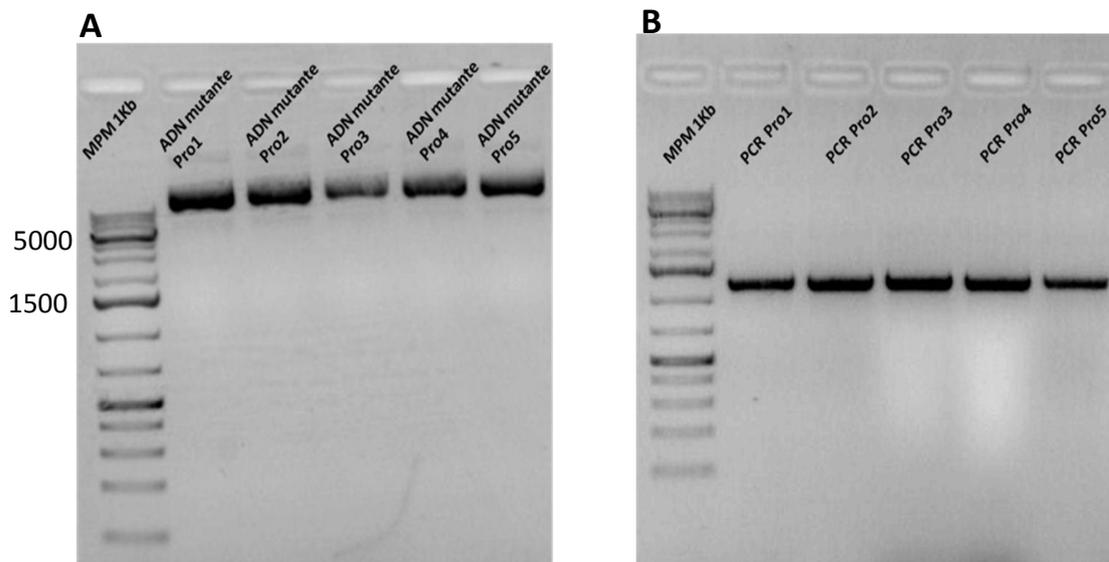
En la Figura 10A se muestra el resultado obtenido en una de las electroforesis en gel de agarosa para analizar las preparaciones de las distintas extracciones de ADN plasmídico, correspondiente a algunos de los mutantes de la región de prolinas.

Como se mencionó en materiales y métodos, las levaduras deben de ser transformadas con un fragmento de la secuencia codificante de P53 (salvaje y mutantes sinónimos). Dicho fragmento se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando las construcciones en el vector pCDNA3 como molde, y los primers P3 y P4 (ver materiales y métodos) que hibridan entre los nucleótidos 125-153 y 1094-1122 respectivamente.

En la Figura 10B se muestra el resultado de la amplificación de TP53 por PCR visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa. En todos los casos se obtuvieron los fragmentos únicos de tamaño esperado (1182 pb). Los productos de PCR fueron

purificados mediante un kit comercial de purificación de ADN extraído de gel de agarosa (ver materiales y métodos).

Todos los fragmentos obtenidos fueron cuantificados mediante el uso de un espectrofotómetro de microvolúmenes, secuenciados y conservados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Las amplificaciones fueron utilizadas posteriormente para las transformaciones de levadura.

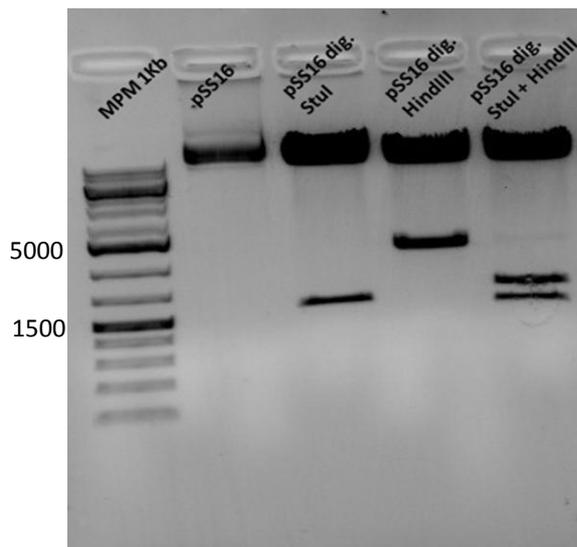


**Figura 10. Análisis de las preparaciones de ADN plasmídico de los mutantes de prolina y amplificaciones de la secuencia codificante de TP53.** A) Análisis de las preparaciones de ADN de P53 salvaje y mutantes en la región de prolina (151-152-153) 1,2,3,4 y 5 respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa 1%. B) Análisis del producto de PCR para la transformación de levadura; amplificaciones de TP53 salvaje y mutantes en la región de prolina (151-152-153) 1, 2, 3, 4 y 5. Electroforesis en gel de agarosa 1%.

Para las reacciones de amplificación se utilizó una enzima de alta fidelidad, aunque sin embargo se tuvo que secuenciar, en algunos casos, más de una colonia para cada mutante ya que presentaban con cierta frecuencia errores en la secuencia codificante.

### 6.11 Preparación del vector pSS16

El vector pSS16 fue digerido con las enzimas de restricción *StuI* y *HindIII* y purificado a partir de gel de agarosa. El vector linealizado y purificado fue cuantificado y conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la transformación de las levaduras.



**Figura 11. Análisis de la digestión de pSS16.** Digestión del vector pSS16, con Stul (NEB) y HindIII (Roche). 1. MPM 1Kb Ladder Fermentas, 2. pSS16 (2,0 µg/mL), 3. pSS16 digestión con Stul, 4. pSS16 digestión con HindIII, 5. pSS16 digestión doble Stul e HindIII. Gel de agarosa al 1%

La Figura 11 muestra el resultado obtenido en la electroforesis en gel de agarosa de las digestiones del vector pSS16 con las enzimas de restricción Stul, HindIII. Al realizar la digestión con cada una de las enzimas por separado se obtiene como resultado el plásmido linealizado y un fragmento adicional. Esto se debe a que para cada una de ellas hay dos sitios de reconocimiento en el vector. Al cortar con ambas enzimas se obtiene el vector pSS16 linealizado conteniendo en las puntas los extremos 3' y 5' de P53. A su vez se libera el gen URA3 en dos fragmentos, un primer fragmento de aproximadamente 600 pb y otro fragmento de aproximadamente 500 pb. El resultado de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El fragmento correspondiente al vector pSS16 linealizado fue purificado.

De esta manera, en la primera esta se completó la preparación de los “reactivos” que son necesarios para los ensayos de la actividad de transcripción de P53 en levaduras: 1) los 21 mutantes sinónimos de P53 seleccionados, de la base de datos IARC y de la región de prolinas, clonados en el vector pCDNA3; 2) los fragmentos de P53 amplificados por PCR, purificados y cuantificados y 3) se preparó el vector de expresión pSS16, el cual fue digerido con las enzimas de restricción (Stul, HindIII).

## **6.2 Análisis de la actividad de transcripción de P53 en los promotores RGC y p21 en levaduras.**

### **Ensayo FASAY en dos cepas de *S. cerevisiae*, YPH-RGC e YPH-p21.**

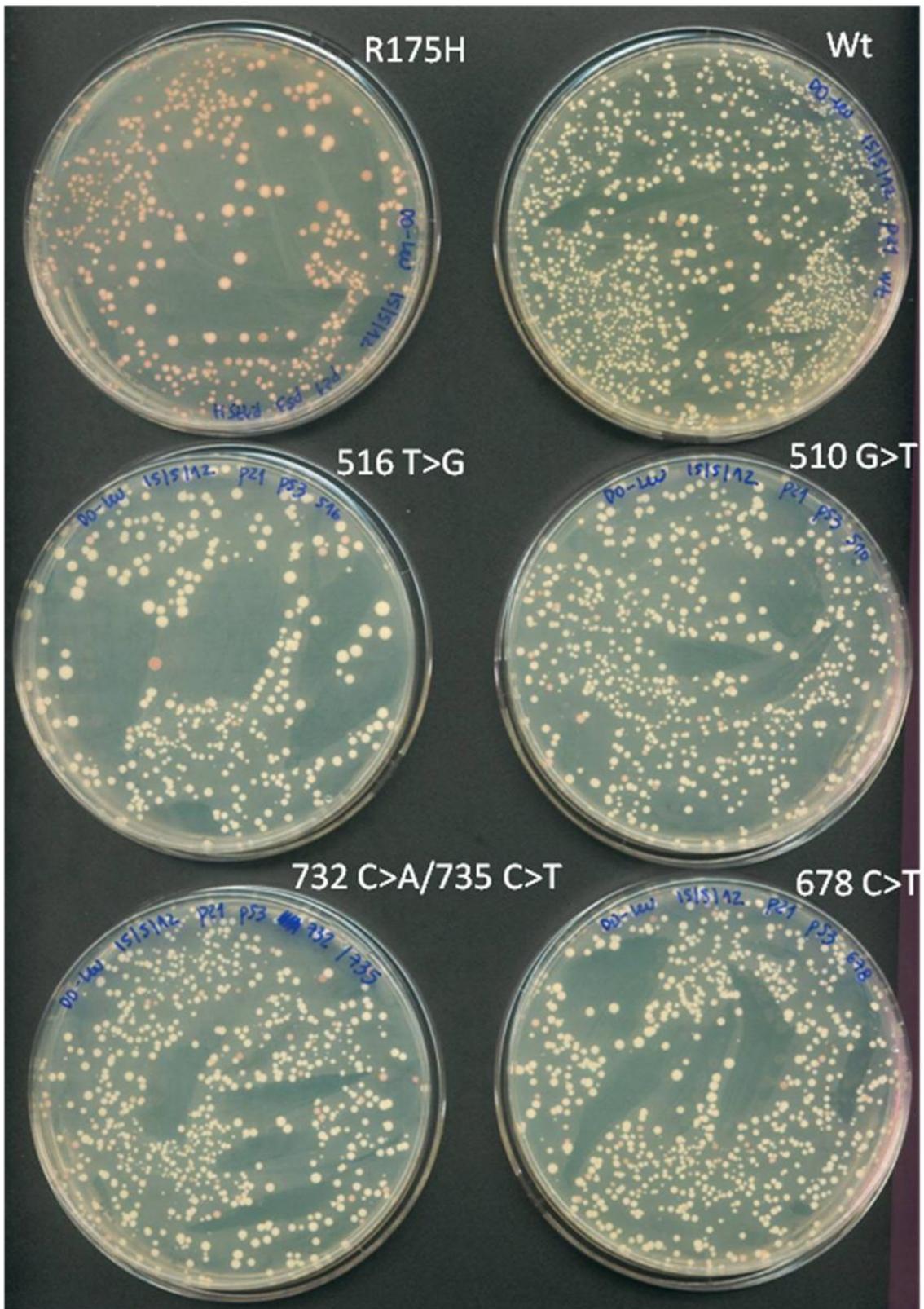
El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar la actividad de transcripción de P53 salvaje y de los mutantes sinónimos en dos elementos de respuesta, RGC y p21.

Para ello se utilizó dos cepas de *S.cerevisiae* que contienen los promotores de genes inducibles por P53. La coloración en las colonias transformantes blanca o roja permite evaluar la actividad de transcripción de P53.

Para esto, se realizó la co-transformación de las levaduras, tal como se describió en materiales y métodos, de las cepas llamadas, YPH-RGC y YPH-p21 con los fragmentos amplificados de TP53 (2 µL de cada producto de PCR) y sus mutantes, y el vector de expresión en levaduras pSS16 (50 ng) previamente linealizado. El producto de la transformación fue plaqueado (100 µL de la transformación) en placas de medio selectivo (DO-Leu) y fueron incubadas 5 días a 29 °C hasta observar la aparición de color. Como control negativo (control de inactivación total de P53), se utiliza el mutante R175H que produce un 100% de colonias rojas.

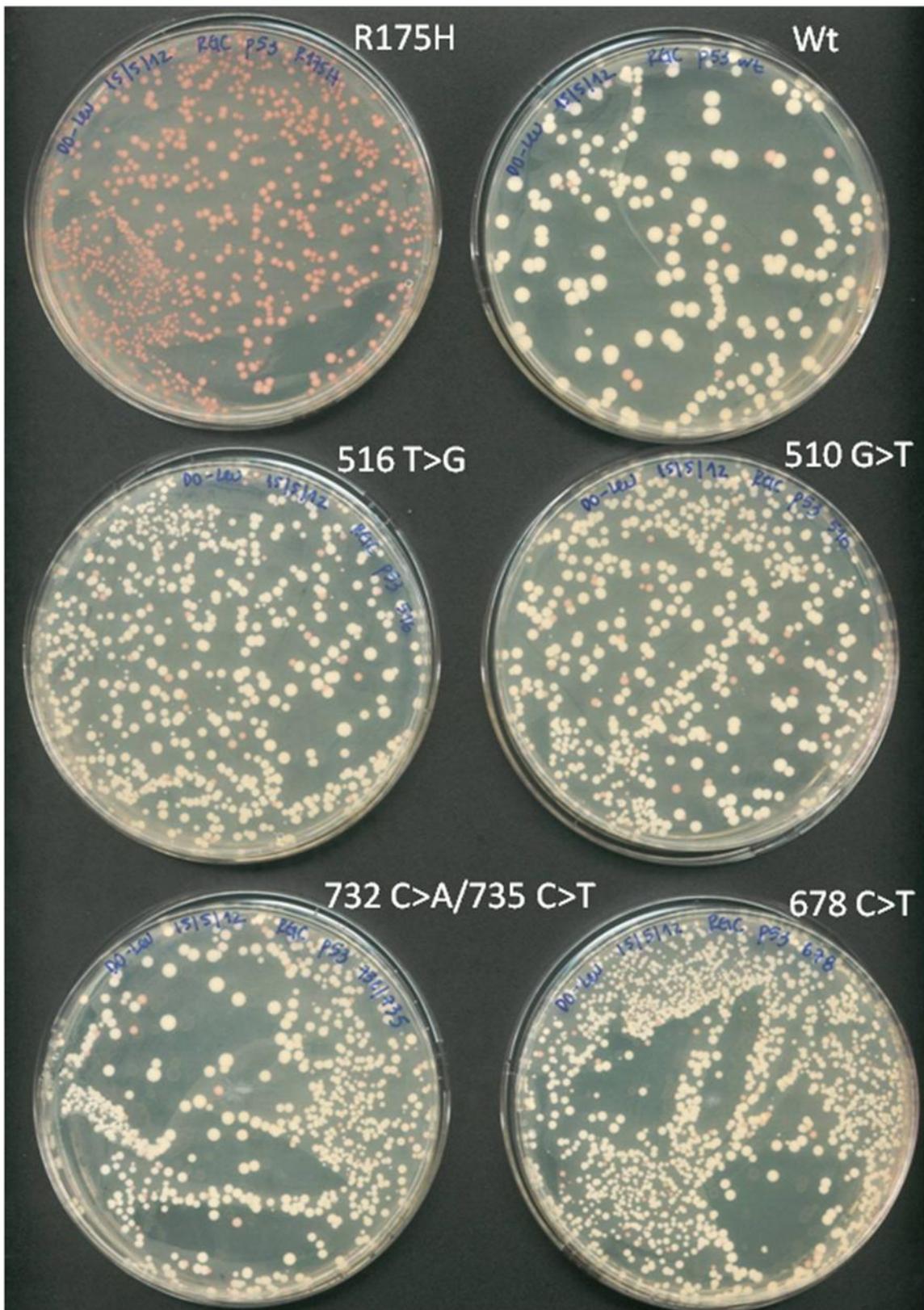
#### → 6.21 Mutantes seleccionados en la base de datos IARC:

En las Figuras 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos en la transformación de levadura conteniendo los dos elementos de respuesta a P53, RGC y p21, con algunos de los mutantes seleccionados en la base de datos IARC (las demás transformaciones de levadura en el elemento RGC, así como también en p21 mostraron resultados similares). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Los resultados se resumen en la figura 14.

**P21**

**Figura 12.** Ensayo FASAY en *S. cerevisiae* para la cepa YPH-p21. Transformación de *S. cerevisiae* cepa YPH conteniendo el elemento de respuesta a P53 p21, con p53 salvaje (control positivo), p53 R175H (control negativo), p53 mutante 510 G>T, p53 mutante 516 T>G, p53 mutante 678 C>T y p53 mutante 732 C>A/735 C>T. 100  $\mu$ L de la mezcla de transformación fueron plaqueados en medio selectivo DO-Leu, e incubados a 29  $^{\circ}$ C durante 5 días.

## RGC

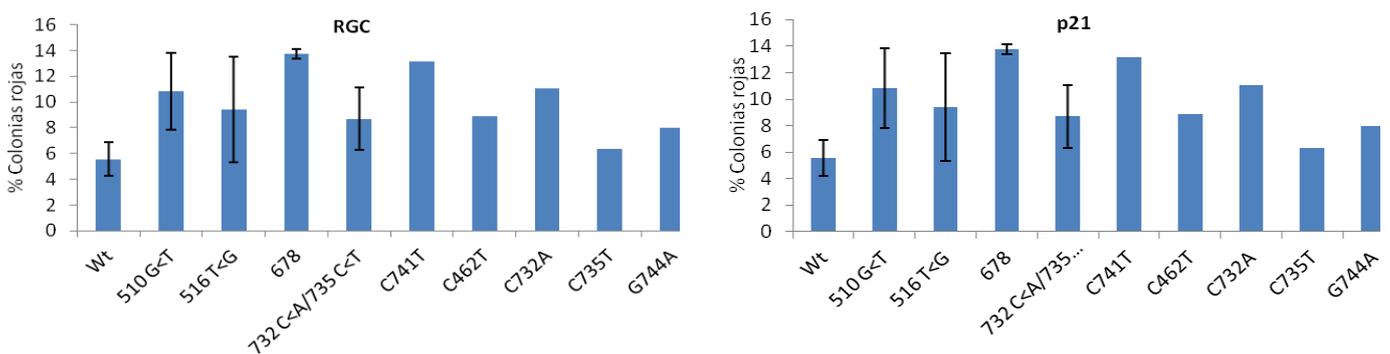


**Figura 13. Ensayo FASAY en *S. cerevisiae* para la cepa YPH-RGC.** Transformación de *S. cerevisiae* cepa YPH conteniendo el elemento de respuesta a P53 RGC, con p53 salvaje (control positivo), p53 R175H (control negativo), p53 mutante 510 G<T, p53 mutante 516 T<G, p53 mutante 678 C<T y p53 mutante 732 C<A/735 C<T. 100  $\mu$ L de la muestra de transformación fueron plaqueados en medio selectivo DO-Leu, e incubados durante 5 días a 29 °C.

La transformación realizada con el gen TP53 salvaje genera una mayoría de colonias blancas y 5,5 – 7,0% de colonias rojas. El mutante de P53 de cambio de aminoácido R175H origina un 100% de colonias rojas, de acuerdo a lo esperado.

Tal como se muestra en las figuras 12 y 13, para ambos elementos de respuesta no se observa un aumento significativo de la cantidad de colonias rojas (correspondientes a pérdida de actividad de transcripción de p53 en cada elemento de respuesta.), en la mayoría de los mutantes analizados respecto a P53 salvaje.

Los resultados obtenidos de la actividad transcripcional de los distintos mutantes sinónimos seleccionados en la base de datos IARC, para cada uno de los elementos de respuesta p21 y RGC se resume en los gráficos a continuación. Se incluye P53 salvaje y no se incluye el mutante de cambio de aminoácido R175H.



**Figura 14. Resultados de los ensayos de FASAY, para las mutaciones sinónimas seleccionadas en la base de datos IARC.**

Los gráficos representan el porcentaje de colonias rojas que se obtuvo en los ensayos de FASAY, para cada uno de los mutantes seleccionados.

Como se observa en la figura la gran mayoría de los mutantes parecerían presentar un porcentaje de colonias rojas mayor o igual al 8%, mientras que en los ensayos con P53 salvaje el porcentaje de colonias rojas es de aproximadamente 6%. Es importante destacar que los ensayos fueron realizados por duplicado para los mutantes sinónimos G510T, T516G, C678T, C732A/C735T y para la proteína salvaje, mientras que para los mutantes C741T, C462T, C732A, C735T y G744A, los experimentos se realizaron una única vez. Por lo tanto no podemos afirmar si en dichos mutantes el porcentaje de colonias rojas es significativamente mayor al de P53 salvaje.

Los mutantes G510T y C678T presentan diferencias significativas en el porcentaje de colonias rojas (10,8% y 13,7% respectivamente) con respecto a la proteína salvaje, en la cepa RGC. El resto de las mutaciones analizadas presentan porcentajes similares al de la proteína salvaje indicando que la mutación no genera una alteración en la actividad transcripcional de P53 en este promotor, en el sistema experimental utilizado.

En la cepa conteniendo el elemento de respuesta p21 la gran mayoría de los mutantes sinónimos de esta serie parecería no presentar diferencias significativas en el porcentaje de colonias rojas con respecto a la proteína salvaje. Sin embargo, como se mencionó anteriormente los experimentos fueron realizados por duplicado únicamente, por lo cual es necesario repetir el mismo para afirmar que ninguno de los mutantes sinónimos afecta de forma significativa la actividad transcripcional de P53 en dicho promotor. Con respecto a los mutantes sinónimos G510T y C678T, presentaron un porcentaje de colonias rojas de aproximadamente 8,8%, valor significativo con respecto al porcentaje de colonias rojas obtenido para la proteína salvaje.

En base a los resultados obtenidos, se decidió continuar el trabajo priorizando el estudio del mutante G510T en la cepa RGC, y posteriormente analizar el efecto del mutante C678T.

#### → 6.22 Mutantes sinónimos de los codones de prolina 151-152-153

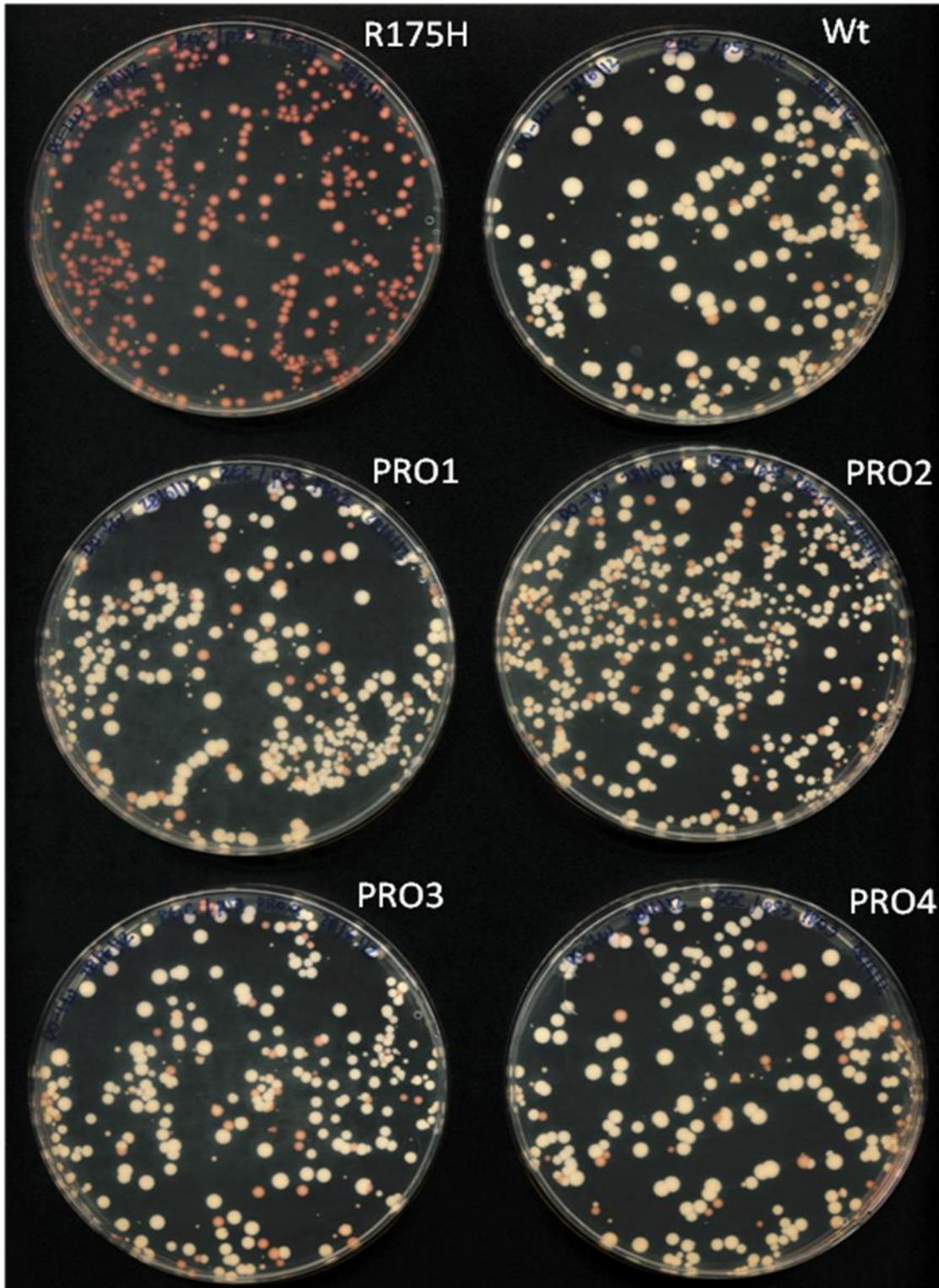
El análisis de la actividad transcripcional de P53 portador de mutaciones sinónimas en la región codificante de las prolinas 151-152-153 mostró en su mayoría un aumento del número de colonias rojas en comparación con la proteína salvaje, para ambos elementos de respuesta. Para el elemento de respuesta RGC se obtuvo un porcentaje de entre un 15-25% de colonias rojas en comparación con un 6% en la proteína salvaje. Del mismo modo, para el elemento de respuesta p21, se obtuvo entre un 10-25% de colonias rojas en comparación a un 6% obtenido para la proteína salvaje (gráficos figura 17).

La figura 15 muestra el resultado de la determinación de la actividad transcripcional de P53 mediante FASAY correspondiente a los mutantes Pro1, Pro2, Pro3 y Pro4 en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC y en la figura 16 se presenta el resultado del mismo ensayo realizado en la cepa conteniendo el elemento de respuesta p21.

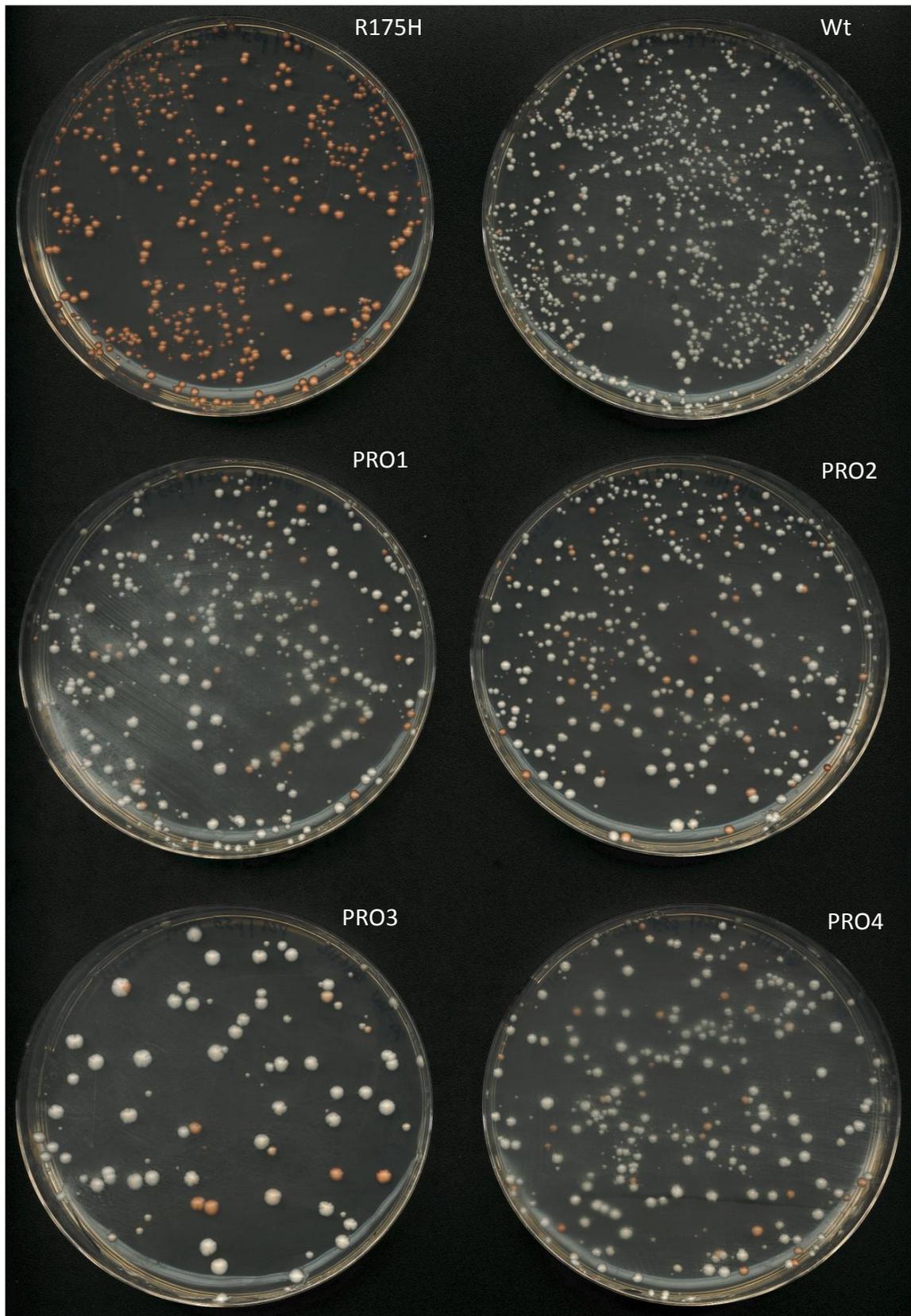
La transformación de levaduras con P53 salvaje mostró un porcentaje de colonias rojas aproximado al 10% en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC y 6% en la cepa conteniendo el elemento de respuesta p21, según lo esperado. Así mismo, los ensayos realizados con el mutante conformacional R175H dieron como resultado un 100% de colonias rojas en ambas cepas.

En ambas figuras puede verse que dichos mutantes presentan diferencias en la cantidad de colonias rojas con respecto a la proteína salvaje. Resultados similares fueron obtenidos para la mayoría de los mutantes de prolina seleccionados y en ambos elementos de respuesta.

## RGC

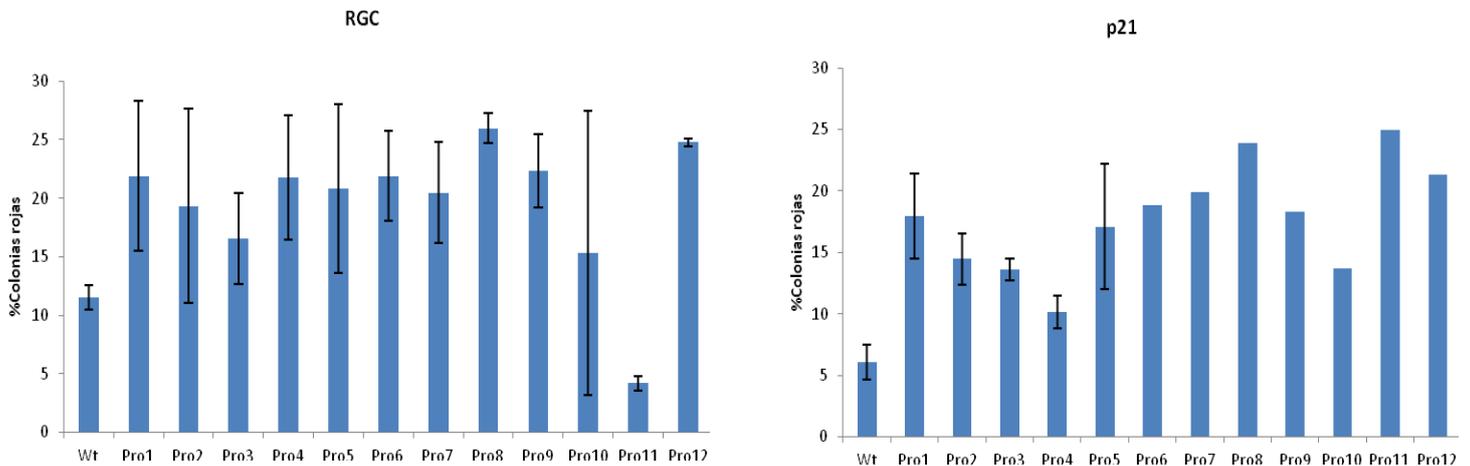


**Figura 15. Ensayo FASAY en *S. cerevisiae* para la cepa YPH-RGC.** Transformación de *S.cerevisiae* cepa YPH conteniendo el elemento de respuesta a P53 RGC, con p53 salvaje (control positivo), p53 R175H (control negativo), p53 mutante Pro1, p53 mutante Pro2, p53 mutante Pro3 y p53 mutante Pro4. 100  $\mu$ L de la muestra de transformación fueron plaqueados en medio selectivo DO-Leu, e incubados durante 5 días a 29 °C.

**p21**

**Figura 16.** Ensayo FASAY en *S. cerevisiae* para la cepa YPH-p21. Transformación de *S.cerevisiae* cepa YPH conteniendo el elemento de respuesta a P53 p21, con p53 salvaje (control positivo), p53 R175H (control negativo), p53 mutante Pro1, p53 mutante Pro2, p53 mutante Pro3 y p53 mutante Pro4. 100  $\mu$ L de la muestra de transformación fueron plaqueados en medio selectivo DO-Leu, e incubados durante 5 días a 29 °C.

En la figura 17 se resume el resultado de los experimentos de FASAY realizados en ambas cepas (por duplicado), para los 12 mutantes de la región de prolinas.



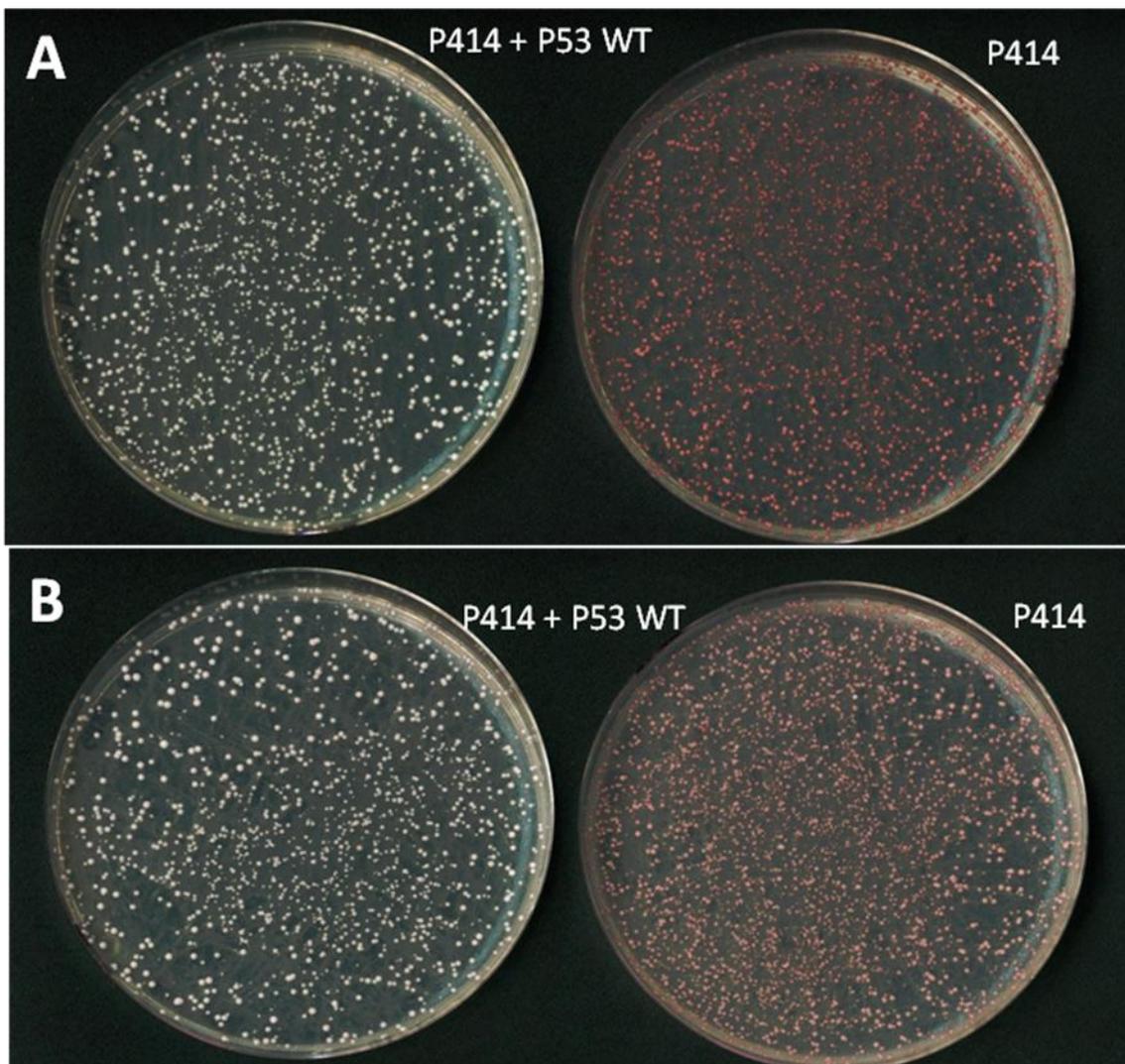
**Figura 17. Resultados de los ensayos de FASAY, para las mutaciones sinónimas seleccionadas en la región rica en Pro 151-152-153.** Los gráficos representan el porcentaje de colonias rojas que se obtuvo en los ensayos de FASAY, para cada uno de los mutantes seleccionados.

Es importante señalar que en la cepa p21 los ensayos con los mutantes Pro6 a Pro12 fueron realizados una sola vez, por lo que desconocemos el error asociado.

Los resultados obtenidos en los ensayos de FASAY para los mutantes Pro1 a Pro12 (figura 17) muestran que la gran mayoría de las mutaciones en esta región de prolinas afecta la actividad de transcripción de P53 en los dos elementos de respuesta estudiados. El resultado del ensayo en el mutante Pro 10 tuvo un error elevado en ambos experimentos lo que no permite concluir si la mutación tiene un efecto o no en la actividad de transcripción en ambos elementos de respuesta. Se debería repetir el ensayo, de manera de poder sacar una conclusión acerca del efecto de dicho cambio sinónimo en la actividad de P53.

→ 6.23 Ensayo de transformación de levaduras (YPH-RGC, YPH-p21) con p414 y p414- P53 salvaje.

El porcentaje de colonias rojas que se observa en los ensayos realizados con la proteína salvaje son muy elevados (aproximadamente 10%) como para corresponderse únicamente a errores introducidos en la reacción de amplificación por PCR. Por lo tanto, con el propósito de evaluar si el elevado número de colonias rojas presentes en la transformación de levaduras con P53 salvaje, se debe a errores introducidos durante la reacción de PCR (Inga, Monti et al. 2001, Smardova, Smarda et al. 2005, Wu, Fu et al. 2007, Van der Vorst, Dekairelle et al. 2012), se modificó la estrategia experimental. Para ello, se procedió a transformar levaduras con un plásmido de expresión p414-ADH (ver anexo 10.3) conteniendo la secuencia salvaje de P53. El clonado de los fragmentos amplificados de P53 en el vector de expresión p414 permitirá evitar el error que pueda introducirse durante las reacciones de amplificación para generar el fragmento de P53. Así mismo, el vector p414 contiene el mismo promotor (ADH) que el vector pSS16 (FASAY), lo cual aseguraría que los niveles de expresión sean similares y por tanto, los resultados serían comparables con los obtenidos en los ensayos de “gap repair”.



**Figura 18. Ensayo FASAY en *S. cerevisiae* para la cepa YPH-p21, YPH-RGC.** Transformación de *S.cerevisiae* cepa YPH conteniendo los elementos de respuesta a P53 A) p21 y B) RGC, con el vector p414 conteniendo la secuencia de P53 salvaje y p414 como control. 100  $\mu$ L de la muestra de transformación fueron plaqueados en medio selectivo DO-Trp, e incubados durante 5 días a 29 °C.

La figura 18 muestra el resultado que se obtuvo en la transformación de levaduras con el plásmido p414-P53 salvaje, y p414 sin inserto como control negativo. Como puede verse al realizar la transformación con el vector vacío, se obtiene un 100% de colonias rojas en ambas cepas, tal como es esperado. Al realizar el ensayo con el vector conteniendo la secuencia de P53 salvaje, se obtiene un 95,5% de colonias blancas y un 0,5% de colonias rojas. Este resultado muestra que el porcentaje de colonias rojas que se obtiene en la transformación con P53 salvaje se redujo al utilizar un vector en lugar de un producto de PCR

para el ensayo de FASAY. Sin embargo no se elimina por completo la presencia de colonias rojas, por tanto podemos descartar la hipótesis de que el elevado porcentaje de colonias rojas presentes en la transformación con P53 salvaje se debe únicamente a errores introducidos durante la reacción de PCR.

✓ **Resumen: Resultados del ensayo de funcionalidad de P53 (FASAY)**

En esta segunda parte del trabajo se logró realizar los ensayos de funcionalidad de P53 en levadura para todas las construcciones realizadas empleando el sistema FASAY.

Se obtuvo un porcentaje de colonias rojas en los ensayos de FASAY realizados con la proteína salvaje, de aproximadamente 5,5-7,0%. Si bien estos valores caerían dentro de lo que se considera ruido de fondo asociado a errores en la amplificación por PCR, el mismo parece ser demasiado elevado considerando que en el estudio se utilizó una enzima taq polimerasa de gran fidelidad. Este porcentaje en la bibliografía (10% de colonias rojas aproximadamente) es atribuido a mutaciones que pueden ser introducidas durante las reacciones de amplificación por PCR, o splicing alternativo del intrón 9 afectando el extremo carboxilo terminal (Wu, Fu et al. 2007).

Para intentar dilucidar porqué se producen colonias rojas en la transformación realizada con P53 salvaje, en este trabajo se realizó en paralelo una transformación con un vector de expresión en levaduras conteniendo la secuencia salvaje de P53, y con el vector p414 sin inserto como control negativo. En dicho ensayo se obtuvo un 0,5% de colonias rojas. Si bien el porcentaje es significativamente menor al obtenido en los ensayos de FASAY (5-10% de colonias rojas), podemos descartar la hipótesis de que dichas mutaciones se deben únicamente a errores introducidos en la reacción de PCR. Sin embargo no podemos decir a que podrían deberse dichas colonias exactamente.

Los resultados obtenidos en los ensayos de FASAY con los mutantes sinónimos seleccionados en la base de datos IARC mostraron en su mayoría que no hay diferencias significativas en la capacidad de activar la transcripción respecto a P53

salvaje. Los mutantes G510T y C678T, presentaron un aumento de pérdida de función con respecto a la proteína salvaje, en el promotor RGC.

Los resultados obtenidos en los ensayos de FASAY para los mutantes en la región de prolinas 151-152-153, presentaron en su gran mayoría diferencias significativas con respecto a la proteína salvaje (entre un 18-25% de colonias rojas). Sin embargo son aún preliminares. Solamente los ensayos realizados en la cepa de levadura conteniendo el elemento de respuesta RGC, se repitieron al menos dos veces para todos los mutantes, mientras que para la cepa conteniendo el elemento de respuesta p21, únicamente se repitieron los ensayos para los mutantes Pro 1 al Pro 4 con sus respectivos controles.

No obstante los ensayos de FASAY no permiten concluir qué mecanismo puede ser afectado por la mutación. Como se mencionó anteriormente las mutaciones sinónimas podrían estar afectando la estabilidad local o total del ARNm, la cinética de traducción, el nivel de expresión de la proteína madura, el splicing o también el plegamiento.

Para intentar dilucidar a qué nivel influyen las mutaciones, nos planteamos en primer lugar estudiar el nivel de expresión de la proteína madura, mecanismo que también se vería afectado por inestabilidad del ARNm.

Tratando de comprender el significado de la presencia de colonias rojas y blancas, a partir de dichas colonias se analizó en paralelo la secuencia codificante de TP53 y el nivel de expresión de P53. Se realizaron extracciones de ADN genómico de levaduras para el análisis de la secuencia de TP53 y verificar que no se hayan introducido errores durante la amplificación por PCR; al mismo tiempo se realizó extracciones de proteínas de colonias rojas y blancas de cada uno de los mutantes de prolina para el análisis del nivel de expresión de P53 mediante western blot.

### **6.3 Evaluación de los niveles de expresión de P53 en levadura.**

Como primera aproximación para comprender la causa de la disminución de la actividad de transcripción de P53 nos propusimos evaluar los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de los diferentes mutantes de prolina seleccionados y en los controles, P53 salvaje y mutante R175H. De la misma forma se analizó el nivel de expresión de P53 en el mutante G510T. Dichos resultados se presentan a continuación.

#### → 6.31 Mutantes región de prolinas 151-152-153

Para realizar la extracción de proteínas de levadura se ensayaron dos protocolos. Tal como se describe en materiales y métodos, el primer protocolo incluye una lisis celular seguida de una centrifugación a baja velocidad, mientras que el segundo protocolo implica el sembrado directo de la muestra en un buffer de carga de proteínas modificado con respecto al buffer estándar (ver materiales y métodos).

Se sembraron cultivos de 5 mL con colonias rojas y blancas de levadura aisladas de cada uno de los mutantes de P53, a los 5 días de crecimiento en placa, en medio selectivo y se procedió a la extracción de proteínas utilizando el protocolo 1. Se cuantificaron proteínas totales mediante el método de Bradford. Para esto, se realizó una curva de calibración utilizando la proteína seroalbúmina bovina (BSA), y se analizó la muestra por triplicado.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación por Bradford para los mutantes expresados en la cepa conteniendo el elemento de respuesta a P53 RGC:

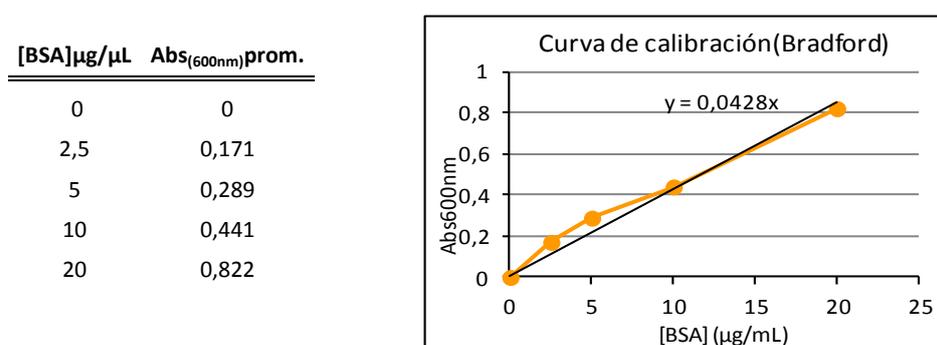
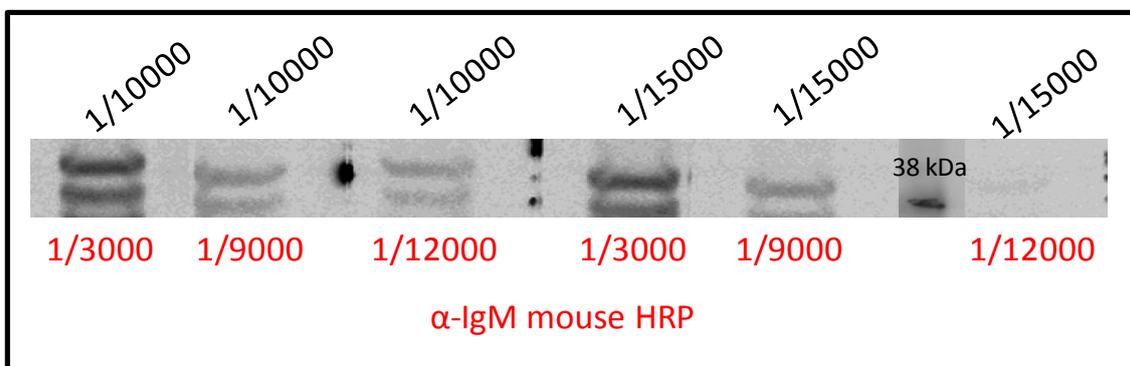


Figura 19. Curva de calibración de BSA para cuantificación de proteínas mediante método de Bradford.

Se calculó el volumen necesario de cada muestra de forma de sembrar la misma cantidad de proteína en un volumen final de 25  $\mu$ L para una electroforesis SDS-PAGE al 12%. Para controlar que se había sembrado cantidades iguales de proteína en los carriles, se decidió revelar la cantidad sembrada de la proteína actina por western blot.

- Puesta a punto del ensayo de western blot:

Para poner a punto la concentración de anticuerpo anti-actina a utilizar en los western blot se utilizó una única muestra, el extracto de proteínas totales de un transformante de color blanco producto de la transformación con P53 salvaje. Se sembró 5  $\mu$ g de proteína en cada carril. Se realizó un ensayo utilizando 2 concentraciones de anticuerpo primario monoclonal anti-actina de ratón, 1/10000 y 1/15000, y 3 concentraciones de anticuerpo secundario anti-IgM de ratón conjugado a HRP, 1/3000, 1/9000 y 1/12000. El resultado obtenido se muestra en la figura 20.



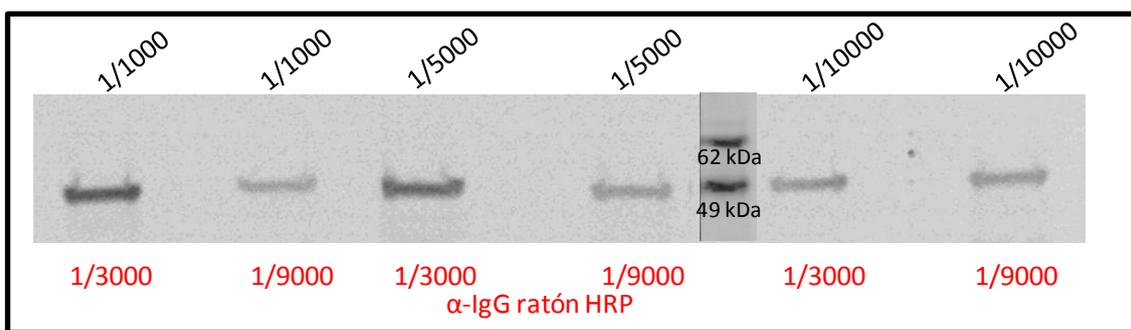
**Figura 20. Puesta a punto de la concentración de los anticuerpos anti-actina utilizados para la normalización de las muestras sembradas en la electroforesis.**

La figura corresponde al ensayo de western blot realizado para el revelado de actina. Se sembró una muestra (P53 salvaje) y se evaluaron dos concentraciones para el anticuerpo primario anti-actina de ratón monoclonal y tres concentraciones para el anticuerpo secundario anti-IgM de ratón conjugado a HRP. En cada carril se indican las concentraciones de cada uno de los anticuerpos en negro y rojo respectivamente. SDS-PAGE 12%.

Como se muestra en la figura 20, todas las diluciones de anticuerpos utilizadas permiten detectar a la proteína actina (PM aparente 42 kDa). En base a estos resultados, para nuestro estudio decidimos utilizar una concentración de 1/15000 para el anticuerpo primario, y una concentración de 1/3000 para el anticuerpo secundario, ya que permite una buena detección y un menor ruido de fondo.

Cabe destacar que en la electroforesis en matriz de poliacrilamida, se detectan dos bandas correspondientes a la proteína, una banda superior de PM esperado (42 kDa), y una banda de menor PM (aproximadamente 38 kDa), que podría corresponder a un producto de degradación de la actina.

Por otro lado, se ajustaron las concentraciones del anticuerpo utilizado para la detección de P53 en las muestras. Para esto se utilizó proteínas de levadura extraídas de un transformante de P53 salvaje de color blanco y se sembró 5 µg de proteína en cada carril. Se realizó el revelado del western blot utilizando 3 concentraciones de anticuerpo primario anti-P53 (DO-1) de ratón, 1/1000, 1/5000 y 1/10000, y 2 concentraciones de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, 1/3000 y 1/9000. El resultado obtenido se muestra en la figura 21.

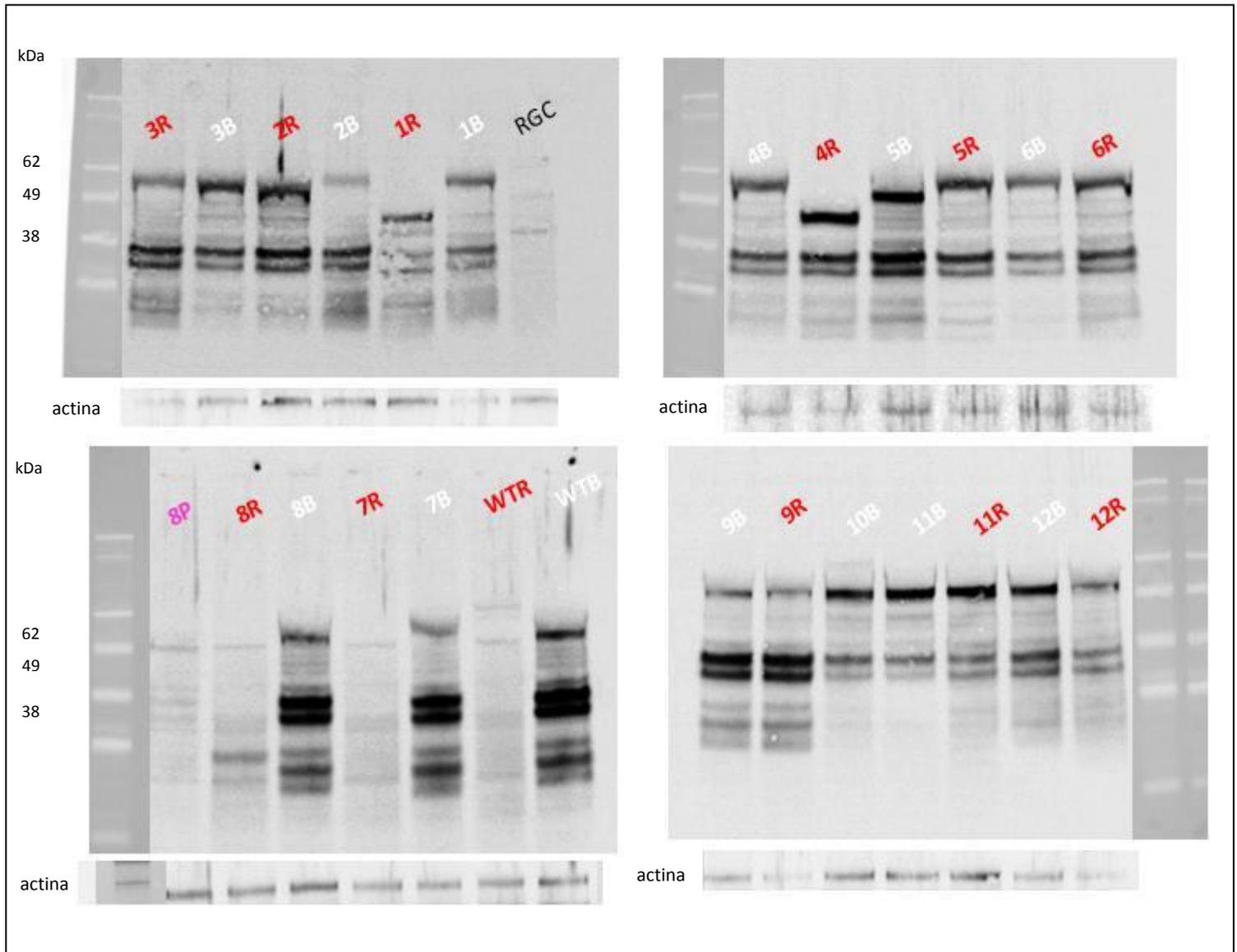


**Figura 21. Puesta a punto de la concentración de los anticuerpos utilizados para el revelado de P53 en levadura.** La figura corresponde al ensayo de western blot realizado para P53. Se sembró una única muestra (P53 salvaje) y se evaluaron tres concentraciones para el anticuerpo primario anti-P53 (DO-1) de ratón monoclonal y dos concentraciones para el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP. En cada carril se indican las concentraciones de cada uno de los anticuerpos en negro y rojo respectivamente. SDS-PAGE 12%.

Tal como puede verse en la figura 21, el revelado mostró la presencia de P53 como una única banda de peso molecular (PM) aparente de 53 kDa. En este caso para el estudio de la expresión de P53, se eligieron las siguientes diluciones de anticuerpos: 1/5000 para el anticuerpo primario DO-1 y 1/3000 para el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón.

- Análisis del nivel de expresión de P53:

El nivel de expresión de P53 en los mutantes sinónimos de prolina fue comparado mediante western blot utilizando las concentraciones óptimas determinadas para ambos anticuerpos (figura 22).



**Figura 22. Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de mutantes Pro, en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC.** Protocolo 1 de extracción de proteínas.

Western blot revelados con anticuerpos anti-P53. En cada carril se indica la muestra. P53 salvaje; colonia blanca (WTB) y colonia roja (WTR); mutante de P53 Pro1, colonia blanca (1B) y colonia roja (1R); Pro2, colonia blanca (2B) y colonia roja (2R); Pro3, colonia blanca (3B) y colonia roja (3R); Pro4, colonia blanca (4B) y colonia roja (4R); Pro5, colonia blanca (5B) y colonia roja (5R); Pro6, colonia blanca (6B) y colonia roja (6R); Pro7, colonia blanca (7B) y colonia roja (7R); Pro8, colonia blanca (8B) y colonia roja (8R); Pro9, colonia blanca (9B) y colonia roja (9R); Pro10, colonia blanca (10B); Pro11, colonia blanca (11B) y colonia roja (11R); Pro12, colonia blanca (12B) y colonia roja (12R). Debajo de cada gel se presenta el control de siembra realizado con la proteína actina. MPM: SeeBlue Plus2 Pre-stained Standar (Invitrogen). SDS-PAGE 12%.

Como se muestra en la figura 20, en la mayoría de las muestras se observa una banda de PM aparente aproximado a 53 kDa correspondiente a P53. Con respecto a la proteína salvaje, se detectó la expresión de P53 en colonias blancas, pero no en colonias rojas. En los mutantes de prolina pudo detectarse P53 en la gran mayoría de las muestras, excepto en las colonias rojas de los mutantes Pro7 y Pro8.

Las colonias rojas de los mutantes Pro 1 y Pro4 presentan formas abortivas de P53, tal como se mostró mediante western blot. Además mediante secuenciación de ADN, extraído de los mismos transformantes utilizados para las extracciones de proteína, pudo corroborarse que en esas colonias la secuencia de P53 presentaba un codón de terminación prematuro, causando de esta forma una producción abortiva de la proteína. La aparición de dicho codón stop seguramente se deba a la reacción de amplificación realizada previo al ensayo de FASAY.

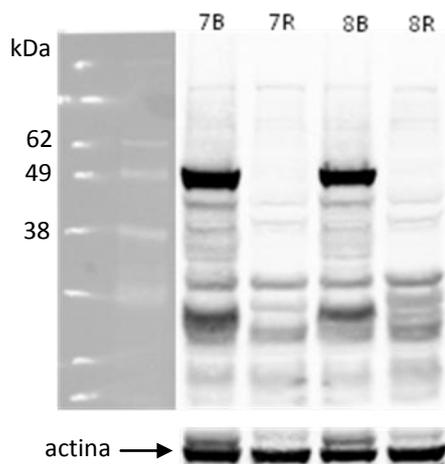
Del mutante Pro10 solamente pudo analizarse la expresión de P53 en colonias blancas, debido a que la transformación fue realizada una única vez y solamente dio colonias blancas (ver gráficos figura 8). Sin embargo como se discutió anteriormente estos ensayos presentan un gran margen de error, por lo cual sería necesario repetir el experimento para sacar una conclusión acerca de dicho mutante.

Para los mutantes Pro2, Pro3, Pro5, Pro6, Pro9, Pro11 y Pro12, se observó que no existen diferencias significativas en cuanto al nivel de expresión de P53 en colonias blancas y rojas. Las secuencias de P53 de todas las colonias fueron verificadas mediante secuenciación del ADN.

Cabe destacar que todas las muestras analizadas mediante este protocolo (protocolo 1), presentan además de la banda de mayor PM correspondiente a P53 completo, otras bandas de menor PM (entre 38 y 25 kDa) que son reconocidas igualmente por el anticuerpo utilizado. Dichas bandas podrían deberse a productos de degradación de P53, o también a formas abortivas de la traducción de la proteína, que contienen el extremo N-terminal, y por tanto son reconocidas por el anticuerpo DO-1.

Con el propósito de reducir la posible degradación de proteínas en la preparación de los extractos se procedió a poner a punto el protocolo de extracción de proteínas 2 (ver materiales y métodos). Este fue empleado para el tratamiento de las muestras Pro7 y Pro8, considerando la ausencia total o aparente de P53 en dichas colonias.

El resultado obtenido en el ensayo de western blot se muestra en la figura 23.



**Figura 23. Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de los mutantes Pro 7 y Pro8, en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC.**

Arriba: Western blot revelado con anticuerpo anti-P53. Se indica a que muestra corresponde cada uno de los carriles. Abajo: Control de siembra de proteínas totales mediante revelado del western blot con anticuerpo anti-actina.

Extracción de proteínas mediante protocolo 2. SDS-PAGE 12%.

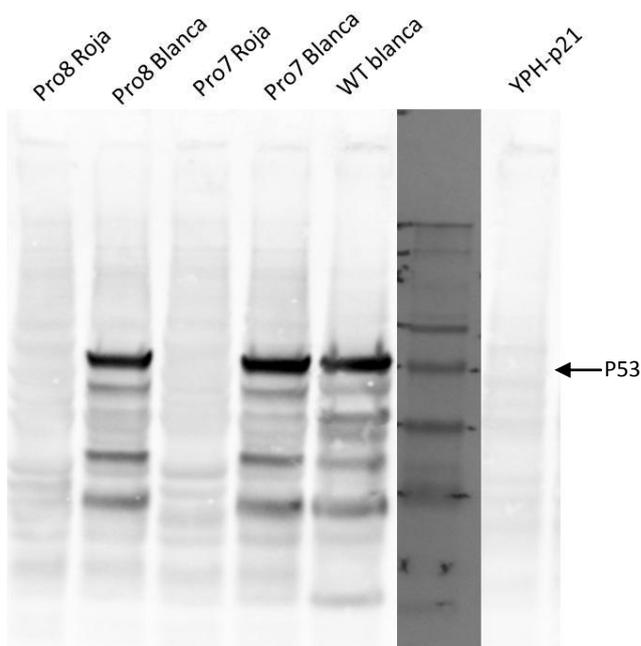
Tal como se muestra en la figura 23, este protocolo permite recuperar una mayor fracción de P53 completo, que el protocolo anterior. Se observa una banda predominante a la altura esperada para P53, en las muestras correspondientes a las colonias blancas de ambos mutantes. No se visualiza bandas en las muestras correspondientes a las colonias rojas. Esto indica que P53 no se está expresando o se expresa en cantidades indetectables, o está presente bajo una isoforma que no es posible detectar con el anticuerpo anti-p53 utilizando.

Para intentar comprender si P53 no puede detectarse en el ensayo de western blot, correspondiente a los mutantes Pro7 y Pro8 (figura 22 y 23), debido a que el anticuerpo utilizado no puede detectarlo (por ejemplo debido a que en las colonias rojas P53 no está completo), se procedió a realizar un nuevo ensayo de western blot utilizando otro anticuerpo anti-P53. Como se mencionó anteriormente el anticuerpo utilizado en primer lugar, DO-1, es monoclonal y presenta un epítipo entre los aminoácidos 11 y 25. En este ensayo se utilizó un anticuerpo policlonal que presenta

tres epítopes, en el extremo N-terminal, en el dominio de unión al ADN y otro en el extremo carboxilo terminal (ver materiales y métodos).

Se utilizaron en dicho ensayo las siguientes muestras: P53 salvaje colonia blanca, mutante Pro7 colonia blanca y roja y mutante Pro8 colonia blanca y roja. El anticuerpo utilizado fue anti-P53 policlonal SAPU (comercial).

A continuación en la figura 24 se muestra el resultado obtenido.



**Figura 24. Ensayo de Western Blot utilizando el anticuerpo anti-P53 SAPU.** Western blot realizado para las muestras: Pro8 colonia blanca, Pro8 colonia roja, Pro7 colonia blanca, Pro7 colonia roja y P53 salvaje colonia blanca. SDS-PAGE 12%.

La figura 24 corresponde al western blot revelado con un anticuerpo policlonal anti-P53 (SAPU). Puede observarse una banda del tamaño esperado para P53 en las colonias blancas de los mutantes Pro7 y Pro 8 y en la proteína salvaje, pero no se detectó en las colonias rojas. Este resultado sugiere que dichas colonias presentaban una coloración roja debido a que en las mismas hay un nivel de expresión de P53 muy bajo.

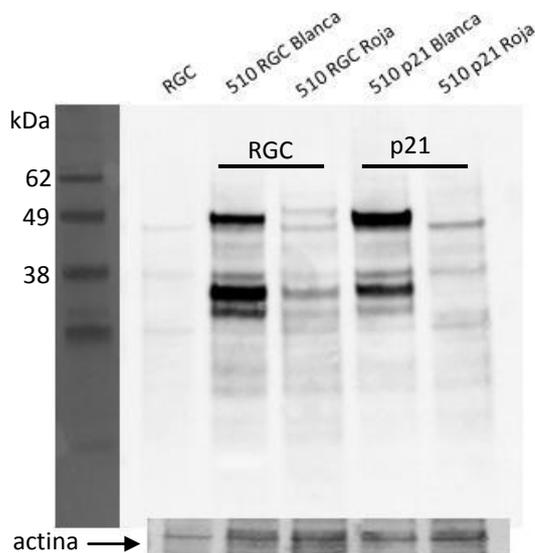
La coloración de dichas colonias podría deberse a una reversión del locus *leu2*, lo cual les permitiría, sin poseer el vector, crecer en un medio deficiente en leucina.

Es interesante destacar que el anticuerpo policlonal SAPU, permite detectar todas las isoformas de P53 según como se describe en P. Khoury, 2010. En la figura 24, la banda de mayor intensidad correspondería a la proteína completa de 53 kDa, la

siguiente en tamaño de un peso molecular aproximado de 47 kDa, podría corresponderse a las isoformas  $\Delta 40p53\alpha$  y  $p53\beta$ . A continuación puede detectarse una banda de un peso molecular aproximado de 42 kDa, la cual podría representar a las isoformas  $\Delta 40p53\beta$  y  $\Delta 40p53\gamma$ . Debajo de esta puede detectarse una banda de un peso molecular 35 kDa, que podría corresponderse con la isoforma  $\Delta 133p53\alpha$  y por último se visualiza una banda de peso molecular 29 kDa que podría estar representando las isoformas  $\Delta 133p53\beta$  y  $\Delta 133p53\gamma$ .

### → 6.32 Mutante IARC G510T

Al igual que para los mutantes de prolinas, para el mutante G510T se ensayaron dos protocolos de extracción de proteínas. Los resultados obtenidos en los ensayos de western blot para dicho mutante expresado en las cepas conteniendo los elementos de respuesta a P53 RGC y p21, mediante el protocolo de extracción 1, se muestran en la figura 25.

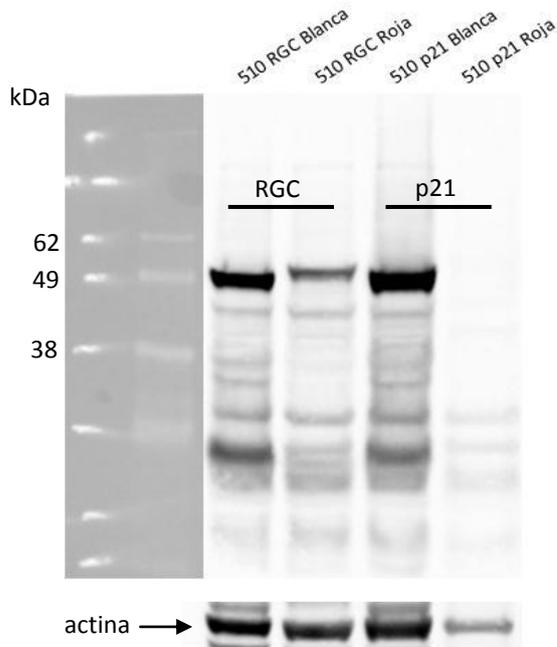


**Figura 25. Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas del mutante G510T, en las cepas conteniendo los elementos de respuesta RGC y p21.**

Arriba: Western blot revelado con anticuerpo anti-P53. Se indica a que muestra corresponde cada uno de los carriles. Abajo: Control de siembra de proteínas totales mediante revelado del western blot con anticuerpo anti-actina. Extracción de proteínas mediante protocolo 1. SDS-PAGE 12%.

Al igual que para algunos de los mutantes de prolinas, se observa una banda a la altura del tamaño esperado para P53, en ambas colonias blancas del mutante G510T, pero no en las colonias rojas. El control de actina muestra que se sembraron

cantidades similares de proteína en todos los casos. Para verificar este resultado por otro método, se realizaron nuevas extracciones de proteína utilizando esta vez el protocolo de extracción de proteínas 2.



**Figura 26. Evaluación de los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas del mutante G510T, en las cepas conteniendo los elementos de respuesta RGC y p21.**

Arriba: Western blot revelado con anticuerpo anti-P53. Se indica a que muestra corresponde cada uno de los carriles. Abajo: Control de siembra de proteínas totales mediante revelado del western blot con anticuerpo anti-actina.

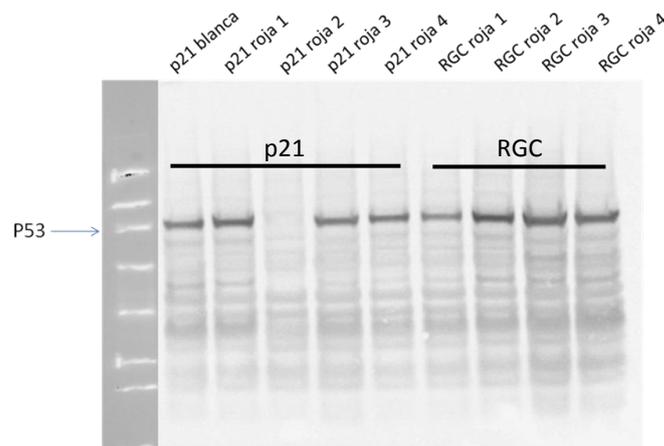
Extracción de proteínas mediante protocolo 2. SDS-PAGE 12%.

La figura muestra una banda correspondiente al PM esperado para P53 en las colonias blancas del mutante expresado en ambas cepas y también en la colonia roja del mutante expresado en la cepa conteniendo el elemento de respuesta RGC. Este resultado indica que el protocolo 2 permite retener y extraer mejor P53 que el protocolo 1.

Para el promotor RGC se observan diferencias en cuanto a la expresión de P53 entre colonias blancas y rojas. Sin embargo, no es posible concluir si ocurre lo mismo con el promotor p21, ya que las cantidades de proteína sembrada no son iguales.

- **6.33 Análisis de la presencia de P53 en colonias rojas producto de la transformación de levaduras con p414-P53 salvaje.**

Con el objetivo de evaluar la presencia de P53 en transformantes de color rojo (producto de la transformación de levaduras con el vector p414 conteniendo la secuencia salvaje de P53), se realizó la extracción de proteínas de 4 colonias rojas de cada cepa (YPH-RGC e YPH-p21) utilizando el protocolo 2. Como control positivo se realizó la extracción de proteínas de una colonia blanca procedente de la transformación en la cepa YPH-p21. Se realizó un western blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-P53 SAPU.



**Figura 27. Ensayo de Western Blot en colonias rojas producto de la transformación de levaduras con p414-P53 salvaje.** Detección de P53 en colonias rojas de levadura mediante western blot. Como control positivo se utilizó una extracción de proteína de una colonia blanca. SDS-PAGE 12%.

Tal como puede verse en la figura 27, en la mayoría de las colonias rojas y en la colonia blanca de ambas cepas se observa una banda de PM aproximado 53 kDa que se correspondería a P53 completo. Por lo cual podemos decir que en dichas colonias P53 estaba presente y por lo tanto dichos transformantes no se corresponden con mutantes producto de la reversión del locus *trp1*. Para la colonia roja número 3 extraída de la transformación de la cepa p21, no se detectó P53, por lo cual podemos pensar que en dicha colonia P53 no se expresó y por lo tanto la colonia presentaba una coloración roja debido a la presencia de la reversión del locus *trp1*.

Es importante señalar que este experimento fue realizado una única vez, por lo cual es necesario repetir la transformación de levaduras y la extracción de proteínas para poder confirmar estas observaciones.

Este experimento muestra que la presencia de colonias rojas en un ensayo de FASAY realizado con P53 salvaje, no se debe únicamente a la presencia de mutantes producto de errores en el proceso de amplificación o a mutantes producto de la reversión del locus de selección; sino que también por sí mismo P53 es capaz de perder total o parcialmente actividad de transcripción en los promotores estudiados.

✓ **Resumen: Evaluación de los niveles de expresión de P53**

En resumen, para evaluar los niveles de expresión de P53 en colonias rojas y blancas producto de la transformación de levaduras con los distintos mutantes sinónimos de prolina, se realizaron western blots. Para esto se ensayaron dos protocolos para la extracción proteica. El protocolo 2 resultó más afectivo ya que permite recuperar una mayor fracción de P53 en su forma completa de 53 kDa.

En las colonias rojas de P53 salvaje y algunos de los mutantes sinónimos analizados (G510T, Pro7 y Pro8) no se logró detectar P53 mediante western blot. Esto puede deberse a que en dichas colonias P53 no se estaba expresando o que el anticuerpo no lo detectó porque se está expresando bajo una isoforma que no contiene el epítipo del anticuerpo utilizado (aminoácidos 11-25). Para intentar comprender este fenómeno, se utilizó otro anticuerpo, llamado SAPU, el cual reconoce tres epítipes (dominio DBD y los extremos N-terminal y C-terminal), por lo cual permite reconocer todas las isoformas de P53. Se realizó un ensayo de western blot con las colonias blancas y rojas de los mutantes Pro7 y Pro8 y la proteína salvaje como control. Como puede verse en la figura 24, se obtuvo exactamente el mismo resultado que para el inmunoblot realizado con el anticuerpo DO-1. Por tanto, podemos decir que en dichas colonias P53 no se estaba expresando, o sus niveles estaban bajos por fuera del límite de detección del ensayo.

Algunos transformantes de coloración roja podrían presentar una reversión del locus de selección *leu2*, lo cual les permitiría crecer en un medio deficiente en leucina sin necesidad de haber incorporado el vector pSS16. Para explorar dicha hipótesis se

debería realizar un mínimo de dos pasajes de dichos transformantes en medio rico YPD y posteriormente un último pasaje en medio de selección DO-Leu. Los pasajes en medio rico YPD tienen como resultado la pérdida de los vectores de selección, por lo cual si las colonias tienen una reversión del locus seguirán siendo capaces de crecer en medio deficiente del aminoácido leucina.

En los mutantes de prolina Pro2, Pro3, Pro5, Pro6, Pro9 a Pro12, no se observan diferencias en cuanto al nivel de expresión de P53 en colonias blancas y rojas. Por tanto, podríamos decir que dichas mutaciones sinónimas no estarían afectando la traducción de la proteína, y tampoco la transcripción, ya que de lo contrario estaría afectando el nivel de ARNm que modificaría también el nivel de proteína.

En los mutantes de Pro1 y Pro4, para los cuales el western blot reveló una banda correspondiente a P53 pero no del tamaño esperado (de aproximadamente 45 kDa), mediante secuenciación pudo verificarse que en ambas secuencias había un codón stop prematuro. Esto lleva a la producción de una proteína abortiva, no funcional y genera colonias de color rojo. Este tipo de alteración de la secuencia puede haberse introducido durante la reacción de amplificación por PCR previo a la transformación de las levaduras.

Para evaluar si el elevado porcentaje de colonias rojas que se observan en los ensayos de FASAY con P53 salvaje se debe a errores en la reacción de amplificación, se realizó una transformación de levadura con el vector p414 conteniendo la secuencia salvaje de P53. El ensayo de FASAY dio como resultado un 0,5% de colonias rojas y un 95,5% de colonias blancas, el resultado del western blot, de proteínas extraídas de ocho colonias rojas, reveló la presencia de P53 en la mayoría de las colonias rojas. Así mismo, no se observaron diferencias en cuanto al nivel de expresión de P53 en dichas colonias.

Estos resultados son alentadores y permiten inferir que la coloración de dichas colonias podría deberse a un problema de conformación de la proteína; ya que por un lado al realizar la transformación con un vector ya estamos descartando errores introducidos durante la reacción de PCR y también mediante este último experimento descartamos la presencia de mutantes de reversión.

## 7 Discusión General y Conclusiones

En este trabajo nos propusimos evaluar el efecto de mutaciones sinónimas reportadas en cáncer en la funcionalidad de P53. Para ello como primera aproximación experimental se seleccionaron un total de 9 mutaciones sinónimas seleccionadas en la base de datos IARC teniendo en cuenta que estas presentaran un porcentaje de aparición de mayor o igual al 1% del total de mutaciones. Así mismo se seleccionaron 12 mutaciones sinónimas en una región rica en prolina comprendida entre los aminoácidos 151-152-153.

En la base de IARC estas prolinas aparecen mutadas y concentran 4,13% de las mutaciones reportadas. En este trabajo se estudiaron además combinaciones de estas mutaciones que nos parecen de interés. Esta región de prolinas forma parte de un dominio SH3 involucrado en la interacción con proteínas. Más aun, los residuos de prolina son interesantes en relación al plegamiento, ya que implican restricciones en el plegamiento de proteínas.

Para la elección de esta serie de 12 mutantes, se tuvieron en cuenta los estudios previos realizados en el laboratorio. Dichos estudios consistieron en generar mediante el uso de primers degenerados un mutante que contemple todas las variantes sinónimas de los tres codones de prolina. Posteriormente mediante la utilización del sistema FASAY se evaluó la actividad transcripcional de dicho mutante. Los ensayos en levaduras mostraron una disminución del 50% de la actividad transcripcional de P53 en los elementos de respuesta RGC y p21. Este resultado motivo el análisis de la secuencia codificante de Tp53 en colonias rojas presentes en dicha transformación de levaduras. Se analizaron mediante secuenciación de ADN más de 100 colonias, las cuales poseían una variante individual. Sin embargo no se logró detectar un mutante que solamente presentara cambios en los mencionados codones, sino que siempre existía un cambio adicional, el cual sería debido posiblemente a errores introducidos durante la reacción de amplificación por PCR. Por lo cual seleccionados las 12 variantes que se presentaban más frecuentemente.

Como primera aproximación al estudio del efecto de dichas variantes sinónimas se utilizó el sistema FASAY en levaduras ya existente. El cual permite evaluar si mutantes de P53 presentan alteraciones en la actividad transcripcional de la proteína. Se seleccionaron dos elementos de respuesta a P53 distintos con el fin de evaluar dos vías de señalización diferentes.

El ensayo de FASAY implica la utilización de un producto de PCR, por lo cual se utilizó una enzima taq polimerasa de alta fidelidad. Sin embargo, tal como pudo verse en este trabajo, se encontraron un elevado porcentaje de error (aproximadamente 7%) que parecería deberse a errores introducidos en este paso experimental. Por tanto, se testeó una segunda enzima taq polimerasa (*PfuI* de Fermentas), de forma de disminuir el ruido de fondo. De todas formas se obtuvieron porcentajes de error similares. Es importante destacar que el producto de amplificación fue secuenciado previo a la realización de la transformación de levaduras, con lo cual nos aseguramos que los errores de amplificación no se produjeron previo al ensayo de transformación.

Cuando el primer grupo de mutaciones seleccionadas de la base IARC fue analizado con el sistema FASAY en los promotores RGC y p21, la mayoría de las mutaciones no presentó diferencias significativas en el porcentaje de colonias rojas respecto a P53 salvaje (Ver tabla 4). Estos resultados son aún preliminares ya que algunos fueron realizados una única vez, y además, por la gran variación de porcentaje de colonias rojas encontrado entre dos experimentos. Podríamos decir que los resultados preliminares obtenidos en FASAY con esta serie de mutaciones muestra que no hay diferencias importantes en la actividad de transcripción de P53 en estos dos promotores, en la mayoría de las mutaciones. En tanto las mutaciones G510T y C678T de esta serie parecen afectar la transcripción de P53 en los dos promotores.

**Tabla 4.** Resumen de los resultados obtenidos de actividad transcripcional de P53 (FASAY) y evaluación del nivel de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de los mutantes sinónimos seleccionados en IARC.

P53	FASAY		WB
	RGC (% C.rojas)	p21 (%C.rojas)	RGC (col.blanca vs col.roja)
Salvaje	5,6	6,7	No se detectó expresión (col.roja)
<b>510 G&lt;T</b>	<b>10,8</b>	<b>8,8</b>	Expresión diferencial
516 T<G	9,4	9,8	No determinado
<b>C678T</b>	<b>13,7</b>	<b>11,5</b>	No determinado
732 C<A/735 C<T	8,7	7,1	No determinado
C741T	13,1	12,5	No determinado
C462T	8,9	8,4	No determinado
C732A	11,0	10,5	No determinado
C735T	6,3	5,9	No determinado
G744A	8,0	6,6	No determinado

En base a este resultado nos preguntamos si el nivel de expresión de P53 en el mutante G510T era el mismo o si la mutación lo había alterado respecto al de P53 salvaje. Para ello se evaluaron los niveles de expresión de P53 en colonias blancas y rojas del mutante G510T, por western blot, expresado en la cepa de levadura conteniendo el elemento de respuesta RGC. Los resultados obtenidos mostraron que en dicha cepa, el mutante de P53 (G510T) se detecta a un nivel más bajo que P53 salvaje (tabla 4). Así mismo gracias a la utilización de los dos protocolos de extracción proteínas observamos que existía una alteración de la solubilidad de P53 en las colonias rojas de dicho mutante. Por tanto planteamos evaluar los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa en levaduras. El estudio de la expresión de este mutante en el promotor p21, y del mutante C678T en los dos elementos de respuesta no permitieron concluir este punto.

#### Mutantes sinónimos de P53 en las prolinas 151-152-153.

El análisis comparativo de la actividad transcripcional muestra que la mayoría de las mutaciones analizadas presenta un aumento significativo del porcentaje de colonias rojas, a pesar del error importante que presenta este ensayo (ver tabla 5). Este resultado es preliminar ya que en el promotor p21 la actividad transcripcional fue

determinada por duplicado en los mutantes Pro1 a Pro6, mientras que los mutantes Pro7 a Pro12 fueron analizados una única vez. De todas maneras los resultados indican claramente una reducción de la actividad transcripcional de P53 portador de la mayoría de las mutaciones sinónimas de las prolinas, Pro1 a Pro 12 cuando activa la transcripción del promotor RGC en las levaduras.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados obtenidos de actividad transcripcional de P53 (FASAY) y evaluación del nivel de expresión de P53 en colonias rojas y blancas de los mutantes sinónimos seleccionados en la región de prolinas 151-152-153.

P53	FASAY		WB
	RGC (% C.rojas)	p21 (%C.rojas)	RGC (col.blanca vs col.roja)
Salvaje	10,5	6,66	No se detectó expresión (col.roja)
*Pro1	21,9	17,9	Codón stop prematuro
*Pro2	19,3	14,5	Expresión similar
*Pro3	16,5	13,6	Expresión similar
*Pro4	21,7	10,2	Codón stop prematuro
*Pro5	20,8	17,1	Expresión similar
*Pro6	21,9	18,9	Expresión similar
*Pro7	20,5	19,9	No se detectó expresión (col.roja)
*Pro8	26,0	23,9	No se detectó expresión (col.roja)
*Pro9	22,4	18,3	Expresión similar
*Pro10	15,3	13,7	Expresión similar
*Pro11	4,2	25,0	Expresión similar
*Pro12	24,8	21,3	Expresión similar

Para determinar si las mutaciones de prolinas habían afectado el nivel de expresión de P53, se realizaron western blots, a partir de extractos proteicos de colonias blancas y rojas de las cepas conteniendo los promotores p21 y RGC (tabla 5). El elevado porcentaje de colonias rojas en los mutantes Pro1 y Pro4 puede explicarse por haberse generado proteínas trunca fruto de la introducción accidental de un codón stop. Por tanto estas mutaciones habría que estudiarlas de nuevo, luego de corregir la secuencia en una nueva transformación de levaduras. En las colonias rojas de los mutantes Pro7 y Pro8, P53 no fue detectado, por tanto la reducción de la actividad transcripcional de P53 puede explicarse por un nivel insuficiente de esta proteína en las levaduras, ya sea por un aumento de la degradación del ARNm o de la proteína. Para los mutantes Pro2, Pro3, Pro5, Pro6, Pro9, Pro11 y Pro12, se observó

que no existen diferencias significativas en el nivel de expresión de P53 en colonias blancas y rojas. Las secuencias de P53 de todas las colonias fueron verificadas mediante secuenciación del ADN. Pensamos que sería de gran interés el estudio en profundidad de estas variantes sinónimas, con el fin de determinar si la pérdida parcial de actividad transcripcional podría deberse a alteraciones en la conformación de la proteína adaptada.

Durante el desarrollo de este trabajo fuimos capaces de evaluar el efecto de mutaciones sinónimas en la funcionalidad del factor supresor de tumores P53. Los ensayos de FASAY realizados en *S. cerevisiae* permiten realizar un screening de mutantes de forma de seleccionar algunas de interés para profundizar en su estudio. Así mismo como sistema experimental presenta la ventaja de ser relativamente sencillo, rápido y de bajo costo. Sin embargo presenta limitaciones en cuanto a la sensibilidad que presenta, por lo cual parecería no ser el más adecuado para el estudio de mutaciones sinónimas de forma individual. Para intentar reducir el ruido de fondo del ensayo planteamos la utilización de un método de FASAY “modificado”, que consistirá en la utilización del vector p414 de expresión en levaduras. Así mismo, debido al uso diferencial de codones entre levaduras y humanos, es necesario confirmar estos resultados en un modelo, por ejemplo, de cultivo celular en células de mamífero. Por esta razón sería de gran importancia evaluar aquellos mutantes para los cuales los ensayos de FASAY no hayan revelado una disminución de la actividad transcripcional en un modelo de células de mamífero.

Por otro lado, los resultados obtenidos en FASAY para P53 salvaje revelaron un porcentaje de colonias rojas elevado (entre un 5,5-7,0%). Este porcentaje en la bibliografía es atribuido normalmente a mutaciones introducidas durante las reacciones de amplificación por PCR, y es considerado como el ruido de fondo del ensayo.

Sin embargo, algunos autores han mostrado que P53 salvaje por sí mismo tiene la capacidad de formar agregados, provocando la pérdida de función. Esta capacidad de formar agregados podría explicar en parte la aparición de colonias rojas. Rigacci y colaboradores en el año 2008, mostraron que el dominio N-terminal de P53 es capaz

de formar agregados *in vitro*, cuando el mismo es sometido a condiciones de bajo pH. La formación de fibrillas de P53 llevaría a la adquisición de una nueva conformación de la proteína, causando una pérdida de la función de transactivación (Rigacci, Bucciantini et al. 2008).

Otra posible explicación a la aparición de colonias rojas en las transformaciones realizadas con la proteína salvaje, es la propia reversión del fenotipo *trp1*- de las cepas utilizadas, por los mecanismos de reparación del ADN de la levadura. El mecanismo de reversión ha sido ampliamente mostrado en levaduras. Fogel y colaboradores mostraron la reversión del locus *his3* (phosphoribosyl transferasa, primera enzima de la vía de síntesis de la histidina) en *S.cerevisiae* (Fogel, Lax et al. 1978). Otros autores mostraron también la reversión de mutaciones en el locus *trp1*, cuando al mismo se le han introducidos mutaciones puntuales o de pérdida de sentido (Strathern, Shafer et al. 1995) (Holbeck and Strathern 1997). Este hecho revela la gran fidelidad de los sistemas celulares de reparación de errores en el ADN.

El elevado porcentaje de colonias rojas y la variabilidad entre ensayos dificulta el estudio de la actividad de transcripción de P53 en este sistema. Por tanto, se consideró una estrategia alternativa. Para evaluar esta estrategia se realizó la transformación de levaduras con p414 conteniendo la secuencia salvaje de P53. Así se obtuvo un porcentaje de colonias rojas del 0,5%, francamente menor al obtenido mediante la metodología del “gap repair” (5-10%).

Con el propósito de evaluar el nivel de expresión de P53 en las colonias rojas producidas en estas nuevas condiciones, se repitió el mismo análisis de western blot. Los resultados mostraron la presencia de la proteína en la mayoría de las colonias rojas y en cantidades similares a la observada en colonias blancas de la misma placa. En una de las colonias no se observó expresión de P53, lo cual lleva a considerar la posibilidad de que la coloración de esa colonia se deba probablemente a la presencia de un mutante de reversión del locus de selección.

Por tanto podemos decir que la utilización de vectores en lugar de productos de PCR para la transformación de levaduras reduce drásticamente la introducción de

mutaciones azarosas debido a errores en la amplificación de ADN por PCR, por lo cual reduce de manera significativa el ruido de fondo en estos estudios.

Los resultados obtenidos son positivos y alentadores. Se avanzó en la puesta a punto del sistema FASAY y en cómo adaptarlo a través del uso del vector p414 para reducir el ruido de fondo que implica el método. Los resultados obtenidos mostraron la reducción de la actividad transcripcional en algunas mutaciones sinónimas de P53 en las levaduras sobre el promotor RGC, que no alteran el nivel de expresión de la proteína. Si estos resultados confirman, será una pregunta de interés entender a qué se debe esta alteración funcional.

En relación a la patología tumoral, es imperioso estudiar el efecto de estas mutaciones de P53 en células humanas y ver si también se afecta la actividad transcripcional en el promotor RGC. Para abordar este estudio, hemos conseguido un vector de expresión en células de mamífero que contiene el elemento de respuesta a P53 RGC controlando la expresión del gen reportero luciferasa. El uso de este vector permitirá evaluar los efectos de estas mutaciones sinónimas en la actividad de transcripción de P53.

Como se consideró inicialmente, las mutaciones sinónimas podrían afectar la conformación de las proteínas. Así podrían alterar por ejemplo interacciones específicas con el ADN o interacciones entre proteínas. Una interacción crucial en las vías mediadas por P53 es su interacción con Hdm2. Es un objetivo en la continuación de este trabajo realizar estudios de interacción proteica mediante BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) para el estudio de la reacción de oligomerización de P53, así como también en la interacción de P53 con su principal regulador negativo Mdm2. Asimismo se plantea analizar la interacción de P53 con el ADN mediante ChiP (Chromatin InmunoPrecipitation).

Consideramos que la realización de este trabajo permitió ajustar condiciones experimentales y a mejorar el sistema FASAY adaptándolo al estudio de mutaciones sinónimas de P53. Asimismo permitió detectar mutaciones sinónimas que de manera significativa afectan la actividad de transcripción en la levadura, sin afectar el nivel de

expresión. Estas mutaciones serán priorizadas para su estudio mayor profundidad en levaduras y en células humanas, contribuyendo a una mayor comprensión del efecto de mutaciones sinónimas en el factor supresor de tumores P53, en relación a la patología tumoral.

## 8 Bibliografía

Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**(4096): 223-230.

Angov, E. (2011). "Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins." Biotechnol J **6**(6): 650-659.

Benchimol, S., D. Pim and L. Crawford (1982). "Radioimmunoassay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines." EMBO J **1**(9): 1055-1062.

Cartegni, L., S. L. Chew and A. R. Krainer (2002). "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing." Nat Rev Genet **3**(4): 285-298.

Cortazzo, P., C. Cervenansky, M. Marin, C. Reiss, R. Ehrlich and A. Deana (2002). "Silent mutations affect in vivo protein folding in Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 537-541.

Craig, E. A., B. D. Gambill and R. J. Nelson (1993). "Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis." Microbiol Rev **57**(2): 402-414.

Crombie, T., J. P. Boyle, J. R. Coggins and A. J. Brown (1994). "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." Eur J Biochem **226**(2): 657-664.

Chamary, J. V., J. L. Parmley and L. D. Hurst (2006). "Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals." Nat Rev Genet **7**(2): 98-108.

Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations." Science **265**(5170): 346-355.

D'Souza, I., P. Poorkaj, M. Hong, D. Nochlin, V. M. Lee, T. D. Bird and G. D. Schellenberg (1999). "Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5598-5603.

Deuerling, E. and B. Bukau (2004). "Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol." Crit Rev Biochem Mol Biol **39**(5-6): 261-277.

Duan, J., M. S. Wainwright, J. M. Comeron, N. Saitou, A. R. Sanders, J. Gelernter and P. V. Gejman (2003). "Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor." Hum Mol Genet **12**(3): 205-216.

Duddy, P. M., A. M. Hanby, D. M. Barnes and R. S. Camplejohn (2000). "Improving the detection of p53 mutations in breast cancer by use of the FASAY, a functional assay." J Mol Diagn **2**(3): 139-144.

Ellis, R. J. and F. U. Hartl (1996). "Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function." FASEBJ **10**(1): 20-26.

Flaman, J. M., T. Frebourg, V. Moreau, F. Charbonnier, C. Martin, P. Chappuis, A. P. Sappino, I. M. Limacher, L. Bron, J. Benhattar and et al. (1995). "A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3963-3967.

Fogel, S., C. Lax and D. D. Hurst (1978). "Reversion at the His1 locus of yeast." Genetics **90**(3): 489-500.

Freed-Pastor, W. A. and C. Prives (2012). "Mutant p53: one name, many proteins." Genes Dev **26**(12): 1268-1286.

Gregersen, N., L. Bolund and P. Bross (2005). "Protein misfolding, aggregation, and degradation in disease." Mol Biotechnol **31**(2): 141-150.

Guimaraes, D. P. and P. Hainaut (2002). "TP53: a key gene in human cancer." Biochimie **84**(1): 83-93.

Hamzehloie, T., M. Mojarrad, M. Hasanzadeh Nazarabadi and S. Shekouhi (2012). "The role of tumor protein 53 mutations in common human cancers and targeting the murine double minute 2-p53 interaction for cancer therapy." Iran J Med Sci **37**(1): 3-8.

Hayashi, K. (1991). "PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA." PCR Methods Appl **1**(1): 34-38.

Holbeck, S. L. and J. N. Strathern (1997). "A role for REV3 in mutagenesis during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **147**(3): 1017-1024.

Hollstein, M. and P. Hainaut (2010). "Massively regulated genes: the example of TP53." J Pathol **220**(2): 164-173.

Inga, A., P. Monti, G. Fronza, T. Darden and M. A. Resnick (2001). "p53 mutants exhibiting enhanced transcriptional activation and altered promoter selectivity are revealed using a sensitive, yeast-based functional assay." Oncogene **20**(4): 501-513.

Ishioka, C., T. Frebourg, Y. X. Yan, M. Vidal, S. H. Friend, S. Schmidt and R. Iggo (1993). "Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast." Nat Genet **5**(2): 124-129.

Jha, S. and A. A. Komar (2011). "Birth, life and death of nascent polypeptide chains." Biotechnol J **6**(6): 623-640.

Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2008). "Structural biology of the tumor suppressor p53." Annu Rev Biochem **77**: 557-582.

Karch, C. M., M. Prudencio, D. D. Winkler, P. J. Hart and D. R. Borchelt (2009). "Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of familial ALS." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(19): 7774-7779.

Khoury, M. P. and J. C. Bourdon (2010). "The isoforms of the p53 protein." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(3): a000927.

Kimchi-Sarfaty, C., J. M. Oh, I. W. Kim, Z. E. Sauna, A. M. Calcagno, S. V. Ambudkar and M. M. Gottesman (2007). "A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity." Science **315**(5811): 525-528.

Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell **137**(4): 609-622.

Lamolle, G., M. Marin and F. Alvarez-Valin (2006). "Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers." Mutat Res **600**(1-2): 102-112.

Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-331.

Murphy, M. E. (2013). "The HSP70 family and cancer." Carcinogenesis **34**(6): 1181-1188.

Navon, A. and A. Ciechanover (2009). "The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting." J Biol Chem **284**(49): 33713-33718.

Novoa, E. M. and L. Ribas de Pouplana (2012). "Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes." Trends Genet **28**(11): 574-581.

Pei, D., Y. Zhang and J. Zheng (2012). "Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx." Oncotarget **3**(3): 228-235.

Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S. V. Tavtigian, P. Hainaut and M. Olivier (2007). "Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database." Hum Mutat **28**(6): 622-629.

Plotkin, J. B. and G. Kudla (2011). "Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias." Nat Rev Genet **12**(1): 32-42.

Rigacci, S., M. Bucciantini, A. Relini, A. Pesce, A. Gliozzi, A. Berti and M. Stefani (2008). "The (1-63) region of the p53 transactivation domain aggregates in vitro into cytotoxic amyloid assemblies." Biophys J **94**(9): 3635-3646.

Ritchie, D. B., M. J. Schellenberg and A. M. MacMillan (2009). "Spliceosome structure: piece by piece." Biochim Biophys Acta **1789**(9-10): 624-633.

Sakaguchi, K., S. Saito, Y. Higashimoto, S. Roy, C. W. Anderson and E. Appella (2000). "Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding." J Biol Chem **275**(13): 9278-9283.

Sauna, Z. E. and C. Kimchi-Sarfaty (2011). "Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease." Nat Rev Genet **12**(10): 683-691.

Scharer, E. and R. Iggo (1992). "Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast." Nucleic Acids Res **20**(7): 1539-1545.

Sikorski, R. S., W. A. Michaud, S. Tugendreich and P. Hieter (1995). "Allele shuffling: conjugational transfer, plasmid shuffling and suppressor analysis in *Saccharomyces cerevisiae*." Gene **155**(1): 51-59.

Smardova, J., J. Smarda and J. Koptikova (2005). "Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast." Differentiation **73**(6): 261-277.

Strathern, J. N., B. K. Shafer and C. B. McGill (1995). "DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair." Genetics **140**(3): 965-972.

Thanaraj, T. A. and P. Argos (1996). "Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization." Protein Sci **5**(8): 1594-1612.

Vabulas, R. M., S. Raychaudhuri, M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2010). "Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(12): a004390.

Van der Vorst, S., A. F. Dekairelle, B. Weynand, M. Hamoir and J. L. Gala (2012). "Assessment of p53 functional activity in tumor cells and histologically normal mucosa from patients with head and neck squamous cell carcinoma." Head Neck **34**(11): 1542-1550.

Voisset, C., S. J. Saupe and M. Blondel (2011). "The various facets of the protein-folding activity of the ribosome." Biotechnol J **6**(6): 668-673.

Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.

Wade, M., Y. C. Li and G. M. Wahl (2013). "MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy." Nat Rev Cancer **13**(2): 83-96.

Wang, B., Z. Xiao, H. L. Ko and E. C. Ren (2010). "The p53 response element and transcriptional repression." Cell Cycle **9**(5): 870-879.

Wu, X. M., J. G. Fu, W. Z. Ge, J. Y. Zhu, J. Y. Wang, W. Zhang, W. Qian and K. K. Huo (2007). "Screen p53 mutations in hepatocellular carcinoma by FASAY: a novel splicing mutation." J Zhejiang Univ Sci B **8**(2): 81-87.

Zalucki, Y. M. and M. P. Jennings (2007). "Experimental confirmation of a key role for non-optimal codons in protein export." Biochem Biophys Res Commun **355**(1): 143-148.

## 9 Anexos

**9.1 Cuantificación de proteínas.** Datos de absorbancia (600nm) y concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), para cada muestra (colonia blanca y roja) expresadas en YPH-RGC. Se muestra los valores de absorbancia a 600nm obtenido para cada una de las muestras por triplicado, así como también la concentración de proteínas calculada en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Muestra	Abs1 <sub>(600nm)</sub>	Abs2 <sub>(600nm)</sub>	Abs3 <sub>(600nm)</sub>	Abs <sub>(600nm)</sub> prom.	[Prot] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
RGC	0,020	0,020	0,019	0,020	0,120
WTB	0,030	0,033	0,026	0,030	0,160
WTR	0,022	0,020	0,014	0,019	0,101
G510T B	0,026	0,025	0,028	0,026	0,163
G510T R	0,030	0,033	0,032	0,032	0,194
Pro1 B	0,015	0,015	0,017	0,016	0,070
Pro1 R	0,015	0,009	0,013	0,012	0,056
Pro2 B	0,011	0,012	0,011	0,011	0,054
Pro2 R	0,014	0,018	0,014	0,015	0,065
Pro3 B	0,013	0,013	0,013	0,013	0,061
Pro3 R	0,012	0,012	0,015	0,013	0,056
Pro4 B	0,011	0,012	0,011	0,011	0,054
Pro4 R	0,029	0,033	0,029	0,030	0,145
Pro5 B	0,005	0,003	0,050	0,019	0,019
Pro5 R	0,029	0,020	0,024	0,024	0,114
Pro6 B	0,014	0,014	0,014	0,014	0,065
Pro6 R	0,028	0,017	0,019	0,021	0,105
Pro7 B	0,024	0,029	0,026	0,026	0,142
Pro7 R	0,065	0,063	0,060	0,063	0,339
Pro8 B	0,043	0,054	0,050	0,049	0,262
Pro8 R	0,028	0,028	0,032	0,029	0,159
Pro9 B	0,029	0,033	0,030	0,031	0,168
Pro9 R	0,094	0,083	0,088	0,088	0,478
Pro10 B	0,015	0,012	0,012	0,013	0,086
Pro11 B	0,009	0,014	0,012	0,012	0,076
Pro11 R	0,005	0,010	0,008	0,008	0,050
Pro12 B	0,005	0,009	0,005	0,006	0,042
Pro12 R	0,004	0,006	0,004	0,005	0,031

**9.21 Tablas de uso de codones en *Saccharomyces 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	

**9.22 Tablas de uso de codones en 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 RPSB. 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

### 9.3 Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de síntesis de mutantes sinónimos IARC y en la región rica en prolina 151-152-153:

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida, en la construcción de los mutantes sinónimos de P53 seleccionados a partir de su aparición en la base de datos IARC.

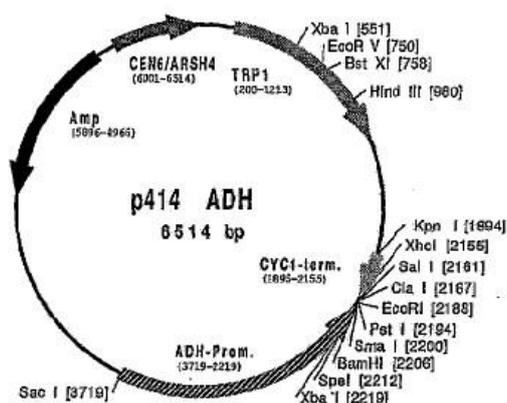
Mutación	Cebador Forward	Cebador Reverse
462C>T	5'-CCCCGCCCGGTACCCGCGTCC-3'	5'-GGACGCGGGTACCGGGCGGGG-3'
510G>T	5'GTCACAGCACATGACTGAGGTTGTGAGGCGC-3'	5'-GCGCCTCACAACCTCAGTCATGTGCTGTGAC-3'
516T>G	5'-ACATGACGGAGGTGGTGAGGCGCTGCC-3'	5'-GGCAGCGCCTCACCACCTCCGTCATGT-3'
678C>T	5'-CCGCTGAGGTTGGTTCTGACTGTACCAC-3'	5'-GTGGTACAGTCAGAACCAACCTCAGGCGG-3'
732C>A	5'-AGTTCCTGCATGGGAGGCATGAACCGGAG-3'	5'-CTCCGTTTCATGCCTCCCATGCAGGAACT-3'
732C>A/735C>T	5'-AGTTCCTGCATGGGAGGTATGAACCGGAGGCC-3'	5'-GGCCTCCGGTTCATACCTCCCATGCAGGAACT-3'
735C>T	5'-CCTGCATGGGCGGTATGAACCGGAGGC-3'	5'-GCCTCCGGTTCATACCGCCCATGCAGG-3'
741C>T	5'-GCATGGGCGGCATGAATCGGAGGCC-3'	5'-GGGCTCCGATTCATGCCGCCCATGC-3'
744G>A	5'-GCGGCATGAACCGAAGGCCATCCTCA-3'	5'-TGAGGATGGGCTTCGGTTCATGCCGC-3'

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida, en la construcción de los mutantes sinónimos de P53 seleccionados en la región rica en prolina 151-152-153.

Mutante	Cebador Forward	Cebador Reverse
Pro1	5'-TGATTCCACACCACCACCCGGCACCCGC-3'	5'-GCGGGTGCCGGGTGGTGGTGTGGAATCA-3'
Pro2	5'-ATTCCACACCTCCGCCGGGCACCCGCG-3'	5'-CGCGGGTGCCCGGGAGGTGTGGAAT-3'
Pro3	5'-CACCCCGCCAGGCACCCGCG-3'	5'-CGCGGGTGCTGGCGGGGGTG-3'
Pro4	5'-TGATTCCACACCGCTCCGGGCACCCGCGTCC-3'	5'-GGTTGATTCCACACCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGC-3'
Pro5	5'-TTCCACACCGCCGGGGCACCCGC-3'	5'-GCGGGTGCCCGGGCGGGTGTGGA-3'
Pro6	5'-GATTCCACACCTCCGCTGGCACCCGCGT-3'	5'-ACGCGGGTGCCAGGCGGAGGTGTGGAATC-3'
Pro7	5'-TTGATTCCACACCTCCTCCTGGCACCCGCGTCC-3'	5'-GGACGCGGGTGCCAGGAGGAGGTGTGGAATCAA-3'
Pro8	5'-TGATTCCACACCGCCACCCGGCACCCGC-3'	5'-GCGGGTGCCGGGTGGCGGTGTGGAATCA-3'
Pro9	5'-CCACACCCACCGGGCACCCGCG-3'	5'-CGCGGGTGCCCGGTGGGGGTGTGG-3'
Pro10 (Pro5+Pro9)	5'-CCACACCCACCGGGCACCCGCG-3'	5'-CGCGGGTGCCCGGTGGGGGTGTGG-3'
Pro11(Pro6+Pro9)	5'-CCACACCCACCGGGCACCCGCG-3'	5'-CGCGGGTGCCCGGTGGGGGTGTGG-3'
Pro12	5'-TGATTCCACACCGCTCCCGGCACCCGC-3'	5'-GCGGGTGCCGGGAGGCGGTGTGGAATCA-3'

#### 9.4 Vector de expresión en levaduras p414-ADH.

La secuencia codificante de P53 salvaje (1182 pb) fue clonada utilizando los sitios de restricción para las enzimas BamHI y EcoRI.



**Vector de expresión en levaduras p414-ADH.** Se muestra en la figura las características de dicho vector. AMP<sup>r</sup>; resistencia a ampicilina, gen de *-lactamasa*. ADH1 promoter; promotor de la enzima Alcohol Deshidrogenasa 1. 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. TRP1; gen *TRP1*, que codifica para la enzima phosphoribosyl-anthranilate isomerase.

#### 9.6 Medios de cultivo.

##### 9.51 Medio Luria Broth (LB)

Para un litro de medio:

10 gr. de triptona.

5 gr. de extracto de levadura.

10 gr. de cloruro de sodio.

Para medio sólido agregar 15 gr. de agar/litro de medio.

Esterilizar mediante autoclave. Antes de utilizar agregar resistencia adecuada.

#### 9.52 Medio Yeast-Peptone-Dextrose (YPD)

Para un litro:

5 gr. extracto de levadura.

20 gr. peptona

20 gr. glucosa.

Para medio sólido agregar 15 gr. de agar/litro de medio.

Esterilizar mediante autoclave.

#### 9.53 Medio Drop-out Leucine (DO-Leu)

Para un litro de medio:

0,69 gr. de mezcla de aminoácidos menos Leucina.

6,7 gr. de yeast-nitrogen-base (YNB) w/o aminoacid.

Para medio sólido agregar 15 gr. de agar/litro de medio.

Ajustar pH a 5,8 y esterilizar mediante autoclave. Antes de utilizar agregar 2% final de glucosa.

#### 9.54 Medio Drop-out Tryptophan (DO-Trp)

Para un litro de medio:

0,74 gr. de mezcla de aminoácidos menos Triptofano.

6,7 gr. de yeast-nitrogen-base (YNB) w/o aminoacid.

Para medio sólido agregar 15 gr. de agar/litro de medio.

Ajustar pH a 5,8 y esterilizar mediante autoclave. Antes de utilizar agregar 2% final de glucosa.

#### 9.55 Medio Mineral Mínimo (MML)

Para un litro de medio:

6,7 gr. de yeast-nitrogen-base (YNB) w/o aminoacid.

Para medio sólido agregar 15 gr. de agar/litro de medio.

Esterilizar mediante autoclave.

### **9.7 Cuantificaciones de cantidades relativas de P53 en colonias rojas y blancas de mutantes sinónimos en la región de prolinas 151-152-153.**

**Tabla. Cuantificaciones de las cantidades relativas de P53.** En la tabla se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación mediante western blot de las cantidades relativas de P53 en relación a las cantidades relativas de actina. Se muestran los resultados obtenidos para algunos de los mutantes en la región de prolinas 151-152-153.

<b>Muestra</b>	<b>Cuantificación (P53/actina)</b>
Pro2 blanca	0,1897
Pro2 roja	0,1360
Pro3 blanca	1,6122
Pro3 roja	1,5645
Pro5 blanca	0,1481
Pro5 roja	0,1996
Pro6 blanca	4,013
Pro6 roja	4,132
Pro 9 blanca	7,798
Pro 9 roja	8,266
Pro 11 blanca	7,9736
Pro 11 roja	6,8878
Pro 12 blanca	20,9114
Pro 12 roja	22,6767