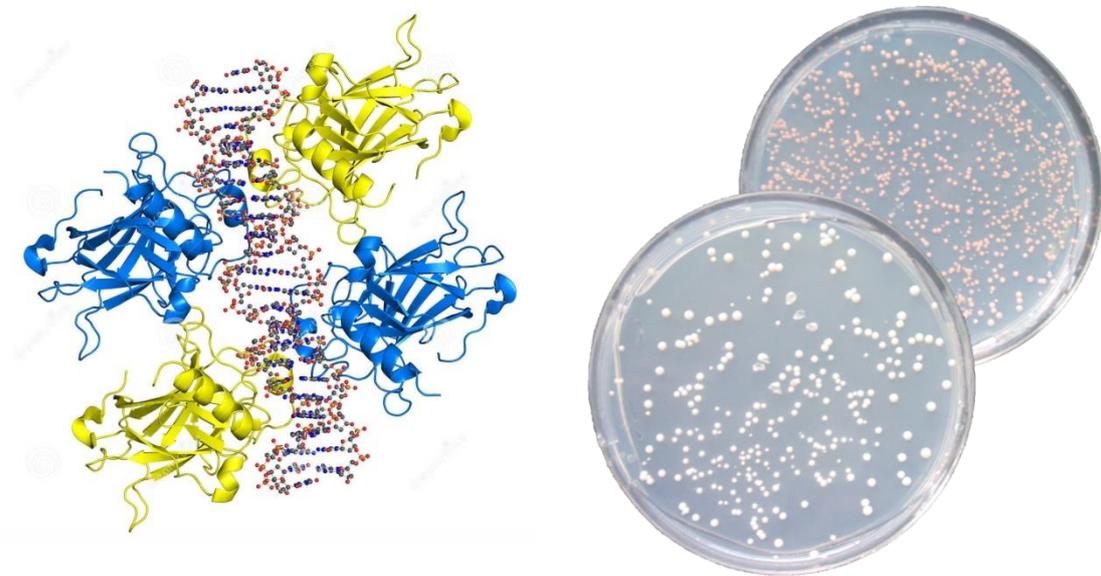


TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOLOGÍA MOLECULAR

“Clonado y evaluación de la funcionalidad de mutantes sinónimos de TP53 humano en *Saccharomyces cerevisiae*”



Bach. Danilo Segovia

Orientadora: Dra. Mónica Marín
Sección Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Udelar

Tribunal:
Dra. Cora Chalar,
Dr. Mario Señorale,
Dra. Mónica Marín

Febrero 2014

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Marín, por brindarme la posibilidad de realizar mi pasantía en su laboratorio, por las horas de discusión y por confiar en mí para la realización de este trabajo.

A la MSc. María José Lista, por compartir conmigo toda su experiencia en el mundo de la ciencia.

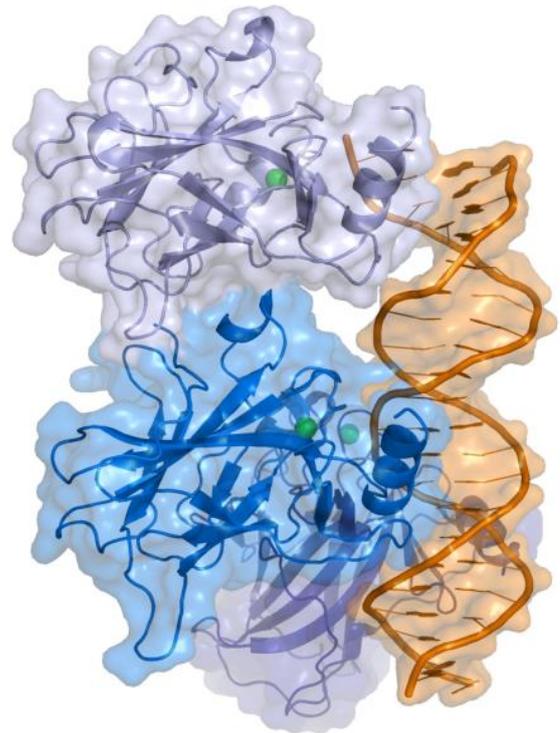
A los integrantes de la Sección Bioquímica y Biología Molecular, especialmente a los integrantes de la sala 305, por el constante intercambio de ideas, pensamientos e incontables momentos de diversión.

A mi familia y amigos, por todo su apoyo y por estar siempre ahí.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

- 2. **AGRADECIMIENTOS**
- 3. **ÍNDICE DE CONTENIDOS**
- 5. **RESUMEN**
- 7. **INTRODUCCIÓN**
- 7. **La proteína P53**
- 7. El gen TP53
- 8. Estructura de P53
- 12. Función de P53
- 15. Regulación de P53
- 16. **Mutaciones en TP53 y cáncer**
- 16. El rol de P53 en el cáncer
- 19. Efecto de las mutaciones en TP53
- 21. **Mutaciones silenciosas y P53**
- 21. Las mutaciones sinónimas
- 24. Mutaciones sinónimas en TP53 en cáncer
- 25. **Análisis funcional en levaduras**
- 25. El sistema FASAY
- 30. Antecedentes del grupo de investigación
- 34. **Objetivo general**
- 35. **Objetivos específicos**
- 36. **MATERIALES Y MÉTODOS**
- 36. **Materiales**
- 36. Plásmidos
- 38. Células
- 38. Marcadores de peso molecular
- 39. **Métodos**
- 39. Amplificación por PCR
- 40. Preparación de plásmidos
- 41. Digestión con enzimas de restricción



- 41. Electroforesis de ADN en geles de agarosa
- 42. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa
- 42. Ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos
- 42. Secuenciación de ADN
- 43. Transformación de levaduras
- 44. Extracción de proteínas de levadura
- 44. Electroforesis de proteínas
- 45. Western blotting
- 47. **RESULTADOS**
- 47. **Subclonado de secuencias codificantes de TP53 en p414ADH**
- 53. **Ensayo funcional en levadura**
- 56. **Análisis de la expresión de P53**
- 61. **DISCUSIÓN**
- 67. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- 72. **ANEXOS**
- 72. **Complemento de Materiales y Métodos**
- 72. Medios de cultivo
- 73. Transformación de levaduras y extracción de proteínas (soluciones)
- 74. Preparación de geles de poliacrilamida
- 75. **Análisis de densitometría**
- 77. **Abreviaciones utilizadas**

RESUMEN

El gen TP53 codifica en humanos para la proteína P53. Esta proteína juega un rol central en varios procesos celulares, siendo los más importantes su acción en el arresto del ciclo celular y su función como mediador de la apoptosis. En los últimos treinta años, P53 se ha convertido en uno de los supresores de tumores más estudiados, y ha sido llamado “guardián del genoma” por su capacidad de activarse frente a situaciones de daño en el ADN.

La acción principal de P53 se lleva a cabo a través de su actividad como regulador de la transcripción. De esta forma, P53 activa o reprime la transcripción de genes blanco, mediante la unión a sus elementos de respuesta.

La información disponible en la base de datos de mutaciones en TP53 de la IARC (International Agency for Research in Cancer), muestra que este gen se encuentra mutado en más del 50% de los cánceres. Alrededor del 90% de estas mutaciones son puntuales y la gran mayoría afecta al dominio de unión al ADN.

Entre las mutaciones que afectan al dominio de unión al ADN, cerca de un 5% corresponde a mutaciones sinónimas, es decir, que no ocasionan un cambio en el aminoácido codificado. Se ha mostrado que este porcentaje es claramente mayor al que se esperaría encontrar en condiciones de neutralidad. Por tanto, esta observación indicaría que mutaciones sinónimas en P53 en casos de cáncer podrían afectar la actividad normal de la proteína.

Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales las mutaciones sinónimas alterarían la función proteica. Entre ellos se destacan la posibilidad de afectar la estructura secundaria, vida media y el corte y empalme del ARN mensajero, así como la generación de cambios en el nivel de expresión, en la estructura tridimensional y en la solubilidad de la proteína.

Este trabajo busca establecer si la actividad transcripcional así como la expresión de P53 puede verse afectada por mutaciones sinónimas, ubicadas en el dominio de unión al ADN. Se analizaron 10 mutantes sinónimos de P53, que contienen variantes sinónimas de los codones de prolina 151, 152 y 153. Nuestro objetivo fue determinar si la sustitución de codones sinónimos que codifican prolinas en las mencionadas

posiciones altera la actividad transcripcional de P53, en comparación con la secuencia codificante salvaje.

La actividad transcripcional de mutantes de P53 puede ser analizada en células de levadura, utilizando el sistema FASAY (de Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast). En este sistema se evalúa la capacidad de los diferentes mutantes de P53 para activar la transcripción de un gen reportero. La expresión de este último se evidencia mediante un cambio de color en la levadura.

El sistema FASAY original implica la transformación de las levaduras con un plásmido lineal digerido con enzimas de restricción y un producto de PCR con la secuencia codificante de P53. Este sistema utiliza el aparato de recombinación homóloga de la levadura para generar plásmidos que expresen P53.

En trabajos previos, nuestro equipo de investigación evaluó la funcionalidad de mutantes sinónimos por este sistema. En el presente trabajo se utilizó una estrategia diferente, basada en el FASAY, que busca disminuir el porcentaje de error del sistema original. Con este fin, se procedió a clonar los mutantes de P53 en un vector de expresión de levadura, para evitar la utilización del sistema endógeno de recombinación homóloga de la levadura. Como ventaja, esta estrategia permite asegurar que la secuencia a analizar será la correcta en todas las colonias de levadura, luego de la transformación.

Los resultados obtenidos utilizando este nuevo sistema indican que el ruido de fondo del sistema FASAY se redujo fuertemente cuando se analiza la actividad transcripcional de P53 salvaje. Sin embargo, cuando se analizan los mutantes sinónimos de P53 no aparecen diferencias significativas en la capacidad de activar la transcripción del gen reportero, en comparación con la secuencia salvaje.

En conclusión, podemos decir que no se detectó un efecto de las mutaciones sinónimas analizadas en la actividad P53 en el sistema de estudio.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tuvo como eje central el análisis del efecto de mutaciones sinónimas en la funcionalidad de la proteína supresora de tumores P53. En las siguientes secciones se brinda un marco teórico que busca introducir al lector al vasto campo de estudio que es la investigación en P53 y al efecto de las mutaciones sinónimas en la expresión génica.

1. LA PROTEÍNA P53

P53 es uno de los supresores de tumores sobre los que se han realizado más investigaciones en los últimos 35 años. Desde su descubrimiento en el año 1979, de forma casi simultánea por tres grupos independientes^{1 2 3}, esta proteína ha cambiado dramáticamente nuestra visión del ciclo de vida de la célula y del cáncer como patología. En este tiempo, nuestro conocimiento sobre P53 se fue incrementando, pasando por momentos en los cuales se lo consideró un oncogén, para luego ser considerado como el supresor de tumores por excelencia y ser conocido por su acción pro-apoptótica frente a situaciones de estrés celular y daño en el ADN.

Hoy sabemos que la función más importante de P53 es la de regulación de la transcripción de un elevado número de genes, controlando procesos celulares que mantienen la homeostasis y la integridad del genoma de la célula. Si bien mucho se ha avanzado en la comprensión de su función, aún queda mucho camino por recorrer para entender todas las vías en las que se encuentra involucrado este “guardián del genoma”.

a. El gen TP53

La proteína P53 es codificada en humanos por el gen TP53. Este se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, más exactamente en la banda 17p13.1⁴ y está compuesto por 11 exones, interrumpidos por 10 intrones.

El primer exón es de gran tamaño, no es codificante y está localizado a una distancia de 8 - 10 kb del resto de los exones. Junto con la primera porción del exón 2, este exón comprende la región 5' UTR del ARNm de P53. La región 3' UTR está contenida en parte del exón 11 ⁵.

El promotor que controla la expresión de TP53 es relativamente débil y carece de TATA box, CAAT box y zonas ricas en GC, secuencias que son características de muchos promotores ⁶.

En su totalidad, TP53 ocupa unos 20 kb de ADN en el cromosoma y produce una proteína de 393 aminoácidos ⁵.

b. Estructura de P53

En su forma activa, P53 es una proteína tetramérica, compuesta por 4 monómeros idénticos de 393 residuos de aminoácido cada uno. Es una proteína capaz de unirse al ADN, con una estructura en dominios ⁷.

El nombre P53 hace referencia a la masa molecular observada de esta proteína cuando migra en un gel SDS-PAGE (53 kDa). Posteriormente se descubrió que esta masa se encuentra sobrestimada, ya que la masa molecular correcta de cada monómero es de 43.7 kDa ⁸. La migración más lenta de los monómeros de P53 es debida a la presencia de regiones ricas en prolina que atrasan la migración. Este fenómeno se ha observado también en otras proteínas ricas en prolina ⁹.

En la Figura 1 se muestra una representación de la estructura de los dominios de unión al ADN de cada monómero interaccionando con un sitio de unión, determinada por Malecka et. al, 2009 ¹⁰.

La información actual sobre la estructura tanto del tetrámero como del monómero de P53 proviene de datos obtenidos de estructuras resueltas de dominios individuales o de dominios interaccionando con proteínas y ADN. No ha sido posible aún obtener una estructura completa de la proteína. Esto se debe a la presencia de zonas con estructura muy flexible y poco definida en algunos de los dominios, que dificultan la determinación de la misma ¹¹.

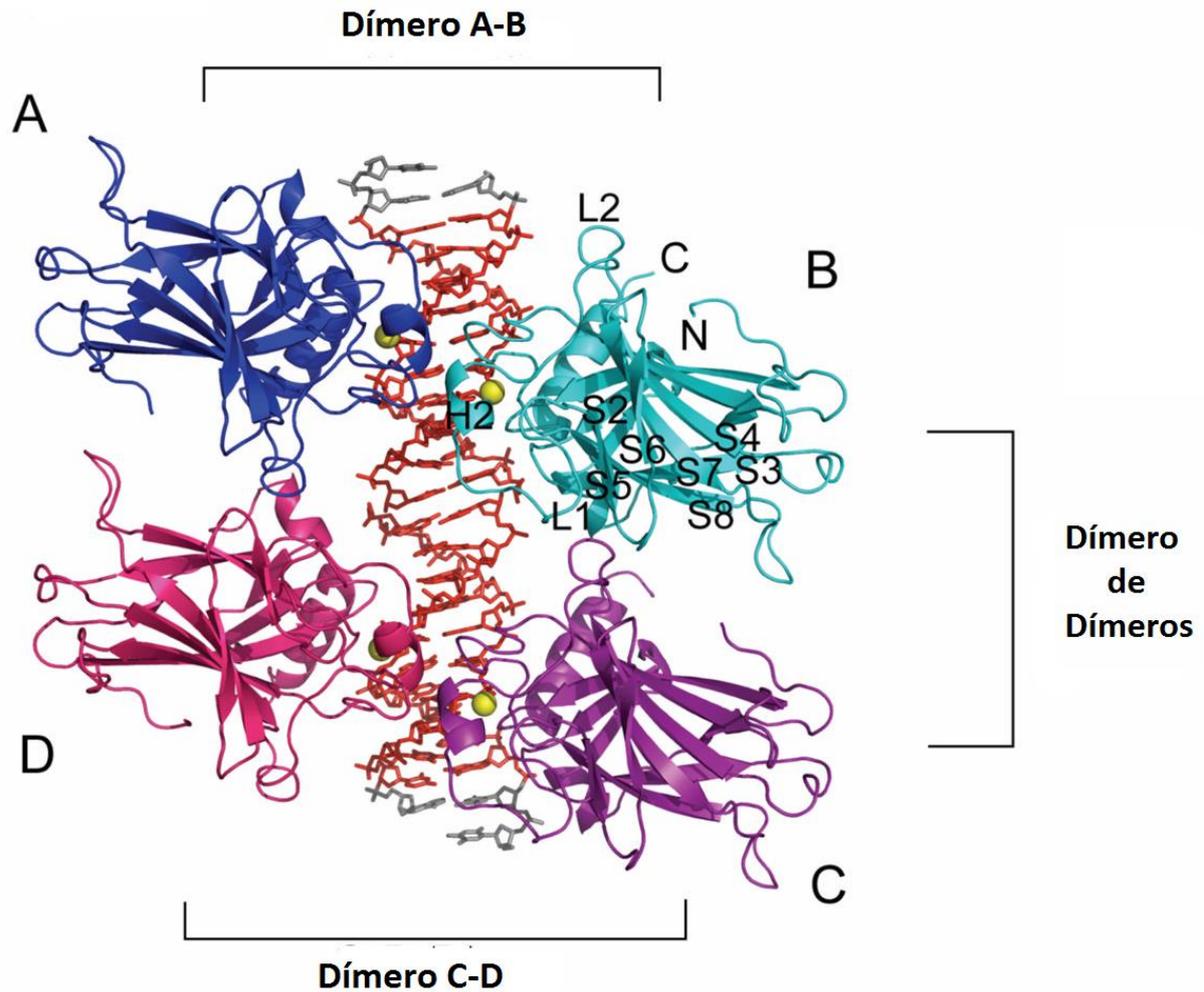


Figura 1. Estructura de los dominios de unión al ADN del tetrámero de P53 unidos a su secuencia consenso – Representación de la estructura cristalográfica de los cuatro dominios de unión al ADN del tetrámero de P53. A, B, C y D corresponden a los distintos monómeros. Los átomos de Zinc se ven en amarillo. En rojo se resaltan las bases del ADN correspondientes a la secuencia consenso del elemento de respuesta a P53. En el monómero B (cian) se señalan distintas estructuras secundarias del DBD (L: bucle, S: hebra β , H: hélice α) y los extremos carboxilo (C) y amino (N) terminales. Se destaca la formación del tetrámero por un “dímero de dímeros”. (Modificado de Malecka et al., 2009).

En la región amino terminal del monómero de P53 se encuentra el dominio de transactivación (TAD) y una región rica en prolina (PRR). La región central comprende el dominio de unión al ADN (DBD), el cual presenta un alto grado de plegamiento.

Finalmente, hacia el extremo carboxilo terminal, se encuentra otra región rica en prolina, un corto dominio de tetramerización (TET), y el dominio carboxilo terminal de regulación (CT). Estas regiones de P53 se esquematizan en la Figura 2.

El dominio DBD está implicado en la unión al ADN sitio específica. La estructura cristalográfica del DBD de P53 acomplejado con el ADN, resuelta por primera vez en 1994, mostró un dominio formado por una sandwich β , que sirve como andamiaje para dos grandes bucles y un motivo bucle-hoja-hélice ¹⁴. El sandwich β está formado por dos hojas β antiparalelas que se empaquetan una contra la otra. El motivo bucle-hoja-hélice se ancla en el surco mayor del ADN e incluye el bucle L1, las hebras β S2 y S2', partes de la hebra extendida S10 y la hélice carboxilo terminal (H2). La otra mitad de la superficie de unión al ADN está formada por dos largos bucles, L2 y L3, los cuales son estabilizados por un átomo de Zinc ⁷. En la Figura 3.a se muestran modelos estructurales de este dominio libre y unido al ADN.

En la zona comprendida entre el DBD y el TET, se encuentra una región de 33 aminoácidos, que si bien tradicionalmente no es llamada como zona rica en prolinas y carece de motivos PXXP, contiene 7 prolinas. La función principal de esta región sería acomodar las diferentes disposiciones espaciales del DBD y el TET en los tetrámeros unidos al ADN, además de su función como región espaciadora entre dominios ¹¹.

El dominio de tetramerización consiste en una corta hebra β y una hélice α , unidas por un giro, en una forma de "V". La estructura tetramérica de P53 puede describirse como un dímero de dímeros. Dos monómeros forman un dímero primario, en el cual las hojas β se posicionan de forma antiparalela y son estabilizadas por interacciones hidrofóbicas. Dos de estos dímeros se asocian a través de sus hélices para formar el tetrámero ^{7,11}. Un estudio de biogénesis de P53 *in vitro* mostró que la formación de los dímeros ocurre co traduccionalmente, mientras que los tetrámeros son formados post traduccionalmente mediante dimerización de dímeros en solución ¹⁵. En la Figura 3.b se observan dos representaciones de la estructura de cuatro dominios de tetramerización interaccionando.

El dominio CT se caracteriza por la abundancia de residuos de aminoácido básicos. Tiene una estructura desordenada, muy flexible conformacionalmente, si bien es capaz de adquirir estructuras ordenadas tras la unión a proteínas o la unión inespecífica al ADN. Se encuentra sujeto a extensivas modificaciones post traduccionales tales como acetilación, ubiquitinación, fosforilación, sumoilación, metilación y neddilación, que regulan la actividad y la cantidad de esta proteína en la célula ⁷.

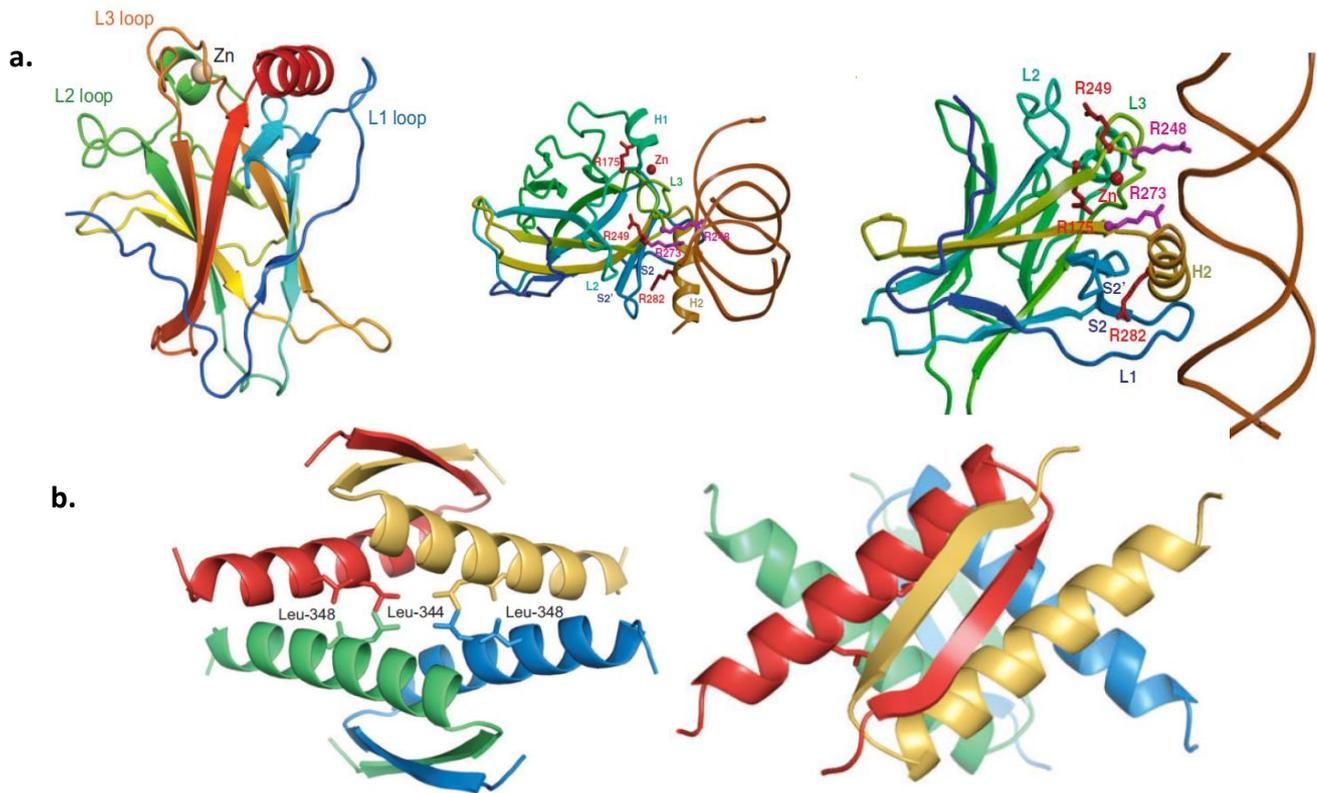


Figura 3. Dominio de unión al ADN y Dominio de Tetramerización – En a. se muestran tres estructuras del DBD. La estructura de la izquierda corresponde al DBD libre (se señalan los bucles L1, L2 y L3 y un átomo de Zinc) (Tomado de Joerger & Fehrst, 2008). Las estructuras del centro y de la derecha muestran la interacción con el ADN. Se señalan diferentes estructuras secundarias (H1, H2, S2, S2', L1, L2 y L3), el átomo de Zinc y aminoácidos que son comúnmente mutados en casos de cáncer (R175, R249, R273, R282). (Tomado de Stavridi et al., 2005). En b. se observan dos estructuras correspondientes a cuatro dominios de tetramerización interaccionando, vistas desde diferente orientación. Se señalan dos leucinas importantes para la interacción (Leu 348 y Leu 344). (Tomado de Joerger & Fehrst, 2008).

c. Función de P53

La función principal de P53 es la de regulación de la transcripción. Múltiples señales, como por ejemplo daño en el ADN y otras situaciones de estrés celular, llevan a la activación funcional de P53. Una vez activado, P53 puede unirse a sus elementos de respuesta en el ADN y activar o reprimir la expresión de numerosos genes blanco.

El elemento de respuesta para la unión específica de P53 en el ADN se caracteriza por la presencia de dos secuencias pentaméricas invertidas, generalmente encontradas en tandem y separadas por 0 – 13 pb. La secuencia consenso para este elemento fue definida en 1992 por el-Deiry et al, y es la siguiente: 5' PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy 3', donde Pu y Py son purinas y pirimidinas respectivamente ¹⁶. Sin embargo, también se han encontrado otras secuencias de unión específica para esta proteína que se alejan

de este consenso. El elemento de respuesta a P53 puede estar localizado tanto en el promotor como en secuencias no codificantes del gen blanco ¹⁷.

La activación de la transcripción mediada por P53 involucra varias interacciones con proteínas. Por un lado, se ha evidenciado el rol de reclutamiento de remodeladores de la cromatina y acetilasas de histonas (en un caso también metiltransferasas) dependiente de P53. Además, P53 ha mostrado facilitar la formación del complejo de pre iniciación de la transcripción a través de interacciones directas con el complejo mediador ¹⁸. Entre las proteínas vinculadas a la activación de la transcripción mediada por P53 se destacan p300 y CBP (CREB Binding Protein) ¹⁹. Ejemplos de genes activados por P53 son BAX, PUMA, pertenecientes a la vía de inducción de la apoptosis, MDM2 en la vía de control de P53 (retroalimentación negativa) y p21, vinculado a la detención del ciclo celular, entre muchos otros ²⁰.

La represión de la transcripción mediada por P53 puede ocurrir por una variedad de mecanismos. En algunos casos P53 actúa como un competidor por sitios en el ADN, impidiendo que factores de transcripción específicos de determinados genes se puedan unir a los promotores que activan. Por otro lado, P53 también es capaz de reclutar modificadores de la cromatina y complejos represores hacia su punto de unión. Otro mecanismo es por el secuestro de factores de transcripción, mediante interacciones proteína-proteína. A su vez, P53 puede reprimir la expresión de genes de forma indirecta, activando la expresión de genes que resultan en el silenciamiento de otros. Finalmente, en los últimos años se han identificado vías de represión mediadas por ARNs no codificantes, como micro ARNs y ARNs largos no codificantes ²¹. Ejemplos de genes que son reprimidos por P53 son el gen de survivina, en la vía de la apoptosis y el gen c-myc en la vía de supresión del crecimiento, entre otros ²⁰.

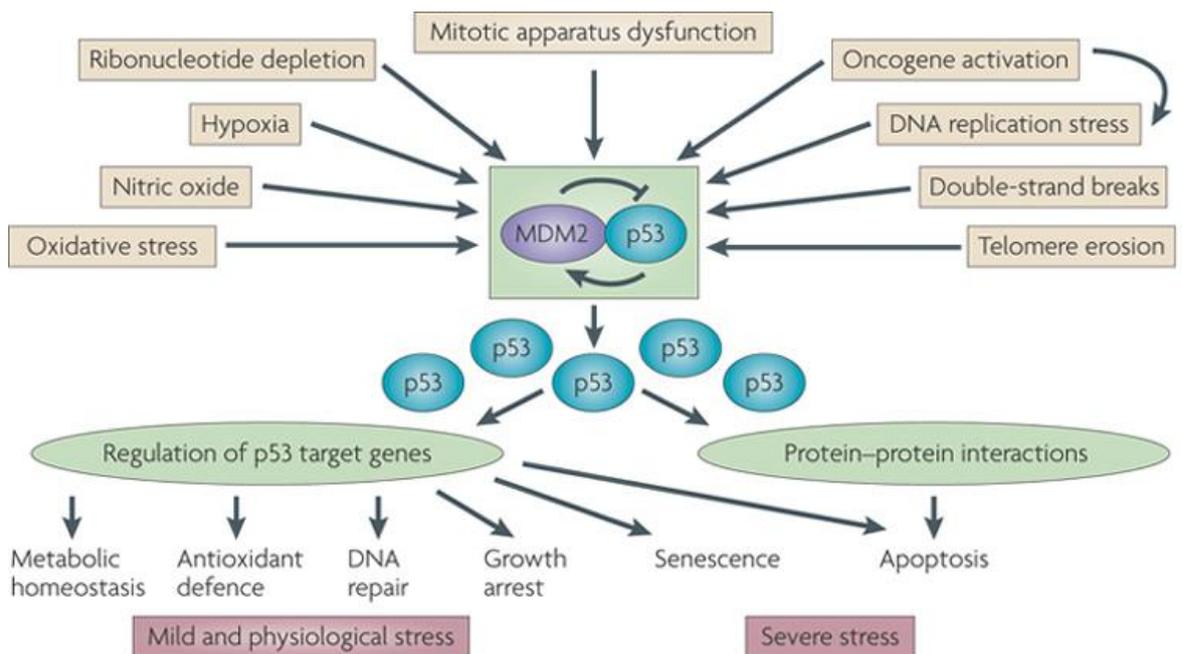
La proteína P53 ha sido implicada en una variedad de vías que tienen un efecto anti proliferativo, cada una de las cuales, bajo circunstancias apropiadas, contribuye a su propiedad de supresor de tumores. Por ejemplo, en respuesta a daño en el ADN, P53 activa la expresión del gen p21, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, que ocasiona el arresto en el ciclo celular en el punto de control G1/S. De esta forma, P53 impide que el daño al ADN sea transmitido a células hijas y brinda el tiempo necesario para su reparación. Asimismo, P53 también promueve la senescencia celular, una forma de arresto permanente del ciclo celular que puede ser inducida por varios

factores, como telómeros no funcionales y perturbaciones en la organización de la cromatina, entre otros. Otro proceso en el que P53 juega un rol importante es en la modulación de la autofagia, proceso mediante el cual la célula degrada sus propios componentes. Finalmente, la función más conocida de P53 es su función pro apoptótica. Varios genes regulados por P53 están vinculados a la inducción de la apoptosis, como BAX, PIG-3, Killer, CD95, P53AID1, Perp y PUMA. Muchos de estos pertenecen a la familia Bcl-2 de genes pro apoptóticos²².

Más recientemente, se ha observado que P53 también controla genes relacionados a otras vías celulares. Entre estas se destacan la vía de regulación del metabolismo de la glucosa, (no solo bajo estrés nutricional, sino también en condiciones normales de crecimiento), vías de generación y eliminación de especies reactivas del oxígeno y procesos como la longevidad y el envejecimiento. Estos descubrimientos muestran que P53 tiene funciones a lo largo de toda la vida celular, pudiendo llevar tanto a la supervivencia como a la muerte celular, dependiendo de la circunstancia en que se encuentre la célula²³.

La actividad bioquímica de P53 no se limita a su acción como regulador de la transcripción. Se ha reportado, por ejemplo, que P53 es capaz de inhibir la replicación del ADN *in vitro*, en una forma dependiente de la unión al ADN. Se piensa que esta actividad estaría mediada por su capacidad de modular la estructura del ADN²⁴. Es posible entonces que P53 funcione directamente en la transcripción como en la replicación del ADN en su rol en la detención del crecimiento. Una constatación que sugiere el rol de P53 en la replicación del ADN es la presencia de sitios de unión al ADN para P53 cercanos a orígenes de replicación putativos, tanto virales como celulares²⁴.

Finalmente, P53 también ha mostrado tener actividad fuera del núcleo de la célula, como en la vía de desencadenamiento de la apoptosis independiente de la activación transcripcional. En esta vía, P53 interactúa con las proteínas de la familia Bcl-2 induciendo permeabilización de la membrana mitocondrial, como parte de la vía intrínseca de la apoptosis. Un posible rol de P53 en la homeostasis mitocondrial también está siendo estudiado²⁵. En la Figura 4 se esquematiza la actividad de P53 frente a diferentes situaciones de estrés.



Nature Reviews | Cancer

Figura 4. Función de P53 – Se esquematiza la activación de P53 frente a diferentes situaciones de estrés celular. Estos estímulos causan un aumento en el nivel de P53 en la célula, lo que lleva a la regulación de los genes blanco de P53 y a su interacción con proteínas, que se traducen en diferentes respuestas dependiendo del nivel de estrés celular. (Tomado de Oren & Levine, 2009).

d. Regulación de P53

La regulación de la respuesta al estrés mediada por P53 es muy importante, ya que niveles muy altos de P53 pueden resultar letales para la célula, mientras que su ausencia permite la oncogénesis. Los principales reguladores negativos de P53 son dos proteínas, llamadas MDM2 y MDMX o MDM4.

MDM2 (llamada HDM2 en humanos), es una E3 ubiquitina ligasa que se une a P53 en el dominio de transactivación y ubiquitina a P53, marcándolo para la degradación proteosomal. MDMX (HDMX en humanos) es una proteína de alta homología estructural con MDM2, que también se une al dominio de transactivación de P53. Esta proteína carece de actividad ubiquitina ligasa, pero inhibe la actividad de P53 mediante el bloqueo estérico de este dominio²⁶.

Un ejemplo de una vía de regulación de P53 por estas proteínas es la respuesta a la radiación ionizante. En una situación de homeostasis, P53 es mantenida en niveles indetectables en la célula por acción de MDM2 y MDMX. Frente a una situación de

estrés por radiación ionizante, se activa la quinasa ATM, que fosforila a P53 en su región amino terminal. Esta fosforilación disminuye la afinidad de MDM2 y MDMX por P53, lo que ocasiona una acumulación de P53 y a su vez estabiliza y activa a esta última, permitiendo entonces su actividad transcripcional. ATM también fosforila a MDM2 y MDMX en sus extremos carboxilo terminal, lo que lleva a la degradación de estas proteínas. En las células que sobreviven a la respuesta al estrés mediada por P53, pronto se recuperan los niveles celulares de MDM2, ya que este gen es activado por P53. De esta forma se evita una respuesta exagerada al estrés que llevaría a la muerte de la célula. A diferencia de MDM2, MDMX no es un gen regulado transcripcionalmente por P53²⁷.

La regulación de P53 también ocurre a nivel transcripcional. En los últimos 10 años se han descrito más de 10 isoformas de P53, las que han demostrado tener un rol importante en la modulación de la actividad de P53. La mayoría de las isoformas comparten el dominio de unión al ADN de P53 completo, pero difieren en su extremo amino y carboxilo terminal. Las isoformas de P53 son generadas por corte y empalme alternativo del ARNm, la presencia de sitios de inicio de la traducción alternativos y por la transcripción a partir de un promotor alternativo. Algunas isoformas presentan actividad transcripcional y se han encontrado expresadas diferencialmente en una forma tejido dependiente²⁸.

Finalmente, la actividad de P53 se encuentra altamente regulada por medio de modificaciones post traduccionales, como ya se ha mencionado en este trabajo. Estas modulan su conformación, su localización, su interacción con proteínas y con elementos de respuesta⁷.

2. MUTACIONES EN TP53 Y CÁNCER

a. El rol de P53 en el cáncer

El cáncer puede definirse como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de un grupo de células malignas con crecimiento descontrolado y capacidad de invasión de tejidos normalmente reservados para otras células. El desarrollo de esta patología puede comenzar en una sola célula, que debido a alguna alteración genética

o epigenética, adquiere la capacidad de dividirse sin control, la cual puede ser transmitida a su descendencia ²⁹. Según los datos de la OMS, se estima que en 2030 unos 11 millones de personas morirán de cáncer en el mundo.

La proteína P53 ha sido relacionada a esta patología desde su descubrimiento. A mediados de la década de los 80' fue clonado el gen TP53 a partir de células tumorales y de células normales. El estudio de la actividad de tales clones, llevó a varios grupos de investigación a proponer que P53 era un oncogén. Sin embargo, varios trabajos realizados a finales de esa década ayudaron a evidenciar que P53 era en realidad un supresor de tumores, y que las propiedades oncogénicas de algunos de los clones se debían a que se trataba de mutantes de P53 ⁸.

Una de las primeras observaciones que se hicieron sobre P53, fue la detección de esta proteína mediante inmunohistoquímica en tejidos tumorales. Mientras que en tejidos normales P53 es indetectable por esta técnica, se observaban cantidades importantes de P53 en carcinomas. Esto se explica por la presencia de mutantes de P53 en los tejidos tumorales. Estos mutantes de P53 a menudo son más estables que la proteína salvaje y se acumulan en la célula ³⁰.

Otro de los descubrimientos que asociaban a P53 con el cáncer fue la detección de mutaciones de línea germinal en P53, en pacientes con el síndrome de Li Fraumeni. Este síndrome fue descubierto en 1969, cuando Li y Fraumeni evaluaron un gran número de familias con ocurrencia temprana de diferentes tipos de tumores. Este síndrome parecía ser hereditario de forma autosómica y se caracterizaba por la aparición de distintos tipos de cáncer a edades menores a los 45 años en varios miembros de una familia. Estudios moleculares posteriores indicaron que mutaciones de línea germinal en TP53 son frecuentes en el síndrome de Li Fraumeni, si bien no todos los casos se deben a mutaciones en este gen ³¹.

A su vez, experimentos realizados con ratones defectivos en P53, mostraron que estos presentaban un desarrollo embrionario normal, pero eran altamente susceptibles al desarrollo de tumores a edades tempranas, tanto de forma espontánea, como frente a carcinógenos ³². Por otro lado, la expresión de P53 salvaje mostró su capacidad de inhibir el crecimiento de tumores cuando es transfectada en líneas celulares tumorales humanas ³³.

Una vez que se conoce la actividad principal de P53 a nivel bioquímico y celular, es clara la implicación de esta proteína en el cáncer. A través de la activación de la transcripción, P53 detiene el crecimiento de las células frente a daño en el ADN, desencadenando apoptosis en casos en los que el daño celular o genómico es irreparable. En el caso de los ratones defectivos para P53, por citar un ejemplo, el desarrollo embrionario transcurre de forma normal, porque su ADN está inicialmente intacto. Sin embargo, en ausencia de P53 y al ser expuestos a agentes que dañan el ADN, comienzan a acumular lesiones genéticas, que conducen a la oncogénesis³⁴.

El rol antiproliferativo de P53 en respuesta a varios tipos de estrés lo convierte entonces en un blanco primario para la inactivación en cáncer. Datos provenientes de la base de datos de mutaciones en P53 de la IARC (International Agency for Research in Cancer), muestran que el gen TP53 se encuentra mutado en alrededor del 50% de los cánceres. Esto lo convierte en el gen más mutado en los casos de cáncer. La gran mayoría de estas mutaciones son puntuales, a diferencia lo que ocurre en otros genes supresores de tumores, en los que los tipos de mutaciones más comunes son deleciones, cambios de marco de lectura y mutaciones sin sentido. La mayoría de las mutaciones en TP53 se localizan en el dominio de unión al ADN y son de cambio de aminoácido.

En la Figura 5 se muestra una representación gráfica de la distribución en codones de las mutaciones puntuales de P53, encontradas en cáncer. Se evidencia la presencia de hot spots mutacionales, codones con una alta frecuencia de mutación en comparación con el resto, en las posiciones 175, 245, 248, 249, 273, y 282^{35, 36}.

Se ha propuesto que P53 se encontraría afectado en todos los casos de cáncer, ya que en aquellos casos en los que no está mutado, su actividad podría verse atenuada por varios mecanismos adicionales³⁷. Por ejemplo, muchos virus ADN tumorales codifican proteínas que se unen e inactivan a P53, como el antígeno T grande de SV40, la proteína E6 del virus del papiloma humano y la proteína de 55 kDa E1B de adenovirus. Otro mecanismo por el cual P53 puede volverse inactiva en tumores es por la sobreexpresión o activación de los reguladores negativos MDM2 y MDMX³⁷.

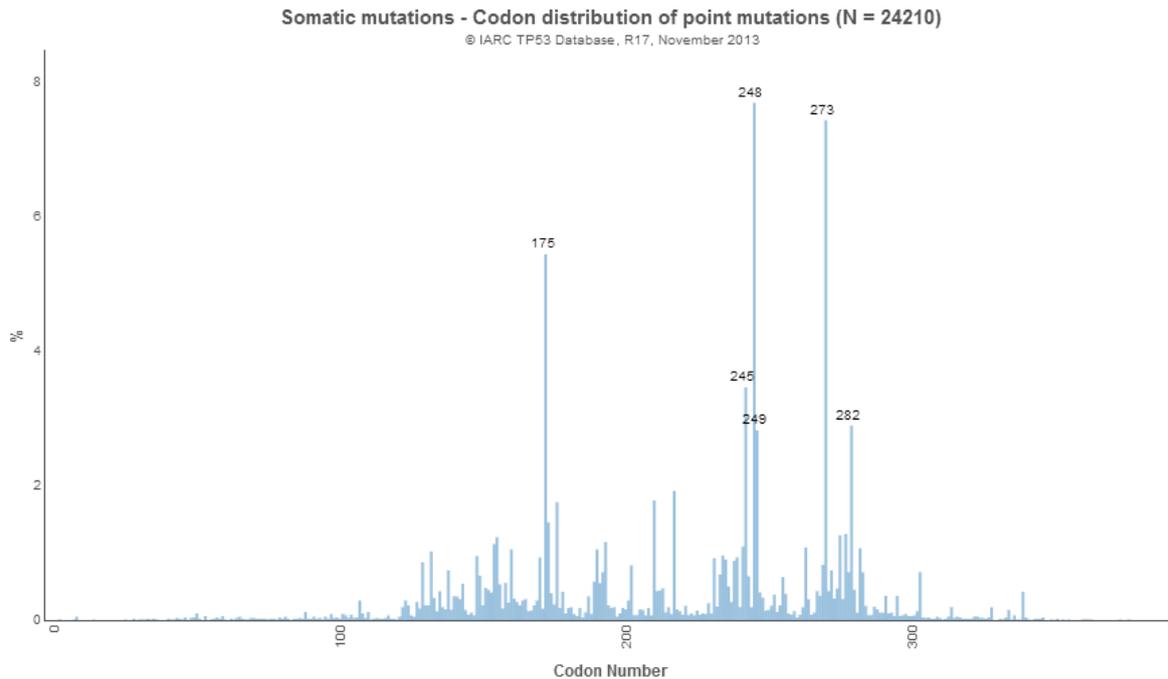


Figura 5. Distribución de la frecuencia de mutación en los codones de P53 – Se grafica la frecuencia de mutación en función de la posición del codón en la estructura primaria de P53 (tomado de p53.iarc.fr).

b. Efecto de las mutaciones en TP53

Los mutantes de P53 que se han detectado en el cáncer tradicionalmente se clasifican en dos categorías principales. Los de clase I son aquellos que implican la sustitución de residuos de aminoácido que contactan directamente con el ADN (posiciones 248, 273). En los de clase II se suelen ver afectados residuos importantes para estabilizar la estructura nativa del dominio de unión al ADN (posiciones 175, 249 y 282). Las proteínas codificadas por los mutantes de clase I suelen tener un plegamiento nativo, mientras que las de clase II son incapaces de adquirir la conformación nativa y permanecen mal plegadas¹¹.

Una de las observaciones más sorprendentes en las mutaciones de TP53 es que muchas de ellas no resultan en la pérdida de la proteína. Al contrario, la mayoría de las células en cáncer acumulan la proteína P53 mutante. Estos altos niveles de P53 se deben a que P53 mutante suele ser más estable que P53 salvaje. En consecuencia, las células tumorales se comportan como si estuvieran reteniendo selectivamente a P53 mutante. Esta propiedad no puede ser explicada argumentando que los mutantes de P53 solo ocasionan la pérdida de funcionalidad de la proteína. Fue así como se postuló

que P53 mutante puede tener un efecto oncogénico. Este efecto ocurre a través de dos mecanismos principales. El primero es mediante el efecto dominante negativo. En este caso, mutantes de P53 que son inactivos, aun retienen su capacidad de formar el tetrámero de P53. De esta forma, son capaces de formar complejos con P53 salvaje, lo que resulta en el bloqueo de la función de P53 salvaje ³⁸. También se han reportado casos en los que P53 mutante es capaz de secuestrar a P53 salvaje en una conformación inactiva, en agregados proteicos que se acumulan en la célula ³⁹.

El segundo mecanismo que lleva la selectividad por P53 mutante en células tumorales, es la presencia de mutantes de P53 con ganancia de función ³⁸.

En 1993 se describió por primera vez la capacidad de varios mutantes de P53 de activar la transcripción de un gen reportero controlado por el promotor del gen *mdr* (multi drug resistance gene), que la proteína salvaje no era capaz de activar ⁴⁰.

Hoy en día se proponen varias formas a través de las cuales los mutantes podrían adquirir una nueva función. Mutaciones en los residuos de aminoácido que tienen contacto con el ADN podrían cambiar la capacidad de unión específica al ADN, tal vez a través de la presencia de elementos de respuesta específicos para P53 mutante que aún no han sido caracterizados. Por otro lado, se ha constatado que mutantes de P53 pueden unirse a factores de transcripción y también a proteínas de la familia de P53, alterando su actividad.

Las proteínas de la familia de P53 son P63 y P73. Estas presentan un alto grado de homología con P53 y son capaces de activar la transcripción, pero su rol principal está vinculado a procesos como el desarrollo y la diferenciación celular. Recientemente se ha mostrado que P63 se puede unir a P53 mutante y el complejo de ambos se une a sitios en el ADN diferentes a los que P63 normalmente se uniría ⁴¹.

El gran número de vías en las que está implicado y la cantidad de proteínas con las que P53 interacciona amplían enormemente el espectro de actividades posibles de estos mutantes de ganancia de función, lo que es tema de intensa investigación.

3. MUTACIONES SILENCIOSAS Y P53

a. Las mutaciones sinónimas

La secuencia nucleotídica de un gen es traducida a la secuencia de aminoácidos de una proteína, siguiendo un conjunto de reglas denominado “código genético”. La secuencia de nucleótidos en una molécula de ARNm es leída en grupos de 3 nucleótidos, denominados codones. El código genético determina cual aminoácido es codificado por cada codón. Existen 64 posibles combinaciones de 3 nucleótidos, mientras que las proteínas están compuestas por solamente 20 tipos de aminoácidos. Los codones sinónimos son aquellos que difieren en su composición nucleotídica pero que codifican para el mismo aminoácido. Por eso se dice que el código genético es “degenerado”, ya que un tipo de aminoácido puede ser codificado por más de un codón. De hecho, los únicos aminoácidos que son codificados únicamente por un codón son la metionina y el triptófano, mientras que el resto tienen entre dos y seis codones sinónimos ²⁹.

Esta redundancia en el código genético genera preguntas acerca del rol de los cambios sinónimos en la secuencia codificante de un gen. Inicialmente se asumió que mutaciones sinónimas, también llamadas silenciosas, no deberían tener ningún efecto en la expresión y funcionalidad de las proteínas codificadas, ya que no ocasionan cambios en la estructura primaria de la proteína (la secuencia de aminoácidos). A su vez, esto significaba que no existiría una presión selectiva hacia determinados codones de aminoácidos, ya que el uso de codones sería indistinto y no habría un cambio en la función celular, la adecuación del organismo al ambiente, o en su evolución. Lo que se esperaba encontrar en estas circunstancias es que los codones sinónimos se distribuyan uniformemente en el genoma, y que evolucionen de forma neutral, con la fijación de un determinado codón mediada únicamente por el azar ⁴².

Sin embargo, a medida que se fueron secuenciando genes y genomas de diferentes organismos, se encontró que los codones sinónimos no son usados en frecuencias iguales e uniformes, si no que existe un sesgo en el uso de determinados codones. Este sesgo varía tanto entre diferentes especies de organismos, así como entre genes de un mismo genoma. De esta forma surgió el término “uso de codones”, el cual hace

referencia a la frecuencia relativa a la cual se utilizan codones alternativos, que especifican a un aminoácido en particular ^{43, 44}.

El hecho de que los codones estén sujetos a cierta presión selectiva, implica entonces que la sustitución de codones por otros sinónimos puede ejercer un efecto positivo o negativo en el proceso de expresión génica. Hoy en día han sido estudiados diversos mecanismos a través de los cuales estas sustituciones sinónimas podrían afectar la actividad de las proteínas. A continuación se enumeran algunos de estos mecanismos.

En primer lugar, el cambio de codones sinónimos puede tener un efecto a nivel del procesamiento del ARNm y la regulación post transcripcional.

Durante el proceso de corte y empalme de los transcritos primarios, también conocido como “splicing”, estos son procesados a fin de eliminar a los intrones del gen. Este proceso es regulado por la maquinaria del splicing, que incluye proteínas y ARN, y por secuencias reguladoras presentes en el transcrito. Entre las secuencias reguladoras, algunas permiten que la maquinaria de corte y empalme identifique las fronteras intrón-exón, entre secuencias codificantes que deben ser conservadas (exones), y los intrones que deben ser eliminados. Otras secuencias reguladoras del splicing, que generalmente se encuentran en los exones, determinan que el intrón sea reconocido como tal para su eliminación. Un mutante sinónimo puede producir modificaciones en estas secuencias reguladoras, causando el salteo de exones o la inclusión de intrones en el transcrito final, y dando lugar a proteínas defectuosas ⁴⁵.

Las mutaciones sinónimas también pueden afectar la regulación postranscripcional, mediante la modificación de sitios de unión a microARNs. Los microARNs son ARNs pequeños cuyo rol principal es regular la expresión génica, a través de la unión a un ARNm con una secuencia complementaria (generalmente en el extremo 3'), y causando su degradación. Si un gen que debe ser silenciado mediante su unión a un miRNA sufre una mutación sinónima en la región reconocida por el miRNA, esta podría causar la pérdida de unión de este último y a la desregulación del gen ⁴⁵.

Por otro lado, las mutaciones sinónimas también pueden causar un efecto en la estructura secundaria del ARNm. En consecuencia, la generación de una estructura menos estable podría llevar a la degradación de los mensajeros afectados, y una disminución del nivel de proteína ⁴⁵.

En segundo lugar, existe también un efecto de las mutaciones sinónimas en varios niveles del proceso de traducción. Se ha evidenciado en algunos organismos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces* y *Drosophila*, una correlación entre los codones sinónimos que aparecen con mayor frecuencia en los genes y el nivel de sus ARNt complementarios. Es así como se ha postulado una co-evolución del uso de codones con la abundancia de cada ARNt. Los codones complementarios a los ARNt más abundantes, son los que aparecen más frecuentemente en las secuencias codificantes más expresadas y se denominan “codones frecuentes”. A su vez, los codones correspondientes a los ARNt de menor abundancia relativa, los llamados “codones raros”, son utilizados con menor frecuencia.

En *Drosophila melanogaster*, por ejemplo, se ha constatado una relación positiva entre los codones frecuentes y los ARNt más abundantes. Los genes altamente expresados como los de proteínas ribosomales presentan una fuerte preferencia por codones frecuentes, mientras que genes menos expresados como el *Adhr*, presentan un sesgo menor en el uso de codones. Por otro lado, estudios realizados en *E. coli* han mostrado que codones frecuentes son traducidos de 3 a 6 veces más rápido que los codones raros, y con una menor frecuencia de error en la incorporación de aminoácidos. Por ello se propuso un rol central del uso de codones en la fidelidad y la cinética de la traducción ⁴⁶.

Asimismo, se ha propuesto que los codones sinónimos podrían alterar la cinética de traducción y afectar directamente el proceso de plegamiento co-traducciona l de las proteínas. Los codones frecuentes serían traducidos más rápidamente que los codones raros, porque sus ARNt complementarios son más abundantes en la célula y el encuentro entre el codón y el anticodón ocurriría más rápidamente y con un apareamiento de bases adecuado. La distribución no uniforme de los codones a lo largo de una secuencia de ARNm podría entonces marcar la velocidad a la cual el transcripto es traducido. Regiones ricas en codones frecuentes tendrían una velocidad de traducción más elevada que regiones ricas en codones raros. En consecuencia, la presencia de codones raros marcaría determinadas pausas o enlentecimientos en la traducción, que permitirían el plegamiento independiente de ciertas regiones de la proteína ^{47, 48}.

Por ejemplo, se ha observado la presencia de regiones ricas en codones raros en los primeros 30 – 50 codones de muchos transcritos altamente expresados, que causarían un enlentecimiento de la velocidad de la elongación, inmediatamente luego del inicio de la traducción. Estas regiones, denominadas “rampas”, servirían para espaciar a los ribosomas en el ARN mensajero. Una distancia considerable entre ribosomas adyacentes previene congestiones de ribosomas, que podrían llevar al estancamiento de ribosomas y proteínas mal plegadas ⁴⁵.

Otra observación relevante que refuerza lo anterior es la presencia de codones raros en secuencias que dan lugar a estructuras proteicas de plegamiento lento, como las hojas β , mientras que estructuras de plegamiento rápido como las hélices α , presentan un enriquecimiento en codones frecuentes. A su vez, proteínas grandes con varios dominios suelen presentar regiones ricas en codones raros en localizaciones estratégicas, que codifican segmentos polipeptídicos que unen los dominios. Se ha propuesto que los codones raros en estas regiones facilitarían que estos dominios se plieguen de forma independiente ⁴⁵. Un ejemplo de ello es un estudio realizado por Crombie et al en 1994, el cual mostró la disminución de la actividad de una enzima de levaduras, causada por la sustitución de codones raros por codones frecuentes en una región entre dominios ⁴⁹.

El esquema de Figura 6, extraído de Angov 2011, ilustra el concepto de codones raros y frecuentes y su rol en el plegamiento de las proteínas ⁴⁷.

b. Mutaciones sinónimas en TP53 en cáncer

Como se menciona anteriormente en este trabajo, el gen TP53 es el gen más afectado por mutaciones en el cáncer. Entre las mutaciones de P53, cerca de un 5% corresponde a mutaciones sinónimas. Este valor es mucho mayor (unas 20 a 100 veces) al que se esperaría encontrar si estas mutaciones fueran neutras. Esta observación nos lleva a preguntarnos sobre el rol de las mutaciones sinónimas en el cáncer.

El análisis de secuencias de P53 provenientes de la base de datos de mutaciones en cáncer de la IARC, ha mostrado que la hipermutabilidad de los tumores puede explicar en parte el alto porcentaje de mutaciones sinónimas en P53. Sin embargo existen mutaciones sinónimas que se localizan preferentemente en potenciadores de splicing,

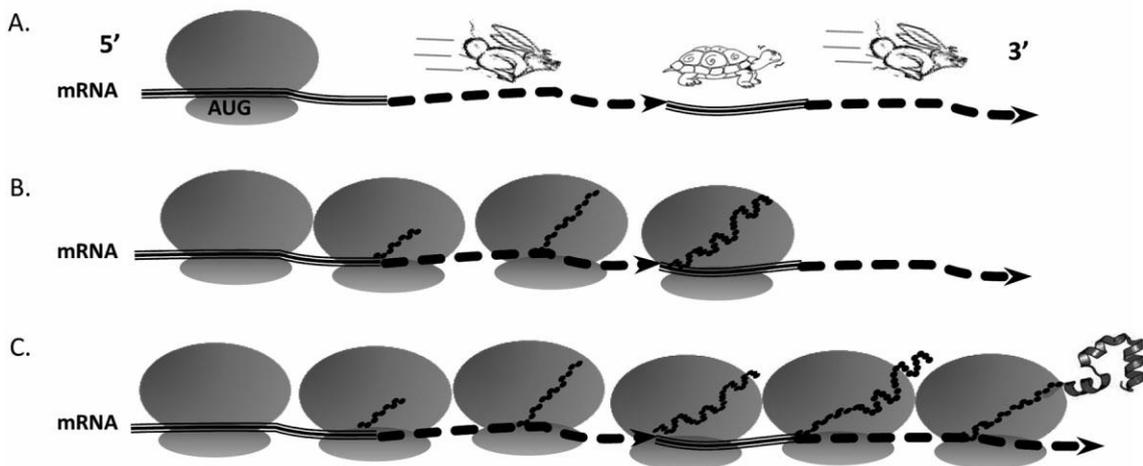


Figura 6. Mutaciones sinónimas y cinética de traducción - Se representa mediante una línea triple a las zonas de codones raros, mientras que la línea punteada en forma de flecha a las de codones frecuentes. La liebre y la tortuga simbolizan la velocidad de la traducción. En B. se observa que cuando el ribosoma llega a una región de codones raros, la velocidad de traducción disminuye (tortuga) y eso le permite a la secuencia polipeptídica en crecimiento adquirir cierta estructura dentro del ribosoma (tomado de Angov, 2011).

lo que sugiere que estas mutaciones también podrían tener una importancia funcional en este gen ⁵⁰.

4. ANÁLISIS FUNCIONAL EN LEVADURAS

a. El sistema FASAY

En 1993, el grupo de Ishioka y colaboradores presenta un novedoso sistema de identificación de mutaciones de línea germinal en P53, denominado FASAY, (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast) ⁵¹. Este sistema está basado en la capacidad de P53 de activar la transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de promotores que contienen sus elementos de respuesta ⁵². De esta manera, el sistema evalúa la capacidad de activar la expresión de un gen reportero, evidenciando la funcionalidad de P53 ⁵¹.

El sistema original utilizaba dos plásmidos. En primer lugar, el plásmido pSS16, derivado del plásmido pLS76. Este último contiene el gen LEU2 como selección, el cual permite a las levaduras crecer en ausencia de leucina, y la secuencia codificante (CDS) de P53 controlada por el promotor constitutivo ADH1. Este promotor da lugar a bajos

niveles de P53 en las levaduras, a fin de evitar un efecto tóxico debido a la sobre expresión de la proteína (como se ha observado para otros promotores). El plásmido pSS16 es idéntico al pLS76, excepto por la región central de la CDS de P53, la cual es reemplazada por el gen URA3. La digestión del plásmido pSS16 con las enzimas *HindIII* y *StuI*, libera al gen URA3, dejando al plásmido pSS16 en forma lineal, con las secuencias 5' y 3' de la CDS de P53 en sus extremos.

El segundo plásmido utilizado es el pSS1, que contiene al gen HIS3 bajo el control del promotor mínimo GAL1 con un sitio de unión a P53 (RGC). La selección de este plásmido es el gen TRP1, que permite el crecimiento de la levadura en ausencia de triptófano.

El primer paso del FASAY consistía entonces en la transformación de una cepa de levadura con auxotrofías para triptófano, leucina e histidina, con el plásmido pSS1. Este plásmido contiene el gen reportero (HIS3) bajo control de un elemento de respuesta a P53. Para mantener el plásmido en las levaduras, se utilizaban medios sin triptófano (selección del plásmido pSS1).

El paso siguiente del FASAY implicaba la separación de los alelos y la reparación de plásmidos pSS16 con productos de PCR derivados de la CDS de P53. En este paso se realiza la co transformación de esta cepa de *S. cerevisiae* con el plásmido pSS16 (digerido con las enzimas *HindIII* y *StuI*) y un producto de PCR. El producto de PCR es obtenido a partir del ADN copia originado por la retrotranscripción del ARNm de P53.

La separación de los alelos se evidencia en el caso de muestras heterocigotas para P53, en las cuales el 50% de los productos de PCR se originan a partir del alelo salvaje y el otro 50% a partir del alelo mutante.

La reparación de los plásmidos con los productos de PCR de P53 es posible gracias al aparato de recombinación homóloga de la levadura. Como el plásmido pSS16 contiene las secuencias 5' y 3' de la CDS de P53, estas pueden recombinar con los productos de PCR.

Seguidamente, las levaduras son plaquedas en medios sin leucina ni triptófano, a fin de conservar las colonias que tengan tanto el plásmido pSS16 como el pSS1.

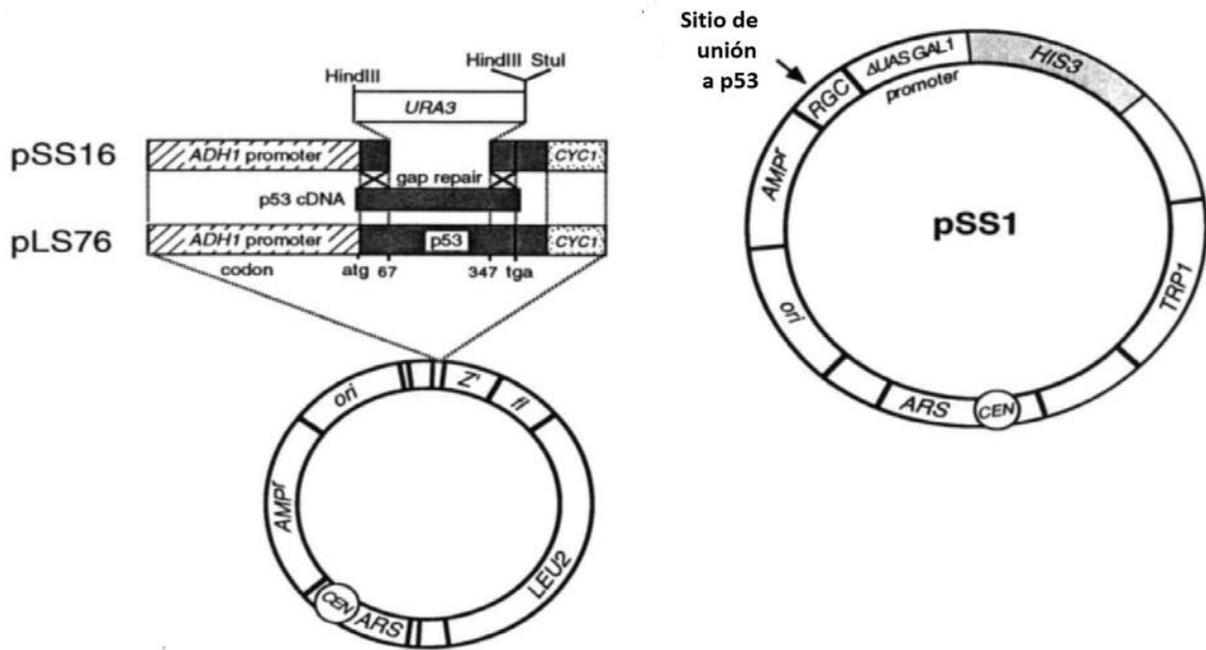
El paso final consistía en la realización de réplicas de las placas, pero en un medio que tampoco contenía histidina, a fin de evidenciar la expresión del gen reportero HIS3. En estas placas sólo pueden crecer aquellas colonias de levadura que además de contener

ambos plásmidos, poseen un alelo de P53 capaz de activar la transcripción del gen HIS3, mediante su elemento de respuesta RGC. Individuos heterocigotas para P53, con uno de los alelos incapaz de activar la transcripción, presentan un 50% de colonias menos en estas réplicas, cuando son comparadas con la placa original. Finalmente, los mutantes se pueden identificar por secuenciación⁵¹. En la Figura 7 se esquematizan los componentes de este sistema.

El método FASAY mostró en ese entonces ser un método rápido y de bajo costo en comparación con otros métodos de análisis de la actividad de P53 que involucraban por ejemplo la transfección de células humanas⁵³. A su vez, presenta ventajas frente a métodos basados únicamente en secuenciación, ya que permite detectar las mutaciones que generen problemas en la funcionalidad de la proteína.

Dos años después de la publicación de esta primera versión del sistema FASAY, Flaman et al. presentan una forma simplificada del mismo. En el trabajo de Flaman se procedió a modificar una cepa de levadura defectiva en el gen ADE2 para que incorpore en su genoma una copia de este gen, pero que esté controlada por elementos de respuesta a P53.⁵⁴

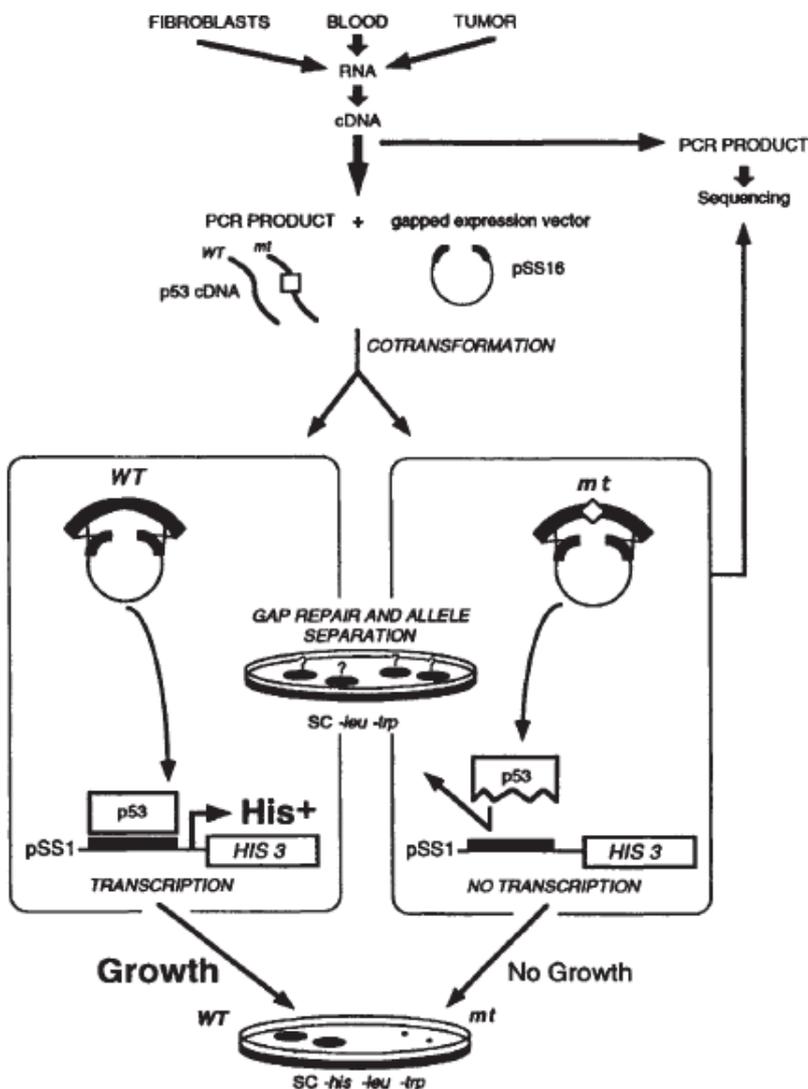
El gen ADE2 codifica para la enzima fosforibosil aminoimidazolcarboxilasa, una enzima de la vía de síntesis de la adenina. Esta enzima cataliza la conversión de P-ribosil aminoimidazol a P-ribosil-aminoimidazolcarboxilato. Las cepas de levadura defectivas en el gen ADE2 no pueden realizar este paso, y por lo tanto acumulan AIR, que es de color rojo. La acumulación de este metabolito ocasiona que las colonias de estas levaduras sean de color rojo. La expresión del gen ADE2 en levaduras defectivas para este gen permite entonces que estas pierdan el color rojo, resultando colonias de color blanco⁵⁵.



Sitio de unión a p53

Figura 7. Sistema FASAY – En la parte superior de la Figura se muestran los plásmidos originalmente utilizados en el FASAY presentado por Ishioka et al, 1993. Estos son el pLS76, el pSS16 y el plásmido pSS1. Este último es el que contiene el gen reportero HIS3 bajo el control del elemento de respuesta a P53 “RGC”.

En la parte inferior se esquematiza el ensayo. El primer paso consiste en la extracción de ARN a partir de muestras como fibroblastos, sangre o un tumor. Con el ARN se sintetiza ADN copia. A partir del ADN copia se obtienen fragmentos de PCR con la CDS de P53. Estos son co transformados junto con el pSS16 en cepas de levadura previamente transformadas con el plásmido pSS1. Las secuencias de P53 que produzcan proteínas funcionales serán las únicas que den colonias capaces de crecer en placas de selección para el gen reportero HIS3 (Tomado de Ishioka et al, 1993).



En esta nueva versión de FASAY, el gen ADE2 funciona como gen reportero. Las células son transformadas con el plásmido pSS16 digerido con las enzimas HindIII y StuI, y con los productos de PCR de P53. Dentro de las levaduras se da la reparación de los plásmidos por recombinación homóloga. Si una célula es transformada con un producto de PCR que contiene la secuencia de P53 funcional, habrá activación de la transcripción del gen ADE2, lo que se observa como un cambio de color en la colonia de levadura, de rojo a blanco.

Esta aproximación experimental tiene la enorme ventaja de que permite evaluar la actividad transcripcional de P53 a través del color en la colonia de levadura. De esta forma, la presencia de mutantes de P53 incapaces de activar la transcripción se evidencia por el color rojo de las colonias. Un paciente heterocigoto, con un alelo salvaje de P53 y uno incapaz de activar la transcripción, presentará entonces un 50% de colonias rojas y un 50% de colonias blancas⁵⁴. En la Figura 8 se esquematiza esta nueva versión del FASAY.

Este sistema presenta numerosas ventajas con respecto al sistema original. Por un lado, la utilización de cepas con el reportero integrado en el genoma representa una simplificación en la metodología, ya que no es necesario utilizar plásmidos con genes reporteros, con el pSS1. Además, la utilización del gen ADE2 como reportero facilita la observación de los resultados y simplifica los pasos del ensayo, porque ya no es necesario replicar las placas en diferentes medios de selección.

Otra ventaja importante es la detección de mutantes sensibles a la temperatura, los que por ejemplo, crecidos a 25°C dan colonias de color blanco, y a 35°C colonias de color rosado⁵⁴.

La principal desventaja de este sistema es la posible incorporación de mutaciones adicionales en el paso de amplificación de la CDS de P53 en la reacción de PCR. Estas generan alteraciones en la secuencia a analizar. Sin embargo, los autores muestran que con la utilización de ADN polimerasas de alta fidelidad, es posible disminuir el error de fondo ocasionado por estas mutaciones hasta un valor de un 3% de colonias rojas para el genotipo salvaje⁵⁴.

Desde su invención, el sistema FASAY ha sido ampliamente utilizado como método de diagnóstico para la identificación de mutantes de P53. Además se ha usado para la determinación de espectros mutacionales en P53, para la ubicación de mutaciones en

la secuencia de P53, el estudio de la interacción con proteínas de la familia de P53 (como P73), ensayos de dominancia de los mutantes, así como en el estudio de otras proteínas no relacionadas a P53 ^{56, 57}.

b. Antecedentes del grupo de investigación

Una línea de investigación central en nuestro laboratorio es el estudio del plegamiento *in vivo* de proteínas y el efecto de las mutaciones sinónimas en este proceso.

En el marco de la tesis de maestría de la MSc. María José Lista, se propuso estudiar la funcionalidad de mutantes sinónimos de P53, mediante el sistema FASAY. Se analizó un total de 21 mutantes sinónimos, en dos cepas de levadura que contenían distintos elementos de respuesta a P53 ⁵⁸.

Doce de estos mutantes correspondían a variantes sinónimos de tres prolinas consecutivas en el dominio de unión al ADN de P53, en las posiciones 151, 152 y 153. Estas prolinas presentan un índice de mutaciones sinónimas relativamente alto en el cáncer, de acuerdo a la información disponible en la base de datos de la IARC. En la Figura 9 se muestra la secuencia aminoacídica del dominio de unión al ADN de P53 y se destacan estas prolinas.

Los experimentos de FASAY realizados utilizaron al gen reportero ADE2, en dos cepas de levadura, con diferentes elementos de respuesta a P53. En una de las cepas, el elemento de respuesta a P53 utilizado fue p21, y en la otra RGC ⁵⁸.

El elemento de respuesta p21 es conocido por mediar en humanos la detención del ciclo celular en fase G1, inducida por P53. Este consiste de una secuencia de 20 pb ubicada corriente arriba del gen p21. El elemento de respuesta RGC fue la primera secuencia de unión específica al ADN descubierta para P53. Su función en el contexto celular aún no ha sido caracterizada. A pesar de esto, esta secuencia ha sido utilizada extensamente para estudiar la actividad transcripcional de P53 y su actividad de inhibición de la replicación del ADN *in vitro*. El control negativo utilizado fue el mutante R175H, un mutante de clase II incapaz de mantener la estructura nativa del dominio de unión al ADN. Este mutante no es capaz de activar la transcripción del gen reportero en el FASAY.

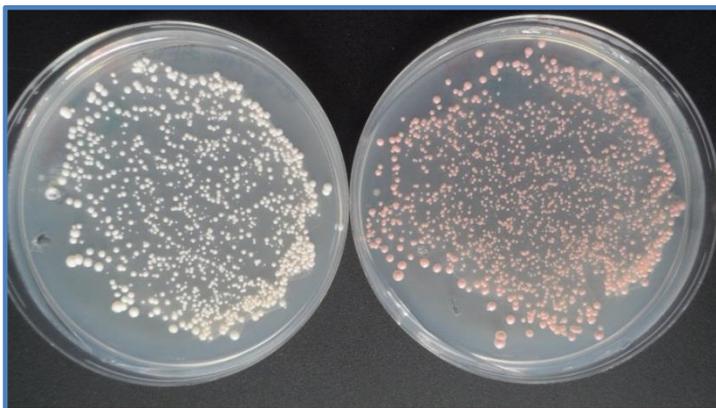
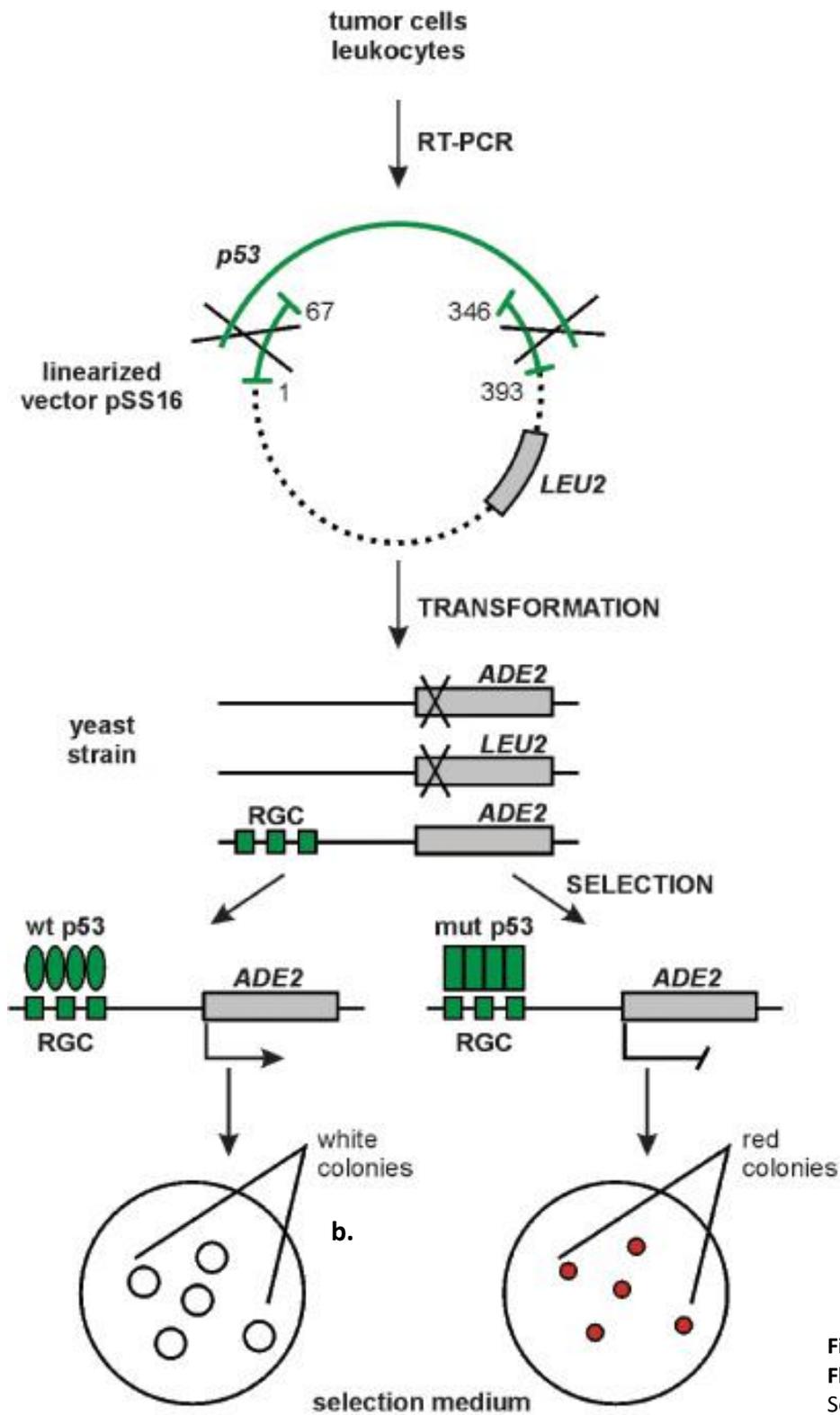


Figura 8. FASAY modificado por Flaman –

Se muestra un esquema del FASAY modificado por Flaman en 1995, con la incorporación del gen reportero ADE2 (tomado de Smardová, 2005).

En la parte inferior se observan dos placas con colonias de levadura. La placa de la derecha corresponde a colonias que no expresan el gen ADE2, acumulan AIR y por tanto son de color rojo. En la placa de la izquierda, las colonias expresan el gen ADE2 y son de color blanco.

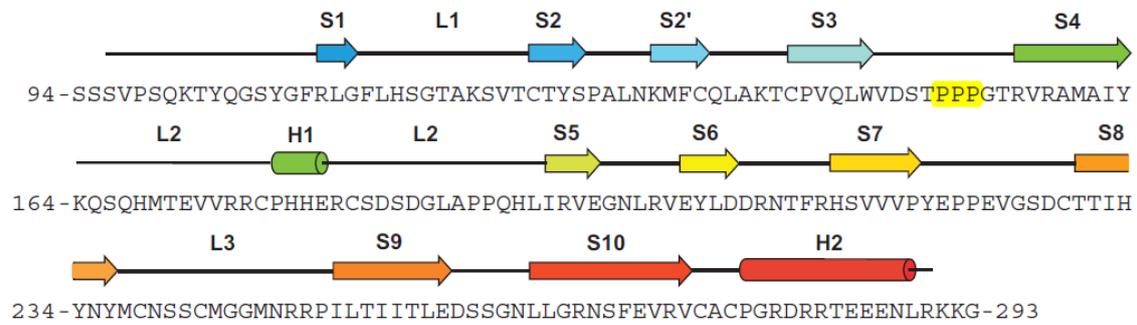


Figura 9. Estructura primaria del dominio de unión al ADN de P53 – Se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al ADN de P53. En amarillo se destacan las prolinas 151-152-153. Las flechas indican zonas de estructura secundaria en hebras β y se representan con una S. Los cilindros corresponden a estructura secundaria en hélice α y se representan con una H. Los bucles se representan con una L. (Modificado de Joerger & Ferhrst, 2008).

Los resultados mostraron que tanto la secuencia salvaje como los mutantes sinónimos de P53 presentaban colonias rojas y blancas. El porcentaje promedio de colonias rojas cuando se analizaba el alelo salvaje era de un 5 a 10%, mientras que el correspondiente al análisis de algunas mutaciones sinónimas presentaba hasta 25% de colonias rojas⁵⁸.

Las colonias rojas observadas en el análisis del alelo salvaje pueden atribuirse a errores en la reacción de PCR, así como a la aparición de mutantes de reversión del genotipo -leu, que ocasionan el crecimiento de colonias rojas que no contienen el plásmido pSS16. A pesar de que los fragmentos de PCR utilizados son secuenciados antes de la transformación, siempre es posible la aparición de errores en una baja frecuencia que no sean detectados en la reacción de secuenciación. Si bien se utilizó una ADN polimerasa de alta fidelidad, el porcentaje de colonias rojas observado fue sensiblemente mayor al reportado en la bibliografía⁵⁸.

En el caso de los mutantes sinónimos que presentan un mayor porcentaje de colonias rojas, consideramos que este incremento puede estar ocasionado por un efecto de la mutación sinónima que resulta de interés estudiar con mayor profundidad.

Con el propósito de reducir el ruido de fondo del ensayo, es decir, la aparición del porcentaje relativamente alto de colonias rojas al analizar el alelo salvaje, nos propusimos un cambio de estrategia. Es así como en el presente trabajo se procedió a clonar las secuencias codificantes de los mutantes sinónimos de P53 en un plásmido de expresión de levadura. El clonado permite la confirmación de la secuencia de los

alelos de P53 antes de transformar las levaduras, evitando así la aparición de colonias que contengan la CDS de P53 con errores de PCR y los posibles errores que puedan tener lugar durante el proceso de recombinación en la levadura.

6. OBJETIVO GENERAL

Este trabajo se enmarca en una línea de investigación que busca establecer si la actividad transcripcional y la expresión de P53 puede verse afectada en variantes sinónimas de esta proteína. En particular, se trabajó con 10 mutantes sinónimos que presentan variantes en tres prolinas consecutivas, que corresponden a los codones 151, 152 y 153. Estas prolinas están localizadas en el dominio de unión al ADN de P53. Nuestro interés es determinar si la sustitución de codones sinónimos que codifican prolinas en las mencionadas posiciones altera la actividad transcripcional de P53, en comparación con la secuencia codificante salvaje. En la Tabla 1 se indican los cambios sinónimos presentes en los diez mutantes analizados.

Tabla 1. Mutaciones sinónimas analizadas – Se presenta la lista de las mutaciones sinónimas analizadas. Se destacan las bases que cambian en cada mutante.

Secuencia	Posición		
	151	152	153
TP53 salvaje	CCC	CCG	CCC
Mutante Pro 1	<u>CCA</u>	<u>CCA</u>	CCC
Mutante Pro 2	<u>CCU</u>	CCG	<u>CCG</u>
Mutante Pro 3	CCC	CCG	<u>CCA</u>
Mutante Pro 4	<u>CCG</u>	<u>CCU</u>	<u>CCG</u>
Mutante Pro 5	<u>CCG</u>	CCG	<u>CCG</u>
Mutante Pro 6	<u>CCU</u>	CCG	<u>CCU</u>
Mutante Pro 7	<u>CCU</u>	<u>CCU</u>	<u>CCU</u>
Mutante Pro 8	<u>CCG</u>	<u>CCA</u>	CCC
Mutante Pro 9	CCC	<u>CCA</u>	<u>CCG</u>
Mutante Pro 10	<u>CCG</u>	<u>CCU</u>	CCC

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Concretamente, en este trabajo se propone:

- 1) Clonar la secuencia codificante de P53 salvaje y de P53 portador de mutaciones sinónimas en un vector de expresión en levadura (p414ADH).
- 2) Analizar y comparar la actividad transcripcional de P53 salvaje y portador de mutaciones sinónimas en células de levadura, sobre la expresión de un gen reportero bajo control de los elementos de respuesta p21 y RGC.
- 3) Analizar la expresión de la proteína P53 en las levaduras, mediante electroforesis y western blotting.
- 4) Comparar el nivel de expresión de P53 que se obtiene en el FASAY clásico (vector pSS16) con el que se obtiene utilizando el vector p414ADH.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se detallan las metodologías utilizadas en este trabajo. En el Anexo A se presenta un complemento de esta sección, detallando la composición de las soluciones y los medios de cultivo utilizados.

1. MATERIALES

a. Plásmidos

Se utilizaron 12 construcciones plasmídicas pcDNA-3, cada una conteniendo como inserto una secuencia codificante para P53. Dos de estos plásmidos corresponden a las secuencias control utilizadas, el control positivo con TP53 salvaje, y el control negativo con el mutante R175H. Los restantes 10 plásmidos contenían cada uno de los mutantes sinónimos a analizar. Tales mutantes fueron construidos mediante mutagénesis sitio dirigida a partir del plásmido de la secuencia salvaje como parte del trabajo de maestría de la Msc. María José Lista ⁵⁸.

El plásmido utilizado para el subclonado y la expresión de P53 en levaduras fue el p414ADH. Este fue cedido a nuestro laboratorio por el Prof. Marc Blondel, Faculté de Médecine et Sciences de la Santé, UBO, Brest, France. Este plásmido contiene sitios de restricción para *Bam*HI y *Eco*RI en su sitio de policlonado y proporciona la capacidad de crecer en un medio sin triptófano a las levaduras que lo poseen.

Para realizar los ensayos de FASAY por el método clásico, se utilizó el plásmido pSS16 y se realizó PCR a partir de los plásmidos pcDNA-3. El plásmido pSS16 proporciona la capacidad de crecer en un medio sin leucina a las levaduras que lo poseen.

En la Figura 10 se muestran los mapas de los vectores utilizados.

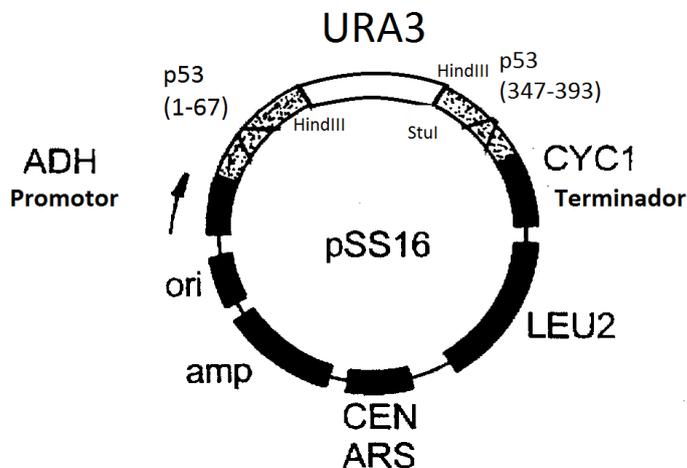
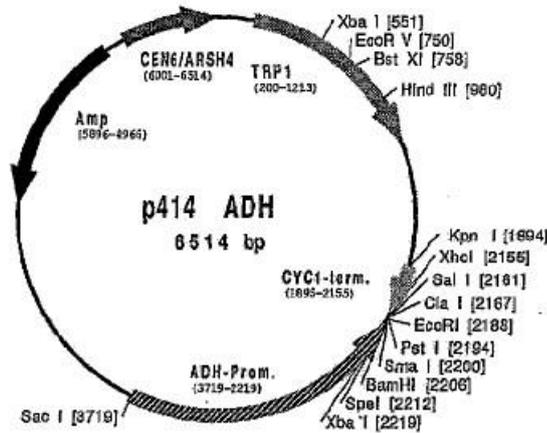
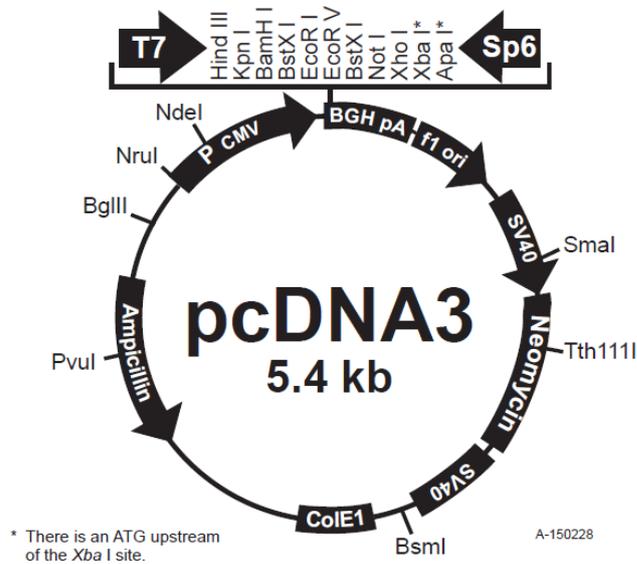


Figura 10. Plásmidos – Se observan los mapas de los plásmidos utilizados. a. pcDNA-3; Ampicilin: resistencia a ampicilina, T7: promotor de transcripción para la ARN polimerasa del fago T7, SP6: promotor del gen SP6, F1 ori: origen de replicación del fago F1, SV40: secuencia promotora y terminadora del virus SV40, Neomycin: resistencia a neomicina, PCMV: promotor de citomegalovirus, BGHpA: señal de poliadenilación de BGH, ColE1: factor colicinogénico. B. p414ADH; Amp: resistencia a ampicilina, CEN/ARS: secuencia centromérica CEN6 y secuencia de replicación autónoma en levaduras, TRP1: gen de la fosforibosil antranilato isomerasa, ADH: promotor de la alcohol deshidrogenasa 1, CYC1: terminador del gen citocromo c1. c. pSS16; URA3: gen de la orto-5- fosfato descarboxilasa, LEU2: gen de la β -isopropilmalatodeshidrogenasa, ori: origen de replicación bacteriano

b. Células

Se utilizaron dos cepas de *S. cerevisiae* derivadas de la cepa YPH500, descrita por Sikorski y Hieter en 1989⁵⁹, conteniendo el gen ADE2 bajo el control de elementos de respuesta a P53

En un caso, el elemento de respuesta incorporado es p21, y la cepa es denominada “YPH p21” y en el otro caso el elemento de respuesta utilizado es RGC, y la cepa es denominada “YPH RGC”. Estas células fueron mantenidas en medio rico para levaduras YPD.

Para la amplificación de los plásmidos se utilizaron células *E.coli* de la cepa DH5- α , quimio competentes por el método de Inoue⁶⁰. Tales células fueron crecidas en medio rico LB, con los antibióticos adecuados en cada caso.

c. Marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular para ADN utilizados en los geles de agarosa fueron el #SM0331 de Thermo Scientific y el N3232L de New England BioLabs. Estos se muestran en la Figura 11.

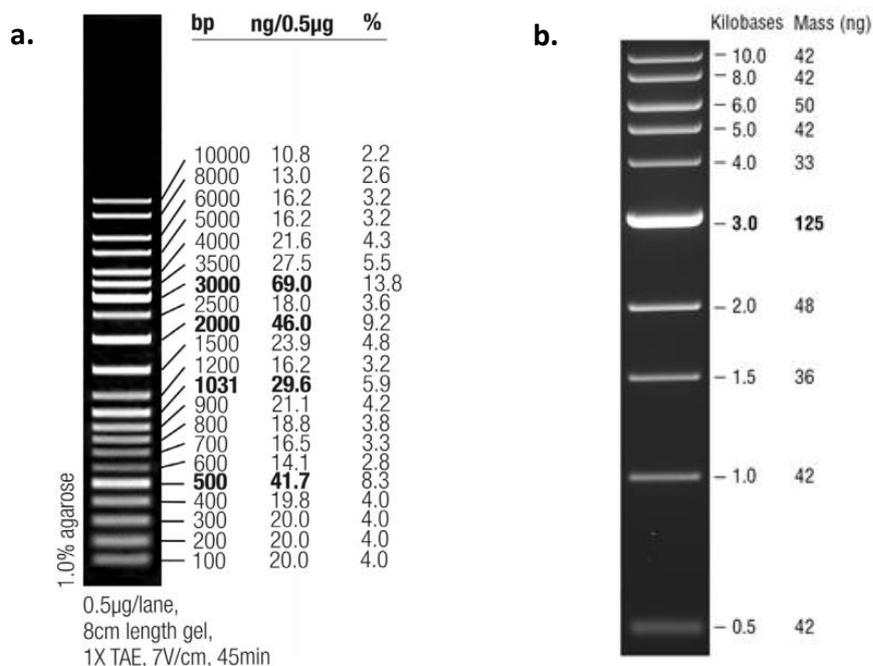
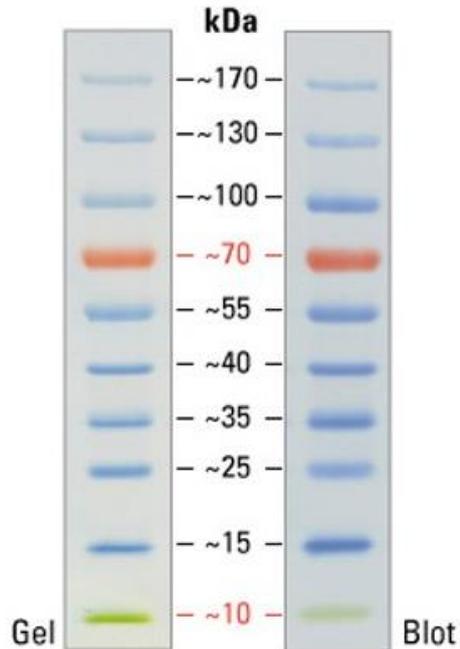


Figura 11. Marcadores de peso molecular - Se observa el marcador de peso molecular #SM0331 de Thermo Scientific, migrado en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (a) y el N3232L de New England BioLabs, migrado en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (b). Las masas en ambos casos corresponden a 0.5 μ g de ADN / carril. (Tomado de www.thermoscientific.com y www.neb.com)

En el caso de los geles de proteínas y los ensayos de western blotting, el marcador de peso molecular utilizado fue el #26616 de Thermo Scientific. Este se muestra en la Figura 12.



Images are from a 4-20% Tris-glycine gel (SDS-PAGE) and subsequent transfer to membrane.

Figura 12. Marcador de peso molecular - Marcador de peso molecular para proteínas #26616 de Thermo Scientific. Se muestra a la izquierda la migración del marcador en un gel de SDS PAGE y a la derecha la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. (Tomado de www.thermoscientific.com)

2. MÉTODOS

a. Amplificación por PCR

Para el subclonado se realiza la amplificación por PCR de las secuencias codificantes para TP53, ya sea control o mutante sinónimo. Para esto se utilizan los siguientes cebadores: P53BamF (5'CGCGGATCCGCGATGGAGGAGCCGAGTCAGATC 3') y P53EcoRI (5'CCGGAATTCCGGTTAGTCTGAGTCAGGCCCTTC 3').

Los cebadores utilizados se hibridan en los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de TP53 y agregan los sitios de restricción necesarios para realizar el subclonado. Estos

son, un sitio de restricción para *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio de restricción para *Eco*RI en el extremo 3'.

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima Kapa HiFi Hotstart (KR0369, Kapa Biosystems), en un volumen final de 50 μ L conteniendo 10 μ L de buffer Kapa 5x con Mg^{2+} [2 mM], 1.5 μ L de dNTPs [10 mM] each, 1.5 μ L de cada cebador [10 mM], 0.8 μ L de ADN polimerasa [1 U/ μ L] y 100 ng de ADN molde. El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, desnaturalización a 98°C durante 20 segundos, hibridación de los cebadores a 62°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 2 minutos, 27 ciclos de repetición y extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Para la reacción de amplificación por PCR para FASAY (método clásico) se utiliza el cebador sentido P3 (5'ATTTGATGCTGTCCCCGACGATATTGAAC 3') y el cebador antisentido P4 (5'ACCCTTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTC 3'). Se utilizó la enzima Kapa HiFi Hotstart (KR0369, Kapa Biosystems), en un volumen final de 50 μ L conteniendo 10 μ L de buffer Kapa 5x con Mg^{2+} [2 mM], 1 μ L de dNTPs [10 mM] each, 1 μ L de cada cebador [10 mM], 1 μ L de ADN polimerasa [1 U/ μ L] y 100 ng de ADN molde. El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C 5 minutos, desnaturalización a 98°C 20 segundos, hibridación de los cebadores a 62°C 1 minuto, extensión a 72°C 2 minutos, 27 ciclos de repetición y extensión final a 72°C durante 10 minutos.

b. Preparación de plásmidos

Los plásmidos utilizados fueron amplificados luego de la transformación (por el método de shock térmico) de bacterias *E.coli* DH5- α quimio competentes. Estas células transformadas son plaqueadas en placas de LB ampicilina (100 μ g/mL) para seleccionar las colonias que contienen el plásmido de interés. Las bacterias son incubadas a 37°C O.N. y al día siguiente se realizan precultivos de 3 mL en LB líquido con ampicilina.

El plásmido es extraído de las bacterias mediante minipreparación de ADN plásmidico por lisis alcalina. Los métodos de transformación de bacterias y minipreparación de ADN

plásmidico son de uso corriente en el laboratorio y están descritos en Sambrook & Russel, 2011⁶¹.

c. Digestión con enzimas de restricción

Los productos de PCR obtenidos para la realización del subclonado deben ser digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Se digieren 12.5 µL de producto de PCR purificado de gel de agarosa con 20 unidades de cada enzima, durante dos horas a 37°C en un volumen final de 50 µL.

Para la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* del plásmido p414ADH este es previamente cuantificado utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes. Se digieren 5 µg de plásmido con 20 unidades de cada enzima a 37°C durante dos horas. Las enzimas *BamHI* y *EcoRI* utilizadas fueron las de Thermo Scientific (ER0051 y ER0271) y las digestiones se realizaron en buffer Tango.

El plásmido pSS16 para FASAY debe ser digerido con las enzimas *StuI* y *HindIII*. Se digieren 5 µg de plásmido en buffer Tango, primero con 20 unidades de la enzima *StuI* (Invitrogen, 15438-013), durante dos horas a 37°C, en un volumen final de 50 µL. Pasado este tiempo se agregan 20 unidades de la enzima *HindIII* (Bioron, 250116S) y se lleva el volumen final a 60 µL agregando buffer Tango y agua. Se incuba durante dos horas adicionales a 37°C.

d. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de PCR, plásmidos y productos de digestión son visualizados mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa. La electroforesis en geles de agarosa se realiza en geles al 1% de agarosa en buffer TAE (Tris-acetato/EDTA) 0.5x.

La migración se realiza a 100 V durante 20 minutos en la cuba de electroforesis MiniRun-GE 100 de BIOER. Los geles son preteñidos con 2 µL de GelRed cada 50 mL, y son visualizados bajo luz ultravioleta.

e. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Los productos de PCR y de digestión con enzimas de restricción son purificados de geles de agarosa antes de ser utilizados en aplicaciones posteriores. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el kit GeneJET de Thermo Scientific (#K0691), siguiendo las instrucciones del fabricante.

f. Ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos

Para el subclonado, los productos de PCR digeridos con enzimas de restricción fueron ligados al vector de expresión en levaduras p414ADH.

Previo a la ligación, el plásmido y los productos de PCR digeridos son cuantificados. Se realiza la ligación de 50 ng de plásmido con 27.2 ng de fragmento de PCR, en una relación de 3 moléculas de inserto por cada molécula de plásmido. En paralelo se realiza la ligación sin utilizar inserto, como control. Para la ligación se utilizó la enzima T4 ligasa de New England BioLabs (M0202S).

La reacción de ligación transcurre durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un volumen final de 20 μ L, utilizando 20 unidades de enzima. Pasado este tiempo, se procede a transformar células *E.coli* DH5- α quimio competentes con 7 μ L de cada ligación, por el método de shock térmico.

g. Secuenciación de ADN

Los plásmidos con inserto son cuantificados y posteriormente secuenciados mediante el servicio de Macrogen, a fin de verificar la presencia de las mutaciones sinónimas correctas y los controles. Para el secuenciado se utilizan los cebadores P53BamF, P53EcoRI, utilizados para realizar el subclonado, y los cebadores E6FI (5'GGAAATTTGCGTGTGGAG 3') y E6RI (5'CTGTCATCCAAATACTCCACACG 3') a fin de cubrir la totalidad de la secuencia codificante de TP53. La calidad de las secuencias fue analizada utilizando el programa BioEdit. En el análisis se realizan alineamientos de las secuencias reportadas por el servicio de secuenciación con la secuencia codificante para P53 salvaje extraída del GeneBank (AB082923.1).

h. Transformación de levaduras

Las cepas YPH RGC e YPH p21 se mantienen creciendo en placas de medio YPD sólido a 30°C. El día anterior a la transformación de las levaduras se realizan precultivos en 10 mL de YPD líquido, inoculados con 5 colonias aisladas de color rojo, provenientes de placas de entre 5 a 7 días de estriadas. Los precultivos son crecidos durante toda la noche a 30°C con agitación a 200 rpm.

Al día siguiente, se determina el crecimiento de los precultivos midiendo la densidad óptica a 600 nm (D.O._{600nm}). A partir de estos, se realizan dos cultivos por cepa, de 40 mL de YPD cada uno, con una densidad óptica inicial de 0.3. Los cultivos se dejan crecer a 30°C y 200 rpm hasta una D.O._{600nm} de 0.6-0.8.

Una vez alcanzado ese valor de densidad óptica, se procede a centrifugar los cultivos a 4000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, a fin de sedimentar las células de levadura. El sedimento de células es resuspendido en 1 mL de buffer TE/LiAc. Seguidamente se centrifugan las células, durante 5 minutos a 4000 rpm. El sedimento de células es suavemente resuspendido en 1 mL de TE/LiAc. Se vuelve a repetir este paso, pero el volumen de buffer a utilizar en la resuspensión dependerá del número de transformaciones a realizar, siendo 100 µL de buffer por transformación. Seguidamente, se alicuotan 100 µL de células en diferentes tubos, cada uno correspondiente a una transformación. A estos se les añade 50 ng de plásmido, 10 µL de ADN de esperma de salmón (previamente incubado a 95°C) y 550 µL de buffer TE/LiAc/PEG. En el caso del ensayo FASAY clásico, se agregan 50 ng de plásmido pSS16 digerido con *HindIII* y *StuI*, junto con 1 µL de producto de PCR.

Los tubos son agitados sobre una rueda durante 30 minutos. Luego se realiza un shock térmico de 15 minutos en baño de agua a 42°C. Se centrifugan los tubos a 4000 rpm durante 5 minutos.

Los sedimentos de células son resuspendidos en 500 µL de medio mínimo MML, y se plaquean 100 µL de células en placas con la selección adecuada (DO-Trp o DO-Leu) con 2% de glucosa. Las placas se incuban durante 2 días a 30°C y hasta 8 días a temperatura ambiente hasta observar la aparición del color en las colonias.

i. Extracción de proteínas de levadura

Para la extracción de proteínas, se realizan precultivos de 5 colonias de igual color en 5 mL medio selectivo líquido, (DO-Trp o DO-Leu con 2% de glucosa). Estos son incubados O.N. a 30°C con agitación a 200 rpm.

Al día siguiente se largan cultivos de D.O._{600nm} inicial de 0.3, y se dejan crecer a 30°C y 200 rpm hasta una D.O._{600nm} de 0.6-0.8. Se registra la densidad óptica final de los cultivos.

Una vez alcanzado el crecimiento deseado, los cultivos son centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sedimentos de células son mantenidos en hielo y resuspendidos en buffer de extracción de proteínas según la siguiente relación: 150 µL para un cultivo de D.O._{600nm} = 0.6. De esta manera se normaliza la concentración de proteínas en los extractos a través de la D.O._{600nm}.

Los extractos son sonicados con un programa de pulsos intermitentes al 10% y un power output del 20%, cinco veces, durante 1 minuto cada vez. Se realizan intervalos de 1 minuto de duración entre cada sonicación, dejando el extracto en reposo, siempre en hielo. Luego de esta primera ronda de sonicación, los tubos son incubados 10 minutos a 99°C. Finalmente, se vuelven a sonicar los tubos, una única vez durante 1 minuto, utilizando los mismos parámetros de la sonicación anterior. Los extractos son conservados a -20°C.

j. Electroforesis de proteínas

Los extractos de proteína de levadura son visualizados mediante electroforesis de proteínas. La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en geles al 12%, de 1.5 mm de espesor.

Los geles se migran en cubas de electroforesis BioRad (Mini-PROTEAN Tetra Cell 165-8000) a 90 mV hasta la salida de las proteínas del gel concentrador, y a 140 mV hasta el final del gel separador. El buffer de corrida para la electroforesis es el Tris-glicina (Tris base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1 %). La tinción de las proteínas se realiza con solución de azul de Coomassie (7% ácido acético, 30% EtOH, 0.2% Coomassie R), durante toda la noche con agitación suave. Los geles son decolorados en solución decolorante (7% ácido acético, 30% EtOH).

k. Western blotting

La presencia de P53 en los extractos de proteínas se detectó mediante ensayos de western blotting. Para la realización de estos ensayos se migran los extractos de proteínas en un gel de SDS-PAGE de 1.5 mm de espesor y 12% de acrilamida. Este gel es seguidamente transferido a una membrana de nitrocelulosa.

Se utiliza el método de transferencia húmeda, y la misma transcurre durante 1 hora a 400 mA. La transferencia de los geles de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se realiza en la misma cuba de electroforesis de BioRAD siguiendo las instrucciones del fabricante. El buffer de transferencia utilizado es Tris-glicina 1x, 20% EtOH.

Los lavados de la membrana de nitrocelulosa se realizan en TBST (Tris.Cl 0.01 M pH 7.5, NaCl 0.05 M, Tween 20 0.2%).

Una vez finalizada la transferencia, la membrana es bloqueada en una solución de leche en polvo 5% y glicina 2% en Buffer TBST durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realiza la incubación con el anticuerpo primario, durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación suave. Los anticuerpos primarios utilizados son el C4 anti β actina (Santa Cruz, sc-4778), hecho en ratón (utilizado para la normalización de la cantidad de proteínas en los extractos proteicos) y el anticuerpo DO-1 anti P53, también hecho en ratón. Para el anticuerpo C4 anti β actina se utilizó una dilución 1/1000 (concentración final igual a 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que para el DO-1 una dilución 1/5000 (concentración final igual a 0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Luego de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana es lavada con abundante buffer TBST, en 6 lavados de 5 minutos. Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. El anticuerpo secundario utilizado es el IgG-HRP anti IgG de ratón, hecho en cabra, (Santa Cruz, sc-2005). La dilución utilizada es 1/2500 (concentración final de 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Finalmente, se realizan 10 lavados de la membrana con abundante buffer TBST durante 5 minutos cada uno y esta después es revelada. Para el revelado de las membranas, se utilizó el sustrato de peroxidasa 3 (Sigma, CPS-3-50), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la incubación con el sustrato, se detectó la señal luminiscente en el G-Box Chemi XX6 de Syngene, utilizando un programa de exposición

en una serie de 1 ms, 10 ms, 20 ms, 96 ms, 1 s, 2 s, 5 s y 10 s. En los casos en los que no se detectó una señal suficientemente fuerte, se ensayaron diferentes tiempos de exposición adicionales.

RESULTADOS

Los resultados de presente trabajo se organizan en tres secciones. En la primera sección se muestran los resultados correspondientes al subclonado de las secuencias codificantes de P53 en el vector p414ADH. A continuación se presentan los resultados del ensayo funcional en levaduras utilizando las construcciones realizadas durante el subclonado. Finalmente, en la última sección se encuentran los resultados de la etapa de análisis de expresión de P53 en las levaduras, así como la comparación del nivel de expresión de P53 utilizando el vector p414ADH con la utilización del vector pSS16, como se hace en el FASAY clásico.

1. SUBCLONADO DE SECUENCIAS CODIFICANTES DE TP53 EN p414ADH

Para intentar disminuir el ruido de fondo del ensayo de FASAY clásico, la estrategia experimental utilizada en este trabajo implica el subclonado de la secuencia codificante de P53 en un vector de expresión en levaduras. Se espera que al transformar las diferentes cepas de levadura con plásmidos conteniendo la secuencia de P53 previamente verificada, se observe una importante disminución en el porcentaje de colonias rojas originado por errores en la reacción de PCR o en el proceso de reparación de los plásmidos por recombinación homóloga, como ocurre en el FASAY.

Para ello se decidió subclonar los mutantes sinónimos de P53 y las secuencias control en el vector p414ADH, un plásmido muy similar al vector pSS16. Ambos plásmidos comparten las secuencias promotoras y terminadoras para la expresión del gen clonado (promotor ADH1 y terminador CYC1), la secuencia centromérica y la secuencia de replicación autónoma en levaduras. La principal diferencia entre ambos plásmidos es la selección en levaduras, ya que en el pSS16 la selección se realiza a partir del gen LEU2, mientras que en el p414ADH esta se realiza por el gen TRP1.

El primer paso del subclonado consistía en la amplificación por PCR de las CDS de P53 que se encontraban clonados en el plásmido pcDNA-3. Se realizaron 12 reacciones de

amplificación por PCR, 10 correspondientes a los mutantes sinónimos Pro 1 – Pro 10, y 2 correspondientes a los controles positivo y negativo. Las reacciones de PCR para amplificar estas secuencias funcionaron correctamente. En la Figura 13 se muestra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa, donde se observan los productos de PCR para los 10 mutantes sinónimos y los dos controles. Los 12 productos de PCR migraron a la altura esperada para su longitud de 1182 pb.

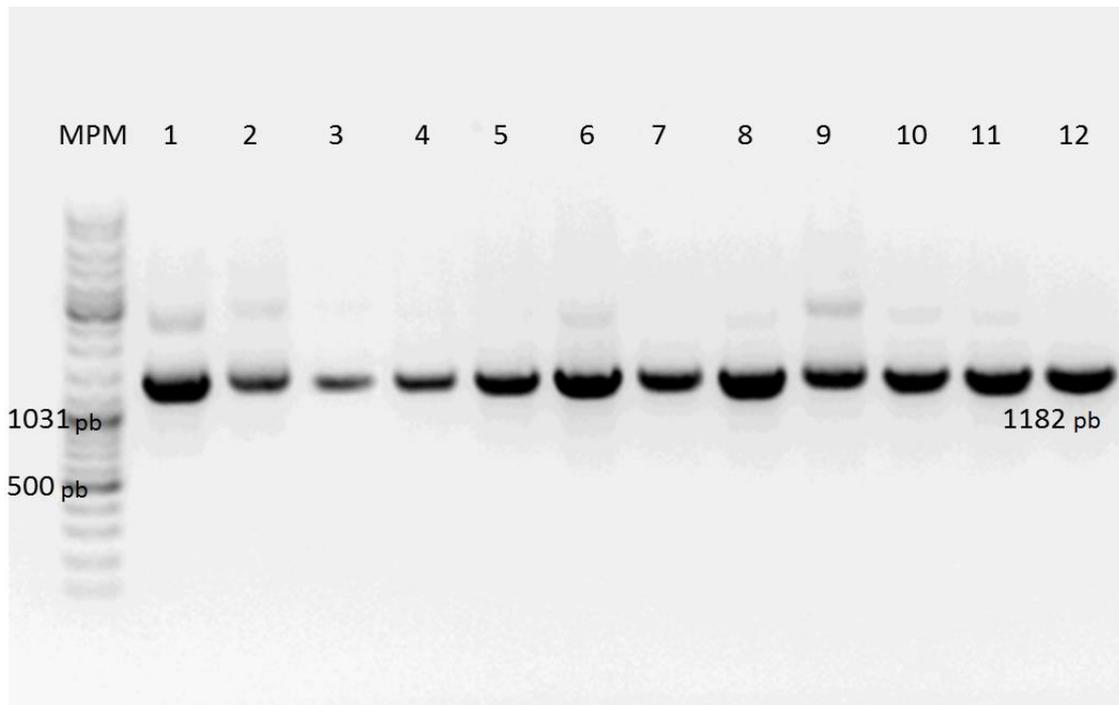


Figura 13. Amplificación por PCR del CDS de P53 – Se muestra un gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed, en el cual se migraron los 12 productos de PCR. Los números 1 y 2 corresponden a los fragmentos de PCR de la CDS de P53 salvaje y el mutante R175H. Los números 3 al 12 corresponden a los mutantes sinónimos de prolina, desde el Pro 1 al Pro 10. Se señalan las bandas correspondientes a 1031 pb y 500 pb en el marcador de peso molecular (Thermo Scientific, #SM0331). Los productos de PCR tienen un tamaño aproximado de 1182pb.

Por otra parte, se realizó la preparación de ADN plásmidico para obtener las cantidades necesarias del vector p414ADH para el subclonado de las 12 secuencias de P53. Los plásmidos se obtuvieron en una concentración promedio de 300 ng/ μ L, obteniéndose un total de 7,5 μ g de plásmido por preparación. En la Figura 14 se muestra un gel de agarosa con dos preparaciones de ADN plasmídico de p414ADH.

El segundo paso del subclonado fue la realización de la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR y del vector p414ADH. Los cebadores utilizados en la reacción de PCR añaden en los extremos 5' y 3' de los productos de PCR los sitios de restricción necesarios para el subclonado. Se utilizaron los sitios de corte para *Bam*HI y *Eco*RI presentes en el sitio de policlonado del vector. Los productos de PCR purificados de gel de agarosa y el plásmido fueron entonces digeridos con ambas enzimas de restricción. Los productos de digestión fueron purificados mediante extracción en gel de agarosa, cuantificados y luego se procedió a realizar la ligación del vector con cada inserto. En la Figura 14 se muestra un gel de agarosa, en el cual se observa el vector digerido y tres productos de PCR, luego de su purificación, en el momento previo a la reacción de ligación.

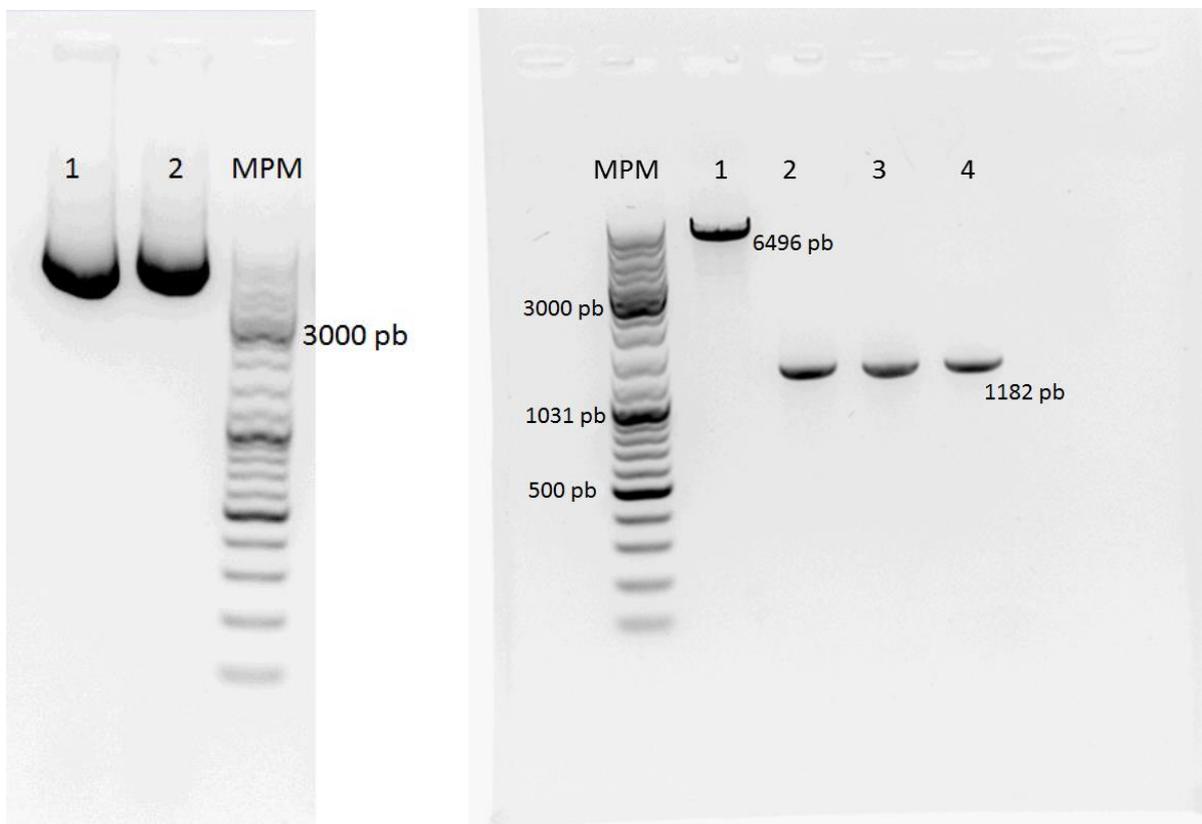


Figura 14. Preparación de plásmido p414 ADH y digestión con enzimas de restricción – Se observan dos gels de agarosa al 1%, teñidos con GelRed. En el gel de la izquierda se observa en los carriles 1 y 2 la migración de dos productos de la preparación del plásmido p414ADH. Se visualiza la migración del plásmido superenrollado. En el gel de la derecha se migró el vector p414ADH luego de la digestión con las enzimas de restricción, por lo cual se encuentra linearizado (1) y los productos de PCR correspondientes a P53 salvaje (2), R175H (3) y Pro 1 (4), todos digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. El marcador de peso molecular utilizado en ambos casos es el #SM0331 de Thermo Scientific.

Una vez realizada la ligación, se transformaron las bacterias *E. coli* DH5- α quimio competentes para obtener los plásmidos recombinantes. La eficiencia de transformación fue del orden de 1×10^7 UFC/ μ g de ADN. De cada placa se realizaron 4 preparaciones de ADN plasmídico, para encontrar plásmidos que hayan incorporado el inserto. En algunos casos se encontró que todas las colonias analizadas contenían el plásmido con inserto, como en el caso del mutante Pro 1, como se puede observar en la Figura 15. En otros casos, no todas las colonias analizadas contenían el inserto, pero siempre al menos había un plásmido recombinante. La presencia de los insertos se evidenció mediante digestión doble de 1 μ L de plásmido con ambas enzimas (10 unidades de cada una) en 20 μ L de reacción, para observar la liberación de los insertos.

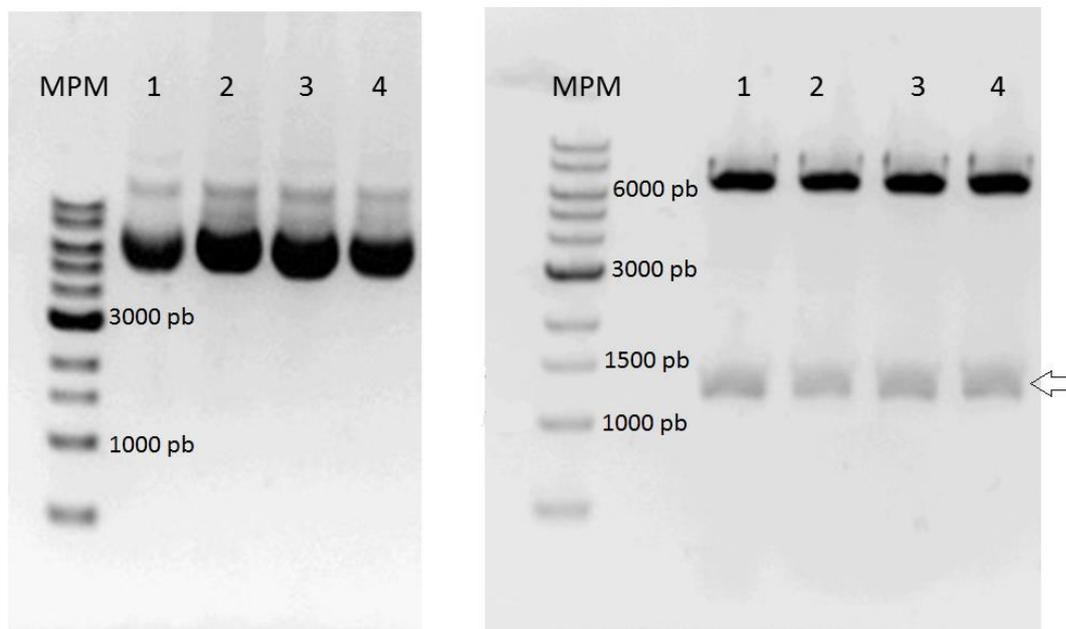


Figura 15. Plásmidos recombinantes Pro 1 – Se muestran dos geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRed. En el gel de la izquierda se muestran los plásmidos extraídos de las cuatro colonias analizadas de la ligación. En el gel de la derecha se muestra el resultado de la digestión de 2 μ L de plásmido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. En todos los casos se evidencia la presencia de la secuencia de P53 clonada, señalada con la flecha de la figura (inserto de 1182 pb). El marcador de peso molecular utilizado en ambos geles es el N3232L de New England BioLabas.

Los plásmidos que contenían un inserto del tamaño adecuado fueron secuenciados utilizando cuatro cebadores diferentes. Estos cebadores se hibridan en diferentes partes de la secuencia codificante para P53, cubriendo entre todos la totalidad de la secuencia.

El análisis de las secuencias se realizó mediante el alineamiento de las secuencias recibidas por parte del servicio de secuenciación, con la secuencia codificante para P53 salvaje extraída del GeneBank. Para la realización de los alineamientos se utilizó el programa BioEdit.

Se buscó que la totalidad de la secuencia fuera igual a los de la secuencia de P53 salvaje, a excepción de los nucleótidos correspondientes a las mutaciones sinónimas (o a la mutación del control negativo R175H). En el caso de los mutantes Pro 1, Pro 5 y Pro 6 se detectaron mutaciones extra originadas por la reacción de PCR. En estos casos fue necesario repetir el subclonado, hasta obtener la secuencia deseada. En las Figuras 16 y 17 se muestra el resultado de dos alineamientos de la secuencia codificante para P53 salvaje extraída del GenBank con secuencias recibidas del servicio de secuenciación para el mutante Pro 5 clonado en el vector p414ADH.

Una vez que se confirmó la secuencia de cada uno de los 10 mutantes sinónimos y de los 2 controles, se dio por finalizada la etapa del subclonado y se comenzaron los ensayos funcionales en levadura.

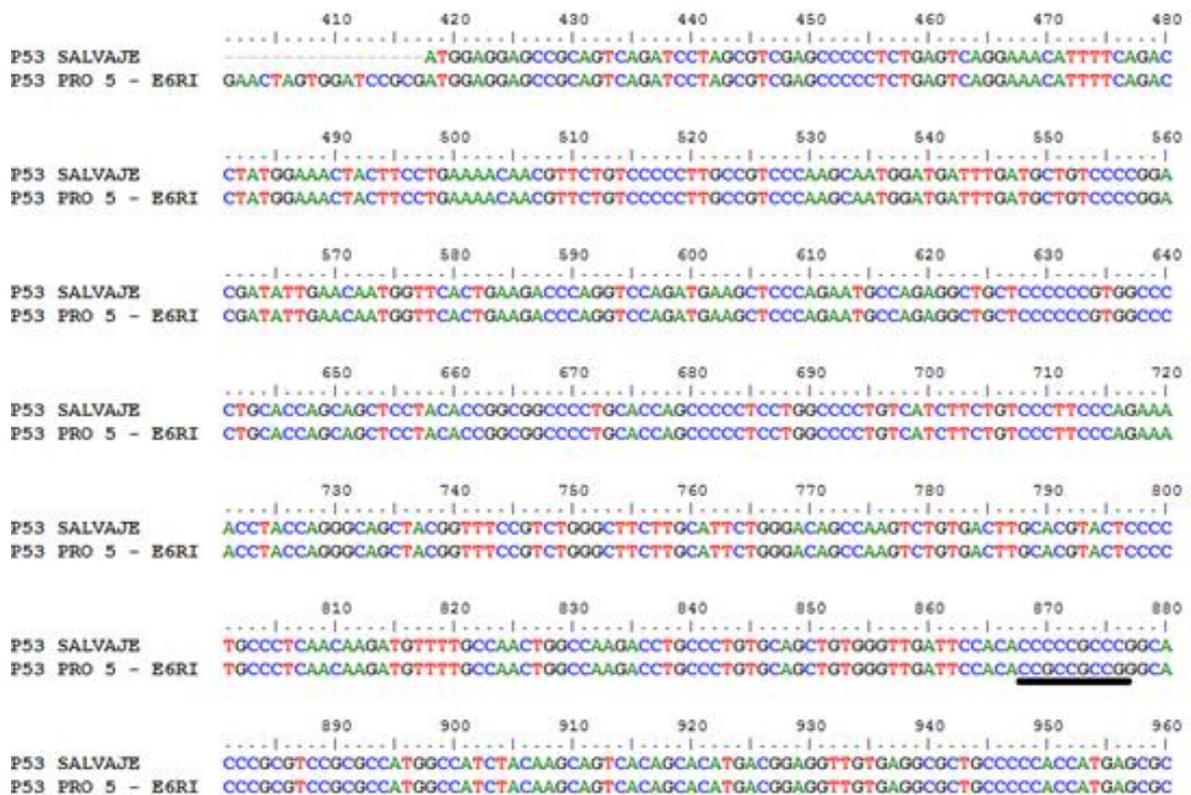


Figura 16. Análisis de secuencias 1 – Se muestra el alineamiento de una secuencia recibida por parte del servicio de secuenciación para el mutante Pro 5 clonado en el vector p414ADH con la secuencia de P53 salvaje. El cebador utilizado en la reacción de secuenciación fue el E6RI. Se destaca la zona de las prolinas 151,152 y 153, en donde se observa la presencia de la mutación correcta.

```

          730      740      750      760      770      780      790      800
P53 SALVAJE  TTCTGCA TGGCGGC ATGAACCG GAGGCCAT CCTCACCA TCATCACAC TGGAAAG ACTCCAGT GGTAAAT CTA CTACTGGGAC
P53 PRO 5 - E6FI TTCTGCA TGGCGGC ATGAACCG GAGGCCAT CCTCACCA TCATCACAC TGGAAAG ACTCCAGT GGTAAAT CTA CTACTGGGAC

          810      820      830      840      850      860      870      880
P53 SALVAJE  GGAACAG CTTTGAGG TGCCTG TTTTGTGC CTGTCTCT GGGAGAG ACCGGCC ACAGAGG AAGAGAA TCTCCGCA AGAAAGGG
P53 PRO 5 - E6FI GGAACAG CTTTGAGG TGCCTG TTTTGTGC CTGTCTCT GGGAGAG ACCGGCC ACAGAGG AAGAGAA TCTCCGCA AGAAAGGG

          890      900      910      920      930      940      950      960
P53 SALVAJE  GAGCCTC ACCACGAG CTGCCCC CAGGGAG CACTAAGC GAGCAGC TGCCCA CAACACC AGCTCCT CTCCCCA GCCAAAGAA
P53 PRO 5 - E6FI GAGCCTC ACCACGAG CTGCCCC CAGGGAG CACTAAGC GAGCAGC TGCCCA CAACACC AGCTCCT CTCCCCA GCCAAAGAA

          970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
P53 SALVAJE  GAAACCAC TGGATGG AGAAAT TTTTCA CCGTT CAGATCC GTGGGCG TGAGCG TTGAGAT GTTCCGAG AGCTGAATG AGG
P53 PRO 5 - E6FI GAAACCAC TGGATGG AGAAAT TTTTCA CCGTT CAGATCC GTGGGCG TGAGCG TTGAGAT GTTCCGAG AGCTGAATG AGG

          1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
P53 SALVAJE  CCTTGGA ACTCAAGG ATGCCCA GCGCTGG GAAGGAG CCGAGGG GGGAGC AGGGCT CACTCCAG CCACTGA AGTCCAAAA AG
P53 PRO 5 - E6FI CCTTGGA ACTCAAGG ATGCCCA GCGCTGG GAAGGAG CCGAGGG GGGAGC AGGGCT CACTCCAG CCACTGA AGTCCAAAA AG

          1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
P53 SALVAJE  GGTCAGT CTACCTC CCGCCAT AAAAAA CTA TGTTC AAGAC AGAAGG GCGCTG ACTCAG ACTGA
P53 PRO 5 - E6FI GGTCAGT CTACCTC CCGCCAT AAAAAA CTA TGTTC AAGAC AGAAGG GCGCTG ACTCAG ACTAACCG GAATTC GATATCAA

```

Figura 17. Análisis de secuencias 2 – Se muestra el alineamiento de una secuencia recibida por parte del servicio de secuenciación para el mutante Pro 5 clonado en el vector p414ADH con la secuencia de P53 salvaje. El cebador utilizado en la reacción de secuenciación fue el E6FI. Este cebador no cubre la zona de las prolinas, pero si logra confirmar la secuencia desde la posición 643 hasta el final de la secuencia.

2. ENSAYO FUNCIONAL EN LEVADURA

Los ensayos funcionales en levadura consistieron en la transformación de las cepas YPH RGC e YPH p21 con las 12 construcciones realizadas en la etapa del subclonado. Las levaduras transformadas fueron plaquedas en placas de medio DO-Trp (selección por el gen TRP1) agar, con 2% de glucosa. La funcionalidad de los diferentes mutantes de P53 es evidenciada por la activación del gen reportero ADE2, que causa el cambio de color en las colonias de levadura, de rojo (previo a la transformación) a blanco.

El día 8 posterior a la transformación se visualizaba correctamente el color en las colonias de levadura. Las transformaciones fueron realizadas al menos tres veces para cada cepa.

Las placas correspondientes al control negativo presentaron un 100 % de colonias rojas para las dos cepas, como era de esperar, ya que este mutante no es capaz de activar la transcripción del gen reportero. Las placas correspondientes al control positivo dieron un promedio de 0.5 % de colonias rojas, y un 99.5% de colonias blancas. Este alto porcentaje de colonias blancas evidencia la eficiente activación del gen reportero por parte de P53 salvaje.

Los mutantes sinónimos presentaron un comportamiento similar al salvaje, con un 99.5% de colonias blancas, sin mostrar diferencias significativas con respecto al salvaje. En la Figura 18 se muestran las fotos de placas transformadas de la cepa YPH RGC y en la Figura 19 de la cepa YPH p21.

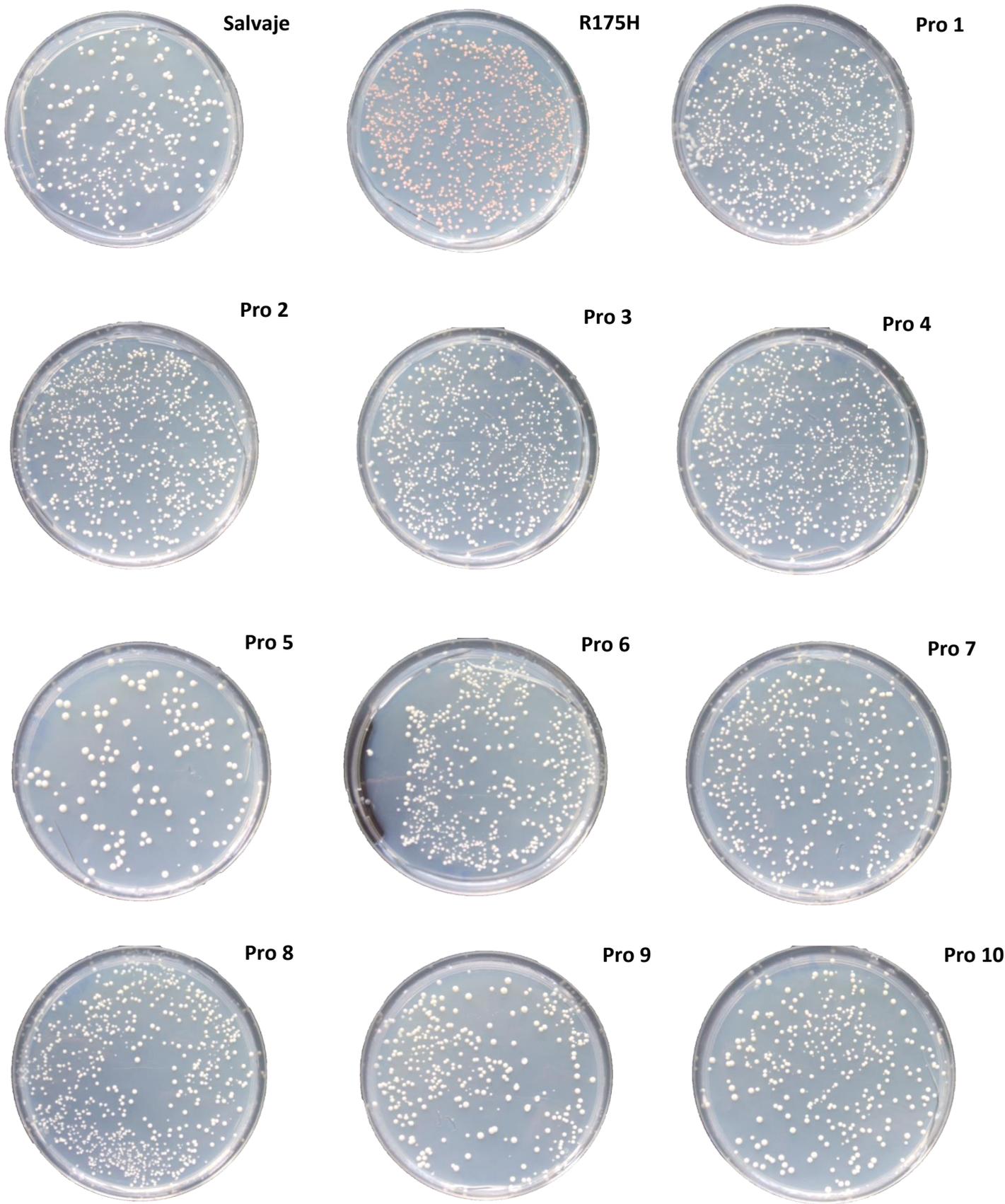


Figura 18. Transformación de la cepa YPH RGC con secuencias codificantes de P53 – Se muestran las placas correspondientes a las transformaciones con de la cepa YPH RGC. La secuencia de P53 transformada, ya sea control o mutante se indica al costado de cada placa.

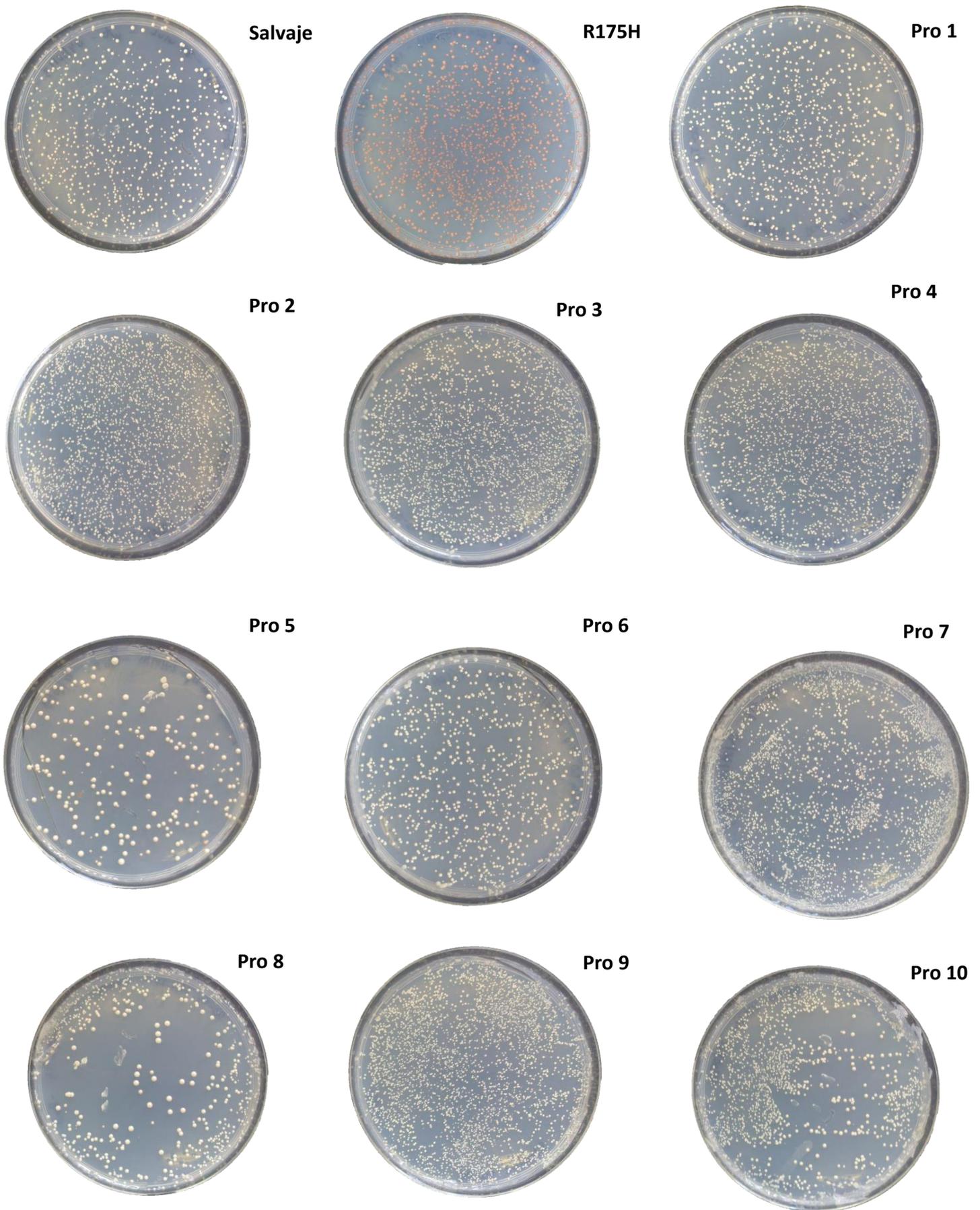


Figura 19. Transformación de la cepa YPH p21 con secuencias codificantes de P53 – Se muestran las placas correspondientes a las transformaciones con de la cepa YPH p21. La secuencia de P53 transformada, ya sea control o mutante se indica al costado de cada placa.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE P53

Para analizar la expresión de los mutantes sinónimos de P53 en el sistema de estudio, se hicieron extracciones de proteínas de levadura.

Se realizaron extracciones de proteínas a partir de cultivos de levaduras derivados de cinco colonias juntas elegidas al azar, a fin de visualizar la expresión de P53 en el conjunto de colonias de un mismo color. De esta forma, se extrajeron proteínas de cultivos inoculados con cinco colonias rojas de la placa correspondiente al control negativo, cinco colonias blancas de las placas de P53 salvaje y de cada uno de los mutantes sinónimos. En los casos en los que aparecían algunas colonias rojas, tanto para el salvaje como para los mutantes sinónimos, también se realizaron extracciones de proteínas de colonias rojas.

Los extractos de proteínas fueron analizados por electroforesis en gels de poliacrilamida y fueron teñidos con azul de Coomassie a fin de visualizar el perfil de proteínas. A su vez, la tinción con azul de Coomassie permitió realizar una estimación de la cantidad de proteína en los extractos, a fin de comparar extractos similares en los ensayos posteriores de western blotting. En la Figura 20 se muestra el perfil de proteínas obtenido en los extractos, en un gel teñido con azul de Coomassie.

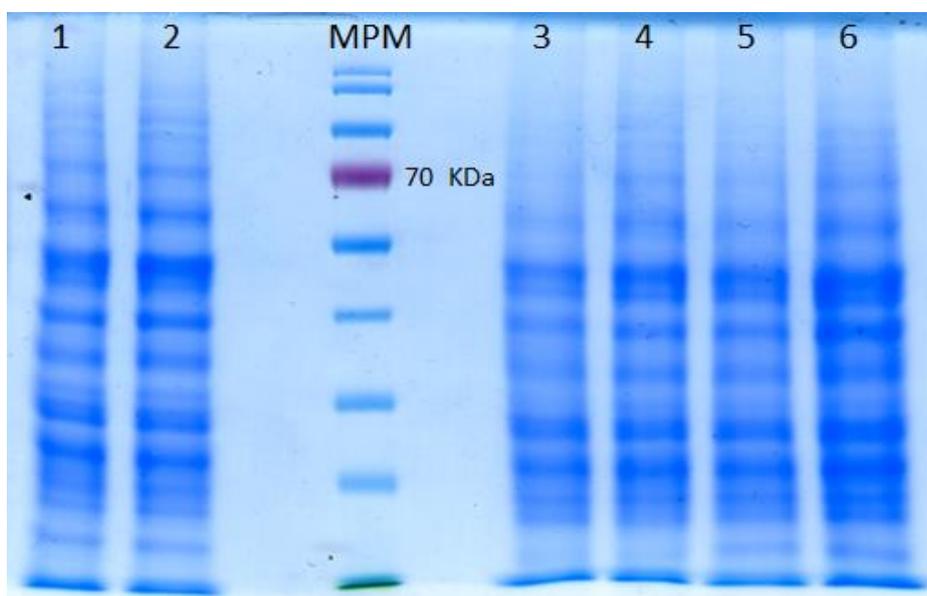


Figura 20. Extracción de proteínas de levadura - Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie, en el cual se migraron extracciones de proteínas de levadura de la cepa YPH p21. Estas corresponden a proteínas extraídas de colonias blancas para el caso de células transformadas con plásmidos p414ADH con P53 salvaje (1) y los mutantes sinónimos de P53 Pro 1 – 4 (3, 4, 5, 6), y a proteínas extraídas de colonias rojas en el caso del R175H (2). El marcador de peso molecular utilizado es el #26626 de Thermo Scientific.

Los extractos con un nivel similar de proteínas se volvieron a migrar en geles de poliacrilamida y fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser analizados en ensayos de western blotting. (El protocolo de extracción no permite la cuantificación de los extractos). A fin de analizar la expresión de P53 y la expresión de actina (como forma de normalizar la cantidad de proteínas en los extractos), los geles para transferir a membranas de nitrocelulosa fueron sembrados en forma simétrica, con el marcador de peso molecular en el medio. Luego de la transferencia, se procedía a cortar la membrana en dos, dejando parte del marcador en ambas mitades. Luego, cada mitad de membrana fue incubada con uno de los anticuerpos primarios, DO-1 para detectar la presencia de P53, y C4 para detectar actina.

En la Figura 21 se muestra el resultado del ensayo de western blot para varios extractos de proteína de levadura. En el caso de las extracciones de colonias blancas de P53 salvaje, en todos los casos se detectó la presencia de P53. Lo mismo ocurrió para las extracciones de las colonias rojas del mutante R175H. Para los mutantes sinónimos, se detectó la presencia de P53 en todos los extractos de colonias blancas. En los extractos correspondientes a colonias rojas, sin embargo, en algunos casos no se detectó la presencia de esta proteína, así como en otros se detectó en un nivel similar al observado en las colonias blancas. Esta misma observación se reportó para los casos de extractos de colonias rojas correspondientes a transformaciones con P53 salvaje.

La presencia de P53 en los extractos de proteínas siempre se detectó como un patrón de bandas, con una banda de alrededor de 53 kDa mayoritaria, y varias bandas de menor masa molecular, inferiores a 50 kDa y mayores a 25 kDa.

La actina se logró detectar en todos los extractos, a una altura cercana a los 41.6 kDa (tamaño esperado para la actina en levaduras), y una banda muy tenue por encima de los 15 kDa.

El último objetivo específico de este trabajo era comparar el nivel de expresión obtenido para P53 en el ensayo de FASAY clásico con el obtenido utilizando nuestra estrategia. El FASAY clásico involucra la utilización del plásmido pSS16 y los productos de PCR con la CDS de P53, mientras que la nueva estrategia requiere el clonado de los mutantes en el vector p414ADH como paso previo a la transformación.

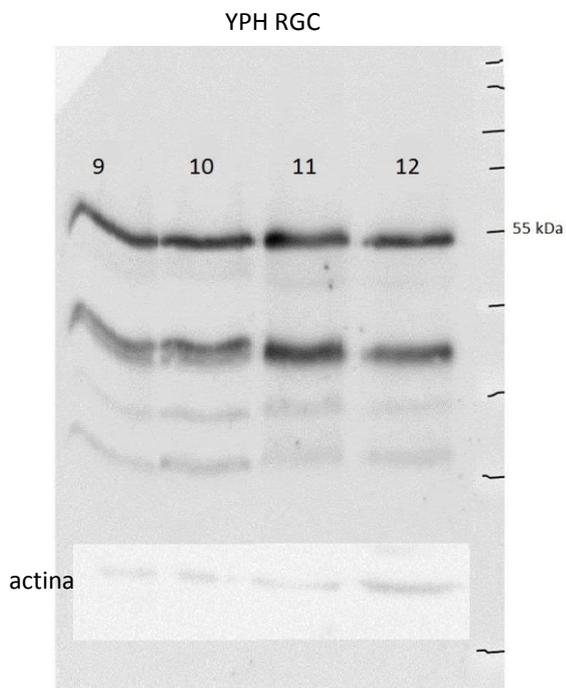
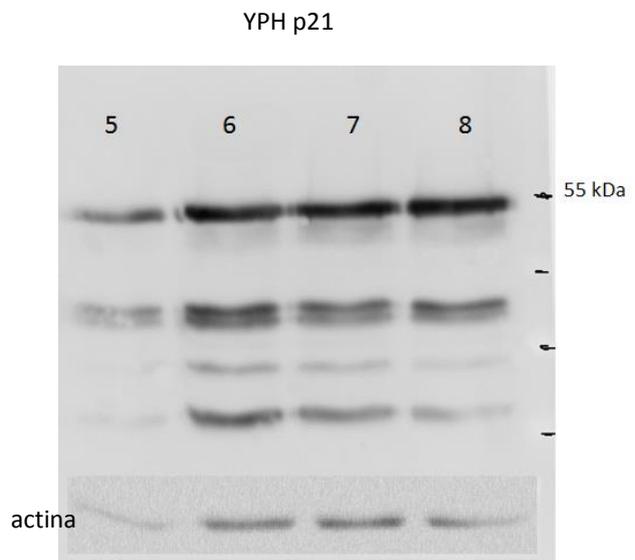
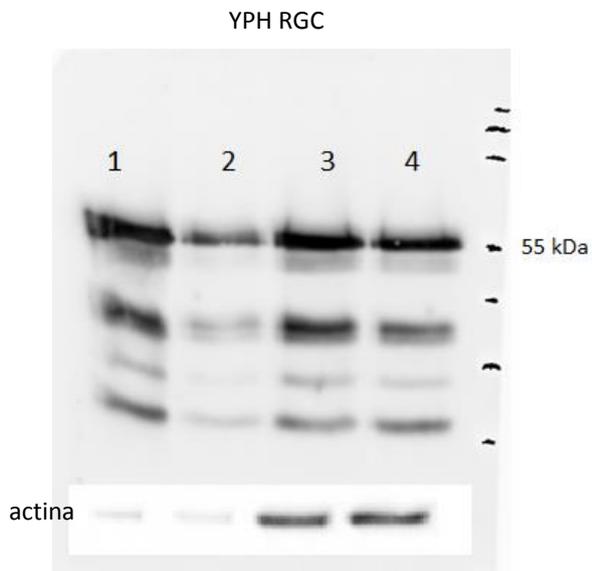


Figura 21. Detección de P53 mediante western blotting

– Se muestran tres membranas de nitrocelulosa, incubadas con el anticuerpo primario DO-1 anti P53 y reveladas con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón HRP. En cada membrana se adjunta en la parte inferior la banda correspondiente a la actina, revelada en la otra mitad de la misma membrana.

A continuación se detallan los extractos que se observan en las membranas: (1) YPH-RGC, P53 salvaje, colonias blancas, (2) YPH-RGC, P53 R175H, colonias rojas, (3) YPH-RGC, P53 Pro 1, colonias blancas, (4) YPH-RGC, P53 Pro 2, colonias blancas, (5) YPH-p21, P53 R175H, colonias rojas, (6) YPH-p21, P53 Pro 1, colonias blancas, (7) YPH-p21, P53 Pro 2, colonias blancas, (8) YPH-p21, P53 Pro 6, colonias blancas, (9) YPH-RGC, P53 Pro 2, colonias rojas, (10) YPH-RGC, P53 Pro 3, colonias rojas, (11) YPH-RGC, P53 Pro 5, colonias blancas, (12) YPH-RGC, P53 Pro 5, colonias rojas. El marcador de peso molecular fue destacado para su visualización, y fue el #26616 de Thermo Scientific. Es importante destacar la presencia de P53 en extractos correspondientes a colonias rojas.

Con este fin se realizaron ensayos funcionales utilizando la metodología del FASAY clásico, transformando a las cepas de levadura con la CDS de P53 salvaje. El FASAY presentó un mayor porcentaje de colonias rojas en comparación con nuestra estrategia, cercano a un 5%, lo que concuerda con lo observado en el trabajo de tesis de Maestría de M. J. Lista⁵⁸.

Seguidamente, se extrajeron proteínas de las colonias blancas de forma análoga a la extracción de proteínas realizada con las colonias de las levaduras transformadas con p414ADH-P53 salvaje y se analizó el nivel de expresión de P53 en ambos sistemas mediante western blotting.

En la Figura 22 se observa el western blot revelado con el anticuerpo DO-1 anti P53. Se muestran las extracciones correspondientes a la cepa YPH p21 e YPH RGC, transformadas con P53 salvaje, para los dos sistemas estudiados. La transferencia de estos extractos fue realizada por duplicado.

A primera vista el nivel de P53 en todos los extractos parecería ser similar. Para confirmar esta observación, se normalizó la señal de P53 en el western blot con la señal obtenida para la actina. La intensidad de las señales se determinó mediante un análisis de densitometría, realizado con el programa Image J. En el Anexo B se presentan los datos de densitometría obtenidos. Para P53 se consideró únicamente la banda mayoritaria de 53 kDa, mientras que para la actina sólo se consideró la banda mayoritaria de 41.6 kDa.

Los resultados no permitieron llegar a conclusiones claras. Se realizaron comparaciones en el nivel de expresión de P53 obtenido en cada cepa por separado. Los resultados indicaron un incremento de la expresión de P53 para la cepa YPH RGC con el sistema nuevo, mientras que para la cepa YPH p21 se observó una disminución. Sería necesario repetir este análisis, utilizando nuevos extractos de proteínas con cantidades equivalentes, y realizar nuevos ensayos de western blotting a fin de obtener una conclusión más definitiva.

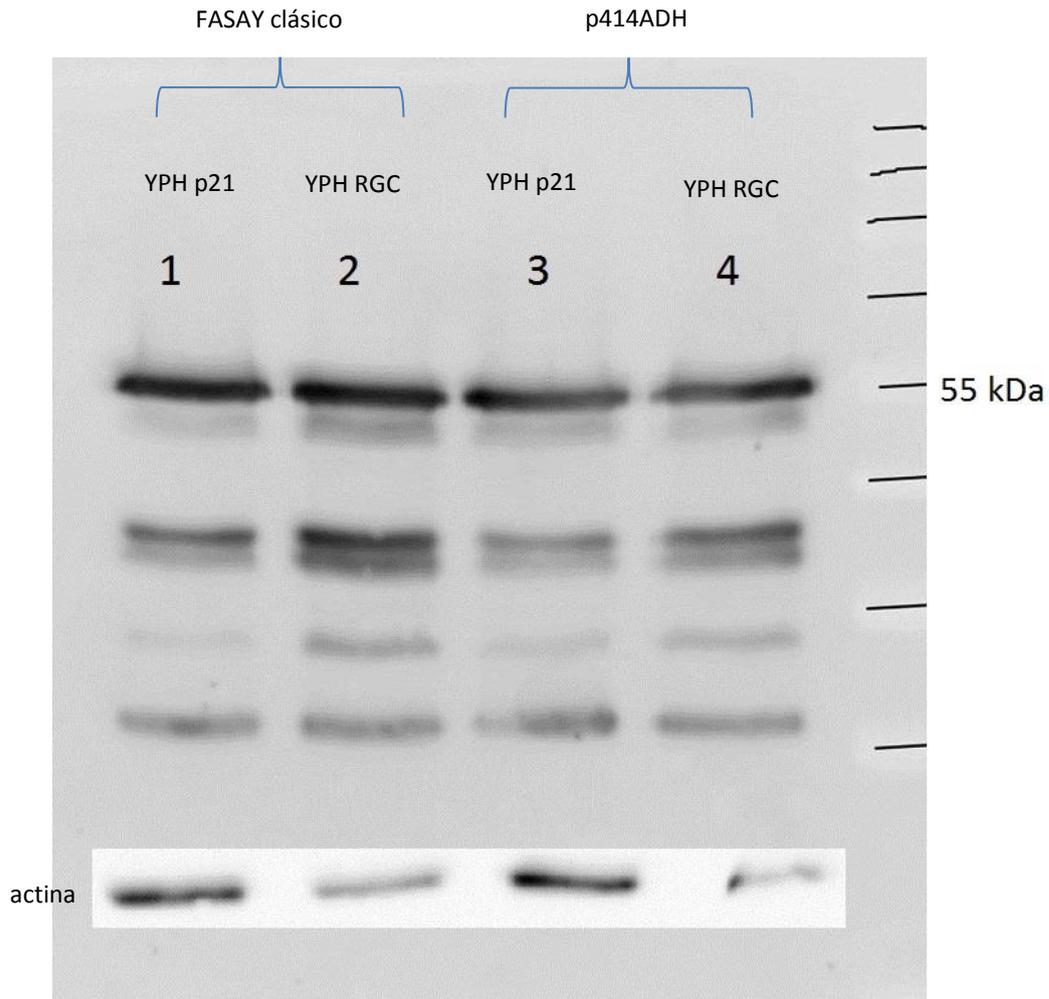


Figura 22. Análisis del nivel de expresión en el sistema FASAY clásico y con el plásmido p414ADH –
 Se muestra un western blot en el cual se analiza la expresión de P53 salvaje en ambos sistemas. Los carriles 1 y 2 corresponden a extracciones de colonias blancas de la cepa YPH-p21 e YPH –RGC, respectivamente, transformadas con el plásmido pSS16 y la CDS de P53. En los carriles 3 y 4 se muestran extracciones de las cepas YPH-P21 e YPH – RGC respectivamente, transformadas con P53 salvaje clonado en p414ADH. En la parte inferior del western blot se muestra la banda correspondiente a la actina, revelada en la otra mitad de la membrana. El marcador de peso molecular utilizado fue el #26616 de Thermo Scientific.

DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo era la evaluación de la actividad transcripcional de diferentes mutaciones sinónimas de P53 en levaduras. Con este fin, se procedió a utilizar una nueva estrategia basada en el sistema FASAY, que intentaba disminuir el ruido de fondo observado para este sistema en trabajos anteriores de nuestro equipo de investigación. El subclonado de los diferentes mutantes sinónimos de P53 en el vector de expresión p414ADH, se presentaba como una estrategia que podría solucionar los problemas ocasionados por los errores introducidos principalmente durante la reacción de PCR del sistema FASAY original. De esta forma, se buscó complementar la caracterización de la funcionalidad de estos mutantes de P53 en el sistema en levaduras, iniciada durante el trabajo de tesis de maestría de la Msc. María José Lista, uno de los antecedentes principales de este trabajo ⁵⁸.

El primero de los objetivos planteados, fue la realización del subclonado de 12 secuencias de P53 en el vector de expresión en levaduras p414ADH. Dos de estas secuencias correspondían a controles (P53 salvaje y mutante R175H), mientras que las 10 restantes eran portadoras de mutaciones sinónimas en los codones codificantes para las prolinas 151, 152 y 153 de P53. El subclonado de estas secuencias en el vector de expresión se pudo llevar a cabo sin dificultades mayores. Si bien se presentó la dificultad de la aparición de mutaciones adicionales en el caso de algunos mutantes durante la amplificación por PCR, mediante la repetición del subclonado se logró obtener la totalidad de las secuencias a analizar.

En lo que respecta a los ensayos funcionales de P53 en levadura, estos se llevaron a cabo sin problemas. El color de las colonias de levadura se logró visualizar con claridad alrededor del día 8 posterior a la transformación. En el caso de los controles, los resultados fueron los esperados, ya que las levaduras transformadas con la secuencia de P53 salvaje mostraron casi un 100% de colonias blancas, lo que indica que se activó adecuadamente la transcripción del gen reportero. En el caso del control negativo, la totalidad de colonias de color rojo muestra la incapacidad de este mutante de activar la transcripción en este sistema. En el caso de los 10 mutantes sinónimos analizados, los resultados claramente indican que no hubo una diferencia significativa en la

activación de la transcripción del reportero ADE2. Esto se evidencia por la aparición de casi la totalidad de colonias de color blanco (99.5%) luego de la transformación.

El resultado obtenido para los mutantes sinónimos contrasta con los resultados de los ensayos de FASAY realizados durante el trabajo de M.J. Lista. En este último, se realizó el FASAY con las secuencias codificantes para los mismos mutantes sinónimos aquí analizados. Los resultados mostraron que tanto la secuencia salvaje como los mutantes sinónimos presentaban colonias rojas y blancas. En el caso de la secuencia salvaje, este porcentaje variaba entre un 5 y 10%. Para algunos de los mutantes sinónimos, este porcentaje ascendía hasta un 25% en promedio. Este aumento en los porcentajes de colonias rojas fue asociado con una posible reducción de funcionalidad de los mutantes⁵⁸. Cuando se propuso la realización del subclonado para mejorar el sistema FASAY, se esperaba encontrar una tendencia similar a la observada en el trabajo anterior. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias entre el alelo salvaje y los diferentes mutantes sinónimos.

Para intentar explicar las diferencias obtenidas entre los resultados para el FASAY clásico en los ensayos realizados por M. J. Lista y los obtenidos en el presente trabajo, se consideró la posibilidad de que hubiera diferencias entre los sistemas en el nivel de expresión de P53. Si la transformación con el plásmido p414ADH resultaba en un nivel mayor de expresión de P53 a aquel obtenido en la transformación utilizando el sistema FASAY clásico, el efecto de las mutaciones sinónimas podría verse enmascarado. Esta explicación ayudaría a compatibilizar los resultados obtenidos anteriormente, que señalaban una pérdida de función parcial de los mutantes. Para evaluar esta hipótesis se realizaron ensayos de FASAY adicionales utilizando el sistema clásico (con el vector pSS16 y el producto de PCR correspondiente a la secuencia salvaje). Los extractos de proteínas de levadura de esta transformación fueron comparados con los de la transformación con el p414ADH-P53 salvaje, y se realizaron ensayos de western blotting para comparar el nivel de expresión de P53. Los resultados obtenidos no permitieron determinar de manera concluyente si hay diferencias significativas en el nivel de expresión para P53 obtenido en los dos sistemas. Esto se debe a que para una cepa se detectó un aumento en el nivel de expresión al utilizar el plásmido p414ADH, mientras que para la otra cepa se observó lo contrario.

El hecho de que estos resultados no sean concluyentes podría explicarse por la utilización de extractos proteicos con cantidades de proteínas no equivalentes. Esto se evidencia al comparar el nivel de actina en los extractos, el cual no fue muy parejo. Si bien se visualizaron los extractos de proteínas con azul de Coomassie antes del ensayo de western blotting, y se intentó comparar extractos similares, es posible que las diferencias en la cantidad de proteína entre los extractos causen la saturación del sistema y que por tanto la estimación de la densidad de las bandas no se correlacione directamente con la cantidad de proteína. Se podrían probar diferentes protocolos de extracción de proteínas de levadura que permitan cuantificar la concentración de proteínas totales en los extractos, a fin de comparar cantidades equivalentes de proteínas.

Proponemos que si bien existe la posibilidad de que haya diferencias en el nivel de expresión, es probable que no haya diferencias muy grandes, ya que en ambos plásmidos la expresión de P53 está bajo el control del mismo promotor (ADH1) y el mismo terminador (CYC1). A su vez, ambos plásmidos comparten la secuencia centromérica y la secuencia de replicación autónoma en levaduras (CEN6/ARSH4), lo que indicaría que se produce un mismo número de copias por célula.

En los ensayos de western blotting para los mutantes sinónimos de P53, se logró detectar la proteína tanto en las colonias blancas, como en algunas de las colonias rojas.

En todos los casos, P53 se detectó con un patrón de bandas, siendo la de 53 kDa la banda mayoritaria, acompañada de varias bandas adicionales de menor peso molecular. Las mismas bandas adicionales aparecen en todas las extracciones de proteínas de P53, tanto de P53 salvaje, como del R175H o los mutantes sinónimos. Además, aparecen siempre en una forma bastante reproducible y la cantidad de cada banda parecería a simple vista relacionarse con la cantidad total de P53. No creemos que se trate de degradación proteica al azar, ya que el patrón es siempre el mismo. También se descarta que sean producto de reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo, ya que en colonias sin P53, ninguna de estas bandas aparece. Una posibilidad es que este patrón sea debido al clivaje proteolítico de la proteína en ciertas posiciones que queden expuestas a proteasas presentes en la levadura. Otra

posibilidad sería que alguna de estas bandas sea originada por la producción de alguna isoforma de P53 que se genere a partir de la formación de estructuras secundarias en el ARNm de P53 (como algún IRES por ejemplo). A pesar de que es muy interesante el análisis de este fenómeno, claramente escapa a los objetivos planteados en este trabajo, si bien puede ser de interés como tema central de futuros trabajos.

En los casos en los que no se detectó la presencia de P53 en colonias rojas tanto del salvaje como de los mutantes sinónimos, podríamos afirmar que se trata de mutantes de reversión del genotipo *-trp*. Este fenómeno de reversión en *S. cerevisiae* está reportado para varios loci (como *-leu3* y *-his1*) y ocurre con una frecuencia relativamente baja ⁶² (en nuestro caso, podemos decir que menos del 0.5% de las colonias eran mutantes de reversión).

Sin embargo, en los casos en que se detectó la presencia de P53 en colonias rojas tanto del salvaje como de los mutantes sinónimos, tendríamos una situación similar a lo observado en el trabajo de M. J. Lista. Estas colonias rojas que fueron transformadas con la secuencia codificante para P53, tanto salvaje como portadora de mutaciones sinónimas, expresan proteínas incapaces de activar la transcripción del gen reportero. Sin embargo, colonias blancas, en la misma placa, transformadas con el mismo plásmido, activan de forma eficiente la transcripción del gen reportero.

Se ha reportado la falta de funcionalidad de P53 salvaje en proteínas que pierden el átomo de zinc en sus monómeros, lo que causa la inestabilidad de la misma.⁶³ Además, la flexibilidad en la estructura de P53 permitiría que esta sea capaz de sufrir diferentes cambios conformacionales, pudiendo alguno de estos llevar a una forma inactiva. Se ha mostrado por ejemplo que el dominio amino terminal es capaz de formar agregados *in vitro* ⁶⁴. Es posible que en estas colonias, el contexto celular ocasione que P53 se encuentre en una de estas conformaciones inactivas. Otra posibilidad es que una parte de estas colonias rojas contengan mutantes espontáneos de P53. La secuenciación de los plásmidos extraídos de estas colonias de levadura podría brindar una respuesta definitiva a esta interrogante.

Otra explicación para las colonias rojas que contienen P53 podría ser que en esos casos P53 sea funcional pero que haya problemas en el gen reportero (por ejemplo

mutaciones introducidas durante el proceso de transformación) que impidan que se evidencie la actividad de P53.

Otra pregunta que surge de este trabajo es por qué hay una diferencia tan grande en lo observado para los mutantes sinónimos con el FASAY clásico y nuestra estrategia experimental. Es decir, para los mutantes sinónimos analizados por FASAY clásico, se observó un incremento en el porcentaje de colonias rojas para algunos de los mutantes aquí analizados, como el Pro 1, Pro6, Pro 8 y Pro 10 (referido como Pro 12 en el trabajo de M. J. Lista), mientras que en este trabajo no se detectaron diferencias en la aparición de colonias rojas en comparación con el salvaje.

Como una primera aproximación para entender la causa de estas diferencias, se podría realizar un estudio estadístico del ensayo de FASAY clásico, a fin de determinar la significancia de las diferencias observadas con el salvaje, y el porcentaje de error asociado a este sistema. De esta forma podríamos descartar que las diferencias observadas entre los mutantes sinónimos y el salvaje son ocasionadas por un error estadístico. Para esto, se podría elegir uno de los mutantes de FASAY que haya mostrado más diferencias en el porcentaje de colonias rojas y realizar repeticiones del ensayo FASAY con este mutante y el salvaje. De esta manera, se tendrá un mayor apoyo estadístico en cuanto a la reproducibilidad de estos experimentos. Se podría realizar un estudio similar utilizando el sistema con el vector p414ADH y el mismo mutante, a fin de comparar los resultados obtenidos.

En el caso en que esta diferencia sea reproducible estadísticamente, deberíamos estudiar entonces el resto de las variables posibles en los dos ensayos. Por ejemplo, se podría subclonar la secuencia de P53 salvaje y portador de una de estas mutaciones sinónimas en otro vector de expresión, como el p416ADH, el cual es muy similar al p414ADH, pero tiene una selección diferente. Este plásmido porta el gen URA3, que permite que las levaduras crezcan en medio sin uracilo. De esta forma, podríamos estudiar el efecto que podría tener una diferente selección en el crecimiento de estas colonias. Para entender mejor las diferencias observadas se podría subclonar los mutantes en el mismo plásmido pSS16, a fin de obtener la réplica exacta de lo que sucede en el FASAY pero con la diferencia de que la secuencia de P53 a utilizar estaría completamente verificada antes de la transformación.

El hecho de que en nuestros experimentos no se hayan observado diferencias entre la capacidad de activar la transcripción de los mutantes sinónimos y el salvaje, no significa que estas mutaciones sean neutrales para la función de P53. En primer lugar, como hemos visto, P53 tiene actividades adicionales a la actividad transcripcional, las cuales no son evaluadas con este sistema. Asimismo, es posible que en este sistema no se observen diferencias en la activación de la transcripción, mientras que sí puede haber diferencias en otros sistemas.

Como perspectivas de este trabajo, podríamos decir que se logró mejorar el sistema original al disminuir prácticamente a cero el efecto ocasionado por los errores en la reacción de PCR. Sin embargo, la realización del subclonado le quita practicidad al sistema, por ejemplo para otras aplicaciones como el uso como diagnóstico.

En cuanto al rol de estas mutaciones sinónimas, si bien no se observó un efecto evidente, es posible que efectos sutiles en la actividad transcripcional de los mutantes no puedan ser apreciados por este sistema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells, *Nature* 278, 261-263.
2. Linzer, D. I., and Levine, A. J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell* 17, 43-52.
3. DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., and Old, L. J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 2420-2424.
4. Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C. M. (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13, *Nature* 320, 84-85.
5. May, P., and May, E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene* 18, 7621-7636.
6. Basset-Seguin, N., Moles, J. P., Mils, V., Dereure, O., and Guilhou, J. J. (1993) TP53 tumor-suppressor gene and human carcinogenesis, *Experimental Dermatology* 2, 99-105.
7. Joerger, A. C., and Fersht, A. R. (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53, *Annual Review of Biochemistry* 77, 557-582.
8. Levine, A. J., and Oren, M. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex, *Nature Reviews. Cancer* 9, 749-758.
9. Ziemer, M. A., Mason, A., and Carlson, D. M. (1982) Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs, *The Journal of Biological Chemistry* 257, 11176-11180.
10. Malecka, K. A., Ho, W. C., and Marmorstein, R. (2009) Crystal structure of a p53 core tetramer bound to DNA, *Oncogene* 28, 325-333.
11. Stavridi, E. S., Huyen, Y., Sheston, E. A., and Halazonetis, T. D. (2005) The Three Dimensional Structure of p53, In *The p53 Tumor Suppressor Pathway in Cancer* (Zambetti, G. P., Ed.), pp 25-52, Springer Science Business Media, Inc., New York.
12. Tsai, W. W., and Craig Barton, M. (2010) p53, In *Signaling Pathways in Liver Diseases* (Dufour, J. F., and Clavien, P. A., Eds.), pp 345 - 357, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
13. Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., and Prives, C. (2002) The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells, *Oncogene* 21, 9-21.

14. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations, *Science* 265, 346-355.
15. Nicholls, C. D., McLure, K. G., Shields, M. A., and Lee, P. W. (2002) Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect, *The Journal of Biological Chemistry* 277, 12937-12945.
16. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53, *Nature Genetics* 1, 45-49.
17. Beckerman, R., and Prives, C. (2010) Transcriptional regulation by p53, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000935.
18. Laptenko, O., and Prives, C. (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities, *Cell Death and Differentiation* 13, 951-961.
19. Grossman, S. R. (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response, *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268, 2773-2778.
20. MacLachlan, T., and el-Deiry, W. S. (2005) Transcriptional Activation by p53: Mechanisms and Targeted Genes, In *The p53 Tumor Suppressor Pathway in Cancer* Springer Science Business Media, Inc (GP, Z., Ed.), pp 53-80, Springer Science Business Media, Inc, New York.
21. Rinn, J. L., and Huarte, M. (2011) To repress or not to repress: this is the guardian's question, *Trends in Cell Biology* 21, 344-353.
22. Zilfou, J. T., and Lowe, S. W. (2009) Tumor suppressive functions of p53, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001883.
23. Vousden, K. H., and Lane, D. P. (2007) p53 in health and disease, *Nature Reviews. Molecular cell biology* 8, 275-283.
24. Miller, S. D., Farmer, G., and Prives, C. (1995) p53 inhibits DNA replication in vitro in a DNA-binding-dependent manner, *Molecular and Cellular Biology* 15, 6554-6560.
25. Vaseva, A. V., and Moll, U. M. (2009) The mitochondrial p53 pathway, *Biochimica et Biophysica Acta* 1787, 414-420.
26. Pei, D., Zhang, Y., and Zheng, J. (2012) Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx, *Oncotarget* 3, 228-235.
27. Perry, M. E. (2010) The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000968.
28. Marcel, V., and Hainaut, P. (2009) p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity?, *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 66, 391-406.
29. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York.
30. Rodrigues, N. R., Rowan, A., Smith, M. E., Kerr, I. B., Bodmer, W. F., Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1990) p53 mutations in colorectal cancer, *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 7555-7559.
31. Malkin, D. (2011) Li-fraumeni syndrome, *Genes & Cancer* 2, 475-484.
 32. Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., Bradley, A., and Donehower, L. A. (1993) Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice, *Nature Genetics* 5, 225-229.
 33. Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation, *Cell* 57, 1083-1093.
 34. Oren, M. (1992) p53: the ultimate tumor suppressor gene?, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 3169-3176.
 35. Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database, *Human Mutation* 28, 622-629.
 36. Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001008.
 37. Freed-Pastor, W. A., and Prives, C. (2012) Mutant p53: one name, many proteins, *Genes & Development* 26, 1268-1286.
 38. Guimaraes, D. P., and Hainaut, P. (2002) TP53: a key gene in human cancer, *Biochimie* 84, 83-93.
 39. Ano Bom, A. P., Rangel, L. P., Costa, D. C., de Oliveira, G. A., Sanches, D., Braga, C. A., Gava, L. M., Ramos, C. H., Cepeda, A. O., Stumbo, A. C., De Moura Gallo, C. V., Cordeiro, Y., and Silva, J. L. (2012) Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer, *The Journal of Biological Chemistry* 287, 28152-28162.
 40. Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A. J. (1993) Gain of function mutations in p53, *Nature Genetics* 4, 42-46.
 41. Muller, P. A., and Vousden, K. H. (2013) p53 mutations in cancer, *Nat Cell Biol* 15, 2-8.
 42. Chamary, J. V., Parmley, J. L., and Hurst, L. D. (2006) Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals, *Nature Reviews. Genetics* 7, 98-108.
 43. Plotkin, J. B., and Kudla, G. (2011) Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias, *Nature Reviews. Genetics* 12, 32-42.
 44. Sharp, P. M., Stenico, M., Peden, J. F., and Lloyd, A. T. (1993) Codon usage: mutational bias, translational selection, or both?, *Biochemical Society transactions* 21, 835-841.

45. Sauna, Z. E., and Kimchi-Sarfaty, C. (2011) Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease, *Nature Reviews. Genetics* 12, 683-691.
46. Akashi, H. (1994) Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy, *Genetics* 136, 927-935.
47. Angov, E. (2011) Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins, *Biotechnology Journal* 6, 650-659.
48. Marin, M. (2008) Folding at the rhythm of the rare codon beat, *Biotechnology Journal* 3, 1047-1057.
49. Crombie, T., Boyle, J. P., Coggins, J. R., and Brown, A. J. (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, *European Journal of Biochemistry / FEBS* 226, 657-664.
50. Lamolle, G., Marin, M., and Alvarez-Valin, F. (2006) Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers, *Mutation Research* 600, 102-112.
51. Ishioka, C., Frebourg, T., Yan, Y. X., Vidal, M., Friend, S. H., Schmidt, S., and Iggo, R. (1993) Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast, *Nature Genetics* 5, 124-129.
52. Scharer, E., and Iggo, R. (1992) Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast, *Nucleic Acids Research* 20, 1539-1545.
53. Frebourg, T., Barbier, N., Kassel, J., Ng, Y. S., Romero, P., and Friend, S. H. (1992) A functional screen for germ line p53 mutations based on transcriptional activation, *Cancer Research* 52, 6976-6978.
54. Flaman, J. M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Chappuis, P., Sappino, A. P., Limacher, I. M., Bron, L., Benhattar, J., and et al. (1995) A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3963-3967.
55. Stotz, A., and Linder, P. (1990) The ADE2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: sequence and new vectors, *Gene* 95, 91-98.
56. Fronza, G., Inga, A., Monti, P., Scott, G., Campomenosi, P., Menichini, P., Ottaggio, L., Viaggi, S., Burns, P. A., Gold, B., and Abbondandolo, A. (2000) The yeast p53 functional assay: a new tool for molecular epidemiology. Hopes and facts, *Mutation Research* 462, 293-301.
57. Smardova, J., Smarda, J., and Koptikova, J. (2005) Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast, *Differentiation; Research in Biological Diversity* 73, 261-277.
58. Lista, M. J. (2013) Actividad Transcripcional de la proteína supresora de tumores P53, en *Saccharomyces cerevisiae*: efecto de mutaciones sinónimas

- relacionadas a la patología tumoral, *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA*, Universidad de la República, Uruguay.
59. Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* *122*, 19-27.
 60. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* *96*, 23-28.
 61. Sambrook, J., and Russel, D. W. (2011) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 62. Fogel, S., Lax, C., and Hurst, D. D. (1978) Reversion at the *His1* locus of yeast, *Genetics* *90*, 489-500.
 63. Butler, J. S., and Loh, S. N. (2003) Structure, function, and aggregation of the zinc-free form of the p53 DNA binding domain, *Biochemistry* *42*, 2396-2403.
 64. Rigacci, S., Bucciantini, M., Relini, A., Pesce, A., Gliozzi, A., Berti, A., and Stefani, M. (2008) The (1-63) region of the p53 transactivation domain aggregates in vitro into cytotoxic amyloid assemblies, *Biophysical journal* *94*, 3635-3646.

ANEXOS

A. COMPLEMENTO DE MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

LB (Luria broth base, Miller) – Medio rico para bacterias

Se utilizó el medio L1900 de Sigma Aldrich. Se prepara con 15.5 g de medio por litro.

Para hacerlo sólido se agregan 15 g de agar por litro de medio.

Esterilizar con autoclave.

YPD (Yeast-Peptone-Dextrose) – Medio rico para levaduras

Para un litro:

5 g de extracto de levadura

20 g de peptona

20 g de glucosa anhidra

Para hacerlo sólido, se agregan 15 g de agar por litro de medio.

Esterilizar con autoclave.

DO-Trp (Drop Out Tryptophan) – Medio selectivo para levaduras

Para un litro:

0.74 g de mezcla de aminoácidos sin triptófano

6.7 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos

Para hacerlo sólido se agregan 15 g de agar por litro de medio.

Ajustar el pH a 5.8 y esterilizar con autoclave.

Antes de utilizar, agregar glucosa al 2%.

DO-Leu (Drop Out Leucine) – Medio selectivo para levaduras

Para un litro:

0.69 g de mezcla de aminoácidos sin leucina

6.7 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos

Para hacerlo sólido se agregan 15 g de agar por litro de medio.

Ajustar el pH a 5.8 y esterilizar con autoclave.

Antes de utilizar, agregar glucosa al 2%.

MML (Médio Mineral Mínimo) – Medio mínimo para levaduras

Para un litro:

6.7 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos

Esterilizar con autoclave.

2. Transformación de levaduras y extracción de proteínas (soluciones)

BufferTE/LiAc (Tris-EDTA/Acetato de Litio)

10% Acetato de Litio 1M estéril, 10% TE 10x estéril

Filtrar con filtro de 0.22 μm antes de utilizar.

Buffer TE/LiAc/PEG40%

Preparación: masar 2g de polietilenglicol (PM 3350 g/mol) y enrasar a 5 mL con buffer TE/LiAc.

Calentar para disolver. Filtrar con filtro de 0.22 μm antes de utilizar.

Preparar en el momento de la transformación.

Buffer de extracción de proteínas

Tris.Cl 25 mM pH 6.8, glicerol 10%, β mercaptoetanol 5%, SDS 5%, urea 8 M y azul de bromofenol (una punta de espátula).

3. Preparación de geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en geles preparados de la siguiente manera:

Gel separador		Gel concentrador	
H ₂ O mQ	7.875 mL	H ₂ O mQ	4.575 mL
4x Tris.Cl/SDS, pH 8.8	5.625 mL	4x Tris.Cl/SDS, pH 6.8	1.875 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30/0.8%	9mL	Acrilamida/Bisacrilamida 30/0.8%	0.965 mL
APS 10%	0.150 mL	APS 10%	0.075 mL
TEMED	0.030 mL	TEMED	0.015 mL

Estas cantidades son suficientes para dos geles de acrilamida al 12%, de 1.5 mm de espesor. Los buffers utilizados son los siguientes: 4x Tris.Cl/SDS pH 8.8 (0.5 M Tris.Cl con 0.4% de SDS) y 4x Tris.Cl/SDS pH 6.8 (1.5 M Tris.Cl con 0.4% de SDS).

B. ANÁLISIS DE DENSITOMETRÍA

Los análisis de densitometría de las bandas correspondientes a ensayos de western blotting se realizaron utilizando el programa Image J. A continuación se detallan las intensidades de las bandas medidas para los westerns blots utilizados para la comparación del nivel de expresión de P53 en los dos sistemas.

Tabla B.1. Datos de análisis de densitometría – En la tabla se indican los datos obtenidos para los análisis de densitometría sobre las bandas de P53 y actina correspondientes a dos ensayos de western blot en los que se intentó analizar las diferencias en el nivel de expresión de P53. Las barras entre los números separan los datos obtenidos para cada duplicado de las membranas. Se muestran los datos de densitometría para las bandas individuales y el cociente de P53/actina. En la última columna se especifica el promedio de los valores de la columna P53/Actina

Sistema, cepa	P53	Actina	P53/Actina	Promedio
FASAY clásico, cepa YPH p21	6567.062/7303.569	7395.518/6477.962	0.887/1.127	1.007
FASAY clásico, cepa YPH RGC	5959.477/6204.305	4999.983/3075.598	1.191/2.017	1.604
p414ADH, cepa YPH p21	4619.406/8036.040	9310.368/6697.255	0.496/1.199	0.8475
p414ADH, cepa YPH RGC	3759.981/6346.225	2094.669/1835.719	1.795/3.457	2.626

Para visualizar los cambios en el nivel de expresión de P53, se compararon los promedios del cociente P53/actina obtenidos para la misma cepa, en los dos sistemas diferentes, de la siguiente manera:

Para la cepa YPH p21: (Promedio p414ADH/Promedio FASAY clásico) = 0.841

Para la cepa YPH RGC: (Promedio p414ADH/Promedio FASAY clásico) = 1.637

Para la cepa YPH RGC, el sistema con el plásmido p414ADH resultaría en un aumento en el nivel de expresión de P53, mientras que para la cepa YPH p21 la nueva estrategia causaría una disminución en el nivel de expresión de P53.

La repetición de este experimento y la utilización de extractos de proteínas con bajas concentraciones de ambas proteínas (a fin de no saturar la señal de ninguna de las proteínas) podría proporcionar una respuesta definitiva a esta pregunta.

C. ABREVIACIONES UTILIZADAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico; **m:** mensajero; **r:** ribosomal; **t:** de transferencia

ADH: Alcohol deshidrogenasa

CBP: CREB Binding protein, proteína activadora de la transcripción

CDS: Coding sequence; Secuencia codificante

CT: Carboxilo terminal, de esta forma se denomina el dominio carboxilo terminal de P53

DBD: DNA binding domain, dominio de unión al ADN

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

FASAY: Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast; Análisis funcional de alelos separados en levadura

IARC: International Agency for Research in Cancer, Agencia internacional para la investigación en cáncer

IRES: Internal Ribosome Entry Site; Sitio interno de entrada al ribosoma

O.N: Overnight, toda la noche

PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilenglicol

PRR: Proline Rich Region; Región rica en prolina

RGC: Ribosomal Gene Cluster; Cluster de genes ribosomales

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis; Electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecil sulfato de sodio

TAD: Transactivation Domain; Dominio de transactivación

TET: Tetramerization Domain; Dominio de tetramerización

UTR: Untranslated Region; Región no traducida