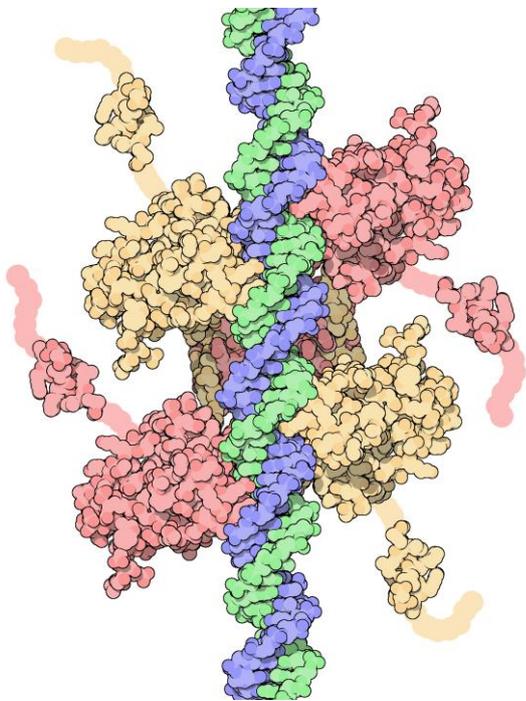


TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



“Evaluación de la
funcionalidad de mutantes
sinónimos de la proteína
supresora de tumores p53
en células humanas”

Florencia Cabrera

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

Agosto 2015

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a las agencias financiadoras e instituciones que permitieron la realización de esta tesis: Facultad de Ciencias, Programa ECOS y CSIC.

A los evaluadores por acceder a corregir la tesis en tan corto plazo y por sus comentarios.

A mis compañeros de la sala 305 por y a Mónica por permitirme formar parte de este grupo y por todas las oportunidades que me ha dado. A Majo y Nacho por todo lo que me ayudaron durante la realización de esta tesis. Al Dr. Robin Fåhraeus, por recibirme amablemente en su laboratorio.

A los compañeros de la Sección Bioquímica, en la que he aprendido mucho, y donde me he sentido muy apreciada y valorada.

A mi familia, que siempre me ha apoyado.

A mis amigos de la vida y de la facultad.

A Rafa, por su apoyo, compañía y amor.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Mutaciones sinónimas	1
La proteína supresora de tumores p53	5
Funciones y mecanismos de acción.....	5
Estructura	6
Regulación	6
Mutaciones en p53	7
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Células, transfección y vectores.....	10
Extracción de ARN y PCR en tiempo real (qPCR)	11
Ensayos de gen reportero (ensayos de Luciferasa)	12
Ensayos de Western Blot (WB)	12
Inmunofluorescencia	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
FUNCIONALIDAD DE MUTANTES DE p53	14
Análisis de la expresión de blancos de p53	14
Ensayos de gen reportero - Luciferasa	16
CAUSAS DE LA DISMINUCIÓN DE LA FUNCIONALIDAD	19
Niveles de expresión de p53.....	19
Ensayos de degradación diferencial	20
Localización subcelular	22
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	29
Soluciones y buffers utilizados.....	29
Vectores utilizados.....	30
Tabla de uso de codones en humanos.....	31

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son el principal producto génico de la célula y las moléculas efectoras de ésta por excelencia. Son sumamente diversas, lo cual permite que lleven a cabo una gran variedad de funciones. La biosíntesis de estas moléculas es un proceso complejo en el que está involucrado un gran número de factores, tanto proteicos como nucleicos, y se encuentra finamente regulado. La propia secuencia codificante de una proteína representa en sí misma un punto de regulación. La degeneración del código genético implica que para un mismo aminoácido existen varios posibles codones (y por ende, ARNs de transferencia) que lo codifiquen, y por lo tanto, la elección del codón codificante en cada caso puede tener un efecto sobre el producto proteico final, al influir sobre distintos procesos que se describen a continuación.

Mutaciones sinónimas

Tradicionalmente, el estudio de la variación genética humana se ha concentrado en el análisis de mutaciones que dan lugar a un cambio en la secuencia aminoacídica de las proteínas que codifican. Por el contrario, las mutaciones sinónimas, es decir, aquellas que no cambian la identidad del aminoácido que codifican, han sido consideradas como poco relevantes, sin consecuencias funcionales, y por lo tanto silenciosas. Sin embargo, el interés en este tipo de mutaciones ha aumentado en la actualidad.

En la mayor parte de los genomas secuenciados se ha visto que los distintos codones sinónimos no son utilizados de forma uniforme. Es decir, existe una tendencia o preferencia a utilizar algunos codones de forma más frecuente que otros para codificar el mismo aminoácido. Este fenómeno, conocido como sesgo en el uso de codones o simplemente uso de codones, es característico para cada organismo, y dentro de un mismo genoma varía entre distintos tipos de genes. En general, aquellas proteínas con altos niveles de expresión, tales como las proteínas ribosomales, son codificadas por codones cuyos tRNAs correspondientes se encuentran en mayores cantidades en la célula [1]. Esto supone que ese codón será traducido más eficientemente y por lo tanto se los ha denominado rápidos o frecuentes. El sesgo en el uso de codones tiene implicancias en la regulación de la expresión génica a través de sus efectos sobre procesos tales como el procesamiento del ARN, la traducción y el plegamiento de proteínas [2].

Existen varios mecanismos por los cuales una mutación sinónima puede modificar los niveles o conformación de una proteína [3, 4]. Durante el procesamiento normal de ARN, la maquinaria encargada de realizar el splicing (el spliceosoma) elimina los intrones del transcrito

primario que no deben estar presentes en el ARN mensajero maduro. Para ello, proteínas de regulación del splicing reconocen secuencias específicas en los exones, marcando así el límite de estos así como el sitio de corte. El cambio generado por una mutación sinónima puede impedir que esta interacción tenga lugar y por ende interferir con la acción del spliceosoma. Esto genera un ARN mensajero incorrectamente procesado que puede dar lugar a una proteína no funcional. Otro mecanismo por el cual una mutación sinónima puede afectar los niveles de proteína es a través de la estabilidad del ARN mensajero. Si un cambio sinónimo da lugar a un ARN mensajero globalmente menos estable, el mismo puede ser más fácilmente degradado, con lo cual los niveles de proteína generados a partir de este pueden ser menores. Por otra parte, una mutación sinónima puede afectar la estabilidad local de un ARN mensajero. Particularmente, un ARN mensajero más estructurado en la región cercana al codón de inicio no puede iniciar fácilmente su traducción, lo cual resulta en niveles reducidos de proteína.

Otros mecanismos de acción son aquellos relacionados con la cinética o dinámica de la traducción del mensajero portador de una mutación sinónima. A través del análisis de genomas, se conoce el hecho de que, en general, existe un agrupamiento de codones raros o poco frecuentes en el inicio de un ARN mensajero, los cuales representan una "rampa" de traducción lenta que permite un correcto espaciamiento entre los ribosomas, evitando que tengan lugar embotellamientos o estancamiento de los mismos. Un cambio sinónimo en uno o más de estos codones (que lo conviertan en un codón frecuente) puede interferir con la traducción correcta del mensajero y por lo tanto dar lugar a proteínas truncas o mal plegadas. Por otra parte, se conoce el hecho de que muchas proteínas adquieren su estructura tridimensional conforme tiene lugar su síntesis. La elección y posición de los codones parece ser de gran relevancia para que este plegamiento co-traducciona l ocurra correctamente. Por ejemplo, es común encontrar codones raros entre dominios de una proteína, generando una pausa ribosomal que enlentezca la traducción, permitiendo así el plegamiento independiente de cada uno de los dominios. La eliminación de estas pausas por cambios sinónimos puede dar lugar a estructuras proteicas alteradas. Todos estos mecanismos se representan en la figura 1, tomada de [3].

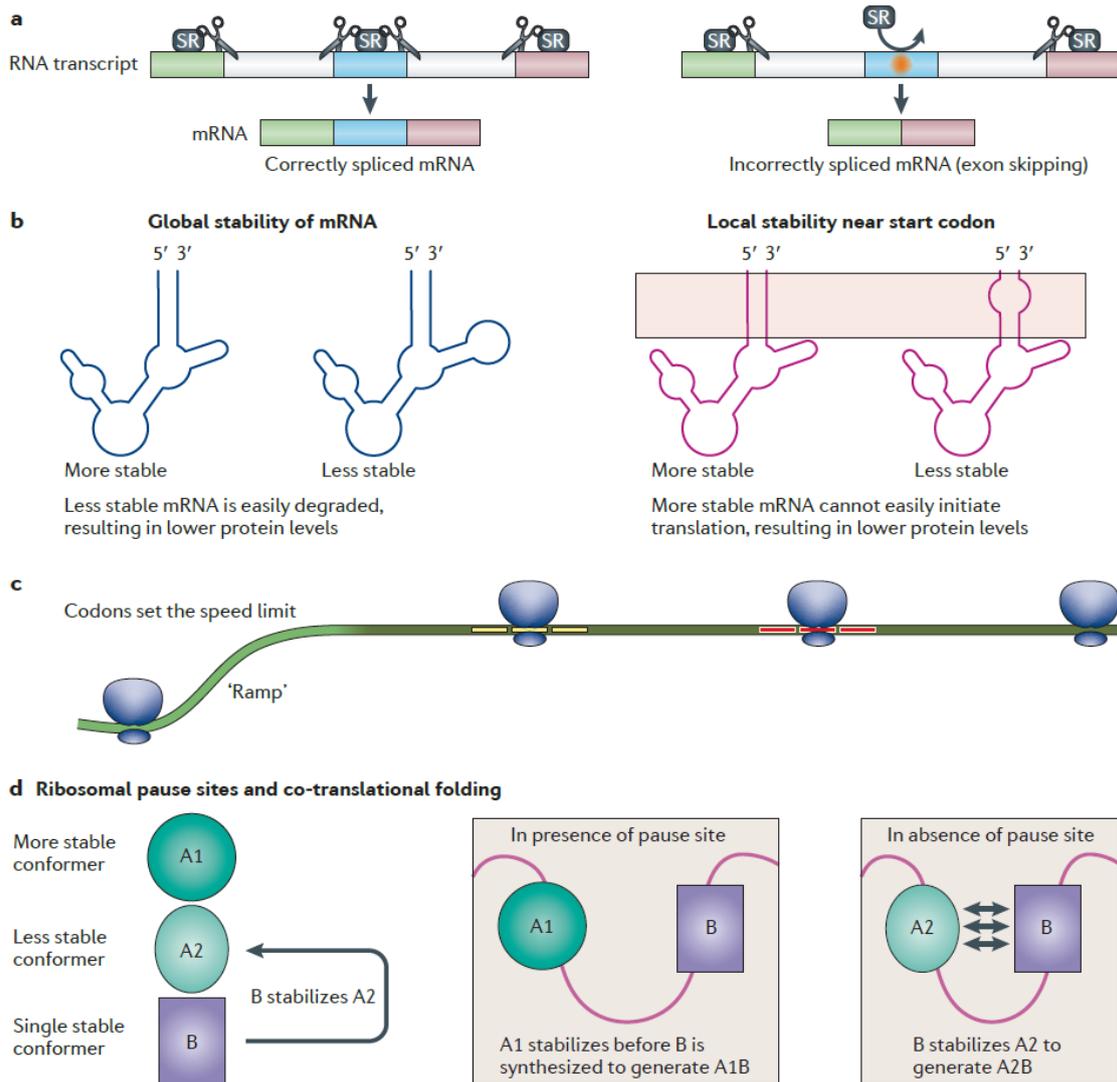


Figura 1: Mecanismos por los que las mutaciones sinónimas pueden dar lugar a niveles reducidos de ARN mensajero y/o proteína, así como a alteraciones conformacionales. **a:** errores en el proceso de splicing, **b:** cambios en la estabilidad global y local del ARN mensajero portador de mutaciones sinónimas, **c:** modificación de la cinética traduccional, **d:** alteraciones en el plegamiento co-traducciona. SR: Proteínas reguladoras del splicing. Tomado de [3].

Más de 50 patologías humanas han sido asociados con mutaciones sinónimas [5]. Existen múltiples ejemplos de genes cuya funcionalidad se ven modificadas debido a la presencia de mutaciones sinónimas en su secuencia. Uno de los más destacados, es el del gen MDR1 (Multi-Drug Resistance 1), que codifica para la glicoproteína P (P-gp). Kimchi-Sarfaty y colaboradores reportaron que un único cambio sinónimo en la secuencia codificante da lugar a alteraciones en la interacción de la proteína con drogas e inhibidores. Esta diferencia no se debe a cambios en los niveles de ARN mensajero o proteína, sino a diferencias conformacionales, que los autores atribuyen a un plegamiento co-traducciona incorrecto debido al cambio de un codón raro por uno frecuente [6]. Otro ejemplo es el de el cambio sinónimo en el gen CFTR (cystic

fibrosis transmembrane conductance regulator). Una deleción de tres nucleótidos en este gen da lugar por un lado a la pérdida de un residuo de fenilalanina y a un cambio sinónimo en una isoleucina. El ARN mensajero de este mutante presenta una estructura secundaria alterada, y a su vez la proteína generada es plegada incorrectamente y degradada. Debido a que generalmente se considera que no hay un rol importante de las mutaciones sinónimas, se asumía que el efecto se debía exclusivamente a la pérdida de la fenilalanina. Sin embargo, se ha demostrado que la variación sinónima altera la estructura del ARN en las cercanías de la mutación e influye sobre la cinética de la traducción [7, 8]. Finalmente, la enzima COMT (Catechol-O-methyltransferase) está implicada en la percepción del dolor así como en otros procesos del sistema nervioso. Se han reportado varios polimorfismos para esta enzima, pero particularmente se vio que un cambio sinónimo en la secuencia codificante generaba un ARN mensajero con una estructura secundaria más estable, lo cual daba lugar a una menor expresión de la proteína, y por lo tanto una mayor sensibilidad en los individuos portadores de la mutación [9].

Nuestro grupo de trabajo se ha centrado en el efecto de mutaciones sinónimas sobre otro gen y su producto proteico: la proteína supresora de tumores p53, cuyas principales características serán descritas en la sección siguiente.

La proteína supresora de tumores p53

Conocida como "el guardián del genoma", p53 es uno de los factores de transcripción más extensa y profundamente estudiados. Se trata de un regulador transcripcional que se une de forma específica a ciertas secuencias de ADN y que, en respuesta a una amplia variedad de señales de estrés, controla la expresión de numerosos genes que definen el destino de la célula, llevándola por ejemplo a la detención del ciclo celular o a la apoptosis [10]. El hecho de que más del 50% de los cánceres humanos presenten mutaciones en p53 destacan el rol central que juega en el adecuado funcionamiento de la célula [11]. Además de las funciones clásicamente atribuidas en relación al control del ciclo celular, actualmente se reconoce que p53 está también involucrado en procesos como la senescencia, la diferenciación celular, el metabolismo de la glucosa y la regulación del estrés oxidativo, entre otros [11, 12].

Funciones y mecanismos de acción

Si bien existen reportes de que p53 tiene actividad fuera del núcleo, su principal rol en la célula es la de factor de transcripción. En este sentido, se conoce el hecho de que es capaz tanto de activar como reprimir la transcripción, siendo en general la primera la más estudiada. Para poder llevar a cabo esta función, se cree que la unión de p53 a sus elementos de respuesta permitiría reclutar a esa región del ADN a factores remodeladores de la cromatina, transacetilasas de histonas y/o metiltransferasas, que faciliten la apertura del promotor. Asimismo, se ha visto que p53 puede facilitar la formación del complejo de pre-iniciación así como favorecer el reclutamiento de factores de transcripción basales [10, 13].

Para algunos genes, la unión de p53 al promotor no resulta en su transcripción sino en la represión. No se conoce aún qué distingue un elemento de respuesta que dará lugar a activación de otro que dará lugar a represión. Se proponen varios mecanismos por los cuales p53 podría inhibir la traducción. Existen ejemplos de genes cuya expresión se ve inhibida debido a que p53 se une de forma específica en un sitio que se superpone con el sitio de unión de otro activador, generando una interferencia estérica. Otro mecanismo implica la interacción proteína-proteína entre p53 y otras proteínas activadoras de la transcripción, unidas o no al ADN. Se conoce también la capacidad de p53 de reclutar desacetilasas de histonas, que modifican la cromatina inhibiendo la transcripción [10, 13]. Finalmente, se conoce desde hace unos años que p53 es capaz de activar la transcripción de micro ARNs, los cuales a su vez dan lugar a una disminución en los niveles de sus ARNs mensajeros blanco, con lo que el efecto final es de una disminución en la expresión génica de ciertos genes desencadenada por p53 [14].

Estructura

En su forma activa, p53 es una proteína tetramérica. Cada monómero consta de 393 residuos, y en la estructura de estos se distinguen tres dominios principales: el dominio amino terminal de transactivación, el dominio central de unión al ADN (DBD) y el dominio carboxilo terminal con funciones regulatorias y de tetramerización [15]. Es el dominio central de unión al ADN quien reconoce y se une a secuencias específicas presentes en los elementos de respuesta a p53, y que posee una estructura definida, a diferencia de los extremos tanto N como C terminales que lo flanquean y que se tratan de regiones intrínsecamente desordenadas, que han dificultado la cristalización de la proteína completa [16]. Un esquema y representación de la estructura de p53 se muestra en la Figura 2 .

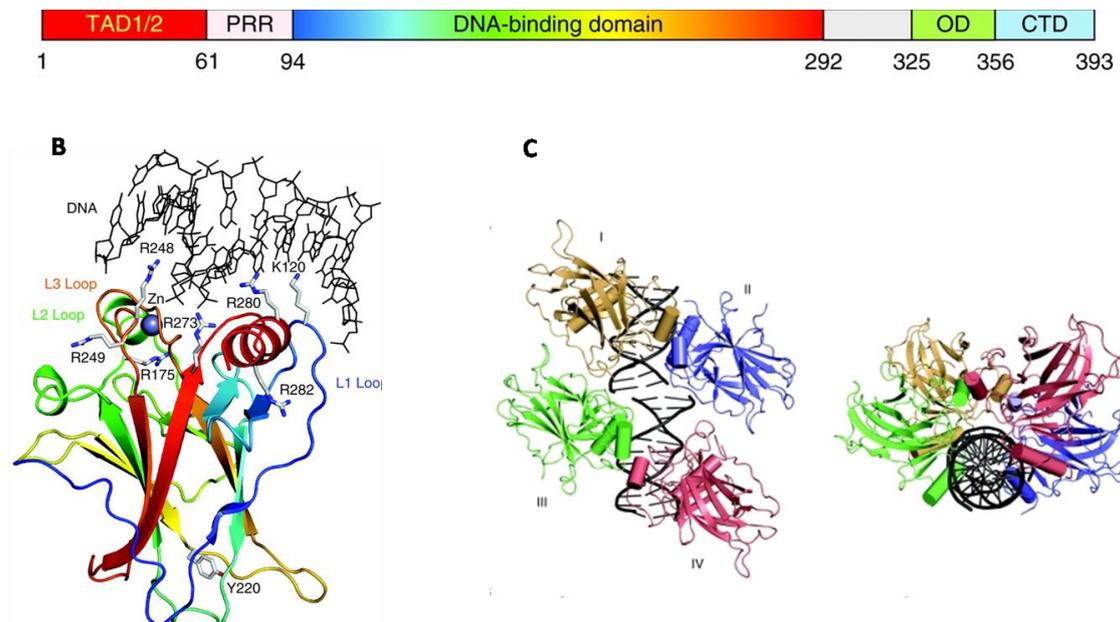


Figura 2: Estructura de la proteína supresora de tumores p53 **A:** esquema de los dominios de p53. Se muestra en rojo el dominio N terminal de transactivación (TAD), que se subdivide en los subdominios TAD 1 y TAD2, seguidos por una región rica en prolinas (PRR) en rosa claro. A continuación se encuentra en dominio de unión al ADN (DBD) en gradiente de colores, separado del dominio de tetramerización (OD, en verde) y del dominio C-terminal (en celeste) por una región flexible (en gris) **B:** estructura del DBD interactuando con el ADN; **C:** representación de un tetrámero de DBD en interacción con su sitio de unión al ADN. Tomado y modificado de [16].

Regulación

Debido a la relevancia que tiene p53 como proteína clave en la integración de señales y generación de respuestas, no es sorprendente que su actividad se encuentre fuertemente regulada a múltiples niveles de la expresión génica, tales como la transcripción, el splicing, la traducción, y las modificaciones post-traduccionales a las que es sometida (fosforilación,

acetilación, ubiquitinación). Existen dos reguladores negativos principales de p53: MDM2 (HDM2 en humanos) y MDMX. A pesar de compartir un alto grado de similitud estructural, no son capaces de compensar la actividad del otro, por lo que se cree que sus funciones no se solapan completamente, sino que pueden complementarse [17, 18].

La principal acción de MDM2 es la de ubiquitar a p53, marcándolo así para la degradación en el proteosoma [19]. Por su parte, MDMX inhibiría la actividad de p53 simplemente uniéndose a él [17]. Se cree también que MDMX al interactuar con MDM2 genera un cambio en este convirtiéndolo en una poliubiquitinligasa de p53, favoreciendo así su degradación [19]. Finalmente, y para agregar un nivel más de acción, se ha visto que MDM2 es capaz de interactuar con el propio ARN mensajero de p53 favoreciendo su traducción. Esta interacción ocurre a través de los mismos nucleótidos que codifican para los aminoácidos que establecen la unión a nivel proteico con MDM2 [20].

En particular para el caso de MDM2 se da un mecanismo de retroalimentación negativa que asegura que la disponibilidad de p53 sea la adecuada de acuerdo al contexto celular. De esta manera, en condiciones normales, p53 se encuentra unida a MDM2, con lo cual se encuentra ubiquitinado y retenido en el citoplasma. Cuando se detectan señales de estrés, la interacción se rompe debido a una serie de fosforilaciones en p53, que permiten que p53 ingrese al núcleo y active la transcripción de sus genes blanco, entre los que se encuentra MDM2. Esto representa un mecanismo de control que permite limitar la actividad de p53 una vez que han desaparecido las señales de estrés. La relevancia de este punto de control de p53 se pone de manifiesto en ciertos cánceres en los que si bien se retiene la actividad de p53 es MDM2 quien se encuentra desregulada, llevando a una actividad desmedida de p53 [21].

Mutaciones en p53

Como fue mencionado anteriormente, p53 se encuentra alterado en aproximadamente la mitad de los cánceres humanos. De todas las mutaciones reportadas, cerca del 90% se concentran en el DBD [21]. Esta información se encuentra disponible en la base de datos de mutaciones en TP53 de la IARC (International Agency for Research in Cancer, (<http://www.iarc.fr/>)). La mayoría de éstas son mutaciones puntuales e implican la sustitución de un aminoácido por otro. Sin embargo, un 5% de las mutaciones puntuales reportadas en muestras tumorales son sinónimas. Este valor es de 20 a 100 veces mayor a lo esperado si se considera que estas mutaciones son neutras, lo cual representa un indicio de que las mismas podrían afectar la función normal de la proteína [22]. En este sentido, un reporte reciente indica que son los oncogenes, mas no los supresores de tumor quienes acumulan mutaciones sinónimas en tumores humanos. Sin embargo, un gen supresor de tumores escapa a esta

tendencia: p53. Los autores reportan también que las mutaciones sinónimas en p53 se concentran en puntos adyacentes a sitios de splicing, inactivándolos [23].

Es en este contexto que se enmarca el presente proyecto, que tiene como objetivo evaluar la funcionalidad de un panel de mutantes sinónimos de p53 en células humanas. En particular, se trabajará con ciertos mutantes previamente analizados por nuestro grupo de trabajo en células de levadura, seleccionados por mostrar potenciales efectos sobre la expresión y funcionalidad de la proteína. Los mismos incluyen dos mutantes presentes en la base de datos IARC, así como cuatro mutantes de una región del DBD correspondientes a los codones 151, 152 y 153, que se trata de tres Prolinas consecutivas. Estos codones son de particular interés ya que concentran gran parte de las mutaciones sinónimas reportadas en la base de datos IARC y, a su vez, por la estructura que presenta este aminoácido, son relevantes para el plegamiento de proteínas. Durante la tesis de Maestría de M^a José Lista y la tesis de grado de Danilo Segovia se generaron y analizaron 12 mutantes en esta región, de los cuales 4 fueron seleccionados para su análisis en células humanas. Se busca poder aportar al conocimiento del rol de las mutaciones sinónimas en una proteína de gran relevancia como lo es p53.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la funcionalidad de un panel de mutantes sinónimos de p53 en células humanas.

Objetivos específicos

1) Evaluar si existen diferencias en los niveles de expresión de genes blanco de p53 en células humanas transfectadas con la secuencia de p53 salvaje o wild type (WT) y mutante.

2) Analizar y comparar la actividad transcripcional de p53 WT y portador de mutaciones sinónimas en células humanas sobre la expresión de un gen reportero (Luciferasa) bajo control de dos elementos de respuesta a p53 (p21 y RGC).

3) Evaluar si existen diferencias en la estabilidad de la proteína codificada por la secuencia de p53 WT o mutante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células, transfección y vectores

Para poder cumplir con los objetivos planteados, se trabajó a lo largo de todos los ensayos propuestos con la línea celular humana H1299 (Nº de catálogo ATCC: CRL-5803), derivada de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (non-small cell lung cancer), las cuales carecen de p53 [24]. Las mismas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Life Technologies-GIBCO), suplementado con de suero bovino fetal (ATCC) al 10% y Penicilina/Estreptomina (Sigma-Aldrich) al 1%, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

Las transfecciones se realizaron empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o Genejuice (Novagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello se sembraron 2x10⁵ o 1x10⁵ células en placas de 6 o 12 pocillos respectivamente, y las mismas fueron transfectadas con 300 ng de una construcción conteniendo la secuencia de p53 (WT o mutante, ver detalles más adelante). Para los ensayos de gen reportero, las células fueron transfectadas además con 300 ng de un plásmido "reportero" que contiene la secuencia del promotor de 21 o un tándem del sitio de unión de p53 a RGC controlando la expresión de la enzima Luciferasa ("p21-Luc" y "RGC-Luc"), así como con 300 ng de un plásmido conteniendo la secuencia de la enzima β-Galactosidasa empleada como control de transfección y normalizador.

Las secuencias de p53, tanto WT como mutantes fueron clonadas en el vector pCDNA3.1 durante las tesis de Maestría y Grado de Ma. José Lista y Danilo Segovia respectivamente. Un esquema del plásmido pCDNA3.1 se presenta en la sección *Anexos*. Con respecto al panel de mutantes sinónimos a analizar, se trabajará con siete mutantes de interés, seleccionados de acuerdo a resultados preliminares del grupo de trabajo. Se cuenta también con una construcción que contiene la secuencia del mutante R175H, que se empleará como control por tratarse de un mutante de p53 ya caracterizado como no funcional. Finalmente, el vector vacío será empleado como control negativo. En la tabla 1 se presentan los detalles de cada mutante.

El plásmido denominado "p21-Luc" se trata de un vector del tipo pGL3 básico (ver *Anexos*), en el cual se ha clonado la secuencia promotora del gen p21 controlando la expresión del gen de la Luciferasa. Este plásmido fue cedido por el Dr. Robin Fåhræus. Asimismo, el plásmido "RGC-Luc", fue donado por el Dr. Moshe Oren y contiene 17 copias del sitio de unión a p53 ubicado río arriba del ribosomal gene cluster (RGC) delante del gen de la Luciferasa. Finalmente, el plásmido denominado "β-Gal" contiene el gen de la enzima β-Galactosidasa bajo el control de un promotor CMV y fue cedido por la Dr. Mariela Bollati.

Tabla 1: Listado de los distintos mutantes sinónimos a utilizar en este trabajo y alguna de sus características.

Mutante	Secuencia WT	Secuencia Mutada	Aminoácido
678	GGC	GGT	Gly
741	AAC	AAT	Asn
Pro1	CCC CCG CCC	CCA CCA CCC	Pro-Pro-Pro
Pro2	CCC CCG CCC	CCT CCG CCG	Pro-Pro-Pro
Pro5	CCC CCG CCC	CCG CCG CCG	Pro-Pro-Pro
Pro7	CCC CCG CCC	CCT CCT CCT	Pro-Pro-Pro
P151	CCC CCG CCC	CCG CCG CCC	Pro-Pro-Pro

Extracción de ARN y PCR en tiempo real (qPCR)

Para evaluar si existen diferencias en los niveles de expresión de genes blanco de p53, 48 horas luego de la transfección con la secuencia WT o portadora de mutaciones de p53 se realizó la extracción de ARN utilizando el kit RNeasy (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido fue cuantificado mediante Nanodrop (Thermo Scientific) y posteriormente 2 µg de este ARN fueron utilizados para la síntesis de ADN copia (cDNA). Para ello se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukaemia Virus) y oligo dT como cebador (Invitrogen). Una vez obtenido el cDNA, se evaluaron los niveles de los siguientes blancos de p53 mediante qPCR: p21, HDM2 y PUMA. Los ensayos fueron realizados en el equipo One Step Cyclor (Applied Biosystems) utilizando PerfeCTa® SYBR® Green FastMix (Quanta Biosciences). Se empleó el gen de la Actina como normalizador.

Los niveles de ARN mensajero de p53 también fueron analizados, para analizar si existían diferencias en la expresión a este nivel entre la secuencia WT y los distintos mutantes. Los cebadores específicos fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Robin Fåhraeus, y sus secuencias se encuentran en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: Cebadores utilizados para las amplificaciones por PCR en tiempo real.

Gen	Cebador forward	Cebador reverse
p21	5'-CCTCAAATCGTCCAGCGACCTT-3'	5'- CATTGTGGGAGGAGCTGTGAAA-3'
HDM2	5'-ATCTACAGGGACGCCATC-3'	5'- CTGATCCAACCAATCACCTGAA-3'
PUMA	5'-GACCTCAACGCACAGTA-3'	5'-CTAATTGGGCTCCATCT-3'
Actina	5'-TCACCCACACTGTGCCATCTACGA-3'	5'-TGAGGTAGTCAGTCAGGTCCCG-3'
p53	5'-TGGGCTTCTTGCATTCTG-3'	5'-GCTGTGACTGCTTGTAGATGGC-3'

Ensayos de gen reportero (ensayos de Luciferasa)

Para continuar el análisis de la funcionalidad de los mutantes sinónimos de p53, se realizaron ensayos de gen reportero. Las células fueron transfectadas como fue descrito anteriormente, y 48 horas luego de la transfección se obtuvieron los lisados celulares. Para ello, se removió el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS 1X, y se colectaron las células en Reporter Lysis Buffer (Promega), compatible con la detección tanto de la actividad de la Luciferasa como de la β -Galactosidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las actividades de ambas enzimas en los distintos extractos fueron medidas utilizando los kits β -Galactosidase Enzyme Assay System y Luciferase Assay System (Promega), en placas de 96 pocillos.

Ensayos de Western Blot (WB)

Para llevar a cabo los análisis mediante WB, 48 horas luego de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con PBS y colectadas en buffer de carga de proteínas (ver Anexo) y hervidas durante 5 minutos. Posteriormente fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE), en geles de acrilamida al 12% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. La membrana es luego bloqueada durante 1 hora, a temperatura ambiente, con agitación suave en solución de bloqueo (5% leche en polvo descremada en buffer TBS-T). A continuación la membrana es incubada con el anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo, de acuerdo a la dilución correspondiente (ver Tabla 3). La incubación se realiza a 4°C, con agitación suave, durante toda la noche (overnight, ON). Posteriormente se realizan 4 lavados de 10 minutos en TBS-T con agitación, para luego incubar la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa, diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Finalmente, se realizan 5 lavados de 10 minutos en TBS-T con agitación y se procede al revelado con el reactivo comercial ECL (Thermo Scientific). Los anticuerpos utilizados y las diluciones empleadas se detallan en la Tabla 3.

Para los ensayos de degradación diferencial, previo a la colecta de las muestras, las células fueron tratadas con Cicloheximida (5 μ g/mL) o DMSO como control durante 2-3 horas.

Inmunofluorescencia

Para evaluar posibles diferencias en la localización subcelular de la proteína WT y la mutante se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Para ello las células fueron crecidas y transfectadas sobre cubreobjetos circulares ubicados dentro de los pocillos de las placas de 12 pocillos. 48 horas luego de la transfección, se remueve el medio de cultivo y se realizan dos lavados con PBS 1X. Las células son fijadas con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%

en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizan dos lavados de 5 minutos con PBS, y se neutraliza el efecto del PFA con una solución de glicina 1 M en PBS, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lleva a cabo el bloqueo y la permeabilización mediante la incubación con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) y saponina, al 3 y 0,1% respectivamente, en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La incubación con el anticuerpo primario se realiza en cámara húmeda, durante 2 horas a temperatura ambiente. En estos ensayos el anticuerpo primario utilizado fue el DO-1, un anticuerpo policlonal de ratón que reconoce p53, a una dilución 1:100, en la solución utilizada para el bloqueo y permeabilización. Posteriormente se realizan tres lavados con PBS y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario. El mismo se trata de un anticuerpo que reconoce inmunoglobulinas de ratón, conjugado a el fluoróforo Alexa 488, y fue utilizado en una dilución 1:500. Para terminar se realiza un lavado con PBS 1X, se tiñen los núcleos celulares con DAPI (1:100 en PBS 1X) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se realizan dos lavados más con PBS 1X. Finalmente, los cubreobjetos son montados sobre portaobjetos empleando liquido de montaje. Las láminas se examinaron al microscopio de epifluorescencia.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot. Se detallan las diluciones empleadas así como el origen de los mismos

Anticuerpo	Dilución utilizada	Origen
Anticuerpos primarios		
α -p53 (CM-1)	1:8000	Conejo
α -p21(12D1)	1:250	Conejo
α -Actina	1:5000	Ratón
Anticuerpos secundarios		
α -IgG de ratón	1:2500	Cabra
α -IgG de conejo	1:2500	Cabra

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FUNCIONALIDAD DE MUTANTES DE p53

Análisis de la expresión de blancos de p53

Con el fin de evaluar la funcionalidad de ciertos mutantes de p53 se decidió analizar la actividad transcripcional de los mismos, mediante un enfoque de PCR en tiempo real (qPCR) de algunos de los principales blancos de p53 (p21, HDM2 y PUMA). La figura 3 muestra los resultados obtenidos para los tres genes blanco evaluados en la línea celular H1299. En todos los casos se muestra el cambio relativo de expresión en comparación con lo obtenido al transfectar con p53 WT ("Fold change vs WT"), normalizado por la expresión de actina. Los resultados representan el promedio de dos muestras biológicas independientes, sobre las cuales se realizó 3 veces la qPCR. Los datos fueron analizados mediante ANOVA utilizando el programa GraphPad Prism.

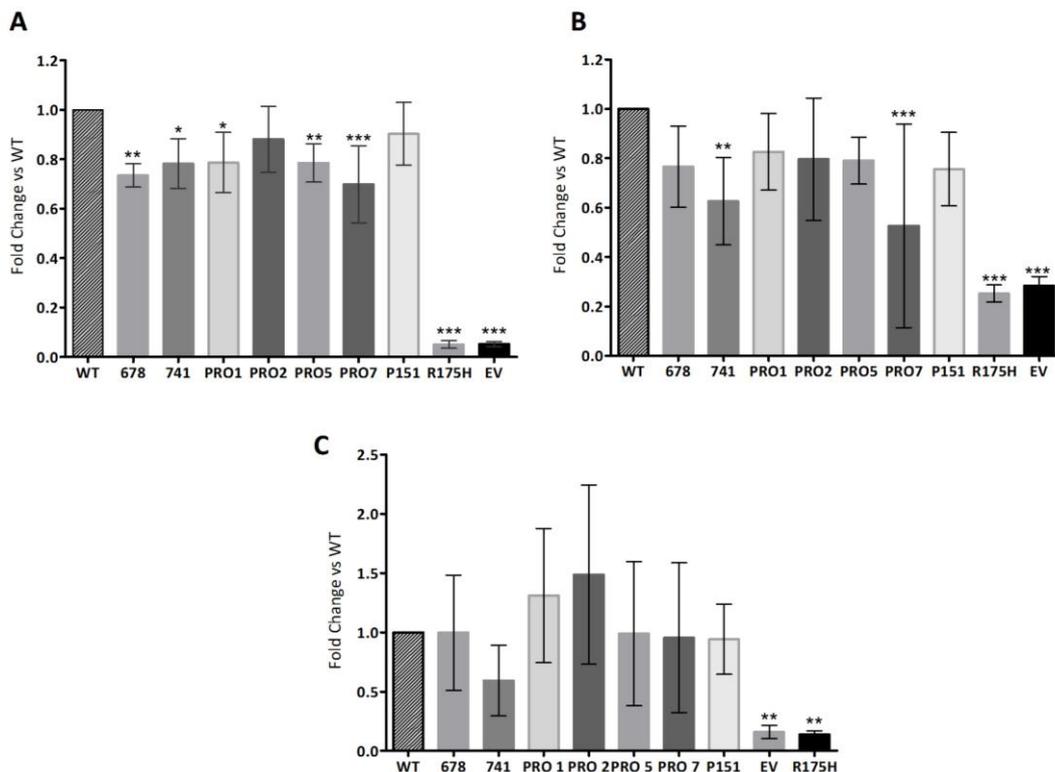


Figura 3: resultado de los ensayos de qPCR para la determinación de los niveles de expresión de tres blancos de p53; **A:** p21, **B:** HDM2 y **C:** PUMA en la línea celular H1299. En todos los casos se muestra el nivel de expresión con respecto a p53 salvaje (Fold Change vs WT). Las barras de error corresponden al desvío estándar. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Los resultados muestran que, si bien no se observan grandes diferencias en la expresión de los genes blanco con respecto al WT, en algunos casos las diferencias resultan significativas. Esto puede observarse para p21 en el caso de los mutantes 678, 741, Pro1, Pro5 y Pro7 y para PUMA en los mutantes 741 y Pro7. No fue posible detectar diferencias significativas en la expresión de HDM2 para ninguno de los mutantes analizados. En todos los casos se observó el comportamiento esperado para el mutante R175H y el control del vector vacío (EV), es decir que en ninguna de estas dos condiciones se da la inducción de los genes blanco de p53 analizados.

Es importante recordar que en todos los casos las células fueron transfectadas con secuencias codificantes, es decir, no se incluyen los intrones, por lo que no esperamos que se observen errores en el proceso de splicing que den lugar a proteínas defectuosas. En este sentido, los fenómenos que podrían estar ocurriendo, ya sean a nivel del ARN o de proteína darían lugar a niveles reducidos de p53 o proteínas con una conformación diferente. Es así que no es sorprendente que los cambios en la actividad transcripcional no sean muy marcados, sino sutiles.

Es posible decir entonces que existe una leve pero significativa reducción de la actividad transcripcional de algunos mutantes en comparación con la proteína WT, que no se pone de manifiesto de igual forma para los distintos blancos de p53. Esto podría estar indicando una variación en la afinidad de los distintos mutantes para las diferentes secuencias de unión al ADN presentes en los elementos de respuesta a p53 lo cual podría estar relacionado con diferencias de afinidad intrínsecas de p53 (WT) por sus elementos de respuesta, un fenómeno que ya a ha sido reportado [25].

A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar trabajando con los mutantes 741 y Pro7, que mostraron diferencias con respecto al WT en dos de los tres genes blanco analizados, y con el mutante 678, que solo mostró diferencias en la activación del gen p21, pero se encuentra presente en la base de datos IARC.

Para evaluar si las diferencias observadas a nivel transcripcional son detectables también a nivel de proteínas se realizaron ensayos de WB para la detección de la proteína p21. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4. En el panel A de la misma puede verse como la intensidad de las bandas correspondientes a p21 es menor para los tres mutantes analizados, a pesar de que los niveles de proteína total sembrados en cada carril son similares, de acuerdo a lo observado en el WB anti-actina. Asimismo es posible ver que no se detectan niveles apreciables de p21 luego de la transfección con el mutante R175H o con el control EV. Un análisis por densitometría de las imágenes obtenidas permitió realizar el gráfico que se

presenta en el panel B de la figura 4. En la misma se muestra la intensidad relativa de p21 en las células transfectadas con los mutantes sinónimos en comparación con la observada en células transfectadas con p53 WT (considerada como 1), luego de la normalización por actina, donde se ve reflejado lo observado en la imagen del WB.

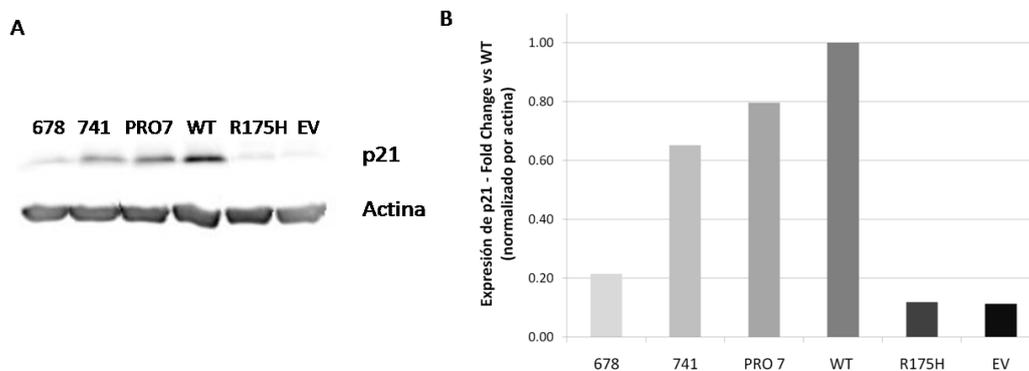


Figura 4: ensayo de Western Blot para la detección de p21 en células H1299 transfectadas con los mutantes 678, 741 y Pro7 así como con la secuencia WT y los controles R175H y EV. **A:** Resultado del WB para revelar los niveles de p21 y actina. **B:** Cuantificación de las bandas observadas en el panel A. En todos los casos se muestra el nivel de expresión con respecto a p53 salvaje (Fold Change vs WT), luego de normalizar por los niveles de actina.

Los resultados confirman lo observado en los ensayos de PCR en tiempo real, es decir, existe una diferencia en los niveles de expresión de p21 en células transfectadas con los tres mutantes sinónimos seleccionados en comparación con las células transfectadas con p53 WT. En algunos casos la disminución es coherente con la reducción observada a nivel de ARN mensajero. Sin embargo, en el caso del mutante 678, la reducción parece ser mucho mayor. Dado que el ensayo de WB para la detección de p21 se realizó una única vez, es necesario repetirlo, con el fin de confirmar estas tendencias. Alternativamente, dado que se trata de una transfección distinta a la realizada para los ensayos de qPCR, es posible que el efecto de los mutantes sinónimos varíe en intensidad de un ensayo a otro y que esta variación se vea reflejada en los resultados obtenidos.

Ensayos de gen reportero - Luciferasa

En un abordaje complementario al análisis de expresión de blancos, se continuó analizando la funcionalidad de los mutantes 678, 741 y Pro7 mediante ensayos de gen reportero, empleando para ello dos construcciones: 1) RGC-Luc, que contiene repetidos del sitio de unión a p53 del ribosomal gene cluster (RGC) corriente arriba del gen de la Luciferasa y 2) p21-Luc, que contiene la enzima Luciferasa bajo el control de la región promotora de p21. De confirmarse las tendencias observadas, se espera que haya una menor expresión del gen reportero en células transfectadas con p53 mutante que con p53 WT. Este análisis es

particularmente importante para el elemento de respuesta RGC, cuyo estudio mediante qPCR es más complejo debido a la naturaleza de los productos que genera.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5. En los mismos se muestra la actividad de la enzima Luciferasa normalizada por la actividad de la enzima β -Galactosidasa para cada uno de los mutantes analizados.

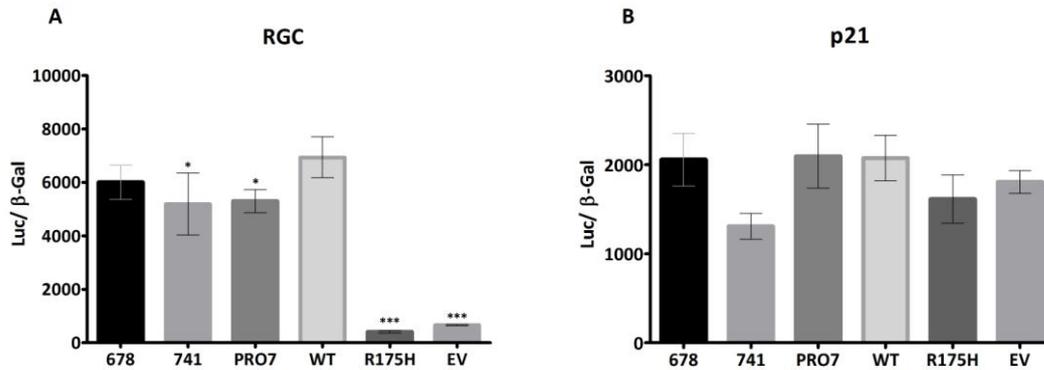


Figura 5: Resultado de los ensayos de gen reportero en células H1299 empleando las construcciones RGC-Luciferasa (panel A) y p21-Luciferasa (Panel B). En todos los casos se muestra, para los mutantes 678, 741, Pro7, el WT y los controles, las unidades arbitrarias de Luciferasa normalizadas por la actividad de la β -Galactosidasa (Luc/ β -Gal). Las barras de error corresponden al desvío estándar. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

En el panel A, correspondiente a los resultados obtenidos con la construcción RGC-Luc, puede observarse que existe una reducción en la actividad del gen reportero para los mutantes 741 y Pro7 con respecto al WT, que resulta significativa (p -valor ≤ 0.05) según el ANOVA. En el caso del mutante 678, si bien parece observarse una reducción de la actividad, la misma no es significativamente diferente a la que presenta el WT. En la misma imagen puede verse que los controles de actividad negativos (R175H y EV) se comportan de acuerdo a lo esperado, es decir que la actividad del gen reportero es casi nula en comparación con lo observado en presencia de p53 WT o portador de mutaciones sinónimas.

Sorprendentemente, este comportamiento no es el observado en el caso del reportero p21-Luc, donde tanto el mutante R175H y el control EV muestran niveles de actividad similares a los de p53 WT o los mutantes sinónimos. Este resultado estaría indicando que la Luciferasa no fue expresada únicamente en respuesta a la presencia de p53 en las células. Existen múltiples factores capaces de inducir la transcripción de p21 además de p53 [26], los cuales podrían estar uniéndose a la región promotora de este y controlando la expresión de la Luciferasa. Alternativamente, es posible que ciertas condiciones del ensayo (densidad de siembra, por ejemplo) afecten de forma diferencial la actividad de p53 (WT o mutante) sobre las distintas construcciones reporteras. Debido a que los controles incluidos en el ensayo con la construcción p21-Luc no se comportan de acuerdo a lo esperado, no es posible afirmar que

la actividad observada se deba exclusiva o mayoritariamente a la activación de la transcripción por parte de p53, es decir, no es específica de p53, y por lo tanto este sistema, en estas condiciones, no nos permite obtener conclusiones certeras acerca de la funcionalidad de los mutantes. De todas formas, es importante recordar que los ensayos de qPCR nos permitieron evaluar la actividad transcripcional de los mutantes sobre el blanco p21 y que en estos ensayos (donde se detectaron leves diferencias entre mutantes y WT) el comportamiento de los controles es el esperado.

Los resultados obtenidos mediante el abordaje de gen reportero empleando la construcción RGC-Luc van en la línea de lo observado a través de los ensayos de qPCR y WB, en particular para los mutantes 741 y Pro7, para los cuales se obtuvieron resultados consistentes a lo largo de todos los análisis realizados, que muestran una diferencia en la funcionalidad en relación al WT.

Un control adicional que se podría haber realizado es el de normalizar la actividad del gen reportero por el nivel de expresión de p53 (además de la normalización mediante β -Galactosidasa). Sin embargo, como veremos más adelante, los distintos mutantes no muestran diferencias en sus niveles de expresión en relación al WT, por lo que incluir esta normalización no debería modificar los resultados obtenidos.

CAUSAS DE LA DISMINUCIÓN DE LA FUNCIONALIDAD

Niveles de expresión de p53

A partir de los resultados presentados en la sección anterior, es posible afirmar que algunos de los mutantes sinónimos analizados ven afectada de forma sutil su funcionalidad. A continuación nos preguntamos sobre la causa de estas diferencias.

Dado que en todos los casos se trabajó con la secuencia codificante de p53 (WT o mutante) contenida en un vector de expresión, se descarta que las diferencias observadas tengan que ver con errores en el splicing y la generación de mensajeros incorrectos. Por el contrario, pensamos que la funcionalidad puede estar afectada por fenómenos que afecten los niveles de ARN mensajero y/o proteína disponibles en la célula o la conformación que adopta la misma. Alternativamente, también es posible que existan diferencias en cuanto a la localización sub celular de los mutantes sinónimos, lo cual ha sido reportado por nuestro grupo para otras proteínas portadoras de polimorfismos sinónimos [27].

Para evaluar si las diferencias en funcionalidad se deben a una disminución en la expresión de p53 tanto a nivel de ARN como a nivel de proteína, se realizaron en paralelo ensayos de Western Blot (WB) y de qPCR para la detección de p53. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. En el panel A de la misma puede observarse que no existen diferencias significativas entre los niveles de ARN mensajero en células transfectadas con la secuencia WT o portadora de mutaciones sinónimas. Tal como era esperado, no se detecta la presencia de ARN mensajero de p53 en las células transfectadas con el vector vacío (EV).

Es interesante que en el caso del mutante R175H, ya caracterizado como no funcional, se observa un aumento significativo en los niveles de ARN mensajero de p53. Este aumento está correlacionado con una mayor expresión a nivel de proteína, que puede observarse en el panel B. Esta acumulación del mutante R175H ya ha sido reportada anteriormente. El cambio de una arginina por una histidina en la posición 175 da lugar a un cambio conformacional que determina que p53 se encuentre completamente desplegado en condiciones fisiológicas, formando agregados estables [28, 29]. Esta acumulación puede deberse a la incapacidad de este mutante de activar la transcripción de MDM2, su principal regulador, que tampoco es capaz de degradarlo [30].

A través de los resultados de WB (panel B) no se detectan diferencias marcadas a nivel proteico entre p53 WT o mutantes. Con estos resultados, descartamos que las diferencias en funcionalidad se deban a una menor disponibilidad de p53 en la célula, con lo cual decidimos explorar otras alternativas.

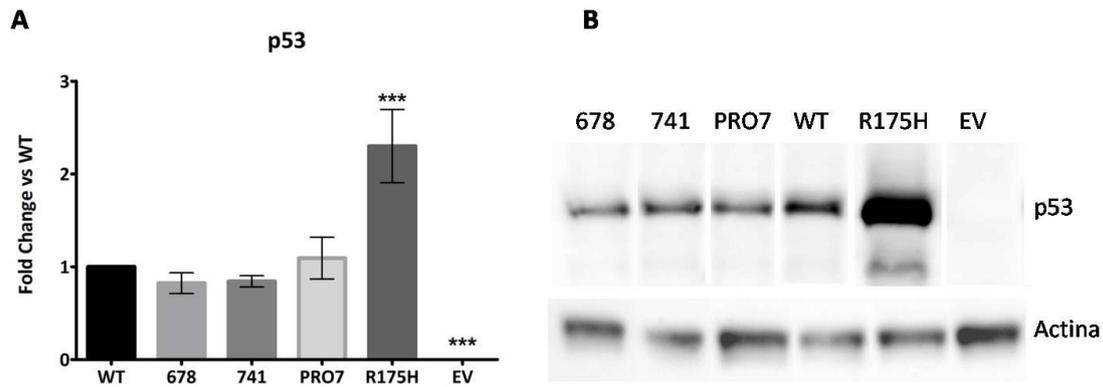


Figura 6: Análisis de la expresión de los distintos mutantes de p53 **A:** Resultado de los ensayos de qPCR para la detección del ARN mensajero de p53 en células H1299 transfectadas con los mutantes 678, 741, Pro7 y los controles WT, R175H y EV. Las barras de error corresponden al desvío estándar **B:** Resultado del WB anti p53 y anti actina como control de carga en extractos obtenidos de las mismas células analizadas por qPCR. *** $p \leq 0.001$.

Ensayos de degradación diferencial

Dado que no se encontraron diferencias en la disponibilidad del ARN mensajero de p53 o de la proteína, nos preguntamos si podrían existir diferencias en la conformación de las proteínas mutantes. Un abordaje para analizar esta posibilidad implica evaluar si la proteína mutante es más rápidamente degradada por la maquinaria celular que la proteína WT. Para ello, células transfectadas con p53 WT o mutante fueron tratadas con cicloheximida (CHX) o con DMSO (como control). La CHX es un inhibidor de la síntesis de proteínas, con lo cual, una vez tratadas las células se detiene el proceso de traducción y es posible observar la degradación de las proteínas ya sintetizadas. Se espera que, si existen diferencias conformacionales que den lugar a diferencias en la estabilidad proteica, las mismas se reflejen en un mayor (o menor) nivel de degradación en relación al WT. Los resultados obtenidos mediante esta aproximación se muestran en la figura 7. En la misma se presentan los resultados obtenidos en 3 ensayos independientes, es decir, 3 transfecciones independientes con sus respectivos tratamientos y WB (Panel A). Mediante densitometría fue posible determinar cuál era el porcentaje remanente de p53 luego del tratamiento con CHX en cada ensayo, lo cual se presenta en el Panel B.

A partir de los resultados obtenidos y a pesar de contar con información de tres replicas independientes, no es posible determinar de forma 100% concluyente que alguno de los mutantes presente diferencias conformacionales que puedan ser detectadas por esta estrategia. De forma general, podemos decir que luego del tratamiento con CHX aun queda aproximadamente un 50% de p53 WT en las células, y que el mutante R175H es el que menos

afectado se ve, lo cual puede estar relacionado a su gran abundancia en las células que lo expresan y a su tendencia a formar agregados resistentes a la degradación.

En lo que respecta a los mutantes, tanto a simple vista como luego de la densitometría no parecen observarse importantes diferencias en relación al WT, excepto en el ensayo 2 para el mutante 741. En este caso se observa que el porcentaje remanente es de 24%, lo cual es bastante inferior al 50% promedio observado para el WT, lo cual indicaría una mayor susceptibilidad a la degradación. Si bien no fue posible reproducir este resultado, el mismo es un indicio de que este mutante podría tener leves diferencias conformacionales con respecto al WT que se ponen de manifiesto en un contexto celular particular. De la misma manera, para el mutante 678 se observa en el ensayo 3 una posible mayor resistencia a la degradación que tampoco pudo verse de forma consistente en los otros ensayos. Ambas tendencias son interesantes y deberían ser exploradas en mayor profundidad.

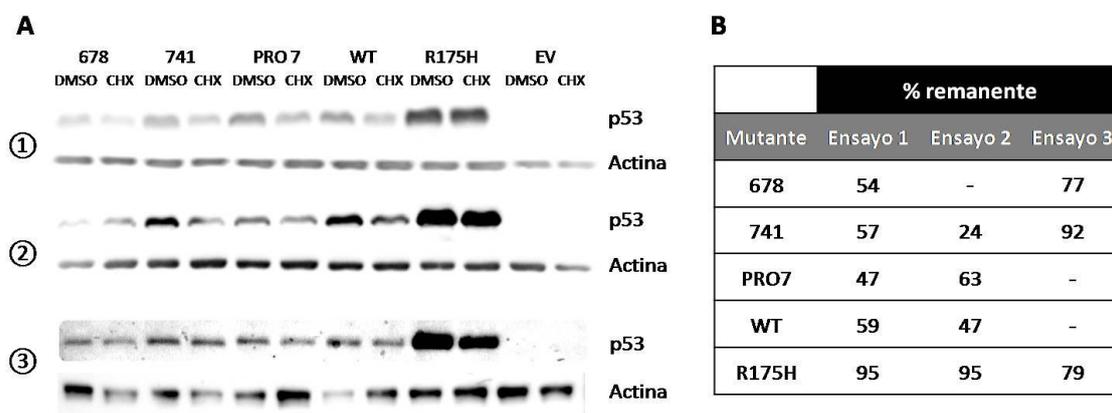


Figura 7: Evaluación de diferencias en la sensibilidad a la degradación de los distintos mutantes de p53, mediante el uso de un inhibidor de la síntesis proteica. **A:** Ensayos de WB para la detección de p53 y actina como normalizador en tres réplicas biológicas independientes (1, 2 3), previamente tratadas con cicloheximida (CHX) o dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo; **B:** Resumen del porcentaje de p53 remanente luego del tratamiento con CHX para cada uno de los ensayos realizados, calculado considerando como 100% el nivel de p53 en la muestra tratada con DMSO (luego de normalizar por actina). En los casos en los que no se muestra un valor, se debe a que el resultado no concuerda con lo esperado, es decir, se detecta una mayor intensidad de banda luego del tratamiento con CHX que previo a él para alguna de las dos proteínas detectadas.

Teniendo en cuenta la variabilidad de los resultados obtenidos, sería importante emplear otros abordajes complementarios que permitan evaluar la existencia de diferencias en conformación. Como contracara a la degradación, podrían emplearse inhibidores del proteosoma para poner en evidencia diferencias en la acumulación de p53 WT o mutante. Inicialmente esto fue descartado dado que al tratarse de extractos proteicos de células transfectadas existen importantes niveles de p53 en la célula y al evitar la degradación por el uso de inhibidores la acumulación podría llevar a cuantificaciones incorrectas debido a efectos

de saturación. De todas maneras, se podrían ajustar las condiciones de transfección para poder llevar a cabo estos ensayos. Otra alternativa es el tratamiento con proteasas que pongan de manifiesto diferencias en la susceptibilidad a la degradación, una estrategia que ya fue utilizada con anterioridad para determinar diferencias conformacionales [6, 31]. Finalmente, se encuentra disponible un anticuerpo que reconoce de forma específica la forma desnaturalizada o parcialmente desnaturalizada de p53 (Ab240), así como anticuerpos específicos para la forma nativa de p53 (Ab 1260) [32]. Sería interesante evaluar la presencia y proporción tanto de una y otra forma (empleando los distintos anticuerpos) en células transfectadas con la secuencia WT y mutante de forma de obtener resultados concluyentes.

Localización subcelular

Como fue mencionado anteriormente, p53 es principalmente un factor de transcripción, y por lo tanto esperamos que se localice principalmente en el núcleo celular. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que existen polimorfismos en el receptor de estrógenos que son capaces de afectar su distribución entre el núcleo y el citoplasma [27], por lo cual nos planteamos analizar si existen diferencias entre p53 WT y los mutantes de interés en este aspecto, que puedan contribuir a la menor funcionalidad observada. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, cuyos resultados se muestran en la figura 8.

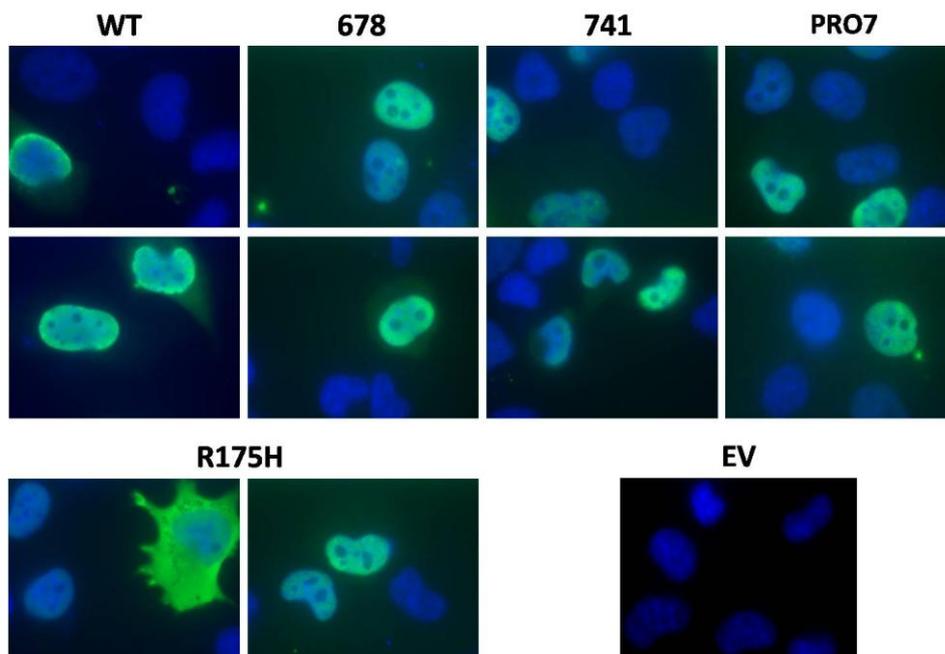


Figura 8: Análisis de la distribución subcelular de p53 mediante inmunofluorescencia. Se presentan imágenes representativas de células transfectadas con p53 WT, los mutantes 678, 741 y Pro7 así como los controles R175H y EV. La señal en verde (Alexa 488) corresponde a p53 mientras que en azul se observan los núcleos teñidos con DAPI.

Si bien se trata de un único análisis y por lo tanto son resultados preliminares, la localización es mayormente nuclear tanto para p53 WT como para los distintos mutantes, con lo cual parece poco probable que sea este uno de los mecanismos que influyan en la menor capacidad de transactivación.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que las diferencias en funcionalidad observadas no parecen deberse a una disminución en la disponibilidad de p53, tanto a nivel de ARN como de proteína, así como tampoco a una distribución subcelular alterada. Los resultados de los ensayos de degradación diferencial apuntan a la existencia de leves diferencias a nivel conformacional que podrían dar cuenta de la disminución en la función como activador de la transcripción de los mutantes de p53.

Del panel original de 7 mutantes analizados, dos de ellos, 741 y Pro7 fueron los que presentaron los resultados más consistentes en los distintos abordajes utilizados para detectar diferencias funcionales.

El mutante Pro7 fue generado en el laboratorio, y se trata de un triple mutante en el cual los tres codones de prolina son de los más frecuentemente utilizados, de acuerdo al uso de codones reportado en humanos (ver tabla en anexos). Como fue mencionado en la introducción, la elección de codones a lo largo de una secuencia codificante es de gran relevancia para el proceso de traducción. En este mutante en particular, además de los cambios en los codones 151 y 153, el codón 152 se modifica dejando de ser el codón menos utilizado. Este "track" de prolinas relativamente frecuentes o rápidas, podría influir en la cinética de la traducción de este mutante y eventualmente en su conformación. Los resultados presentados en este trabajo no aportan evidencia a favor de una diferencia en la conformación proteica de este mutante en relación a la proteína WT. Sin embargo, este aspecto no fue evaluado exhaustivamente y por lo tanto no podemos descartar que estas mutaciones tengan un efecto a este nivel. Por otra parte, y si bien no se detectaron cambios en la expresión de este mutante en relación al WT, vale la pena mencionar que las mutaciones en los codones 152 y 153 presentes en el mutante Pro7 eliminarían potenciales sitios de metilación. Las mutaciones simples en estos dos codones (Pro 152-G456T o Pro 153-C459T) se encuentran reportadas en la base de datos IARC y ambas se tratan de sitios CpG, y por lo tanto, de presentarse a nivel genómico podrían influir en los niveles de expresión de p53 en una célula portadora de estas mutaciones.

El caso del mutante 741 es interesante ya que el mismo fue seleccionado por su alto porcentaje de aparición en la base de datos IARC. Esta mutación afecta al residuo de asparagina en la posición 247. El cambio de C a T en esta posición es la mutación más frecuente asociada a radiación UVB en cáncer de piel humano [33]. Por otra parte debemos mencionar que un trabajo reciente clasifica a esta mutación (junto con la mutación 678 analizada en este trabajo) como un artefacto de secuenciación [34]. En este trabajo, los autores analizan distintos tipos de mutaciones presentes en la base de datos IARC y el tipo de trabajo en el cual fue reportada dicha mutación, de acuerdo a lo reportado por Edlund y colaboradores [35]. Con esta información, si una mutación aparece reportada en artículos clasificados como "outliers", se la considera como un artefacto de secuenciación. Sin embargo, cuando analizamos en detalle la base de datos en la que se basa el artículo, encontramos que el caso del mutante 741 no parece ajustarse a la clasificación que le dan los autores ya que en la gran mayoría de los reportes no existen dudas sobre su veracidad, lo cual es indicado en la base de datos como "No specific problem" (sin problemas específicos.)

A diferencia del mutante Pro7, esta mutación no afecta sitios de metilación, pero si se trata de un sitio aceptor del splicing. Si bien un efecto de este tipo no fue evaluado en este trabajo, de acuerdo a la base de datos IARC, distintas herramientas de predicción indican que esta mutación no tendría un efecto sobre el splicing.

Para este mutante no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión pero existen indicios de que son aspectos conformacionales los que se ven afectados. En este sentido, un elemento fundamental de la maquinaria de traducción lo componen los ARNs de transferencia (tRNAs). Se postula que aquellos codones que emplean más frecuentemente son decodificados por tRNAs que se encuentran en abundancia en la célula, y lo opuesto puede decirse para los codones menos frecuentes. El mutante 741 se trata de un interesante caso donde evaluar el efecto de la disponibilidad de tRNAs isoaceptores. El aminoácido asparagina es codificado únicamente por dos codones, uno de los cuales se emplea más frecuentemente que el otro, y en el caso del mutante 741, la mutación convierte al codón en un codón infrecuente. Sería interesante poder sobreexpresar el tRNA que decodifica este codón y evaluar si en este nuevo contexto celular se mantienen o no las diferencias en funcionalidad observadas. Alternativamente, podría estudiarse la actividad de este mutante en líneas celulares con distintos orígenes tisulares que puedan presentar diferencias en la abundancia de tRNAs isoaceptores de asparagina. Si bien se tratan de resultados controversiales, se ha descrito que existen diferencias tejido específicas en la expresión de los distintos tRNAs [36]. Adicionalmente, existe actualmente información sobre diferencias en la disponibilidad de los

distintos tRNAs isoaceptores en células en distintas etapas de diferenciación o proliferación [37], lo cual también debe ser tenido en cuenta para evaluar diferencias que puedan verse afectadas por el contexto o las condiciones celulares.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El objetivo principal de este trabajo era analizar la funcionalidad en células humanas de un panel de mutantes sinónimos de p53 de interés para nuestro grupo de trabajo. De este grupo inicial, tres mutantes (678, 741 y Pro7) presentaron resultados alentadores en los primeros abordajes exploratorios, siendo particularmente consistentes los resultados para dos de ellos (741 y Pro7).

Estos resultados nos permitieron concentrar la atención en estos mutantes y evaluar algunas de las posibles causas para la disminución de funcionalidad que mostraban. A través de esta búsqueda pudimos ver que las mutaciones sinónimas que portaban estos mutantes no afectaban los niveles de expresión del ARN mensajero o la proteína correspondiente, así como tampoco parecían afectar la localización de la proteína en la célula. Sin embargo, y en particular para el mutante 741, parecen observarse diferencias conformacionales en relación a la proteína WT, que deben ser analizadas con mayor profundidad y por enfoques complementarios a los realizados. De confirmarse estos resultados, el siguiente paso implicaría evaluar si las diferencias conformacionales afectan la capacidad de p53 de interactuar con otras proteínas, particularmente reguladores (como Hdm2), o con sí mismo, lo cual es fundamental para su función de factor de transcripción. En este sentido, también sería relevante conocer si la capacidad de unión al ADN se ve afectada.

Dado el rol fundamental que tiene p53 en el control de procesos claves como el ciclo celular y la apoptosis, a futuro sería interesante poder evaluar si la presencia de esta mutación a nivel genómico genera un fenotipo alterado en las células portadoras, y si este efecto es dependiente del contexto celular. En conjunto y conociendo la relevancia de p53 en el cáncer, esta información contribuiría a comprender mejor el rol de mutaciones sinónimas en el desarrollo de esta patología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Novoa, E.M. and L. Ribas de Pouplana, *Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes*. Trends Genet, 2012. **28**(11): p. 574-81.
2. Plotkin, J.B. and G. Kudla, *Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(1): p. 32-42.
3. Sauna, Z.E. and C. Kimchi-Sarfaty, *Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(10): p. 683-91.
4. Sauna, Z.E. and C. Kimchi-Sarfaty, *Synonymous Mutations as a Cause of Human Genetic Disease*, in eLS. 2013, John Wiley & Sons, Ltd.
5. Hunt, R.C., et al., *Exposing synonymous mutations*. Trends Genet, 2014. **30**(7): p. 308-21.
6. Kimchi-Sarfaty, C., et al., *A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity*. Science, 2007. **315**(5811): p. 525-8.
7. Lazrak, A., et al., *The silent codon change I507-ATC->ATT contributes to the severity of the DeltaF508 CFTR channel dysfunction*. FASEB J, 2013. **27**(11): p. 4630-45.
8. Bartoszewski, R.A., et al., *A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28741-8.
9. Nackley, A.G., et al., *Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure*. Science, 2006. **314**(5807): p. 1930-3.
10. Laptenko, O. and C. Prives, *Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 951-61.
11. Aylon, Y. and M. Oren, *New plays in the p53 theater*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(1): p. 86-92.
12. Vousden, K.H. and D.P. Lane, *p53 in health and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 275-83.
13. Riley, T., et al., *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 402-12.
14. He, L., et al., *microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 819-22.
15. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *Structural biology of the tumor suppressor p53*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 557-82.
16. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(6): p. a000919.

17. Pei, D., Y. Zhang, and J. Zheng, *Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx*. *Oncotarget*, 2012. **3**(3): p. 228-35.
18. Wang, Y.V., M. Wade, and G.M. Wahl, *Guarding the guardian: Mdmx plays important roles in setting p53 basal activity and determining biological responses in vivo*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(21): p. 3443-4.
19. Wang, X. and X. Jiang, *Mdm2 and MdmX partner to regulate p53*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(10): p. 1390-6.
20. Wade, M., Y.-C. Li, and G.M. Wahl, *MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(2): p. 83-96.
21. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 594-604.
22. Lamolle, G., M. Marin, and F. Alvarez-Valin, *Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers*. *Mutat Res*, 2006. **600**(1-2): p. 102-12.
23. Supek, F., et al., *Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers*. *Cell*, 2014. **156**(6): p. 1324-35.
24. Hjortsberg, L., et al., *The p53 Mutation HandBook 2.0*. available online, <http://p53.free.fr>, 2008.
25. Tebaldi, T., et al., *Whole-genome cartography of p53 response elements ranked on transactivation potential*. *BMC Genomics*, 2015. **16**: p. 464.
26. Gartel, A.L. and S.K. Radhakrishnan, *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. *Cancer Res*, 2005. **65**(10): p. 3980-5.
27. Fernandez-Calero, T., et al., *The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014. **143**: p. 99-104.
28. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *p53 mutations in cancer*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(1): p. 2-8.
29. Sigal, A. and V. Rotter, *Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6788-93.
30. Willis, A., et al., *Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes*. *Oncogene*, 2004. **23**(13): p. 2330-8.
31. Horjales, S., et al., *Translational machinery and protein folding: evidence of conformational variants of the estrogen receptor alpha*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **467**(2): p. 139-43.

32. Cho, Y., et al., *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science, 1994. **265**(5170): p. 346-55.
33. Luo, J.L., et al., *UV-induced DNA damage and mutations in Hupki (human p53 knock-in) mice recapitulate p53 hotspot alterations in sun-exposed human skin*. Cancer Res, 2001. **61**(22): p. 8158-63.
34. Leroy, B., M. Anderson, and T. Soussi, *TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade*. Hum Mutat, 2014. **35**(6): p. 672-88.
35. Edlund, K., et al., *Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9551-6.
36. Dittmar, K.A., J.M. Goodenbour, and T. Pan, *Tissue-specific differences in human transfer RNA expression*. PLoS Genet, 2006. **2**(12): p. e221.
37. Gingold, H., et al., *A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation*. Cell, 2014. **158**(6): p. 1281-92.

ANEXOS

Soluciones y buffers utilizados

PBS

KCl - 2,7 mM

KH₂PO₄ - 1,4 mM

Na₂HPO₄ - 4 mM

NaCl – 137 mM

TBST

Tris-HCl pH 7.5 - 10 mM

Tween 20 - 0.1%

NaCl – 75 mM

Buffer carga proteínas Laemmli sample buffer (2X)

SDS - 4%

Glicerol - 20%

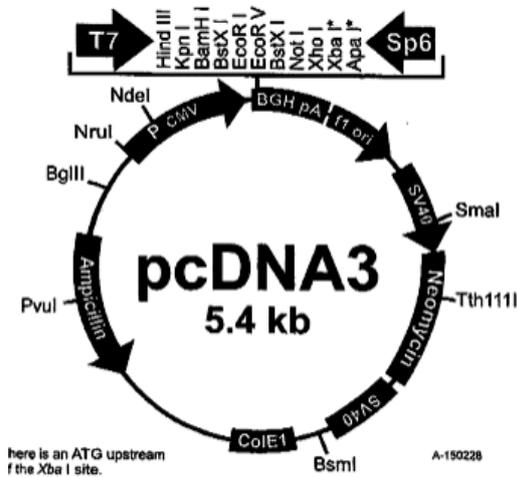
Tris-Cl (pH 6.8) - 120 mM

Azul de bromofenol - 0.02%

DTT - 30 mM

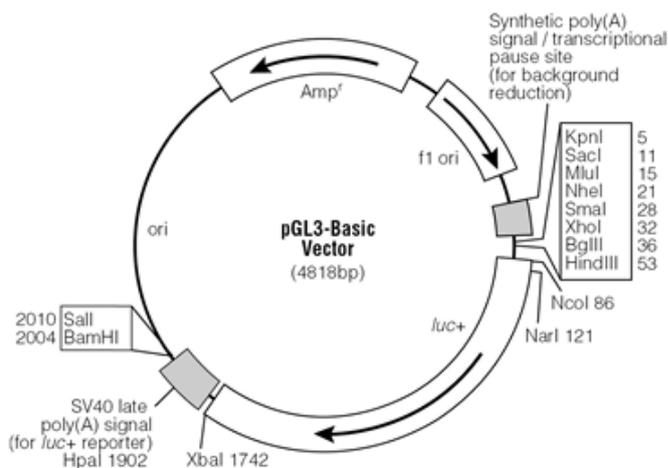
Vectores utilizados

pCDNA3.1 - Vector donde fueron clonadas las secuencias codificantes de p53 WT y mutantes.



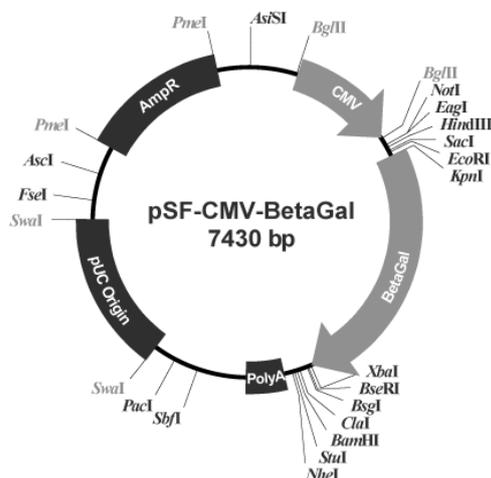
- P CMV: Promotor CMV (citomegalovirus)
- BGH pA: secuencia señal de poliadenilación
- f1 ori: origen para la producción de ADN simple hebra.
- SV40: secuencias promotoras y terminadoras del simian virus 40.
- Neomycin: Resistencia a neomicina.
- Col E1: origen de replicación.
- Ampicillin: Resistencia a ampicilina

pGL3 Basic - Vector base para las construcciones reporteras.



- Amp^r: resistencia a ampicilina
- f1 ori: origen para la producción de ADN simple hebra.
- Luc⁺: gen reportero, secuencia codificante de la enzima Luciferasa (Firefly)
- SV40 late poly(A) signal: señal de poliadenilación para el gen reportero.

pCMV-β-Gal - Vector de expresión constitutiva de β-Gal, utilizado para normalización.



- P CMV: Promotor CMV (citomegalovirus)
- BetaGal: secuencia codificante del gen de la enzima β-Galactosidasa
- pUC Origin: origen de replicación.
- PolyA: señal de poliadenilación
- Amp^R: Resistencia a ampicilina

Tabla de uso de codones en humanos - Para cada tRNA se muestra el número de genes que codifican cada isoceptor (cuadro blanco) y el uso de codones expresado en porcentaje (cuadros verdes).

Tomado de Genomic tRNA Database (<http://gtrnadb.ucsc.edu/Hsapi19/Hsapi19-summary-codon.html>)

Isotype	tRNA Count by Anticodon			
	Codon Usage (Percentage)			
Ala	AGC 29	GGC	CGC 5	TGC 9
	GCT 1.84	GCC 2.77	GCG 0.74	GCA 1.58
Gly	ACC 15	GCC 15	CCC 7	TCC 9
	GGT 1.08	GGC 2.22	GGG 1.65	GGA 1.65
Pro	AGG 10	GGG	CGG 4	TGG 7
	CCT 1.75	CCC 1.98	CCG 0.69	CCA 1.69
Thr	AGT 10	GGT	CGT 6	TGT 6
	ACT 1.31	ACC 1.89	ACG 0.61	ACA 1.51
Val	AAC 11	GAC	CAC 16	TAC 5
	GTT 1.1	GTC 1.45	GTG 2.81	GTA 0.71

Isotype	tRNA Count by Anticodon						
	Codon Usage (Percentage)						
Ser	AGA 11	GGA	CGA 4	TGA 5	ACT	GCT 8	
	TCT 1.52	TCC 1.77	TCG 0.44	TCA 1.22	AGT 1.21	AGC 1.95	
Arg	ACG 7	GCG	CCG 4	TCG 6			CCT 5 TCT 6
	CGT 0.45	CGC 1.04	CGG 1.14	CGA 0.62			AGG 1.2 AGA 1.22
Leu	AAG 12	GAG	CAG 10	TAG 3			CAA 7 TAA 7
	CTT 1.32	CTC 1.96	CTG 3.96	CTA 0.72			TTG 1.29 TTA 0.77

Isotype	tRNA Count by Anticodon			
	Codon Usage (Percentage)			
Phe	AAA	GAA 12		
	TTT 1.76	TTC 2.03		
Asn	ATT 2	GTT 32		
	AAT 1.7	AAC 1.91		
Lys			CTT 17	TTT 16
			AAG 3.19	AAA 2.44
Asp	ATC	GTC 19		
	GAT 2.18	GAC 2.51		
Glu			CTC 13	TTC 13
			GAG 3.96	GAA 2.9
His	ATG	GTG 11		
	CAT 1.09	CAC 1.51		
Gln			CTG 20	TTG 11
			CAG 3.42	CAA 1.23

Isotype	tRNA Count by Anticodon			
	Codon Usage (Percentage)			
Ile	AAT 14	GAT 3		TAT 5
	ATT 1.6	ATC 2.08		ATA 0.75
Met			CAT 20	
			ATG 2.2	
Tyr	ATA 1	GTA 14		
	TAT 1.22	TAC 1.53		
Supres			CTA 1	TTA 2
Stop			TAG 0.08	TAA 0.1
Cys	ACA	GCA 30		
	TGT 1.06	TGC 1.26		
Trp			CCA 9	
			TGG 1.32	
SelCys			TCA 3	
Stop			TGA 0.16	