



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas –
Universidad Nacional de Rosario

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)

Tesis de Doctorado

**“Caracterización de mecanismos moleculares de
agresividad tumoral activados por p53 mutante”**

Presentada por Lic. Carla María Borini Etichetti

Director: Dr. Javier Girardini

Rosario, Argentina

2019

Caracterización de mecanismos moleculares de agresividad tumoral activados por p53 mutante

Carla María Borini Etichetti

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Oncología Molecular, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario IBR-CONICET, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2014 y el 1 de febrero de 2019, bajo la dirección del Dr. Javier Girardini.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Dr. Javier Girardini. Director.....

Dra. María Cristina Carrillo. Miembro del Jurado.....

Dra. Vanesa Gottifredi. Miembro del Jurado.....

Dr. Lucas B. Pontel. Miembro del Jurado.....

Defendida:

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

PUBLICACIONES

- **“Isoprenylcysteine carboxy methyltransferase (ICMT) is associated with tumor aggressiveness and its expression is controlled by the p53 tumor suppressor”.** **Carla Borini Etichetti**, Carolina Di Benedetto, Carolina Rossi, María Virginia Baglioni, Silvio Bicciato, Giannino Del Sal, Mauricio Menacho-Márquez and Javier Girardini. *The Journal of Biological Chemistry*. Año 2019. doi: 10.1074/jbc.RA118.006037.

REUNIONES CIENTÍFICAS

- **“ICMT cooperates with tumor aggressiveness and is under complex control by p53 family members”.** **Carla Borini Etichetti**, Carolina Di Benedetto, Carolina Rossi, María Virginia Baglioni, Silvio Bicciato, Giannino Del Sal, Mauricio Menacho-Márquez and Javier Girardini. **SAIB**. Congreso. Paraná, AR. Año 2018. **Tipo de participación: Exposición Oral**.
- **“Targeting post-prenylation processing in cancer: study of the role of ICMT in tumor progression”.** **Borini Etichetti Carla**, Di Benedetto Carolina, Rossi Carolina, Menacho Marquéz Mauricio and Girardini Javier E. **Reunión conjunta de Sociedades de Biociencias**. Congreso. Buenos Aires, AR. Año 2017. **Tipo de participación: Poster**.
- **“Mechanisms of tumor aggressiveness activated by mutant p53”.** Girardini J., **Borini Carla**, Ibarra Solange and Di Benedetto Carolina. **X ALAMCTA**. Congreso. **Montevideo, Uruguay**. Año 2016. **Tipo de participación: Exposición Oral**.
- **“Identification of novel mutant p53 target genes in triple negative breast cancer”.** **Borini Etichetti Carla**, Di Benedetto Carolina, Rossi Carolina and Girardini Javier E. **Ganando la Guerra contra el Cáncer**. Congreso. Bs As, AR. Año 2016. **Tipo de participación: Poster**.

- “Identification of novel mutant p53 target genes in triple negative breast cancer”. **Borini Etichetti Carla**, Di Benedetto Carolina, Rossi Carolina and Girardini Javier E. Emerging Targeted Therapies in Cancer & Autoimmunity. Congreso. **Varadero, Cuba**. Año 2016. **Tipo de participación: Poster**.
- “Characterization of mutant p53-based molecular mechanisms of tumor aggressiveness”. Carolina Di Benedetto, **Carla Borini Etichetti** and Javier E. Girardini. **SAIB**. Congreso. Mar del Plata, AR. Año 2015. **Tipo de participación: Poster**.

PUBLICACIONES RELACIONADAS

- “Total Synthesis and Cytotoxic Activity of 6,8-Dimethoxy-1,3-dimethylisoquinoline Isolated from *Ancistrocladus tectorius*: A 6π-Azaelectrocyclization Approach”. Iván Cortés, **Carla Borini Etichetti**, Javier E. Girardini, Teodoro S. Kaufman and Andrea B. J. Synthesis. Año 2018. doi: 10.1055/s-0037-1610276.
- “Synthesis of triazole derivatives of levoglucosenone as promising anticancer agents. Effective exploration of the chemical space through retro-aza-Michael//aza-Michael isomerizations”. Tsai YH, **Borini Etichetti CM**, Di Benedetto C, Girardini JE, Martins FT, Spanevello RA, Suárez AG, Sarotti AM. J Org Chem. Año 2018. doi: 10.1021/acs.joc.7b03141.

¶ mi mamá...

ÍNDICE

ÍNDICE	6
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
LENGUAJE ESPECIAL	11
RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Alteraciones genéticas en el cáncer.....	17
1.2. p53 como supresor tumoral.....	19
1.3. Dominios funcionales de p53	20
1.4. Isoformas de p53.....	22
1.5. Regulación de la expresión génica mediada por p53.....	23
1.6. La familia de p53	27
1.7. Isoformas de p63 y su relación con el cáncer	28
1.8. Isoformas de p73 y su relación con el cáncer	30
1.9. Mutantes de p53.....	32
1.10. Identificación de vías alteradas por p53 mutante en el cáncer.....	36
1.11. Prenilación de proteínas.....	37
1.12. ICMT	39
1.13. Rol biológico de ICMT	40
1.14. Rol de ICMT en el cáncer.....	41
1.15. Inhibidores de ICMT	42
OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo general	46
2.2. Objetivos específicos	46
MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1. Plásmidos.....	48
3.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	49
3.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	50
3.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	50
3.5. Reacciones de ligación de ADN	50
3.6. Cepas bacterianas	51
3.7. Cultivos de <i>E. coli</i> DH5α.....	51

3.8. Generación de células bacterianas competentes.....	51
3.9. Transformación bacteriana.....	51
3.10. Secuenciación de fragmentos de ADN.....	52
3.11. Determinación de la concentración de ADN y ARN	52
3.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	52
3.13. Obtención de ARN, retrotranscripción y PCR en tiempo real	53
3.14. Cultivo de líneas celulares y reactivos	54
3.15. Transfección.....	54
3.16. Silenciamiento transitorio y estable	55
3.17. Generación de líneas celulares estables.....	55
3.18. Obtención de extractos proteicos a partir de células en cultivo.....	56
3.19. Cuantificación de proteínas totales	56
3.20. <i>Western Blot</i>	56
3.21. Ensayos de luciferasa	57
3.22. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	58
3.23. Proliferación	59
3.24. Ensayo de MTT	59
3.25. Ensayo de formación de colonias.....	60
3.26. Ensayo de cierre de la herida.....	60
3.27. Ensayo de migración en <i>transwell</i>	60
3.28. Formación de quistes de células MDCK en cultivos 3D	60
3.29. Ensayo de tumorigenicidad <i>in vivo</i>	61
3.30. Técnica de inmunohistoquímica	62
3.31. Tinción de F-actina.....	62
3.32. Búsqueda de sitios de unión a p53 <i>in silico</i>	62
3.33. Análisis de expresión génica en bases de datos de cáncer	63
3.34. Valores de expresión media y cálculo de las firmas moleculares.....	63
3.35. Análisis de la evolución clínica en bases de datos de cáncer	64
3.36. Análisis estadístico	64
RESULTADOS CAPÍTULO I:	66
Rol de la familia de p53 en la expresión de <i>ICMT</i>	66
4.1. La expresión de <i>ICMT</i> se encuentra regulada en forma opuesta por p53 wt y mutantes puntuales asociadas a tumores	66

4.2. Caracterización de mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción de <i>ICMT</i>	71
4.3. Participación de otros miembros de la familia de p53 en la regulación de <i>ICMT</i>	80
RESULTADOS CAPÍTULO II:	85
Efecto de ICMT sobre fenotipos tumorales.....	85
5.1. Efecto de ICMT sobre fenotipos tumorales <i>in vitro</i>	85
5.2. Efecto de ICMT sobre el potencial tumorigénico y metastásico <i>in vivo</i>	91
5.3. Mecanismos activados por la sobreexpresión de ICMT	94
RESULTADOS CAPÍTULO III:	97
Relevancia clínica de la sobreexpresión de ICMT	97
6.1. Relación entre la expresión de <i>ICMT</i> y el estado de p53 en cáncer de mama y pulmón	97
6.2. Análisis de la correlación entre la evolución clínica de pacientes con cáncer de mama o pulmón y los niveles de p53 e ICMT	99
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

3D: tridimensional.

aa: aminoácido/s

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNi: ácido ribonucleico pequeño de interferencia.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

ARNsh: ácido ribonucleico pequeño de tipo horquilla.

°C: grados centígrados.

chIP: ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.

cm: centímetro (s).

c.s.p: cantidad suficiente para.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DO: densidad óptica.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

g: gramo (s).

h: hora(s).

IP: inmunoprecipitación.

kDa: kilo Dalton.

kb: kilo pares de bases.

l: litro.

LB: medio Luria-Bertani.

M: molar.

mA: miliamperio.

min: minuto(s).

µl: microlitro(s).

µg: microgramo (s).

ml: mililitro(s).

mg: miligramo (s).

mM: milimolar.

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

- nm: nanómetro (s).
- nt: nucleótido(s).
- % p/v: porcentaje peso en volumen.
- p53RE: *p53 Responsive Elements*.
- pb: pares de bases.
- PBS: solución tampón fosfato salino.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- PFA: paraformaldehído.
- qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.
- RE: retículo endoplasmático.
- qRT-PCR: transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.
- rpm: revoluciones por minuto.
- SDS: dodecil sulfato de sodio.
- seg: segundo(s).
- SFB: suero fetal bovino.
- TBS: Solución salina tamponada con tris.
- TE: solución tampón; 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA.
- TEM: transición epitelio-mesenquimal.
- U: unidad enzimática.
- % v/v: porcentaje volumen en volumen.
- W: watt.
- wt: *wild type*.

LENGUAJE ESPECIAL

Buffer: solución reguladora de pH.

Cassette: tipo de elemento genético móvil que contiene un gen funcional y un sitio de recombinación.

Cross-linked: polímeros unidos por enlaces covalentes.

Cross-linking: reacción que provoca la unión de una cadena de polímero a otra.

Debris: desechos orgánicos que quedan después de la lisis celular.

Downstream: corriente abajo en un gen.

Gene Expression Omnibus: repositorio público internacional que archiva y distribuye libremente datos de *microarrays*, secuenciación de última generación y otros datos genómicos.

Hotspots: una región de ADN que exhibe una propensión inusualmente alta a mutar.

Input: representa la cantidad de cromatina inicial en experimentos de chIP.

In silico: hecho por computadora o por medio de simulación computacional.

In vitro: realización de experimentos fuera del organismo vivo.

In vivo: realización de experimentos dentro del organismo vivo.

Kit: conjunto de artículos o equipos necesarios para un propósito específico.

Knockout: gen inactivado por delección, mutación, o por la interrupción con un fragmento artificial de ADN.

Merged: proceso de combinación de dos o más imágenes fotográficas con campos superpuestos para producir una única imagen.

Microarray: técnica utilizada para detectar la expresión de miles de genes al mismo tiempo.

Missense: mutación puntual en la que un solo cambio de nucleótido da como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente.

Nonsense: mutación en la que un codón que corresponde a uno de los veinte aminoácidos especificados por el código genético se cambia a un codón que provoca la terminación prematura de la traducción.

Northern Blot: procedimiento utilizado para detectar secuencias específicas de ARN mediante hibridación con ADN complementario.

Nude: término utilizado para ratones de laboratorio de una cepa con una mutación genética que causa un timo deteriorado o ausente, lo que resulta en un sistema

inmunitario inhibido debido a un número muy reducido de células T. Como fenotipo adicional se observa la ausencia de vello corporal, lo que le da el apodo "desnudo".

One-tailed T-test: prueba en la que el estadístico utilizado tiene una distribución T de Student con distribución de una cola.

One-way ANOVA: técnica estadística con distribución F que se usa para comparar las medias de dos o más muestras.

p53 Responsive Elements: secuencia de ADN reconocida por p53 y a la cual se une al actuar como factor de transcripción.

Pellet: masa sólida de moléculas o partículas (como proteínas, ácidos nucléicos o células), que se obtiene de un medio líquido en un tubo cónico mediante centrifugación.

Probeset: colección de dos o más sondas que están diseñadas para medir una única especie molecular.

Splice: mutación genética que inserta, elimina o cambia una cantidad de nucleótidos en el sitio específico en el que tiene lugar el empalme durante el procesamiento del ARN mensajero precursor en el ARN mensajero maduro.

Test: un procedimiento destinado a establecer la calidad, el rendimiento o la confiabilidad de algo.

Transwell: inserto utilizado para ensayos de migración e invasión en cultivo celular.

Two-tailed T-test: prueba en la que los datos utilizados tienen una distribución T de Student con distribución de dos colas.

Upstream: corriente arriba en un gen.

Western Blot: técnica analítica usada para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos.

Wild type: tipo silvestre, primera variante alélica descrita de un gen.

Resumen

RESUMEN

La presencia de mutaciones en el gen que codifica al supresor tumoral p53 constituye una de las alteraciones genéticas más frecuentes en el cáncer. La mayoría de dichas mutaciones son del tipo *missense*, lo que conduce a la expresión abundante de proteínas mutantes de longitud completa. Las mutantes de p53 no solo pierden la función de supresor tumoral, sino que también pueden adquirir nuevas actividades que promueven la progresión tumoral. A pesar de las evidencias que demuestran que p53 mutante aumenta la agresividad tumoral, los mecanismos que subyacen a esta actividad han sido poco caracterizados. Un aspecto notable de muchas mutantes puntuales de p53 es su capacidad de alterar la expresión génica, aún cuando la mutación anula su capacidad de actuar como un factor de transcripción. Con el fin de comprender en mayor profundidad este fenómeno, en el presente trabajo de tesis estudiamos la relación entre la familia de p53 y la expresión de *ICMT*, identificado por nuestro grupo como un gen inducido por p53 mutante. *ICMT* juega un papel clave en la regulación de proteínas preniladas, catalizando la carboximetilación del extremo C-terminal. A pesar de las crecientes evidencias que sugieren que las alteraciones en la red de proteínas preniladas pueden afectar la progresión tumoral, la regulación de este complejo proceso de modificación post-traduccional y el papel específico de *ICMT* no se comprenden completamente. Nuestro trabajo revela un vínculo entre el procesamiento posterior a la prenilación y la vía de p53. Descubrimos que los miembros de la familia p53 afectan la expresión de *ICMT* de diferentes maneras. Las proteínas relacionadas con la supresión tumoral, como p53 *wild type* (wt) e isoformas TAp63 y TAp73, mostraron un efecto negativo sobre la expresión de *ICMT*, lo que sugiere que este gen está bajo una regulación precisa en células normales. Por el contrario, la expresión de *ICMT* se vio potenciada por los mutantes puntuales de p53, lo que apoya la noción de que el estado de p53 afectaría los niveles de *ICMT* durante la progresión tumoral. A su vez, demostramos que la sobreexpresión de *ICMT* contribuye con fenotipos agresivos *in vitro* e *in vivo*. Además, encontramos una correlación entre el estado de p53 y la expresión de *ICMT* en pacientes con cáncer de mama y pulmón. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la interrelación funcional entre los miembros de la familia p53 y las formas mutantes de p53 aumenta los niveles de *ICMT* durante la

tumorigénesis, y de esta forma, coopera con la activación de mecanismos de agresividad tumoral.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1.1. Alteraciones genéticas en el cáncer

Según el Informe más reciente de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, www.iarc.fr, ISBN 978-92-832-0429-9), el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo y se prevé que el número de casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Debido a su incidencia, esta enfermedad ha sido objeto de una intensa labor de investigación en las últimas décadas. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, los conocimientos sobre la misma aún son insuficientes para lograr un control clínico satisfactorio. El cáncer es una patología compleja que presenta una notable multiplicidad de mecanismos, a través de los cuales afecta profundamente el comportamiento celular. Se considera que esta patología se origina por la acumulación de diferentes combinaciones de alteraciones genéticas y epigenéticas. Dichas alteraciones, conducen a fenotipos que generalmente presentan seis características comunes: auto-suficiencia en relación a las señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-proliferativas, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión tisular y metástasis (Figura 1) ¹.



Figura 1: Capacidades adquiridas por las células tumorales. La mayoría, si no todos los cánceres, adquieren el mismo conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de diferentes estrategias. Figura adaptada de ¹.

A su vez, además de estas seis características, el tumor puede beneficiarse también del microambiente inflamatorio ² y del cambio en el metabolismo celular para sostener una proliferación celular desregulada y potencial invasivo ³. Desde un punto de vista molecular, la tumorigénesis es un proceso de múltiples etapas en el que cada paso se asocia a mutaciones que afectan la función de proteínas que forman parte de la compleja red de la célula tumoral. En general, estas mutaciones ocurren en proto-oncogenes o en genes supresores de tumores. En el primer grupo se encuentran genes como *RAS*, *cMYC*, *SRC* y *ERBB2*, que una vez mutados muestran una función alterada, debido al aumento de su expresión y/o actividad, promoviendo así diferentes fenotipos tumorales. A la inversa, las células tumorales necesitan inactivar genes supresores de tumores como *TP53*, *RB* o *PTEN*, los cuales actúan limitando la transformación neoplásica. Las mutaciones somáticas en *TP53*, presentes en más del 40% de los casos, constituyen la alteración genética más frecuente en el cáncer humano (Figura 2) ^{4,5}.

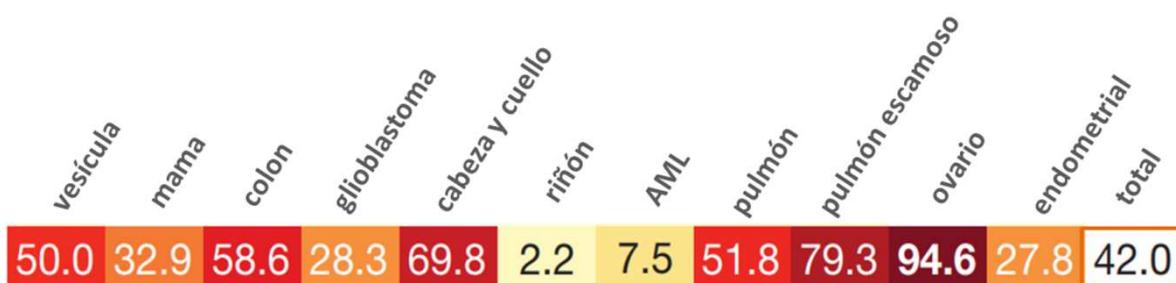


Figura 2: *TP53* es el gen más frecuentemente mutado en los tumores humanos. Se muestran los porcentajes de mutaciones en *TP53* analizados en muestras de distintos tipos de cáncer. Figura adaptada de ⁵.

TP53 codifica un factor de transcripción denominado p53, debido a su movilidad electroforética aparente, el cual actúa como un poderoso supresor tumoral. La inactivación de p53 ocurre mediante mecanismos muy diferentes a los operados sobre otros supresores tumorales, los cuales generalmente eliminan la presencia de la proteína. En el caso de p53, en cambio, aproximadamente el 74% de las mutaciones son del tipo *missense* (Figura 3) y de ellas, cerca del 97% ocurren dentro del dominio de unión al ADN ⁴. Como consecuencia de las mismas, se producen mutantes puntuales que se expresan abundantemente en tumores humanos ⁶.

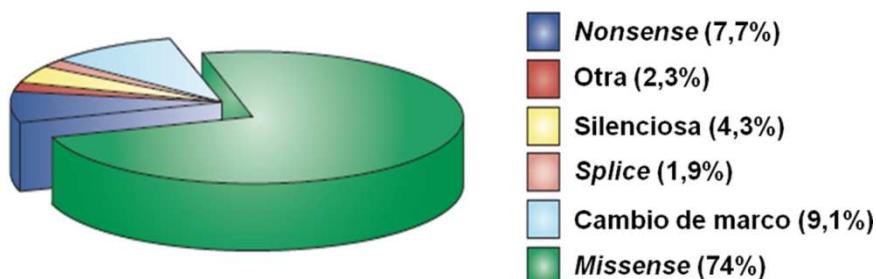


Figura 3: Distribución de mutaciones somáticas en TP53. Gráfico circular que representa los diferentes tipos de mutaciones encontradas en tumores según datos informados en la base de datos de mutaciones en TP53, IARC. Figura adaptada de ⁶.

En general, las mutantes puntuales pierden la capacidad de reconocer las secuencias blanco de p53 wt en el ADN y la función de supresor tumoral. Sin embargo, ésta no es la única consecuencia, ya que además, muchas proteínas mutantes adquieren nuevas propiedades que les permiten colaborar activamente con la progresión tumoral ⁷. De esta forma, un único evento de mutación transforma a una de las principales vías de supresión tumoral en un poderoso mecanismo oncogénico.

1.2. p53 como supresor tumoral

p53 fue descubierta durante el auge de la investigación en virus oncogénicos, como una proteína humana de 53 kDa unida al antígeno T en células transformadas con el virus SV40 ^{8,9}. Debido a esta asociación y al hecho de que numerosos clones aislados correspondían a mutantes puntuales, p53 fue inicialmente clasificado como un oncogén, pero en trabajos posteriores se estableció que la forma wt de p53 era capaz de suprimir el crecimiento y la transformación oncogénica en cultivos celulares ^{10,11}. Posteriormente, el rol de p53 como supresor tumoral fue confirmado en modelos de ratones *knockout*, los cuales desarrollan tumores con alta penetrancia ¹². Por otra parte, las mutaciones en TP53, son comunes en tumores humanos ⁴ y están relacionadas con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer ^{6,13}. De acuerdo con su acción como supresor de tumores, las mutaciones en TP53 son una característica distintiva de un trastorno genético hereditario de predisposición al cáncer conocido como síndrome de Li-Fraumeni ¹⁴. En células normales, los niveles de p53 se mantienen bajos mediante una serie de reguladores de los cuales el más caracterizado es la E3 ubiquitina ligasa MDM2, que facilita su degradación ^{15,16,17}.

Sin embargo, p53 se estabiliza en respuesta a diversos tipos de estrés celular, incluyendo el daño al ADN y problemas durante la replicación causados por oncogenes. Los mecanismos que conducen a la activación de p53 dependen del estímulo: por ejemplo, el daño al ADN promueve la fosforilación de p53, bloqueando la degradación mediada por MDM2¹⁸, mientras que la señalización oncogénica induce la inhibición de MDM2 por parte del supresor tumoral ARF¹⁹. Las funciones mejores entendidas de p53 se centran en su capacidad para promover el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Estudios pioneros de la década de 1990 demostraron que p53 es crucial para activar el control del ciclo celular inducido por daño reversible al ADN²⁰; mediado en parte, por su capacidad para activar transcripcionalmente a p21^{21,22}. En algunas circunstancias, p53 induce la senescencia celular, un programa permanente de detención del ciclo celular^{23,24}. Asimismo, p53 puede promover la apoptosis^{25,26}, a través de la inducción transcripcional de miembros de la familia BCL-2 tales como *BAX* y *PUMA*^{27,28}. Sin embargo, el rol biológico de p53 wt parece ser mucho más complejo, como lo sugieren trabajos recientes, los cuales demuestran que p53 también controla programas “no canónicos”. Como ejemplos se pueden citar, la capacidad de p53 de modular la autofagia, alterar el metabolismo, reprimir la pluripotencialidad y la plasticidad celular, así como funciones citoplasmáticas independientes de la transcripción^{29,30}. Incluso los niveles basales de p53 pueden reforzar otras múltiples redes supresoras de tumores³¹. En conjunto, las evidencias sugieren que la respuesta de p53 es notablemente flexible y que depende del tipo celular, su estado de diferenciación, las condiciones de estrés y las señales externas.

1.3. Dominios funcionales de p53

TP53 abarca 20 Kb en el cromosoma 17 (17p13.1) y consta de 11 exones, que codifican una proteína de 393 aminoácidos (aa)³². Como muchos otros factores de transcripción, p53 tiene una estructura compuesta por dominios funcionales conservados evolutivamente: un dominio N-terminal (*Transactivation Domain*, TAD, aa 1-61), un dominio rico en prolina (*Proline Rich Region*, PRR, aa 64-93), un dominio central de unión al ADN (*DNA Binding Domain*, DBD, aa 93-292), un dominio de oligomerización (*Oligomerization Domain*, OD, aa 325-355) y un dominio regulador C-terminal (*C-Terminal Domain*, CTD, aa 355-393) (Figura 4).



Figura 4: Organización de los dominios de la proteína p53. Dominios de transactivación 1 y 2 (TAD1 y TAD2), región rica en prolina (PRR), dominio de unión a ADN (DBD), señales de localización nuclear 1, 2 y 3 (NLSI, NLSII, NLSIII), dominio de oligomerización (OD), secuencia de exportación nuclear (NES) y dominio C terminal (CTD). Figura adaptada de ³³.

El dominio N-terminal de p53 es responsable de su función como activador transcripcional ^{34,35} y está compuesto por dos subdominios: TAD1 y TAD2. Este dominio interactúa con componentes de la maquinaria de transcripción basal y con diversos reguladores de la transcripción ³⁶⁻³⁹. Adyacente al dominio de transactivación está el dominio rico en prolina que contiene cinco repeticiones del motivo PXXP (donde P designa prolina y X cualquier otro aminoácido). Esta región es importante para la unión con diferentes interactores proteicos ⁴⁰, en parte debido a que los motivos PXXP proporcionan sitios de unión para el dominio de homología 3 de Src (SH3) presente en numerosos componentes de vías de señalización. En la parte central de la proteína se encuentra el dominio de unión de unión al ADN, capaz de reconocer secuencias específicas en los genes blanco. La tetramerización de p53, requerida para su función de transactivación, está mediada por el dominio de oligomerización ⁴¹. Además, este dominio contiene una secuencia que regula el intercambio de p53 entre el núcleo y el citoplasma (*Nuclear Export Signal*, NES aa 340-351) ⁴². Adyacentes al dominio de oligomerización se encuentran tres señales de localización nuclear (NLSI aa 316–325, NLSII aa 369–375 y NLSIII aa 379–384) ⁴³. Los últimos aminoácidos de p53 constituyen el dominio C-terminal básico que se ha considerado como un dominio regulador debido a su capacidad para influir en la actividad de p53 bajo condiciones de estrés ⁴⁴. Varios residuos de lisina en este dominio experimentan modificaciones post-traduccionales que regulan la estabilidad y función de p53 ⁴⁵. Además, ha sido propuesto que facilitaría la unión del DBD a sus secuencias blanco a través de interacciones electróstáticas con el ADN ⁴⁶.

1.4. Isoformas de p53

Existe un patrón complejo de isoformas de p53 debido al uso de distintos promotores y al empalme alternativo durante el procesamiento del transcripto primario (Figura 5).

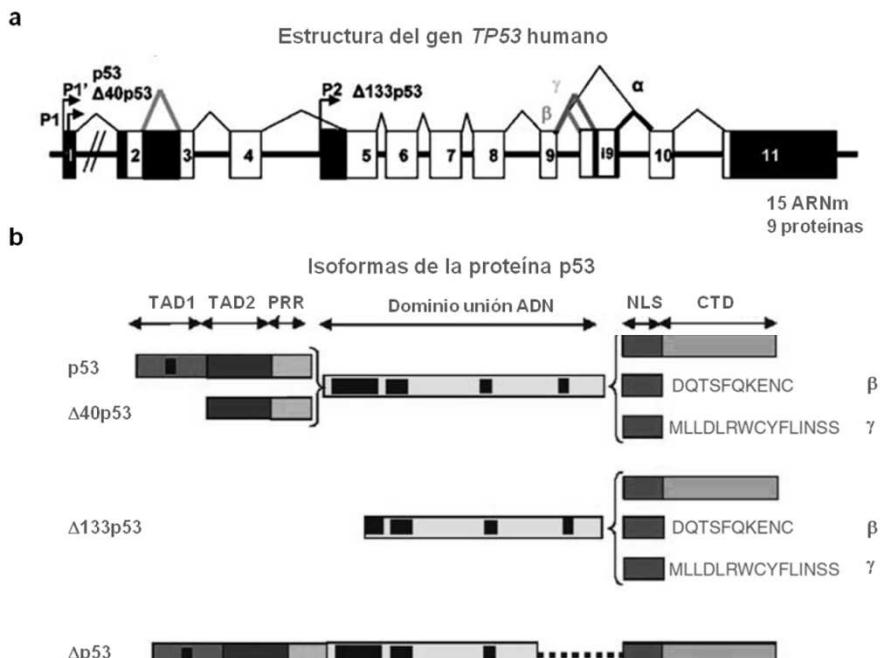


Figura 5: Isoformas de p53. a) Esquema de la estructura del gen *TP53* humano. Se indican empalmes alternativos (α , β , γ) y promotores alternativos (P1, P1' y P2). b) Dominios estructurales y funcionales presentes en las isoformas de p53. Figura adaptada de ⁴⁷.

La transcripción de la proteína puede iniciarse desde dos sitios distintos en la secuencia del exón 1 (P1 y P1'), pero también desde un promotor interno ubicado en el intrón 4 (P2). El uso de promotores alternativos puede conducir a la expresión de dos proteínas p53 truncadas en el extremo N-terminal diferentes: Δ40p53 y Δ133p53. Δ40p53 pierde el subdominio de transactivación TAD1 y se obtiene mediante un inicio alternativo de la traducción a partir de P1' o un empalme alternativo del intrón 2. El uso de P2 permite la expresión de Δ133p53, isoforma que se inicia en el codón 133 y carece del dominio de transactivación completo (TAD1 y TAD2), el dominio rico en prolina y parte del dominio de unión al ADN. Además, el empalme alternativo del intrón 9 puede producir tres isoformas diferentes en su extremo C-terminal: p53 (o p53 α), p53 β y p53 γ , de las cuales, las isoformas p53 β y p53 γ carecen del dominio de oligomerización ^{47,48}. Curiosamente, se ha descrito una isoforma de p53 adicional ($\Delta p53$), que se caracteriza por una delección de 66

aminoácidos dentro del dominio central (correspondiente a los aa 257-322). Esta isoforma presenta una actividad transcripcional diferente de la de p53 de longitud completa⁴⁹, induciendo solo genes involucrados en el arresto del ciclo celular. Hasta ahora, los niveles de expresión espacial y temporal de las diferentes isoformas de p53 son en gran parte desconocidos y sus roles funcionales aún esperan una caracterización más profunda^{50,51}.

1.5. Regulación de la expresión génica mediada por p53

La función supresora de tumores de p53 wt se atribuye en gran medida a su capacidad para regular la transcripción de numerosos genes diana, aunque otros modos de acción han sido descriptos^{30,52}. El mecanismo de activación transcripcional involucra la unión de p53 wt al ADN en regiones específicas conocidas como elementos de respuesta a p53 (*p53 Response Elements*, p53RE). Dichas regiones están formadas por dos hemisitios, cada uno de los cuales posee una secuencia definida por el consenso PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy (donde; Pu:purina, Py: pirimidina), organizados en un arreglo palindrómico y separadas por un espaciador de 0–13 pares de bases⁵³. Cada hemisitio contacta a dos monómeros de p53 wt, conformando en total una estructura activa tetramérica. La presencia de p53 wt en los promotores de genes diana permite la activación de diversos procesos que involucran la interacción con diferentes interactores⁵⁴. Por un lado, p53 wt es capaz de reclutar proteínas reguladoras de la estructura de la cromatina que colaboran para aumentar la accesibilidad de la maquinaria transcripcional. Por ejemplo, la interacción con las acetil-transferasas p300 y CBP, favorece la relajación de la cromatina mediante la acetilación de histonas y aumenta la estabilidad de p53 a través de su acetilación^{55–57}. También se ha descripto la interacción de p53 wt con miembros del complejo acetil-transferasa STAGA y con la arginina-metiltransferasa PRMT1^{58,59}. Por el otro, p53 wt interactúa con diversos componentes del complejo de pre-iniciación de la transcripción. Entre las interacciones con factores de transcripción basales caracterizadas se puede citar la unión a TBP, TAF6 y TAF9, pertenecientes al factor TFIID. También ha sido descripta la interacción con componentes de TFIIF, como p62 y TFB1^{60,61}. Además, p53 wt puede interactuar con miembros del complejo multiproteico *Mediator*, el cual actúa como una plataforma de ensamblado del complejo de pre-iniciación. Entre los

genes inducidos por p53 wt más estudiados hasta el momento se encuentran genes involucrados en el control del ciclo celular como *CDKN1A* que codifica al inhibidor de CDKs p21²¹, el gen que codifica 14-3-3 σ inhibidor de la importación nuclear de Ciclina B / Cdc2,⁶² o genes pro-apoptóticos como *BAX* y *PUMA*²⁷. Además, p53 wt induce la transcripción de MDM2, que codifica a su propia ubiquitina ligasa^{63,64}. En conjunto, los estudios realizados indican que p53 wt es capaz de inducir la transcripción de más de 100 genes³⁰. Sin embargo, el repertorio de genes activados por p53 wt en cada caso particular es variable, y depende en gran medida del contexto celular y del tipo de señales activadoras.

Además de la inducción transcripcional, se ha demostrado que p53 wt es capaz de reprimir la expresión de numerosos genes, los cuales están involucrados en distintas funciones celulares (Tabla 1)⁶⁵.

Función	Gen	Función	Gen
Apoptosis	ARC	Replicación y Reparación del ADN	APEX1/APE1/Ref1
	BCL2		BRCA1-2
	LGALS3/galactina-3		MGMT
	NOS3		RECQL4
	UBD/FAT10		TOP2A
Ciclo Celular/ Crecimiento Celular	Ciclina A-B1-B2	Matriz extracelular/ Adhesión	EPCAM
	VEGF		FN1/Fibronectina
	CHEK1		MMP13
	FOS/c-FOS		PODXL
	MYC		MMP1
Destino Celular/ Desarrollo	CD44	Infección/ Respuesta Inmune	HBV/Virus Hepatitis B
	NANOG		IL6
	PCNA		TP53BP1/p202
Señalización Celular	AR	Metabolismo	PTGS2/COX2
	PKD1		ALB/albumina
	PRKCA/PKCa		ABC1/MDR1
	PTPN6/SHP-1		TYR
Citoesqueleto/ Movilidad Celular	PTK2/FAK	Regulación Transcripcional y Traduccional	EIF4E
	MLN50/LASP1		HSP90AB1/Hsp90 β
	STMN1		HSPA4/hsp70
	ANLN		MIR17-92

Tabla 1: Genes reprimidos por p53 wt.

La actividad represora de p53 wt parece involucrar una mayor variedad de mecanismos en comparación con la activación transcripcional. Si bien, muchos de estos genes poseen una región sensible a p53 en el promotor⁶⁵, en general no se identificó un p53RE canónico asociado a su actividad represora. De todas formas, en muchos casos se observó el reclutamiento de p53 wt en los promotores de genes reprimidos y en algunos casos se demostró la interacción directa con el ADN⁶⁵. En conjunto, las evidencias experimentales han permitido proponer diferentes mecanismos de represión transcripcional activados por p53 wt. Estos pueden

clasificarse en mecanismos directos, los cuales involucran su reclutamiento en el promotor, y mecanismos indirectos en los cuales p53 wt actúa sin necesidad de interactuar físicamente con la cromatina en los genes diana⁶⁶. Entre los mecanismos de represión directos que involucran la interacción con el ADN podemos a su vez distinguir varias posibilidades. De manera análoga a la activación transcripcional, p53 puede unirse a un elemento de respuesta en el ADN e incluso, reclutar co-represores (Figura 6 a). Otra posibilidad implica la unión de p53 a un elemento que se superponga a los sitios de unión de otros activadores de la transcripción (Figura 6 b). También podría producirse la unión de p53 en la cercanía de un sitio de unión para un factor de transcripción, posibilitando la acción inhibitoria de p53 wt sobre el mismo (Figura 6 c)⁶⁷. Los sitios de unión identificados presentan variaciones en el núcleo central del p53RE canónico y en la orientación de los hemisitios⁶⁸. Además, los análisis recientes de los sitios represores validados muestran a menudo espaciadores más largos que en los sitios activadores⁶⁹.

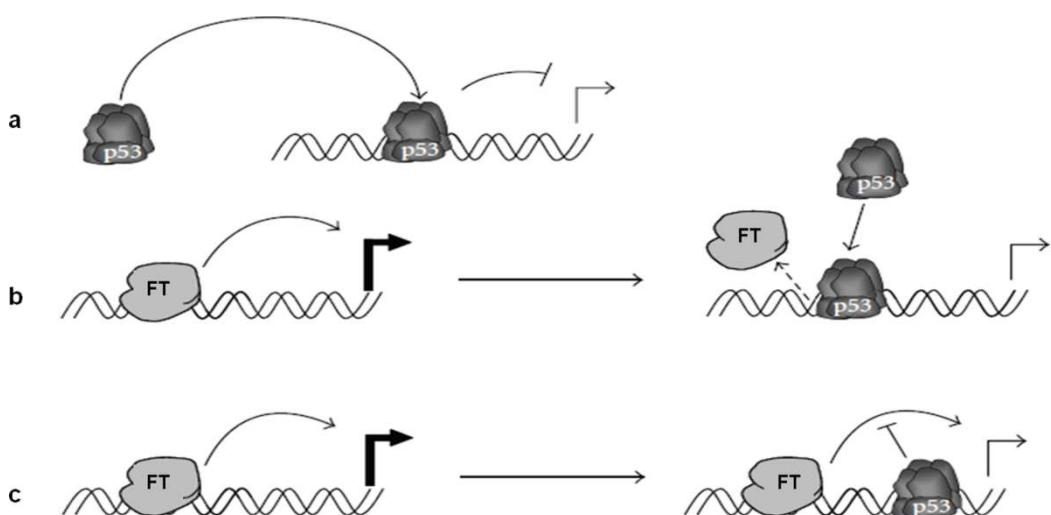


Figura 6: Mecanismos de represión de p53 dependientes de unión al ADN. a) Unión de p53 a una secuencia específica que conduce a la represión transcripcional directa por p53. b) Desplazamiento de factores de transcripción debido a la superposición de los sitios de unión al ADN. c) Unión de p53 en la cercanía de un sitio de unión para un factor de transcripción, ejerciendo inhibición sobre el mismo. Figura adaptada de⁶⁷

A su vez, p53 wt puede ser reclutado en los promotores de genes reprimidos mediante la interacción con otras proteínas. p53 wt puede actuar como un co-represor, uniéndose a otros factores de transcripción presentes en los promotores (Figura 7 a). Alternativamente, puede interactuar con componentes de la maquinaria de transcripción basal, interfiriendo con su función (Figura 7 b). Además, la

presencia de p53 wt en los promotores puede contribuir la condensación de la cromatina mediante el reclutamiento de histona deacetilasas o ADN metiltransferasas (Figura 7 c) ⁶⁷.

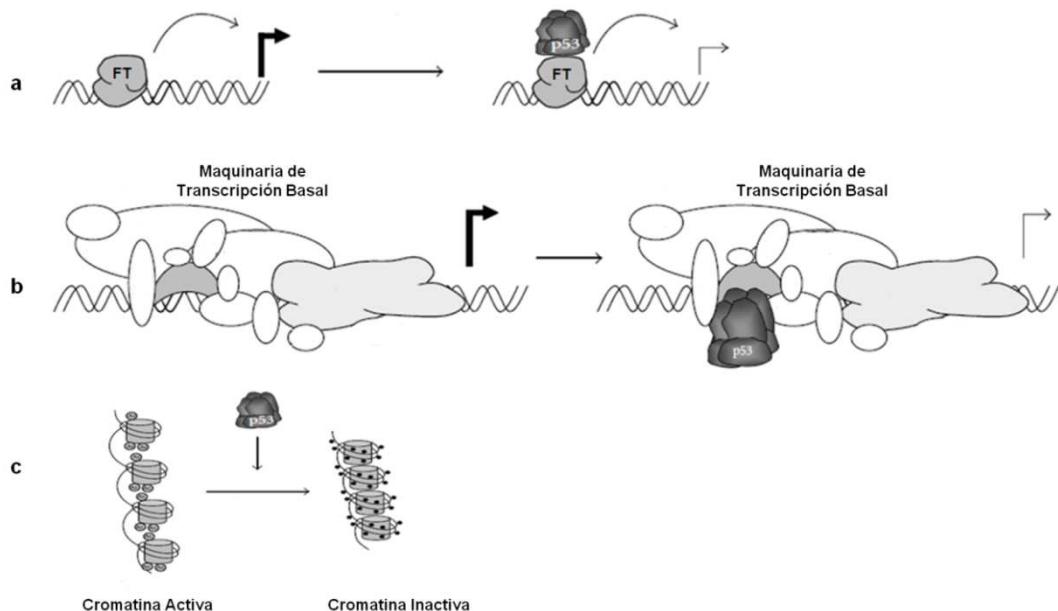


Figura 7: Reclutamiento de p53 en los promotores de genes reprimidos mediante la interacción con otras proteínas. **a)** Interacción de p53 con co-factores de transcripción. **b)** Interacción de p53 con la maquinaria de transcripción basal. **c)** Regulación de la estructura de la cromatina y metilación del promotor. Figura adaptada de ⁶⁷.

Los mecanismos de represión indirecta se caracterizan por la ausencia completa de p53 en los promotores de los genes diana (Figura 8). En estos casos, se propone que p53 puede ejercer sus efectos represivos indirectamente regulando la transcripción de otros factores transcripcionales y/o micro ARNs ⁷⁰. Además, p53 wt podría secuestrar interactores, impidiendo su unión a la cromatina.

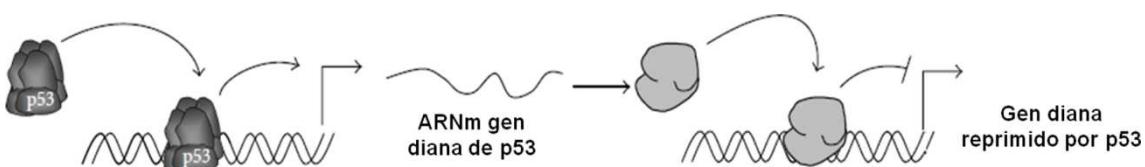


Figura 8: Represión indirecta de p53 a través de la regulación de otros genes. p53 regula la expresión de numerosos factores de transcripción y los cambios en la expresión de los mismos pueden afectar la regulación de sus propios genes diana. Figura adaptada de ⁶⁷.

Cabe señalar que las funciones de los genes reprimidos por p53 están involucradas en muchos procesos biológicos diferentes (Figura 9), lo que sugiere que la represión transcripcional por p53 desempeña un papel importante en la fisiología celular. El equilibrio, entre los genes diana transactivados y reprimidos en estas vías, funciona en conjunto para modelar el comportamiento celular.

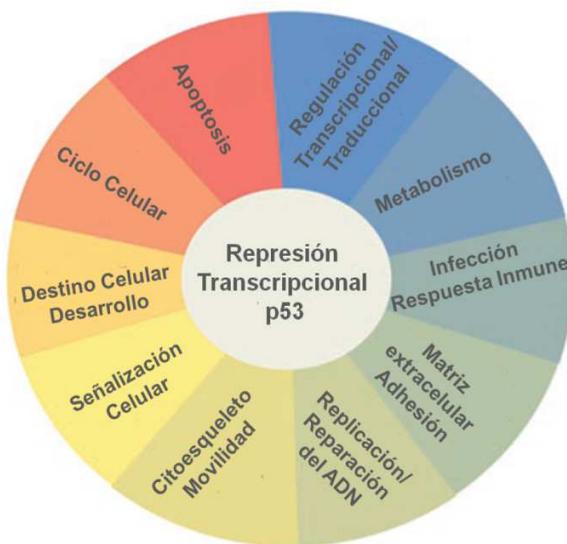


Figura 9: Procesos celulares en los cuales intervienen genes reprimidos por p53. Figura adaptada de ⁶⁵.

1.6. La familia de p53

Aunque inicialmente se creyó que p53 era una proteína única sin parálogos, más tarde, quedó claro que pertenece a una familia multigénica que incluye otros dos miembros, p63 y p73, codificadas por los genes *TP63* y *TP73* respectivamente ^{71,72}. Aunque las tres proteínas son capaces de unirse al ADN de una manera específica, reconociendo secuencias similares y tienen una organización modular comparable, sus estructuras primarias no comparten una identidad elevada. Se observa alrededor del 30% de identidad entre p53 y cualquiera de sus parálogos considerando toda la secuencia. Curiosamente, la identidad alcanza el 65% cuando se considera solo el dominio de unión al ADN (IARC *TP53 Database*, www.p53.iarc.fr). En concordancia con esta homología estructural parcial, los miembros de la familia de p53 tienen algunas funciones superpuestas mediadas por la transactivación de genes diana comunes ⁷³. De hecho, p63 y p73 también pueden

desencadenar apoptosis en respuesta al estrés genotóxico⁷⁴ e inducir senescencia tanto *in vitro* como *in vivo*^{75,76}. A pesar de esta similitud, el desarrollo de ratones *knockout* para estos genes demostró en forma categórica que ambos poseen funciones biológicas específicas en el desarrollo embrionario y el control de la diferenciación. Aunque los ratones que carecen de p63 nacen vivos, muestran graves fenotipos asociados a defectos en el desarrollo^{77,78}. Las extremidades están ausentes o truncadas debido a un mal funcionamiento de la cresta ectodérmica apical. Además, estos ratones no desarrollan una epidermis estratificada, ni la mayoría de los tejidos epiteliales (por ejemplo; folículos pilosos, dientes, próstata y glándulas mamarias) y, finalmente, mueren por deshidratación en las horas posteriores al nacimiento. Todas estas anomalías indican el papel fundamental de p63 en el desarrollo epidérmico^{77,78}. Los ratones que carecen de p73 muestran un retraso en el crecimiento y una alta tasa de mortalidad en los primeros dos meses⁷⁹. A su vez, sufren varios defectos neurológicos (hidrocefalia, disgenesia del hipocampo y pérdida de neuronas simpáticas), tienen problemas inmunológicos caracterizados por infecciones crónicas e inflamación y muestran un comportamiento reproductivo y social anormal. Otro aspecto notable de esta familia es que tanto *TP63* como *TP73* codifican una serie de isoformas cuya caracterización conforma un campo de investigación de enorme interés, actualmente en desarrollo. El papel crítico de p63 y p73 en el proceso tumoral *in vivo*, fue puesto en evidencia por hallazgos en ratones compuestos p63^{+/−} p73^{+/−}, los cuales mostraron el desarrollo de tumores espontáneos y metástasis. Además, se observó que la pérdida de p63 y p73 también puede cooperar con la pérdida de p53 en el desarrollo de tipos tumorales específicos⁸⁰. A pesar de su relevancia, dicho modelo no permitió profundizar el rol funcional de las distintas isoformas de p63 y p73, ya que se basó en la eliminación completa de las mismas. Los avances más recientes, realizados en este sentido, indican una notable complejidad funcional con diferentes consecuencias sobre el proceso neoplásico.

1.7. Isoformas de p63 y su relación con el cáncer

TP63 consta de 15 exones, que abarcan más de 270 Kb en el cromosoma 3q27⁸¹. Codifica al menos seis isoformas generadas por la combinación de empalme alternativo y transcripción desde un promotor alternativo ubicado en el intrón 3

(Figura 10 a). Las isoformas TAp63 se generan por la actividad del promotor corriente arriba del exón 1, y contienen el dominio de transactivación en su extremo N-terminal. En cambio, el promotor alternativo en el intrón 3 conduce a la expresión de isoformas Δ Np63, que carecen del dominio de transactivación. En total, han sido identificadas al menos seis variantes de ARNm que permiten la síntesis de seis isoformas proteicas diferentes (TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ , Δ Np63 α , Δ Np63 β y Δ Np63 γ) (Figura 10 b).

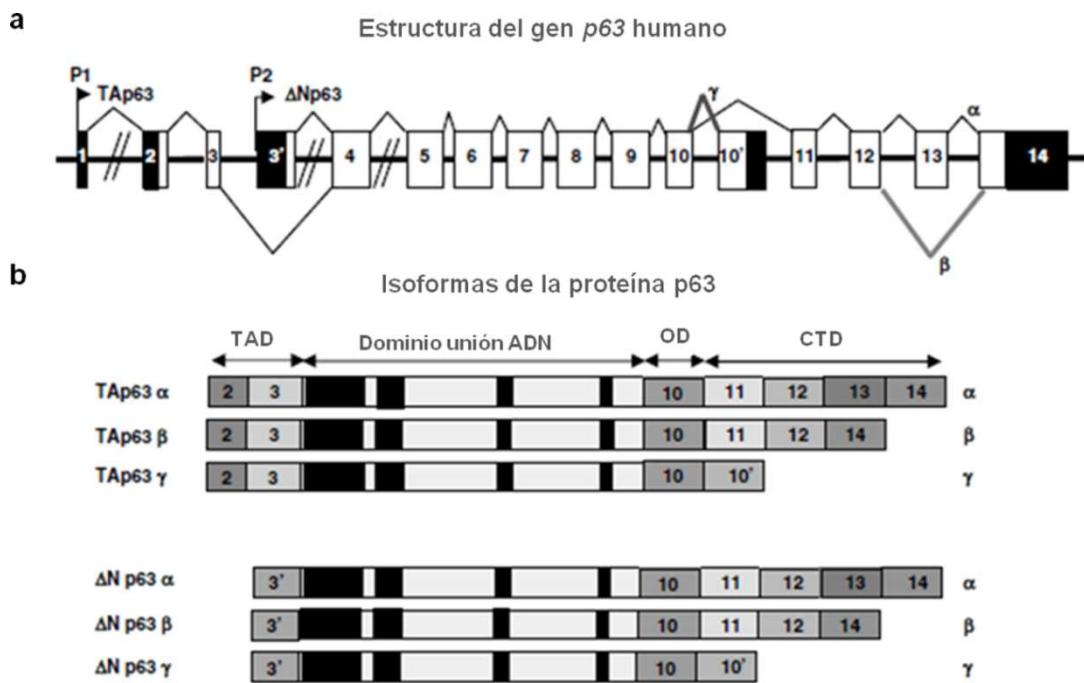


Figura 10: Isoformas de p63. a) Esquema de la estructura del gen *TP63* humano, se indican el empalme alternativo (α , β y γ) y los promotores alternativos (P1 y P2). b) Isoformas de p63. Las proteínas TAp63 codificadas a partir del promotor P1 contienen el dominio N-terminal de transactivación. Las proteínas Δ Np63 codificadas a partir del promotor P2 son proteínas truncadas que contienen un dominio N-terminal diferente al de las proteínas TAp63. Los números indican los exones que codifican las isoformas de p63. Figura adaptada de ⁸²

Todas las isoformas son capaces de unirse al ADN a través de un elemento de respuesta y regular la transcripción de los genes diana. Dicho elemento es similar al p53RE, pero sin embargo presenta selectividad por p63 ^{83,84}. Además de regular un repertorio génico específico, las isoformas TAp63 pueden inducir la expresión de algunos genes diana de p53 wt, colaborando de esta forma con el arresto del ciclo celular o la apoptosis. Estas observaciones iniciales sugirieron que las isoformas TAp63 podrían colaborar con la supresión tumoral. Dicha hipótesis se vio confirmada

por estudios más recientes que ampliaron dicho concepto demostrando un papel crítico para TAp63 en la supresión de la metástasis^{85,86}. El rol de las isoformas ΔNp63 en el cáncer ha sido menos estudiado. La capacidad de dichas isoformas de ejercer dominancia negativa sobre p53 wt y TAp63 mediante la competencia por los elementos de respuesta en el ADN sugirió que podrían colaborar con el desarrollo tumoral⁸⁷. Por otra parte, también se demostró que las isoformas ΔNp63 activan directamente genes específicos no inducidos por las isoformas TAp63, como Hsp-70, HSP70B, TMP, IL-8, DSPP y Hdkk-1^{88,89}, algunos de los cuales podría colaborar con el desarrollo tumoral.

1.8. Isoformas de p73 y su relación con el cáncer

TP73 consta de 15 exones que abarcan más de 80 Kb en el cromosoma 1p36.3. También codifica varias isoformas generadas mediante la combinación de diferentes mecanismos^{90,91}. Las isoformas TAp73 se generan por la actividad del promotor P1, corriente arriba del exón 1, mientras que el promotor alternativo P2, en el intrón 3, conduce a la expresión de isoformas ΔNp73, que carecen del dominio de transactivación (Figura 11 a). Por otro lado, la exclusión del exón 2 por empalme alternativo genera las proteínas ex2p73, las cuales han perdido parte del dominio de transactivación. A su vez, la exclusión de los exones 2 y 3 por empalme alternativo origina las proteínas ex2/3p73, que pierden por completo el dominio de transactivación y se inician desde el exón 4. En forma similar a p63, mediante empalme alternativo se generan al menos siete alternativas para el extremo C-terminal (α, β, γ, δ, ε, ζ y η). Además, el uso de codones de iniciación alternativos en el dominio N-terminal, proporciona cuatro alternativas adicionales para las isoformas TAp73⁹². En conjunto, p73 expresa al menos 35 variantes de ARNm, que pueden codificar teóricamente 29 isoformas diferentes de la proteína p73 (Figura 11 b). Hasta ahora, se han descripto 14 isoformas de p73 diferentes.

De manera similar a p63 todas las isoformas de p73 son capaces de unirse específicamente al ADN a través de elementos de respuesta específicos, los cuales guardan similitud con los p53RE⁸⁴.

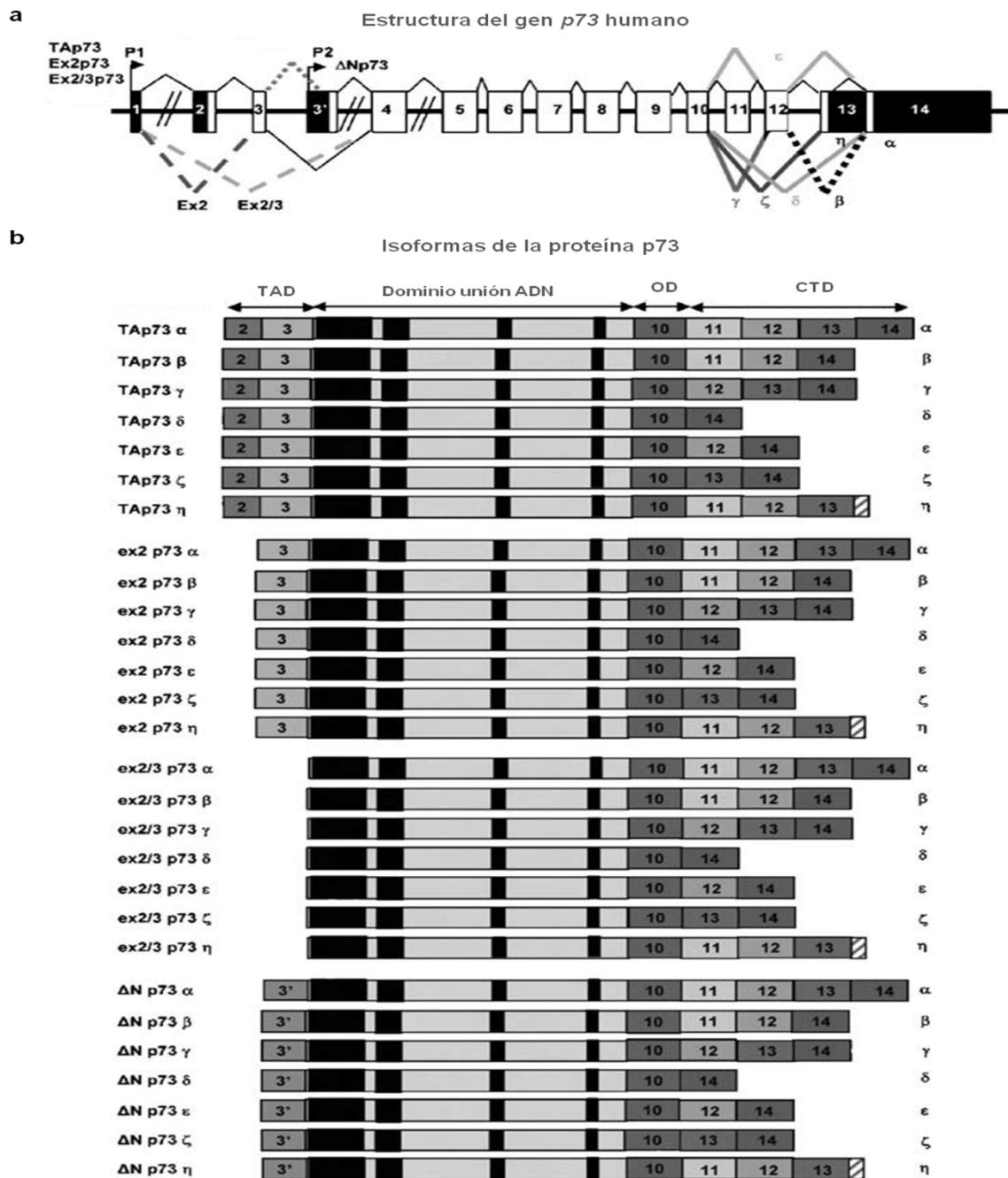


Figura 11: Isoformas de p73. a) Esquema de la estructura del gen *TP73* humano, se indican empalmes alternativos (Ex2, Ex2/3, α , β , γ , δ , ϵ , ζ y η) y promotores alternativos (P1 y P2). b) Isoformas de p73. Las proteínas TAp73 codificadas a partir del promotor P1 contienen el dominio N-terminal de transactivación conservado. Las proteínas ex2p73 se originan por la exclusión del exón 2. Las proteínas ex2/3p73 se originan por exclusión de los exones 2 y 3 y se inician desde el exón 4. Las proteínas Δ Np73 codificadas a partir del promotor P2 son proteínas truncadas que contienen un dominio N-terminal diferente de las proteínas TAp73. Los números indican los exones que codifican las isoformas de p73. Figura adaptada de ⁸².

Las isoformas de p73 regulan repertorios génicos específicos, sin embargo, existe un cierto grado de superposición con p53 wt. Por ejemplo, las isoformas TAp73 pueden colaborar con el arresto del ciclo celular y la respuesta apoptótica, a través de su acción sobre genes inducidos por p53 wt. Las isoformas Δ Np73 pueden

ejercer efectos dominantes negativos sobre las actividades de p53wt, TAp73 y TAp63 mediante la competencia por sitios de unión al ADN^{87,91}. También se demostró que las isoformas ΔNp73 activan directamente genes no inducidos por las isoformas TAp73⁹³. En general, las evidencias sugieren un rol anti-tumoral para las isoformas TAp73 y un rol pro-tumoral para las isoformas ΔNp73, aunque se requiere una caracterización más profunda de su función biológica.

1.9. Mutantes de p53

Si bien el espectro de mutaciones en *TP53* es complejo, incluyendo mutaciones de distintos tipos, el mismo se encuentra dominado por la presencia de mutaciones de tipo *missense*. Esta es una característica que distingue a p53 wt de otros supresores tumorales, los cuales son generalmente inactivados por mutaciones que eliminan la proteína. En cambio, las mutaciones *missense* en *TP53* permiten la expresión de proteínas mutantes puntuales, las cuales son muy abundantes en tumores humanos. Estas alteraciones han sido encontradas en toda la secuencia del gen *TP53*⁹⁴, pero con mayor frecuencia se agrupan dentro del dominio de unión al ADN, dentro del cual se identificaron seis codones (*hotspots*) que se sustituyen con mayor frecuencia, presentes en las posiciones 175, 245, 248, 249, 273 y 282 (Figura 12).

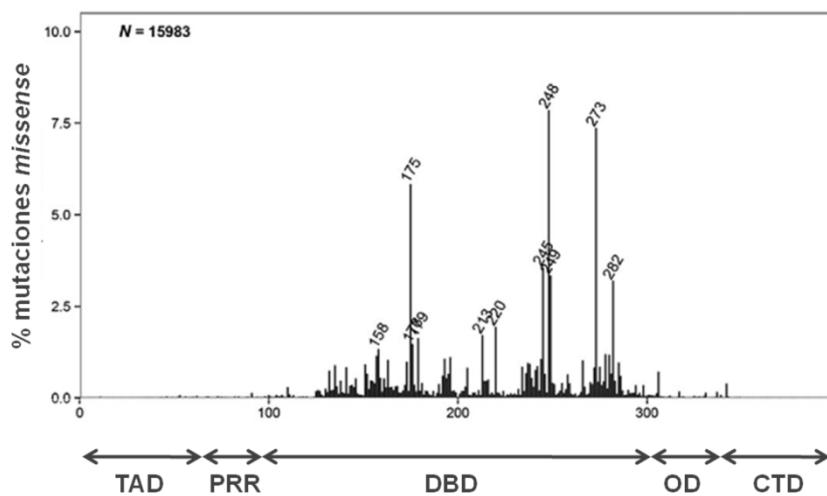


Figura 12: Distribución de las mutaciones missense reportadas a lo largo de la secuencia de p53 (393 aa). TAD, dominio de transactivación; PRR, dominio rico en prolina; DBD, dominio de unión al ADN; OD, dominio de oligomerización; CTD, dominio C-terminal. N: número de muestras analizadas. Figura adaptada de⁹⁴.

Aunque la mayoría de los estudios experimentales se han centrado en la actividad de las mutantes de p53 más frecuentes, casi todos los codones dentro del dominio de unión al ADN de p53 se encuentran individualmente mutados en el cáncer. Las mutantes de p53 se han clasificado en dos categorías diferentes: el primer grupo comprende mutaciones que afectan a los aminoácidos que entran en contacto directo con el ADN, como R248Q, R248W y R273H y, por lo tanto, previenen la actividad transcripcional sin afectar drásticamente la conformación de la proteína (conocidas como mutantes de contacto), y el segundo grupo comprende mutaciones que afectan la estructura tridimensional de la proteína, causando distorsiones conformacionales locales (como R249S y G245S) o globales (como R175H y R282W) (denominadas mutantes conformacionales).

Posición/codón	ADN/cambio de base	Proteína/cambio de aa	Tipo de mutación	Efecto mutación
175	c.524G>A	p.R175H	Sustitución/missense	Estructural
196	c.586C>T	p.R196*	Sustitución/nonsense	Estructural
213	c.637C>T	p.R213*	Sustitución/nonsense	Nula
220	c.659A>G	p.Y220C	Sustitución/missense	Estructural
245	c.733G>A	p.G245S	Sustitución/missense	Estructural
248	c.742C>T	p.R249W	Sustitución/missense	Unión al ADN
248	c.743G>A	p.R248Q	Sustitución/missense	Unión al ADN
273	c.818G>A	p.R273H	Sustitución/missense	Unión al ADN
273	c.817C>T	p.R273C	Sustitución/missense	Unión al ADN
282	c.844C>T	p.R282W	Sustitución/missense	Unión al ADN
306	c.916C>T	p.R306*	Sustitución/nonsense	Deleción C-terminal
342	c.1024C>T	p.R342*	Sustitución/nonsense	Deleción C-terminal

Tabla 2: Mutaciones frecuentes en TP53. Se muestran 12 mutaciones que representan cada una al menos el 1% del total de las mutaciones en el conjunto de datos del genoma completo proveniente de la base de datos COSMIC (cancer.sanger.ac.uk/wgs). Estructural: mutación que afecta el plegamiento de la proteína; Nula: se predice que la mutación impide la síntesis de la proteína; Unión al ADN: mutación que reemplaza a un aminoácido que hace contacto directo y específico con el ADN; Deleción C-terminal: mutación que genera una proteína que carece de todo (p.R306 *) o parte del (p.R342 *) dominio de oligomerización. Tabla adaptada de ⁴.

Estas mutaciones puntuales generalmente conducen a una pérdida de la actividad de p53 wt, sin embargo, sus consecuencias funcionales pueden ser más complejas. Los efectos fenotípicos de p53 mutante pueden resumirse en tres escenarios no excluyentes entre sí (Figura 13).

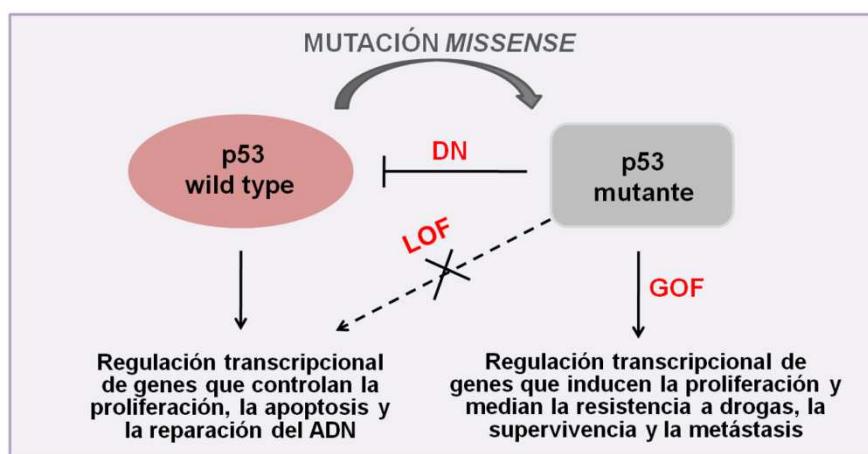


Figura 13: Representación esquemática del impacto funcional de las mutaciones en TP53. LOF: *loss of function*, pérdida de función; DN: dominancia negativa; GOF: *gain of function*, ganancia de función. Figura adaptada de ⁶.

En primer lugar, la mayoría de las mutaciones observadas en tumores humanos anulan las funciones supresoras de tumores del alelo afectado, lo que se denomina pérdida de función (*Loss of Function*, LOF). Si en la misma célula el alelo restante se pierde (pérdida de heterocigosisidad), dicha célula quedará totalmente privada de la protección antitumoral mediada por p53 wt. En segundo lugar, la mayoría de las mutaciones *missense* producen mutantes de p53 de longitud completa capaces de inhibir, en diversos grados, la función de la proteína wt. Este efecto de dominancia negativa se logra mediante la oligomerización de proteínas mutantes y wt, formando un heterotetrámero defectuoso en la unión al ADN ⁹⁵. Por lo tanto, incluso si se retiene el alelo wt, la célula puede verse privada de las funciones de p53 wt a través de dicho mecanismo. Finalmente, se demostró que muchas mutaciones puntuales confieren a la proteína nuevas funciones que son independientes de p53 wt. Tales actividades, comúnmente descritas como ganancia de función de p53 mutante (*Gain of Function*, GOF) pueden contribuir activamente con varios aspectos del desarrollo tumoral (Figura 14).

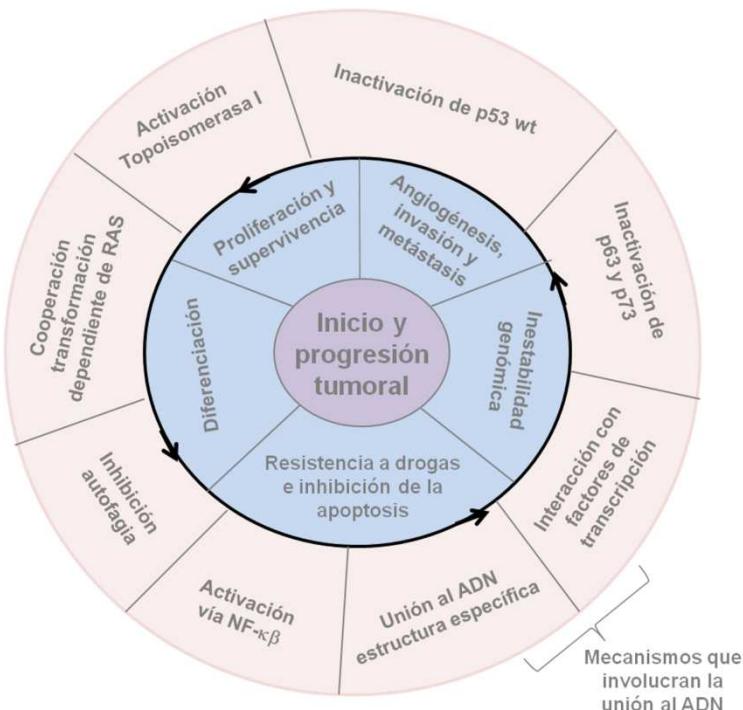


Figura 14: Propiedades oncogénicas de p53 mutante y sus mecanismos subyacentes. El círculo interior (celeste) representa fenotipos oncogénicos asociados con las actividades de las proteínas mutantes de p53. El círculo exterior representa propiedades clave de los mutantes de p53 que subyacen a los fenotipos enumerados en el círculo interno. Cada uno de los efectos fenotípicos se puede atribuir a casi cada una de las propiedades mecanicistas; por lo tanto, el círculo interior se puede girar libremente. Figura adaptada de ⁶.

Si bien el concepto de ganancia de función está presente desde el descubrimiento de p53, recién se demostró experimentalmente por primera vez hace más de 25 años ⁹⁶, cuando se observó que la introducción de p53 mutante en células nulas para p53 era capaz de aumentar la agresividad *in vitro* e *in vivo*. Actualmente, la adquisición de nuevas funciones por parte de mutantes puntuales de p53 ha sido ampliamente documentada en una gran variedad de sistemas experimentales. En particular, el desarrollo de modelos en ratones constituyó un punto de inflexión en este campo, demostrando que la presencia de p53 mutante favorece el desarrollo de un perfil tumoral más agresivo y metastásico en comparación con ratones sin p53 ⁹⁷⁻¹⁰³. La hipótesis de la adquisición de nuevas funciones en mutantes puntuales de p53 se ve respaldada por la observación de la evolución clínica de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni. Los pacientes que portan una mutación *missense* en la línea germinal desarrollan cáncer en forma significativamente más precoz que los pacientes con otros tipos de mutaciones en *TP53* ^{104,105}. A pesar de las contundentes evidencias sobre el rol pro-tumoral de p53 mutante, no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares involucrados. Las hipótesis propuestas

para explicar estas funciones neomórficas sugieren que p53 mutante podría actuar como un factor pleiotrópico que perturba procesos celulares a través de la alteración de la función normal de distintos interactores⁶. Por ejemplo, p53 mutante puede unirse a sus parálogos TAp63^{85,106} o TAp73^{107,108} e interferir con su función como factores de transcripción. Por otra parte, a pesar de haber perdido la capacidad de reconocer secuencias consenso para p53 wt en el ADN, existen evidencias de la capacidad de algunas mutantes de alterar la expresión génica. Han sido sugeridos diversos mecanismos para explicar dicha capacidad. Por ejemplo, se propuso que p53 mutante podría actuar como co-factor de transcripción^{109,110} o que podría unirse a secuencias ricas en guanina presentes en los promotores de algunos genes¹¹¹. Además, ha sido reportada su presencia en regiones intergénicas y no codificantes¹¹². Sin embargo, la diversidad de mecanismos en los cuales han sido involucradas las mutantes de p53 hace difícil una comprensión cabal del fenómeno de GOF y de su impacto en la patología humana. En tal sentido, considerando la alta frecuencia de mutaciones *missense* y la potencialidad de las mutantes puntuales como blancos terapéuticos altamente específicos, el estudio de las funciones asociadas a p53 mutante es un campo de gran relevancia en la biología del cáncer.

1.10. Identificación de vías alteradas por p53 mutante en el cáncer

La capacidad de p53 mutante de afectar la fisiología celular a través de la interacción con diversos interactores proteicos sugiere que sus efectos van a depender en gran medida del contexto celular. En tal sentido, es posible especular que p53 mutante podría generar distintos efectos en distintos tipos celulares, o en distintos momentos de la progresión tumoral. Esta complejidad hace necesario el estudio de los efectos biológicos de las mutantes en diversos sistemas experimentales. Con este objetivo en mente, nuestro grupo se propuso caracterizar el efecto de p53R280K sobre la expresión génica en células de cáncer de mama Triple Negativo. En este contexto, se realizaron análisis de *microarray* en células MDA-MB-231 en las cuales la expresión de p53 mutante endógena fue silenciada utilizando ARNs de interferencia pequeños (ARNi). La línea celular MDA-MB-231 expresa en forma exclusiva la mutante p53R280K, debido a la incorporación de la mutación *missense* correspondiente y a la delección del alelo wt restante¹¹³. Esta línea proviene de un adenocarcinoma de mama humano Triple Negativo y, debido a

sus características agresivas, es utilizada como sistema modelo de células agresivas y metastásicas. Los resultados obtenidos permitieron identificar un programa transcripcional activado por p53 mutante ¹⁰⁶. Entre los genes identificados en dicho análisis, captó nuestro interés ICMT (*Isoprenil-cistein-carboxi-metiltransferase*), no solo porque presentó el diferencial de expresión negativo más elevado; sino también, por su rol biológico. ICMT forma parte de una vía de modificación post-traduccional de diversas proteínas. Esta vía modifica el extremo C-terminal de sus sustratos combinando la prenilación y la metilación. Algunas proteínas relacionadas íntimamente con mecanismos oncogénicos son modificadas por esta vía, incluyendo miembros de la familia RAS, así como también GTPasas de la familia RHO y subunidades de las proteínas G heterotriméricas. A partir de nuestros resultados surgió la hipótesis de que podría existir una relación entre los mecanismos oncogénicos activados por p53 mutante y la alteración de la prenilación de proteínas.

1.11. Prenilación de proteínas

El proceso de modificación post-traduccional conocido como prenilación involucra tres etapas. El paso inicial consiste en la adición de un isoprenoide, farnesilo o geranilgeranilo, a un residuo de cisteína cercano al extremo C-terminal de las proteínas sustrato ¹¹⁴, catalizado por la farnesiltransferasa (FTasa) o geranilgeraniltransferasa (GGTasa) I. El residuo de cisteína prenilado suele ser parte de un motivo CAAX (C: cisteína; A: aminoácido alifático; X: cualquier aminoácido), pero otros motivos como CXC también pueden ser blanco de las preniltransferasas ¹¹⁵. Luego, los aminoácidos terminales que siguen a la cisteína prenilada (AAX) se eliminan mediante una peptidasa específica conocida como Endoproteasa Convertidora de RAS1 (RCE1) en el retículo endoplasmático (RE) ¹¹⁶. Finalmente, ICMT cataliza la metilación del extremo carboxilo libre en la cisteína. Esta modificación proporciona un extremo C-terminal hidrofóbico no cargado a la proteína sustrato, lo cual aumenta su interacción con las membranas biológicas y/o modifica su capacidad de interactuar con otras proteínas (Figura 15) ¹¹⁷. Se ha predicho la existencia de más de 200 proteínas CAAX basándose en análisis de secuencia y estructurales ^{118,119}.

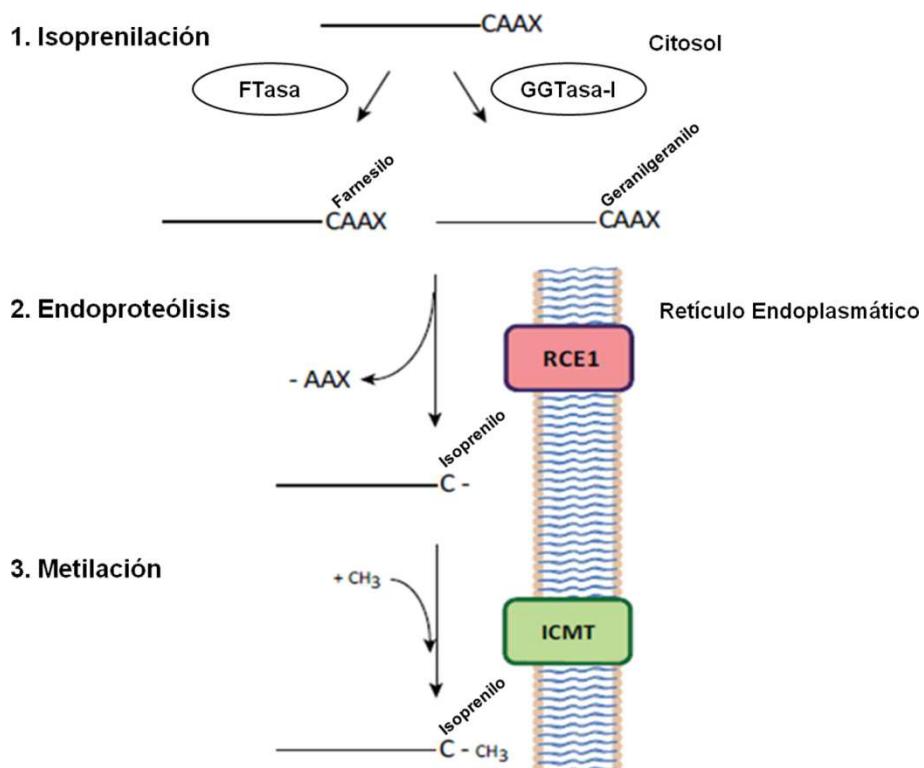


Figura 15: Modificaciones post-traduccionales por prenilación. El proceso involucra tres modificaciones post-traduccionales secuenciales. **1)** Adición de un grupo isoprenilo a la cisteína del motivo CAAX por FTasa o GGTasa-I. **2)** Remoción de aminoácidos en el extremo C-terminal por RCE1. **3)** Metilación del residuo de cisteína isoprenilado expuesto, catalizada por ICMT.

Paso 1: Isoprenilación del residuo de cisteína por FTasa o GGTasa-I. En primer lugar, el grupo lipídico es unido covalentemente a través de un enlace tioéter al residuo de cisteína del motivo CAAX o CXC. La isoprenilación tiene lugar en el citosol y es catalizada por FTasa o GGTasa-I. FTasa agrega un lípido farnesilo (farnesilación) de 15 carbonos y GGTasa-I agrega un lípido geranilgeranilo de 20 carbonos (geranilgeranilación)¹²⁰. Tanto FTasa como GGTasa-I son proteínas heterodiméricas que consisten de una subunidad α , que comparten, y una subunidad β distinta y específica para cada una de las proteínas¹²¹. FTasa y GGTasa-I son metaloenzimas que requieren zinc para la actividad enzimática; FTasa también requiere magnesio¹²². El aminoácido final del motivo CAAX influye sobre el tipo de isoprenoide agregado. Generalmente, cuando en la posición X se encuentra una leucina, la cisteína en el motivo CAAX es procesada por GGTasa-I (por ejemplo, RHOA y CDC42)^{120,117,123}; cuando en la posición X se encuentra serina, metionina, glutamina o alanina, la cisteína es procesada por FTasa (por ejemplo, RAS, laminas nucleares, RHEB y proteínas centroméricas)^{117,120,124-126}. De todas formas, estos

requerimientos estructurales parecen no ser tan estrictos, ya que también hay algunas proteínas CAAX que pueden procesarse por ambas isopreniltransferasas (por ejemplo, K-RAS, RHOB y RHOH) ¹²⁷.

Paso 2: Deleción de los residuos en el extremo C-terminal. Después de la isoprenilación, las proteínas son reconocidas por RCE1, una proteína integral de membrana del RE con el sitio activo en el citosol ^{128,129,130}. RCE1 elimina los aminoácidos subsiguientes a la cisteína isoprenilada (–AAx en proteínas CAAX), mediante endoproteólisis tanto en proteínas conjugadas con farnesilo como con geranilgeranilo ^{131,132}.

Paso 3: Metilación de la cisteína C-terminal por ICMT. Después de la endoproteólisis, ICMT cataliza la metilación del extremo carboxilo libre en el residuo de cisteína isoprenilado. Esta metiltransferasa es también una proteína integral de membrana del RE con el sitio activo en el citosol ¹¹⁷. La metilación de proteínas CAAX preniladas está ausente en las células ICMT^{-/-}, lo que confirma que ICMT es la única enzima que puede catalizar esta reacción ¹³³.

1.12. ICMT

Los genomas de los mamíferos codifican solo un miembro de la clase de metiltransferasas ICMT, la cual carece de homología con cualquier otra metiltransferasa ¹³⁴. La secuenciación reveló un ADNc para ICMT humana de 3595 pb con un marco abierto de lectura que predijo una proteína de 284 aa. El único gen humano está en el cromosoma 1p36.21 y se expresa como dos variantes de ARNm mediante un empalme alternativo. La variante principal codifica el polipéptido de longitud completa; la variante secundaria tiene un exón adicional y parece codificar una proteína truncada en el N-terminal que comienza con el aa metionina en la posición 97. La proteína truncada no ha sido caracterizada y no se sabe si sería catalíticamente activa ¹³⁵. ICMT es una proteína integral de membrana restringida al RE y su actividad catalítica requiere asociación a la misma ^{134,136}. Una caracterización experimental profunda permitió concluir que ICMT atraviesa la membrana del RE ocho veces, con sus extremos N-terminal y C-terminal dispuestos hacia el citosol. A su vez, se reveló una estructura de hélice-giro-hélice conservada para el último par de segmentos transmembrana y se predijo un dominio regulador N-terminal que consiste en dos segmentos transmembrana (Figura 16).

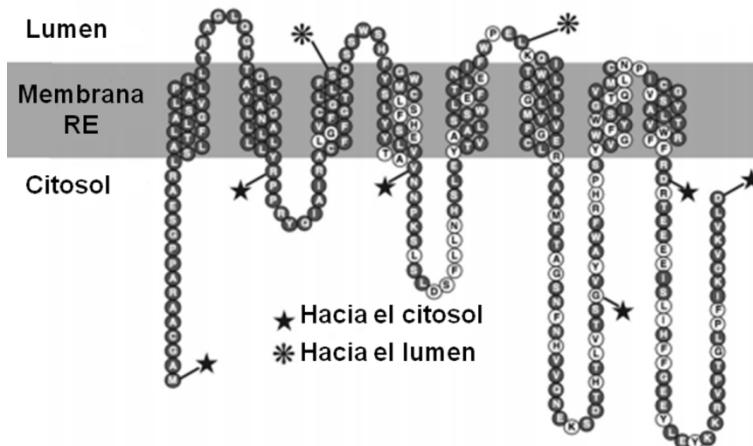


Figura 16: Topología de ICMT. Las estrellas indican los sitios que se asignaron al citosol y los asteriscos indican los sitios que se asignaron a la luz del RE. Figura adaptada de ¹³⁷

Para caracterizar la estructura tridimensional de ICMT se utilizó la proteína proveniente de escarabajo *Tribolium castaneum*, ya que mostró una estabilidad bioquímica superior en soluciones que contienen detergentes en comparación con otros ortólogos. ICMT humana y de escarabajo comparte la misma topología predicha ¹³⁷ y tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del 58% dentro de la región que se cree que contiene el sitio activo ¹³⁸ (aa 90–281). ICMT de escarabajo mostró una metilación robusta de los sustratos prenilados, tanto en las membranas celulares como en la forma purificada, y mostró parámetros cinéticos similares a los de ICMT humana ^{139,140}. El sitio activo abarca regiones citosólicas y expuestas a la membrana, lo cual sugiere distintas rutas de entrada para el dador de metilo citosólico, S-adenosilmetionina, y para los sustratos prenilados, asociados con la membrana del RE. La estructura tridimensional propuesta explica cómo ICMT supera el desafío topográfico y la energía desfavorable de reunir dos reactivos que tienen diferentes localizaciones celulares en un entorno de membrana, una característica relativamente no caracterizada pero definitoria de muchas enzimas integrales de membrana ¹⁴¹.

1.13. Rol biológico de ICMT

Un aspecto intrigante de las proteínas preniladas es que se distribuyen entre diferentes familias y están involucradas en una variedad de funciones biológicas ¹⁴². ICMT es esencial durante el desarrollo embrionario, ya que su deficiencia en ratones

da como resultado la muerte de los embriones entre los días E10.5 y E12.5.¹⁴³. Investigaciones realizadas demostraron que ICMT es requerida para las primeras etapas del desarrollo del hígado y sugieren que los embriones deficientes en ICMT mueren de anemia causada por defectos en el desarrollo hepático¹⁴⁴. El examen de tejidos de ratones macho químéricos reveló que las células *lcmt*^{-/-} contribuyen de manera diferente al desarrollo de diferentes tejidos. En el músculo esquelético la contribución de células con deficiencia de ICMT fue alta, lo que sugiere que ICMT podría no ser importante para su desarrollo; mientras que en cerebro, hígado y testículos la contribución fue relativamente baja, sugiriendo que la actividad de ICMT es importante para el desarrollo de dichos órganos. El análisis por *Northern Blot* de tejidos de ratones de tipo salvaje mostró que la expresión de *lcmt* en diferentes tejidos se correlaciona inversamente con el grado de contribución de células *lcmt*^{-/-} en los tejidos de ratones químéricos. Así, por ejemplo, la expresión de *lcmt* fue alta en el cerebro y el hígado, donde la contribución de las células *lcmt*^{-/-} fue baja¹⁴³.

1.14. Rol de ICMT en el cáncer

La identificación de miembros de la familia RAS como sustratos de ICMT reforzó la idea de que la prenilación de proteínas puede desempeñar un papel en el cáncer^{145,146}. Por ejemplo, la ablación genética de *ICMT* redujo la transformación inducida por KRAS de fibroblastos de embrión de ratón *in vitro*¹⁴⁷. La supresión tejido específica de *ICMT* en ratones que expresan KRAS mutante en células mieloides y neumocitos, atenuó el síndrome mieloproliferativo y redujo las áreas de lesiones neoplásicas en los pulmones¹⁴⁸. Además, la ablación genética de *ICMT* en líneas celulares de cáncer de mama que albergan RAS mutante, redujo la formación de tumores en un modelo de xenotransplante¹⁴⁹. En contraste, la deleción de *ICMT* en las células progenitoras pancreáticas aumentó el número de neoplasias intraepiteliales y promovió la progresión a adenocarcinoma ductal pancreático¹⁵⁰. Estas evidencias indican que una caracterización más profunda es necesaria para comprender el papel de ICMT en tumorigénesis. Algunos miembros de la familia de las RHO GTPasas también son modificados por ICMT¹⁵¹, lo que sugiere otras conexiones con mecanismos oncogénicos. Un gran número de evidencias apoya la idea de que las RHO GTPasas desempeñan un papel relevante en el cáncer; sin embargo, su efecto en el comportamiento celular parece estar condicionado por la

interacción con un gran repertorio de reguladores y por la intercomunicación con otras vías de señalización ¹⁵². Inicialmente se propuso que las RHO GTPasas desempeñan un papel pro-neoplásico basándose en evidencias de estudios *in vitro* sobre los miembros de la familia más estudiados, RHOA, RAC1 y CDC42. Sin embargo, este concepto ha sido desafiado por datos recientes de modelos *in vivo* y tumores humanos ¹⁵³. Los efectos de los miembros de la familia de las RHO GTPasas sobre la remodelación del citoesqueleto de actina y la motilidad celular sugieren que su desregulación puede afectar la invasividad y la metástasis ¹⁵⁴. De acuerdo con esta idea, la inhibición de ICMT redujo la migración y la invasión en células MDA-MB-231 *in vitro* ¹⁵⁵, junto con una disminución de la actividad de RHOA y RAC1. Del mismo modo, se observó una disminución en la migración e invasión *in vivo* en las células de fibrosarcoma HT-1080 tras la inhibición de ICMT ¹⁵⁶, lo cual se asoció a la alteración de la actividad de RAB4A. No obstante, la acción de ICMT en sustratos específicos puede tener diferentes consecuencias en la localización subcelular y/o los niveles de expresión. Por ejemplo, se ha informado que la inhibición de ICMT redujo el tiempo de vida media de RHOA pero mejoró la estabilidad de algunos miembros de la familia de RAS ¹⁵⁷. La ausencia de ICMT produjo diferentes efectos en la localización de los miembros de la familia de RAS y RHO ¹²⁷, y ejerció efectos opuestos en la localización y actividad de RALA y RALB ¹⁵⁸. En conjunto, las evidencias sugieren un papel en la progresión tumoral para ICMT; sin embargo, las consecuencias de su desregulación parecen depender del tipo celular y del contexto.

1.15. Inhibidores de ICMT

La inhibición de la FTasa se propuso como una estrategia terapéutica en el cáncer; sin embargo, las moléculas probadas en ensayos clínicos mostraron una respuesta limitada. Una posible explicación de este desempeño decepcionante puede ser la prenilación alternativa por la GGTasa-I. El procesamiento selectivo posterior a la prenilación ofrece la ventaja de que tanto RCE1 como ICMT pueden actuar sobre sustratos farnesilados o geranilgeranilados. Los estudios con inhibidores de RCE1 mostraron resultados relativamente modestos y posibles efectos adversos que incluyen cardiomiopatía y retinopatía ¹⁴². En contraste, se han observado resultados alentadores para la inactivación o inhibición de ICMT en algunos modelos

experimentales. Por lo tanto, un conocimiento profundo de la alteración de la función de ICMT en tumores es necesario para explotar su potencial como blanco terapéutico.

Las estrategias para la inhibición de ICMT pueden clasificarse en dos grupos. El primero se basa en el aumento de la concentración de S-adenosilhomocisteína (AdoHcy o SAH), que es el producto de la reacción de metilación en sí. SAH puede unirse a ICMT y funcionar como un inhibidor competitivo de retroalimentación¹⁵⁹. La reacción de metilación convierte la S-adenosilmetionina (AdoMet o SAM) en SAH. Sin embargo, la SAH puede convertirse en adenosina y homocisteína por la SAH hidrolasa y por lo tanto, su efectividad está estrechamente ligada al metabolismo celular (Figura 17).

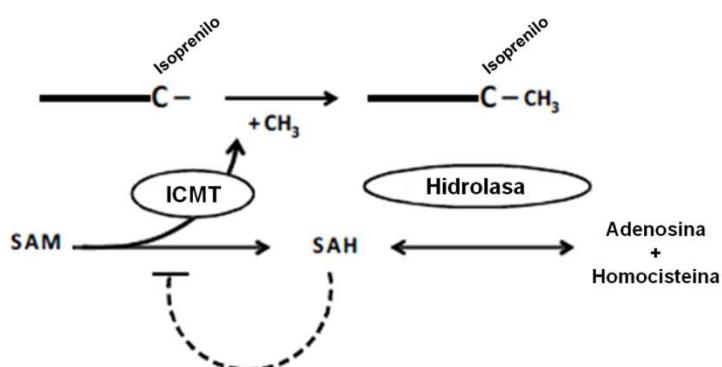


Figura 17: Carboximetilación mediada por ICMT. SAM es el dador de metilo en la reacción de metilación catalizada por ICMT. En la reacción de metilación, SAM libera un grupo metilo (CH₃) y se convierte en SAH, e ICMT agrega el grupo metilo a la proteína CAA_X isoprenilada. La SAH puede unirse y funcionar como un inhibidor competitivo de ICMT. La hidrolasa de la SAH convierte la SAH en adenosina y homocisteína mediante una reacción reversible.

El metotrexato, un antifolato utilizado en el tratamiento del cáncer, inhibe la formación de dihidrofolato y tetrahidrofolato a partir de folato que resulta en la inhibición de síntesis de ADN¹⁶⁰. Se ha sugerido que un mecanismo adicional para el efecto antiproliferativo del metotrexato es la inhibición de la metilación catalizada por ICMT. El metotrexato aumenta los niveles de homocisteína y, por lo tanto, también los niveles de SAH, lo que resulta en la inhibición de la reacción de metilación catalizada por ICMT¹⁶¹. Sin embargo, la reacción de metilación con SAM como dador de metilos y SAH como producto es general para todas las metiltransferasas y por lo tanto disminuye la especificidad de esta estrategia.

El segundo grupo se basa en el uso de análogos de los sustratos isoprenilcisteína, incluyendo el N-acetil-S-farnesil-L-cisteína (AFC) y N-acetil-S-geranilgeranil-L-cisteína (AGGC). Tanto AFC como AGGC son sustratos para ICMT y, por lo tanto, actúan como inhibidores competitivos¹¹⁷. Varios análogos de AFC y AGGC se han desarrollado y evaluado, pero muchos de ellos tienen efectos pleiotrópicos^{162,163}. Otro tipo de inhibidores de ICMT son moléculas pequeñas basadas en indol. El más potente y prometedor de este tipo de compuestos es Cysmethynil (2-[5-(3-methylphenyl)-1-octyl-1H-indol-3-yl]acetamide)^{164,165}, el cual funciona como un inhibidor competitivo con respecto a la cisteína isoprenilada y un inhibidor no competitivo con respecto a SAM. Cysmethynil mostró actividad antitumoral y algunas evidencias lo señalan como un inhibidor selectivo de ICMT, ya que fibroblastos deficientes en ICMT, fueron insensibles al fármaco^{165,166}. El tratamiento de células tumorales con este compuesto produce una disminución de la carboximetilación y una localización errónea de RAS, y en consecuencia, una señalización alterada a través de la vía. El tratamiento con Cysmethynil bloquea el crecimiento independiente del anclaje en la línea celular DKOB8, derivada de cáncer de colon humano, y este efecto es revertido mediante la sobreexpresión de ICMT. A su vez, el tratamiento de células de cáncer de próstata PC3 con Cysmethynil afectó la progresión del ciclo celular e, inesperadamente, activó un proceso autofágico, promoviendo la muerte celular dependiente de la autofagia. Además, el tratamiento con Cysmethynil, redujo el crecimiento tumoral de xenotransplantes de la línea celular PC3 en ratones¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

Objetivos

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Este trabajo de Tesis se propone caracterizar los mecanismos moleculares activados por p53 mutante involucrados en el desarrollo de fenotipos tumorales agresivos y metastásicos.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Profundizar el estudio de la capacidad de p53 mutante de alterar la expresión génica en células tumorales.
- 2.2.2. Analizar los mecanismos que regulan la transcripción de *ICMT*.
- 2.2.3. Estudiar el efecto de ICMT sobre la agresividad tumoral.
- 2.2.4. Evaluar la relevancia clínica de los niveles de ICMT en pacientes con cáncer de mama o pulmón utilizando bases de datos públicas disponibles.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Plásmidos

El ADN plasmídico fue preparado mediante el *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega). Para la expresión transitoria de p53 wt y p53 mutante se emplearon los plásmidos: pCDNA3-p53¹⁶⁸, pCDNA3-p53R280K, pCDNA3-p53R273H, pCDNA3-p53R248W, pMSCV-p53R249S, pCDNA3-p53R175H¹⁰⁶, pCDNA3-p53 L22Q/W23S ΔC(aa 355-393) y pCDNA3-p53 L22Q/W23S ΔPro(aa 64-93). Para la expresión de las isoformas de p63 con un etiqueta para Myc se utilizaron los siguientes plásmidos: pCDNA3-TAp63α, pCDNA3-TAp63β, pCDNA3-TAp63γ, pCDNA3-ΔNp63α, pCDNA3-ΔNp63β, pCDNA3-ΔNp63γ¹⁶⁹. La expresión transitoria de TAp73α con una etiqueta para HA se realizó con el plásmido pCDNA3-TAp73α¹⁷⁰. El plásmido para la expresión estable de ICMT fue construido utilizando el vector pLPC-GFP¹⁶⁸. La secuencia codificante de ICMT (906 pb) fue amplificada por PCR sobre ADNc de células H1299 usando los siguientes oligonucleótidos: ICMTuppLFw e ICMTpLRv (Tabla 3), y clonada entre los sitios HindIII y BamHI en pLPC-GFP. Para generar el reportero pICMTluc el fragmento comprendido entre el -2234 hasta el +37 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *ICMT* fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de células MDA-MB-231 usando los siguientes oligonucleótidos: ICMP2Mfw e ICMP1rv (Tabla 3), y clonado entre los sitios Mlul y Xhol en el vector pGL3-*basic*. Esta construcción fue utilizada como molde de PCR para generar una serie de reporteros delecionados en el extremo 5', ICMTluc1000 (oligonucleótidos: ICMPMfw e ICMP1rv), ICMTluc500 (oligonucleótidos: ICMTQSaclfw e ICMP1rv), ICMTluc200 (oligonucleótidos: ICMTP200Saclfw e ICMP1rv), ICMTluc50 (oligonucleótidos: ICMTP50Saclfw e ICMP1rv) (Tabla 3). Cada deleción fue ligada entre los sitios Mlul o Sacl/HindIII de pGL3-*basic*. Para generar el reportero pGL3P-ICMTluc200-50 el fragmento comprendido entre el -209 hasta el -14 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *ICMT* fue amplificado por PCR utilizando como molde el plásmido pICMTluc (oligonucleótidos: ICMTP200Kpnlfw e ICMTP50upSaclrv) (Tabla 3) y clonado entre los sitios Sacl y HindIII en el vector pGL3-*promoter*. pICMTlucΔ(-209-14) se generó mediante PCR de extensión por solapamiento utilizando los siguientes pares de cebadores: ICMP2Mfw/ICMTPΔrv (fragmento en sentido ascendente) e ICMTPΔfw/ICMP1rv (fragmento en sentido descendente). Los

fragmentos anilados se utilizaron como molde para amplificar un fragmento de 2076 pb con ICMP2Mfw e ICMP1rv, que se clonó en pGL3-*basic* (Tabla 3).

Nombre	Secuencia
ICMTuppLFw	AAAAAGCTTCGTTCTCCGGGCTACAG
ICMTpLRv	AAAGGATCCCAGGTCCACCTGACCCCCCTT
ICMP2Mfw	AAAACGCGTGCAGGGACAAGAGTGGAGAG
ICMP1rv	AAACTCGAGCTGTAGCCCCGGAGAACG
ICMPMfw	AAAACGCGTGAAAAGCTTGCCTCC
ICMTQSaclfw	AAAGAGCTCCACGCCAGCTAATTTTGT
ICMTP200Saclfw	AAAGAGCTCGCGACTTCTCCCACCACTT
ICMTP50Saclfw	AAAGAGCTCCATCGCGGGCACAGTGC
ICMTP200Kpnlfw	AAAGGTACCGCGACTTCTCCCACCACTT
ICMTP50upSaclrv	AAAGAGCTCCGGCCGGGAAGGGCAG
ICMTP Δ fw	CGGGCGGCATGGCGGCACAG
ICMTP Δ rv	CGCCGATGCCGCCCGCGTCTG

Tabla 3: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR para generar las construcciones de interés.

3.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para la separación de las moléculas de ácidos nucléicos se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa mediante el sistema tipo submarino ¹⁷¹. El gel se preparó conteniendo el colorante Gel Green (BIOTIUM). La corrida se llevó a cabo utilizando una intensidad de corriente de 40-60 mA. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ (Promega), digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Para la separación de moléculas de ADN, se utilizó agarosa en un rango de concentración entre 0,8-2 % p/v disuelta en solución TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8) y la corrida se llevó a cabo en solución TAE. Para la siembra, las muestras fueron mezcladas en una proporción 9:1 con solución de siembra (Azul de Bromofenol 0,25 % p/v; Xilene cyanol 0,25 % p/v; Glicerol 30 % v/v; Tris-HCl 1 M pH 8). Finalmente la observación de las bandas correspondientes a los distintos fragmentos se hizo por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta (Darker Reader, potencia 48 W).

3.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para aislar fragmentos de ADN para su posterior clonado, las muestras de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa como se describió anteriormente. La zona del gel conteniendo el fragmento de interés se extrajo por corte con bisturí estéril y el ADN se purificó siguiendo las recomendaciones del proveedor del *kit* comercial “*Qiaex II Gel Extraction Kit*” (QIAGEN). Dicho *kit* provee una suspensión de partículas de sílica a la cual se unen los fragmentos de ADN en presencia de sales caotrópicas, luego las partículas son recolectadas por centrifugación, lavadas y finalmente es posible eluir el ADN con solución tampón o agua a pH controlado.

3.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las reacciones se llevaron a cabo considerando la solución tampón de reacción, el tiempo y la temperatura propuestos por el proveedor de las respectivas enzimas (Fermentas, Invitrogen, y Promega). Se utilizó una cantidad de ADN de entre 1 y 2 μ g, una concentración final de albúmina sérica bovina de 0,1 μ g/ μ l y entre 1 y 2 unidades de las enzimas correspondientes en un volumen final de 20 μ l. Los resultados de los cortes se verificaron mediante electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa, estimando el tamaño de los fragmentos generados por comparación con marcadores de peso molecular adecuados.

3.5. Reacciones de ligación de ADN

Luego de digerir los plásmidos y fragmentos de ADN con las enzimas correspondientes, se sembraron en un gel de agarosa y las bandas fueron purificadas. Posteriormente se estimaron las cantidades relativas de plásmido e inserto analizando mediante electroforesis en gel de agarosa alícuotas de ambas muestras, con el objeto de determinar el volumen a utilizar, de modo que la relación de moléculas fragmento/plásmido sea 5:1. En las reacciones se utilizó 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), *buffer* ligasa (Promega), 2,5 mM ATP y H_2O c.s.p 20 μ l. Las mezclas se incubaron durante toda la noche a 4 °C.

3.6. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (F⁻ *supE44* Δ /*lacV169* (ϕ 80 *lacZ* Δ *M15*) *hsdR17* (*r_k* *m_k*) *recA1* *endA1* *gyrA69* *thi1* *relA1* *deoR* Δ (*lacZYA-argF*) *U169* λ) para realizar las distintas transformaciones de plásmidos y mezclas de ligación.

3.7. Cultivos de *E. coli* DH5 α

Se empleó el medio de cultivo líquido LB (peptona de caseína 10 g; NaCl 10 g; extracto de levadura 5 g; agua destilada c.s.p. 1 l) y el medio de cultivo sólido LB-agar (Bacto-Agar 15 g y LB c.s.p. 1 l). Las células se cultivaron a 37 °C, y con agitación constante en el caso de cultivos líquidos. Como marcador de selección se utilizó el antibiótico Ampicilina en una concentración final de 0,1 mg/ml.

3.8. Generación de células bacterianas competentes

Se generó un pre-inóculo cultivando las bacterias durante 18 h hasta la fase estacionaria en medio LB. Luego, el cultivo se diluyó 1/100 en un volumen final de 200 ml en el mismo medio y se incubó nuevamente hasta llegar a fase exponencial, evaluada por la medida de DO a 590 nm (0,4-0,5). Se dividió el cultivo en fracciones de 40 ml cada una, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Luego, las células se cosecharon por centrifugación durante 10 min a 3000 rpm a 4 °C usando una centrifuga Eppendorf 5804 R. Posteriormente, se resuspendió el *pellet* en 40 ml de solución de cloruro de calcio fría (CaCl₂ 60 mM, glicerol 15 % v/v, Pipes 10 mM, pH 7,0) y las células se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm a 4 °C. Se resuspendieron las células nuevamente en 40 ml de solución de cloruro de calcio fría y se incubó en hielo durante 10 min. Las células en estado de competencia se recuperaron por centrifugación. Finalmente, se resuspendió cada *pellet* en 1,6 ml de solución de cloruro de calcio fría y se fraccionó la suspensión. Las fracciones se almacenaron a -70 °C para su posterior uso.

3.9. Transformación bacteriana

Se mezclaron las células competentes con los ácidos nucléicos a transformar (50-100 μ l de células con 10-20 μ l de mezcla de ligación o 30 μ l de células con 2-4 μ l de plásmido). Se mezcló cuidadosamente y se incubó 30 min en hielo. Luego, se sometieron las células a un shock térmico de 45 seg a 42 °C y luego, por 10 min, se

volvió a incubar en hielo. A estas células se les agregó 1 ml de LB, y se las incubó a 37 °C durante 1 h. Se sembraron en placas de LB agar, suplementado con 0,1 mg/ml de Ampicilina. Las mismas se incubaron a 37 °C durante la noche.

3.10. Secuenciación de fragmentos de ADN

Los fragmentos amplificados y clonados se enviaron al servicio de secuenciación enzimática de la Universidad de Maine, Orono, Estados Unidos. Una vez recibidos los archivos, las secuencias se analizaron *in silico* para establecer su identidad.

3.11. Determinación de la concentración de ADN y ARN

La concentración y pureza de las muestras de ADN y ARN se determinaron por medidas de Absorbancia a las longitudes de onda 260 nm, 280 nm y 230 nm¹⁷¹. Las concentraciones se calcularon considerando que 1 unidad de Abs a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble hebra y a 40 µg/ml de ARN. Por otra parte, las relaciones de $\text{Abs}_{\lambda=260}/\text{Abs}_{\lambda=280}$ y $\text{Abs}_{\lambda=260}/\text{Abs}_{\lambda=230}$ se utilizaron como indicador de pureza de la muestra de ADN o ARN con respecto a contaminantes tales como proteínas, sales o solventes orgánicos.

3.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En cada reacción de amplificación con ADN polimerasa termoestable *Taq* (Invitrogen) se emplearon los cebadores en una concentración de 0,2 µM; dNTPs 200-400 µM; MgCl₂ 1-3 mM; *buffer* 1X (Invitrogen) y *Taq* ADN polimerasa 2 U (Invitrogen). Para los casos en los cuales se utilizó la ADN polimerasa termoestable *Pfx*, se emplearon los cebadores en una concentración de 0,2 µM; dNTPs 200-400 µM; MgSO₄ 1 mM; *buffer Pfx* 1X (Invitrogen) y *Pfx* ADN polimerasa 2 U (Invitrogen). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl. Se utilizó un termociclador PERKIN ELMER modelo GeneAmp PCR System 2400 o termociclador Mastercycler personal, EPPENDORF. En todas las reacciones se incluyó un control negativo en el que no se adicionó molde. Para analizar por PCR colonias transformantes, cada clon se resuspendió de manera individual en la mezcla de reacción de PCR correspondiente y, a continuación, se procedió con el programa de PCR adecuado.

3.13. Obtención de ARN, retrotranscripción y PCR en tiempo real

Para la obtención de ARN total se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen). El ARN fue purificado por extracción con cloroformo, seguida por precipitación con isopropanol. El ADN genómico contaminante fue eliminado por tratamiento con *DNase I* (Thermo Fisher Scientific). La integridad del ARN se analizó por electroforesis en gel de agarosa y su concentración se determinó espectrofotométricamente. El ARN total obtenido fue retrotranscripto usando cebadores oligodT(16) y la transcriptasa reversa M-MLV (Promega), en presencia de inhibidor de ARNasa (*RNaseOUT*, Thermo Fisher Scientific), y se siguieron las indicaciones del proveedor. Para analizar cambios en la expresión de los genes en estudio, se realizó una PCR en tiempo real por triplicado utilizando como molde el ADNc generado, empleando el reactivo Mezcla Real 2X (Biodynamics). Los cebadores (Eurofins Genomics o GenBiotech) se utilizaron a una concentración final de 1 μ M en un volumen final de 14 μ l, de acuerdo con las siguientes condiciones: 2 min a 95 °C durante un ciclo; y 30 s a 95 °C, 20 s a 60 °C, 30 s a 72 °C durante 40 ciclos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler ep gradient Realplex2* (Eppendorf). La cuantificación relativa de las cantidades de ARNm para cada gen en las distintas muestras se llevó a cabo a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando GAPDH o los *input* como estándares internos. Se usaron los siguientes cebadores de PCR en tiempo real: ICMTqPfw, ICMTqPrv, GAPDHfw, GAPDHrv, ICMTPrtfw-ChIP, ICMTPrtrv-ChIP, ICMTPrtfw-ChIPup e ICMTPrtrv-ChIPup (Tabla 4).

Nombre	Secuencia
ICMTqPfw	CAGTGGAGTGTACGCTTGGT
ICMTqPrv	AGAATGCCACACTGTCAGG
GAPDHfw	TCTCTGCTCCTCCTGTT
GAPDHrv	GCCCAATACGACCAAATCC
ICMTPrtfw-ChIP	CGAGAACTGGCAGGCGGC
ICMTPrtrv-ChIP	TGTAGCCCGGAGAACGCG
ICMTPrtfw-ChIPup	CTCGCTGACCCACCACTTG
ICMTPrtrv-ChIPup	AAACGCCAAGCCCTCACTC

Tabla 4: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en reacciones de qPCR.

3.14. Cultivo de líneas celulares y reactivos

Las líneas celulares MDA-MB-231 (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: HTB-26), MDA-MB-468 (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: HTB-132) y MCF-7 (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: HTB-22) derivadas de adenocarcinoma mamario humano, la línea celular HepG2 (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: HB-8065) derivada de carcinoma hepatocelular humano, las líneas celulares HT29 (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: HTB-38), HCT116 p53^{+/+} y su contraparte p53^{-/-} derivadas de adenocarcinoma colorectal humano y las líneas celulares HEK-293, derivada de riñón embrionario humano normal, y HEK-293-GP fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor) y una mezcla de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). La línea celular H1299 (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: CRL-5803) derivada de un carcinoma pulmonar no microcítico humano y la línea celular MDCK (ATCC, *American Type Cell Collection* Nº: CCL-34) derivada de riñón normal de *Canis familiaris*; fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y una mezcla de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera de aire húmedo con 5% de CO₂. Se controlaron periódicamente mediante tinción con DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) y PCR para evitar la infección por micoplasma. El Polybrene (Sigma) fue disuelto en agua a una concentración de 8 mg/ml, filtrado, alicuotado y conservado en alícuotas a -20°C. El Cysmethynil (Cayman Chemical) fue disuelto en DMSO a una concentración de 13 mM, alicuotado y conservado a -80°C. Alícuotas de uso se conservaron a -20°C. La Doxorrubicina (Delta Farma) fue disuelta en agua estéril a una concentración de 370 µM, alicuotada y conservada a -20 °C para su posterior uso. Nutlin-3 (Sigma) fue disuelta en DMSO a una concentración de 20 mg/ml, alicuotada y conservada a -20 °C para su posterior uso. La puromicina (Sigma) fue disuelta en agua estéril a una concentración de 2 mg/ml, alicuotada y conservada a -20°C para su posterior uso. El U0126 (Sigma) fue disuelto en DMSO a una concentración de 10 mg/ml, alicuotado y conservado a -80°C. Alícuotas de uso se conservaron a -20°C.

3.15. Transfección

Para los experimentos de transfección en células se utilizó el reactivo Lipofectamina 3000 o Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el

proveedor. Brevemente, las células se plaquearon el día previo a la transfección. Antes de la transfección, se reemplazó el medio por medio fresco. Para cada condición se diluyeron los plásmidos o los ARNi, y en paralelo la Lipofectamina en un volumen equivalente de Opti-MEM (Invitrogen). Ambas diluciones se mezclaron y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Las mezclas Lipofectamina-ADN o Lipofectamina-ARN se adicionaron a las placas y se homogeneizó suavemente. Tras 16 h de incubación, se renovó el medio por medio fresco.

3.16. Silenciamiento transitorio y estable

El silenciamiento transitorio en células MDA-MB-231, MDA-MB-468, HT29 y HEK293 mediante ARNi específicos se realizó por transfección con Lipofectamina 2000 o Lipofectamina 3000 (Invitrogen). Se usaron las siguientes secuencias de ARNi: sip53 (GACUCCAGUGGUAAUCUAC, QIAGEN)¹⁰⁶, siLCMT (SMART poolM-005209-01-0005, Dharmacon) y siLacZ (GUGACCAGCGAAUACCUGU, QIAGEN) como control. El silenciamiento estable en células MDA-MB-231 se realizó por transducción con partículas retrovirales. Fueron usados los siguientes ARNsh¹⁰⁶: shp53 (GACUCCAGUGGUAAUCUAC), shp53 3' UTR (GGUGAACCUUAGUACCUAA) y shLacZ (GUGACCAGCGAAUACCUGU). Las secuencias de los ARNsh mencionadas están clonadas en el plásmido pRS, el cual permite la inserción estable en el genoma celular del ARNsh junto con una resistencia a puromicina como marcador de selección.

3.17. Generación de líneas celulares estables

Para la generación de líneas estables, células HEK293-GP fueron transfectadas por el método de fosfato de calcio. Brevemente, el día anterior a la transfección se colocaron 1×10^6 células en placas de 6 cm de diámetro. Previo a la transfección se reemplazó el medio de las células por medio fresco. Para cada muestra se preparó una suspensión de partículas de ADN-Ca₃(PO₄)₂ como sigue: 250 µL de una solución de CaCl₂ 250 mM conteniendo los plásmidos a transfectar se mezcló por goteo en 250 µL de solución HBS 2X (Hepes 50mM pH 7, NaCl 280mM, Na₂HPO₄ 1,5mM), y dicha mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se utilizaron 4 µg de plásmidos retrovirales de la serie pLPC-GFP o pRS que permiten la inserción estable en el genoma celular de un *cassette* para la expresión de un gen o de un ARNsh de interés junto con una resistencia a puromicina como marcador de

selección, así como 4 µg de plásmido pM2ENV que codifica para las proteínas de la cápside viral. Luego de 6-8 h post-transfección se cambió el medio por medio fresco. Tras 48 h, el medio contenido las partículas retrovirales fue filtrado, suplementado con 10% SFB y 4 µg/ml de Polybrene (Sigma), y adicionado a las células de interés. Dicho medio fue reemplazado por medio fresco 24 h post-infección y, tras 24 h de incubación adicionales, las células infectadas fueron seleccionadas con 2 µg/ml de puromicina (Sigma) por aproximadamente una semana o hasta el siguiente pasaje celular.

3.18. Obtención de extractos proteicos a partir de células en cultivo

En primer lugar, se removió el medio a las placas y se las lavó dos veces con PBS (NaCl 0,135 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM y pH 7,4), luego las células fueron lisadas en solución tampón de lisis fría (Tris-HCl 20 Mm pH 8, EDTA 1mM, NaCl 120 mM, NP40 0,5 % v/v, PMSF 1mM), suplementado con *cocktail* inhibidor de proteasas (Sigma), e inhibidores de fosfatasas (NaF y ortovanadato de sodio 1mM) y se recolectaron en frío con ayuda de una espátula. A continuación se transfirió la suspensión celular a tubos eppendorf de 1,5 ml. Se incubaron 15 min en hielo para completar la lisis y luego se centrifugó 15 min a 14000 rpm a 4 °C para separar el *debris* celular. Se recolectaron alícuotas de 10 µl para cuantificar proteínas. Las muestras se conservaron a -70 °C.

3.19. Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el *kit* “*Pierce BCA Protein Assay*” de Thermo Scientific, el cual mide concentración total de proteínas comparada con una proteína estándar, albúmina sérica bovina; este ensayo combina la conocida reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ por las amidas de las proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad y selectividad de la detección del complejo Cu¹⁺/Ácido bicinconílico, el cual es soluble en agua y exhibe una fuerte y lineal absorbancia a 562 nm.

3.20. Western Blot

Los extractos proteicos fueron diluidos en solución tampón de siembra (Tris pH 6,8 250 mM; β-mercaptopetanol 700 mM; SDS 5% p/v; glicerol 25% v/v; azul de bromofenol 0,1% p/v) para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida en

condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles de separación se utilizaron al 10 o al 15% (acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 10 o 15% p/v, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS 0,1% p/v) y los de concentración al 5% (acrilamida:bis-acrilamida (29:1) 5% p/v, Tris-HCl 0,126 M pH 6,8; SDS 0,1% p/v). Luego del SDS-PAGE, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en solución de transferencia (Tris-HCl 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,03 % p/v; Metanol 20 % v/v, pH 8,3). Seguidamente, las membranas fueron bloqueadas por incubación en solución de bloqueo (leche descremada en polvo al 5% p/v y Tween-20 0,1% v/v en PBS o albúmina sérica bovina al 5% p/v y Tween-20 0,1% v/v en TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7,5. 150 mM NaCl) en los experimentos donde utilizamos anticuerpos primarios que reconocen proteínas fosforiladas) por 1 h con agitación orbital a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con diluciones de los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo correspondiente: 1/8000 anti-p53 monoclonal (Santa cruz, DO-1); 1/500 anti-ICMT policlonal (Proteintech, 51001-2-AP); 1/10000 anti-actina policlonal (Sigma); 1/1000 anti-GAPDH monoclonal (Santa cruz, G-9); 1/3000 anti-GFP policlonal (Abcam, Ab 290); 1/4000 anti-c-Myc monoclonal (Sigma, Clone 9E10); 1/1000 anti-HA monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, F-7); anti-ERK monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, C-9) y anti-p-ERK policlonal (Cell Signaling, 91015), con agitación suave toda la noche a 4°C, y con una dilución de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugado a peroxidasa de rabanito (Jackson, 1:10000) en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron utilizando el *kit* para quimioluminiscencia “ECL Plus” (GE Healthcare) o “SuperSignal West Pico Chemiluminescent” (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del proveedor, y se expusieron sobre placas radiográficas de alta sensibilidad (Amersham Biosciences). Para la estabilización de p53 wt, se trajeron células MCF-7 o HCT116 p53^{+/+} con 10 µM de Nutlin-3 (Sigma) durante 48 h y posteriormente se prepararon los extractos proteicos.

3.21. Ensayos de luciferasa

Las células H1299 o HCT116 transfectadas con los plásmidos de interés fueron lisadas por agregado de 100 µl de *Passive Lysis Buffer* (Promega) previamente diluido. Se realizó una centrifugación suave para separar el *debris* celular. La actividad luciferasa se midió utilizando el *kit* comercial *Luciferase Assay System*

(Promega), según el protocolo recomendado por el proveedor, en un lector de microplacas multimodo (Synergy 2, BioTek). Como control de transfección se utilizó el vector pCMV- β gal que permite la expresión de la enzima β -galactosidasa. Los datos obtenidos de actividad luciferasa fueron normalizados respecto a la actividad β -galactosidasa. Cuando se indica, las células HCT116 se trataron con Doxorrubicina 0,5 μ M (Delta Farma) durante 16 h.

3.22. Inmunoprecipitación de la cromatina

Células H1299 fueron plaqueadas y posteriormente co-transfectadas con el plásmido pICMTluc y con un plásmido que permite la expresión de p53 wt (pCDNA3-p53wt), p53 mutante (pCDNA3-p53R280K) o con pCDNA3 como control, utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Células HCT116 p53^{+/+} fueron plaqueadas y posteriormente tratadas con Doxorrubicina 0,5 μ M para inducir la expresión de p53 wt. Células HEK-293 fueron plaqueadas el día previo al inicio del protocolo de chIP y no recibieron ningún tratamiento, ya que los niveles basales de expresión de p53 wt son relativamente elevados. En los 3 casos, a continuación, las células fueron *cross-linked* en medio de cultivo con 1% p-formaldehído (PFA) por 10 min, luego el p-formaldehído fue neutralizado usando 125 mM de glicina en PBS. Los núcleos celulares fueron obtenidos lisando las células en una solución tampón hipotónica (5 mM Pipes pH 6.8, 85 mM KCl, 0.5 % NP-40 e inhibidores de proteasas) y posterior centrifugación. El *pellet* de núcleos fue resuspendido en RIPA 100mM *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate, 0.1% SDS, suplementado con inhibidores de proteasas). La cromatina fue sonicada a fragmentos promedio de 500-800 pb y purificada por 1 h a 4°C con proteína A-Sepharose (GEHealthcare), previamente bloqueada con ADN de esperma de salmón (Sigma). La proteína A-Sepharose fue removida por centrifugación y una alícuota del sobrenadante fue tomada como *input*. El resto de la cromatina fue inmunoprecipitada toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-p53 DO1 (Santa Cruz), previamente unido a la proteína A-Sepharose, y en cada caso se realizó el control negativo correspondiente. Los complejos proteína-ADN fueron recuperados unidos a la proteína A-Sepharose y lavados secuencialmente con *buffer* RIPA 100 mM, *buffer* RIPA 250 mM (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40,

0.5% Na-Deoxycholate y 0.1% SDS), solución de LiCl (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40 y 0.5% Na- Deoxycholate) y TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). El tratamiento con ARNasa fue realizado en TE por 30 min a 37°C y para revertir el *cross-linking* las muestras fueron tratadas toda la noche a 68°C agregando igual volumen de *proteinase K solution* (200 mM NaCl, 1% SDS y 0.3 mg/ml *proteinase K*). En paralelo, los *inputs* fueron tratados de igual manera. Despues de la extracción fenol-cloroformo y la precipitación con etanol, las muestras fueron resuspendidas en agua. El ADN co-inmunoprecipitado fue analizado por PCR y/o por qPCR (oligonucleótidos: ICMTPrfw-ChIP, ICMTPrtrv-ChIP, ICMTPrfw-ChIPup e ICMTPrtrv-ChIPup (Tabla 4)). El enriquecimiento de p53 wt o p53R280K en el promotor de *ICMT* fue calculado como el porcentaje de la cromatina inmunoprecipitada respecto al *input* usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.23. Proliferación

Las células H1299 o MDA-MB-231 que expresaban de forma estable ICMT-GFP o GFP como control, fueron plaquedas y cultivadas durante 4 u 8 días. El número de células cada día fue determinado mediante tripsinización y conteo en cámara de Neubauer y/o mediante ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma).

3.24. Ensayo de MTT

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de MTT, basado en la reducción metabólica de este compuesto por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial en las células viables para producir la sal insoluble formazán, lo cual se evidencia a través de un cambio en su coloración. Las células fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos y cultivadas toda la noche. Al día siguiente, se cambió el medio por medio contenido las condiciones a analizar. Luego del tratamiento por los periodos indicados, se aspiró el medio y se agregó una solución de 500 µg/ml de MTT (solución madre 5 mg/ml en agua) en medio de cultivo. Tras incubar 4 h, los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO y se leyó la absorbancia a 570 nm en lector de microplacas (Synergy 2, BioTek).

3.25. Ensayo de formación de colonias

Las células fueron plaquedas en baja densidad (1800 células/placa) y se permitió la formación de colonias por incubación durante 15 días, con cambio del medio de cultivo dos veces por semana. Con el fin de evaluar el efecto del inhibidor de ICMT Cysmethynil (Cayman Chemical), las células H1299 o MDA-MB-468 se plaquearon a baja densidad en placas de 6 cm y se trataron con 30 μ M de Cysmethynil o DMSO como control. Para los tratamientos, se diluyó una solución stock en DMSO de Cysmethynil 13 mM en medio de cultivo y se usó la dilución correspondiente de DMSO como control. El medio que contiene Cysmethynil o DMSO se reemplazó dos veces por semana. Seguidamente, las colonias formadas fueron fijadas con PFA 4%, teñidas con Giemsa y contadas.

3.26. Ensayo de cierre de la herida

Las células H1299 y MDA-MB-468 se plaquearon a alta densidad (1×10^6 células/placa 3,5 cm). Al día siguiente se trataron con Cysmethynil 30 μ M o DMSO como control y se realizó una estría. Tras 24 h se midió el cierre de la herida mediante microscopía invertida.

3.27. Ensayo de migración en *transwell*

Las células MDA-MB-468 se plaquearon en medio sin SFB con Cysmethynil 30 μ M o DMSO como control, sobre insertos (Corning). En la parte inferior del inserto se colocó medio completo con Cysmethynil 30 μ M o DMSO como control. Tras incubar por 24 h, las células en la cara superior del inserto fueron eliminadas mecánicamente y aquéllas en la cara inferior fueron fijadas con PFA 4% p/v y teñidas con Hoechst. A continuación, las células fluorescentes fueron observadas por microscopía de fluorescencia y el número de células fluorescentes se determinó empleando el software ImageJ FIJI.

3.28. Formación de quistes de células MDCK en cultivos 3D

Las células MDCK se sembraron como suspensión de células individuales (8×10^4 células/ml) sobre cubreobjetos recubiertos con Matrigel (BD Biosciences). Después de 2 o 3 días, una vez formados los quistes, se lavaron con PBS y se fijaron (PFA al 4%, 30 min a temperatura ambiente o metanol, 7 min, -20°C). Las células se

pretrataron con 0,5% de Triton X-100 / PBS (10 min, 4°C) y luego se permeabilizaron y bloquearon con albúmina sérica bovina al 1% / Triton X100 al 0,2% / Tween/PBS al 0,05% durante 30 min a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo anti-GM130 (Abcam, EP892Y) se realizó en solución de bloqueo durante un mínimo de 2 h a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal.

3.29. Ensayo de tumorigenidad *in vivo*

Ratones hembra *nude* fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP y todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las regulaciones de la Comisión de Bioética para el Manejo y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Los animales fueron alimentados con alimento comercial y agua a voluntad y mantenidos a 22°C en un ciclo luz/oscuridad de 12 h. Un total de 19 ratones fue dividido en dos grupos de 9 y 10 ratones, los cuales fueron inyectados con células H1299 estables infectadas con pLPC-GFP (control) o pLPC-ICMTGFP respectivamente. 1×10^6 células fueron lavadas con PBS y diluidas en matrigel (1:1) y 50 μ l de esta mezcla fueron inyectados de manera subcutánea en el área abdominal¹⁷². Una vez que los tumores fueron palpables, se midieron los diámetros tumorales mayor (D_M) y menor (D_m) dos veces por semana empleando un calibre vernier. Los volúmenes tumorales fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D_M \cdot D_m^2$$

Al cabo de 64 días los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y las autopsias fueron llevadas a cabo. Los tumores primarios de cada ratón fueron aislados para inmunohistoquímica. Por otra parte, ratones hembra BALB/c fueron obtenidos del Centro de Medicina Comparada, ICIVET, Universidad Nacional del Litoral. Los animales fueron alimentados con alimento comercial y agua a voluntad y mantenidos a 22°C en un ciclo luz/oscuridad de 12 h. Los ratones fueron divididos al azar en dos grupos de 10 animales cada uno e inyectados con una suspensión de 1×10^6 células 4T1-ICMTGFP o 4T1-GFP como control en PBS. La inyección se aplicó de manera subcutánea en la glándula mamaria abdominal. Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió previamente. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y fueron sometidos a un proceso de autopsia a

fin de analizar y conservar los tumores, ganglios, bazo, hígado y pulmones. Para evidenciar la metástasis pulmonar, los pulmones fueron teñidos por perfusión con tinta china y posterior decoloración con solución Fekete (55% etanol, 3% formaldehído y 4% ácido acético).

3.30. Técnica de inmunohistoquímica

Los tumores generados en los ratones se trajeron, se fijaron en PFA al 4%, se incrustaron en parafina, se cortaron en secciones de 5 a 6 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para la tinción inmunohistoquímica, los cortes fueron sometidos a un protocolo de desparafinización con xileno y posterior rehidratación. Posteriormente se bloquearon y se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo contra Ki67 (Leica Biosystems, dilución 1:50). Después de la incubación durante la noche, los portaobjetos se enjuagaron con PBS, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el *kit Vectastain Elite ABC* (Vector Laboratories), desarrollado con 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) y contrateñidos con hematoxilina.

3.31. Tinción de F-actina

Las células H1299 se transfecaron con pLPC-GFP o pLPC-ICMTGFP y 16 h más tarde, se sembraron en cubreobjetos recubiertos previamente con Matrigel 1:100 (Corning). Después de 24 h, las células se fijaron con PFA al 4% p/v, se permeabilizaron, se bloquearon con albúmina sérica bovina al 5% p/v y se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa 594 (Life Technologies) para visualizar los filamentos de actina. En promedio, se tomaron 25 fotos por condición y el experimento se realizó tres veces. Las células redondeadas con señal fuerte de F-actina en la proximidad de la membrana plasmática se contaron sobre las células totales.

3.32. Búsqueda de sitios de unión a p53 *in silico*

Con el fin de encontrar secuencias compatibles con p53RE en el promotor de *ICMT* utilizamos el software Regex 101, que permite la búsqueda de expresiones regulares. La secuencia correspondiente al consenso canónico de p53RE ⁵³, PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy[X0-20]PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy (Pu:purina, Py: pirimidina, X: cualquier nucleótido (nt)) fue ingresada en el buscador como:

(?:a|g){3}c(?:a|t){2}g(?:t|c){3}(.{0,20})(?:a|g){3}c(?:a|t){2}g(?:t|c){3}. La secuencia compatible con el consenso modificado encontrado en genes reprimidos ⁶⁵, PuPuXCXXGXPYX[X0-20]XPuXCXXGXPYPy fue ingresada en el buscador como: (?:a|g){2}.c..g.(?:t|c).({0,20}).(?:a|g).c..g.(?:t|c){2}. Donde (?:a|g) representa Pu, (?:t|c) representa Py, un punto representa cualquier nt, (?:a|t) le indica al programa que puede buscar a o t en esa posición, una única letra le indica al programa que solo ese nt puede ocupar esa posición, {2} y {3} son los cuantificadores, que le indican al programa cuantas veces se repite la secuencia que esta por delante y finalmente, ({0,20}) representa la región espaciadora, la cual puede extenderse entre los cero y los 20 nt.

3.33. Análisis de expresión génica en bases de datos de cáncer

Cáncer de mama: partimos de una colección de 4,640 muestras de cáncer de mama registradas con grado histológico del tumor y resultado clínico. Todos los datos se midieron en matrices Affymetrix y se descargaron de NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y EMBL-EBI Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Antes del análisis, renombramos y reorganizamos todos los conjuntos de datos eliminando muestras duplicadas. Los conjuntos de datos se han modificado como se describe en ¹⁷³. Adenocarcinoma de pulmón: datos normalizados RSEM nivel 3 (*RNA-Seq by Expectation-Maximization*), mutaciones de *TP53* e información clínica para 516 muestras del conjunto de datos de adenocarcinoma de pulmón TCGA (LUAD) se descargaron del GDAC *Firehose*. MDA-MB-231: los datos de expresión génica sin procesar (archivos .CEL) para las células MDA-MB-231 depletadas de p53 y para el control, se descargaron de NCBI *Gene Expression Omnibus* GSE14491. Las señales se convirtieron en valores de expresión utilizando el robusto procedimiento de matrices múltiples RMA ¹⁷⁴ del paquete afín *Bioconductor*.

3.34. Valores de expresión media y cálculo de las firmas moleculares

Se consideraron los valores de expresión media estandarizada para cada gen en las muestras de cada subgrupo (por ejemplo, firma p53 mutante o p53 wt; ICMT 201609_x_at probe set). El valor combinado de expresión para cada firma se obtuvo agrupando los valores de expresión estandarizados en una única expresión para

generar una puntuación con promedio cero⁹⁴, proporcionando por lo tanto gráficos con datos adimensionales.

3.35. Análisis de la evolución clínica en bases de datos de cáncer

Para identificar dos grupos de tumores con ICMT alto o bajo, utilizamos el clasificador descrito en⁸⁵. Los tumores se clasificaron como ICMT "bajo" si la puntuación combinada fue negativa y como ICMT "alto" si la puntuación combinada fue positiva. Esta clasificación se aplicó a los valores de expresión del metadataset. Para evaluar el valor pronóstico de ICMT, estimamos, utilizando el método de *Kaplan-Meier*, las probabilidades de que los pacientes permanecieran libres de metástasis. Para confirmar estos hallazgos, las curvas de *Kaplan-Meier* se compararon utilizando el análisis estadístico Log-rank (Mantel-Cox).

3.36. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el *test T-student* o ANOVA seguido de *Tukey-Kramer Multiple Comparison test*. A menos que se indique lo contrario, los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media, de tres o más experimentos independientes. Valores de P menores a 0,05 se consideraron significativos.

Resultados Capítulo I:
Rol de la familia de p53 en la expresión de *ICMT*

RESULTADOS CAPÍTULO I:

Rol de la familia de p53 en la expresión de *ICMT*

4.1. La expresión de *ICMT* se encuentra regulada en forma opuesta por p53 wt y mutantes puntuales asociadas a tumores

De acuerdo con resultados previos, se planteó como hipótesis inicial de trabajo que p53R280K podría regular positivamente la expresión de *ICMT*. Para probar esta hipótesis; se analizó el efecto del silenciamiento transitorio de p53R280K endógeno, en la línea celular MDA-MB-231¹¹³, sobre los niveles de ARNm y proteína de ICMT. Luego de la transfección del ARNi contra p53 (sip53), se extrajo el ARN total, se retro-transcribió y se realizó qPCR en muestras de ADNc usando cebadores específicos para la región codificante de *ICMT* (ICMTqPfw e ICMTqPrv, Tabla 4). Se observó que el silenciamiento de p53 mutante endógeno redujo significativamente los niveles de ARNm de *ICMT* (Figura 18 a). Por otra parte, el análisis mediante *Western Blot* mostró que los niveles proteicos de ICMT también disminuyeron luego del silenciamiento de p53R280K en células MDA-MB-231 (Figura 18 a), apoyando la hipótesis de que p53 mutante promueve la expresión de *ICMT*.

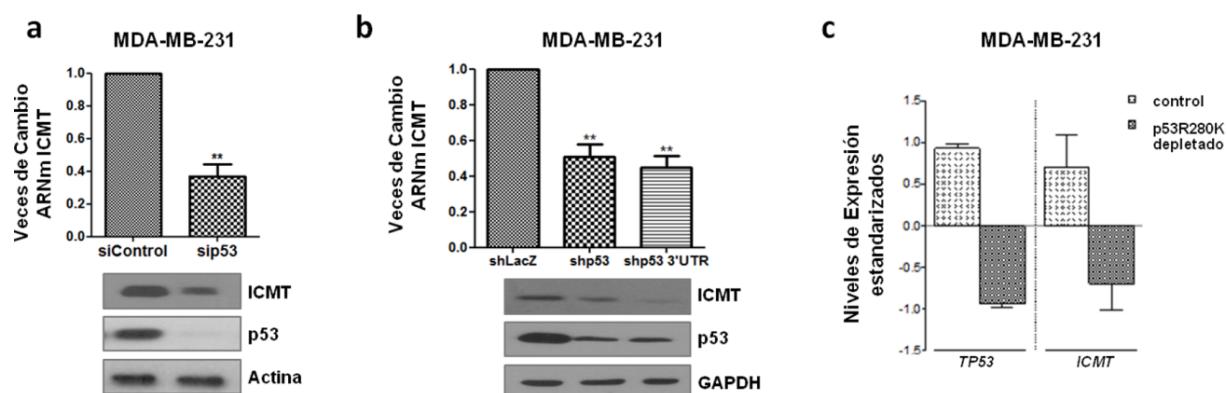


Figura 18: a) Niveles de ARNm de *ICMT* después del silenciamiento de p53R280K endógeno en células MDA-MB-231. Los niveles de ARNm de *ICMT* se determinaron mediante qRT-PCR, se normalizaron a los niveles de ARNm de *GAPDH* y se expresaron como veces de cambio en comparación con el control (Panel superior, n=3, *One-tailed T-test*, p = 0,0062). Panel inferior: niveles proteicos de ICMT y p53R280K determinados por *Western Blot*. b) La expresión de p53R280K endógena en células MDA-MB-231 se redujo de forma estable mediante transducción con partículas retrovirales que contienen ARNsh contra p53 o control (shp53, shp53 3'UTR o shLacZ). Los niveles de ARNm de *ICMT* se determinaron mediante qRT-PCR, (Panel superior, n=3, *One way ANOVA*, p = 0,0041). Los niveles de ICMT y p53R280K se determinaron mediante *Western Blot* (Panel inferior). c) Niveles de expresión estandarizados de *TP53* e *ICMT* (*probeset 201609_x_at*) en células MDA-MB-231 control y luego del silenciamiento de p53R280K (datos provenientes de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) GSE14491, ⁸⁵).

Con el fin de descartar efectos inespecíficos asociados al ARNi, realizamos experimentos similares silenciando p53R280K en forma estable, utilizando dos ARNsh diferentes contra p53. Uno de ellos reconoce la misma secuencia que sip53. El otro, está dirigido a una secuencia diferente, presente en el 3' UTR. En ambos casos, confirmamos la disminución en los niveles de ARNm y proteína de ICMT en comparación con las células transducidas con el ARNsh control. Creemos que estos resultados descartan fuertemente posibles efectos inespecíficos y refuerzan nuestros resultados anteriores (Figura 18 b). Sumado a esto, cuando analizamos un conjunto independiente de datos provenientes de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO), previamente publicados por otros autores⁸⁵, pudimos confirmar nuestras observaciones, ya que la expresión de *ICMT* se redujo significativamente en la misma línea celular cuando p53R280K fue silenciado (Figura 18 c).

Con el objeto de determinar si la expresión de *ICMT* se ve afectada por otra mutante puntual de p53 realizamos experimentos similares en las líneas MDA-MB-468 (adenocarcinoma mamario Triple Negativo)¹⁷⁵ y HT29 (adenocarcinoma colorectal)¹⁷⁶. Ambas líneas expresan en forma endógena p53R273H, una de las mutantes más frecuentes en el cáncer⁹⁴, y no poseen p53 wt (Figura 19 a y b).

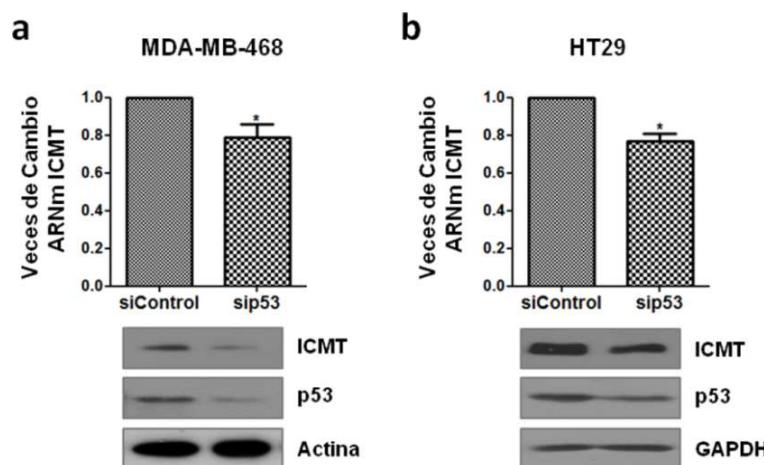


Figura 19: a) Niveles de ARNm de *ICMT* determinados mediante qRT-PCR después del silenciamiento de p53R273H endógeno en células MDA-MB-468 (n=3, *One-tailed T-test*, p = 0,048). Panel inferior: niveles proteicos de ICMT y p53R273H determinados por *Western Blot*. b) Niveles de ARNm de *ICMT* determinados mediante qRT-PCR después del silenciamiento de p53R273H endógeno en células HT29 (n=3, *One-tailed T-test*, p = 0,0151). Panel inferior: niveles proteicos de ICMT y p53R273H determinados por *Western Blot*.

En ambos casos se confirmó que el silenciamiento de p53R273H produjo una disminución significativa en los niveles de ARNm y proteína de ICMT. En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de las mutantes estudiadas, p53R280K y p53R273H, favorece la expresión de *ICMT*.

Teniendo en cuenta la estrecha interacción funcional entre las mutantes puntuales de p53 y la forma wt^{177,94}, decidimos ampliar nuestro análisis estudiando el efecto de p53 wt sobre la expresión de *ICMT*. En este caso, evaluamos en primer lugar el efecto del silenciamiento de p53 wt sobre los niveles proteicos de ICMT en la línea celular HEK-293, derivada de riñón embrionario humano (Figura 20 a). Encontramos que luego del silenciamiento, los niveles proteicos de ICMT aumentaron, lo cual indica que p53 wt regula negativamente a *ICMT*. Con el fin de entender si p53 wt puede afectar los niveles de ARNm de *ICMT* en estado estacionario, se transfectaron células H1299 con un plásmido que expresa p53 wt y se realizaron estudios de qRT-PCR. Dicha línea celular deriva de adenocarcinoma de pulmón y no expresa ninguna forma de p53 debido a una delección en el locus correspondiente¹⁷⁸. Los resultados mostraron que la expresión de p53 wt reduce significativamente los niveles de ARNm de *ICMT* en comparación con las células control transfectadas con el vector vacío (Figura 20 b). Por el contrario, en experimentos similares, los niveles de ARNm de *ICMT* se incrementaron con la expresión de p53R280K, confirmando la regulación positiva por parte de p53 mutante. A su vez, el análisis mediante *Western Blot* demostró que, los niveles proteicos de ICMT en células H1299 disminuyeron debido a la expresión de p53 wt pero aumentaron en presencia de p53R280K (Figura 20 b). Siguiendo la misma metodología, confirmamos que los niveles proteicos de ICMT aumentaron tras la transfección de los mutantes p53R273H y p53R175H en células H1299 (Figura 20 c). Según la clasificación estructural, p53R273H es un mutante de contacto, mientras que p53R175H es un mutante estructural. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que diferentes mutantes puntuales de p53 asociadas con el cáncer comparten la capacidad de regular de manera positiva la expresión de *ICMT*, y que este efecto no se limita solamente a los mutantes de contacto. A su vez, estos resultados, nos permitieron demostrar en un mismo sistema el rol opuesto de las formas wt y mutante de p53 sobre *ICMT*.

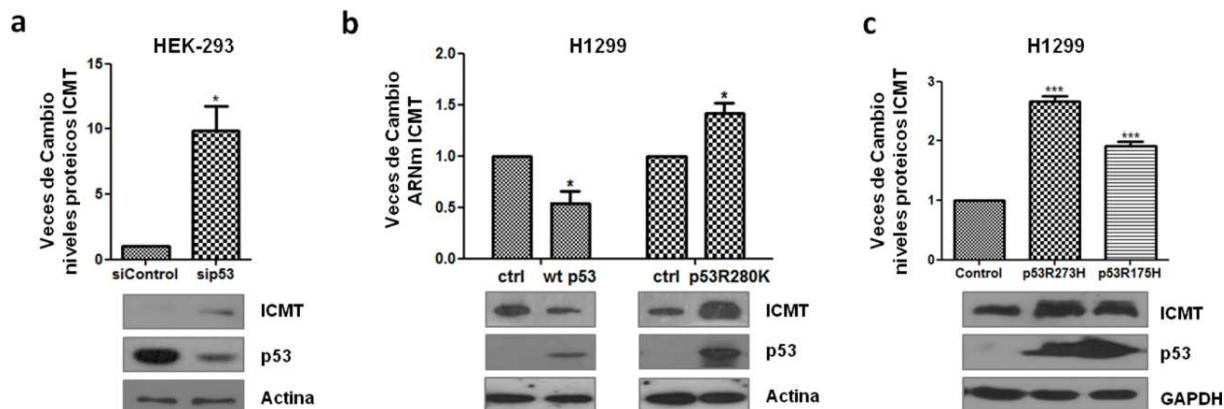


Figura 20: **a)** Niveles proteicos de ICMT y p53 después del silenciamiento de p53 wt endógeno en células HEK-293 determinados por *Western Blot* (Panel inferior) y cuantificados por densitometría (Panel superior, *One-tailed T-test*, $p = 0,0201$). **b)** Las células H1299 se transfecaron con plásmidos que expresan p53 wt, p53R280K o vector vacío (ctrl) como se indica, los niveles de mRNA de ICMT se determinaron mediante qRT-PCR, se normalizaron en relación con el ARNm de GAPDH y se expresaron como veces de cambio en comparación con las células control ($n = 4$, *One-tailed T-test*, $p = 0,0147$ y $p = 0,0123$ respectivamente). Niveles proteicos de ICMT y p53 determinados por *Western Blot* (Panel inferior). **c)** Niveles proteicos de ICMT y p53 determinados por *Western Blot* en células H1299 transfectadas con plásmidos que expresan p53R273H, p53R175H o vector vacío (control) como se indica (Panel inferior). Cuantificaron por densitometría (Panel superior, *One way ANOVA*, $p < 0,0001$).

Posteriormente, estudiamos el efecto de la estabilización de p53 wt endógena sobre los niveles de ICMT en la línea celular MCF-7¹⁷⁹, derivada de adenocarcinoma mamario. Las células se trataron con Nutlin-3, un inhibidor específico de la interacción entre p53 y la ubiquitina ligasa MDM2¹⁸⁰, el cual interfiere con la degradación de p53 wt por parte del proteosoma 26S. El análisis por *Western Blot* confirmó el aumento en los niveles de p53 wt luego del tratamiento, y en forma concomitante mostró una reducción en los niveles proteicos de ICMT. A su vez, se obtuvieron resultados similares cuando tratamos con Nutlin-3 células de la línea HCT116 p53^{+/+}, derivadas de adenocarcinoma de colon (Figura 21 a). Por otra parte, utilizando la línea celular singénica HCT116 p53^{-/-}, generada por delección de ambos alelos de TP53¹⁸¹, se evaluó el efecto de la reconstitución de la expresión de p53 wt sobre los niveles de ICMT. Se transfecaron las células HCT116 p53^{-/-} con un plásmido que expresa p53 wt y se realizaron estudios de qRT-PCR y *Western Blot*. La reintroducción de p53 wt en este sistema, redujo significativamente los niveles de ARNm y proteína de ICMT (Figura 21 b).

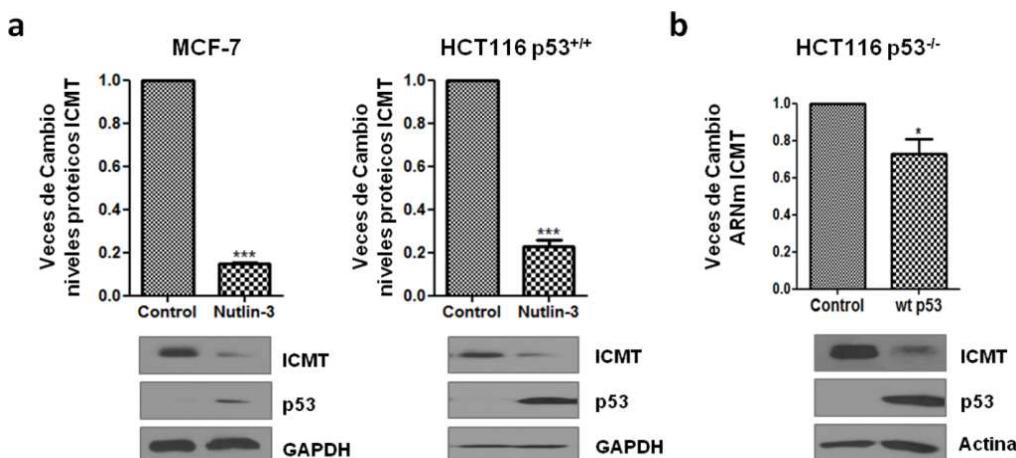
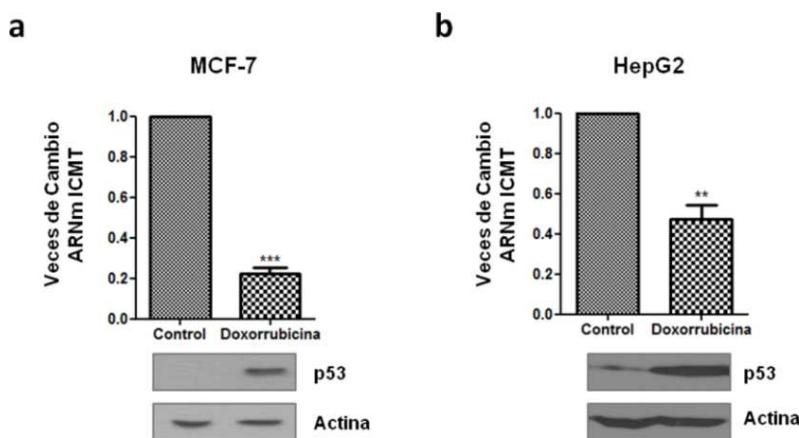


Figura 21: a) Células MCF-7 o HCT116 p53^{+/+} se trataron con Nutlin-3. Los niveles proteicos de ICMT y p53 se analizaron mediante *Western Blot* (Panel inferior) y se cuantificaron por densitometría (Panel superior, *One-tailed T-test*, $p < 0,0001$ y $p = 0,0008$ respectivamente). b) El efecto de p53 wt en los niveles de estado estacionario de ARNm de *ICMT* se determinó mediante qRT-PCR tras la transfección de células HCT116 p53^{-/-} con un plásmido que expresa p53 wt o vector vacío como control (Panel superior; $n=4$, *One-tailed T-test*, $p = 0,0218$). Niveles proteicos de p53 wt e ICMT determinados por *Western Blot*. (Panel inferior).

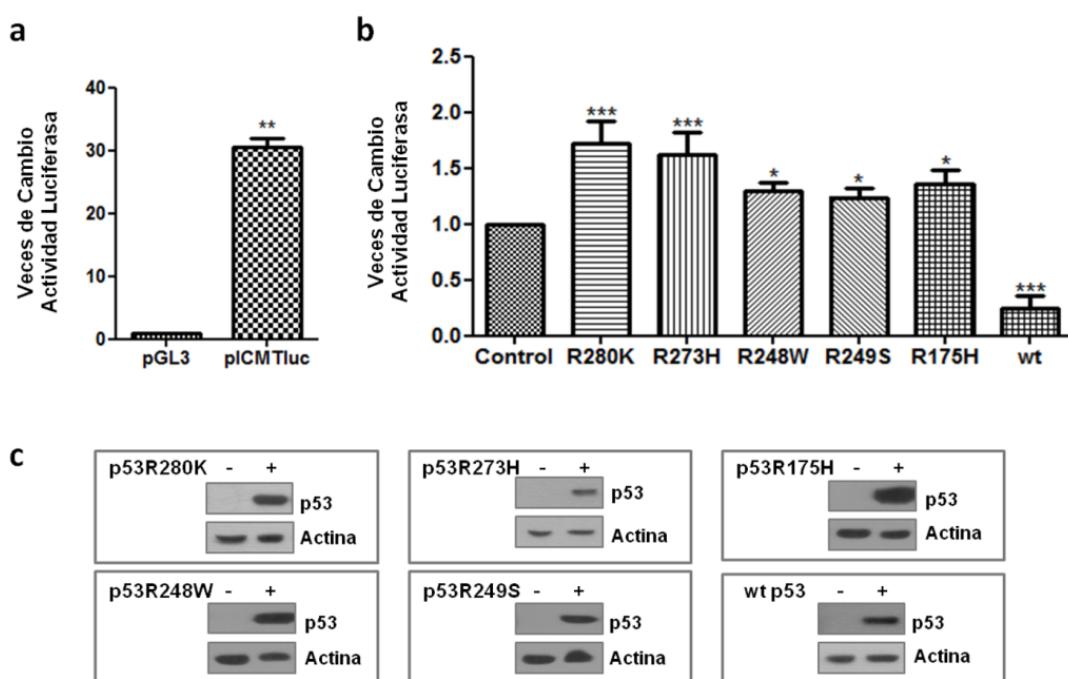
Con el fin de ampliar la caracterización de la regulación de la expresión de *ICMT*, se estudió el efecto del agente terapéutico Doxorrubicina, el cual se intercala en el ADN generando estrés genotóxico interfiriendo con la acción de la topoisomerasa II^{182,183}. El daño generado, activa una compleja respuesta que incluye la estabilización de p53 wt^{184,185}. Luego del tratamiento con Doxorrubicina de la línea MCF-7 fue posible confirmar la estabilización de p53 wt y además se observó una reducción significativa de los niveles de ARNm de *ICMT*, analizados mediante qRT-PCR (Figura 22 a). Un resultado similar fue obtenido utilizando la línea celular HepG2¹⁸⁶, derivada de hepatocarcinoma (Figura 22 b). En conjunto, nuestros resultados confirman que la expresión de *ICMT* se encuentra reprimida por la acción de p53 wt. En contraposición, demostramos que la presencia de mutantes puntuales de p53 ejerce el efecto opuesto. Por consiguiente, la alteración de la vía de p53 durante la progresión tumoral podría contribuir a potenciar la expresión de *ICMT*.



4.2. Caracterización de mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción de *ICMT*

Para entender si las formas wt y mutante de p53 afectan la transcripción de *ICMT*, decidimos realizar una caracterización funcional de su promotor. A partir del ADN genómico de células MDA-MB-231, se logró amplificar una secuencia de 2271 pb entre las posiciones -2234 y +37 respecto del sitio de inicio de la transcripción del ARNm de *ICMT*, utilizando los cebadores ICMP2Mfw e ICMP1rv (Tabla 3). La secuencia amplificada fue clonada corriente arriba del gen de la enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) en el vector pGL3-*basic*, para generar el reportero pICMTluc, el cual fue utilizado en el análisis de actividad transcripcional *in vitro* mediante ensayos de luciferasa. Inicialmente, se analizó la actividad promotora del plásmido pICMTluc; para esto, se transfeció la construcción en células H1299. Como control de transfección se co-transfeció el plásmido pCMV- β gal, el cual dirige la expresión de la enzima β -galactosidasa. La actividad luciferasa se determinó a las 48 h luego de la transfección, a partir de cantidades equivalentes de extractos proteicos, y los valores se normalizaron respecto de la actividad β -galactosidasa. Los ensayos mostraron un aumento significativo de la actividad luciferasa en células conteniendo la construcción pICMTluc en comparación al nivel basal de actividad luciferasa obtenido al transfectar el vector pGL3 vacío (Figura 23 a). Lo cual demuestra, que la secuencia clonada contiene los elementos necesarios para activar

la transcripción y además presenta una actividad promotora fuerte. Estos resultados nos permitieron validar el uso de este reportero para estudiar los mecanismos que regulan la transcripción de *ICMT*. A continuación, se estudió el efecto de diversas formas de p53 sobre la actividad del reportero. Se realizaron ensayos de luciferasa tras la co-transfección de un plásmido que expresa p53R280K con pICMTluc en células H1299. Se encontró que la expresión de p53R280K aumentó significativamente la actividad del reportero en ausencia de p53 wt (Figura 23 b y c). Estos resultados se condicen con nuestras observaciones previas y respaldan la idea de que p53 mutante coopera con la expresión de *ICMT* a través de la adquisición de actividades neomórficas.



Se realizaron experimentos similares co-transfectando plásmidos que expresan otras mutantes puntuales de p53 (p53R273H, p53R248W, p53R249S y p53R175H) con

plCMTluc. En este caso, también observamos un aumento de la actividad del promotor (Figura 23 b y c), lo cual manifiesta que todos los mutantes puntuales ensayados ejercen un efecto positivo sobre el mismo. Posteriormente, estudiamos el efecto de p53 wt sobre el reportero siguiendo la misma metodología. Los resultados demostraron que la actividad del promotor fue marcadamente reprimida por la proteína wt (Figura 23 b y c), lo que indica que la transcripción de *ICMT* está regulada negativamente por la vía de p53.

Luego, analizamos el efecto de p53 wt endógena sobre la actividad del promotor de *ICMT*. Células HCT116 p53^{+/+} o HCT116 p53^{-/-} se transfecaron con plCMTluc y pCMV-β-galactosidasa como control de transfección. La expresión de p53 wt endógeno se indujo mediante tratamiento con Doxorrubicina. Después de 24 h, se determinó la actividad luciferasa y se confirmó la expresión de p53 mediante *Western Blot*. Encontramos que la actividad del reportero se redujo significativamente después de la inducción de p53 en células HCT116 p53^{+/+}, pero no se vio afectada en las células HCT116 p53^{-/-} (Figura 24). Estos resultados evidencian que la represión del promotor de *ICMT* tras el tratamiento con Doxorrubicina requiere de la presencia de p53 wt endógena.

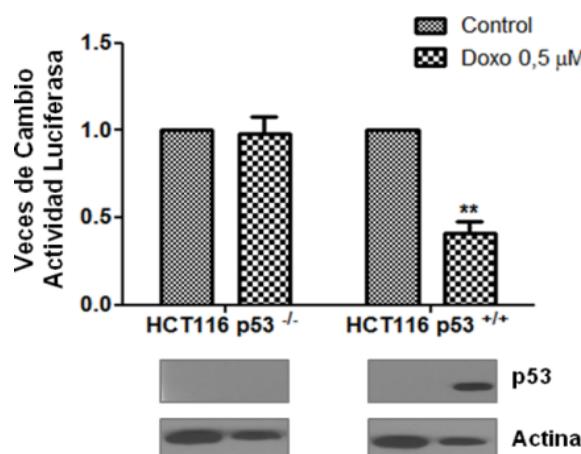


Figura 24: Ensayos de luciferasa en células HCT116 p53^{-/-} o HCT116 p53^{+/+} co-transfектadas con plCMTluc y pCMV-β-gal, y tratadas con Doxorrubicina 0,5 μM para inducir la expresión endógena de p53 wt (Panel superior; *One-tailed T-test*, $p = 0,0062$). Los valores de actividad luciferasa se normalizaron en base a la actividad β-galactosidasa y se expresaron como veces de cambio con respecto a las células no tratadas con Doxorrubicina (Control). Confirmación de la inducción de p53 wt por *Western Blot* (Panel inferior).

Nos preguntamos además, si formas de p53 con alteraciones en dominios importantes para su función transcripcional podrían afectar al promotor de *ICMT*.

Para abordar esta pregunta realizamos ensayos de luciferasa en células H1299, co-transfectando pICMTluc con un plásmido que permite la expresión de p53 conteniendo mutaciones en las posiciones L22Q/ W23S (mutaciones inactivadoras en el dominio de transactivación (TAD)) y además, una delección del dominio C-terminal (p53L22Q/W23S Δ C(aa355-393)). En paralelo, realizamos ensayos similares expresando p53 conteniendo las mismas mutaciones en las posiciones 22/23, pero con una delección en el dominio rico en prolina (p53L22Q/W23S Δ Pro(aa64-93)). Observamos que ambas mutantes perdieron la actividad represiva (Figura 25). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que mientras la inactivación severa de la función de p53 anula la represión de *ICMT*, la adquisición de mutaciones puntuales asociadas al cáncer puede transformar el efecto represivo en activación.

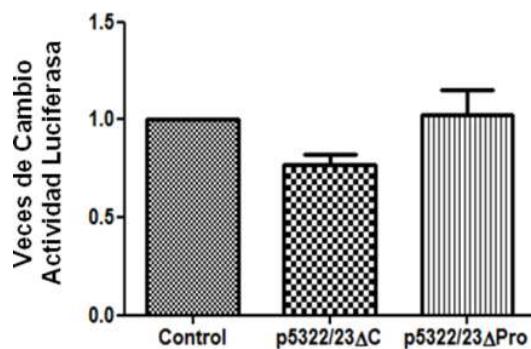


Figura 25: Ensayos de luciferasa realizados en células H1299 co-transfectadas con pICMTluc y plásmidos que expresan las proteínas indicadas, o vector vacío como control, y pCMV- β -gal. Los valores se normalizaron en base a la actividad β -galactosidasa y se expresaron como veces de cambio con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (Control), (n=3, One way ANOVA, $p > 0,05$).

Con el fin de identificar las regiones responsables del efecto de p53 wt, generamos diferentes construcciones reporteras que contienen delecciones del promotor de *ICMT* insertadas en el vector pGL3-basic (Figura 26 a). En primer lugar, se analizó la actividad promotora de las construcciones (Figura 26 b), verificando que todos los reporteros mantuvieran actividad promotora y pudieran ser utilizados para el mapeo.

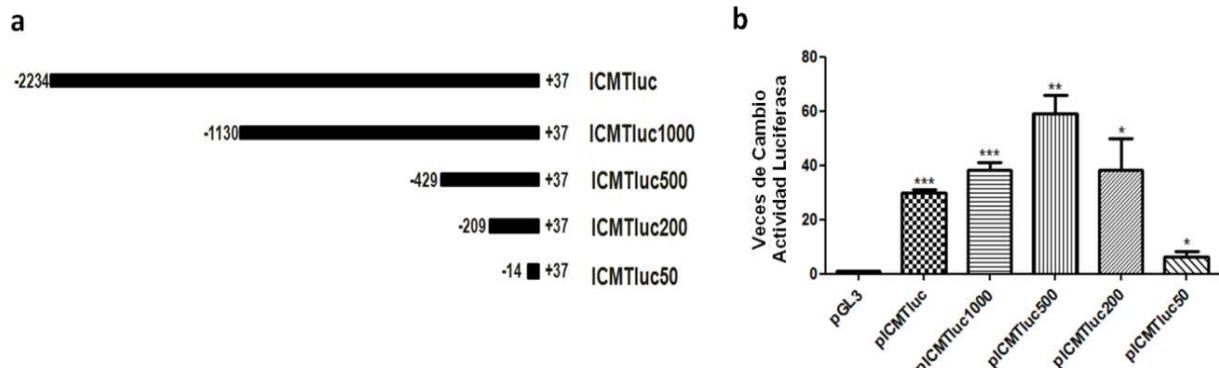


Figura 26: a) Representación esquemática de las delecciones del promotor de *ICMT* utilizadas para generar los plásmidos reporteros. b) Evaluación de la actividad reportera de las construcciones indicadas co-transfectadas en células H1299 con *pCMV- β gal*, los resultados se expresan como veces de cambio correspondientes a valores de actividad luciferasa normalizados en base a medidas de actividad β -galactosidasa y relativos al control (células transfectadas con *pGL3-basic*), (One-tailed T-test, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$).

Posteriormente se realizaron ensayos transfeciendo conjuntamente a cada reportero con p53 wt. Encontramos que el efecto represivo se mantuvo en el fragmento entre las posiciones -209 y +37, pero no se observó utilizando el fragmento entre -14 y +37 (Figura 27 a), lo que indica que la región comprendida entre las posiciones -209 y -14 es requerida para la represión por parte de p53 wt.

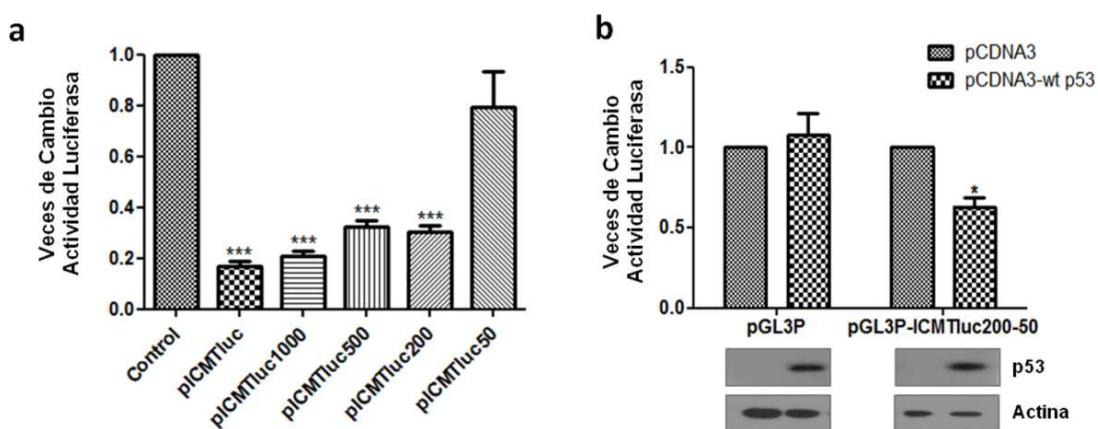


Figura 27: a) Ensayo de luciferasa sobre las delecciones del promotor de *ICMT*. Las células H1299 se co-transfectaron con los plásmidos indicados y *pCDNA3-p53wt* o el vector vacío (Control) (One way ANOVA, ***: $p < 0,0001$). b) Ensayos de luciferasa en células H1299 co-transfectadas con *pGL3-promoter* (*pGL3P*) o *pGL3-promoter* que contiene el fragmento de 195 pb (-209 -14) (*pGL3P-ICMTluc200-50*) y *pCDNA3-p53wt* o *pCDNA3* como control según se indica (One-tailed T-test, $p = 0,01$). Panel inferior: confirmación de la expresión de p53 wt por Western Blot.

Para confirmar este resultado, se clonó el fragmento que incluye las posiciones -209 a -14 en el vector *pGL3-promoter*, corriente arriba del promotor SV40, el cual dirige

la transcripción del gen de la luciferasa. Luego de la transfección de este reportero en células H1299 junto con p53 wt, se encontró que la actividad se redujo significativamente, en comparación con las células control (Figura 27 b). En cambio, p53 wt no mostró ningún efecto sobre el vector pGL3-*promoter* vacío, lo cual demuestra que el fragmento del promotor identificado es capaz de reprimir la transcripción de manera dependiente de p53.

Para confirmar el requerimiento de la secuencia identificada, generamos la construcción pICMTlucΔ(-209-14) en la cual el fragmento de 195 pb comprendido entre los -209 y los -14 pb fue delecionado del promotor completo. Mediante ensayos de luciferasa se observó que al eliminar esta región, p53 wt perdió la capacidad de reprimir al promotor de ICMT (Figura 28).

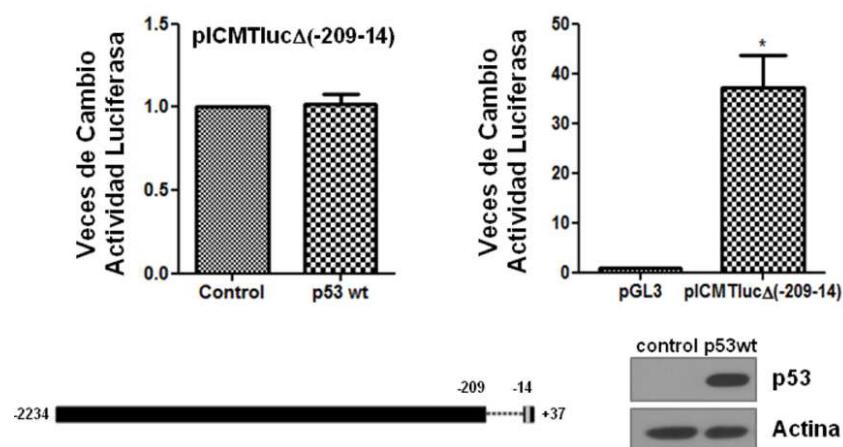


Figura 28: Ensayos de luciferasa en células H1299 co-transfектadas con pICMTlucΔ(-209-14) (Panel superior izquierdo: n=3, *One-tailed T-test*, p > 0,05), el cual carece del fragmento de 195 pb comprendido entre los -209 y los -14 pb como se indica en el esquema (Panel inferior izquierdo), y pCDNA3-p53wt o pCDNA3 como control. Panel superior derecho: evaluación de la actividad reportera basal de la construcción (*One-tailed T-test*, p = 0,0151), en relación al control (células transfectadas con pGL3-basic). Panel inferior derecho: confirmación de la expresión de p53 wt por *Western Blot*. En todos los casos, la actividad luciferasa se normalizó en base a medidas de actividad β -galactosidasa y se expresó como veces de cambio en comparación con las células control.

Para comprender si p53 wt puede actuar directamente sobre el promotor de *ICMT*, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina. En primera instancia, células H1299 se transfecaron con pICMTluc y un plásmido que codifica p53 wt o plásmido vacío como control, y la proteína se inmunoprecipitó usando un anticuerpo anti-p53 (DO1). A partir del ADN inmunoprecipitado de las células transfecadas con p53 wt fue posible amplificar un fragmento de 102 pb, entre las posiciones, -66 y +36 del promotor de *ICMT* (Figura 29 a). Por el contrario, el

fragmento estaba ausente en el ADN immunoprecipitado de las células sin p53, lo que confirma el reclutamiento específico de la proteína en el promotor de *ICMT*. Posteriormente, se evaluó el reclutamiento de p53 wt en el promotor de *ICMT* endógeno en las líneas celulares HEK-293 y HCT116 p53^{+/+}. En el caso de células HEK-293, se realizaron experimentos de chIP sin tratamiento de inducción, ya que los niveles basales de p53 wt son relativamente elevados (Figura 29 b y 20 a). En cambio, las células HCT116 p53^{+/+} (Figura 29 c) fueron tratadas con Doxorrubicina 0,5 µM para inducir la expresión de p53 wt (Figura 29 c, panel inferior). Se utilizó el anticuerpo anti-p53 (DO1) o anti-GFP como control negativo de la inmunoprecipitación.

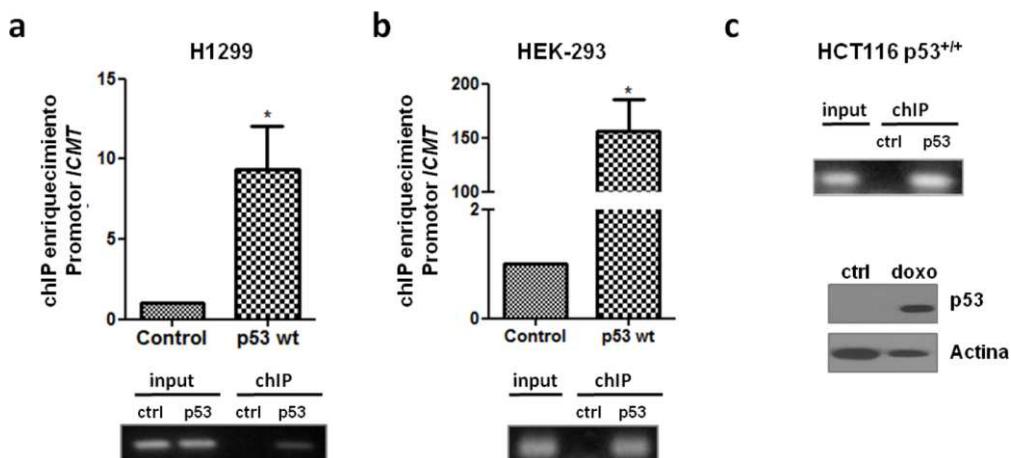


Figura 29: a) Ensayos de chIP en células H1299 co-transfectadas con pICMTluc y pCDNA3-p53wt o pCDNA3 como control. La inmunoprecipitación se realizó con anti-p53 (DO1). La presencia de ADN del promotor de *ICMT* en el inmunoprecipitado se determinó mediante qPCR (Panel superior), ($n=3$, *One-tailed T-test*, $p = 0,026$). y PCR semicuantitativa (Panel inferior). b) Ensayos de chIP en células HEK-293. La inmunoprecipitación se realizó utilizando anti-p53 (DO1) o anti-GFP como control. La presencia de ADN del promotor de *ICMT* en el inmunoprecipitado se determinó mediante qPCR ($n=3$, *One-tailed T-test*, $p = 0,0171$) y PCR semicuantitativa (Panel inferior). c) PCR semicuantitativa del ensayo de chIP en células HCT116 p53^{+/+} tratadas con Doxorrubicina. La IP se realizó utilizando anti-p53 (DO1) o anti-GFP como control. Confirmación de la inducción de p53 wt por *Western Blot* (Panel inferior).

Los resultados demostraron que en ambos sistemas fue posible amplificar el fragmento entre las posiciones -66 y +36 del promotor de *ICMT* en el ADN immunoprecipitado con el anticuerpo anti-p53. Estos resultados confirman que p53 wt endógeno es reclutado en el promotor de *ICMT* en las líneas celulares estudiadas. La presencia de p53 wt en el promotor de *ICMT* nos llevó a preguntarnos si existen p53RE en la región identificada como responsable de su efecto. En consecuencia,

analizamos el promotor de *ICMT* en busca de potenciales sitios de unión para p53. Se utilizó un software para buscar expresiones regulares correspondientes a diferentes secuencias consenso (<https://regex101.com/>). No encontramos ninguna secuencia conforme al consenso canónico de p53RE⁵³, PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy[X0-20]PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy (Pu:purina, Py: pirimidina, X: cualquier nucleótido). Se consideró una región espaciadora entre 0 y 20 nucleótidos para permitir una búsqueda menos restrictiva (Figura 30 a, resultados disponibles en: <https://regex101.com/r/dUOYDa/2>). También se buscaron secuencias utilizando un consenso modificado que contiene alteraciones del motivo canónico basado en p53RE encontrados en genes reprimidos⁶⁵, PuPuXCXXGXPY[X0-20]XPuXCXXGXPYPy (Figura 30 b, resultados disponibles en: <https://regex101.com/r/k7QB3C/1>). Nuevamente, no encontramos ninguna secuencia correspondiente al consenso modificado en la región responsable del efecto de p53wt (Figura 30 b).

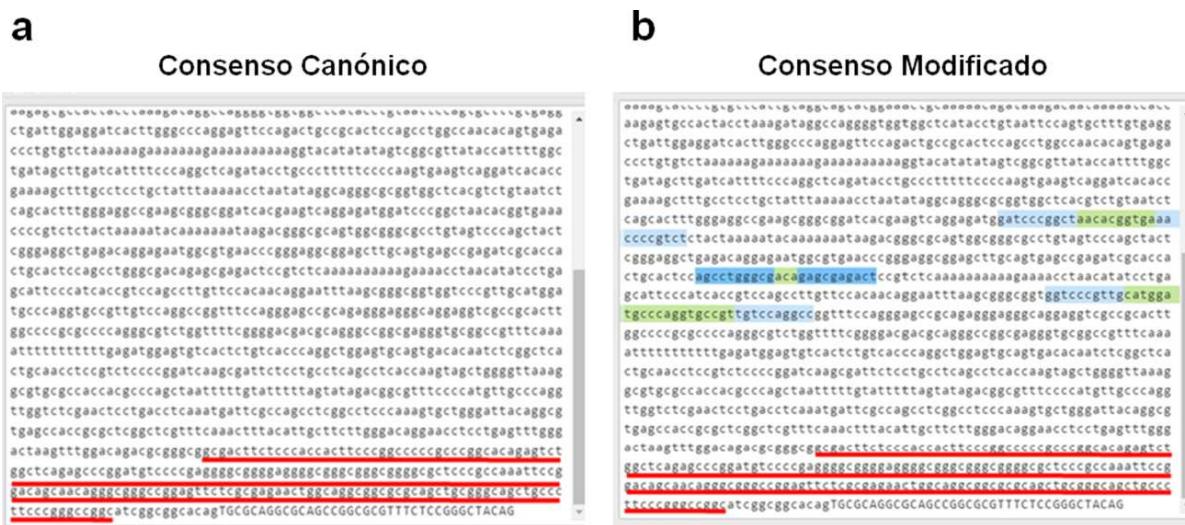


Figura 30: Búsqueda de sitios de unión para p53 en el promotor de *ICMT*. a) Análisis utilizando el consenso canónico de p53RE PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy[X0-20]PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy. **b)** Análisis utilizando un consenso modificado que contiene alteraciones del motivo canónico, encontradas en los genes reprimidos, PuPuXCXXGXPY[X0-20]XPuXCXXGXPYPy. Cada panel muestra una representación gráfica de los resultados de un fragmento del promotor que incluye la región responsable del efecto de p53 wt (-209-14) subrayada en rojo (para el análisis completo, consultar <https://regex101.com/r/dUOYDa/2> o <https://regex101.com/r/k7QB3C/1>). Los cuadros de colores indican coincidencias (recuadros celestes: secuencia consenso, recuadros verdes: región espaciadora). No se observaron coincidencias en la región comprendida entre los -209 y los -14 pb en ninguno de los análisis.

Aunque el software identificó algunas secuencias en otras regiones, las consideramos como falsos positivos ya que nuestros experimentos demostraron claramente que no están involucradas en el efecto de p53 wt. Creemos que la alta degeneración del consenso modificado permitió una búsqueda menos rigurosa. Por lo tanto, especulamos que el reclutamiento puede implicar la interacción con otras proteínas presentes en el promotor, aunque no podemos excluir la unión directa al ADN en un sitio divergente que muestre diferencias aún mayores con el consenso propuesto.

A continuación, mapeamos la región involucrada en el efecto p53 mutante. Se realizaron ensayos de luciferasa utilizando los mismos reporteros utilizados para p53 wt. En este caso, se encontró una clara reducción en la activación del promotor por p53R280K utilizando todas las delecciones reporteras, en comparación con el fragmento del promotor -2234 +37 original, lo que indica que el efecto de p53 mutante depende de la región comprendida entre -2234 y -1130 (Figura 31 a). Además, p53R280K aumentó la actividad del promotor también en el reportero pICMTlucΔ(-209-14), lo que demuestra que la región entre -209 y -14 no está involucrada en este efecto (Figura 31 b).

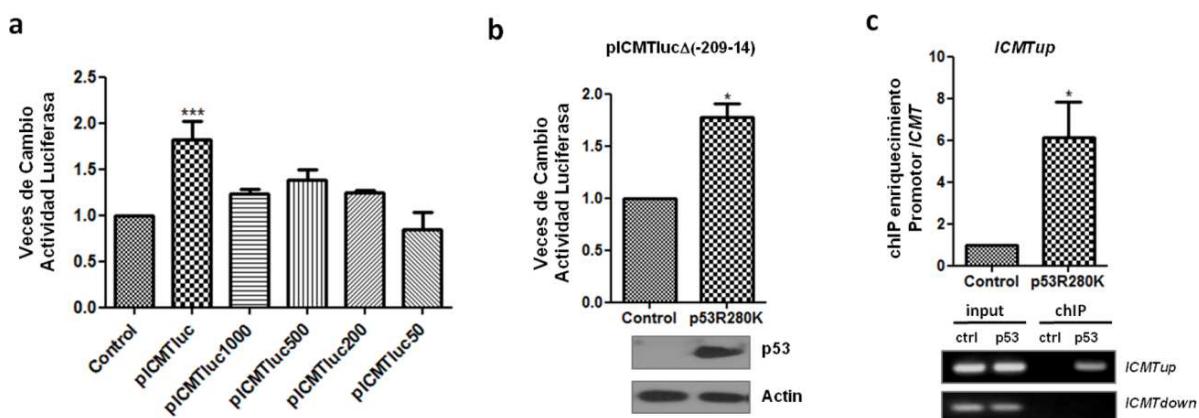


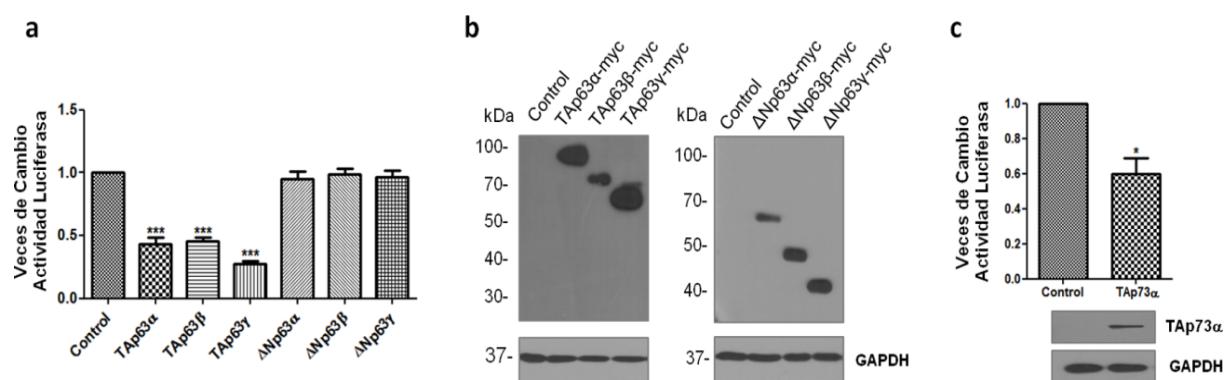
Figura 31: a) Ensayos de luciferasa sobre las delecciones del promotor de *ICMT*. Las células H1299 se co-transfectaron con los plásmidos indicados y un plásmido que expresa p53R280K o un vector vacío (control). La actividad luciferasa se normalizó a la actividad β -galactosidasa y se expresó como veces de cambio respecto a las células control (One way ANOVA, ***: p = 0,0003). b) Ensayos de luciferasa en células H1299 co-transfectadas con pICMTlucΔ(-209-14) y un plásmido que expresa p53R280K o un vector vacío (control). La actividad luciferasa se normalizó y se expresó como veces de cambio en comparación con las células control (One-tailed T-test, p = 0,0256). Panel inferior: confirmación de la expresión de p53R280K por Western Blot. c) Ensayo de chIP en células H1299 co-transfectadas con pICMTluc y pCDNA3-p53R280K o pCDNA3 como control. La IP se realizó utilizando el anticuerpo anti-p53 (DO1). La presencia de los fragmentos promotores -2178 -2071 (*ICMTup*) o -66 +36 (*ICMTdown*) se determinó mediante qPCR (Panel superior, n=3, One-tailed T-test, p = 0,0476) y PCR semicuantitativa (Panel inferior).

Mediante ensayos de chIP en células H1299 transfectadas con p53R280K, pudimos amplificar un fragmento de 107 pb entre las posiciones -2178 y -2071 (*ICMTup*), en el ADN inmunoprecipitado con anti p53 (Figura 31 c). Contrariamente, al realizar la amplificación entre las posiciones -66 y +36 (*ICMTdown*) en los ensayos de chIP, no encontramos evidencias de reclutamiento de p53R280K en esta región (Figura 31 c). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que p53R280K es reclutado en el promotor de *ICMT* en una región diferente a p53 wt, lo que indica que cada proteína regula la actividad del promotor por diferentes mecanismos.

4.3. Participación de otros miembros de la familia de p53 en la regulación de *ICMT*

Nuestros resultados mostraron un efecto positivo de las mutantes de p53 sobre la expresión de *ICMT* en las líneas MDA-MB-231, MDA-MB-468, HT29 y H1299. Estas líneas celulares no expresan la forma wt de p53, lo cual indica que p53 mutante puede afectar la expresión de dicho gen en forma independiente de p53 wt. Nos planteamos entonces indagar los mecanismos involucrados. Estudios previos han descripto la capacidad de p53 mutante de bloquear la función de su parólogo p63^{108,187}. De acuerdo con lo discutido, existen diversas isoformas de p63, las cuales pueden agruparse en isoformas TA y ΔN. Si bien TAp63 es capaz de regular la expresión de genes blanco específicos, también actúa sobre genes regulados por p53 wt. Nos preguntamos entonces si algunas isoformas de p63 podrían cooperar en la represión de *ICMT*, y si p53 mutante podría colaborar a aumentar los niveles de expresión, oponiéndose a la función de p63. En primer lugar, se estudió el efecto de TAp63α, una de las isoformas más estudiadas, y que se demostró responsable de actividades antiproliferativas y antimetastásicas^{85,86}. Los resultados de ensayos de luciferasa utilizando el reportero pICMTluc mostraron que la sobreexpresión de TAp63α en células H1299 ejerció un efecto represivo sobre el promotor de *ICMT*, similar al observado con p53 wt (Figura 32 a y b). El análisis de las isoformas TAp63β y TAp63γ mostró el mismo efecto (Figura 32 a y b). Estos resultados sugieren que la represión de *ICMT* podría formar parte de los mecanismos efectores de las funciones biológicas de TAp63. Posteriormente, se estudió el efecto de isoformas ΔN, las cuales carecen del dominio N-terminal, utilizando la misma

metodología. Los resultados obtenidos mostraron que, Δ Np63 α , Δ Np63 β y Δ Np63 γ no tuvieron ningún efecto sobre la actividad del promotor (Figura 32 a y b). Considerando que solo las isoformas TA de p63 afectaron la actividad del promotor, decidimos extender el análisis con el fin de comprender si TAp73 interviene en la regulación de *ICMT*. En ensayos de luciferasa utilizando el reportero pICMTluc, encontramos que TAp73 α también reprimió la actividad del promotor de *ICMT* (Figura 32 c).



Por lo tanto, nuestros hallazgos muestran que isoformas TA de p63 y p73 comparten con p53 wt la capacidad de regular negativamente al promotor de *ICMT*. Esta redundancia funcional sugiere fuertemente que un control riguroso de la expresión de *ICMT* es relevante en la fisiología de las células normales. Por el contrario, en base a nuestros resultados, se espera que la adquisición de mutaciones inactivantes en p53 wt derogue su efecto represivo sobre la expresión de *ICMT*. Además, la presencia de p53 mutante podría alterar la función de diferentes miembros de la familia de p53. Como fue comentado, las mutantes puntuales de p53 ejercen un efecto de dominancia negativa sobre la forma wt, ya que mantienen la capacidad de oligomerizar a través del dominio OD⁹⁵. Pero además, las mutantes adquieren la capacidad de interactuar con p63, alterando su actividad. Esta capacidad fue

propuesta como un mecanismo de ganancia de función, ya que es específica de p53 mutante¹⁸⁸. Con el fin de comprender si los mencionados mecanismos podrían afectar la expresión de *ICMT*, estudiamos la interacción funcional entre p53 mutante y algunos miembros de la familia p53 en ensayos de luciferasa. En primer lugar, se co-transfектaron p53R280K y p53 wt con pICMTluc en células H1299 y se midió la actividad del reportero. Se encontró que la presencia de p53R280K contrarrestó casi por completo la represión del promotor por parte de p53 wt, sugiriendo un efecto de dominancia negativa (Figura 33 a).

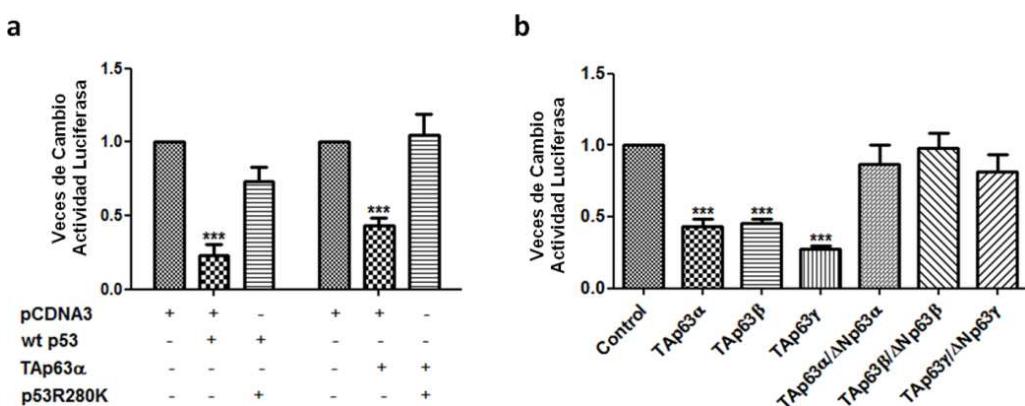


Figura 33: **a)** p53R280K contrarresta el efecto represivo de p53 wt y TAp63α en el reportero de *ICMT*. Ensayos de luciferasa en células H1299 co-transfектadas con pICMTluc y plásmidos que expresan las proteínas p53 wt o TAp63α y p53R280K como se indica (One way ANOVA, ***: p <0,0001). **b)** Las isoformas ΔN de p63 contrarrestan el efecto represivo de las isoformas TA de p63 en el reportero de *ICMT*. Ensayos de luciferasa en células H1299 co-transfектadas con pICMTluc y plásmidos que expresan las proteínas que se indican (One way ANOVA, ***: p <0,0001).

Luego se co-transfectó p53R280K con TAp63α en el mismo sistema, en donde la mutante también anuló el efecto represivo. Finalmente, decidimos analizar la relación funcional entre isoformas TA y ΔN de p63, ya que las mismas intervienen en la regulación de la expresión de algunos genes ejerciendo efectos opuestos⁸⁸. En consecuencia, estudiamos el efecto de la co-expresión de isoformas ΔNp63 y TAp63 en ensayos de luciferasa. Los resultados mostraron que la presencia de ΔNp63 anuló casi completamente la represión del promotor por parte de las isoformas TAp63 (Figura 33 b).

Colectivamente, nuestros resultados demuestran que el promotor de *ICMT* está regulado negativamente por proteínas implicadas en mecanismos de supresión tumoral, tales como p53 wt e isoformas TA de p63 y p73. Además, las mutantes

puntuales de p53 no solo contrarrestan este efecto represivo, sino que también regulan positivamente su expresión, sugiriendo que la adquisición de mutaciones *missense* en *TP53* podría cooperar con la progresión tumoral a través del aumento de la expresión de *ICMT*.

Resultados Capítulo 2: Efecto de ICMT sobre fenotipos tumorales

RESULTADOS CAPÍTULO II: Efecto de ICMT sobre fenotipos tumorales

5.1. Efecto de ICMT sobre fenotipos tumorales *in vitro*

De acuerdo con la hipótesis planteada a partir de los resultados obtenidos sobre la regulación de la expresión de *ICMT*, decidimos estudiar las consecuencias del aumento de los niveles de esta enzima sobre fenotipos asociados a las células tumorales. Para este fin, se generó un plásmido de expresión conteniendo la secuencia codificante de ICMT humana fusionada a GFP. Se amplificó la secuencia codificante completa mediante PCR utilizando los cebadores ICMTuppLfw-ICMTpLrv (Tabla 3), a partir de ADNc generado por retrotranscripción de ARN total de células H1299. El producto de amplificación de 906 pb se ligó con el vector pLPC-GFP para generar la construcción pLPC-ICMTGFP. Dicho vector permite la expresión transitoria en células de mamífero y la manipulación genética estable mediante transducción, ya que contiene secuencias que permiten su empaquetamiento en partículas pseudovirales y posterior integración en el genoma²³.

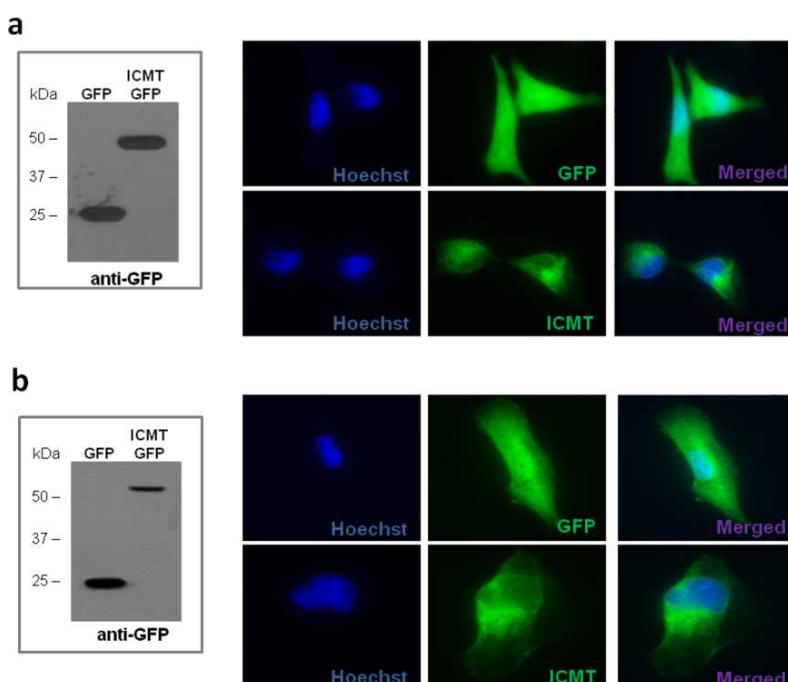


Figura 34: a) Análisis de *Western Blot* usando anticuerpo anti-GFP (Panel izquierdo) y microscopía de fluorescencia (Panel derecho) de células H1299 que expresan establemente GFP o ICMT-GFP. b) Análisis de *Western Blot* usando anticuerpo anti-GFP (Panel izquierdo) y microscopía de fluorescencia (Panel derecho) de células MDA-MB-231 que expresan establemente GFP o ICMT-GFP.

La expresión de la proteína de fusión se confirmó en células MDA-MB-231 y H1299 transducidas con partículas retrovirales conteniendo pLPC-ICMTGFP o pLPC-GFP como control, luego de seleccionar a las células que integraron el *cassette* para la expresión de la proteína de interés en su genoma junto con un gen de resistencia a puromicina. Mediante *Western Blot* se detectó la presencia de ICMT-GFP en los lisados celulares (Figura 34 a y b). Además, el estudio por microscopía de fluorescencia (Figura 34 a y b) demostró que ICMT-GFP se localiza en un área citoplásmica discreta en estrecha asociación con el núcleo, en concordancia con la localización en el RE descripta para esta enzima¹³⁴. Por el contrario, GFP se distribuyó uniformemente en el citoplasma de las células.

En primer lugar, analizamos el efecto de ICMT sobre la proliferación celular *in vitro* en ambas líneas celulares (Figura 35 a y b). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la tasa de proliferación entre las células que sobreexpresan ICMT y las células control en ninguno de los dos casos.

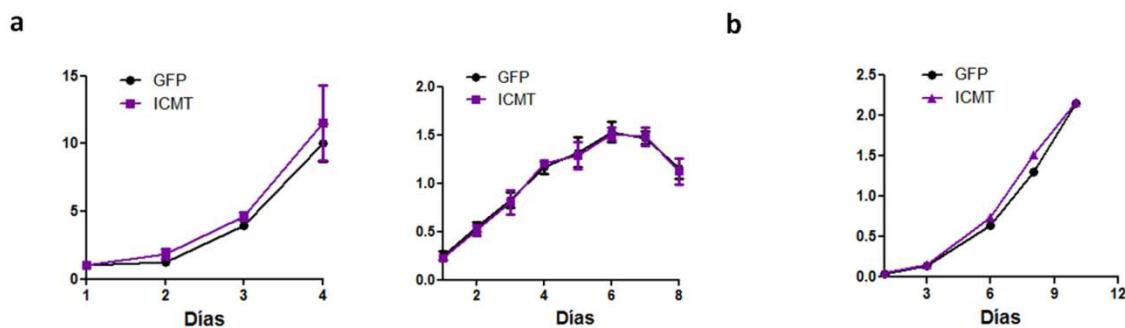


Figura 35: a) Ensayo de proliferación de células H1299 que expresan establemente GFP o ICMT-GFP evaluado por recuento de células en cámara de Neubauer (Panel izquierdo) y por MTT (Panel derecho). b) Ensayo de proliferación de células MDA-MB-231 que expresan establemente GFP o ICMT-GFP evaluado por recuento de células en cámara de Neubauer.

Para comprender si altos niveles de ICMT pueden promover la capacidad clonogénica *in vitro*, se realizaron ensayos de formación de colonias. Células H1299 expresando pLPC-ICMTGFP o pLPC-GFP como control, se plaquearon a baja densidad y se incubaron para permitir el crecimiento clonal. Nuestros resultados mostraron que las células sobreexpresando ICMT desarrollaron un número significativamente mayor de colonias en comparación con las células control (Figura 36 a). Estos resultados indican que altos niveles de ICMT pueden conferir una

ventaja para sobrevivir y proliferar en condiciones restrictivas, como las impuestas por el cultivo abajo densidad.

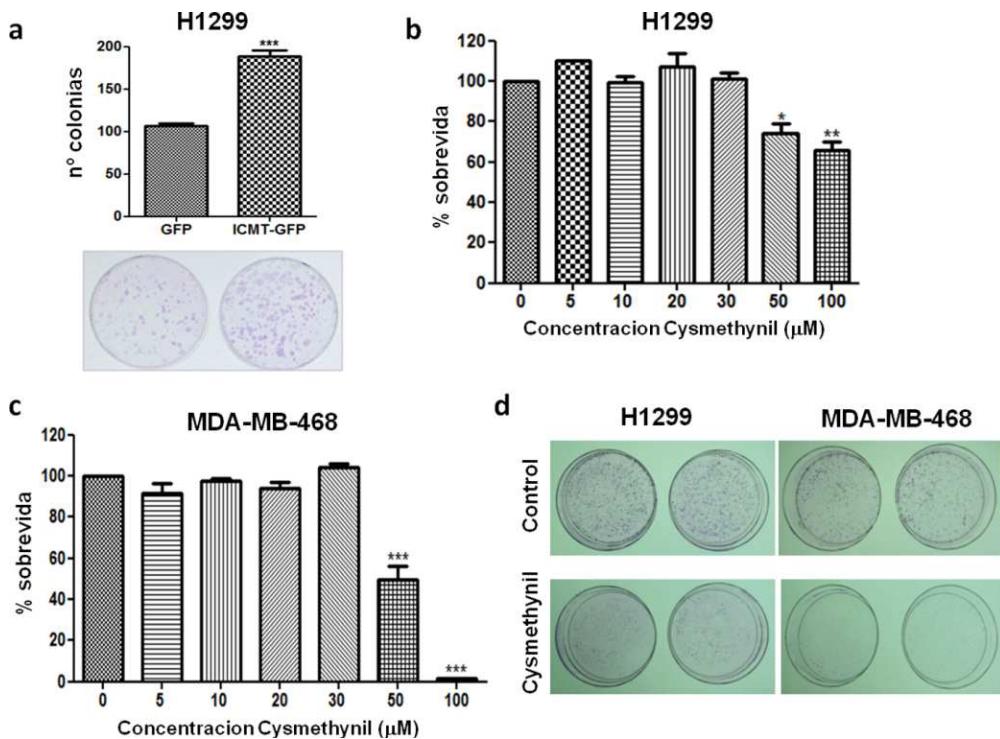


Figura 36: a) Ensayo de formación de colonias. Las células H1299 que sobreexpresan ICMT-GFP o GFP como control se plaquearon a baja densidad y se incubaron durante 2 semanas, las colonias se tiñeron con Giemsa y se determinó su número (n=4, *One-tailed T-test*, p = 0,0003). b) Ensayo de MTT para evaluar toxicidad del Cysmethynil en función de la concentración en H1299 (*One way ANOVA*, p =0,0004) o c) MDA-MB-468 (*One way ANOVA*, p <0,0001). d) Ensayo de formación de colonias en células H1299 o MDA-MB-468 tratadas con 30 μM Cysmethynil o DMSO, se muestran imágenes representativas (n=3).

Por otro lado, decidimos analizar el efecto de la inhibición farmacológica de ICMT utilizando el compuesto Cysmethynil (véase apartado 1.15 en la introducción). Previamente, otros autores habían reportado experimentos con Cysmethynil en células MDA-MB-231 *in vitro*¹⁵⁵. En consecuencia, decidimos extender el estudio a las líneas celulares H1299 y MDA-MB-468. En primer lugar, se evaluó la toxicidad del inhibidor sobre las células en estudio, analizando la biorreducción de MTT. La viabilidad celular de las líneas ensayadas, H1299 y MDA-MB-468, no fue afectada a concentraciones hasta 30 μM. Sin embargo, a concentraciones superiores, como 50 y 100 μM, la viabilidad disminuyó (Figura 36 b y c). A partir de estos ensayos, elegimos la concentración de 30 μM como concentración de trabajo para los

ensayos subsiguientes. Evaluamos la capacidad clonogénica *in vitro* en ambas líneas celulares. Las células H1299 o MDA-MB-468 se plaquearon a baja densidad y se trataron con Cysmethynil. Como control se utilizó la dilución correspondiente de DMSO. Los resultados mostraron que el tratamiento con el inhibidor de ICMT redujo el potencial clonogénico de células H1299 y MDA-MB-468 en ensayos de formación de colonias (Figura 36 d).

Posteriormente se estudió el efecto de ICMT sobre fenotipos asociados a las células metastásicas. Se realizaron ensayos de cierre de la herida en placa utilizando células H1299 (Figura 37 a) y ensayos de migración en *transwell* utilizando células MDA-MB-468 (Figura 37 b) tratadas con Cysmethynil. En ambos casos se observó una disminución significativa en la migración a las 24 h del tratamiento con Cysmethynil (Figura 37 a y b).

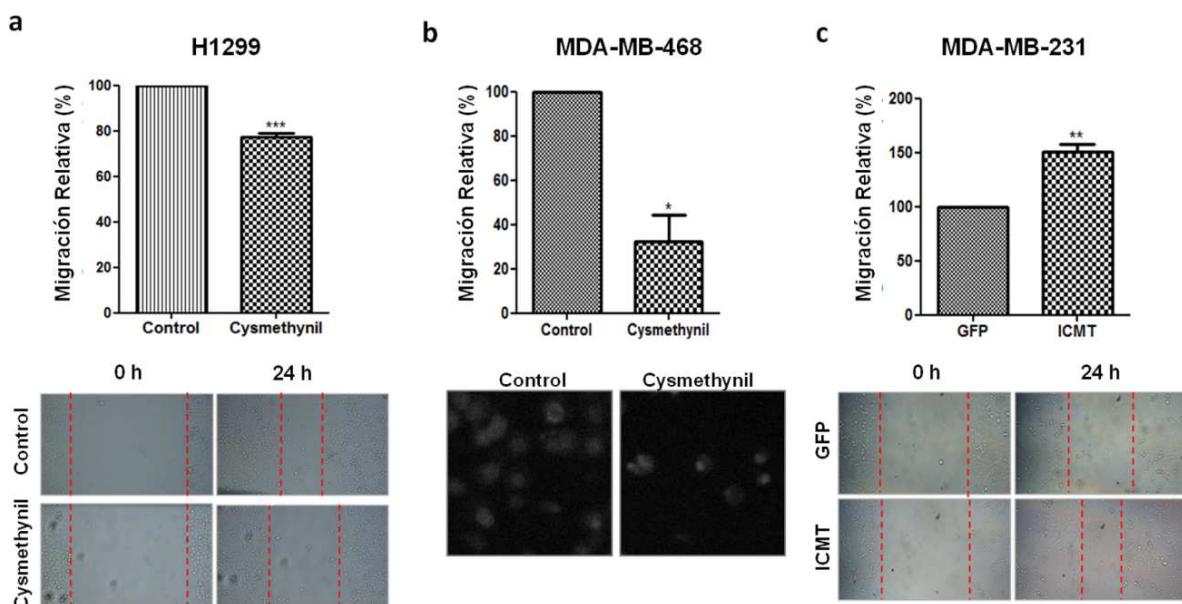


Figura 37: a) Ensayo de migración por cierre de la herida en células H1299 tratadas con 30 μ M de Cysmethynil (n=4, *One-tailed T-test*, p = 0,0005). Panel inferior: imágenes representativas. b) Ensayo de migración en *transwell* de células MDA-MB-468 tratadas con 30 μ M de Cysmethynil (n=3, *One-tailed T-test*, p = 0,0152). Panel inferior: imágenes representativas. c) Ensayo de migración por cierre de la herida en células MDA-MB-231 que sobreexpresan de forma estable ICMT-GFP o GFP como control (n=3, *One-tailed T-test*, p = 0,0073). Panel inferior: imágenes representativas.

Luego, se evaluó si la sobreexpresión de ICMT en la línea celular MDA-MB-231 afecta la capacidad migratoria de las células. Las líneas celulares estables previamente generadas sobreexpresando ICMT-GFP o GFP como control fueron

utilizadas en el ensayo de cierre de la herida en placa. De acuerdo con nuestra hipótesis, la sobreexpresión de ICMT en células MDA-MB-231 aumentó significativamente la migración evaluada a las 24 h (Figura 37 c). Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas, indicando un efecto inhibitorio de la migración luego del tratamiento con Cysmethynil en las mismas células¹⁵⁵.

La capacidad de las células de un tumor primario de metastatizar depende de su capacidad de independizarse de las células vecinas y de adquirir características migratorias e invasivas. La adquisición de estas características depende en muchos casos de la activación de un programa que recapitula en gran medida la transición epitelio-mesenquimal (TEM), el cual involucra cambios a nivel de la expresión génica, así como de la dinámica del citoesqueleto. Alteraciones en la adhesión, morfología y polarización celular son los eventos iniciales que ocurren durante la transición de las células epiteliales hacia un fenotipo invasivo. Con el fin de profundizar la caracterización del rol de ICMT en la adquisición de fenotipos invasivos decidimos estudiar su efecto sobre la polarización y la integridad epitelial en estructuras organotípicas. Para este fin, se utilizó un modelo de cultivo tridimensional (3D) de células MDCK, las cuales generan estructuras esféricas formadas por una capa de células de tipo epitelial con polaridad apico-basal rodeando un lumen interno, denominadas esferoides o quistes. Este modelo ha sido de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de polarización, y presenta la ventaja de que el efecto de distintas vías de señalización ha sido caracterizado. En particular, ha sido utilizado para el estudio del rol de RHO GTPasas como RAC1, RHOA y CDC42^{189,190,191}, las cuales han sido propuestas como sustratos de ICMT. Para lograr la sobreexpresión de ICMT se transdujeron células MDCK en cultivo bidimensional (2D) con pLPC-ICMTGFP o pLPC-GFP como control, y la expresión de las proteínas fue confirmada por *Western Blot* (Figura 38 a). Posteriormente las células se plaquearon sobre matrigel y se incubaron durante 3 días hasta observar la formación de quistes. Se realizó un análisis por microscopía confocal de fluorescencia, obteniendo imágenes sobre planos consecutivos a lo largo del eje z. La polarización se evaluó mediante inmunolocalización de GM130^{192,193} como marcador apical y los núcleos fueron visualizados mediante tinción con DAPI (Figura 38 b). Fue posible observar que las células expresando ICMT-GFP presentaron alteraciones en la formación de los quistes, caracterizadas por la presencia de más de un lumen y alteración de la polaridad apical (Figura 38 c y d). Los resultados

demuestran que el aumento en los niveles de ICMT redujo las características epiteliales, ya que alteró la polarización celular y la arquitectura de los quistes.

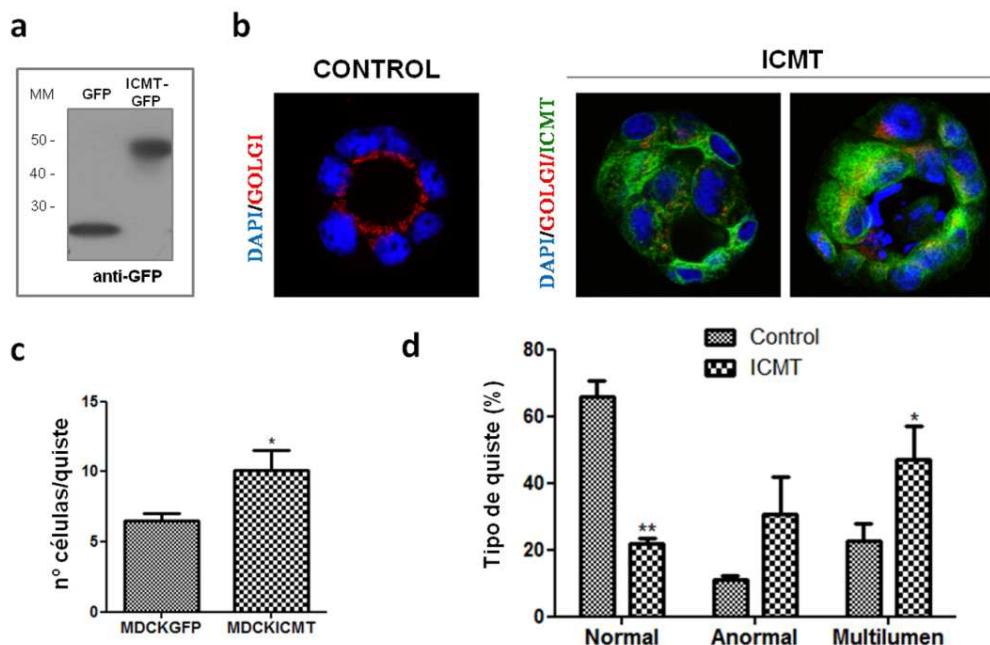


Figura 38: Análisis del efecto de ICMT en la formación de quistes de células MDCK en cultivos 3D. **a)** La expresión de la proteína de fusión ICMT-GFP se confirmó mediante *Western Blot* de células mantenidas en cultivo bidimensional. **b)** Imágenes de microscopía confocal representativas de células transducidas con pLPC-ICMTGFP o pLPC-GFP como control. Se estudió la expresión de GM130 por inmunofluorescencia (rojo), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul); verde, GFP. Las células se fijaron con metanol, lo que dió como resultado la pérdida de la señal soluble de GFP, pero no afectó la señal de la proteína de fusión, probablemente debido a su posible ubicación como proteína de membrana del RE. **c)** Cuantificación del número de células por quiste (n=3, *One-tailed T-test*, p = 0,0377). **d)** Porcentaje de quistes según su morfología: normal, anormal y multilumen (n=3, *One-tailed T-test*, **: p = 0,0063, *: p = 0,0256).

En conjunto, los resultados de los estudios *in vitro* nos sugieren que el aumento en los niveles de ICMT podría contribuir con la progresión tumoral de diversas formas. A través de su efecto sobre el potencial clonogénico podría colaborar con el crecimiento del tumor primario y/o la supervivencia en condiciones hostiles, tales como la circulación sanguínea o la sede de colonización. Por otra parte, ICMT podría colaborar con la liberación de células invasivas a partir del tumor primario, favoreciendo la transición epitelio-mesénquima. Por último, una vez liberadas las células invasivas, ICMT podría colaborar en los procesos migratorios.

5.2. Efecto de ICMT sobre el potencial tumorigénico y metastásico *in vivo*

Considerando las evidencias del rol pro-tumoral obtenidas *in vitro*, decidimos estudiar si el aumento en los niveles de ICMT podría colaborar con el desarrollo de tumores *in vivo*. Para este objetivo se utilizaron las células H1299 que expresan ICMT-GFP en forma estable generadas por transducción retroviral, las cuales se inyectaron por vía subcutánea en ratones *nude*. Como control se utilizaron células transducidas con GFP. El desarrollo de tumores y las condiciones generales de los animales fueron monitoreados periódicamente (Figura 39 a).

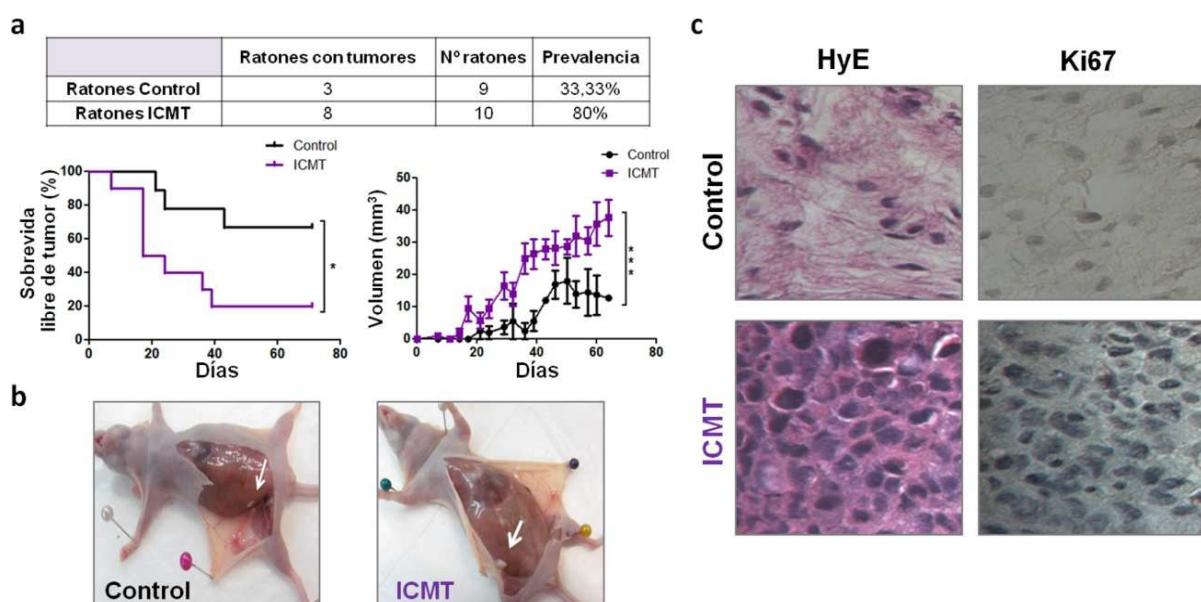


Figure 39: Ensayo de formación de tumores *in vivo*. a) Células H1299 sobreexpresando ICMT-GFP o GFP como control se inyectaron en forma subcutánea en ratones *nude* y se analizó el desarrollo tumoral. Panel superior: número de ratones que desarrollaron tumores en cada grupo (ICMT o Control). Abajo a la izquierda: gráfico de Kaplan Meier que muestra los días en los que las masas tumorales fueron detectables mediante inspección manual después de la inyección (*Test Log-rank (Mantel-Cox)*, $p = 0,0240$ y *Test Gehan-Breslow-Wilcoxon*, $p = 0,0177$). Abajo a la derecha: evolución del tamaño de las masas palpables detectadas en cada grupo (*Comparison of Fits*, ecuación de crecimiento exponencial, $p < 0,0001$). **b)** Imágenes representativas de los tumores desarrollados. **c)** Tinción con hematoxilina-eosina (HyE, Panel izquierdo) e inmunohistoquímica con el marcador de proliferación Ki-67 (Panel derecho) en los cortes histológicos de los tumores Control e ICMT.

En los ratones inyectados con células ICMT-GFP fue posible detectar masas palpables significativamente más temprano en comparación con los controles. Además, observamos que el volumen promedio de las mismas en los ratones control fue menor que el de las masas originadas a partir de células ICMT-GFP (Figura 39 a y b). La autopsia realizada luego del sacrificio de los animales reveló que el 80% de

los ratones inyectados con células ICMT-GFP desarrolló masas tumorales (8/10). En contraste, se encontraron tumores en solo el 33.3% de los ratones inyectados con células control (3/9). Por otra parte, el análisis histológico por hematoxilina-eosina mostró que los tumores de los ratones control presentaron una estructura caracterizada por una mayor proporción de tejido conjuntivo y pocos núcleos celulares. En contraste, los tumores provenientes de células ICMT-GFP fueron más compactos y presentaron mayor celularidad (figura 39 c). A su vez, el análisis por inmunohistoquímica indica una mayor expresión de Ki-67 en los tumores provenientes de células ICMT-GFP, lo cual se asociaría con una mayor proliferación comparada con los controles (figura 39 c). En resumen, nuestros resultados demuestran que los altos niveles de ICMT aumentaron el potencial tumorigénico de las células H1299 *in vivo*.

Con el objeto de profundizar la caracterización de los efectos de ICMT sobre la progresión tumoral *in vivo* decidimos realizar estudios de transplante ortotópico. Se utilizaron células de cáncer de mama 4T1. Dicha línea celular deriva de un adenocarcinoma mamario Triple Negativo de ratón y no expresa p53¹⁹⁴. Los tumores generados por estas células son capaces de colonizar sitios distantes, tales como los ganglios linfáticos y los pulmones, y por lo tanto constituyen un excelente modelo para el estudio de metástasis *in vivo*, ya que recapitula todas las etapas de este complejo proceso. Por otra parte, al ser células murinas, no es necesario utilizar ratones inmuno deficientes, lo que permite contemplar el rol del sistema inmunológico en el análisis. En primer lugar, mediante transducción con partículas retrovirales, se generaron células 4T1 con expresión estable de ICMT-GFP o GFP como control y la expresión de las proteínas fue confirmada por *Western Blot* (Figura 40).

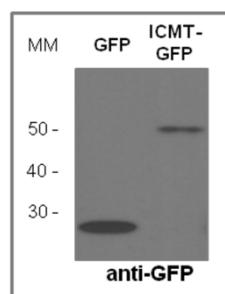


Figura 40: Análisis por *Western Blot* de células 4T1 que expresan establemente GFP o ICMT-GFP usando anticuerpo anti-GFP.

Las células generadas fueron inyectadas en la grasa mamaria de ratones hembra BALB/c, utilizando 10 ratones por grupo. Mediante el monitoreo periódico se siguió el desarrollo de masas palpables durante un período de 41 días, luego del cual los animales se sacrificaron y se realizó la autopsia. Observamos que los tumores provenientes de células ICMT-GFP presentaron una tasa de crecimiento mayor (Figura 41 a y b). Se analizó también la presencia de metástasis macroscópicas en los pulmones utilizando una contracoloración con tinta china. Encontramos que la sobreexpresión de ICMT resultó en un incremento significativo en el número de metástasis en pulmón (Figura 41 c). Asimismo, se detectaron 3 metástasis en bazo y una en hígado en el grupo de ICMT, pero no se detectó metástasis macroscópica en el grupo control en dichos órganos.

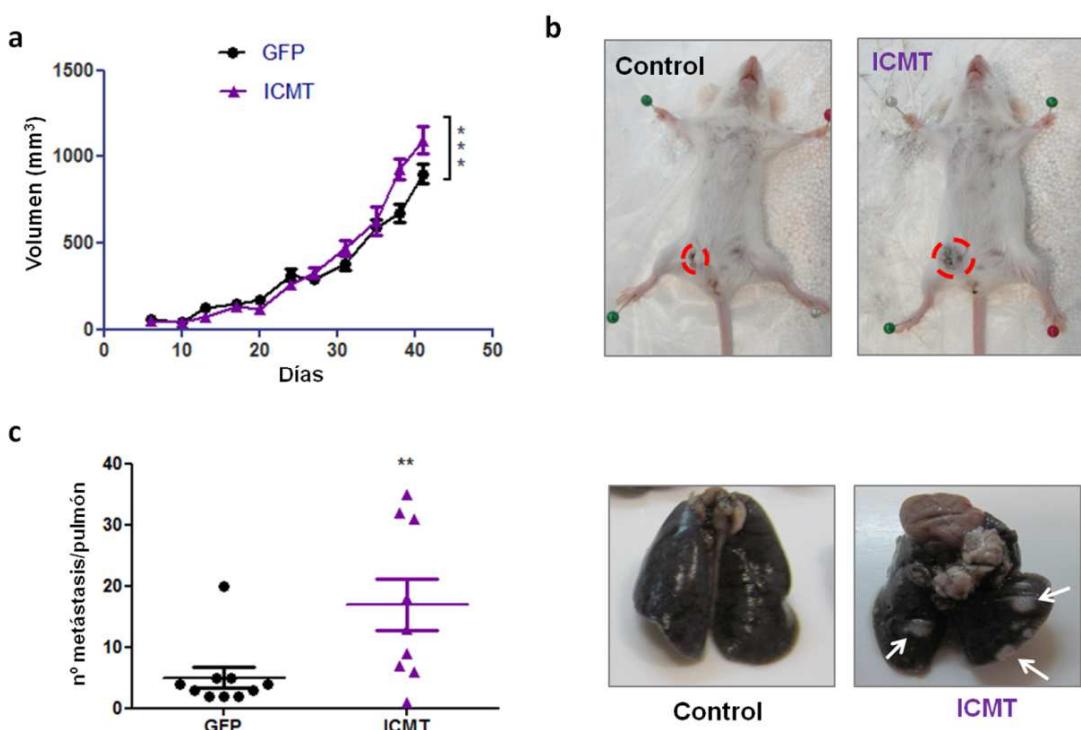


Figura 41: Ensayo de formación de tumores *in vivo* por transplante ortotópico. Células 4T1 expresando ICMT-GFP o GFP como control se inyectaron en la grasa mamaria de ratones BALB/c hembra y se monitoreó el desarrollo tumoral. **a)** Evolución del tamaño de las masas palpables detectadas en cada grupo (Comparison of Fits, ecuación de crecimiento exponencial, $p < 0,0001$). **b)** Imágenes representativas de los tumores desarrollados. **c)** Número de metástasis por pulmón (Panel izquierdo One tailed T-test, $p = 0,0076$). Imágenes representativas de los pulmones teñidos con tinta china. Las flechas indican la presencia de metástasis macroscópicas (Panel derecho).

En resumen, los resultados obtenidos en ambos modelos demuestran que la sobreexpresión de ICMT favorece el desarrollo tumoral y el proceso de metástasis *in vivo*.

5.3. Mecanismos activados por la sobreexpresión de ICMT

A continuación, nos preguntamos cuáles podrían ser los mecanismos moleculares activados por la sobreexpresión de ICMT. En principio, nos concentraremos en su efecto sobre sustratos relevantes en procesos oncogénicos, tales como RAS y las RHO GTPasas. Las evidencias de modelos de tumorigénesis inducida por RAS han demostrado que la fosforilación de ERK se redujo tras la inactivación genética de *ICMT*¹⁴⁸. Por lo tanto, para comprender si ICMT puede afectar la fosforilación de ERK en células H1299, se realizaron estudios de *Western Blot* con un anticuerpo que reconoce específicamente a ERK fosforilada en los residuos Thr202/Tyr204 (p-ERK). Encontramos que p-ERK es fácilmente detectable, lo cual podría explicarse por la presencia de una forma mutante constitutivamente activa de N-RAS en esta línea celular. Ni el silenciamiento de *ICMT* (silICMT), ni el tratamiento con Cysmethynil afectaron la fosforilación de ERK. Por el contrario, los niveles de p-ERK se redujeron claramente luego del tratamiento con el inhibidor de la quinasa MEK1/2, U0126, demostrando la especificidad de la señal (Figura 42 a y b). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la inhibición de ICMT no afecta la fosforilación de ERK en células H1299 y sugieren fuertemente que los efectos pro-oncogénicos de ICMT en dichas células no involucran la activación de ERK por parte de RAS. Por otro lado, estudiamos la presencia de cambios en la estructura del citoesqueleto, en vista de la relevancia de las RHO GTPasas como reguladores de la polimerización de actina. Las células H1299 se transfecaron con pLPC-ICMTGFP o pLPC-GFP, se colocaron en placas sobre vidrio cubierto con matrigel y se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa 594. La distribución de actina se analizó mediante microscopía de fluorescencia en células positivas para GFP. Encontramos que luego de la transfección de ICMT-GFP, una gran proporción de células mostró una morfología redondeada con acumulación de actina cerca de la membrana plasmática. Por el contrario, la proporción de células con dicha morfología en el control fue significativamente menor (Figura 42 c). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de ICMT alteró la estructura del citoesqueleto de actina en células

H1299. Teniendo en cuenta el papel clave que desempeñan las RHO GTPasas como reguladores de la polimerización de actina, es probable que su actividad se vea afectada por los cambios en los niveles de ICMT.

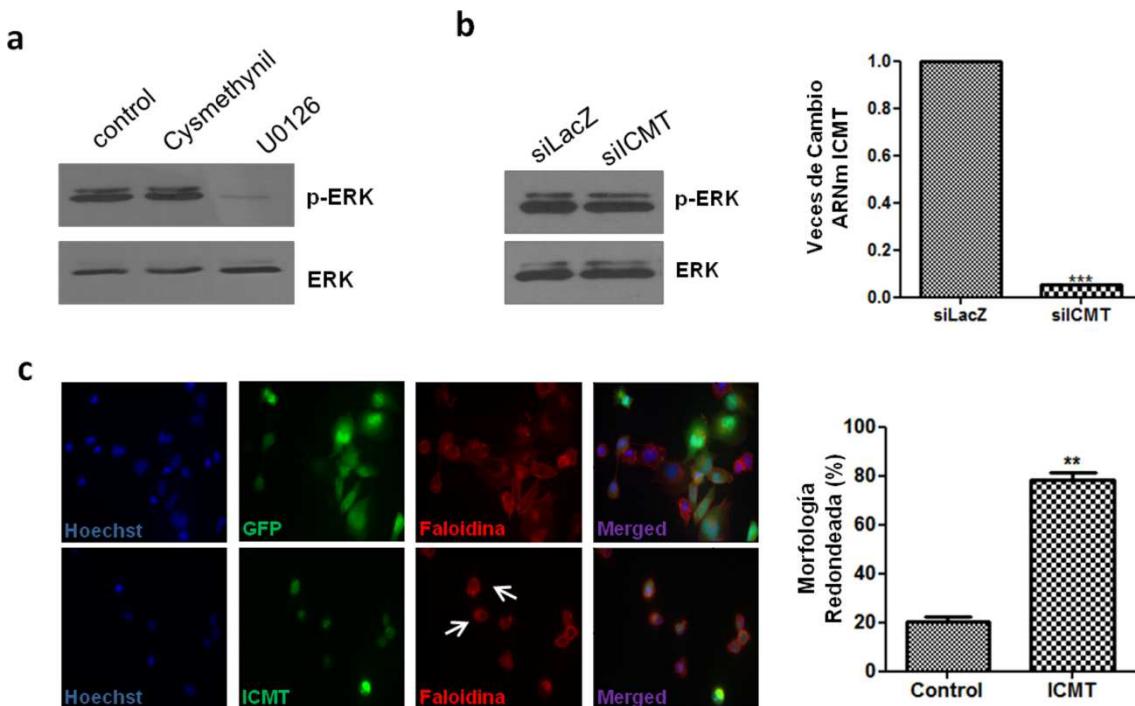


Figura 42: a) Análisis por *Western Blot* con anti p-ERK en células H1299 luego del tratamiento con 30 μ M de Cysmethynil o inhibidor de MEK1/2 U0126. b) Análisis por *Western Blot* con anti p-ERK en células H1299 luego de la transfección de ARNi contra *ICMT* (siICMT) o control (siLacZ) (Panel izquierdo). Chequeo del silenciamiento de *ICMT* por qPCR (Panel derecho). c) Visualización de la polimerización de actina. Las células H1299 fueron transfectadas con pLPC-GFP (Panel superior izquierdo) o pLPC-ICMTGFP (Panel inferior izquierdo), se colocaron en placas sobre cubreobjetos recubiertos con matrigel y se tiñeron con faloidina. Se muestran imágenes representativas. Las flechas señalan células redondeadas. Panel derecho: se cuantificó el número de células redondeadas (n=3, *Two tailed T-test*, p = 0,0052).

Resultados Capítulo III:
Relevancia clínica de la sobreexpresión de ICMT

RESULTADOS CAPÍTULO III: Relevancia clínica de la sobreexpresión de ICMT

En conjunto, nuestros resultados provenientes de experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que en condiciones fisiológicas la expresión de *ICMT* se encuentra regulada en forma precisa por parte de proteínas con funciones de supresión tumoral, como p53 wt, TAp63 y TAp73. Por el contrario, la adquisición de mutaciones en *TP53* podría cooperar con la progresión tumoral promoviendo la sobreexpresión de *ICMT*. Con el fin de evaluar la relevancia clínica de estos resultados, decidimos estudiar la relación entre *ICMT* y la vía de p53 en pacientes de cáncer de mama y pulmón.

6.1. Relación entre la expresión de *ICMT* y el estado de p53 en cáncer de mama y pulmón

En primer lugar, nos preguntamos si el estado de p53 podría afectar la expresión de *ICMT*. Se analizaron los datos de *microarrays*, de 25 bases de datos públicas independientes de cáncer de mama (compendio BC (*breast cancer compendium*): 3661 casos), en busca de correlaciones entre los niveles de ARNm de *ICMT* y el estado de p53. Dado que este compendio no contiene datos sobre mutaciones en *TP53*, se utilizó la firma molecular de p53 como criterio para discriminar entre casos wt y mutantes. Dicha firma molecular se determinó analizando el perfil de expresión de tumores humanos con estado de p53 conocido¹⁹⁵. La firma molecular asociada a p53 wt presenta una alta correlación con la presencia de alelos wt. Por el contrario, la firma molecular asociada a p53 mutante se correlaciona con la presencia de mutaciones en *TP53* (*missense*, *nonsense* y *deleciones*). El análisis demostró que los casos con un valor alto para la firma p53 mutante mostraron niveles de ARNm de *ICMT* relativamente más altos, en comparación con los casos con valor bajo. A su vez, los casos con un valor alto para la expresión de la firma p53 wt mostraron niveles significativamente más bajos de ARNm de *ICMT* (Figura 43 a). Estos resultados sugieren fuertemente que la presencia de p53 wt en tumores se correlaciona con baja expresión de *ICMT*, de acuerdo con nuestros resultados que muestran un efecto represor de esta proteína sobre el promotor de *ICMT*. Teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos las mutaciones en *TP53* son del tipo

missense, nuestros resultados sugieren también que la presencia de mutantes puntuales de p53 favorece la sobreexpresión de *ICMT* en tumores. La presencia de niveles proteicos elevados de p53 en tumores está fuertemente correlacionada con la adquisición de mutaciones en *TP53*¹⁹⁵. Por lo tanto, con el objeto de corroborar nuestras observaciones se analizaron los niveles de ARNm de *ICMT* en los casos en cuales los datos de expresión de p53, evaluados por inmunohistoquímica (IHQ), estaban disponibles (596 casos). En apoyo a nuestros resultados, encontramos que los niveles de ARNm de *ICMT* estaban significativamente incrementados en los casos con altos niveles proteicos de p53 (Figura 43 b).

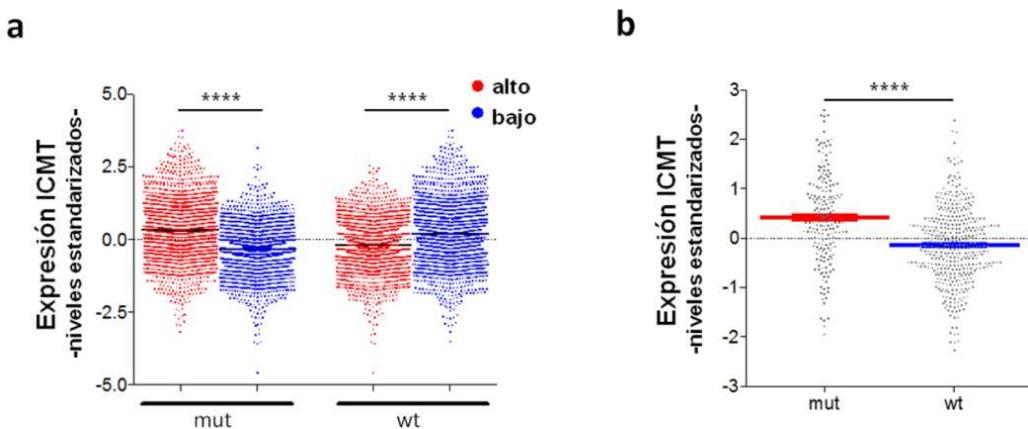


Figura 43: Niveles de expresión estandarizados de *ICMT* en muestras del compendio BC de cáncer de mama (n = 3661) clasificadas de acuerdo con a) la firma molecular p53 (ver texto), mut: clasificación según la firma p53 mutante, wt: clasificación según la firma p53 wt y b) niveles de p53 determinados por IHQ, mut: casos con altos niveles de p53, wt: casos con bajos niveles de p53 (Two-tailed unpaired T-test, ****: p <0,0001).

A continuación, ampliamos nuestro análisis para determinar si se pueden observar correlaciones similares en cáncer de pulmón. Con este fin, clasificamos los casos del conjunto de adenocarcinoma de pulmón TCGA-LUAD (516 casos) de acuerdo con la expresión de la firma p53, como se explicó para el compendio BC. Observamos la presencia de niveles de ARNm de *ICMT* significativamente mayores en casos con un valor alto para la firma p53 mutante, en comparación con los casos con valor bajo. En forma similar, el promedio estandarizado de la expresión de *ICMT* se redujo en más de dos veces en los casos con un valor alto para la firma de p53 wt, comparados con los casos con valor bajo (Figura 44 a). Para confirmar esta correlación, se analizaron los niveles de ARNm en los casos con mutaciones en

TP53, evaluados por secuenciación completa del exoma (*Whole Exome Sequencing*, WES), ya que los datos de IHQ de p53 no están disponibles en este conjunto de datos. En apoyo a nuestra hipótesis, encontramos que los niveles de ARNm de *ICMT* eran significativamente más altos en los casos que contenían mutaciones en *TP53*, en comparación con los casos con p53 wt (Figura 44 b).

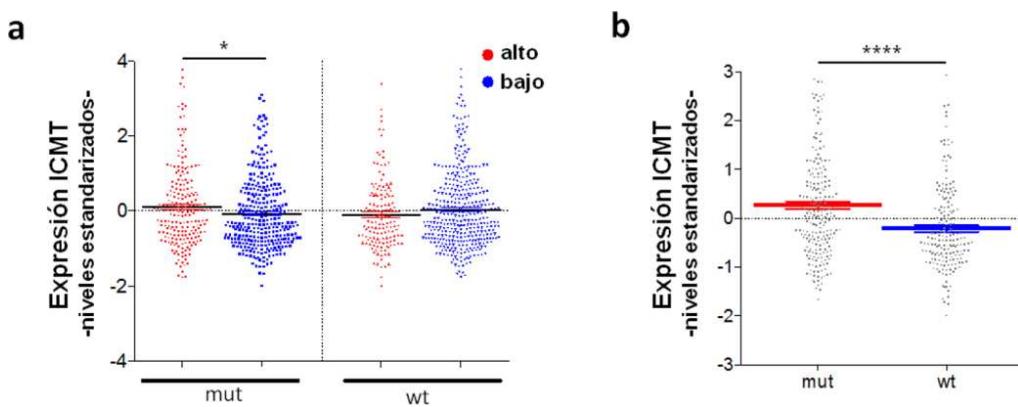


Figura 44: Niveles de expresión estandarizados de *ICMT* en muestras de adenocarcinoma de pulmón del conjunto de datos TCGA-LUAD (n = 516) clasificadas de acuerdo con **a**) la firma molecular p53 (ver texto), mut: clasificación según la firma p53 mutante, wt: clasificación según la firma p53 wt y **b**) estado de p53 determinado a partir de WES (*Two-tailed unpaired T-test*, ****: p <0,0001 y *: p <0,05).

6.2. Análisis de la correlación entre la evolución clínica de pacientes con cáncer de mama o pulmón y los niveles de p53 e ICMT

Finalmente, nos preguntamos si la expresión de *ICMT* podría correlacionarse con la evolución clínica en el cáncer. Encontramos que los casos con altos niveles de ARNm de *ICMT* en el compendio BC mostraron una disminución significativa en la supervivencia libre de metástasis (Figura 45 a), lo que sugiere que la sobreexpresión de ICMT coopera con el desarrollo de tumores agresivos. Cuando estratificamos los casos considerando también los niveles de p53 determinados por IHQ, encontramos que los casos con bajos niveles de p53 (es decir, correlacionados con el estado p53wt) y bajos niveles de ARNm de *ICMT* mostraron un aumento significativo de la supervivencia libre de metástasis en comparación con los otros grupos (Figura 45 b). Estos resultados sugieren que el efecto promotor de metástasis de ICMT es particularmente evidente en tumores que retienen p53 wt.

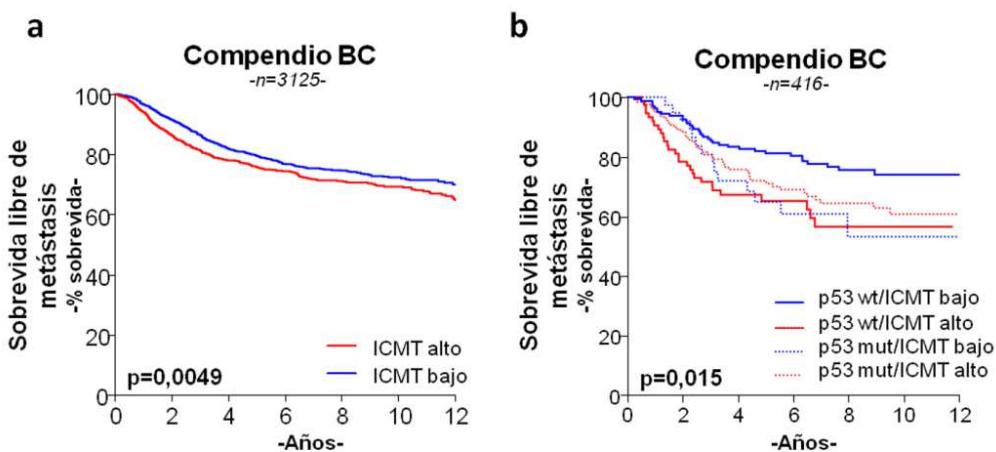


Figura 45: a) Sobrevida libre de metástasis de pacientes del compendio BC de cáncer de mama ($n = 3661$) clasificados de acuerdo con el nivel de expresión de *ICMT*. b) Sobrevida libre de metástasis en grupos de pacientes estratificados según el nivel de expresión de *ICMT* y los niveles de p53 determinados por IHQ, p53 mut: casos con altos niveles de p53, p53 wt: casos con bajos niveles de p53 (Test Log-rank (Mantel-Cox)).

Del mismo modo, encontramos una correlación significativa entre altos niveles de expresión de *ICMT* y una disminución de la supervivencia en el conjunto de datos de pacientes con cáncer de pulmón (Figura 46 a). Una tendencia similar a la observada en el compendio de BC se encontró cuando estratificamos los casos considerando niveles de expresión p53 (Figura 46 b).

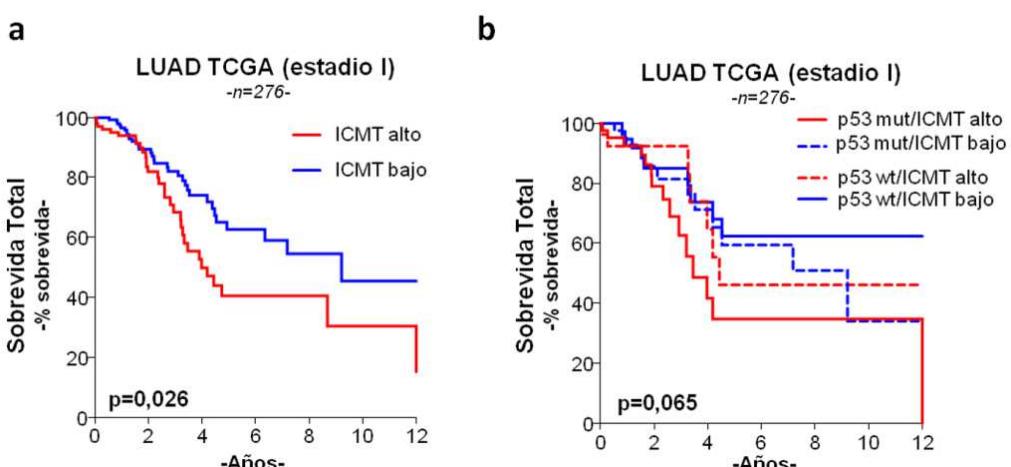


Figura 46: a) Sobrevida de pacientes de cáncer de pulmón en estadio I del compendio TCGA-LUAD ($n = 276$) clasificados de acuerdo con el nivel de expresión de *ICMT*. b) Sobrevida libre de metástasis en grupos de pacientes del mismo compendio estratificados según el nivel de expresión de *ICMT* y el estado de p53 determinado según la firma molecular p53 (Test Log-rank (Mantel-Cox)).

En conjunto, nuestros resultados apoyan la idea de que la sobreexpresión de *ICMT* está asociada a la alteración de la vía de p53, y que además, promueve la agresividad tumoral en cáncer de mama y pulmón.

Discusión y Conclusiones

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cáncer es una de las patologías más difundidas en la actualidad y una de las principales causas de muerte a nivel mundial, junto con las enfermedades cardiovasculares. Según el informe mundial de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) del año 2014, se contabilizaron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en el año 2012, y se estima un aumento de la incidencia en los próximos años. Nuestro país no es ajeno a esta problemática, ya que se ubica en el rango de países con incidencia media-alta de esta enfermedad de acuerdo con datos difundidos por el Instituto Nacional del Cáncer (<http://www.msal.gov.ar/inc/>). En particular, la incidencia de cáncer de mama es elevada en nuestro país, produciéndose 19.000 nuevos casos por año y siendo la primera causa de muerte por tumores en mujeres. Por su parte, el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes a nivel mundial y, en la Argentina, su incidencia es de 10.296 casos por año. Si bien la etiología del cáncer no ha sido aún comprendida en detalle, se cree que existen diversas combinaciones de alteraciones genéticas y epigenéticas capaces de contribuir al desarrollo de tumores, lo que la convierte en una de las enfermedades más complejas para prevenir, tratar y estudiar. A pesar de los importantes avances que han permitido mejorar en gran medida la calidad de vida de las personas que lo padecen, aún no se dispone en la práctica clínica de terapias eficaces. Uno de los grandes desafíos en la biología molecular del cáncer es identificar mecanismos oncogénicos conservados dentro de la gran heterogeneidad molecular que presentan los tumores humanos. En este escenario complejo, se destaca la relevancia de comprender los efectos de las alteraciones moleculares sobre las vías de señalización, las cuales gobiernan en gran medida el comportamiento celular, y de identificar las posibles interconexiones entre ellas.

La inactivación de la vía de p53 es una de las alteraciones más frecuentes en el cáncer. No solo la frecuencia de mutaciones en *TP53* es la más alta reportada en tumores humanos, sino que también, en muchos casos que retienen la forma wt, la vía se encuentra bloqueada debido a la alteración de otros componentes. Dentro del complejo espectro de alteraciones encontradas en este gen, se destaca la presencia de mutaciones *missense*, cuya presencia está íntimamente ligada al desarrollo de fenotipos agresivos y metastásicos^{7,188}.

En las últimas décadas, se demostró que el rol de la vía de p53 se extiende más allá de la respuesta al estrés genotóxico, y abarca otros aspectos de la fisiología celular; tales como, la comunicación intercelular, la regulación del metabolismo de glucosa, la capacidad de modular la autofagia, alterar el metabolismo y reprimir la pluripotencialidad y la plasticidad celular ²⁹. Incluso, los niveles basales de p53 pueden reforzar otras múltiples redes supresoras de tumores ³¹. Considerando el rol central de la alteración de la vía de p53 en el cáncer, parece lógico suponer que el estudio de sus consecuencias sobre funciones no canónicas de p53 wt puede ayudar a descubrir nuevos mecanismos oncogénicos. En la presente tesis, hemos contribuido a caracterizar un aspecto desconocido de la vía de p53, revelando su conexión con el procesamiento de proteínas preniladas. La prenilación de proteínas y el procesamiento posterior están emergiendo como modificaciones post-traduccionales críticas que afectan diferentes aspectos de la fisiología celular y particularmente, podrían cooperar con el cáncer ¹⁴². A pesar de que los mecanismos subyacentes no se comprenden completamente, la inhibición de las diferentes etapas de esta vía se propuso como una estrategia terapéutica en el cáncer ¹⁴². En particular, algunos modelos experimentales han proporcionado resultados alentadores en relación a la inactivación o inhibición de ICMT ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. De todos modos, es necesario un conocimiento profundo del rol de dicha enzima en el cáncer con el fin de explotar su potencial terapéutico.

En este trabajo, demostramos que la expresión de *ICMT* se encuentra regulada por varios miembros de la familia de p53, incluyendo mutantes puntuales de p53 asociadas al cáncer, lo cual sugiere una interrelación compleja, con distintas consecuencias sobre la fisiología celular. A pesar del creciente interés en la función biológica de ICMT, los mecanismos que regulan su expresión no habían sido estudiados hasta el momento. Nuestros resultados demuestran por primera vez que p53 wt reprime la actividad del promotor de *ICMT* y regula negativamente los niveles de ARNm y proteína. Los efectos ejercidos en la regulación de la expresión génica por parte de p53 wt son complejos y pueden estar influenciados por el contexto celular y la naturaleza de las señales de activación ³⁰. A partir de ensayos de luciferasa identificamos, en el promotor de *ICMT*, una región entre las posiciones -209 y -14 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción, como responsable del efecto represivo observado. Además, encontramos que p53 wt es reclutada en el promotor de *ICMT* en una región que abarca este fragmento, sugiriendo fuertemente

que el mecanismo de represión implica la acción de p53 wt como parte de un complejo regulador en la cromatina. El análisis *in silico* de la región identificada no indicó la presencia de ninguna secuencia compatible con el consenso para p53RE; incluso, considerando un consenso modificado propuesto para explicar las diferencias encontradas en los promotores de genes diana reprimidos⁶⁵. Por lo tanto, especulamos que el reclutamiento puede implicar la interacción con otras proteínas presentes en el promotor, aunque no podemos excluir la unión a un sitio divergente.

Por otro lado, demostramos que todas las isoformas TA de p63 y TAp73 α reprimen el promotor de *ICMT*, lo que sugiere una superposición funcional parcial con p53 wt. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos sobre otros genes diana de p53, los cuales se mostraron regulados de manera similar por p53 wt, y las isoformas TA de p63 y p73¹⁰⁸. Esta redundancia funcional aparente entre proteínas que colaboran con la supresión tumoral abona la hipótesis de que la regulación estricta de los niveles de *ICMT* es necesaria para mantener la fisiología celular. Sin embargo, cada una de estas proteínas ejerce distintas funciones biológicas, como lo demuestran los fenotipos completamente diferentes observados en ratones *knockout*, incluyendo la letalidad embrionaria o perinatal en el caso de p63^{77,78} y el retraso en el crecimiento, la alta tasa de mortalidad en los primeros dos meses, los defectos neurológicos y los problemas inmunológicos en el caso de p73⁷⁹. En este contexto, nuestros resultados sugieren que la regulación de la expresión de *ICMT* también podría ser relevante para las funciones específicas de TAp63 y TAp73. Por el contrario, las isoformas ΔN de p63 no tuvieron efecto sobre la actividad del promotor, lo que demuestra que el dominio TA es necesario para la función represiva. Sumado a esto, nuestros resultados de co-transfección sugieren que las isoformas ΔN de p63 pueden cooperar para potenciar la expresión de *ICMT* al contrarrestar el efecto represivo de las isoformas TA de p63. Teniendo en cuenta que se propuso un papel pro-tumoral para las isoformas $\Delta N p63$ ^{196,197}, los efectos divergentes encontrados en el promotor de *ICMT* para las isoformas TAp63 y $\Delta N p63$ respaldan la idea de que el aumento de los niveles de *ICMT* cooperaría con mecanismos pro-oncogénicos.

En oposición a los efectos ejercidos por p53 wt y las isoformas TA de p63 o p73, encontramos un efecto positivo de p53 mutante sobre la actividad del promotor, así como sobre los niveles de ARNm y de proteína de ICMT. Estos resultados sugieren

que la sobreexpresión de *ICMT* puede estar relacionada con la función oncogénica de p53 mutante. Nuestros hallazgos también indican que este efecto está asociado a un mecanismo de ganancia de función, ya que la activación del reportero y el aumento en los niveles de ARNm y proteína en células H1299 son completamente independientes de la presencia de p53 wt. Además, observamos que diferentes mutantes puntuales indujeron la expresión de *ICMT*, lo cual sugiere que este mecanismo no se encuentra restringido a tumores con presencia de una única mutante. Demostramos también que el efecto de p53R280K depende de la región -2234 -1130 pb, y que la proteína mutante es reclutada en dicha región. Por el contrario, su efecto es completamente independiente de la región -209 -14 pb. En consecuencia, nuestros resultados indican que p53 wt y p53 mutante regulan la expresión de *ICMT* a través de diferentes mecanismos. La regulación diferencial ejercida por la forma wt y las mutantes nos lleva a preguntarnos cuáles son las diferencias estructurales que justifican actividades opuestas sobre la expresión de *ICMT*. De acuerdo con nuestras observaciones, la capacidad de inducir la expresión de *ICMT* está presente en diferentes tipos de mutantes puntuales, incluyendo mutantes de contacto (R273H, R248W) y conformacionales locales (R249S, R280K) o globales (R175H). Por otra parte, nuestros resultados demostraron que diferentes mutantes artificiales, en las cuales la función transcripcional de p53 fue severamente comprometida (p53 L22Q/W23S Δ Pro(aa 64-93) y p53 L22Q/W23S Δ C(aa 355-393)), no tuvieron efecto sobre la inducción del promotor de *ICMT*. Por lo tanto, se pone de manifiesto que mientras la inactivación de la función de p53 anula la represión de *ICMT*, las mutaciones puntuales asociadas al cáncer provocan un cambio que transforma el efecto represivo en activación.

Por otra parte, la co-expresión de p53R280K con p53 wt o TAp63 α eliminó el efecto represivo de ambos factores de transcripción en ensayos de luciferasa, mostrando un efecto de dominancia negativa sobre los mismos. Estas observaciones, sumadas a los resultados que demuestran la dominancia negativa de Δ Np63 sobre TAp63 sugieren que la expresión de *ICMT* podría verse afectada por la interacción funcional entre miembros de la familia de p53. A su vez, nuestros resultados implican que las mutaciones *missense* en *TP53* pueden cooperar para aumentar la expresión de *ICMT* por mecanismos complementarios. Por un lado, la función represiva de p53 wt se pierde debido a la mutación de un alelo y al efecto de dominancia negativa ejercido por la proteína mutante sobre la forma wt, generada a partir del alelo

restante. Por otro lado, la proteína mutante puede activar mecanismos de inducción independientes de p53, los cuales podrían involucrar la inhibición de las isoformas TA de p63 o p73, así como la interacción con otros factores desconocidos. Nuestros hallazgos sugieren que la expresión de *ICMT* debe regularse estrictamente en condiciones fisiológicas, y que las alteraciones adquiridas durante la tumorigénesis, que conduzcan a la inactivación funcional de p53 wt, TAp63 o TAp73, inducirían la expresión del dicho gen. En este contexto, se esperaría que tal aumento en los niveles de ICMT cooperara con la progresión tumoral. En apoyo a esta idea, demostramos por primera vez que la sobreexpresión de ICMT exacerbó diversos fenotipos tumorales *in vitro*. El aumento en el potencial clonogénico asociado a altos niveles de ICMT podría reflejarse en una mayor proliferación y/o supervivencia en condiciones hostiles, tanto en la sede primaria del tumor, como en la circulación sanguínea o en sedes de colonización. Por otra parte, el aumento en la migración sugiere una mayor capacidad invasiva. En línea con estos experimentos, la inhibición farmacológica de ICMT con Cysmethynil disminuyó el potencial clonogénico y migratorio de las células tumorales *in vitro*. Los efectos observados para este inhibidor confirman su potencial utilidad como compuesto anticancerígeno^{165,166}. En un sentido más amplio, el desarrollo de características invasivas requiere en general la activación de un programa del tipo TEM¹⁹⁸. Nuestros estudios en cultivos 3D de células MDCK demostraron que el aumento en los niveles de ICMT también colaboró en este sentido, ya que redujo las características epiteliales, alterando la polarización celular y la arquitectura de los esferoides en cultivos 3D. En conjunto, los resultados de los estudios *in vitro* nos sugieren que el aumento en los niveles de ICMT podría contribuir con la progresión tumoral de diversas formas y durante las distintas etapas del desarrollo tumoral.

Los resultados de los modelos *in vivo* utilizados, confirmaron que el aumento en los niveles de ICMT colabora con la patología en células H1299 derivadas de carcinoma de pulmón no microcítico humano y 4T1 derivadas de adenocarcinoma de mama Triple Negativo murino. En ambos modelos fue posible observar un aumento en el potencial tumorigénico. En el caso de células H1299 este potencial de expresó como un mayor número de ratones con tumores y un mayor volumen tumoral. Sin embargo, estas células no desarrollan metástasis cuando son inyectadas en forma subcutánea. El modelo de células 4T1 presenta la ventaja de permitir estudiar el proceso completo de metástasis en ratones inmunocompetentes. Estas células,

generan tumores primarios con una eficiencia cercana al 100 % en ratones BALB/c. Sin embargo, a pesar de este mayor potencial tumorigénico basal, la sobreexpresión de *ICMT* produjo un aumento significativo en el volumen tumoral y en la frecuencia de metástasis.

La multiplicidad de potenciales sustratos de *ICMT* plantea un interrogante en relación a los mecanismos moleculares activados por la sobreexpresión de *ICMT*. Esta es una pregunta relevante ya que no se conoce de qué modo se articula la función de proteínas preniladas. En tal sentido, hemos realizado una aproximación a dicha problemática indagando la participación de algunos sustratos relevantes en el cáncer, tales como RAS y RHO GTPasas. Nuestros resultados sugieren que los efectos promovidos por *ICMT* en células H1299 no involucran la activación del eje RAS/MAPK, ya que ni el silenciamiento ni la inhibición de *ICMT* afectó a la fosforilación de ERK. Por el contrario, pudimos demostrar que el citoesqueleto de actina se ve afectado por la sobreexpresión de *ICMT*. Teniendo en cuenta el papel clave que desempeñan las RHO GTPasas como reguladores de la polimerización de actina, es probable que su actividad se vea afectada por cambios en los niveles de *ICMT*. Dada la complejidad funcional y el número de proteínas que pertenecen a la familia de las RHO GTPasas, cabe señalar que sería relevante identificar cuáles de ellas son modificadas por *ICMT* en las células tumorales.

El análisis de bases de datos públicas puso en evidencia la relevancia clínica de nuestros hallazgos. En primer lugar, nuestros resultados indican que p53 wt y mutante ejercen efectos opuestos sobre *ICMT* en cáncer de mama. Los tumores clasificados como p53 wt, se correlacionan con niveles más bajos de ARNm de *ICMT*. A la inversa, los tumores compatibles con la presencia de mutaciones en p53 mostraron niveles de ARNm de *ICMT* significativamente mayores. Además, el efecto positivo de las mutantes de p53 en la expresión de *ICMT* es respaldado por una aproximación diferente, basada en los niveles de expresión de p53, determinados por inmunohistoquímica en muestras tumorales. También se observó una correlación similar entre los niveles de ARNm de *ICMT* y el estado de p53 en el conjunto de datos de cáncer de pulmón, lo que sugiere que el efecto de la vía de p53 sobre la expresión de *ICMT* no está restringida a un tipo de tumor específico.

En segundo lugar, la sobreexpresión de *ICMT* mostró una correlación significativa con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama y de pulmón. Un análisis más detallado del compendio BC, estratificando los casos en base a los niveles de

expresión de p53, indicó que los casos con bajos niveles de p53 y menor expresión de *ICMT* mostraron un aumento significativo de la sobrevida libre de metástasis en comparación con todos los demás grupos. De acuerdo con los criterios utilizados en esta clasificación, se espera que el grupo con baja expresión de p53 este compuesto mayoritariamente por casos con p53 wt. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de *ICMT* en tumores que no expresan formas mutantes de p53 tendría un efecto más marcado sobre el desarrollo de metástasis, en comparación con los casos que expresan mutantes de p53. Sobre esta base, es posible formular la hipótesis de que prevenir la sobreexpresión de *ICMT* o inhibir su función en el grupo de baja expresión de p53 (es decir, p53 wt o nulo) aumentaría la sobrevida. Además, estos resultados también sugieren que las terapias basadas en la inhibición de *ICMT* pueden ser particularmente eficaces en pacientes con p53wt, los cuales representan más del 70% de los casos de cáncer de mama. Evidencias previas han demostrado que el aumento de la geranilgeranilación de proteínas coopera con la agresividad tumoral en cáncer de mama y que los mutantes puntuales de p53 promueven este efecto induciendo la expresión de SREBP y alterando la vía del mevalonato^{110,199}. La sobreexpresión de *ICMT* puede recapitular algunos de los efectos de la alteración de la vía del mevalonato al afectar la función de las proteínas geranilgeraniladas. En este contexto, los tumores con p53 mutante pueden ser menos dependientes de la sobreexpresión de *ICMT*, debido a que ya han desarrollado un mecanismo para alterar la función de las proteínas modificadas por geranilgeranilación. Una superposición parcial de efectos de este tipo podría explicar por qué la sobreexpresión de *ICMT* generó un efecto más marcado en el grupo con baja expresión de p53 del compendio de BC (enriquecido en casos con p53 wt). Por otra parte, es posible que la presencia de mutantes puntuales de p53 active otros mecanismos de agresividad tumoral que estarían ausentes en los casos con p53 wt o nulo. Por lo tanto, dichos mecanismos dependientes de p53 mutante proporcionarían capacidades adicionales para fomentar la progresión tumoral en casos con niveles bajos de *ICMT*. Esto explicaría por qué la expresión de *ICMT* no mostró una diferencia significativa en la sobrevida en el grupo enriquecido en casos de p53 mutante.

En resumen, nuestros resultados revelan una conexión entre la familia de p53 y la red de proteínas preniladas. Proponemos que la expresión de *ICMT* está regulada por la interacción entre los miembros de la familia de p53. La alteración de este

equilibrio durante la progresión tumoral tendría un impacto en los niveles de *ICMT*, lo que a su vez modificaría la acción de las proteínas preniladas, fomentando de esta forma la acción de mecanismos de agresividad. Además, nuestras evidencias también contribuyen a comprender la relevancia clínica de la sobreexpresión de *ICMT* en el cáncer de mama y de pulmón, y sugieren que las estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de *ICMT* pueden ser particularmente útiles en los casos con p53 wt.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, (2000).
2. Alberto Mantovani. Inflaming metastasis. *Nature* **457**, (2009).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. Hainaut, P. & Pfeifer, G. P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026179 (2016).
5. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339 (2013).
6. Brosh, R. & Rotter, V. When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 701–713 (2009).
7. Muller, P. A. & Vousden, K. H. p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* **15**, 2–8 (2013).
8. Lane D P & Crawford L V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263 (1979).
9. Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization Tumor Antigen and Uninfected of a 54K Dalton Cellular SV40 Present in SV40-Transformed Cells. *Cell* **17**, 43–52 (1979).
10. Finlay, C. A., Hinds, P. W. & Levine, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083–1093 (1989).
11. Levine, A. J. & Oren, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 749–758 (2009).
12. Donehower, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992).
13. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001008–a001008 (2010).
14. Malkin, D. *et al.* Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and Other Neoplasms. *Science* (80-). **250**, 1233–1238 (1990).
15. Ygal Haupt, Ruth Maya, A. K. and M. O. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, (1997).
16. Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25–27 (1997).
17. Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299–303 (1997).
18. Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325–334 (1997).
19. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, D. R. The Ink4a Tumor Suppressor Gene

- Product, p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. *Cell* **92**, 713–723 (1998).
20. Kastan, M. B. P53: A Determinant of the Cell Cycle Response to DNA Damage. *Nov. Approaches to Sel. Treat. Hum. Solid Tumors* 291–296 (1993).
21. Wafik S. El-Deiry, Takashi Tokino, V. E. V. & Levy, Daniel B. Ramon Parsons, Jeffrey M. Trent, t David Lin, W. Edward Mercer, Kenneth W. Kinzler, and B. V. WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. *Cell* **75**, 817–825 (1993).
22. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816 (1993).
23. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).
24. Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M. & Wright, W. E. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* **196**, 33–9 (1991).
25. Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A. & Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**, 847–849 (1993).
26. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, O. M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, (1991).
27. Toshiyuki Miyashita and John C. Reed. Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
28. Schuler, M. & Green, D. R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 684–688 (2001).
29. Aylon, Y. & Oren, M. The Paradox of p53: What, How, and Why? *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026328 (2016).
30. Kastenhuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062–1078 (2017).
31. Pappas, K. *et al.* p53 Maintains Baseline Expression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Mol. Cancer Res.* **15**, 1051–1062 (2017).
32. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. X-rays strike p53 again. *Nature* **370**, (1994).
33. Rajagopalan, S., Andreeva, A., Rutherford, T. J. & Fersht, A. R. Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 8587–8592 (2010).
34. Unger, T., Mietz, J. A., Scheffner, M., Yee, C. L. & Howley, P. M. Functional Domains of Wild-Type and Mutant p53 Proteins Involved in Transcriptional Regulation , Transdominant Inhibition , and Transformation Suppression. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5186–5194 (1993).
35. Candau, R. *et al.* Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* **15**, 807–816 (1997).

36. Chang, J., Kim, D., Lee, S. W., Choi, K. Y. & Sung, Y. C. Transactivation Ability of p53 Transcriptional Activation Domain Is Directly Related to the Binding Affinity to TATA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 25014–25019 (1995).
37. Jawhari, A. *et al.* Domain Architecture of the p62 Subunit from the Human Transcription / Repair Factor TFIIH Deduced by Limited Proteolysis and Mass Spectrometry Analysis. *Biochemistry* **43**, 14420–14430 (2004).
38. Avantaggiati, M. L. *et al.* Recruitment of p300 / CBP in p53-Dependent Signal Pathways. *Cell* **89**, 1175–1184 (1997).
39. Scolnick, D. M. *et al.* CREB-binding Protein and p300/CBP-associated Factor Are Transcriptional Coactivators of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Cancer Res.* **57**, 3693–3696 (1997).
40. Walker KK, L. A. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15335–15340 (1996).
41. Shieh, S., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site , Ser20 , requires tetramerization. *EMBO J.* **18**, 1815–1823 (1999).
42. Stommel, J. M. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18**, 1660–1672 (1999).
43. Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze 'ev, A. & Rotterl, V. Nuclear Accumulation of p53 Protein Is Mediated by Several Nuclear Localization Signals and Plays a Role in Tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6565–6577 (1990).
44. Krummel, K. A. *et al.* The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. *PNAS* **102**, 10188–10193 (2005).
45. Chuikov, S. *et al.* Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* **432**, 353–360 (2004).
46. Laptenko, O. *et al.* The p53 C Terminus Controls Site-Specific DNA Binding and Promotes Structural Changes within the Central DNA Binding Domain. *Mol. Cell* **57**, 1034–1046 (2015).
47. Bourdon, J. C. P53 and Its Isoforms in Cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 277–282 (2007).
48. Ghosh, A., Stewart, D. & Matlashewski, G. Regulation of Human p53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7987–7997 (2004).
49. Rohaly, G. *et al.* A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* **122**, 21–32 (2005).
50. Khoury, M. P. & Bourdon, J. p53 Isoforms : An Intracellular Microprocessor ? *Genes Cancer* 453–465 (2011).
51. Khoury, M. P. & Bourdon, J. The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–10 (2010).
52. Fuster, J. J., Sanz-González, S. M., Moll, U. M. & Andrés, V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol. Med.* **13**, 192–199 (2007).

53. El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45–49 (1992).
54. Raj, N. & Attardi, L. D. The transactivation domains of the p53 protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, (2017).
55. Kawai, H., Nie, L., Wiederschain, D. & Yuan, Z. M. Dual Role of p300 in the Regulation of p53 Stability. *J. Biol. Chem.* **276**, 45928–45932 (2001).
56. Ito, A. *et al.* p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* **20**, 1331–1340 (2001).
57. Grossman, S. R. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2773–2778 (2001).
58. Gamper, A. M. & Roeder, R. G. Multivalent Binding of p53 to the STAGA Complex Mediates Coactivator Recruitment after UV Damage. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2517–2527 (2008).
59. Jansson, M. *et al.* Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1431–1439 (2008).
60. Di Lello, P. *et al.* p53 and TFIIIE share a common binding site on the Tfb1/p62 subunit of TFIIH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 106–111 (2008).
61. Di Lello, P. *et al.* Structure of the Tfb1/p53 Complex: Insights into the Interaction between the p62/Tfb1 Subunit of TFIIH and the Activation Domain of p53. *Mol. Cell* **22**, 731–740 (2006).
62. Hermeking, H. *et al.* 14-3-3r Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Mol. Cell* **1**, 3–11 (1997).
63. Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T. & Oren, M. Regulation of mdm2 expression by p53: Alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* **8**, 1739–1749 (1994).
64. Ard, P. G. *et al.* Transcriptional Regulation of the mdm2 Oncogene by p53 Requires TRRAP Acetyltransferase Complexes. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5650–5661 (2002).
65. Wang, B., Xiao, Z., Ko, H. L. & Ren, E.-C. C. The p53 response element and transcriptional repression. *Cell Cycle* **9**, 870–879 (2010).
66. Ho, J. & Benchimol, S. Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ.* **10**, 404–408 (2003).
67. Böhlig, L. & Rother, K. One function - Multiple mechanisms: The manifold activities of p53 as a transcriptional repressor. *J. Biomed. Biotechnol.* (2011).
68. Wang, B., Xiao, Z. & Ren, E. C. Redefining the p53 response element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14373–14378 (2009).
69. Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 402–412 (2008).
70. He, L., He, X., Lowe, S. W. & Hannon, G. J. microRNAs join the p53 network - Another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 819–822 (2007).
71. Kaghad, M. *et al.* Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell* **90**, 809–819

- (1997).
72. Yang Annie, Mourad Kaghad, Wang Yunmei, Gillett Emily, Fleming Mark D., Volker Dotsch, Nancy C. Andrews, C. and D. M. F. p63,a p53Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol. Cell* **2**, 305–316 (1998).
73. Stiewe, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 165–167 (2007).
74. Yang, A. & McKeon, F. p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 199–207 (2000).
75. Fang, L., Lee, S. W. & Aaronson, S. A. Comparative Analysis of P73 and P53 Regulation and Effector Functions. *J. Cell Biol.* **147**, 823–830 (1999).
76. Guo, X. *et al.* TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1451–1457 (2009).
77. Mills, A. A. *et al.* p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708–713 (1999).
78. Annie Yang, Ronen Schweitzer, Deqin Sun, Mourad Kaghad, Nancy Walker, Roderick T. Bronson, Cliff Tabin, Arlene Sharpe, Daniel Caput, C. C. & F. M. P63 Is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development. *Nature* **398**, 3–7 (1999).
79. Yang, A. *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99–103 (2000).
80. Flores, E. R. *et al.* Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* **7**, 363–373 (2005).
81. McKeon, F. p63 and the epithelial stem cell : more than status quo ? *Genes Dev.* **18**, 465–469 (2004).
82. Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P. & Bourdon, J. C. p53/p63/p73 isoforms: An orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* **13**, 962–972 (2006).
83. Osada, M. *et al.* Differential Recognition of Response Elements Determines Target Gene Specificity for p53 and p63. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6077–6089 (2005).
84. Sasaki, Y. *et al.* Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* **24**, 5131–5136 (2005).
85. Adorno, M. *et al.* A Mutant-p53/Smad Complex Opposes p63 to Empower TGF β -Induced Metastasis. *Cell* **137**, 87–98 (2009).
86. Su, X. *et al.* TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* **467**, 986–990 (2010).
87. Bénard, J., Douc-Rasy, S. & Ahomadegbe, J. C. TP53 family members and human cancers. *Hum. Mutat.* **21**, 182–191 (2003).
88. Dohn, M., Zhang, S. & Chen, X. p63alpha and DNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* **20**, 3193–3205 (2001).

89. Wu, G. *et al.* deltaNp63alpha and TAp63alpha Regulate Transcription of Genes with Distinct Biological Functions in Cancer and Development. *Cancer Res.* **63**, 2351–2357 (2003).
90. Moll, U. M. & Slade, N. p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation. *Mol. Cancer Res.* **2**, 371–387 (2004).
91. Melino, G. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 663–670 (2003).
92. Stiewe, T., Zimmermann, S., Frilling, A., Esche, H. & Pu, B. M. Transactivation-deficient deltaTA-p73 Acts as an Oncogene. *Cancer Res.* **62**, 3598–3602 (2002).
93. Liu, G., Nozell, S., Xiao, H. & Chen, X. deltaNp73beta Is Active in Transactivation and Growth Suppression. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 487–501 (2004).
94. Bouaoun, L. *et al.* TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.* **37**, 865–876 (2016).
95. Milner, J. & Medcalf, E. A. Cotranslation of Activated Mutant p53 with Wild Type Drives the Wild-Type p53 Protein into the Mutant Conformation. *Cell* **65**, 765–774 (1991).
96. Dirk Dittmer, Sibani Pati, Gerard Zambetti, Shelley Chu, Angelika K. Teresky, Mary Moore, C. F. & A. J. L. Gain of function mutations in p53. *Nature* **4**, 42–46 (1993).
97. Doyle, B. *et al.* p53 mutation and loss have different effects on tumourigenesis in a novel mouse model of pleomorphic rhabdomyosarcoma. *J. Pathol.* **222**, 129–137 (2010).
98. Lang, G. A. *et al.* Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell* **119**, 861–872 (2004).
99. Morton, J. P. *et al.* Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 246–251 (2010).
100. Olive, K. P. *et al.* Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell* **119**, 847–860 (2004).
101. Caulin, C. *et al.* An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. *J.Clin.Invest.* **117**, 1893–1901 (2007).
102. Terzian, T. *et al.* The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes & Dev.* **22**, 1337–1344 (2008).
103. Alexandrova, E. M. *et al.* Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature* **523**, 352–356 (2015).
104. Bougeard, G. *et al.* Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J. Med. Genet.* **45**, 535–538 (2008).
105. Zerdoumi, Y. *et al.* Drastic Effect of Germline TP53 Missense Mutations in Li – Fraumeni Patients. *Hum. Mutat.* (2012).
106. Girardini, J. E. *et al.* A Pin1/Mutant p53 Axis Promotes Aggressiveness in Breast Cancer. *Cancer Cell* **20**, 79–91 (2011).
107. Weissmueller, S. *et al.* Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell* **157**, 382–394 (2014).

108. Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T. & Prives, C. A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1874–1887 (2001).
109. Fontemaggi, G. *et al.* The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1086–1093 (2009).
110. Freed-Pastor, W. A. *et al.* Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* **148**, 244–258 (2012).
111. Quante, T. *et al.* Mutant p53 is a transcriptional co-factor that binds to G-rich regulatory regions of active genes and generates transcriptional plasticity. *Cell Adhes. Migr.* **11**, 3290–3303 (2012).
112. Brázdová, M. *et al.* Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1486–1500 (2009).
113. Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J. & Lane, D. P. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **5**, 893–9 (1990).
114. Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H. J. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3339–3354 (2002).
115. Smeland, T., Seabra, M. C., Goldstein, J. & Brown, M. Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10712–10716 (1994).
116. Manolaridis, I. *et al.* Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. *Nature* **504**, 301–305 (2013).
117. Winter-Vann, A. M. & Casey, P. J. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 405–412 (2005).
118. Maurer-Stroh, S. *et al.* Towards complete sets of farnesylated and geranylgeranylated proteins. *PLoS Comput. Biol.* **3**, 634–648 (2007).
119. Nguyen, U. T. T. *et al.* Analysis of the eukaryotic prenylome by isoprenoid affinity tagging. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 227–235 (2009).
120. Zhang, F. L. & Casey, P. J. PROTEIN PRENYLATION: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Biochemistry* **65**, 241–269 (1996).
121. Seabra, M. C. *et al.* Protein Farnesyltransferase Geranylgeranyltransferase a Common a Subunit. *Cell* **65**, 429–434 (1991).
122. Casey, P. J. & Seabra, M. C. Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**, 5289–5292 (1996).
123. Finegold, A. A. *et al.* Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the CDC43 gene product but not the DPRI gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4448–4452 (1991).
124. Lane, K. T. & Beese, L. S. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res.* **47**, 681–699 (2006).
125. Scott Reid, T., Terry, K. L., Casey, P. J. & Beese, L. S. Crystallographic Analysis of CaaX Prenyltransferases Complexed with Substrates Defines Rules of Protein

- Substrate Selectivity. *J. Mol. Biol.* **343**, 417–433 (2004).
126. Basso, A. D., Kirschmeier, P. & Bishop, W. R. Farnesyl transferase inhibitors. *J. Lipid Res.* **47**, 15–31 (2006).
127. Roberts, P. J. *et al.* Rho Family GTPase Modification and Dependence on CAAX Motif-signalized Posttranslational Modification. *J. Biol. Chem.* **283**, 25150–25163 (2008).
128. Wright, L. P. & Philips, M. R. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* **47**, 883–891 (2006).
129. Walter K. Schmidt, Amy Tam, Konomi Fujimura-Kamada, and S. M. Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11175–11180 (1998).
130. Otto, J. C., Kim, E., Young, S. G. & Casey, P. J. Cloning and Characterization of a Mammalian Prenyl Protein-specific Protease. *J. Biol. Chem.* 8379–8383 (1999).
131. Wolbach, S. B. *et al.* Modulation of Ras and a-Factor Function by Carboxyl-Terminal Proteolysis. *Science (80-.)* **275**, 1796–1800 (1997).
132. Jang, G. & Gelb, M. H. Substrate Specificity of Mammalian Prenyl Protein-Specific Endoprotease Activity †. *Biochemistry* **37**, 4473–4481 (1998).
133. Bergo, M. O. *et al.* Targeted inactivation of the isoprenyleysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 17605–17610 (2000).
134. Dai, Q. *et al.* Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **273**, 15030–15034 (1998).
135. Young, S. G., Clarke, S. G., Bergoc, M. O., Phillips, M. & Fong, L. G. Genetic approaches to understanding the physiologic importance of the carboxyl methylation of isoprenylated proteins. in *Enzymes* 273–301 (2006).
136. Pillingers, M. H., Volkerqv, C., Stock, J. B., Weissmann, G. & Philips, M. R. Characterization of a Plasma Membrane-associated directed a Carboxyl Methyltransferase in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **269**, 1486–1492 (1993).
137. Wright, L. P. *et al.* Topology of Mammalian Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Determined in Live Cells with a Fluorescent Probe. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1826–1833 (2009).
138. Romano, J. D. & Michaelis, S. Topological and Mutational Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, Founding Member of the Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Family. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1957–1971 (2001).
139. Baron, R. A. & Casey, P. J. Analysis of the kinetic mechanism of recombinant human isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase (Icm). *BMC Biochem.* **5**, 1–12 (2004).
140. Diver, M. M. & Long, S. B. Mutational analysis of the integral membrane methyltransferase isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) reveals potential substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **289**, 26007–26020 (2014).
141. Diver, M. M., Pedi, L., Koide, A., Koide, S. & Long, S. B. Atomic structure of the eukaryotic intramembrane RAS methyltransferase ICMT. *Nature* **553**, 526–529 (2018).

142. Wang, M. & Casey, P. J. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 110–122 (2016).
143. Bergo, M. O. *et al.* Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Deficiency in Mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 5841–5845 (2001).
144. Lin, X., Jung, J., Xu, B., Zoghbi, H. & Zaret, K. S. Prenylcysteine carboxylmethyltransferase is essential for the earliest stages of liver development in mice. *Gastroenterology* **123**, 345–351 (2002).
145. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E. & Marshall, C. J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**, 1167–1177 (1989).
146. Casey, P. J., Solski, P. A., Der, C. J. & Buss, J. E. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8323–8327 (1989).
147. Bergo, M. O. *et al.* Inactivation of Icmt inhibits transformation by oncogenic K-Ras and B-Raf. *J. Clin. Invest.* **113**, 539–550 (2004).
148. Wahlstrom, A. M. *et al.* Inactivating Icmt ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. *Blood* **112**, 1357–1365 (2008).
149. Lau, H. Y., Tang, J., Casey, P. J. & Wang, M. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase is critical for malignant transformation and tumor maintenance by all RAS isoforms. *Oncogene* **36**, 3934–3942 (2017).
150. Court, H. *et al.* Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase deficiency exacerbates KRAS-driven pancreatic neoplasia via Notch suppression. *J. Clin. Invest.* **123**, 4681–4694 (2013).
151. Cushman, I. & Casey, P. J. RHO methylation matters: A role for isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase in cell migration and adhesion. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 11–15 (2011).
152. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**, 269–309 (2013).
153. Zandvakili, I., Lin, Y., Morris, J. C. & Zheng, Y. Rho GTPases: Anti-or pro-neoplastic targets? *Oncogene* **36**, 3213–3222 (2017).
154. Jansen, S., Gosens, R., Wieland, T. & Schmidt, M. Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond. *Pharmacology and Therapeutics* **183**, 1–21 (2018).
155. Cushman, I. & Casey, P. J. Role of isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase-catalyzed methylation in rho function and migration. *J. Biol. Chem.* **284**, 27964–27973 (2009).
156. Do, M. T., Chai, T. F., Casey, P. J. & Wang, M. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase function is essential for RAB4A-mediated integrin β 3 recycling, cell migration and cancer metastasis. *Oncogene* **36**, 5757–5767 (2017).
157. Backlund, P. S. Post-translational processing of RhoA. Carboxyl methylation of the carboxyl-terminal prenylcysteine increases the half-life of RhoA. *J. Biol. Chem.* **272**, 33175–33180 (1997).
158. Gentry, L. R. *et al.* Divergent roles of CAAX motif-signaled posttranslational modifications in the regulation and subcellular localization of Ral GTPases. *J. Biol.*

- Chem.* **290**, 22851–22861 (2015).
159. Wnuk, S. F. *et al.* Anticancer and Antiviral Effects and Inactivation of S-Adenosyl-L-homocysteine Hydrolase with 5'-Carboxaldehydes and Oximes Synthesized from Adenosine and Sugar-Modified Analogues. *J. Med. Chem.* **2623**, 1608–1618 (1997).
160. Zhao, R., Matherly, L. H. & Goldman, I. D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev. Mol. Med.* **11**, (2009).
161. Winter-vann, A. M. *et al.* Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: An unexpected property of methotrexate. *PNAS* **100**, 6529–6534 (2003).
162. Yu-Ting Ma, Yi-Qun Shi, Young Hee Lim, Sonja H. McGrail, J. Anthony Ware, and R. R. R. Mechanistic Studies on Human Platelet Isoprenylated Protein Methyltransferase: Farnesylcysteine Analogs Block Platelet Aggregation without Inhibiting the Methyltransferase. *Biochemistry* **33**, 5414–5420 (1994).
163. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, M. P. S-Adenosylmethionine and methylation. *The FASEB* **10**, 471–480 (1996).
164. Donelson, J. L. *et al.* Amide-substituted farnesylcysteine analogs as inhibitors of human isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 4420–4423 (2006).
165. Winter-Vann, A. M. *et al.* A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4336–41 (2005).
166. Wang, M. *et al.* A Small Molecule Inhibitor of Isoprenylcysteine Carboxymethyltransferase Induces Autophagic Cell Death in PC3 Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 18678–18684 (2008).
167. Baron, R. A., Peterson, Y. K., Otto, J. C., Rudolph, J. & Casey, P. J. Time-Dependent Inhibition of Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase by Indole-Based Small Molecules. *Biochemistry* **46**, 554–560 (2007).
168. Mantovani, F. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 912–920 (2007).
169. Ghioni, P. *et al.* Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8659–8668 (2002).
170. Mantovani, F. *et al.* Pin1 Links the Activities of c-Abl and p300 in Regulating p73 Function. *Mol. Cell* **14**, 625–636 (2004).
171. Peter, J. S. *Molecular Cloning*. COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS (2012).
172. Muller, P. A. J. *et al.* Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell* **139**, 1327–1341 (2009).
173. Enzo, E. *et al.* Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *EMBO J.* **34**, 1349–1370 (2015).
174. Irizarry, R. A. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* **31**, 15e–15 (2003).

175. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, D. P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708 (1989).
176. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, L. D. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7555–7559 (1990).
177. Muller, P. A. J. & Vousden, K. H. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304–317 (2014).
178. Bamford, S. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* **91**, 355–8 (2004).
179. Kainz, C. *et al.* Comparison of p53 mutational status with mRNA and protein expression in a panel of 24 human breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **79**, 37–46 (2003).
180. Lyubomir T. Vassilev, Binh T. Vu, Bradford Graves, Daisy Carvajal, Frank Podlaski, Zoran Filipovic, Norman Kong, Ursula Kammlott, Christine Lukacs, Christian Klein, Nader Fotouhi, E. A. L. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science (80-.)* **303**, 844–849 (2004).
181. O'Connor, P. M. *et al.* Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* **57**, 4285–4300 (1997).
182. Wang, S. *et al.* Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **279**, 25535–25543 (2004).
183. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. & Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1845**, 84–89 (2014).
184. Yeh, P. Y. *et al.* Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. *Oncogene* **23**, 3580–3588 (2004).
185. Kaeser, M. D., Pebernard, S. & Iggo, R. D. Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 7598–7605 (2004).
186. Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
187. Strano, S. *et al.* Physical Interaction with Human Tumor-derived p53 Mutants Inhibits p63 Activities. *J. Biol. Chem.* **277**, 18817–18826 (2002).
188. Freed-Pastor, W. A. & Prives, C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* **26**, 1268–1286 (2012).
189. Martin-Belmonte, F. *et al.* Cell-Polarity Dynamics Controls the Mechanism of Lumen Formation in Epithelial Morphogenesis. *Curr. Biol.* **18**, 507–513 (2008).
190. Lucy Erin O'Brien, Tzuu-Shuh Jou, Anne L. Pollack, Qihang Zhang§, Steen H. Hansen, P. Y. and K. E. M. Rac1 orients epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat. Cell Biol.* **3**, (2001).
191. Rodríguez-Fraticelli, A. E., Auzan, M., Alonso, M. A., Bornens, M. & Martín-Belmonte, F. Cell confinement controls centrosome positioning and lumen initiation during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* **198**, 1011–1023 (2012).

192. Russ, A., Louderbough, J. M. V., Zarnescu, D. & Schroeder, J. A. Hugl1 and Hugl2 in Mammary Epithelial Cells: Polarity, Proliferation, and Differentiation. *PLoS One* **7**, 3–14 (2012).
193. Baschieri, F. *et al.* Spatial control of Cdc42 signalling by a GM130–RasGRF complex regulates polarity and tumorigenesis. *Nat. Commun.* **5**, 4839 (2014).
194. Aslakson, C. J. & Miller, F. R. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. *Cancer Res.* **52**, 1399–1405 (1992).
195. Miller, L. D. *et al.* An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13550–13555 (2005).
196. Candi, E. *et al.* TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle* **6**, 274–85 (2007).
197. Dang, T. T., Esparza, M. A., Maine, E. A., Westcott, J. M. & Pearson, G. W. Δ Np63 α promotes breast cancer cell motility through the selective activation of components of the epithelial-to-mesenchymal transition program. *Cancer Res.* **75**, 3925–3935 (2015).
198. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. Emt: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
199. Sorrentino, G. *et al.* Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat. Cell Biol.* **16**, 357–366 (2014).