



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HER2 POR MUTANTES DE P53 EN CÁNCER

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANA ALEJANDRA ROMÁN ROSALES

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. **JUAN PATRICIO GARIGLIO VIDAL**
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HER2 POR MUTANTES DE P53 EN CÁNCER

Tabla de contenido

Figuras y Tablas	1
RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES	33
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	37
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
RESULTADOS	60
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Figuras y Tablas

Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.....	6
Figura 2 Sellos emergentes para caracterizar el desarrollo de cáncr.	12
Figura 3. Dominios de la proteína p53.	17
Figura 4. Porcentaje de mutaciones somáticas de p53 en los diferentes tipos de cáncer.....	18
Figura 5. Distribución de codones de p53 según su frecuencia de mutación.	19
Figura 6. Familia de receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico.	25
Figura 7. Estructura de la cromatina en promotores activos (cormatina abierta) y promotores inactivos (cromatina cerrada).	30
Figura 8. El cáncer como resultado de desregulaciones genéticas y epigenéticas.	32

Figura 9. Ensayos preliminares en la evaluación de HER2 debido a la influencia de oncoproteínas del VPH.....	33
Figura 10. Western blot para HER2 y p53 en diferentes líneas de cáncer cervical	35
Figura 11. Esquema de los vectores empleados para la transfección de las diferentes mutantes de p53 empleadas.	42
Figura 12. Secuencia de purificación de plásmidos.	43
Figura 13. Selección clonal para la purificación de plásmidos.	44
Figura 14. Procedimiento general de secuenciación de los plásmidos.....	45
Figura 15. Diseño de oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los plásmidos.	46
Figura 16. Resultados de la secuenciación de los plásmidos de mutaciones de p53.....	47
Figura 17. Descripción gráfica del contenido de plásmidos shRNA de p53.	48
Figura 18. Ejemplo del diseño de oligonucleótidos (TP53).	51
Figura 19. PCR punto final para beta-2microglobulina (B2M).	52
Figura 20. Ejemplos de tinciones con Azul de Coomassie y con Rojo de Ponceau.	54
Figura 21. Resumen gráfico de la metodología para la evaluación de un reportero de luciferasa.	56
Figura 22. Resumen general de la metodología de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).	58
Figura 23. Nivel de expresión de HER2 y p53 en distintas líneas celulares derivadas de cáncer.	60
Figura 24. Contribución de la mutante p53R273C en los niveles de expresión de la proteína de HER2.....	62
Figura 25. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a la mutante p53R273C.....	62
Figura 26. Contribución de la mutante p53R248Q en los niveles de expresión de la proteína de HER2.....	63
Figura 27. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a la mutante p53R248Q.	64
Figura 28. Contribución de la mutante p53R273H en los niveles de expresión de la proteína de HER2.....	64
Figura 29. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a la mutante p53R175H.	65
Figura 30. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a las mutantes p53R273C y p53R248Q.	66
Figura 31. Panel de líneas celulares con expresión de p53 mutante muestran elevados niveles de expresión de ARNm de <i>ERBB2</i> y proteína HER2.	67
Figura 32. Expresión de wtp53 correlacionando con los niveles de expresión de ARNm de <i>ERBB2</i> y proteína HER2.....	68
Figura 33. Inhibición de la expresión de la mutante p53R273C en la línea celular C33A.	69
Figura 34. Inhibición de la expresión de la mutante p53R248Q en la línea celular OVCAR-3.....	70
Figura 35. La mutante p53R273C aumenta la estabilidad de la proteína de HER2 en células HeLa.	72
Figura 36. La expresión de las mutantes p53R273C y p53R248Q aumentan la estabilidad de la proteína HER2.	72
Figura 37. Las mutantes p53R273C y p53R248Q regulan de manera positiva la expresión del ARNm de <i>ERBB2</i> y la proteína HER2.....	73
Figura 38. Las mutantes p53R248Q y p53R273C, pero no wtp53 transactivan el promotor de HER2 en células Saos-2 transfectadas de manera estable.	75

Figura 39. Las mutantes p53R248Q y p53R273C se asocian a la cromatina e induce la acetilación de histonas H3 y H4 en la región proximal del promotor de <i>ERBB2</i>	77
Figura 40. Las mutantes p53R248Q y p53R273C incrementan la acetilación de histonas y la unión de p53 a la region distal del promotor de HER2.....	78
Figura 41. Modelo de regulación positiva de <i>ERBB2</i> por mutantes de p53.....	86

Tabla 1. Características de las líneas celulares empleadas durante el trabajo.	39
Tabla 2 Cuantificación de plásmidos después de su purificación.	45
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos.....	50
Tabla 4. Condiciones de determinación de la expresión de proteínas por Western Blot.	54
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para evaluar la Región PROXIMAL del promotor de HER2	57
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para evaluar la Región DISTAL del promotor de HER2.....	58

RESUMEN

La sobreexpresión de la proteína oncogénica HER2 está relacionada con un mal pronóstico en pacientes con tumores invasivos de cáncer de mama. Asociaciones clínicas han propuesto que las mutaciones de p53 pueden ser detectadas frecuentemente en los casos de cáncer de mama positivo para HER2. Los mecanismos responsables de la adquisición de funciones oncogénicas de las proteínas mutantes de p53 (mtp53), entre las que se encuentra la ganancia de función (GOF), y su relación con la expresión de HER2 no se han determinado al momento. Aunque estas mutaciones se han reportado a lo largo de toda la secuencia del gen *TP53*, existen seis “hotspots”, entre los que se encuentran los residuos R248 y R273 (p53R248Q y p53R273C). En el presente trabajo se evaluó la expresión de HER2 (transcripción y proteína), así como la estabilidad de la proteína HER2 y la posible interacción de las mutantes de p53 mencionadas en el promotor del gen *ERBB2*, después de inducir o silenciar la expresión de mutantes de p53 en diversas líneas celulares de cáncer. Encontramos que la expresión de HER2 se encuentra elevada en las líneas celulares que expresan de manera endógena las mutantes de p53 mencionadas y que esta disminuye al silenciar la expresión de estas mutantes de p53; además la transfección de mutantes de p53 en la línea celular Saos-2 aumentó la expresión de ARNm de *ERBB2*, p53R248Q (0,5 veces) y p53R273C (3 veces), con una significación de $p < 0,5$. Las mutantes de p53, de manera diferencial, favorecen la estabilidad de la proteína HER2. A nivel transcripcional, se observó que las mutantes p53R248Q y p53R273C aumentan significativamente la actividad de la luciferasa sobre el promotor de *ERBB2*. De manera más detallada, observamos que ambas mutantes promueven la acetilación de las histonas H3 y H4, tanto en el promotor Proximal como en el Distal de *ERBB2*, pero en diferentes niveles. Estos hallazgos muestran por primera vez que las mutantes de p53 inducen sobreexpresión de HER2 y que estudios más especializados podrían contribuir a terapias dirigidas para mejorar el tratamiento de pacientes que desarrollen tumores con la combinación de estos factores.

ABSTRACT

HER2 overexpression is related with a poor prognosis in patients with invasive breast cancer tumors. Clinical associations have reported that p53 mutations can be detected frequently in cases of HER2-positive breast cancer. The mechanisms responsible for the acquisition of oncogenic functions of the mutant proteins of p53 (mtp53), known as Gain of Function (GOF), over HER2 expression have not been reported. Although these mutations have been reported throughout the sequence of the TP53 gene, there are six “hotspots”, including residues R248 and R273 (p53R248Q and p53R273C). In the present work we evaluated the expression of HER2 (transcription and protein), as well as the stability of the HER2 protein and the possible interaction of these p53 mutants in the *ERBB2* gene promoter, after inducing or silencing the expression of p53 mutants in various cancer cell lines. We found that HER2 expression is elevated in cell lines that endogenously express the mentioned p53 mutants and that this expression decreases after silencing the expression of p53; in addition, the transfection of p53 mutants in the Saos-2 cell line increased the expression of HER2 mRNA: p53R248Q (0.5-times) and p53R273C (3-times), with a significance of $p < 0.5$. The p53 mutants, differentially, favor the stability of the HER2 protein. At the transcriptional level, it was observed that p53R248Q and p53R273C mutants significantly increase the activity of a luciferase reporter on the *ERBB2* promoter. In a more detailed manner, we observed that both mutants promote, differentially, the acetylation of histones H3 and H4 in this promoter, both in Proximal and Distal regions. These findings show for the first time that p53 mutants induce overexpression of HER2 and that more specialized studies could contribute to targeted therapies to improve the treatment of patients who develop tumors with the combination of these factors.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo de Cáncer

De acuerdo con una recopilación presentada en el año 2010, en la Figura 1 se muestran seis sellos distintivos que describen el desarrollo del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

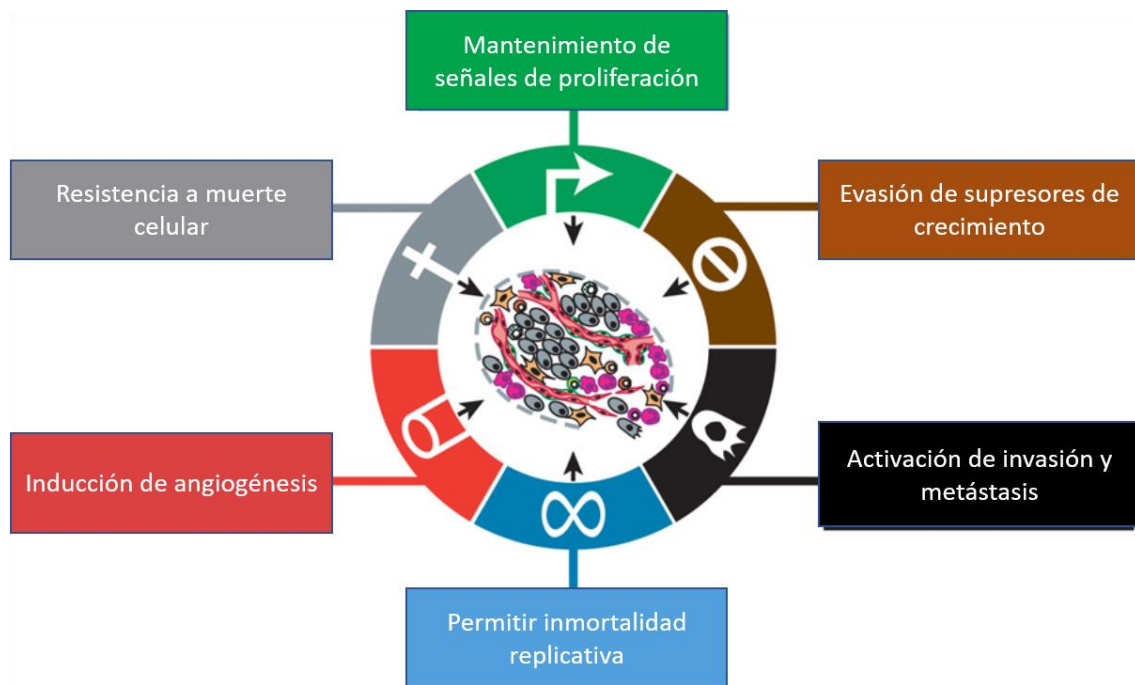


Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.

En la imagen se engloban las seis habilidades que se propusieron en perspectiva en el año 2000. En la década pasada se realizaron progresos importantes para el entendimiento de los mecanismos involucrados para cada característica. Figura modificada de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Es importante tomar en cuenta que estos procesos pueden encontrarse englobados en la inestabilidad genética. Además de estos 6 sellos distintivos, que han sido ampliamente estudiados y establecidos, existen nuevas investigaciones que están cobrando importancia, como: el metabolismo energético y la evasión del sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011). Las células en organismos complejos están inmersas en un flujo continuo de información que proviene tanto de su entorno externo como de las células vecinas. La correcta interpretación e integración de todas estas señales es crucial para la homeostasis, la supervivencia y la adaptación de la célula única, así como del propio organismo en conjunto (Holbro, Civenni and Hynes, 2003).

A continuación, se describirán de manera breve cada una de las características mencionadas como sellos del desarrollo de cáncer:

- **MANTENIMIENTO PROLONGADO DE SEÑALES PROLIFERATIVAS**

Una de las características fundamentales de las células cancerígenas es su capacidad para mantener una proliferación crónica. Cuando los tejidos se desarrollan de manera normal, estos controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que instruyen hacia la entrada y la progresión del ciclo de división celular y por lo tanto de su crecimiento, asegurando de esta forma la homeostasis¹, el número de células, así como el mantenimiento de la arquitectura y función de un tejido normal. Por el contrario, se ha determinado que las células cancerosas son capaces de desregular en forma positiva, las señales de activación que se transmiten en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular y que típicamente contienen dominios de tirosina cinasa intracelulares, favoreciendo un aumento y descontrol en el crecimiento celular.

Actualmente se ha mejorado el entendimiento de la señalización mitogénica en células cancerosas (Perona, 2006; Hynes and MacDonald, 2009; Lemmon and Schlessinger, 2010; Witsch, Sela and Yarden, 2010). Las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad de sustentar la señalización proliferativa de diversas maneras, es decir que pueden generar señales para la producción de una mayor cantidad de ligandos (factores de crecimiento) a los que responden mediante la expresión de receptores afines, lo que da como resultado la estimulación proliferativa autocrina. Alternativamente, las células cancerosas pueden enviar señales para estimular la producción de factores de crecimiento producidos por las células normales dentro del estroma, suministrando a las células cancerosas de diversos factores de crecimiento (Bhowmick, Neilson and Moses, 2004; Cheng *et al.*, 2008). La señalización de los receptores

¹ Homeostasis: Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo.

involucrados en el crecimiento pueden ser aumentados debido a un aumento en los niveles de proteínas receptoras expresadas en la superficie de la célula cancerosa, de esta manera dichas células se vuelven hiperreactivas a pequeñas cantidades de factor de crecimiento, que de manera normal no tendrían repercusiones con el crecimiento celular; el mismo resultado puede ser consecuencia de alteraciones estructurales en las moléculas receptoras que facilitan la activación independiente del ligando.

- **EVASION DE SEÑALES DE SUPRESION DE CRECIMIENTO**

Además de la capacidad distintiva de inducir y mantener activas señales de estimulación del crecimiento, las células cancerosas también deben eludir los poderosos programas que regulan de manera negativa la proliferación celular; muchos de estos programas dependen de las acciones de los genes supresores de tumores. Se han descrito muchos supresores tumorales que operan de diversas maneras para limitar el crecimiento y la proliferación celular.

Los dos supresores tumorales que han sido descritos de una forma más amplia, son los que codifican para las proteínas RB (asociado a retinoblastoma) y p53; estos supesores operan como nodos centrales de control dentro de dos circuitos reguladores celulares complementarios clave que rigen las decisiones de proliferación de las células o, como alternativa, activan la senescencia y los programas apoptóticos² (Hanahan and Weinberg, 2011).

- **RESISTENCIA A LA MUERTE CELULAR**

Varios estudios han establecido las bases para fundamentar el concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer (Evan and Littlewood, 1998; Lowe, Cepero and Evan, 2004; Adams and Cory, 2007). El esclarecimiento de los circuitos de señalización que rigen el programa apoptótico ha revelado cómo se

² Apoptosis: Tipo de muerte celular en la que una serie de procesos moleculares en la célula conducen a su muerte. Es un método que el cuerpo usa para deshacerse de células innecesarias o anormales. También es conocido como muerte celular programada.

desencadena la apoptosis en respuesta a diversos tipos de estrés fisiológico que experimentan las células cancerosas durante el curso de la tumorigénesis o como resultado de terapias utilizadas contra el cáncer. Algunos ejemplos del estrés causante de procesos apoptóticos pueden ser causados por desequilibrios resultantes de los niveles elevados de señalización en oncogenes³, como se mencionó anteriormente (Hanahan and Weinberg, 2011).

- **INMORTALIDAD REPLICATIVA**

Actualmente se acepta ampliamente que las células cancerosas adquieren un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad se relaciona con el comportamiento de las células en la mayoría de los linajes celulares normales en el cuerpo, que son capaces de atravesar solo un número limitado de ciclos sucesivos de división celular. Esta limitación se ha asociado con dos barreras distintas a la proliferación: la senescencia⁴, que implica la entrada típicamente irreversible en un estado no proliferativo pero viable, llegando a un punto de crisis que finaliza con la muerte celular. En raras ocasiones, las células emergen de una población en crisis y exhiben un potencial replicativo ilimitado. Esta transición se ha denominado inmortalización, un rasgo que la mayoría de las líneas celulares establecidas poseen en virtud de su capacidad de proliferar en cultivo sin evidencia de senescencia o crisis. La telomerasa, la ADN polimerasa especializada que agrega segmentos repetidores de telómeros a los extremos del ADN telomérico, está casi ausente en células no inmortalizadas pero expresada a niveles funcionalmente significativos en la gran mayoría (aproximadamente 90%) de células inmortalizadas espontáneamente, incluidas células cancerosas humanas (Hanahan and Weinberg, 2011).

- **INDUCCION DE ANGIOGENESIS**

³ Oncogene: Gen que contribuye a convertir células normales en células cancerosas, principalmente por favorecer un aumento exacerbado del crecimiento celular.

⁴ Senescencia: Se refiere a la capacidad de determinadas células de poder realizar sólo un número limitado de divisiones celulares

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La generación de nuevos vasos sanguíneos (vasculatura) está asociada a tumores y cubre estas necesidades. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura implica el nacimiento de nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos (vasculogénesis) además del brote (angiogénesis) de nuevos vasos adicionales. En el adulto, como parte de procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino, se activa la angiogénesis, pero solo de manera transitoria. Por el contrario, durante la progresión tumoral, un "interruptor angiogénico" casi siempre se activa y permanece activado, lo que provoca que la vasculatura normalmente inactiva genere continuamente nuevos vasos que ayudan a mantener crecimientos neoplásicos en expansión (Hanahan and Folkman, 1996; Hanahan and Weinberg, 2011).

- **ACTIVACIÓN DE INVASIÓN Y METÁSTASIS**

A medida que los carcinomas provenientes de los tejidos epiteliales progresan hacia grados de malignidad más patológicos, reflejados en la invasión local y metástasis a distancia, las células cancerosas asociadas típicamente desarrollan alteraciones en su forma y en su unión a otras células y a la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). La alteración que ha sido la mejor caracterizada, implica la pérdida de E-cadherina, una molécula clave de adhesión célula-célula. Al favorecer la unión adherente de una célula epitelial con células epiteliales adyacentes, E-cadherina ayuda a ensamblar láminas de células epiteliales y mantener a las células dentro de estas láminas epiteliales en forma inactiva (sin crecimiento, solo mantenimiento). Un aumento en la expresión de E-cadherina ha sido establecida como antagonista de la invasión y la metástasis, mientras que la reducción de su expresión puede potenciar fenotipos carcinogénicos. La regulación negativa observada con frecuencia y la inactivación mutacional ocasional de E-cadherina en carcinomas humanos proporcionaron un fuerte apoyo para

establecer su papel como un supresor clave de esta capacidad característica en cáncer (Cavallaro and Christofori, 2004; Berx and van Roy, 2009).

Los autores definieron características distintivas del cáncer como capacidades funcionales adquiridas que permiten que las células cancerosas sobrevivan, proliferen y se diseminen; estas funciones se adquieren en diferentes tipos de tumores a través de mecanismos distintos y en diversos momentos durante el curso de los múltiples pasos que llevan a la tumorigénesis. Como se mencionó al principio de esta sección, la adquisición de los sellos característicos del cáncer, pueden ser favorecidas por procesos de inestabilidad genómica y evasión del sistema inmune. El desarrollo de inestabilidad genómica en las células cancerosas genera mutaciones aleatorias que incluyen reordenamientos cromosómicos; entre estos se encuentran los raros cambios genéticos que pueden orquestar capacidades distintivas a las de células normales. Por otro lado, también se menciona el estado inflamatorio de lesiones premalignas y francamente malignas que es impulsado por las células del sistema inmune, algunas de las cuales sirven para promover la progresión tumoral por diversos medios (Hanahan and Weinberg, 2011).

Sin embargo, se ha propuesto que otros atributos distintivos de las células cancerosas son funcionalmente importantes para el desarrollo del cáncer y, por lo tanto, en un futuro podrían agregarse a la lista de características principales (Colotta *et al.*, 2009; Luo, Solimini and Elledge, 2009; Negrini, Gorgoulis and Halazonetis, 2010). El primero implica la reprogramación hacia el aumento del metabolismo de la energía celular, de forma que se favorezca el crecimiento y la proliferación celular continua, reemplazando el programa metabólico que opera en la mayoría de los tejidos normales y alimenta las operaciones fisiológicas de las células asociadas (DeBerardinis *et al.*, 2008; Semenza, 2008; Jones and Thompson, 2009; Kennedy and Dewhirst, 2010). El segundo implica la evasión activa por parte de las células cancerosas, del ataque y la eliminación que ejercen las células inmunes; esta capacidad resalta las funciones de un sistema

inmunitario que puede antagonizar, pero que también puede mejorar el desarrollo y la progresión del tumor (Teng *et al.*, 2008; Vajdic and van Leeuwen, 2009; Mougiakakos *et al.*, 2010; Strauss and Thomas, 2010). Ambas capacidades bien pueden demostrar que facilitan el desarrollo y la progresión de muchas formas de cáncer humano y, por lo tanto, pueden considerarse como distintivos emergentes para el desarrollo del cáncer. En la Figura 2 se muestra la propuesta de dos nuevos sellos emergentes, además de dos características que se habilitan durante el desarrollo de cáncer; y que se han agregado gracias a los exhaustivos esfuerzos por entender los mecanismos involucrados.

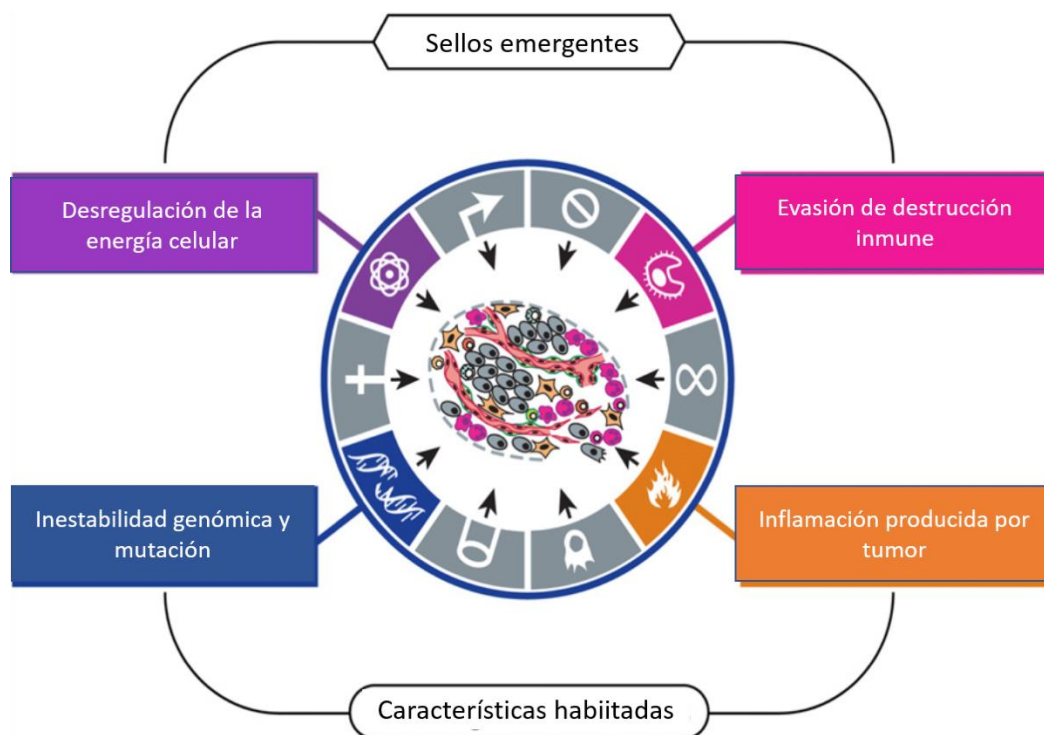


Figura 2 Sellos emergentes para caracterizar el desarrollo de cáncer.

Se sugieren dos características adicionales involucradas en la patogénesis de algunos o quizás todos los cánceres. Uno implica la capacidad de modificar, o reprogramar, el metabolismo celular para apoyar de manera más efectiva la proliferación neoplásica. El segundo permite que las células cancerosas evadan la destrucción inmunológica. Debido a que ninguna de las capacidades está aún generalizada y validada por completo, se etiquetan como distintivos emergentes. Además, se han identificado dos características que facilitan la adquisición de los distintivos principales y emergentes: inestabilidad genómica e inflamación. Figura modificada de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Contribución al desarrollo de cáncer

Como se mencionó en la sección anterior, los sellos característicos del cáncer pueden ser observados en las diferentes células y tumores que se han estudiado con la finalidad de explicar

el desarrollo del cáncer. Pero ¿cómo se pueden explicar estas características? Gran parte de las explicaciones generadas desde que se inició la investigación sobre el cáncer, se pueden resumir en la siguiente frase: “el cáncer es, en esencia, una enfermedad genética” (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Aunque recientemente se han agregado diversas alteraciones más para explicar y estudiar las contribuciones en el desarrollo de cáncer, las alteraciones genéticas que han sido mayormente estudiadas, y de las que se tienen evidencias más contundentes, son: 1) alteraciones activadoras en oncogenes y 2) alteraciones que inhiben la función de genes supresores de tumores (Vogelstein and Kinzler, 2004; Croce, 2008).

Las alteraciones (especialmente mutaciones⁵) en estas clases de genes pueden ocurrir en la línea germinal, lo que resulta en predisposición hereditaria al cáncer, o en células somáticas únicas, dando como resultado tumores esporádicos (Vogelstein and Kinzler, 2004; Piccolo and Frey, 2008).

A diferencia de otras enfermedades, una sola alteración genética no puede "causar" el desarrollo de cáncer. Las células de los mamíferos tienen múltiples mecanismos de defensa para protegerlas contra los efectos potencialmente letales de las mutaciones genéticas del cáncer, y solo hasta que se conjunta la expresión de varios genes modificados, será posible el desarrollo de un cáncer invasivo. Por lo tanto, es mejor pensar que los genes que se encuentran alterados en el cáncer contribuyen al desarrollo del cáncer en lugar de causarlo (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Las mutaciones en genes normales pueden hacer que las células que los poseen adquieran características cancerosas. Esta hipótesis obtuvo un mayor apoyo después de que las herramientas de biología molecular se aplicaron en la investigación sobre este padecimiento.

⁵ Mutación: Cualquier cambio en la secuencia del ADN de una célula.

Aparte del aumento en la función que gobiernan los oncogenes, el cáncer también puede surgir debido a la pérdida o daño de la función de genes supresores de tumores que controlan el crecimiento celular. En muchos casos, ambas razones contribuyen a causar cáncer (Imran *et al.*, 2017).

Las mutaciones de genes supresores de tumores o de oncogenes funcionan de manera similar a nivel fisiológico: conducen el proceso neoplásico al inhibir los procesos de muerte celular o la detención del ciclo celular y aumentar el número de células tumorales mediante la estimulación de la formación de nuevas células, respectivamente. (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Se han identificado otras clases de genes que favorecen el desarrollo del cáncer, llamados genes de estabilidad o cuidadores, o microRNAs, aunque para propósitos de este trabajo no se explicarán en detalle.

GENES SUPRESORES DE TUMORES

Una mutación en un gen supresor de tumores es análoga a un freno disfuncional en un automóvil; el auto no se detiene incluso cuando el conductor intenta aplicarlo. Generalmente se requieren mutaciones en los alelos maternos y paternos de un gen supresor tumoral para conferir una ventaja selectiva a la célula (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Los supresores de tumores desempeñan su papel al inhibir la proliferación celular y el desarrollo de tumores. En la mayoría de los tumores, la inactivación de los genes supresores de tumores elimina la regulación negativa de estos genes sobre la proliferación celular, lo que provoca que el crecimiento celular sea anormal y que con un crecimiento sostenido pueda desencadenarse procesos que conducen al desarrollo de cáncer. Los genes supresores de tumores tienen mutaciones de "pérdida de función" porque no ejercen su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular. Para que un gen supresor tumoral promueva el desarrollo tumoral, ambas copias del

gen deben ser inactivadas porque una copia es suficiente para controlar la proliferación celular, es decir que estas mutaciones actúan de forma recesiva (Imran *et al.*, 2017).

Las mutaciones en los genes supresores de tumores reducen la actividad del producto génico, que pueden ser deleciones o inserciones de diversos tamaños, mutaciones de paro que dan como resultado una proteína trunca. Aunque también pueden ser mutaciones sin sentido en residuos que son esenciales para su actividad, dando como resultado una proteína completa, pero sin la actividad fisiológica que desempeña de manera normal y que incluso pudiera tener efectos contrarios, como se explicará más adelante el caso de la proteína supresora de tumores codificada por el gen *TP53*. Otra forma de alteraciones, que se ha estudiado recientemente, es la que provoca silenciamiento epigenético.

Proteína supresora de tumores p53

En 1979, varios grupos descubrieron p53 de forma independiente al usar sueros de animales con tumores inducidos por SV40, en los que sus elementos principales se unía a una proteína no viral con una masa molecular aparente de alrededor de 53 kDa (Chang *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979; Linzer, Maltzman and Levine, 1979). La proteína p53 está codificada por el gen *TP53* e inicialmente se describió como un oncogén celular porque se observó que su presencia podía immortalizar ciertos tipos de células y cooperar con otros oncogenes en la transformación celular. Sin embargo, fue hasta finales de la década de 1980 que se reveló que p53 es, de hecho, un supresor de tumores y que la evidencia de sus supuestas funciones oncogénicas se había obtenido erróneamente a partir de clones mutantes derivados de los tumores estudiados (Baker *et al.*, 1989; Eliyahu *et al.*, 1989; Finlay, Hinds and Levine, 1989). Por lo tanto, el potencial del p53 mutante (mtp53) para promover el cáncer fue uno de los primeros hallazgos en el campo de la investigación de p53.

El funcionamiento normal y bastante estudiado de la proteína supresora de tumores p53, ha mostrado evidencia de que se trata de un factor de transcripción que regula una amplia gama de funciones, como la respuesta al daño del ADN, la apoptosis y la senescencia; aunque se han realizado estudios en los que se demuestra que p53 silvestre (wtp53) puede tener otras actividades biológicas que son independientes de la transcripción (Vogelstein, Lane and Levine, 2000; Liu and Chen, 2006). Los niveles de p53 de tipo silvestre son muy bajos en las células normales; sin embargo, aumentan rápidamente en respuesta a varias formas de estrés celular como respuesta al daño del ADN, la hipoxia, el metabolismo oxidante o la señalización oncogénica, así como también en respuesta al envejecimiento, manteniendo de esta forma la integridad genómica y previniendo la formación de tumores (Murray-Zmijewski, Slee and Lu, 2008; Vousden and Prives, 2009; J Liu, Zhang and Feng, 2014).

El gen que codifica para la proteína p53 está constituido por aproximadamente 20300 nucleótidos agrupados en 11 exones que codifican para una proteína de 393 aminoácidos (aa) (<http://p53.bii.a-star.edu>). La proteína p53 consta de tres dominios funcionales principales (Lane, 1992; Oren, 2003; Joerger and Fersht, 2007):

- 1) Dominio amino(N)-terminal: alberga un dominio de activación transcripcional (transactivación) que comprende de los aa 1 al 44, el cual interactúa con proteínas reguladoras del complejo iniciador de la transcripción y co-activadores. Dentro del dominio N-terminal también se encuentra una secuencia de exportación nuclear (aa 11-24) y un sitio rico en prolina (aa 58-101), cuyo papel también es el de regular la función de p53.
- 2) Dominio central de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés) localizado en la región media de la proteína (aa 102-292). A través de este dominio, p53 se une a regiones promotoras de genes involucrados con las funciones reportadas, por ejemplo: en el arresto del ciclo celular y en apoptosis, entre otros.

3) Dominio carboxilo(C)-terminal (aa 293-393) que incluye secuencias de localización nuclear (aa 316-324, 370-376 y 380-386), una secuencia de exportación nuclear (aa 340-351) y una región de oligomerización (aa 325-356), en donde se regula la formación de tetrámeros de p53.

La estabilización y la activación completa de wtp53, como factor de transcripción, se regula principalmente a través de varias modificaciones post-traduccionales, mediante reacciones de acetilación, metilación, nedilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación (Brooks and Gu, 2003; Watson and Irwin, 2006; Olsson *et al.*, 2007) (Figura 3).

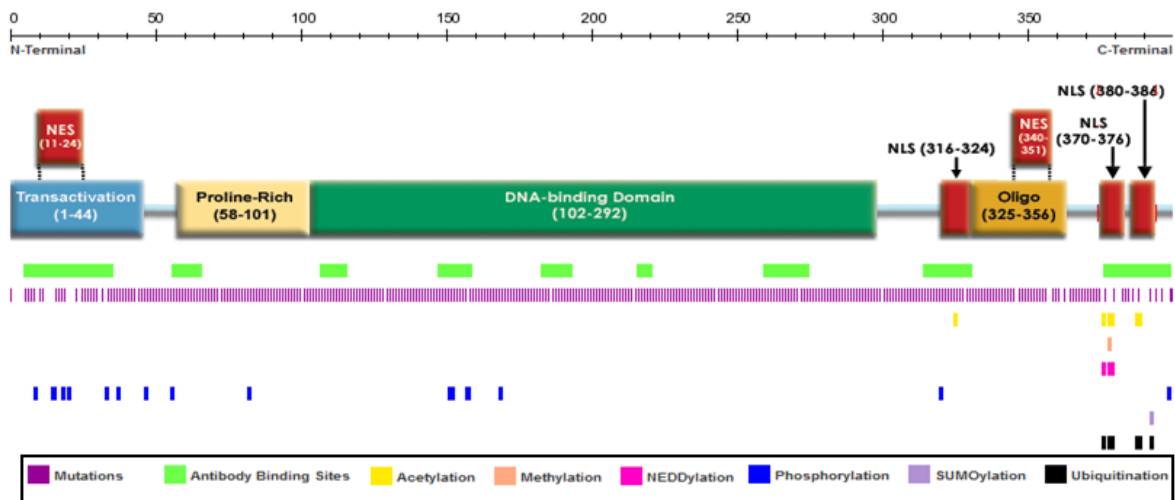


Figura 3. Dominios de la proteína p53.

Se muestran los sitios de mutación, de unión a anticuerpos y sitios específicos para modificaciones post-traduccionales a lo largo de toda la proteína p53 (Figura tomado de <http://p53.bii.a-star.edu.sg/index.php>).

Mutantes de p53

Las mutaciones en p53 encontradas en tumores están relacionadas con falta de control en el ciclo celular, apoptosis defectuosa y reparación ineficaz del ADN, dando como resultado una proliferación celular descontrolada e inestabilidad genómica (Soussi and Bérout, 2001; Resnick and Inga, 2003; Vousden and Ryan, 2009).

Contrario a lo que sucede con muchos otros genes supresores de tumores que son inactivados por mutaciones sin sentido o que provocan cambio en el marco de lectura, que inactivan

completamente la función de la proteína o que generan proteínas truncas; en el caso de p53 casi el 80% de sus mutaciones son sustitutivas, es decir, mutaciones puntuales. El cambio de UN solo nucleótido provoca el cambio de UN aminoácido en la secuencia de la proteína con la consecuente expresión de una proteína mutante (Olivier, Hollstein and Hainaut, 2010).

Se estima que las mutaciones somáticas de p53 son las más comunes en los tumores de humanos, ya que pueden ocurrir en casi todos los tipos de cáncer con tasas de mutación que pueden ser de hasta el 50% en diferentes tipos de cáncer, como: ovario, esófago, colorrectal, cabeza y cuello, laringe y pulmón; aproximadamente 5% en leucemia, sarcoma, cáncer testicular, melanoma maligno y con menor frecuencia en cáncer de cuello uterino (Soussi, 2000; Soussi *et al.*, 2006; Kandoth *et al.*, 2013; Leroy *et al.*, 2013), representado en la Figura 4.

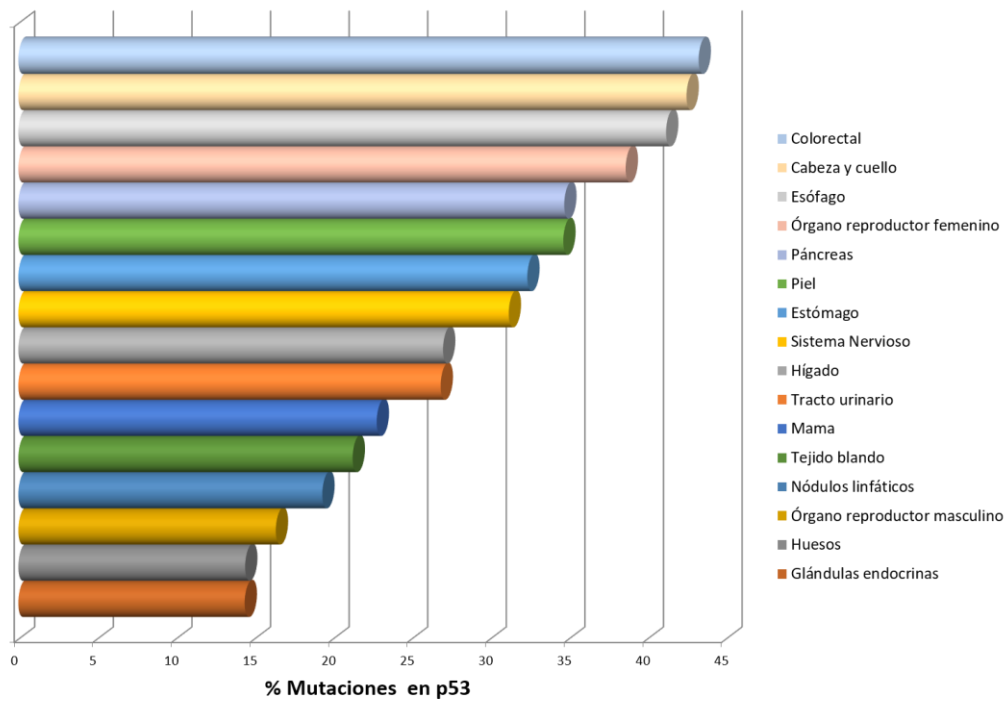


Figura 4. Porcentaje de mutaciones somáticas de p53 en los diferentes tipos de cáncer.

Se muestra la representación de los datos estadísticos sobre mutaciones de p53 en diferentes tipos de cáncer. Datos tomados de la base de datos de TP53 de la IARC (Agencia Internacional para la investigación en cáncer).

Aunque estas mutaciones se han reportado a lo largo de toda la secuencia del gen *TP53*, alrededor de un tercio de estas mutaciones se encuentran en seis residuos⁶: R175, G245, R248, R249, R273 y R282, que corresponden al dominio de unión al ADN de p53 y se conocen como “hotspots⁷” mutacionales, tanto en tumores espontáneos como hereditarios (Figura 5) (Varley, 2003; Strano, Dell’Orso, Di Agostino, *et al.*, 2007). Las alteraciones somáticas del gen *TP53* son frecuentes en la mayoría de los cánceres humanos, mientras que las mutaciones en la línea germinal *TP53* ocurren con mucho menor frecuencia como un tipo raro de predisposición al cáncer conocido como síndrome de Li-Fraumeni (LFS, por sus siglas en inglés) (Hainaut and Hollstein, 2000).

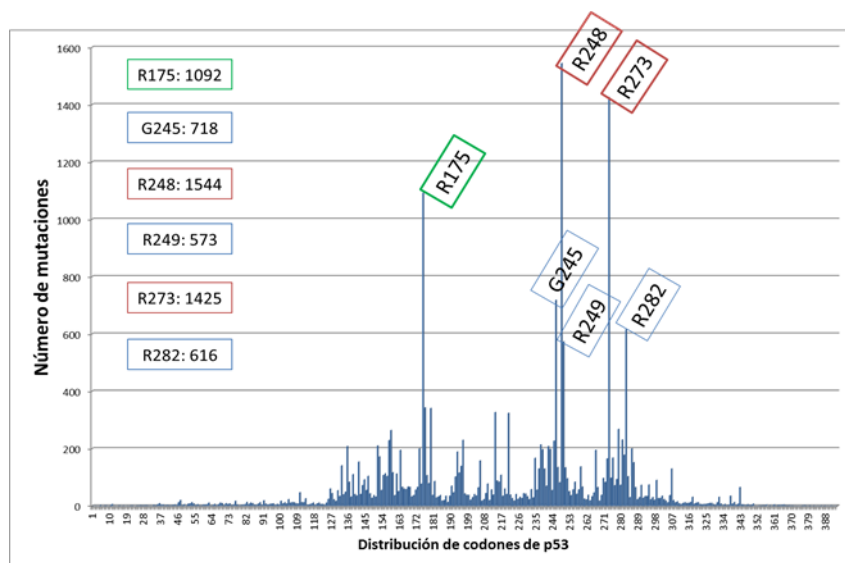


Figura 5. Distribución de codones de p53 según su frecuencia de mutación.

Se muestra la distribución de la frecuencia de mutaciones de p53, tomando los datos para diferentes tipos de cáncer mostrados por la Agencia Internacional para investigación en cáncer (IARC).

Las mutaciones son más frecuentes en etapas avanzadas o en los subtipos de cáncer con comportamiento agresivo (como el cáncer de mama triple negativo o con fenotipo de ERBB2

⁶ Para el objetivo de este trabajo, decidimos realizar la simplificación de la mención de las mutantes de p53 de la siguiente manera: colocar el prefijo p53 seguido de la mutación (por consenso, al mencionar las mutaciones se coloca la letra del residuo de aminoácido que es silvestre, seguido de la posición del codón de la secuencia de aminoácido que está modificada y al final se coloca la letra del residuo de aminoácido por el que se sustituye el silvestre. En este caso p53 (R) corresponde a una arginina (248) corresponde al codón en el que se refleja la mutación.

⁷ Hotspot: Zonas dentro de las secuencias genómicas en las que se presenta una alta tasa de mutaciones

amplificado) (Y Wang *et al.*, 2004; Yun Wang *et al.*, 2004; Langerod *et al.*, 2007a). En los tipos de cáncer en el que se han reportado bajas tasas de mutación, p53 a menudo se inactiva por mecanismos alternativos como el virus del papiloma humano de alto riesgo en el cáncer de cuello uterino (Lagunas-Martinez, Madrid-Marina and Gariglio, 2010).

El hecho de que las proteínas mutadas de p53 sean reportadas con una elevada expresión en muchos tipos de cáncer humano, sugiere la existencia de una fuerte selección de este fenómeno en la carcinogénesis (Weisz, Oren and Rotter, 2007). Los datos sobre la relevancia de los diferentes tipos de mutación de p53 que se presentan en los diferentes tipos de cáncer humano se pueden revisar ampliamente a través de la base de datos generada por la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) (<http://www-p53.iarc.fr>), un recurso que compila todas las variantes del gen *TP53* que han sido reportadas, incluyendo información sobre el fenotipo tumoral, características del paciente, impacto estructural y funcional de las mutaciones, entre otras (Petitjean *et al.*, 2007).

Estudios *in vitro* sobre la estructura tridimensional de proteínas han permitido clasificar a las proteínas mutantes de p53 en dos categorías principales de acuerdo con su efecto sobre la estabilidad termodinámica de la proteína p53 (Bullock and Fersht, 2001): mutaciones de "contacto" con el ADN y mutaciones "conformacionales". Las mutaciones de "contacto" afectan residuos implicados directamente en la unión al ADN, como por ejemplo: p53R248 y p53R273. Las mutaciones "conformacionales" comprende mutaciones que causan distorsiones conformacionales locales o globales (como en los residuos p53R175, p53R249 y p53G245), que también afectan, aunque de manera indirecta, la unión al ADN (Cadwell and Zambetti, 2001; Brosh and Rotter, 2009).

En cuanto a su función, se han establecido tres efectos fenotípicos de las mutaciones en *TP53* que se mencionan a continuación:

- 1) Pérdida de función (LOF, por sus siglas en inglés), provocan la pérdida parcial o completa de su función silvestre (Kato *et al.*, 2003)
- 2) Efecto dominante negativo (DN) sobre el alelo de tipo silvestre restante, a través de la heterooligomerización de la proteína mutante con la proteína de tipo silvestre (Milner and Medcalf, 1991; Milner, Medcalf and Cook, 1991)
- 3) Ganancia de función (GOF, por sus siglas en inglés) que implica nuevas actividades oncogénicas de p53 mutante, no presente en la p53 de tipo silvestre (Sigal and Rotter, 2000; Strano, Dell'Orso, Mongiovi, *et al.*, 2007).

Como menciona el punto número 3, algunas mutaciones de p53 le pueden permitir la adquisición de nuevas funciones que son independientes de las funciones normales de la proteína silvestre. Estas nuevas propiedades adquiridas, denominadas como ganancia de función (GOF) se han demostrado experimentalmente en sistemas *in vitro* e *in vivo* con ausencia de p53 silvestre y funcional. La ganancia de función de la mutantes de p53 ha cobrado gran importancia debido a que se ha observado que contribuye al desarrollo del cáncer, mediante la unión a nuevas proteínas y/o favoreciendo transcripción de oncogenes (Brosh and Rotter, 2009).

Existen reportes en los que se ha comprobado que mutantes de p53 también pueden activar regiones promotoras de genes virales y celulares que normalmente no son regulados por p53 silvestre, como por ejemplo: MDR1, EGFR, PCNA, VEGFR, IL-6, BFGF, HSP70, BAG-1 y c-myc (Cadwell and Zambetti, 2001; Weisz, Oren and Rotter, 2007). Estos genes se encuentran involucrados principalmente en proliferación celular, contrario a la función que desempeñan los genes que de manera normal son inducidos por p53 silvestre. Además de la proliferación celular, las mutantes de p53 pueden favorecer otros procesos que se han denominado como oncogénicos como, por ejemplo: tumorigenicidad aumentada, crecimiento celular independiente del anclaje y aumento de la tasa de crecimiento, aumento de la metástasis e invasividad, disminución de la sensibilidad a los fármacos quimioterapéuticos (Blandino, Levine

and Oren, 1999), interrupción del punto de control del huso, actividad de la topoisomerasa I activada e inducción de la amplificación génica.

Es importante notar que existe heterogeneidad bioquímica y biológica de los efectos de estas mutantes lo cual puede deberse a la naturaleza del residuo resultante, indicando que no todas las mutaciones son equivalentes (Soussi and Lozano, 2005). Por ejemplo, la mutante p53R175H de p53 es capaz de inhibir la transcripción del gen pro-apoptótico Fas; sin embargo la inhibición de este gen no es tan evidente con otras mutantes (codones 248 y 273) (Zalcenstein *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha observado que células que expresan la mutante p53R248Q presentan resistencia a doxorubicina y paclitaxel a diferencia de las células que contienen la mutante p53R273C (Chan and Lung, 2004). Junk y colaboradores, observaron que la introducción de la mutante p53R273H aumenta el potencial migratorio e invasivo de células epiteliales mamarias humanas, contrario a p53R175H con la cual no se ve efecto (Junk *et al.*, 2008).

Los datos presentados sugieren que GOF tiene un verdadero papel pato-fisiológico que puede conducir a un desarrollo agresivo del cáncer y a un peor pronóstico para los pacientes en los que se detecta la presencia de este tipo de mutaciones. Por lo tanto, actualmente la investigación sobre p53 no sólo debe limitarse al estudio de los efectos de la pérdida de funciones de p53 silvestre, sino además a la identificación de mutaciones en p53 en los tumores, que pueden proveer de ventajas adicionales en el desarrollo de los tumores en diversos tipos de cáncer humano. Además, el mecanismo molecular de los fenotipos GOF y la regulación positiva de la expresión génica por mutantes de p53 aún no se ha determinado con claridad.

ONCOGENES

Una alteración (especialmente diversos tipos de mutación) en un oncogén es análoga a un acelerador atascado en un automóvil; el automóvil aún avanza incluso cuando el conductor quita su pie de él (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Un proto-oncogén⁸ codifica de manera normal para proteínas que controlan principalmente la proliferación celular. En el momento en que los proto-oncogenes son alterados hacia el favorecimiento en el desarrollo de cáncer, se les denomina oncogenes. La activación de oncogenes puede deberse a: 1) reordenamientos cromosómicos, 2) mutaciones y 3) amplificación génica. Estos tres mecanismos causan una alteración en la estructura del oncogén, como parte de la transformación oncogénica que finalmente genera una proliferación incontrolada de células; favoreciendo de esta forma el desarrollo de cáncer manifestada en una ventaja de crecimiento o una mayor supervivencia de las células portadoras de tales alteraciones (Croce, 2008). Es importante señalar que, a nivel genómico, solo se requiere un único alelo oncogénico para alterar la función normal del gen debido a su propiedad dominante.

Los productos de los oncogenes se pueden clasificar en:

- 1) Factores de transcripción. Los factores de transcripción a menudo son miembros de familias (que involucran una gran cantidad y diversidad de genes) que comparten dominios estructurales comunes. Para actuar, muchos factores de transcripción requieren interacción con otras proteínas (Croce, 2008).
- 2) Remodeladores de la cromatina. Las modificaciones en el grado de compactación de la cromatina juegan un papel crítico en el control de la expresión génica, la replicación y la reparación, y de la segregación cromosómica. El patrón de modificación de las histonas constituye un código epigenético⁹ que determina la interacción entre los nucleosomas y las proteínas asociadas a la cromatina (Strahl and Allis, 2000). Estas interacciones, a su

⁸ Proto-oncogén: Gen que participa en el crecimiento normal de las células. Las mutaciones en un proto-oncogén pueden hacer que éste se convierta en un oncogén, que puede hacer que se formen células cancerosas.

⁹ La Epigenética se refiere a los cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina, por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo. Las modificaciones epigenéticas son metilación del ADN y modificaciones de histonas

vez, determinan la estructura de la cromatina y su capacidad transcripcional (Croce, 2008).

- 3) Factores de crecimiento. La activación constitutiva de un gen del factor de crecimiento puede contribuir a la transformación maligna (Croce, 2008).
- 4) Receptores del factor de crecimiento. Los receptores del factor de crecimiento están alterados en muchos tipos de cáncer (Heldin, 1995). En muchos tumores, una delección del dominio de unión al ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una proteína transmembrana con actividad de tirosina quinasa, causa la activación constitutiva del receptor en ausencia de unión al ligando (Arteaga, 2002).
- 5) Transductores de señales. La unión del receptor tirosina quinasa al ligando apropiado provoca la reorganización de los receptores y la autofosforilación de tirosinas en la porción intracelular de las moléculas (Pawson and Warner, 2007).
- 6) Reguladores de apoptosis. Existen dos vías principales que conducen a la apoptosis: a través de la generación de estrés celular como consecuencia de daño celular, activación de oncogenes o privación de factores de crecimiento; y mediante la activación del receptor de muerte celular, activada mediante la unión de sus ligandos FasL, TRAIL y TNF (Croce, 2008).

Las investigaciones que se han realizado para determinar los oncogenes implicados en el inicio y la progresión de los tumores han permitido la identificación de moléculas blanco para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer. La ventaja de la terapia dirigida es que permite actuar sobre las células cancerosas que dependen del producto oncogénico para su crecimiento y supervivencia. De esta forma, las células cancerosas son más sensibles al tratamiento que las células normales. No todos los blancos terapéuticos son equivalentes, por lo que se requieren múltiples fármacos para actuar contra los múltiples blancos involucrados en el desarrollo del cáncer (Croce, 2008).

Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2)

El gen *ERBB2* codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2, también identificado como HER2 (por sus siglas en inglés – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 -) o como Neu por su relación con un oncogén identificado en ratones (Hynes and Stern, 1994; Park *et al.*, 2008). Debido a que el gen *ERBB2* es importante para el desarrollo de tejidos en ciertas etapas del desarrollo normal de un organismo, pero se desregula en cáncer, es que se le denomina como un proto-oncogén. La expresión del receptor HER2 puede ser normal en ciertos tipos de tejidos y en ciertas etapas del desarrollo de un organismo; por lo tanto, depende de un sistema de regulación muy eficiente que permite el aumento o disminución de su expresión. El papel crítico de HER2 como un proto-oncogén se ha establecido firmemente por numerosos estudios preclínicos y clínicos (Yan *et al.*, 2014).

HER2 es un miembro de la familia del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), que cumplen actividades de receptor Tirosina - Kinasa (RTK, por sus siglas en inglés). Esta familia participa en la regulación de la proliferación celular, la angiogénesis, la adhesión celular, la motilidad celular, el desarrollo y la organogénesis, mediante la activación de diferentes vías de señalización (Roskoski Jr., 2014). En la Figura 6 es posible identificar a la familia de EGFR, conformada por cuatro miembros estrechamente relacionados: EGFR, *ERBB2* (Neu, HER2), *ERBB3* (HER3) y *ERBB4* (HER4) (Hynes and Stern, 1994).

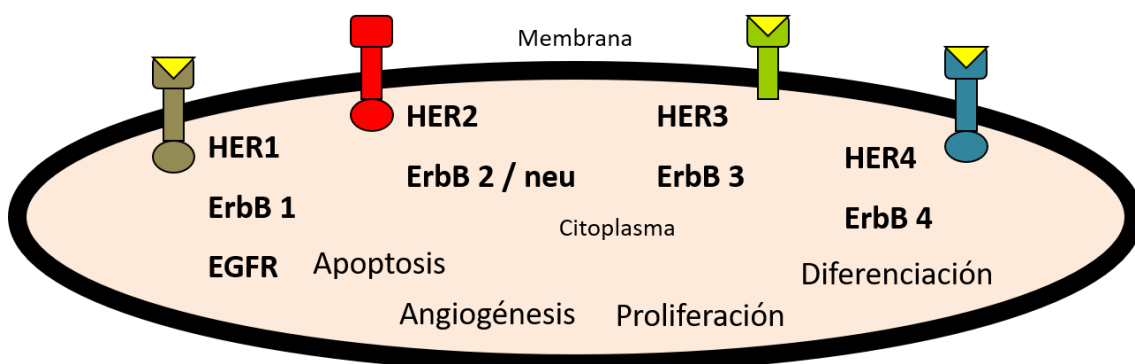




Figura 6. Familia de receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico.

Se muestra una representación de los receptores transmembranales con actividad tirosina cinasa (RTK), que forman parte de la familia del Factor de Crecimiento Epidérmico. La parte del receptor que se encuentra por fuera de la célula

contiene sitios de unión a ligando; una vez lleva a cabo la unión, los receptores sufren un cambio estructural que expone sitios de señalización del tipo tirosina cinasa . EGFR y HER4 son receptores funcionales que se activan por unión de sus ligandos específicos . El receptor HER3 también tiene sitios de unión a ligando, pero no tiene actividad funcional de tirosina cinasa. De manera excepcional, en el receptor HER2 no se han identificado sitios de unión a ligando, pero se sabe que tiene una configuración permanentemente activa. La señalización que desencadenan estos receptores contribuye a procesos involucrados en procesos como angiogénesis, apoptosis, proliferación y diferenciación.

Como todos los RTK, estos receptores existen como monómeros en la membrana celular y dependen de la unión con sus respectivos ligandos específicos para su activación, que provoca la dimerización y trans-fosforilación de sus dominios intracelulares (Yarden and Pines, 2012). A esta familia de receptores se unen diferencialmente 11 ligandos, y aunque no se ha identificado un ligando de activación directo para HER2, si se ha observado que este receptor puede interactuar con los otros miembros de la misma familia, previamente activados por ligando. Estudios estructurales sobre el receptor HER2 han permitido concluir que este receptor se expresa en una forma constitutivamente activa, y debido a esto, el receptor HER2 se conoce como el compañero de dimerización preferido para los otros miembros de la familia (Graus-Porta *et al.*, 1997). Cuando existe mayor densidad de receptores HER2 también se pueden formar homodímeros capaces de favorecer la señalización al interior de la célula (Bazley and Gullick, 2005).

La función de estos receptores ha sido más fácil de evaluar a nivel celular que a nivel de organismo. Especialmente en el caso de HER2, este receptor se expresa en una variedad de tipos de células y tejidos. Estudios a través de métodos inmunohistoquímicos señalan que la expresión del receptor HER2 se encuentra activa durante las etapas embrionarias del desarrollo, en las tres capas germinales y especialmente identificada en el sistema nervioso, en el epitelio respiratorio y digestivo. Hacia el final de la gestación y después del nacimiento la distribución del receptor en los tejidos cambia. En animales adultos y en cultivos celulares, por ejemplo, la tinción inmunoreactiva para HER2 se localizó en niveles moderados en células de origen epitelial o de mesénquima, pero no fue detectable en el tejido conectivo ni en el sistema nervioso. En la piel

humana, HER2 se expresa en los niveles más altos en la epidermis media y superior, y su nivel de expresión es bajo o ausente en células basales (Hynes and Stern, 1994). La expresión de los receptores de la familia de EGFR, se ve en una variedad de tejidos a lo largo del desarrollo donde, como se describe a continuación, desempeñan funciones esenciales durante la embriogénesis al controlar la proliferación y diferenciación de las células.

Si bien HER2 está ampliamente distribuido, la actividad de señalización está sin duda regulada por la presencia de sus socios transmodulantes. Por ejemplo, las interacciones más estudiadas en el desarrollo de cáncer, son las que involucran a HER2 con EGFR y HER3 (Olayioye *et al.*, 2000; Holbro, Civenni and Hynes, 2003). La formación de estos heterodímeros frecuentemente aumenta la señalización relacionada con la proliferación y la migración celular (Hudelist *et al.*, 2003; Knowlden *et al.*, 2003). Las mutaciones y/o desregulación de estos receptores han sido correlacionadas con el desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer (Yarden and Sliwkowski, 2001; Mendelsohn and Baselga, 2003).

El modelo más empleado para el estudio del efecto de la sobreexpresión del receptor HER2 es el cáncer de mama. La importancia de *ERBB2* en el cáncer de mama humano primario se destaca por el hecho de que el 20% -30% de los cánceres de mama humanos muestran niveles elevados del gen *ERBB2* debido a la amplificación genómica de este protooncogén (Slamon *et al.*, 1987, 2001; Winston, Ramanaryanan and Levine, 2004).

La amplificación del gen *ERBB2* o la sobreexpresión del receptor HER2 además se ha correlacionado con un mal pronóstico en cáncer de mama y con el desarrollo de otros tipos de cáncer humano, como de colon (Schuell *et al.*, 2006), vejiga (Eltze *et al.*, 2005), ovario (McKenzie *et al.*, 1993), endometrio (Hetzl *et al.*, 1992), pulmón (Hirashima *et al.*, 2001), cérvico-uterino (Mitra *et al.*, 1994), cabeza y cuello (Beckhardt *et al.*, 1995), esófago (Reichelt *et al.*, 2007), estómago (Jaehne *et al.*, 1992) y piel (De Potter *et al.*, 2001).

Existen algunos tumores con niveles elevados tanto de proteína como de ARNm, pero sin amplificación a nivel de ADN. Para algunos tipos de tumores, como el de pulmón, vejiga y esofágico, la sobreexpresión de la proteína del receptor HER2 se detecta con mayor frecuencia que la amplificación del gen, lo que nos pueda dar indicio de que existan mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales alternativos que controlen la expresión de HER2 (Hynes and Stern, 1994). En un carcinoma gástrico con una proteína HER2 elevada y sin amplificación génica, se detectaron niveles altos de unión de una proteína a la caja TATA del promotor del gen *ERBB2*. La regulación postranscripcional también puede ser importante en la sobreexpresión de HER2.

La importancia que ha cobrado este receptor en el desarrollo de cáncer ha llevado a la investigación y al desarrollo de terapias anti-HER2. La terapia anti-HER2 ha sido aprobada en la actualidad para cáncer de mama, gástrico y gastroesofágico, cuando este receptor está sobreexpresado.

Elucidar los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la desregulación del gen *ERBB2* sería un paso importante para el entendimiento de la patogénesis del subgrupo particular de tumores que sobre-expresan HER2 en cáncer de mama, y en otros tipos de cáncer en los que ya se ha establecido su relación (Dillon *et al.*, 2007), así como para encontrar nuevas alternativas de terapia.

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

La epigenética se define como rasgos hereditarios que no están vinculados a cambios en la secuencia del ADN; sin embargo, la epigenética se ha utilizado para describir los mecanismos por los cuales las proteínas asociadas a la cromatina y las modificaciones postraduccionales (MPT) de las histonas regulan la transcripción. La regulación epigenética es importante para mantener la identidad celular y está implicada en procesos fundamentales como la proliferación,

el desarrollo, la diferenciación y la integridad del genoma. La regulación epigenética de un gen se puede determinar a través de la metilación del ADN, la remodelación del nucleosoma, el intercambio de variantes de histonas y las MPT de las histonas (Egger *et al.*, 2004; Helin and Dhanak, 2013).

Las modificaciones epigenéticas son generalmente marcas estables, resultantes de la modificación covalente de la cromatina, que determinan la expresión génica de una manera que es hereditaria en todas las divisiones mitóticas y como ya se mencionó, esto no implica que deba existir un cambio en la secuencia del ADN. Las modificaciones epigenéticas son características de diferentes tipos de células y, de hecho, desempeñan un papel clave en la definición del transcriptoma, que en última instancia determina la identidad de cada tipo de célula (Fisher, 2002; Ballestar and Esteller, 2008). Los cambios aberrantes en el patrón de modificaciones epigenéticas darían como resultado una actividad nuclear alterada y, por lo tanto, un transcriptoma alterado, que transformaría la identidad de la célula.

Parte de los avances realizados para comprender los mecanismos de regulación en genes eucarióticos ha sido el reconocimiento del papel de la cromatina, específicamente las modificaciones de histonas, en la modulación de la actividad génica. Durante los años 80 y principios de los 90, los investigadores se centraron en el estudio y la identificación de los factores de transcripción, que se consideraron los principales actores en la regulación de genes. En las células eucariotas, el ADN se empaqueta en cromatina, cuya subunidad repetitiva es el nucleosoma, una partícula caracterizada por un núcleo proteico que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Considerando que, la porción central de estas proteínas está directamente involucrada en el ensamblaje del octámero de histonas, sus extremos N-terminales sobresalientes se caracterizan por la presencia de muchos residuos conservados que son diana para una variedad de MPT.

La mayor parte de la cromatina existe en un estado en el que los nucleosomas se empaquetan de manera compacta para formar una denominada "estructura de cromatina cerrada", que, por

ejemplo, es típica de la cromatina silenciada transcripcionalmente (Figura 7). Por medio de microscopía óptica, esta cromatina cerrada, también denominada como heterocromatina aparece característicamente como las áreas densamente teñidas de los núcleos.

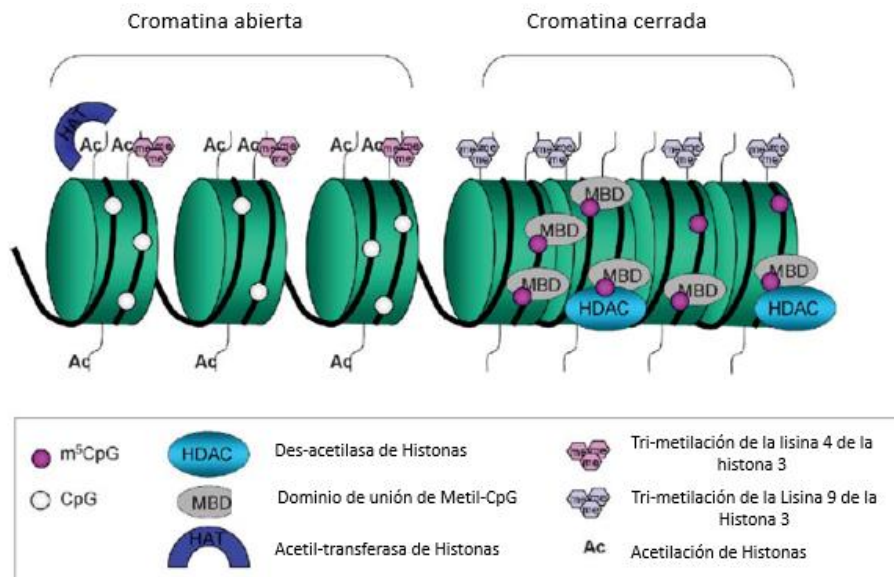


Figura 7. Estructura de la cromatina en promotores activos (cromatina abierta) y promotores inactivos (cromatina cerrada).

En la cromatina abierta o activa transcripcionalmente, se caracteriza por citosinas desmetiladas y colas de histonas acetiladas; además de la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. En cromatina cerrada, las citosinas metiladas se unen a MBDs que atraen HDACs, que remueven grupos acetilo de las colas de histonas; el ADN lleva la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 como una marca de silenciamiento. Figura modificada de (GRØNBAEK, HOTHER and JONES, 2007).

A la inversa, las partes que se observan ligeramente teñidas de los núcleos son representativas de la eucromatina, en la que los nucleosomas son menos compactos y forman una "estructura de cromatina abierta" accesible a la maquinaria transcripcional (Figura 7). Estas áreas transcripcionalmente permisivas comprenden solo una parte menor del genoma. El hecho de que la transcripción se produzca o no dentro de estas regiones está regulado por una serie de procesos dinámicos en los que intervienen factores de transcripción y remodeladores de la cromatina, en un contexto celular particular (GRØNBAEK, HOTHER and JONES, 2007).

Las modificaciones de histonas también se han definido como modificadores epigenéticos. Las modificaciones postraduccionales de las histonas, incluidas la acetilación y la metilación de los residuos de lisina conservados en los extremos amino-terminales, se han estudiado

detenidamente en los últimos años. En general, la acetilación de las histonas marca regiones activas transcripcionalmente (eucromatina), mientras que las histonas hipoacetiladas se encuentran en regiones heterocromáticas, que son transcripcionalmente inactivas. La metilación de la histona puede ser un marcador para las regiones activas e inactivas de la cromatina. La metilación de la lisina 9 en el extremo N de la histona H3 (H3-K9) es un sello distintivo del ADN silencioso y se distribuye globalmente en regiones heterocromáticas como los centrómeros y los telómeros. También se encuentra en el cromosoma X inactivo y en los promotores silenciados. En contraste, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3-K4) denota actividad y se encuentra predominantemente en promotores de genes activos (Egger *et al.*, 2004).

La modulación de la estructura de la cromatina y la posterior regulación de la expresión génica se controlan mediante la metilación directa del ADN [por las metiltransferasas de ADN (DNMT)] y / o la modificación estructural de los residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de las proteínas de las histonas mediante enzimas nucleares, incluidas las transferasas de acetil (HAT), histona desacetilasas (HDAC), arginina metiltransferasas (RMT), lisina metiltransferasas (KMT) y lisina desmetilasas (KDM). La alteración del estado de metilación, acetilación o fosforilación de cualquiera de las unidades nucleosómicas influye en la condensación de la cromatina, lo que facilita o impide la susceptibilidad del ADN a la unión de factores de transcripción y el inicio de la transcripción. En conjunto, la actividad de estas enzimas regula el epigenoma, el estado reversible y heredable de la información genética. Recientemente, la epigenética es el campo de estudio asociado con la comprensión de cómo estos mecanismos contribuyen tanto a los procesos fisiológicos productivos como a las enfermedades humanas tan dispares como los trastornos neuropsiquiátricos del desarrollo, la diabetes y los hábitos perjudiciales inducidos por fármacos, así como la Inflamación, y la progresión y el desarrollo del cáncer (Decarlo and Hadden, 2012).

En la Figura 8 se muestra una imagen como resumen de las interacciones que existen entre los factores genéticos y epigenéticos en el desarrollo del cáncer:

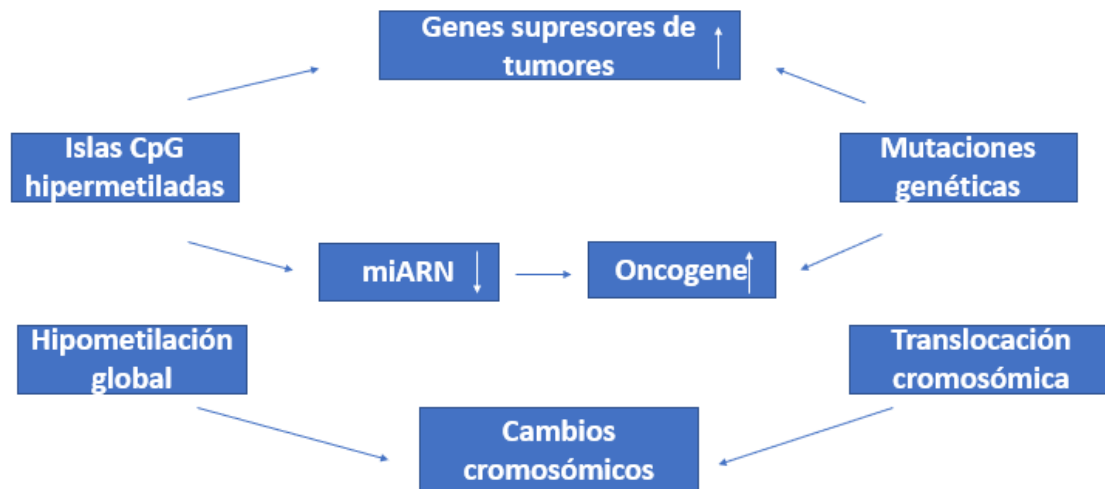


Figura 8. El cáncer como resultado de desregulaciones genéticas y epigenéticas.

La hipermetilación de la isla CpG de un promotor de genes supresores de tumores resulta en una inactivación estable. Este mecanismo también inactiva microRNAs (miRNAs), que regula oncogenes. La hipometilación global ha sido asociada con inestabilidad cromosomal. Las mutaciones genéticas afectan tanto la inactivación de genes supresores de tumores, como la activación de oncogenes. La translocación cromosomal tiene gran impacto en muchos procesos diferentes. Figura modificada de (Ballestar and Esteller, 2008).

Debido a que muchas enfermedades humanas, incluido el cáncer, tengan una etiología epigenética y que los cambios epigenéticos sean reversibles, se ha realizado investigación para que las enzimas responsables del mantenimiento de los patrones epigenéticos sean objetivo potencial para varios compuestos que abren la posibilidad del diseño de nuevas familias de agentes terapéuticos.

En la actualidad, existen varias moléculas pequeñas que funcionan mediante la modulación de las actividades epigenéticas que ya están aprobadas por la FDA, lo que indica la viabilidad clínica de una amplia clase de compuestos farmacológicos. El campo de la investigación basada en epigenética y el desarrollo de fármacos se está expandiendo rápidamente a medida que se explora su papel en una variedad de estados de enfermedades crónicas (Egger *et al.*, 2004; Ballestar and Esteller, 2008; Decarlo and Hadden, 2012).

ANTECEDENTES

En trabajos anteriores realizados por el grupo de trabajo, se había observado mediante ensayos de inmunohistoquímica que la expresión de la proteína de HER2 en queratinocitos inmortalizados con la proteína oncogénica E6 del VPH-16 se encontraba aumentada en comparación con queratinocitos inmortalizados con la oncoproteína E7 de VPH-16 (Figura 9A). Estos resultados fueron correlacionados con resultados a nivel de ARN mensajero (ARNm) de *ERBB2* (Figura 9B).

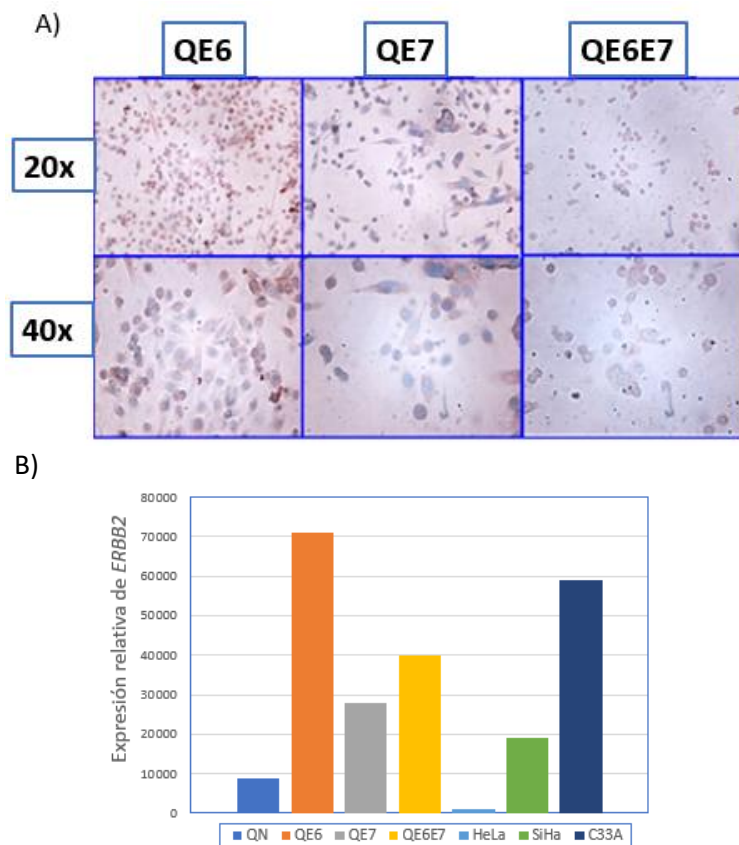


Figura 9. Ensayos preliminares en la evaluación de HER2 debido a la influencia de oncoproteínas del VPH. Análisis de la expresión de HER2 en queratinocitos tranfectados con las oncoproteínas E6 (QE6), E7 (QE7) o ambas (QE6E7). A) Inmunohistoquímica de HER2. B) Expresión de ARN mensajero de *ERBB2*. En este caso se realizó una comparación con líneas celulares de cáncer cervical, relacionadas generalmente con infecciones por VHP.

Pensando en una inactivación de p53 que pudiera provocar un aumento en la expresión de HER2, encontramos que Yang y colaboradores (Yang, Lee and Kang, 2006), observaron que la expresión de HER2 está regulada positivamente por la inactivación de p53. Empleando un sistema de recombinación Cre-loxP en las células mamarias (MEC) de un ratón transgénico

condicional que expresa la proteína p53 flanqueada por sitios loxP, p53_{fp/fp}, lograron la expresión de una proteína p53 deficiente de los exones 5 y 6, importantes en la unión de p53 con el ADN (p53_{Δ5,6}), por lo que es inactiva transcripcionalmente. Observaron que la exposición de MEC p53_{fp/fp} a la recombinasa Cre resultaba en un incremento significativo en (p53_{Δ5,6}) y en los niveles de HER2. Al intentar dilucidar cómo es que ocurría este fenómeno, encontraron que en células MEC con p53 inactivo, AP-2 tiene mayor actividad en la región promotora del gen *ERBB2* y que PKA también se encuentra activo, favoreciendo el aumento en la expresión de HER2. Este trabajo apoya de manera importante nuestros resultados preliminares, mostrando que la inactivación de p53 pudiera favorecer un aumento en la expresión de HER2.

En un contexto celular similar al de nuestros resultados preeliminares, Narisawa-Saito y colaboradores en el 2007 (Narisawa-Saito *et al.*, 2007) realizaron un estudio en el que se correlaciona la inactivación de p53 por efecto de la oncoproteína E6 del Virus del Papiloma Humano 16 (VPH16-E6) con la expresión de HER2. E6 propicia la degradación de p53 ya que al unirse a E6AP, el complejo resultante actúa como ubiquitina ligasa para la degradación de p53. Mediante la transfección de la oncoproteína E6 en queratinocitos inmortalizados demostraron que existe una correlación entre la disminución de la expresión de p53 y la sobreexpresión de HER2, de igual manera lo demostraron en líneas celulares de cáncer cervical con infección por VPH16. Un dato interesante en este trabajo es el hecho de que además emplearon una línea celular negativa para VPH: C33A, en la que también se observó sobreexpresión de HER2 incluso mayor a la observada en las líneas positivas para infección por virus de papiloma humano.

Con base en el trabajo anterior, se planteó la posibilidad de analizar la expresión de la proteína HER2 por ensayos de Western blot, en diversas líneas celulares derivadas de cancer cervical, como: SiHa, HeLa y C33A (Figura 10).

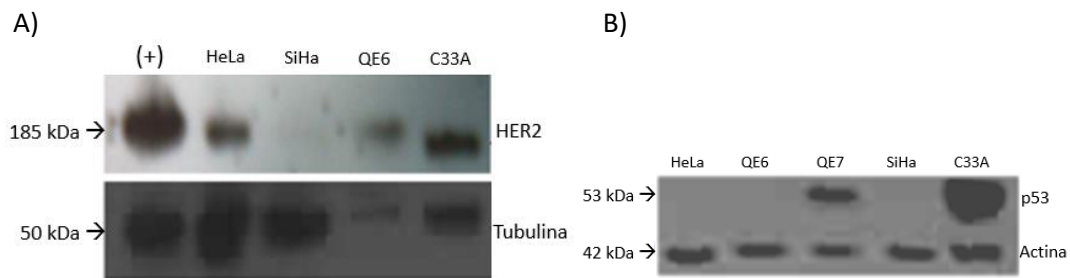


Figura 10. Western blot para HER2 y p53 en diferentes líneas de cáncer cervical

A) Western Blot para determinar la expresión de la proteína HER2 empleando como control de carga Tubulina. El control positivo empleado fue una línea celular de cáncer de mama en la que se conoce la sobreexpresión de HER2. B) Western Blot para determinar la expresión la proteína p53 empleando como control de carga Actina. Se evaluaron queratinocitos tranfectados con las oncoproteínas E6 (QE6) o E7 (QE7), así como en diferentes líneas celulares de cáncer cervical.

De manera consistente, observamos que a pesar de que en la línea celular C33A se detectan altos niveles de p53, también hay expresión importante de HER2 comparando con las otras líneas de cáncer cervical. Es importante resaltar que esta línea celular expresa una de las mutantes más frecuentes de p53: **p53R273C**. Sin embargo, en el trabajo de Narisawa y colaboradores, no se investigó si existía una contribución de la mutante de p53 en el efecto de sobreexpresión de HER2. En la literatura, se reportó que la oncoproteína E6 de VPH degrada a p53 y que algunas mutaciones en esta proteína la estabilizan, como en el caso de C33A (Wrede *et al.*, 1991).

Ya específicamente en la relación de proteínas mutantes de p53 (mtp53), hay estudios en los que tanto mutaciones somáticas en *TP53*, como la amplificación del gen HER2 se correlacionan con un riesgo elevado de recurrencia del cáncer de mama y con una elevada mortalidad global en comparación con sólo una o ninguna alteración (Bull *et al.*, 2004; Duffy, Synnott and Crown, 2018). En un estudio con muestras clínicas de cáncer de mama se encontró una asociación entre la presencia de diversas mutaciones de p53 y el subgrupo de pacientes HER2 positivo, sugiriendo que la mutación de p53 podría estar asociada con el desarrollo de cáncer de mama más agresivo (Langerod *et al.*, 2007b; Schon and Tischkowitz, 2018). Además, se ha observado que pacientes portadores de mutaciones en *TP53* muestran una probabilidad significativamente mayor de desarrollar cáncer de mama con amplificación del gen HER2 (83%) en comparación una cohorte

de casos de cáncer de mama de aparición temprana (16%) (Wilson *et al.*, 2010a). Un estudio más amplio que apoya esta asociación, encontró que los pacientes con cáncer de mama que albergan una mutación de línea germinal del gen *TP53*, tiene una prevalencia significativamente mayor en tumores positivos para HER2, en comparación con pacientes en los que no se determinó ningún tipo de mutación (Melhem-Bertrandt *et al.*, 2012). Es importante señalar que los estudios mencionados anteriormente son sólo asociaciones clínicas y no se propone ningún mecanismo para esta relación.

Planteamiento del problema y relevancia

El aumento de la mortalidad a causa del cáncer es un importante problema de salud en México y en el Mundo. El desarrollo de cáncer se debe en parte a la inactivación de genes supresores de tumor y activación de oncogenes. La sobreexpresión y/o amplificación del oncogén HER2 está asociada con el desarrollo de varios tipos de cáncer como mama, colon, vejiga, ovario, endometrio, pulmón, etc. Además, el gen supresor de tumor p53 se encuentra mutado en más del 50% de todos los tipos de cáncer. Interesantemente, existen reportes que sugieren que p53 puede regular negativamente la expresión de HER2 y que la inactivación de p53 (E6 de HPV16) favorece un aumento en los niveles de proteína de HER2. Asimismo, en otros reportes se ha observado que la presencia de mutaciones en p53 coincide con la sobreexpresión de HER2; sin embargo, el mecanismo no ha sido estudiado, por lo que sería importante elucidar si existe una relación directa entre mutantes de p53 y la sobreexpresión de HER2 en cáncer.

HIPÓTESIS

“Proteínas mutantes de p53 inducirán la sobreexpresión del receptor HER2 en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer”.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si proteínas mutantes de p53 inducen la sobreexpresión del receptor HER2 en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer y proponer un mecanismo posible para la explicación de dicho fenómeno.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de expresión de *ERBB2* (ARNm) y HER2 (proteína) en líneas celulares de cáncer cervical (HeLa, C33A), de ovario (OVCAR-3) y mama (MCF-7 y SKBR3).
2. Determinar los niveles de expresión de p53 en líneas celulares de cáncer cervical (HeLa, C33A), de ovario (OVCAR-3) y mama (MCF-7 y SKBR3).
3. Analizar el efecto de las mutantes p53R273C, p53R248Q, p53R273H y p53R175H sobre los niveles de expresión de *ERBB2* (ARNm) y HER2 (proteína) a partir de transfecciones transitorias en la línea celular HeLa.
4. Determinar el efecto del silenciamiento de la expresión de p53 mutante (shRNAs p53) sobre los niveles de expresión de *ERBB2* (ARNm) y HER2 (proteína) en líneas celulares que expresan diferentes mutantes de p53: C33A (p53R273C), OVCAR-3 (p53R248Q) y SKBR-3 (p53R175H).
5. Analizar el efecto de la expresión de las mutantes p53R273C, p53R248Q sobre los niveles de expresión de *ERBB2* (ARNm) y HER2 (proteína) mediante transfecciones estables en la línea celular Saos-2.

6. Evaluar la estabilidad de la proteína HER2 como efecto de la expresión de las mutantes p53R273C y p53R248Q en las líneas celulares HeLa y Saos-2 transfectadas.
7. Evaluar el efecto de las mutantes p53R248Q y p53R273C sobre la activación del promotor de *ERBB2* en la línea celular Saos-2 que expresan las mutantes de manera estable.
8. Proponer un modelo de regulación de las mutantes evaluadas de p53 sobre HER2.

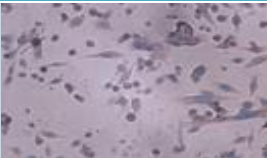
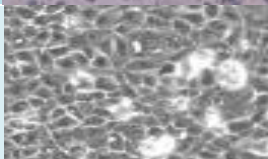
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

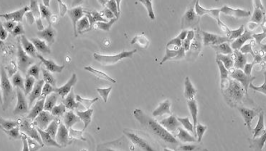

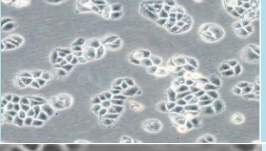
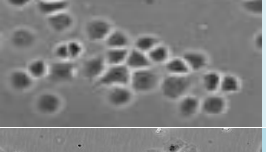
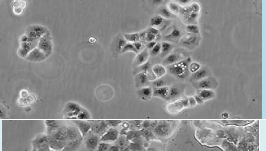
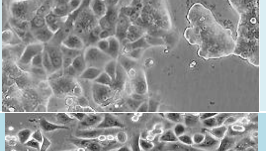
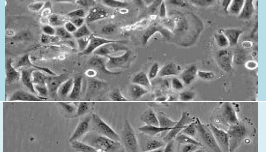
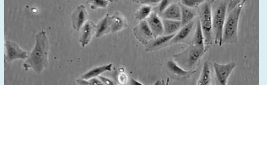
Se analizaron los niveles de expresión del gen y la proteína HER2 en líneas celulares que expresan de manera endógena alguna proteína p53 mutante. Posteriormente, se analizó mediante transfecciones transitorias el efecto de diferentes mutantes de p53 (p53R273C, p53R248Q, p53R175H y p53R273H) sobre los niveles de HER2, en una línea celular que expresa niveles bajos de wtp53 (HeLa). Por otra parte, se determinó el efecto de shRNAs específicos para p53 sobre los niveles de expresión del ARNm y la proteína HER2, en líneas celulares con diferentes mutantes de p53: C33A (p53R273C), SKBR-3 (p53R175H) y OVCAR-3 (p53R248Q). Además, se analizó el estado de fosforilación de HER2 en las líneas celulares por WB con el propósito de observar si estas mutantes también provocan cambios en la activación de la señalización de esta oncoproteína. Por último, se analizó el efecto de las mutantes de p53 (p53R248Q y p53R273C) sobre el promotor de HER2 (ensayo de luciferasa y CHIP) en diversas transfecciones estables hechas en las líneas celulares Saos-2 (p53 nula).

Cultivos celulares

Se utilizaron líneas celulares derivadas de diversos tipos de cáncer:

Tabla 1. Características de las líneas celulares empleadas durante el trabajo.

Línea celular	Tipo de cáncer	Características	
Queratinocitos (QN, QE6, QE7, QE6E7)	Células epiteliales	Transfectados con oncoproteína E6, oncoproteína E7, oncoproteína E6/E7	
HaCat	Queratinocitos inmortalizados	mtp53 H179Y His → Tyr	

HeLa	Cáncer cervical	VPH-18 wtp53	
SiHa	Cáncer cervical	VPH-16 wtp53	
C33A	Cáncer cervical	VPH (-) mtp53 R273C (MS) Arg → Cis	
SW13	Carcinoma adrenocortical	mtp53 H193Y His → Tyr	
OVCAR-3	Carcinoma de ovario	mtp53 R248Q Arg → Gln	
MCF-7	Adenocarcinoma mamario	wtp53	
SKBR-3	Carcinoma mamario	mtp53 R175H (MS) Arg → His	
Saos-2	Osteosarcoma	p53 (-)	

Las líneas celulares Saos-2, MCF-7, HeLa, C33A, OVCAR-3, and SKBR-3 fueron obtenidas originalmente de la Colección Americana de Cultivos (ATCC, por las siglas en inglés de American Type Culture Collection). Las demás líneas celulares fueron obtendadas mediante la donación de diversos laboratorios de la red de investigación interna del país.

Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (mezcla de antibióticos de Invitrogen, CA). Las células se incuban en una atmósfera de 37 °C con una humedad del 5% de CO₂. El crecimiento ideal de los cultivos celulares

es del 50 al 80% de confluencia¹⁰ antes del siguiente pasaje o de la preparación de cultivos para próximos experimentos.

Tratamiento con cicloheximida (CHX)

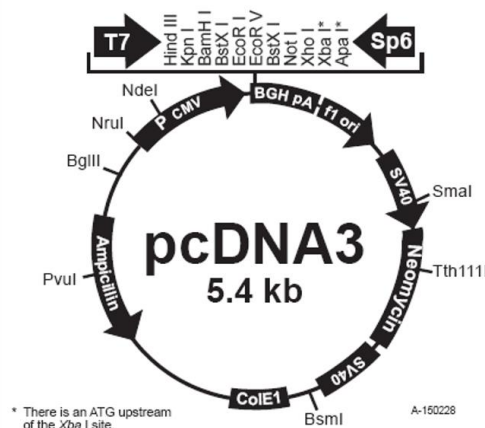
Para los tratamientos con cicloheximida (CHX), las células fueron cultivadas de manera simétrica en placas de cultivo de 60 x 15 mm y fueron adicionadas con la concentración de 100 µg/ml de cicloheximida (Sigma, St. Louis, MO), una vez que los cultivos alcanzaron el 70 u 80% de confluencia. Posterior a la adición del compuesto, las células adheridas a la placa son colectadas en los tiempos seleccionados: 30 minutos, 1h, 2h, 4h and 8h.

Purificación de plásmidos

Los plásmidos que contienen las mutantes p53R248Q y p53R273C fueron obtenidos por donación del grupo de trabajo de Maria Lung (Chan and Lung, 2004). Los plásmidos que contienen las mutantes p53R175H y p53R273H fueron comprados con el proveedor (Addgene Watertown, MA). El plásmido que contiene la mutante wtp53 fue donado por el grupo del Dr. Vogelstein (Baker *et al.*, 1990).

A)

Modificaciones por medio de mutagénesis oligonucleótido dirigida:
Codón 273
 (R;CGT to C;TGT).
 La secuencia para la expresión de esta mutante fué clonada en un vector pcDNA3.



Modificaciones por medio de mutagénesis oligonucleótido dirigida:
Codón 248
 (R;CGG to Q;CAG).
 La secuencia para la expresión de ésta mutante fué clonada en un vector pcDNA3.

¹⁰ Confluencia: Medida del número de células en una placa de cultivo celular y se refiere al porcentaje de cobertura en la superficie de la placa en cultivos adherentes.

B)

Modificaciones por medio de mutagénesis oligonucleótido dirigida:

Codón 175
(R;CGC to H;CAC).

La secuencia para la expresión de esta mutante fué clonada en un vector pCMV-Neo-Bam.

1 SITE FOR:

BamHI

XbaI

SacI

HindIII

2 SITE FOR:

SacI

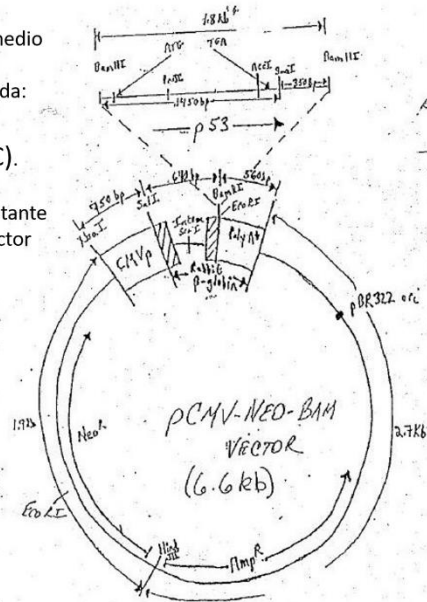


Figura 11. Esquema de los vectores empleados para la transfección de las diferentes mutantes de p53 empleadas.

A) Los plásmidos p53R248Q y p53R273C tiene como base un vector de pcDNA3. B) El plásmido p53R175H tienen como base un vector de pCMV-Neo-Bam.

La purificación de los plásmidos se realizó mediante el kit Qiagen Plasmid Purification (Qiagen MD, USA), siguiendo la secuencia general sugerida por el proveedor e ilustrada en la Figura 11. De manera general, los protocolos de purificación de plásmidos se basan en un procedimiento de lisis alcalina modificada, seguido de la unión del ADN de plásmido a la resina que se encuentra en columnas de purificación apropiadas de bajo contenido de sal y pH. El ARN, las proteínas, los colorantes y las impurezas de bajo peso molecular se eliminan a través de los lavados correspondientes. Finalmente, el ADN de plásmido se retira de la columna en un amortiguador con alto contenido de sal y luego se concentra y se desala por precipitación con isopropanol.

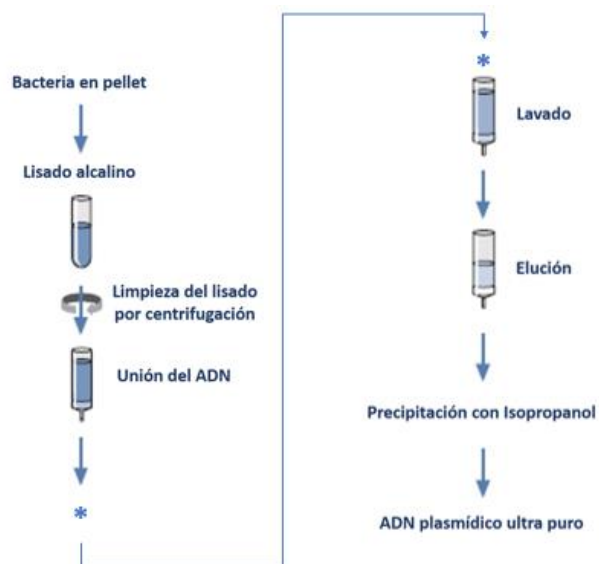


Figura 12. Secuencia de purificación de plásmidos.

Se realiza transformación bacteriana de *E.coli*, para obtener una colonia que genere la cantidad sugerida de cultivo líquido. Las células del cultivo anterior se recolectan por centrifugación (pellet). Se añade el buffer alcalino para la lisis celular. La suspensión obtenida se centrifuga para eliminar residuos celulares de mayor tamaño porque el sobrenadante es el que se introduce a la columna de purificación previamente equilibrada. Posteriormente la columna de purificación es lavada 2 veces y finalmente se realiza la elución del ADN que se queda adherido a la columna. El ADN de plásmido obtenido es precipitado con isopropanol y lavado con etanol para que su purificación sea completa.

Para la obtención del ADN de plásmido, se partió de una colonia individual de *E.coli* obtenida de una placa de selección estriada (Figura 13), colocándola en 5 ml de medio líquido LB adicionado con ampicilina (LB+Amp). Este cultivo fue incubado durante un tiempo aproximado de 8 h a 37°C y con agitación vigorosa (aprox. 300 rpm). El cultivo obtenido, se diluyó 1/1000 en 500 ml de medio LB+Amp y se incubó a 37°C durante un periodo de 12–16 h con agitación vigorosa. En estas condiciones, fue posible obtener un cultivo con densidad celular de aproximadamente $3-4 \times 10^9$ células por mililitro. Las células del cultivo anterior fueron recolectadas mediante centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano obtenido se resuspendió por pipeteo y vortex en 10 ml de Buffer previo de lisis adicionado con RNAsa. Se añadieron 10 ml de un segundo Buffer de lisis, invirtiendo vigorosamente el tubo de 4-6 veces y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) hasta obtener una suspensión homogénea. La reacción de lisis se detuvo inmediatamente transcurrido el tiempo, empleando Buffer de neutralización frío e invirtiendo vigorosamente de 4 a 6 veces, además de mantener el tubo incubando en hielo por 20 minutos. La suspensión obtenida se centrifugó a $\geq 20,000$ x g

por 30 min a 4°C. El sobrenadante se pasa rápidamente a otro tubo para centrifugarse de nuevo a $\geq 20,000 \times g$ por 15 min a 4°C. Durante este paso, la columna de purificación fue equilibrada con 10 ml de Buffer de equilibrio y dejando que se vaciara por gravedad. Una vez que la columna fue equilibrada y que se obtuvo el sobrenadante de la última centrifugación, este es colocado en la columna de purificación, esperando a que todo el contenido pase por gravedad. Posteriormente la columna de purificación fue lavada 2 veces con 30 ml de buffer de lavado. En este paso el ADN de plásmido se encuentra adherido a los componentes de la columna de purificación, por lo que se realizó el proceso de elución con 15 ml de buffer de elución. El ADN de plásmido obtenido fue precipitado al agregar 10.5 ml (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló bien para lograr la precipitación, se centrifugó inmediatamente a $\geq 15,000 \times g$ durante 30 min a 4°C y se decantó con cuidado el sobrenadante. El sedimento de ADN se lavó con 5ml de etanol al 70%, se centrifugó a temperatura ambiente a $15,000 \times g$ durante 10 min y se decantó con cuidado sin alterar el sedimento. El sedimento se secó al aire durante 5-10 min y finalmente se disolvió el ADN obtenido en un volumen adecuado de Buffer TE, enjuagando las paredes para recuperar el ADN.

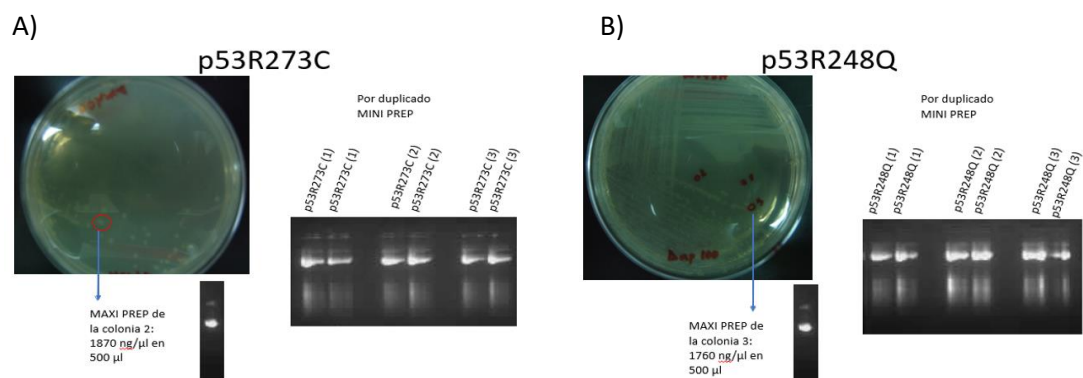


Figura 13. Selección clonal para la purificación de plásmidos.

Selección clonal de cada mutante con medio LB+Amp en placa para realizar el procedimiento de acuerdo con las instrucciones del proveedor del Kit de purificación y el resultado se observó a través de un gel de agarosa 1%. Se muestran los resultados de tres procesos de purificación de cada una de las mutantes A) p53R273C y B) p53R248Q.

El rendimiento de la purificación que se realizó de los vectores de las diferentes mutantes puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 2 Cuantificación de plásmidos después de su purificación.

PLÁSMIDO	Cuantificación ng/μL	Cuantificación ng/μL	Cuantificación ng/μL	Cuantificación ng/μL	Promedio (ng/μL)
p53R273C	1770	1910	1870	1740	1822.50
p53R248Q	2680	2010	1760	1920	2092.50
p53R175H	100	45			72.50
pcDNA3	2130	897	1080	2140	1561.75
wtp53	1200	985			1092.50

Secuenciación de plásmidos

Todos los plásmidos empleados fueron verificados para la mutación puntual en los codones correspondientes, mediante secuenciación de ADN con el kit: “BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit”.

La metodología para realizar una secuenciación con el kit Big Dye (Applied Biosystems, CA USA), se realiza siguiendo el diagrama de flujo que se resume en la Figura 14:

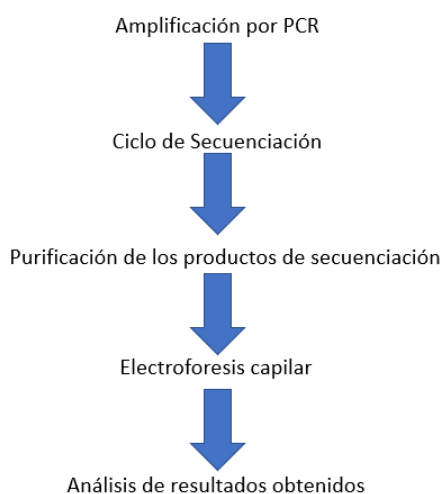
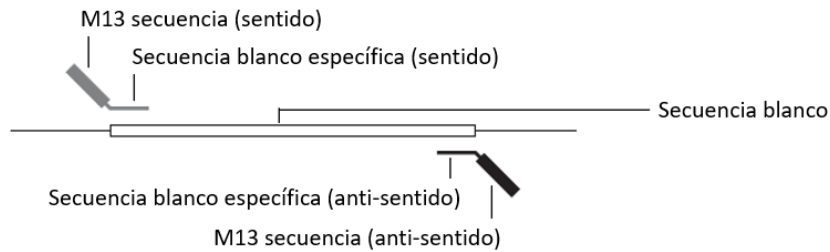


Figura 14. Procedimiento general de secuenciación de los plásmidos.

Para realizar la secuenciación de ADN se delimita el tamaño de las secuencias y se obtienen grandes cantidades de producto mediante una amplificación por PCR en la que se incorporan secuencias específicas que son reconocidas al momento de pasar por la electroforesis capilar. Los resultados se entregan como archivos que deben ser analizados al compararlos con la secuencia blanco.

Para que las secuencias fueran reconocidas al momento de introducirlas en el equipo que realiza la electroforesis capilar, se emplearon oligonucleótidos diseñados con las secuencias blanco específicas, adicionando secuencias de reconocimiento universal M13 (Figura 15).



- M13 secuencia (sentido): 5'- TGTAAAACGACGGCCGT -3'
- M13 secuencia (anti-sentido): 5'- CAGGAACAGCTATGCC -3'

Figura 15. Diseño de oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los plásmidos.

Las secuencias blanco específicas son adicionadas de: Secuencia de reconocimiento universal M13 en sentido: 5'-TGTAACGACGGCCGT-3' y Secuencia de reconocimiento universal M13 en anti-sentido: 5'-CAGGAACAGCTATGCC-3'.

La mezcla de componentes empleados para la reacción de PCR corresponde a: 4 ng de ADN, 0.8 μ M de cada oligonucleótido acoplado a la secuencia M13, 5 μ L de la mezcla maestra proporcionada por el proveedor (BigDye® Direct PCR Master Mix) y completar hasta un volumen final de 10 μ L. La mezcla de reacción se colocó en el termociclador con el siguiente programa: 96°C 5 minutos, 35 ciclos (30s a 94°C, 45s a 62°C y 45s a 68°C), 2 minutos a 72°C y finalmente la mezcla de reacción se llevó a 4°C. Los productos de PCR obtenidos se cuantificaron para colocar 20 ng en la mezcla de secuenciación, agregando los siguientes componentes a la mezcla: 2 μ L de la Mezcla Maestra de secuenciación (BigDye® Direct Sequencing Master Mix) y 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos M13 sentido y anti-sentido en dos mezclas diferentes. El programa de secuenciación se realizó como se menciona a continuación: 37°C por 15 minutos, 80°C por 2 minutos, 96°C por 10s, 25 ciclos (10s a 96°C, 5s a 50°C y 4 minutos a 60°C), y finalmente la mezcla de reacción se llevó a 4°C. Los productos de reacción obtenidos fueron purificados previo a la electroforesis capilar que se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Los resultados de secuenciación fueron entregados en los archivos correspondientes de acuerdo con el equipo de secuenciación capilar empleado y a partir de éstos se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas (Figura 16). La comparación se realizó con la secuencia de ADN de wtp53, con el fin de evaluar la presencia de las mutaciones

puntuales correspondientes a la secuencia contenida en cada uno de los plásmidos que serán empleados para la transfección de las líneas celulares.

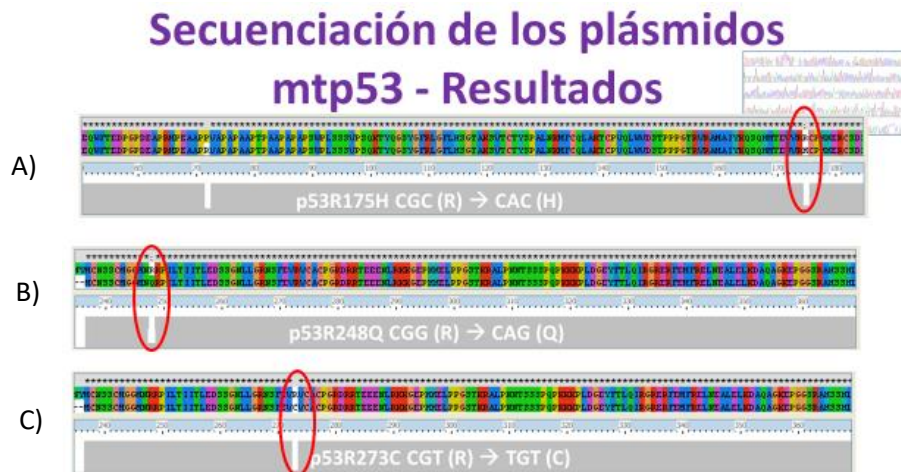


Figura 16. Resultados de la secuenciación de los plásmidos de mutaciones de p53.

Los archivos de secuenciación entregados resultados de secuenciación se comparan con la secuencia de ADN de wtp53 para realizar el alineamiento de las secuencias con el programa Chromas Pro DNA Sequencing para identificar que efectivamente los plásmidos purificados contienen la mutación que se quiere estudiar. A) Alineamiento de los resultados para la mutante p53R175H. B) Alineamiento para identificar la secuencia de la mutante p53R248Q. A) Alineamiento de los resultados para la mutante p53R273C.

Transfecciones estables y transitorias

El protocolo para las transfecciones fue el mismo tanto para la expresión de proteínas de p53 (mutantes o silvestre), así como para el silenciamiento de p53 en las líneas celulares que de manera endógena expresan las mutaciones de p53 estudiadas en el presente trabajo.

Las células fueron colocadas en placas de cultivo de 60 x 15 mm en una concentración de 5×10^5 células por placa y se dejaron llegar a la confluencia mencionada en la sección de cultivo celular.

Inicialmente se realizó la estandarización de la concentración de los plásmidos: vector vacío, p53R175H, p53R273H, p53R248Q, p53R273C y wtp53. y transfectadas con diferentes concentraciones de plásmido: 0.3, 0.5, 0.8 and 1.0 μg . Una vez que se estableció la concentración óptima de plásmido, ésta fue la que se utilizó para los siguientes ensayos, tanto para realizar transfecciones transitorias como para realizar transfecciones estables.

En el caso del proceso de silenciamiento de la expresión de p53, se utilizó el “SureSilencing shRNA Plasmid Kit” (SABiosciences, Qiagen), que puede resumirse en la Figura 17.

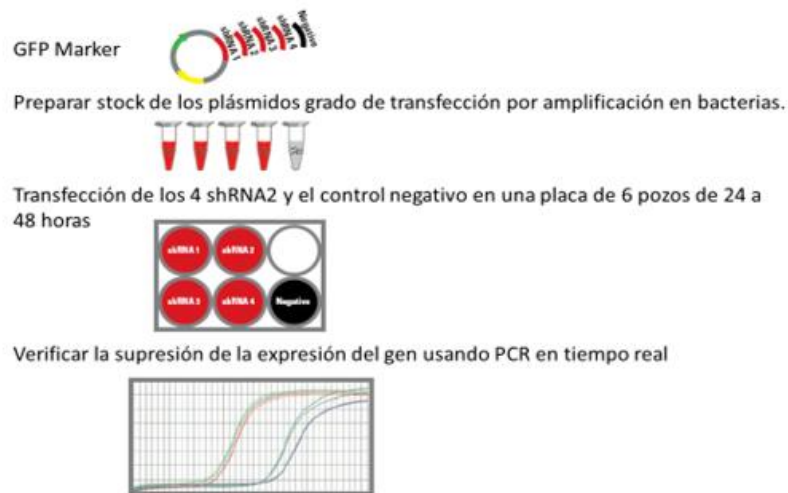


Figura 17. Descripción gráfica del contenido de plásmidos shRNA de p53.

El kit empleado contiene cuatro plásmidos con secuencias para el silenciamiento de p53 y un control negativo. Se sigue el procedimiento de purificación de plásmidos. Se realizan combinaciones de plásmidos para lograr el silenciamiento deseado y el resultado se mide como la expresión del gen por PCR en tiempo real.

Todas las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el caso de las transfecciones transitorias, las células fueron colectadas 48 horas después del proceso de transfección. En el caso de que se requiriera que las líneas celulares transfectadas con los plásmidos se mantuvieran estables, entonces se realizó un tratamiento con un antibiótico específico para seleccionar las células transfectada que adquirieron resistencia: Geneticina (G-418), en una concentración de 1200 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Posteriormente las células resistentes se mantuvieron en crecimiento con una concentración de 800 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico G-418.

Transcripción reversa

La metodología de la transcripción reversa utiliza como templado el ARN de las células. La técnica requiere el uso del reactivo TRIZOL (Invitrogen, CA) que provoca la lisis celular y

mantiene la integridad del ARN durante el proceso de extracción, al mismo tiempo que va descartando componentes celulares no deseados.

Una vez agregado 1ml de TRIZOL y colectada la suspensión celular en un tubo, se adicionó 200 μ L de cloroformo y se mezcló por inversión, se dejaron reposando las muestras por 3 min y se centrifugaron por 15 min a 14,000 rpm. Transcurrido este tiempo se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, al que se le agregó 500 μ L de isopropanol y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min, siendo en seguida centrifugadas durante 15 min a 14,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL EtOH 75% en agua DEPC, se centrifugó 5 min a 7,500 rpm, se decantó y se dejó secar la pastilla. Se resuspendió en 30 μ L de agua DEPC. El ARN fue sujeto a digestión con DNasa I (Ambion).

Finalmente, el ARN se centrifuga para formar un precipitado transparente que se resuspende en agua tratada con DEPC¹¹, o de manera alternativa: con agua libre de enzimas que degradan el ARN (ARNasas).

Una vez que se obtiene el ARN, es posible realizar la reacción de transcripción reversa para obtener el ADN complementario, a partir del ARN. A partir de 3 μ g de ARN colocados en un tubo, se adicionaron: 1 μ L de Oligo DT, 2 μ L de dNTPs y con H₂O DEPC se llevaron a un volumen de 12 μ L. Se incubó durante 5 min a 65°C, y en seguida se colocó en hielo por 2 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionó 4 μ L de Buffer 5x, 2 μ L de DTT y 1 μ L de Inhibidor de RNasa, se incubó por 2 min a 42°C y se colocó en hielo durante 2 min y finalmente se adicionó 1 μ L de la enzima Superscript II. Las muestras fueron incubadas por 50 min a 42°C y finalmente se inactivo la enzima incubando la muestra a 70°C por 15 min. El volumen final obtenido de ADN complementario fue de 20 μ L.

¹¹ DEPC: El pirocarbonato de dietilo (DEPC), también llamado dicarbonato de dietilo (nombre IUPAC), se emplea para inactivar a la enzima ARNasa en agua y en utensilios de laboratorio.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos obtenidos fueron diseñados y obtenidos a partir de bibliografía conocida. En el caso del diseño de oligonucleótidos, se utilizaron las secuencias que pueden consultarse a través de la base de datos "GenBank" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Una vez que se cuenta con la secuencia, se empleó el programa de computadora "Primer Express Software" en el, que colocando los parámetros deseados nos arroja una serie de posibles secuencias que contienen los menos problemas para permitir que los oligonucleótidos cumplan con su función en reacciones de cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Una vez que se tiene el diseño, los oligonucleótidos fueron adquiridos a través del proveedor Sigma-Aldrich (St Louis MO).

Las secuencias que se emplearon para los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa fueron los que se mencionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos

GEN		Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del Producto
<i>HER2</i>	Foward	5' – AGCTCTGCTACCAGGACACG – 3'	168 pb
	Reverse	5' – TCAGGCTCTGACAATCCTCA – 3'	
<i>p53</i>	Foward	5' – GATGCTGTCCCCGGACGA – 3'	127 pb
	Reverse	5' – AGGGGCCCGCCGGTGTAG – 3'	
<i>B2M</i>	Foward	5' – ACCCCCACTGAAAAAGATGAGT – 3'	100 pb
	Reverse	5' – ATGATGCTGCTTACATGTCTCG – 3'	

El diseño correcto de los oligonucleótidos empleados se comprobó con herramientas de NCBI, como se puede observar en la Figura 18.

Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_000546.5

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NM_000546.5 Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA

```
GATGGGATTGGGGTTTTCCCTCCCATGTGCTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAGTC
TAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTCGGGCTGGGAGCGTG
CTTCCACGACGGTGAACGCTTCCCTGGATTGGCAGCCAGACTGCCTCCGGGTCACTGCCATGGAGGA
GCCGAGTCAGATCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTT
CCTGAAAAACAACGTTCTGTCCCTTGCCTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCTCCGGACGATA
TTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCAGATGAAGCTCCCAAGATGCCAGAGGCTGCTCCCTCCG
GGCCCTGCACCCAGCAGCTCTACACCCGGCGGCCCTGCACCCAGCCCTCCTGGCCCTGTCACTTCT
GTCCCTCCAGAAAACTACCAAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGCTTCTTGCACTTCTGGGACAGCCA
AGTCTGTGACTTGCAGTACTCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGT
GCAGCTGTGGGTGATTCCACACCCCGCCCGCACCCGGTCCCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCA
CAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCC
CTCCTCAGCATCTATCCGAGTGGAAAGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCG
ACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTAC
ATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAGACT
CCAGTGGTAATCTACTGGGAGGGAGAGCTTTTGGGTCGCTGCTTGGGAGGAGCGGGG
```

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GATGCTGTCCCGGACGA	Plus	18	326	343	55.71	66.67%
Reverse primer	AGGGCCCGCCGGTGTAG	Minus	17	452	436	58.21	76.47%
Product length	127						

Products on intended target

>NM_000546.4 Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 127
Forward primer 1 GATGCTGTCCCGGACGA 18
Template 326 ..... 343
Reverse primer 1 AGGGCCCGCCGGTGTAG 17
Template 452 ..... 436
```

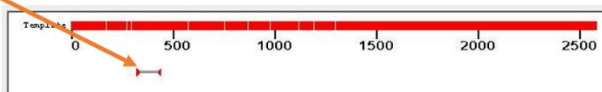


Figura 18. Ejemplo del diseño de oligonucleótidos (TP53).

Los oligonucleótidos para identificar el gen TP53 fueron diseñados con el programa Primer Express a partir de la secuencia "Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA" de NCBI. Fueron verificados con la herramienta de "Electronic PCR" (Rotmistrovsky, Jang and Schuler, 2004).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Punto final

Los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa cualitativa se llevaron a cabo empleando las cantidades sugeridas por el proveedor, de los siguientes reactivos: 1 µg de ADN complementario, Enzima polimerasa, dntps, MgCl, (Invitrogen, CA). Todos los componentes de la reacción se colocan y mezclan en un tubo de ensayo de 0.2 ml, para posteriormente colocarse en el Termociclador Maxigen (Axigen, Corning NY USA) para realizar el proceso de amplificación con los cambios de temperatura programados de la siguiente manera: 95°C for 5 min para la desnaturalización del ácido nucleico de muestra, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s y finalmente 72°C por 30 s. Los productos de amplificación obtenidos con esta reacción solo pueden ser visualizados a través de un gel de agarosa, en este caso el gel se preparó al 1%. Los productos de amplificación se hacen pasar por un campo eléctrico con ayuda de un

amortiguador que nos permitirá determinar el tamaño de los productos obtenidos, lo cual es un parámetro para asegurar el resultado. Estos productos pueden ser visualizados en los gels porque son teñidos con un colorante que se intercala en las dobles cadenas de ADN (bromuro de etidio) y luz ultravioleta (UV). El empleo de un marcador de peso molecular permite identificar el tamaño de los productos de amplificación obtenidos. Además de las reacciones con los oligonucleótidos específicos para lo que se quiere identificar, también es necesaria la obtención de productos de amplificación de un gen constitutivo que al final nos permite determinar la amplificación relativa del gen de interés, con respecto al gen constitutivo, en este caso, se empleó el gen de beta-2-microglobulina (B2M), como el gen constitutivo (Figura 19).

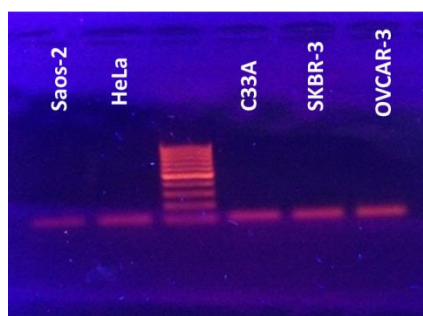


Figura 19. PCR punto final para beta-2microglobulina (B2M).

Se muestran los resultados de una reacción de amplificación por PCR del gen beta-2-microglobulina o B2M, empleado como gen constitutivo de las extracciones de ADN para cada línea celular: Saos-2, HeLa, C33A, SKBR-3 y OVCAR-3. Este gen se emplea como control para el análisis de resultados de los genes blanco. Gel de agarosa al 1% empleando buffer TAE 1X y teñido con Bromuro de Etidio.

Tiempo real (cuantitativa)

Los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa se llevaron a cabo empleando la mezcla maestra de colorante "SYBR Green" (Thermo Scientific, Waltham MA) en un equipo de tiempo real "ABI 7300 Real Time PCR system" (Applied Biosystems, California USA). Las condiciones óptimas para llevar a cabo estos ensayos se establecieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante del reactivo y del equipo empleado. A continuación, se muestra el programa temperaturas y tiempos empleados para la obtención de los resultados de este trabajo: 95°C for 5 min para la desnaturalización del ácido nucleico de la muestra, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, y una fase final de elongación de los

productos obtenidos de 72°C por 7 min. Después del proceso de amplificación, se programó una curva de disociación usada para corroborar que solo se obtiene UN producto deseado a partir de las amplificaciones secuenciales. El valor basal (denominado como CT) para cada muestra se empleó para determinar los niveles de expresión relativa del gen evaluado, de acuerdo con el método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method) (Livak and Schmittgen, 2001).

Análisis de proteínas por Western Blot

Para la obtención de concentrados proteínicos, las células que se obtuvieron de los cultivos celulares fueron lavadas dos veces con PBS 1x y lisadas¹² con un amortiguador hipertónico¹³ (50µM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, NP40 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, Dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) 0.1%, 1mM Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, por sus siglas en inglés) y una mezcla completa de inhibidores de proteasas marca Roche). Los concentrados obtenidos fueron cuantificados mediante un método colorimétrico RC Protein Assay (BioRAD) basado en el ensayo de Lowry y modificado para ser usado en presencia de varios agentes reductores y detergentes, generando una coloración que puede ser medida a una absorbancia de 650 a 700 nm.

Cantidades equitativas de proteínas fueron separadas mediante electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS – PAGE) y transferidas por medio de electroforesis horizontal en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Millipore, Billerica MA). En la Figura 20 se muestran ejemplos de tinciones empleadas para la visualización de la correcta difusión de las proteínas en los diferentes soportes empleados para la metodología de inmunodetección por Western Blot.

¹² Lisar: Destrucción de las células.

¹³ Hipertónico: Medio con alta concentración de sales que provoca la salida de agua de las células que se encuentran en él, rompiendo la membrana celular y permitiendo la salida de los componentes celulares.

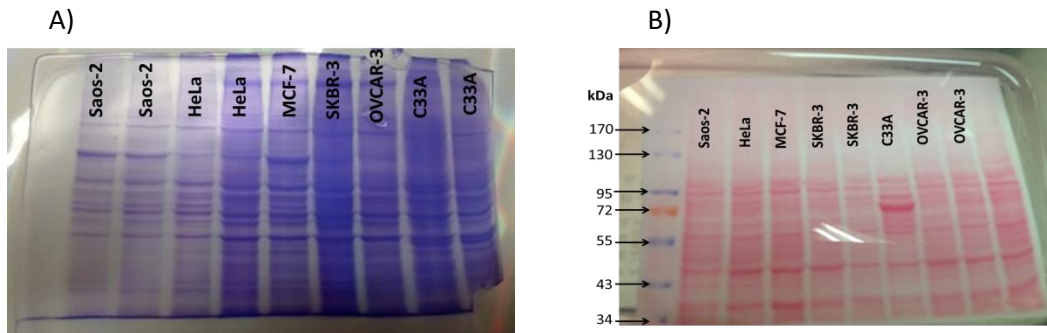


Figura 20. Ejemplos de tinciones con Azul de Coomassie y con Rojo de Ponceau.

A) Tinción con Solución de Azul de Coomassie de un gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS). Se colocaron volúmenes de 10 µl de cada mezcla de proteínas obtenidas a partir de lisados de líneas celulares de Saos-2, HeLa, MCF-7, SKBR-3, OVCAR-3 y C33A sin tratamientos específicos. El Azul de Coomassie permite la visualización de la distribución de la electroforesis vertical de las proteínas y el ajuste de las cantidades necesarias para tener la misma cantidad de proteína de cada muestra. B) Tinción con Solución de Rojo Ponceau S de una membrana de nitrocelulosa posterior a la transferencia de proteínas de un gel de acrilamida SDS-PAGE en gradiente discontinuo (8 y 12%). En cada carril se colocaron 20 µg de proteína de cada lisado celular. Este colorante es compatible con membranas de PVDF y nitrocelulosa, además de ser una tinción reversible que no interfiere en la unión de los anticuerpos. Se empleó marcador de peso de proteínas preteñido en un rango de 10 a 170kDa (Thermo Scientific, MA).

Una vez que las proteínas se inmovilizaron en la membrana de nitrocelulosa, se realizó un bloqueo de la membrana con 4% de leche sin grasa en Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés). Las condiciones para cada una de las proteínas evaluadas son los siguientes:

Tabla 4. Condiciones de determinación de la expresión de proteínas por Western Blot.

Proteína	SDS-PAGE	Bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Tiempo de revelado
HER2	8%	0.8%	HER2 receptor monoclonal primary antibody (Cell signaling, Danvers, MA) Dilución 1:1000 Toda la noche	Anticuerpo de conejo conjugado con peroxidase de caballo (Sigma-Aldrich, St Louis MO) Dilución 1:10000 1 hora	20 minutos promedio
P53	10%	1%	Anticuerpo p53-DO1 conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) Dilución 1:500 Toda la noche	Ninguno	2 minutos promedio

Actina	10%	1%	Anticuerpo Actina Dilución 1:200 1 hora	Anticuerpo de ratón conjugado con peroxidasa 1:1000 1 hora	20 segundos promedio
---------------	-----	----	---	--	----------------------

Debido a que los anticuerpos secundarios (y algunos primarios, como es el caso del anticuerpo contra p53) están acoplados a peroxidasa, la expresión de proteínas puede ser detectada por medio de quimioluminiscencia usando el sustrato “Supersignal West Pico” (Thermo Scientific, Waltham MA). La intensidad de la banda de proteínas observada puede ser analizada a partir de las imágenes de Western Blot obtenidas a través del software Syngne.

Expresión de promotor de gen con reportero de luciferasa

Las células Saos-2 transfectadas de manera estable con: vector¹⁴ vacío, wtp53, p53R248Q y p53R273C fueron transfectadas con el vector reportero de luciferasa que contiene el promotor de HER2 (pNeuLite) (Xing *et al.*, 2000) obtenido a través de Addgene Inc. (Cambridge, MA) bajo las mismas condiciones que se emplearon para las transfecciones anteriores. Después de 24 horas, las células fueron lisadas y las muestras obtenidas fueron evaluadas con el sistema Dual-Glo[®] Luciferase Assay (Promega, Madison WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que también pueden ser revisadas en la bibliografía (Weisz *et al.*, 2004). En la Figura 21 se muestra una representación gráfica de la interpretación de los resultados que se obtienen mediante esta metodología. El resultado fue detectado mediante el equipo Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Perú) en las siguientes condiciones: 0.5 segundo de integración / pozo. La inducción de la expresión del promotor de HER2 se calcula como las unidades relativas de luz que se obtienen en las células Saos-2 transfectadas con las mutantes de p53 comparando con el promedio de unidades relativas de luz que expresan las células Saos-2 transfectadas con el

¹⁴ Vector: Moléculas de ADN que se replican y que sirven para transferir fragmentos de ADN entre células (plásmidos)

vector vacío. Los resultados fueron normalizados con la expresión relativa de las unidades de luz de renilla y graficados contra el logaritmo de la concentración de los componentes.

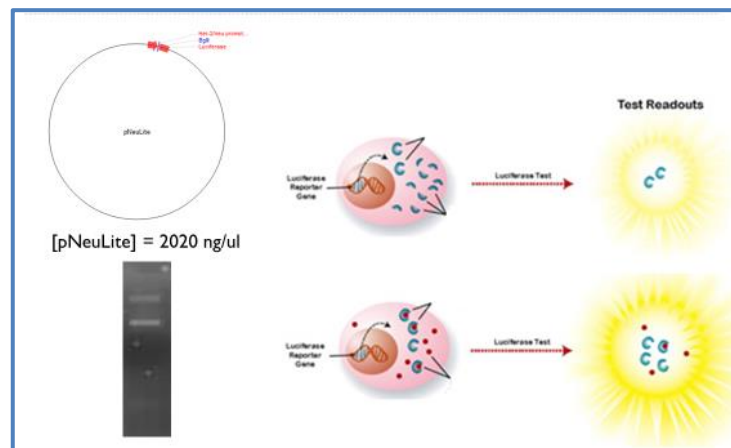


Figura 21. Resumen gráfico de la metodología para la evaluación de un reportero de luciferasa.

Se realiza la transfección del reportero en las mismas condiciones estandarizadas para las líneas celulares empleadas. Tiempo después de esta transfección, las células se lisan y se obtienen las fracciones celulares en la que se medirá la emisión de luz de la luciferasa, con ayuda de un luminómetro. Después de normalizar los resultados con la cantidad de luz emitida por la renilla (control), los resultados se expresan como unidades de expresión relativa. Mayor luminiscencia indica una mayor actividad del reportero en el promotor de interés, infiriendo una mayor actividad del promotor.

Inmunoprecipitación de cromatina

Los ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés) se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit (ChIP One Day Kit, Qiagen) (Figura 22). De manera breve, las células se fijan con 1% de formaldehído por 10 minutos y posteriormente el formaldehído es neutralizado con 125 mmol/L de glicina por 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y generosamente cosechadas con amortiguador de lisis y colectadas por centrifugación a 4°C para obtener los lisados celulares. Los lisados son incubados por 15 minutos a temperatura ambiente con rotación y posteriormente son centrifugados; el pellet¹⁵ fue resuspendido en amortiguador de enriquecimiento. Los materiales insolubles que se encontraban en el pellet fueron resuspendidos en 1 ml de amortiguador de inmunoprecipitación y los complejos de ADN-proteína fueron sonicados para producir

¹⁵ Pellet: Precipitado de material biológico obtenido a partir de centrifugación

fragmentos de cromatina de longitudes entre 200 y 600 pares de bases (pb), esto pudo observarse con el empleo de un gel de agarosa mediante electroforesis horizontal. Una décima parte de la cromatina fragmentada se apartó para tener un control de INPUT y la muestra restante fue pre-lavada con proteína A/G. Para cada CHIP, se adicionaron los anticuerpos: anti-p53 (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology), anti-Histona 3 (Upstate, Millipore Merck) or anti-Histona 4 (Upstate, Millipore Merck), o con control no específico (IgG) y se incubaron toda la noche a 4°C. Los complejos formados fueron precipitados a 4°C con 1/20th del volumen de perlas magnéticas de proteína G, las perlas fueron lavadas y los complejos de anticuerpos-cromatina fueron eluidos y la interacción cruzada de ADN-proteína fueron revertidos con la adición de NaCl. Las muestras fueron tratadas subsecuentemente con proteinasa K, y el ADN genómico fue recuperado y purificado mediante columnas de afinidad. La cuantificación de ADN a partir de las muestras inmunoprecipitadas con p53, H3ac y H4ac, control sin anticuerpo y el control INPUT se realizó con PCR cuantitativa por como se describió anteriormente.

Las secuencias empleadas para la evaluación de los inmunoprecipitados fueron los que se describen en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para evaluar la Región PROXIMAL del promotor de HER2

<i>GEN</i>		Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del Producto
<i>HER2a</i>	Foward	5' – GTTGCCACTCCCAGACTTGT – 3'	321 pb
	Reverse	5' – CTCCATGGTGCTCACTGC – 3'	
<i>HER2b</i>	Foward	5' – CACATCCCCCTCTTGACTA – 3'	331 pb
	Reverse	5' – GCAACTCCCAGCTTCACTTT – 3'	
<i>HER2c</i>	Foward	5' – GGTGGCACATGCCTGTAATC – 3'	329 pb
	Reverse	5' – AATGGTTTTCCACCACATC – 3'	

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para evaluar la Región DISTAL del promotor de HER2

GEN		Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del Producto
HER2d	Foward	5' – ATCTGCCCTGATCTGAGTTT – 3'	220 pb
	Reverse	5' – GCTGCTGATTCGATTCCTC – 3'	
HER2e	Foward	5' – CTCAAGCCTACTCTGAGGAA – 3'	302 pb
	Reverse	5' – GCAACTCCCAGCTTCACTTT – 3'	
HER2f	Foward	5' – GCAGTAGCAAGCATCGAGTT – 3'	202 pb
	Reverse	5' – TGGATCATCACAAAGGTTTTCA – 3'	

El diseño de los oligonucleótidos empleados para evaluar la región proximal (HER2a, HER2b y HER2c) y distal (HER2d, HER2d y HER2e) del promotor de HER2, fueron tomados de los trabajos realizados por Hurst en 2001 y Delacroix en 2005 (Hurst, 2001; Delacroix *et al.*, 2005).

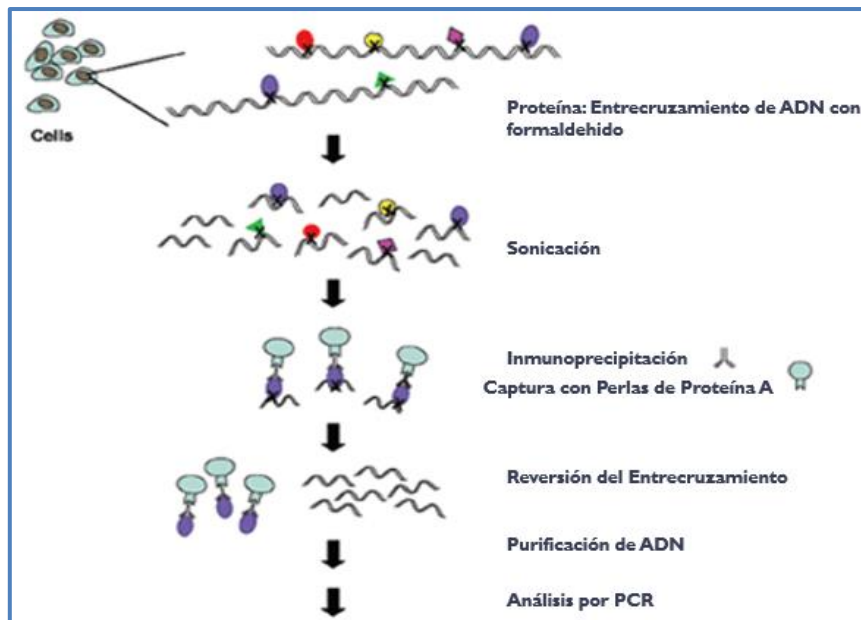


Figura 22. Resumen general de la metodología de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).

Posterior a la lisis celular el formaldehído permite mantener fijo el ADN unido a la cromatina, se emplean tiempos específicos para que un exceso de formaldehído no intervenga en los pasos siguientes. Estandarizar el tiempo y fuerza del proceso de sonicación permite obtener fragmentos de cromatina del tamaño adecuado para evaluar las secuencias de interés. Mediante el uso de perlas de Proteína A y anticuerpos específicos contra lo que se quiere evaluar, se lleva a cabo una inmunoprecipitación. Para recuperar el ADN genómico, el entrecruzamiento es revertido con adición de sales y posteriormente debe ser purificado para analizarse mediante reacciones de PCR, en este caso se empleó PCR en tiempo real.

Análisis estadístico

En todos los casos, cada experimento se realizó al menos 3 veces, y los resultados se presentan como el promedio \pm Desviación Estándar del Promedio (SEM, por sus siglas en inglés). El análisis estadístico se realizó con una t-student pareada de 1 cola para los promedios entre los controles y los datos experimentales. Tanto las gráficas como los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 6 (GraphPad, San Diego CA). * $p < 0.05$, ns= no significativo de acuerdo con el análisis de diferencia estadística.

RESULTADOS

Niveles de expresión de HER2 y p53 en líneas celulares derivadas de cáncer.

Se determinó la expresión tanto de la proteína como del ARNm de HER2 mediante ensayos de RT-qPCR y Western Blot en diversas líneas celulares: HeLa, SiHa, C33A, SW13 y HaCaT.

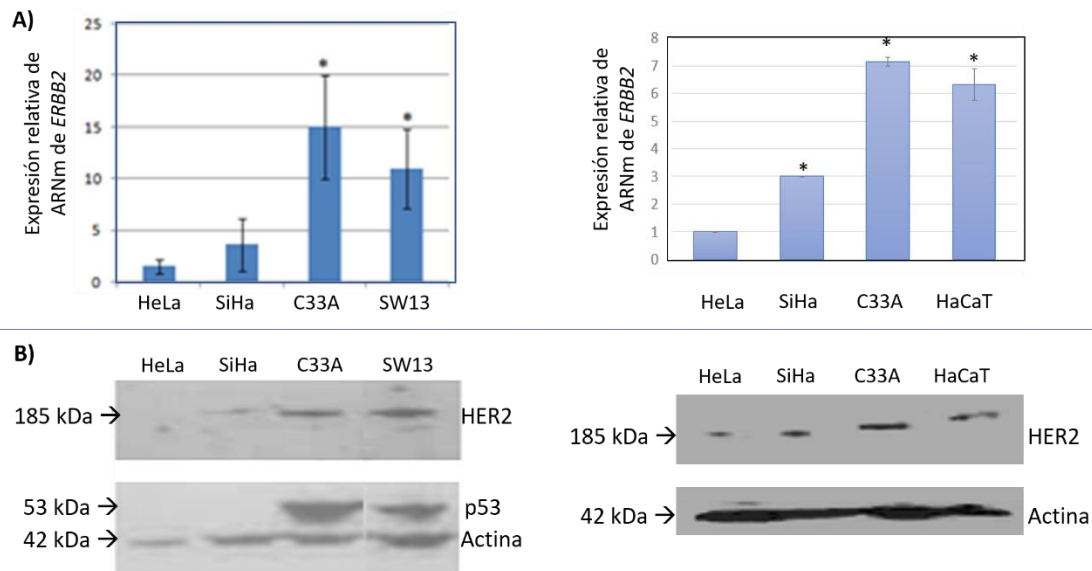


Figura 23. Nivel de expresión de HER2 y p53 en distintas líneas celulares derivadas de cáncer.

Análisis de la expresión de HER2 y p53 en réplicas biológicas de las líneas celulares HeLa, SiHa, C33A, además de incluir la evaluación de las líneas celulares SW13 y HaCaT. A) Niveles de expresión del ARNm de *ERBB2* determinada mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó comparando cada línea celular con la línea celular HeLa con la prueba de t-student, * $p < 0.05$. B) Niveles de expresión de proteína HER2 y p53 en líneas celulares de cáncer determinados mediante Western Blot, estandarizando con el control de carga a Actina.

Se pueden observar resultados importantes: C33A, HaCat y SW13 mostraron un elevado nivel de expresión del receptor HER2 a nivel de proteína y de ARNm en comparación con las líneas celulares HeLa y SiHa. En estos resultados, podemos observar que la expresión de HER2 en las líneas celulares C33A, HaCat y SW13 con mutaciones en p53, p53R273C, p53H179Y y p53H193Y respectivamente, es mayor que en las líneas celulares en las que p53 es inactivado por efecto de la oncoproteína E6 del VPH (Figura 23).

Los niveles de expresión de la proteína HER2 en HeLa, SiHa y C33A correlaciona con los resultados obtenidos por Narisawa-Saito (Narisawa-Saito *et al.*, 2007). Y aunque el resultado

observado de ARNm de *ERBB2* es contrario a lo reportado por el autor y colaboradores, cabe resaltar que en ese trabajo sólo determinaron la expresión del ARNm por PCR semicuantitativo, a diferencia de nuestro trabajo donde realizamos PCR cuantitativo en tiempo real.

Nuestros resultados sugieren que p53 silvestre puede participar en la regulación negativa de la expresión de HER2 y que como consecuencia de la inactivación de p53, provocada por la oncoproteína E6 del VPH, podría aumentar la expresión de HER2. Lo más importante es que cuando p53 se encuentra mutada, ésta podría participar de manera activa induciendo una sobreexpresión HER2.

Dado que la mutación de C33A (p53R273C) tiene una participación importante en la expresión de HER2 y por lo tanto sería interesante revisar esta correlación. Encontramos que el grupo de Maria Lung (2004), reportó que dos mutantes de p53 pueden actuar de manera diferencial sobre la resistencia fármacos en cáncer hepático (p53R273C y p53R248Q), por lo que se solicitaron los vectores empleados en ese trabajo para nosotros evaluar en nuestro sistema el efecto de estas mutantes de p53 sobre los niveles de expresión de HER2 (Chan and Lung, 2004) .

Niveles de expresión de la proteína HER2 en células HeLa transfectadas transitoriamente con diferentes mutantes de p53

Mutación p53R273C

Con la finalidad de determinar la aportación de la mutación específica p53R273C que es expresada endógenamente en C33A, y en la que observamos consistentemente un elevado nivel de expresión de HER2 tanto a nivel de proteína como a nivel de ARNm, se realizaron transfecciones transitorias en la línea celular HeLa, con el plásmido específico para la mutación p53R273C clonado en el vector pcDNA3. De manera inicial, se estandarizó la concentración del plásmido, probando tres concentraciones: 0.3, 0.5 y 0.8 µg y fue posible observar un aumento considerable de los niveles de proteína HER2 en todas las transfecciones a las distintas

concentraciones comparadas con el control transfectado con el vector vacío pcDNA3 (Figura 24). No observamos diferencias en la inducción de HER2 entre las distintas concentraciones utilizadas de vector después de hacer la densitometría y normalizar con el control de carga de actina.

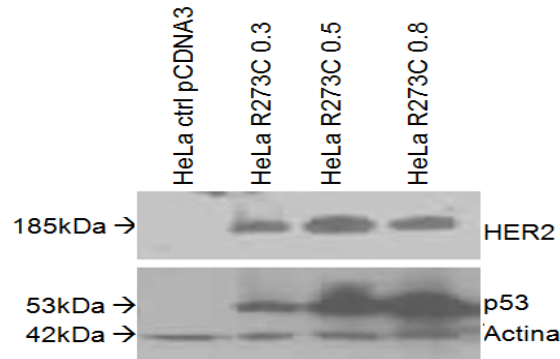


Figura 24. Contribución de la mutante p53R273C en los niveles de expresión de la proteína de HER2.

En el panel se muestra el resultado de Western Blot para determinar los niveles de expresión de las proteínas HER2 y p53 posterior a la transfección de concentraciones crecientes del plásmido que contiene la mutante p53R273C en la línea celular HeLa. Se empleó actina como control de carga.

Para los siguientes experimentos, se empleó sólo la concentración de 0.5 μg para determinar los niveles de expresión del ARNm de *ERBB2*, lo cual nos indicaría si la regulación de HER2 por esta mutante es a nivel de ARNm o proteína o de ambas.

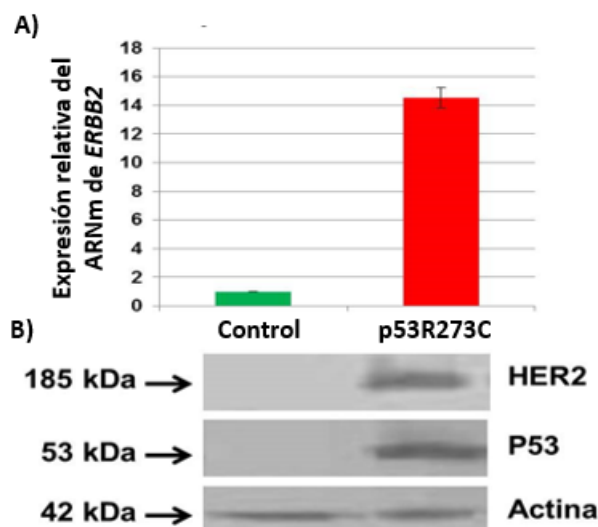


Figura 25. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a la mutante p53R273C.

A) Expresión relativa del ARNm de *ERBB2*, mediante RT-qPCR. B) Western Blot de HER2, p53 y actina (como control de carga). La evaluación se realizó en células HeLa transfectadas de manera transitoria con 0.5 μg de plásmido que contiene la mutante p53R273C y el Control empleado fue la misma línea celular transfectada con la misma concentración del vector vacío de dicho plásmido. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes.

Mutante p53R248Q

De igual forma que con la mutante p53R273C, se realizaron transfecciones transitorias en células HeLa, utilizando un vector clonado con la secuencia para la expresión de otra de las mutantes más frecuentes de p53: p53R248Q, y que se empleó en este caso con la finalidad de observar si los resultados en la expresión de HER2 serían los mismos que con la mutante anterior o si existe alguna diferencia entre estas dos mutaciones de p53 sobre la expresión de HER2. En forma similar al ensayo anterior, se emplearon las mismas concentraciones de plásmido: 0.3, 0.5 y 0.8 μg .

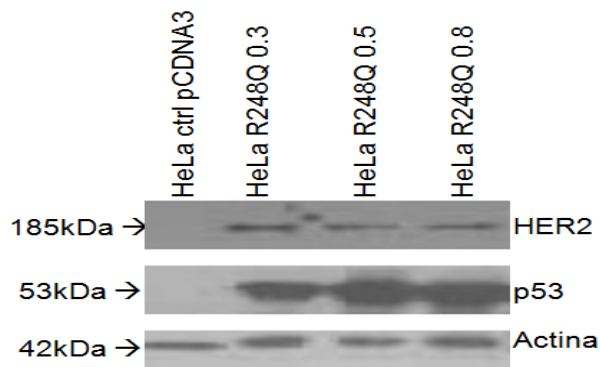


Figura 26. Contribución de la mutante p53R248Q en los niveles de expresión de la proteína de HER2.

En el panel se muestra el resultado de Western Blot para determinar los niveles de expresión de las proteínas HER2 y p53 posterior a la transfección de concentraciones crecientes del plásmido que contiene la mutante p53R248Q en la línea celular HeLa. Actina se empleó como control de carga.

De igual manera, observamos que es notable el aumento de la proteína HER2 como consecuencia de la expresión de la mutación p53R248Q en todas las concentraciones evaluadas de plásmido comparando con el control transfectado con el vector vacío (Figura 26). Los próximos experimentos se realizaron utilizando solamente la concentración de 0.3 μg .

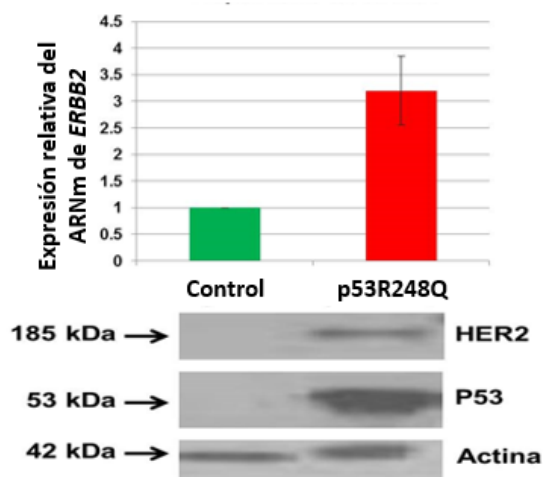


Figura 27. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a la mutante p53R248Q.

A) Expresión relativa del ARNm de *ERBB2*, mediante RT-qPCR. B) Western Blot de HER2, p53 y actina (como control de carga). La evaluación se realizó en células HeLa transfectadas de manera transitoria con 0.3 μg de plásmido que contiene la mutante p53R248Q y el Control fueron células HeLa transfectada con la misma concentración de vector vacío de dicho plásmido. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes.

Mutante p53R273H

En el caso de la mutante p53R273H, es interesante observar que los resultados no son similares a los obtenidos con las mutantes evaluadas anteriormente (p53R273C y p53R248Q). A pesar de múltiples evaluaciones con el plásmido, se requirieron cantidades mucho mayores de plásmido (1, 5 y 10 μg) para lograr observar una expresión de HER2 similar a la que se obtuvo con 0.8 μg de plásmido de p53R273C, además de que las líneas celulares transfectadas con esta mutación no lograron ser estables. En la Figura 28 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.

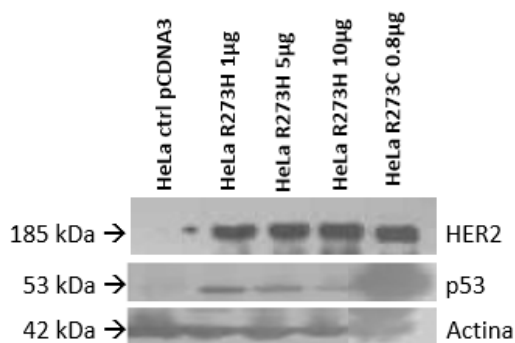


Figura 28. Contribución de la mutante p53R273H en los niveles de expresión de la proteína de HER2.

En el panel se muestra el resultado de Western Blot para determinar los niveles de expresión de las proteínas HER2 y p53 posterior a la transfección de concentraciones crecientes del plásmido que contiene la mutante p53R273H en la línea celular HeLa. Actina se empleó como control de carga.

Mutante p53R175H

De igual manera que en los casos anteriores, se realizaron transfecciones transitorias con la mutante p53R175H en la línea celular HeLa. El efecto de esta mutante sobre la expresión del receptor HER2 fue un aumento tanto a nivel transcripcional (Figura 29A) como a nivel de proteína (Figura 29B).

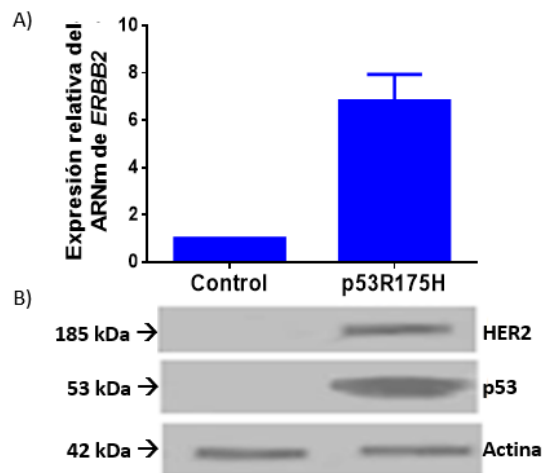


Figura 29. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a la mutante p53R175H.

A) Expresión relativa del ARNm de *ERBB2*, mediante RT-qPCR. B) Western Blot de HER2, p53 y actina (como control de carga). La evaluación se realizó en células HeLa transfectadas de manera transitoria con 0.5 μ g de plásmido que contiene la mutante p53R175H y el Control fueron células HeLa transfectada con la misma concentración de vector vacío de dicho plásmido. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes.

Como conclusión de esta sección, podemos decir que las mutantes p53R273C, p53R248Q y p53R175H inducen un aumento en los niveles de expresión de HER2. Para el caso específico de la mutante p53R175H, no fue posible obtener líneas celulares transfectadas de manera estable, por lo que para el objetivo de este trabajo se omitió esta mutante (Figura 30).

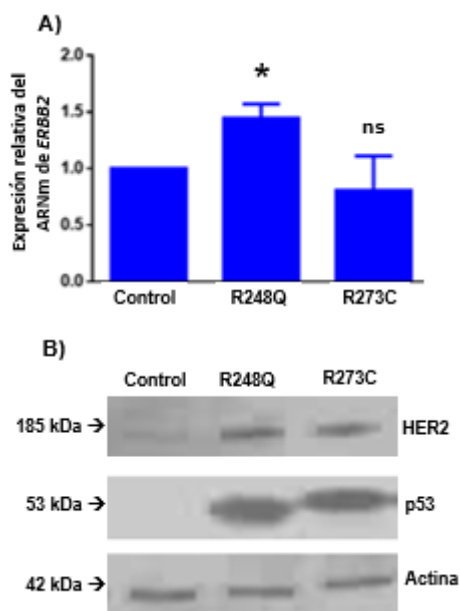


Figura 30. Nivel de expresión de HER2 y p53 como respuesta a las mutantes p53R273C y p53R248Q.

A) Expresión relativa del ARNm de *ERBB2*, mediante RT-qPCR. B) Western Blot de HER2, p53 y actina (como control de carga). La evaluación se realizó en células HeLa transfectadas de manera transitoria con 0.5 μ g de plásmido p53R273C y 0.5 μ g de plásmido p53R248Q. El Control fueron células HeLa transfectadas con el vector vacío de dichos plásmido. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó comparando cada línea celular con la línea celular Saos-2 con la prueba de t-student, * $p < 0.05$; ns = análisis estadístico no significativo.

Niveles de expresión de HER2 y p53 en líneas celulares derivados de otros tipos de cáncer.

Con la finalidad de establecer una posible correlación entre las mutantes de p53 y la expresión del receptor HER2, evaluamos tanto su nivel de expresión del ARNm como de la proteína en un panel de líneas celulares derivadas de cáncer humano, descritas previamente en la sección de “Estrategia Experimental”. Las líneas celulares MCF-7 y HeLa expresan p53 silvestre, aunque la línea celular HeLa se encuentra infectada por el VPH-18 y por lo tanto expresa la oncoproteína E6 la cual favorece la degradación de p53. Las líneas celulares C33A, SKBR-3 y OVCAR-3 expresan de manera endógena tres de las mutantes “hotspot” que existen en los diferentes tipos de cáncer humanos: p53R273C, p53R175H y p53R248Q. Con el fin de presentar un sistema con menos interferencias para nuestro objetivo, se optó por emplear la línea celular Saos-2, que tiene como característica principal (para nuestro propósito), delección bialélica de p53. Esta línea celular ha sido ampliamente empleada para la evaluación de mutantes de p53 (Leroy *et al.*, 2014).

De esta manera es posible concluir una modificación en la regulación de HER2 como consecuencia de la expresión exógena de diferentes mutantes de p53.

Para evaluar los niveles de expresión del ARN mensajero, se llevaron a cabo ensayos de PCR cuantitativo, como se detalló en la sección de “Estrategia Experimental”. Los resultados muestran que las líneas celulares en las que las mutantes de p53 se expresa de manera endógena, tienen un mayor nivel de expresión del receptor HER2 comparando con las líneas celulares que expresan wtp53 o en el caso particular de Saos-2, que no tiene expresión de esta proteína (Figura 31A). En concordancia con los resultados obtenidos para la expresión de ARNm de *ERBB2*, también observamos mayores niveles de expresión de la proteína en las líneas celulares que expresan las diferentes mutantes de p53 (Figura 31B).

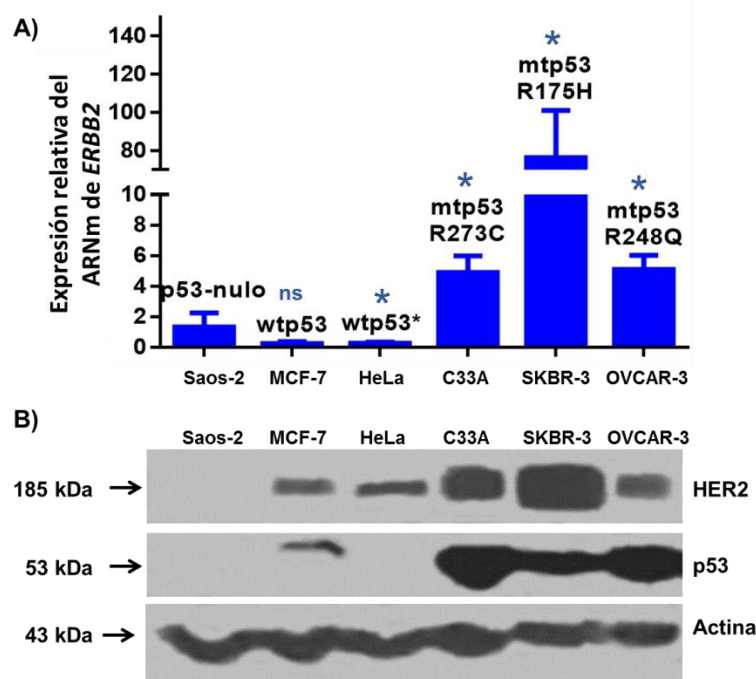


Figura 31. Panel de líneas celulares con expresión de p53 mutante muestran elevados niveles de expresión de ARNm de *ERBB2* y proteína HER2.

A) La expresión relativa del ARNm de *ERBB2* se determinó mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR); los datos finales se calcularon mediante el método del ciclo de umbral (CT) comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$), empleando el transcrito de β 2-microglobulina (β 2M) como control de normalización. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó comparando cada línea celular con la línea celular Saos-2 con la prueba de t-student, * $p < 0.05$; ns = análisis estadístico no significativo. B) Los niveles de proteína HER2 se determinaron mediante un ensayo de Western Blot. Se utilizaron cantidades iguales de lisados celulares totales y se identificaron las proteínas como se describe en la Estrategia Experimental. Las placas se volvieron a probar para el anticuerpo anti- β -actina como control de carga. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Además, en la Figura 32A se puede observar que la expresión exógena de wtp53 en la línea celular HeLa, influenciada por el efecto de E6 de VPH-18, disminuye la expresión del ARNm de *ERBB2*.

Evaluando el efecto de wtp53 sobre HER2, se realizó la transfección de wtp53 en las líneas celulares HeLa (Figura 32A) y en la línea células Saos-2 (Figura 32B), observamos que esta transfección disminuye la expresión del gen *ERBB2*. Determinamos también el efecto de la transfección de wtp53 en la línea celular Saos-2 (empleando un exceso de proteína para lograr ver la expresión de HER2 en Saos-2), observamos que wtp53 disminuye la expresión de HER2 (Figura 32D). Al evaluar el efecto del silenciamiento de wtp53 en la línea celular MCF-7, observamos que se aumenta la expresión de *ERBB2* (Figura 32C).

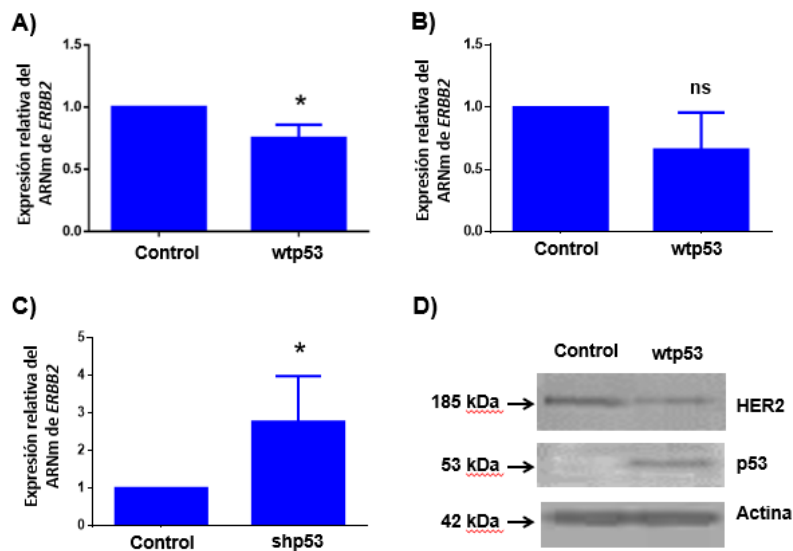


Figura 32. Expresión de wtp53 correlacionando con los niveles de expresión de ARNm de *ERBB2* y proteína HER2. Las células se procesaron para determinar los niveles de ARNm de *ERBB2* mediante RT-qPCR. Estos experimentos se realizaron por triplicado y los datos se muestran como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student comparando los resultados obtenidos en: A) HeLa B) Saos-2, células transfectadas con wtp53 frente a células transfectadas con vector vacío. C) MCF-7 transfectadas con shp53 frente a células transfectadas todas con plásmido Control. * $p < 0.05$, ns = análisis de diferencia estadística no significativa. D) La expresión de la proteína HER2 en Saos-2 transfectadas con wtp53 se evaluó mediante ensayos de Western Blot y la imagen de la transferencia es representativa de tres experimentos independientes.

Silenciamiento de las diferentes mutantes de p53 en líneas celulares

Debido a los resultados obtenidos en el panel de líneas celulares, se decidió también evaluar el efecto que tendría el silenciamiento de las mutantes de p53 que se expresan de manera endógena en las líneas celulares analizadas: C33A, SKBR-3 y OVCAR-3. Se empleó la transfección de un shRNA para inhibir la expresión de la mutante de p53 en cada línea celular, de acuerdo con lo descrito en la sección de “Estrategia Experimental”. Consideramos que evaluar el efecto de la regulación de HER2 por parte de las mutantes de p53 puede ser más interesante en una línea celular que representa uno de los tipos de cáncer en el que la expresión de este receptor tiene una relevancia clínica muy importante (SKBR-3).

Línea celular C33A (p53R273C)

El shRNA logró inhibir en un 80% la expresión de la mutante de p53 en la línea celular C33A, esta inhibición fue suficiente para disminuir considerablemente los niveles de expresión tanto a nivel de ARNm de *ERBB2*, como de proteína HER2 (Figura 33). Este resultado corrobora lo observado con la transfección transitoria de la mutante p53R273C en la línea celular HeLa, sugiriendo que existe una relación directa entre la presencia de esta mutante de p53 y la sobreexpresión de HER2.

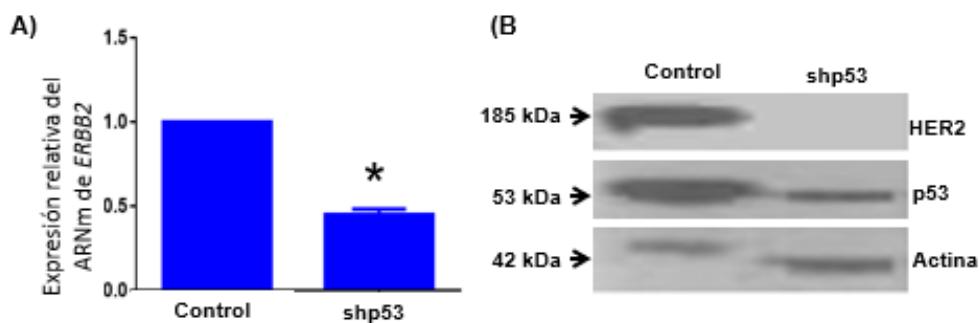


Figura 33. Inhibición de la expresión de la mutante p53R273C en la línea celular C33A.

La expresión de la mutante p53R273C en la línea celular C33A fue inhibida transitoriamente por el shRNA contra p53 (shp53). Después de 48 h, las células se procesaron para determinar: A) Expresión relativa del ARNm de *ERBB2* por RT-qPCR. los datos se muestran como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student. B) ensayo de expresión de proteínas por Western Blot. La imagen de la transferencia es representativa de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Línea celular OVCAR-3 (p53R248Q)

De igual forma que con la mutante p53R273C, el efecto del shRNA para inhibir la expresión de p53 logró disminuir la expresión de la mutante de p53R248Q en la línea celular OVCAR-3 y esta inhibición permitió observar un efecto de disminución en los niveles de expresión del ARNm y de la proteína de HER2 (Figura 34).

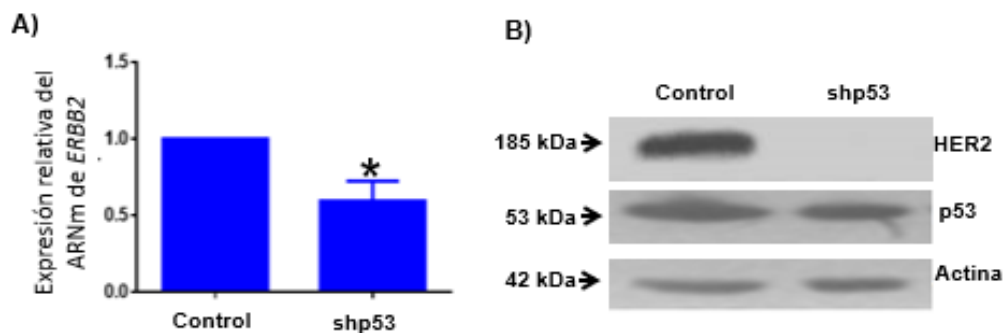


Figura 34. Inhibición de la expresión de la mutante p53R248Q en la línea celular OVCAR-3.

La expresión de la mutante p53R248Q en la línea celular OVCAR-3 fue inhibida transitoriamente por el shRNA contra p53 (shp53). Después de 48 h, las células se procesaron para determinar: A) Expresión relativa del ARNm de *ERBB2* por RT-qPCR. los datos se muestran como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student. B) ensayo de expresión de proteínas por Western Blot. La imagen de la transferencia es representativa de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

El resultado es muy similar a lo observado con la transfección de la mutante p53R273C en la línea celular HeLa, lo que nos indica que ambas mutantes pudieran causar una regulación de HER2. Efectos más específicos debieron ser evaluados para identificar un posible mecanismo de estas mutantes sobre la expresión de HER2.

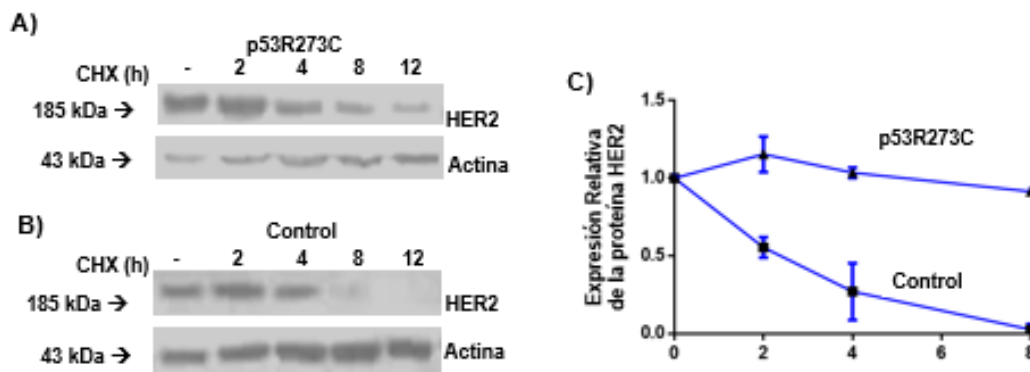
Línea celular SKBR-3 (p53R175H)

A pesar del resultado positivo obtenido en la línea SKBR-3, con respecto a la expresión de HER2 y de p53; así como los resultados previos que obtuvimos con la transfección transitoria de la mutante p53R175H en la línea celular HeLa; no fue posible lograr transfecciones de shRNA en la línea celular SKBR-3, por lo que decidimos enfocarnos en las mutantes con las que obtuvimos resultados más consistentes.

A partir de este punto se decidió que solo trabajaríamos con las líneas celulares C33A y OVCAR-3, las cuales representan a las mutantes p53R273C y p53R248Q, respectivamente.

Efecto de la transfección de mutantes en la estabilidad de la proteína HER2 (Ensayos con CHX)

Otro dato interesante que observamos fue que, en el caso de la mutante p53R273C, se observa una mayor expresión a nivel de proteína que a nivel de ARNm en la línea celular HeLa, por lo que se revisaron los efectos de esta mutante sobre la estabilidad de HER2 en esta línea celular. Para detener la síntesis de proteínas se emplearon pulsos del compuesto Cicloheximida (CHX), es decir, se exponen las células a una misma concentración del reactivo en diferentes periodos de tiempo. Los estudios con CHX consistieron en evaluar la estabilización de la proteína HER2, debido a que este compuesto detiene el proceso de traducción de proteínas¹⁶ en las células y por lo tanto permite evaluar la estabilidad de las proteínas ya sintetizadas en los periodos de tiempo seleccionados (McKeehan and Hardesty, 1969). En la Figura 35 se puede observar que la proteína HER2 permanece estable después de 8 horas de exposición a la CHX en células HeLa transfectadas con p53R273C en comparación con células transfectadas con el vector vacío, en donde la expresión de la proteína HER2 se pierde casi de manera total a las 8 horas.



¹⁶ Traducción de proteínas: Proceso de la síntesis de proteínas en la que se genera una cadena de aminoácidos (polipéptido) a partir del ARN mensajero

Figura 35. La mutante p53R273C aumenta la estabilidad de la proteína de HER2 en células HeLa.

Después de los tratamientos con 100 µg/ml de cicloheximida (CHX) en células HeLa transfectadas de manera estable con la mutante p53R273C (A) o vector vacío (B), los niveles de proteína HER2 se midieron en diferentes puntos de tiempo mediante ensayos de Western Blot. C) El análisis de densitometría de las imágenes de Western Blot que se muestran, se realizó con el software Syngene.

También se evaluó la estabilidad de la proteína HER2 en células Saos-2 transfectadas con ambas mutantes (p53R273C y p53R248Q). Encontramos que la proteína HER2 es aparentemente más estable, incluso a las 8 horas después de la exposición a CHX, en células Saos-2 que expresan cada una de las mutantes (Figura 36A y 36B) en comparación con las células control transfectadas con el vector vacío (Figura 36C).

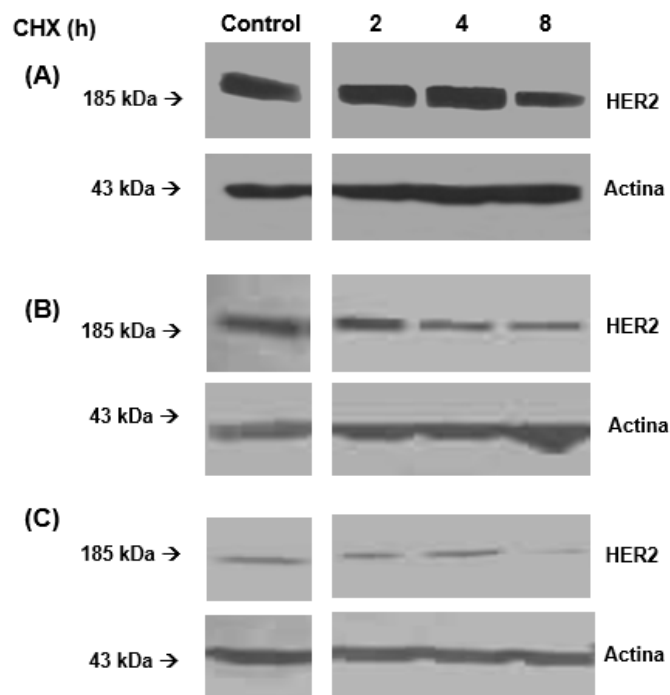


Figura 36. La expresión de las mutantes p53R273C y p53R248Q aumentan la estabilidad de la proteína HER2.

La estabilidad de la proteína HER2 se analizó en células Saos-2 transfectadas de manera estable con las mutantes p53R248Q (A), p53R273C (B) y vector vacío (C). Después del tratamiento con CHX (100 µg/ml) durante los períodos de tiempo indicados, las células se procesaron y la expresión de HER2 se evaluó mediante Western Blot, empleando actina como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en este apartado nos permiten pensar en la posibilidad de que las mutantes de p53 pudieran favorecer la estabilidad de la proteína de HER2, sin embargo, para poder concluir el resultado, se requieren más estudios.

Efectos de las mutantes p53R273C y p53R248Q sobre la expresión de HER2 en la línea celular Saos-2

Para corroborar en un modelo más “limpio” si las mutantes de p53 están contribuyendo en la inducción de sobreexpresión de HER2, se decidió hacer transfecciones estables con los plásmidos que expresan a las mutantes de p53R273C y p53R248Q, en la línea celular Saos-2. La razón para usar esta línea celular fue evitar la interpretación errónea de efectos adicionales de wtp53 sobre HER2, que sean debidos a factores intrínsecos de la línea celular (como, por ejemplo, la infección por VPH-18 en la línea celular HeLa). La línea celular Saos-2 tiene una menor eficiencia de transfección que HeLa, pero a pesar de eso, nos fue posible tener una eficiencia de transfección adecuada para nuestro propósito, además de expresar bajos niveles de HER2, como puede observarse en los resultados anteriores (Figura 31A y 31B, Página 67).

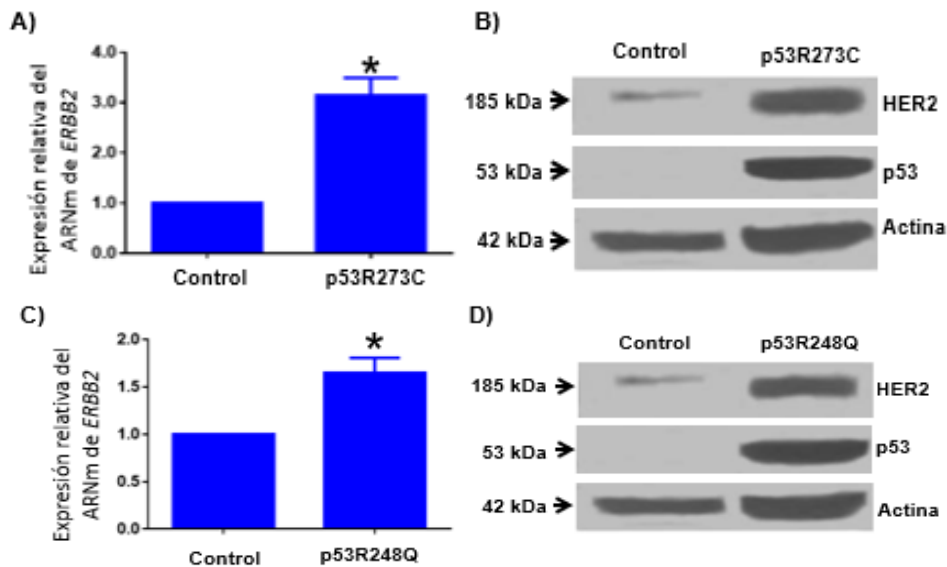


Figura 37. Las mutantes p53R273C y p53R248Q regulan de manera positiva la expresión del ARNm de *ERBB2* y la proteína HER2.

La línea celular Saos-2 se transfectó de manera estable con la mutante p53R273C, con la mutante p53R248Q, o con vector vacío. Las células transfectadas se procesaron después de la selección estable para: (A y C) el ensayo de expresión de ARNm de *ERBB2*, mediante RT-qPCR. Los datos se muestran como la media \pm SEM y el análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student. La expresión de la proteína HER2 (B y D) se realizó mediante ensayos de Western Blot. La imagen de la transferencia es representativa de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Al favorecer la expresión exógena de las mutantes p53R273C (Figura 37A y 37B) y p53R248Q (Figura 37C y 37D) en la línea celular Saos-2, observamos resultados consistentes con los obtenidos en la línea celular HeLa. En estas nuevas transfecciones estables, ambas mutantes favorecen la sobreexpresión del ARNm y de la proteína de HER2.

Los resultados obtenidos tanto en la línea celular HeLa como en la línea Saos-2, sugieren que la mutante p53R248Q regula de manera positiva la expresión de HER2 en ambos niveles, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional, mientras que la regulación por parte de la mutante p53R273C pudiera depender de su contexto celular.

Posteriormente, se revisaron diferentes aspectos a nivel transcripcional, para concluir con la propuesta de un mecanismo que nos permita explicar la regulación de la sobreexpresión de HER2 como efecto de la expresión de las mutantes p53R248Q y p53R273C.

Las mutantes p53R248Q y p53R273C inducen la activación transcripcional en el promotor de ERBB2

Evaluamos el efecto de las mutantes p53R248Q y p53R273C sobre el promotor¹⁷ de *ERBB2* empleando un ensayo de transactivación para este promotor, por medio del indicador luciferasa, el cual se describe ampliamente en la sección de “Estrategia Experimental”. Las líneas celulares usadas fueron Saos-2 modificadas para expresar de manera exógena y estable cada una de las mutantes a evaluar. Observamos que, bajo nuestras condiciones experimentales, las mutantes p53R248Q y p53R273C aumentaron de manera significativa, en más del 50%, la actividad del promotor de *ERBB2* con respecto al control (células Saos-2 transfectadas de manera estable con el vector vacío) (Figura 38). También determinamos la actividad de este promotor, en la línea celular Saos-2 transfectada con wtp53. Los resultados mostraron que la expresión exógena de wtp53 disminuye de manera significativa la actividad del promotor de *ERBB2* (Figura 38).

¹⁷ Promotor: Región del ADN que contiene diferentes secuencias específicas para la unión de factores de transcripción y que determina el lugar en el que la ARN polimerasa comienza la transcripción de un gen.

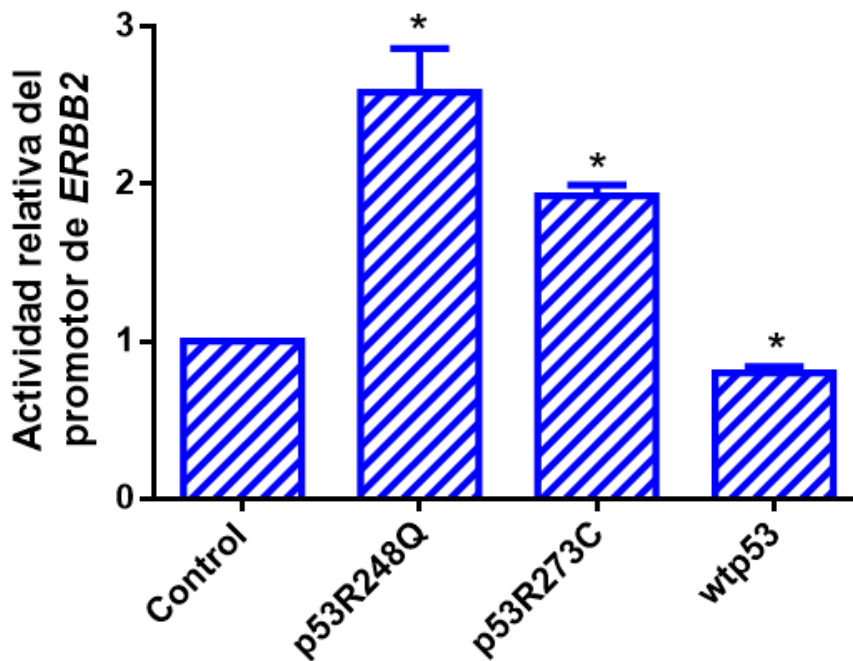


Figura 38. Las mutantes p53R248Q y p53R273C, pero no wtp53 transactivan el promotor de HER2 en células Saos-2 transfectadas de manera estable.

Las células Saos-2 establemente transfectadas se cotransfectaron con el plásmido reportero de luciferasa pNeuLite (dirigido a evaluar la activación del promotor de *ERBB2*). Después de 48 h, la actividad de luciferasa se cuantificó como se describe en la "Estrategia Experimental". Los resultados de la actividad de luciferasa se normalizaron a la actividad de la luciferasa de Renilla y se graficaron como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student comparando los resultados obtenidos para la Actividad Relativa en células Saos-2 transfectadas con p53R48Q, p53R273C o wtp53 contra el vector vacío: * $p < 0.05$.

Las mutantes p53R248Q y p53R273C se unen e inducen la acetilación de histonas en el promotor de ERBB2

El hecho de observar que ambas mutantes de p53, p53R248Q y p53R273C, aumentan de manera positiva la actividad del promotor de *ERBB2*, nos llevó realizar experimentos más específicos para poder explicar los resultados obtenidos. En este sentido, se pensó en evaluar un panorama a nivel molecular para determinar si existe una posible interacción física entre el promotor de *ERBB2* y las mutantes de p53. Llevamos a cabo ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina, con anticuerpos específicos contra p53 y contra las formas acetiladas de las histonas H3 y H4. De nuevo empleamos las líneas celulares Saos-2 transfectadas establemente con cada una de las mutantes de p53 y con el control de vector vacío. Como se explica en la sección de "Estrategia Experimental", tomamos el diseño de oligonucleótidos realizado por Hurst en 2001 y Delacroix en 2005, y que permite evaluar las regiones Distal y Proximal del promotor de *ERBB2* (Hurst, 2001; Delacroix *et al.*, 2005). Estos oligonucleótidos se denominarán de la misma forma que se

encuentran en la referencia citada: HER2a, HER2b y HER2c para la región Proximal, y HER2d, HER2e y HER2f para la región Distal del promotor (Figura 39A y 40A).

La región HER2a tiene una caja TATA en la posición de -22 a -26 pb, un sitio de unión para los factores transcripcionales de la familia ETS en la posición de -30 pb, y una caja CAAT (CCAAT) en la posición que va de -71 a -75 pb. La región HER2b, incluye una secuencia correspondiente al factor de unión transcripcional AP-2 en la posición -217. La región HER2c, también incluye un sitio de unión AP-2 en -495 pb (Figura 39A). Encontramos que en las regiones HER2a y HER2b, ambas mutantes p53R248Q y p53R273C tuvieron un enriquecimiento similar después de la inmunoprecipitación de p53: HER2a (enriquecimiento de 2.3 y 3.0 veces, respectivamente) y HER2b (2.4 y 2.5, respectivamente); además, en ambas regiones hay un aumento importante en las marcas de acetilación de las histonas H3 y H4 (Figura 39B y 39C). Para HER2c, encontramos que la mutante p53R248Q tiene el mayor enriquecimiento observado en la región Proximal del promotor *ERBB2*, mientras que la mutante p53R273C tuvo un enriquecimiento de patrón y nivel similar a lo observado tanto en HER2a como en HER2b (enriquecimiento de 10.4 y 2.2 veces, respectivamente) (Figura 39D). La línea celular Saos-2 transfectada con p53R248Q presentó el nivel más alto de proteína p53 y las histonas acetiladas (particularmente H4) en las tres regiones proximales.

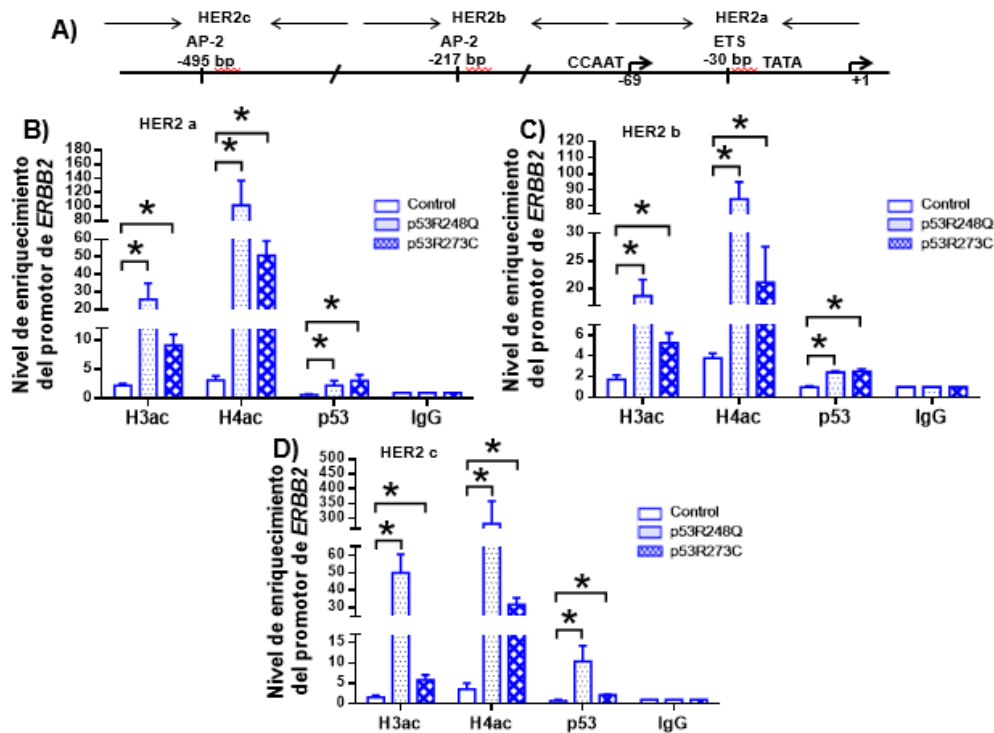


Figura 39. Las mutantes p53R248Q y p53R273C se asocian a la cromatina e induce la acetilación de histonas H3 y H4 en la región proximal del promotor de *ERBB2*.

Las células Saos-2 transfectadas de manera estable con p53R248Q, p53R273C o vector vacío se analizaron mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Se usaron anticuerpos contra la histona acetilada H3, H4, proteína p53 e IgG como anticuerpo control. A) Muestra una representación gráfica de las regiones proximales flanqueadas por los oligonucleótidos utilizados. El ADN precipitado se amplificó con los oligonucleótidos descritos en la sección de "Estrategia Experimental": HER2a (B); HER2b (C) y HER2c (D). El nivel de enriquecimiento de las histonas H3 y H4 acetiladas, así como de p53 en las diferentes regiones promotoras de *ERBB2* se determinaron mediante RT-qPCR. Los resultados de enriquecimiento de las regiones se grafican como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student empleando diversas comparaciones * $p < 0.05$.

Para la evaluación de la región Distal del promotor *ERBB2*, los oligonucleótidos denominados como HER2d y HER2e cubren respectivamente dos sitios de unión a AP-2 ubicados en las regiones -4000 pb y -4500 pb del promotor (Figura 40A). Observamos que HER2d tiene el mayor enriquecimiento en el caso de la mutante p53R273C en el promotor HER2. En general, hubo un modesto enriquecimiento de las marcas de histonas acetiladas para las regiones que corresponden a HER2d y HER2e (Figura 40B y 40C). Vale la pena notar que en las regiones distales (HER2d y HER2e) el enriquecimiento de H3 y H4 acetilados tiene diferencias entre las dos mutantes evaluadas; por otro lado, p53R273C indujo un aumento mayor en el enriquecimiento de las marcas de acetilación de las histonas para la región HER2d, por otro lado, la mutante p53R248Q favoreció un aumento mayor de estas marcas de acetilación en la región HER2e. En conjunto, estos resultados sugieren que ambas mutantes p53R248Q y p53R273C

podieran estar involucradas directamente en la activación del promotor de *ERBB2*. Por lo tanto, podemos pensar que ambas mutantes de p53 contribuyen a la modificación en el promotor de *ERBB2* hacia una cromatina más activada.

Además, en esta evaluación se incluyó otra región más alejada del promotor de *ERBB2*, que corresponde a sitios en los que no se ha observado que participen en la activación del promotor, y que, para fines de este trabajo, se denominó como HER2f (Figura 40A). Como era de esperarse, la región denominada como HER2f fue en la que se observó el menor enriquecimiento para las marcas de acetilación en las histonas H3 y H4, coincidiendo además con el reclutamiento más bajo de p53 en este promotor (Figura 40D).

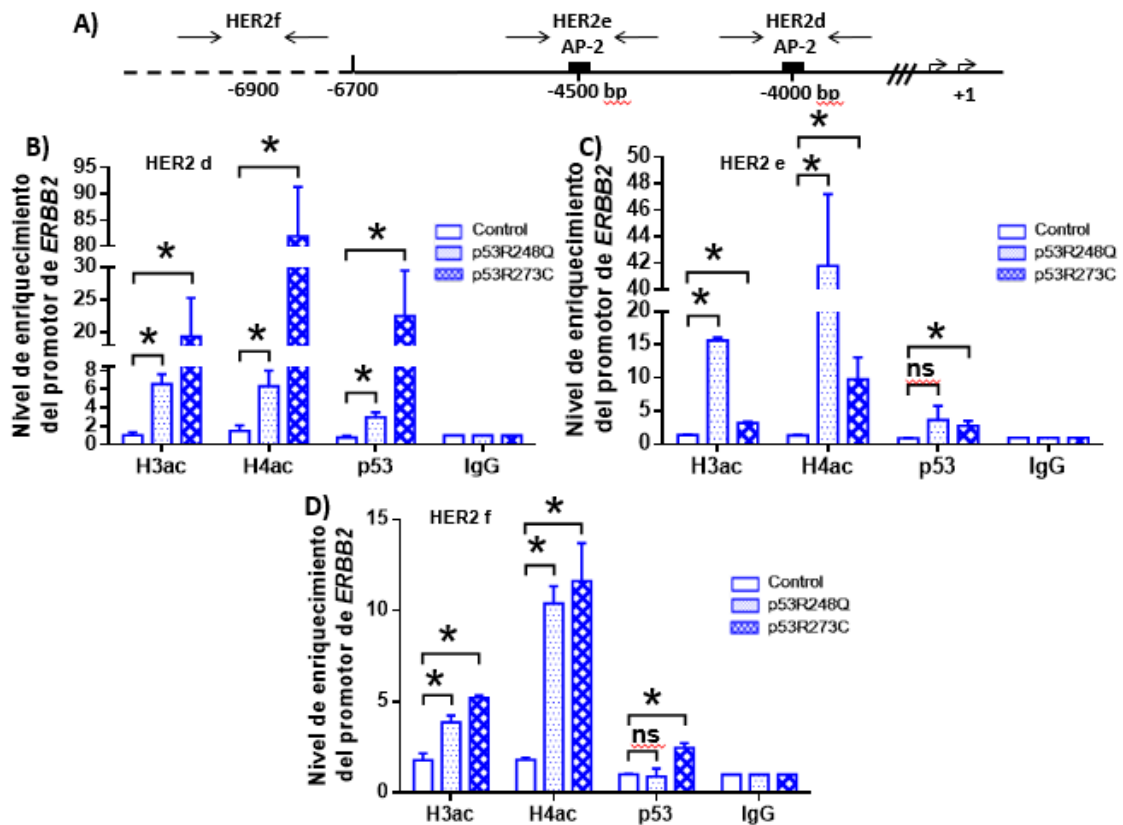


Figura 40. Las mutantes p53R248Q y p53R273C incrementan la acetilación de histonas y la unión de p53 a la region distal del promotor de HER2.

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se llevaron a cabo en células Saos-2 transfectadas establemente con p53R248Q, p53R273C y vector vacío. Se usaron anticuerpos contra la histona acetilada H3, H4, proteína p53 e IgG como anticuerpo control. A) Muestra una representación gráfica de las regiones distales flanqueadas por los oligonucleótidos utilizados. El ADN precipitado se amplificó con los oligonucleótidos descritos en la "Estrategia Experimental": HER2d (B) y HER2e (C). Los oligonucleótidos denominados como HER2f (D) se emplearon

como control. El nivel de enriquecimiento de las histonas H3 y H4 acetiladas, así como de p53 en las diferentes regiones promotoras de *ERBB2* se determinaron mediante RT-qPCR. Los resultados de enriquecimiento de las regiones se grafican como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t-student empleando diversas comparaciones * $p < 0.05$, ns = análisis de diferencia estadística no significativa.

DISCUSIÓN

Es muy conocido y aceptado ampliamente el hecho de que algunas de las proteínas mutantes de p53 (mtp53) promueven la carcinogénesis al ejercer un efecto dominante negativo sobre la proteína wtp53; o al adquirir nuevas actividades oncogénicas denominadas ganancia de función (GOF), que evidentemente son independientes de las funciones que normalmente desempeña wtp53 (Lozano, 2007; Weisz, Oren and Rotter, 2007; Oren and Rotter, 2010; Solomon, Madar and Rotter, 2011; Freed-Pastor and Prives, 2012; Muller and Vousden, 2013; Juan Liu, Zhang and Feng, 2014). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se observa una GOF por parte de las mutantes de p53, recientemente se han comenzado a definir y estudiar (Goldstein *et al.*, 2011). Existen reportes donde se ha identificado que las mutantes de p53 se detectan con mayor frecuencia en subgrupos de pacientes con cáncer de mama y/o gástrico con un mal pronóstico, especialmente en el subtipo que sobreexpresa el receptor HER2 (Jaehne *et al.*, 1992; Langerod *et al.*, 2007b), por esta razón en este trabajo estudiamos la posible regulación de la expresión de HER2 por mutantes de p53.

En el presente trabajo hicimos un análisis *in vitro* de la GOF de dos de las mutantes de p53 más frecuente, haciendo uso de un panel seleccionado de líneas celulares que son descritas de manera general en la sección de “Estrategia Experimental”. La línea celular Saos-2 se eligió por ser nula para la expresión de p53, ya sea de forma silvestre o mutante, y comúnmente es empleada para estudiar nuevos roles de wtp53, así como efectos de p53 mutantes (He, Ni and Huang, 2014). En el caso de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBR-3, Xiao *et al.*, observaron que las células MCF-7 tienen un número normal de copias de genes y un contenido

bajo de proteína HER2, mientras que SKBR-3 las células contienen aproximadamente 10 veces más copias del gen *ERBB2* y 15 veces más el contenido de su proteína (Xiao *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados de Xiao, observamos la mayor expresión de ARNm y expresión de proteínas de HER2 en la línea celular SKBR-3, aunque finalmente se decidió no utilizar la línea celular SKBR-3 o la mutante p53R175H en experimentos posteriores, debido a que la amplificación de HER2 en esta línea celular no nos permite analizar la posible regulación de las mutantes de p53 sobre la expresión de HER2. A pesar de que MCF-7 también alberga wtp53, los niveles basales de proteína HER2 observados en esta línea celular pueden ser inherentes al fondo genético normal necesario para mantener la función de las células mamarias; además de que se ha sugerido que la vía de la p53 está alterada en este tejido (Lacroix, Toillon y Leclercq 2006; Park et al. 2008). Por otro lado, en el caso de los adenocarcinomas cervicales, hay informes que concluyen que la amplificación de HER2 y las mutaciones en TP53 no son muy comunes en este tipo de cáncer y que otros fenómenos como la ganancia en el número de copias del cromosoma 17q no está asociada con la sobreexpresión de HER2 (Chavez-Blanco *et al.*, 2004). HeLa es una línea celular de cáncer cervical que contiene el genoma del virus del papiloma humano 18 (VPH-18) que codifica para la oncoproteína E6 y causa la degradación de p53 (Lagunas-Martinez, Madrid-Marina and Gariglio, 2010); lo que podría explicar la expresión de la proteína HER2 en las células HeLa. Evaluamos también una línea celular de cáncer cervical (C33A), en la que los niveles de expresión de HER2 es elevada y que expresa una proteína mutante de p53 (Narisawa-Saito *et al.*, 2007). Demostramos que en dos líneas celulares diferentes que albergan wtp53 (HeLa y MCF-7), el ARNm de HER2 se expresa en un nivel muy bajo, lo que concuerda con los resultados de Yang et al., en 2006 indicando que wtp53 podría regular negativamente HER2 (Yang, Lee and Kang, 2006). Beaufort et al., describieron varias líneas celulares de cáncer de ovario y confirmaron que existe una mutación de p53 para la línea celular OVCAR-3, pero no se ha reportado que estas células presentaran amplificación de HER2 (Beaufort *et al.*, 2014). Con el panel de líneas celulares que utilizamos en este estudio,

encontramos evidencia que soporta la idea de que mtp53 está implicado en la regulación positiva de la expresión de HER2. Nos interesamos particularmente en el efecto observado en las líneas celulares que albergan tres de las mutantes de p53 más comunes (p53R273C, p53R175H y p53R248Q). En estas líneas celulares observamos elevados niveles de expresión de HER2 (ARNm y proteína) en comparación con las líneas celulares que expresan una wtp53 funcional (MCF-7), una wtp53 con función inactivada (HeLa) o con expresión nula de p53 (Saos-2). Nuestros resultados son consistentes con otros estudios que sugieren una asociación clínica entre la presencia de mutaciones de p53 y la sobreexpresión de HER2 (Bull *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2010b; Melhem-Bertrandt *et al.*, 2012).

A pesar de haber comenzado con la evaluación del efecto de otras mutantes sobre la expresión de HER2: p53R273H y p53R175H, los resultados no fueron lo suficientemente concluyentes para seguir trabajando con éstas. Por lo tanto, nos enfocamos a analizar el posible mecanismo de regulación de la expresión de HER2 como consecuencia de la expresión exógena de las mutantes p53R248Q y p53R273C en dos tipos de células diferentes, HeLa y Saos-2. En contraparte, analizamos el efecto de inhibir la expresión de estas mutantes, que se expresan de manera endógena en las líneas celulares OVCAR-3 y C33A (p53R248Q y p53R273C, respectivamente). Observamos diferencias en la eficacia de acción del shRNA empleado para dicho propósito, lo cual puede deberse a la eficacia de la transfección intrínseca a cada línea celular. La mayor inhibición de la expresión de p53 fue para la expresión de la mutante p53R273C en comparación con la expresión para la mutante p53R248Q. A pesar de esto, en ambos casos, la inhibición de la expresión de las mutantes de p53 fue suficiente para disminuir la expresión de HER2, tanto a nivel de ARNm como de proteína. La regulación de HER2 por mutantes de p53, podría sugerir importantes implicaciones clínicas en el diagnóstico y la terapia de diversos tipos de cáncer que presentan sobre expresión de HER2 (Olivier *et al.*, 2009).

Con el fin de obtener información sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales las mutantes de p53 evaluadas regulan positivamente la expresión de HER2, evaluamos dos posibilidades, que no son mutuamente excluyentes: 1) Estabilización de la proteína HER2 aumentada y 2) Inducción de la actividad del promotor de *ERBB2*.

En el caso de la primera hipótesis, encontramos que p53R273C induce la estabilidad de la proteína HER2 en las líneas celulares HeLa y Saos-2. En contraste, la mutante p53R248Q solo mostró un ligero efecto en la estabilidad de la proteína HER2. Estos resultados nos sugieren que esta propiedad de la mutante p53R273C es independiente del contexto celular general. Por otra parte, con estos resultados podemos deducir que no todas las proteínas mutantes de p53 presentan las mismas características de GOF. Trabajos anteriores ya habían reportado la posibilidad de la estabilización de HER2 demostrando, por ejemplo, que la mutante p53R175H puede regular algunos genes que contribuyen a la estabilidad de la proteína HER2, como es el caso del gen de EGFR, que como efecto final puede contribuir a la dimerización de HER2 (Roskoski Jr., 2014; Yallowitz *et al.*, 2015). Por otro lado, se tiene conocimiento de reportes en los que se indica que la HSP90 (chaperona de choque térmico 90, de acuerdo con su traducción del inglés) también induce la estabilización de la proteína HER2 (Powers and Workman, 2006). El sistema de proteínas chaperonas¹⁸ ayuda a controlar la estabilidad de las formas recién traducidas, tanto de EGFR como de HER2, pero una vez que la proteína se encuentra madura y en funcionamiento, HSP90 solo puede ayudar a la estabilización de HER2 y no de EGFR. Curiosamente, también se ha informado que HSP90 también puede desempeñar un papel clave en el plegamiento de las proteínas¹⁹ mutantes de p53 y su consecuente estabilización: esto sugiere que una terapia dirigida a HSP90 podría inhibir al mismo tiempo la vía de señalización

¹⁸ Proteína chaperona: Proteínas que tienen como función estabilizar a las proteínas desplegadas, desplegarlas para su paso a través de membranas o para su degradación, y/o ayudarlas para su correcto plegamiento o ensamblaje

¹⁹ Plegamiento de proteínas: Proceso en el que una cadena del polipéptido formado en la traducción de proteínas se dobla para convertirse en una proteína biológicamente activa en su estructura nativa 3D.

de HER2 y la ganancia de función de las mutantes de p53 (Li *et al.*, 2011). Recientemente, también se demostró que las mutantes de p53 promueven la fosfoactivación de HSF1, su estabilización y la unión de esta proteína a secciones específicas de ADN en los promotores de sus genes blanco; HSF1 es el principal regulador transcripcional de las chaperonas de choque térmico, incluida la HSP90, por lo tanto se sugiere una cooperación oncogénica mtp53-HSF1-HSP90 para estabilizar la proteína HER2 (Li *et al.*, 2014). Con la aproximación experimental que realizamos en nuestro modelo, no nos fue posible establecer una asociación directa de la expresión de la proteína Hsp90 con la estabilidad en HER2 como consecuencia de la expresión de las mutantes de p53 evaluadas, así como no fue posible establecer que Hsp90 contribuyera en la propia estabilidad de estas mutantes (datos no mostrados).

Con el fin de evaluar la segunda posibilidad para la sobre expresión de HER2, tomamos en cuenta que en trabajos anteriores, se había demostrado la activación del promotor de genes como *MDR1*, *EGFR*, *NF-kB* y *Axl* por el efecto de mtp53 (Muller and Vousden, 2013; Vaughan *et al.*, 2014). Nuestros resultados mostraron que ambas mutantes de p53 (R248Q y R273C) expresada de forma estable en la línea celular Saos-2 indujeron la actividad del promotor del gen *ERBB2*. La regulación positiva de la actividad del promotor *ERBB2* podría ser el resultado de la unión directa de las proteínas p53 mutantes al ADN, o como resultado de la inducción o el reclutamiento de otros factores de transcripción y activadores transcripcionales, como podría ser el caso de las acetil-transferasas de histonas (HAT, por sus siglas en inglés). Entre los activadores conocidos del promotor de *ERBB2* se encuentran los factores de transcripción de la familia de ETS: AP-2 y YY1 (Hurst, 2001; Bosc and Janknecht, 2002; Allouche *et al.*, 2008); así como también represores, como por ejemplo FOXP3, PEA3 y GATA4 (Xing *et al.*, 2000; Hua *et al.*, 2009). De acuerdo a la secuencia reportada del promotor de *ERBB2* descrito por Hurst en 2001, evaluamos si la regulación positiva en la expresión del ARNm de *ERBB2* puede ser por efecto de la unión de p53 mutante a la secuencia promotora de *ERBB2* que contienen sitios de unión para AP-2 o ETS (Hurst, 2001). Demostramos el reclutamiento específico de las mutantes:

p53R248Q y p53R273C tanto en la región proximal como distal del promotor de *ERBB2*, pero es importante señalar que no todas las regiones presentaron el mismo nivel de enriquecimiento. De hecho, observamos que la mutante p53R248Q se une principalmente a la región proximal del promotor de *ERBB2*, mientras que la mutante p53R273C muestra su mayor nivel de reclutamiento en la región distal de este mismo. Aunque los mayores enriquecimientos de cada mutante se observaron en diferentes regiones del promotor de *ERBB2*, estos tienen en común que se localizan en sitios de unión a AP-2. Es posible que las mutantes de p53 solas o en complejo con proteínas AP-2 tengan una afinidad diferente o que se unan selectivamente a diferentes secuencias cerca de los sitios de unión de AP-2 en el promotor de *ERBB2*. Previamente se ha demostrado que los factores AP-2 se unen a wtp53 *in vitro* e *in vivo* (McPherson, Loktev and Weigel, 2002; Modugno *et al.*, 2002); por ejemplo, en una unión dependiente de p53, AP-2 α puede regular el promotor del gen *p21WAF1/CIP1* (McPherson, Loktev and Weigel, 2002; Wajapeyee and Somasundaram, 2003). Vale la pena mencionar que las mutantes p53R248Q y p53R273C son capaces de activar las regiones de unión de AP-2 en otros promotores, sugiriendo que estas mutantes de p53 podrían cooperar con AP-2 para activar la transcripción de *ERBB2*. También se ha demostrado que otros factores de transcripción interactúan con las mutantes p53, incluidos SP1, ETS1, ETS2, NF-Y y el receptor de vitamina D (Santoro, Strano and Blandino, 2014), que alteran la expresión de sus genes blanco. A pesar de que en nuestro trabajo descartamos el estudio de la mutante p53R273H, se ha demostrado que ésta podría ejercer su ganancia de función oncogénica al unirse a secuencias genómicas humanas que corresponden a sitios de unión de factores transcripcionales de la familia de ETS, en regiones proximales o distales de los promotores (Vaughan *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, el promotor proximal de *ERBB2* cuenta con una secuencia de ETS; por lo tanto, es posible pensar que las mutantes p53R248Q y p53R273C puedan interactuar con los factores de transcripción ETS.

De manera simultanea, en el ensayo de ChIP fue posible analizar el efecto de las mutantes de p53 sobre la activación directa o indirecta de las marcas epigenéticas de acetilación en histonas H3 y H4 (H3Ac y H4Ac), sobre la actividad del promotor de *ERBB2* (Mishra *et al.*, 2001; Falahi *et al.*, 2013). Como se esperaba, el enriquecimiento de la acetilación de histonas H3 y H4 inducido por las mutantes p53 coincide con el nivel de activación del promotor de *ERBB2*. Se observó una importante activación de la acetilación de ambas histonas en la región proximal del promotor de *ERBB2*, lo que nos sugiere que esta región pudiera tener una participación más relevante en la activación de dicho promotor. En este sentido de acuerdo con nuestros resultados, Zhu *et al.* demostraron que las mutantes GOF de p53 pueden unirse a genes reguladores de la cromatina, como las metiltransferasas MLL1, MLL2 y la acetiltransferasa MOZ, lo que favorece cambios en los patrones de metilación y acetilación de histonas en todo el genoma. El análisis del Atlas del genoma del cáncer muestra una regulación específica del aumento de MLL1, MLL2 y MOZ en tumores derivados de pacientes en los que se determinaron proteínas mutantes de p53 con ganancia de función (Zhu *et al.*, 2015). El gen MOZ, codifica para una enzima que agrega un grupo acetilo a la lisina K9 de la histona H3, lo que permite un aumento de la expresión génica (Zhu *et al.*, 2015). De manera particular, en el caso de la histona H3, observamos que las mutantes p53R248Q y p53R273C, aumentan el nivel de marcas acetiladas en la histona H3 en el promotor *ERBB2*. Por otro lado, observamos que el nivel de acetilación de la histona H4 fue más alto que el de la histona H3 en todas las regiones analizadas, debido principalmente al efecto de la mutante p53R248Q. Estos resultados coinciden con la observación de Mishra SK *et al.*, 2001, en la que se utilizaron inhibidores de HDAC para evaluar el efecto de estas marcas de acetilación sobre el promotor de *ERBB2* (Mishra *et al.*, 2001). En nuestro trabajo, podemos sugerir que la acetilación de H4 es más importante para la activación de *ERBB2*.

En la Figura 41 se muestra una representación esquemática propuesta en base a nuestros resultados, sobre la disposición de las histonas y la unión de las mutantes de p53 evaluadas en las regiones distal y proximal del promotor de *ERBB2*.

Modelo propuesto

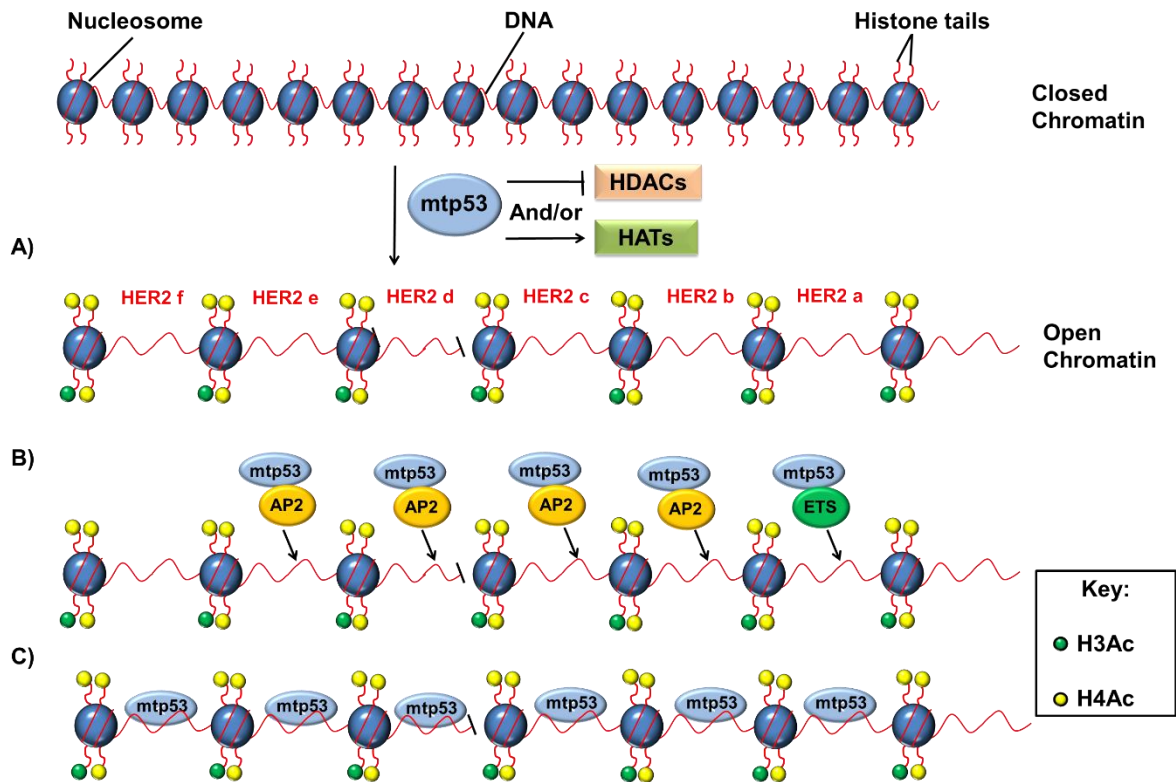


Figura 41. Modelo de regulación positiva de *ERBB2* por mutantes de p53.

En el modelo propuesto se representan tres mecanismos moleculares diferentes de cómo es que p53 mutante puede activar la transcripción del promotor del gen *ERBB2*. A) p53 mutante puede inducir la acetilación de histona (s) y/o inhibir desacetilasas de histonas, causando el enriquecimiento de las formas acetiladas de las histonas H3 y H4 y como consecuencia la reorganización de la cromatina en el promotor de *ERBB2*. B) Las mutantes de p53 pueden inducir la interacción de uno o más factores de transcripción con el promotor de *ERBB2*, como, por ejemplo, AP-2 y ETS; C) Las propias mutantes de p53 puede interactuar directamente en el promotor de *ERBB2*. Estas 3 posibilidades no son mutuamente excluyentes y podrían conducir a la activación del promotor de *ERBB2* y la consecuente expresión del gen. En esta representación, las histonas son esferas azules grandes, las marcas acetiladas de histona H3 son pequeñas esferas verdes, las marcas acetiladas de histona H4 son pequeñas esferas amarillas, las proteínas p53 mutantes se muestran como óvalos de color azul claro, los factores de transcripción como AP-2 son óvalos amarillos y ETS es un óvalo verde; la secuencia de ADN se muestra en rojo.

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestro estudio ha demostrado por primera vez que 1) la sobreexpresión de HER2 puede ser inducida por mutantes p53 a través de la activación transcripcional de *ERBB2* y en cierto modo favoreciendo la estabilización de su proteína; 2) La acetilación de las histonas H3 y H4 se asocian principalmente a la región proximal del promotor de *ERBB2* en presencia de las mutantes p53R248Q y p53R273C.

Sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar por completo el mecanismo a través del cual estas mutantes de p53 pueden inducir una regulación positiva de la expresión del ARNm de *ERBB2* y la sobreexpresión de su proteína. Explorar la ganancia de funciones oncogénicas de las mutantes de p53 puede revelar nuevas oportunidades para el diagnóstico y la terapia. En este sentido, nuestros resultados podrían tener implicaciones clínicas en el cáncer de mama y otros tipos de cáncer en los que se ha observado sobreexpresión de HER2 y que por lo tanto se ha utilizado como un objetivo terapéutico. Como mencionamos en la sección de antecedentes, Wilson et al. realizaron una asociación clínica e informaron que los pacientes portadores de mutaciones de p53 muestran una probabilidad significativamente mayor de desarrollar cáncer de mama con amplificación del gen *ERBB2*. Será necesario demostrar si en particular las mutantes p53R248Q y p53R273C tienen alguna asociación clínica a la sobreexpresión de HER2 en el cáncer o si existen otras mutaciones específicas de p53 asociadas a la sobreexpresión de este receptor.

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados son significativos estadísticamente, pero aún así consideramos que es indispensable mejorar nuestro modelo de estudio, ya sea agregando más variantes *in vitro* ó comenzando con la evaluación de estos fenómenos en estudios *in vivo* para poder tener un mayor acercamiento a lo que pasa en un organismo completo, con las variantes que esto implica.

El hecho de contar ya con líneas celulares que expresan de manera estable dos de las mutantes más frecuentes de p53: p53R248Q y p53R273C, nos permite analizar el efecto de esta mutantes en otros aspectos relacionados con el desarrollo o mantenimiento del cáncer *in vitro*. Por ejemplo, en una colaboración que se realiza con el Instituto Nacional de Cardiología, ya se tienen resultados importantes para la publicación del efecto de la mutante p53R248Q sobre el mantenimiento de la glicólisis y la disminución del estrés oxidativo en diferentes condiciones de suministro de oxígeno.

Los resultados que obtuvimos de la estabilidad de la proteína pueden ser explicados más ampliamente, al observar como se modifican las proteínas involucradas en la estabilidad del receptor HER2, por lo que en ese aspecto aún tenemos trabajo importante que desarrollar.

A nivel de la regulación transcripcional del gen *ERBB2*, logramos obtener mayores resultados que nos permiten identificar como es que las mutantes de p53 evaluadas pueden participar en la regulación de este gen. Los resultados nos permitieron realizar la propuesta de un modelo en el que se explica que el efecto de las mutante p53R248Q y p53R273C sobre el promotor de *ERBB2* puede ser mediante interacción directa o mediante la modificación epigenética (específicamente sobre la acetilación de histonas).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. M. and Cory, S. (2007) 'The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy', *Oncogene*, 26(9), pp. 1324–1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220.
- Allouche, A. *et al.* (2008) 'The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors', *Breast Cancer Res*, 10(1), p. R9. doi: 10.1186/bcr1851.
- Arteaga, C. L. (2002) 'Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?', *The oncologist*, 7 Suppl 4, pp. 31–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202786> (Accessed: 28 September 2018).
- Baker, S. J. *et al.* (1989) 'Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas.', *Science (New York, N.Y.)*, 244(4901), pp. 217–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649981> (Accessed: 24 September 2018).
- Baker, S. J. *et al.* (1990) 'Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53', *Science*, 249(4971), pp. 912–915. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2144057>.
- Ballestar, E. and Esteller, M. (2008) 'Chapter 9 Epigenetic Gene Regulation in Cancer', in, pp. 247–267. doi: 10.1016/S0065-2660(07)00009-0.
- Bazley, L. A. and Gullick, W. J. (2005) 'The epidermal growth factor receptor family.', *Endocrine-related cancer*, 12 Suppl 1(Supplement_1), pp. S17-27. doi: 10.1677/erc.1.01032.
- Beaufort, C. M. *et al.* (2014) 'Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes.', *PLoS one*. Edited by R. Pearson, 9(9), p. e103988. doi: 10.1371/journal.pone.0103988.
- Beckhardt, R. N. *et al.* (1995) 'HER-2/neu oncogene characterization in head and neck squamous cell carcinoma.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 121(11), pp. 1265–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576473> (Accessed: 25 September 2018).
- Berx, G. and van Roy, F. (2009) 'Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), pp. a003129–a003129. doi: 10.1101/cshperspect.a003129.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. and Moses, H. L. (2004) 'Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression', *Nature*, 432(7015), pp. 332–337. doi: 10.1038/nature03096.
- Blandino, G., Levine, A. J. and Oren, M. (1999) 'Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy', *Oncogene*, 18(2), pp. 477–485. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927204>.
- Bosc, D. G. and Janknecht, R. (2002) 'Regulation of Her2/neu promoter activity by the ETS transcription factor, ER81', *J Cell Biochem*, 86(1), pp. 174–183. doi: 10.1002/jcb.10205.
- Brooks, C. L. and Gu, W. (2003) 'Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: The molecular basis for p53 regulation', *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), pp. 164–171. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00003-6.
- Brosh, R. and Rotter, V. (2009) 'When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field', *Nat Rev Cancer*, 9(10), pp. 701–713. doi: 10.1038/nrc2693.

- Bull, S. B. *et al.* (2004) 'The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer', *J Clin Oncol*, 22(1), pp. 86–96. doi: 10.1200/JCO.2004.09.128.
- Bullock, A. N. and Fersht, A. R. (2001) 'Rescuing the function of mutant p53.', *Nature reviews. Cancer*, 1(1), pp. 68–76. doi: 10.1038/35094077.
- Cadwell, C. and Zambetti, G. P. (2001) 'The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth.', *Gene*, 277(1–2), pp. 15–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602342> (Accessed: 25 September 2018).
- Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004) 'Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 4(2), pp. 118–132. doi: 10.1038/nrc1276.
- Chan, K. T. and Lung, M. L. (2004) 'Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line', *Cancer Chemother Pharmacol*, 53(6), pp. 519–526. doi: 10.1007/s00280-004-0767-4.
- Chang, C. *et al.* (1979) 'Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells.', *Journal of virology*, 31(2), pp. 463–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/225565> (Accessed: 24 September 2018).
- Chavez-Blanco, A. *et al.* (2004) 'HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target', *BMC Cancer*, 4(1), p. 59. doi: 10.1186/1471-2407-4-59.
- Cheng, N. *et al.* (2008) 'Transforming Growth Factor- Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion', *Molecular Cancer Research*, 6(10), pp. 1521–1533. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.
- Colotta, F. *et al.* (2009) 'Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability.', *Carcinogenesis*, 30(7), pp. 1073–81. doi: 10.1093/carcin/bgp127.
- Croce, C. M. (2008) 'Oncogenes and Cancer', *New England Journal of Medicine*, 358(5), pp. 502–511. doi: 10.1056/NEJMra072367.
- DeBerardinis, R. J. *et al.* (2008) 'The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation', *Cell Metabolism*, 7(1), pp. 11–20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- Decarlo, D. and Hadden, M. K. (2012) 'Oncoepigenomics: making histone lysine methylation count.', *European journal of medicinal chemistry*, 56, pp. 179–94. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.08.010.
- Delacroix, L. *et al.* (2005) 'Distal ERBB2 promoter fragment displays specific transcriptional and nuclear binding activities in ERBB2 overexpressing breast cancer cells', *DNA Cell Biol*, 24(9), pp. 582–594. doi: 10.1089/dna.2005.24.582.
- Dillon, R. L. *et al.* (2007) 'An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3sigma tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer', *Mol Cell Biol*, 27(24), pp. 8648–8657. doi: 10.1128/MCB.00866-07.
- Duffy, M. J., Synnott, N. C. and Crown, J. (2018) 'Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker', *Breast Cancer Research and Treatment*, 170(2), pp. 213–219. doi: 10.1007/s10549-018-4753-7.
- Egger, G. *et al.* (2004) 'Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.', *Nature*, 429(6990), pp. 457–63. doi: 10.1038/nature02625.

- Eliyahu, D. *et al.* (1989) 'Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), pp. 8763–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2530586> (Accessed: 24 September 2018).
- Eltze, E. *et al.* (2005) 'Cox-2 and Her2/neu co-expression in invasive bladder cancer.', *International journal of oncology*, 26(6), pp. 1525–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870865> (Accessed: 25 September 2018).
- Evan, G. and Littlewood, T. (1998) 'A matter of life and cell death.', *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp. 1317–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721090> (Accessed: 24 September 2018).
- Falahi, F. *et al.* (2013) 'Towards sustained silencing of HER2/neu in cancer by epigenetic editing', *Mol Cancer Res*, 11(9), pp. 1029–1039. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0567.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W. and Levine, A. J. (1989) 'The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.', *Cell*, 57(7), pp. 1083–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2525423> (Accessed: 24 September 2018).
- Fisher, A. G. (2002) 'Cellular identity and lineage choice.', *Nature reviews. Immunology*, 2(12), pp. 977–82. doi: 10.1038/nri958.
- Freed-Pastor, W. A. and Prives, C. (2012) 'Mutant p53: one name, many proteins', *Genes Dev*, 26(12), pp. 1268–1286. doi: 10.1101/gad.190678.112.
- Goldstein, I. *et al.* (2011) 'Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: New landmarks on the way to targeted therapies', *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 18(1), pp. 2–11. doi: 10.1038/cgt.2010.63.
- Graus-Porta, D. *et al.* (1997) 'ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling', *EMBO J*, 16(7), pp. 1647–1655. doi: 10.1093/emboj/16.7.1647.
- GRØNBAEK, K., HOTHER, C. and JONES, P. A. (2007) 'Epigenetic changes in cancer', *APMIS*, 115(10), pp. 1039–1059. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_636.xml.x.
- Hainaut, P. and Hollstein, M. (2000) 'p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.', *Advances in cancer research*, 77, pp. 81–137. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549356> (Accessed: 25 September 2018).
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) 'Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.', *Cell*, 86(3), pp. 353–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718> (Accessed: 24 September 2018).
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer.', *Cell*, 100(1), pp. 57–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> (Accessed: 1 November 2018).
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- He, H., Ni, J. and Huang, J. (2014) 'Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review)', *Oncology Letters*, 7(5), pp. 1352–1362. doi: 10.3892/ol.2014.1935.
- Heldin, C. H. (1995) 'Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.', *Cell*, 80(2), pp. 213–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834741> (Accessed: 28 September 2018).

Helin, K. and Dhanak, D. (2013) 'Chromatin proteins and modifications as drug targets', *Nature*, 502(7472), pp. 480–488. doi: 10.1038/nature12751.

Hetzel, D. J. *et al.* (1992) 'HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer.', *Gynecologic oncology*, 47(2), pp. 179–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1361478> (Accessed: 25 September 2018).

Hirashima, N. *et al.* (2001) 'Protein overexpression and gene amplification of c-erb B-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study.', *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 14(6), pp. 556–62. doi: 10.1038/modpathol.3880350.

Holbro, T., Civenni, G. and Hynes, N. E. (2003) 'The ErbB receptors and their role in cancer progression.', *Experimental cell research*, 284(1), pp. 99–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648469> (Accessed: 25 September 2018).

Hua, G. *et al.* (2009) 'A negative feedback regulatory loop associates the tyrosine kinase receptor ERBB2 and the transcription factor GATA4 in breast cancer cells', *Mol Cancer Res*. 2009/03/12, 7(3), pp. 402–414. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-01751541-7786.MCR-08-0175 [pii].

Hudelist, G. *et al.* (2003) 'Co-Expression of ErbB-Family Members in Human Breast Cancer: Her-2/neu is the Preferred Dimerization Candidate in Nodal-positive Tumors', *Breast Cancer Research and Treatment*, 80(3), pp. 353–361. doi: 10.1023/A:1024929522376.

Hurst, H. C. (2001) 'Update on HER-2 as a target for cancer therapy: the ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment', *Breast Cancer Res*, 3(6), pp. 395–398. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737892>.

Hynes, N. E. and MacDonald, G. (2009) 'ErbB receptors and signaling pathways in cancer', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2008.12.010.

Hynes, N. E. and Stern, D. F. (1994) 'The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer.', *Biochimica et biophysica acta*, 1198(2–3), pp. 165–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819273> (Accessed: 28 September 2018).

Imran, A. *et al.* (2017) 'Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article.', *Iranian journal of public health*, 46(11), pp. 1475–1485. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29167765> (Accessed: 19 July 2018).

Jaehne, J. *et al.* (1992) 'Expression of Her2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma', *J Cancer Res Clin Oncol*, 118(6), pp. 474–479. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1352299>.

Joerger, A. C. and Fersht, A. R. (2007) 'Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants.', *Advances in cancer research*, 97, pp. 1–23. doi: 10.1016/S0065-230X(06)97001-8.

Jones, R. G. and Thompson, C. B. (2009) 'Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth', *Genes & Development*, 23(5), pp. 537–548. doi: 10.1101/gad.1756509.

Junk, D. J. *et al.* (2008) 'Different mutant/wild-type p53 combinations cause a spectrum of increased invasive potential in nonmalignant immortalized human mammary epithelial cells.', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(5), pp. 450–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472962> (Accessed: 25 September 2018).

Kandoth, C. *et al.* (2013) 'Mutational landscape and significance across 12 major cancer types.',

Nature, 502(7471), pp. 333–339. doi: 10.1038/nature12634.

Kato, S. *et al.* (2003) 'Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), pp. 8424–8429. doi: 10.1073/pnas.1431692100.

Kennedy, K. M. and Dewhirst, M. W. (2010) 'Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation', *Future Oncology*, 6(1), pp. 127–148. doi: 10.2217/fon.09.145.

Knowlden, J. M. *et al.* (2003) 'Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells.', *Endocrinology*, 144(3), pp. 1032–44. doi: 10.1210/en.2002-220620.

Kress, M. *et al.* (1979) 'Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum.', *Journal of virology*, 31(2), pp. 472–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/225566> (Accessed: 24 September 2018).

Lagunas-Martinez, A., Madrid-Marina, V. and Gariglio, P. (2010) 'Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), pp. 6–16. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.03.005.

Lane, D. P. (1992) 'Cancer. p53, guardian of the genome.', *Nature*, 358(6381), pp. 15–6. doi: 10.1038/358015a0.

Lane, D. P. and Crawford, L. V (1979) 'T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.', *Nature*, 278(5701), pp. 261–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218111> (Accessed: 24 September 2018).

Langerod, A. *et al.* (2007a) 'TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer', *Breast Cancer Res.* 2007/05/17, 9(3), p. R30. doi: bcr1675 [pii]10.1186/bcr1675.

Langerod, A. *et al.* (2007b) 'TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer', *Breast Cancer Res.* 9(3), p. R30. doi: 10.1186/bcr1675.

Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010) 'Cell signaling by receptor tyrosine kinases', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.

Leroy, B. *et al.* (2013) 'The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis', *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. D962–D969. doi: 10.1093/nar/gks1033.

Leroy, B. *et al.* (2014) 'Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: a reassessment.', *Human mutation.* NIH Public Access, 35(6), pp. 756–65. doi: 10.1002/humu.22556.

Li, D. *et al.* (2011) 'Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells', *Mol Cancer Res*, 9(5), pp. 577–588. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0534.

Li, D. *et al.* (2014) 'A gain-of-function mutant p53-HSF1 feed forward circuit governs adaptation of cancer cells to proteotoxic stress', *Cell Death Dis*, 5, p. e1194. doi: 10.1038/cddis.2014.158.

Linzer, D. I. and Levine, A. J. (1979) 'Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.', *Cell*,

- 17(1), pp. 43–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222475> (Accessed: 24 September 2018).
- Linzer, D. I., Maltzman, W. and Levine, A. J. (1979) 'The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen.', *Virology*, 98(2), pp. 308–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/228475> (Accessed: 24 September 2018).
- Liu, G. and Chen, X. (2006) 'Regulation of the p53 transcriptional activity', *J Cell Biochem*, 97(3), pp. 448–458. doi: 10.1002/jcb.20700.
- Liu, J., Zhang, C. and Feng, Z. (2014) 'Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer.', *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 46(3), pp. 170–9. doi: 10.1093/abbs/gmt144.
- Liu, J., Zhang, C. and Feng, Z. (2014) 'Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46(3), pp. 170–179. doi: 10.1093/abbs/gmt144.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lowe, S. W., Cepero, E. and Evan, G. (2004) 'Intrinsic tumour suppression.', *Nature*, 432(7015), pp. 307–15. doi: 10.1038/nature03098.
- Lozano, G. (2007) 'The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models', *Curr Opin Genet Dev*, 17(1), pp. 66–70. doi: 10.1016/j.gde.2006.12.003.
- Luo, J., Solimini, N. L. and Elledge, S. J. (2009) 'Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction.', *Cell*, 136(5), pp. 823–37. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.024.
- McKeehan, W. and Hardesty, B. (1969) 'The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 36(4), pp. 625–630. doi: 10.1016/0006-291X(69)90351-9.
- McKenzie, S. J. *et al.* (1993) 'Serum levels of HER-2 neu (C-erbB-2) correlate with overexpression of p185neu in human ovarian cancer.', *Cancer*, 71(12), pp. 3942–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099528> (Accessed: 25 September 2018).
- McPherson, L. A., Loktev, A. V and Weigel, R. J. (2002) 'Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53', *J Biol Chem*, 277(47), pp. 45028–45033. doi: 10.1074/jbc.M208924200.
- Melhem-Bertrandt, A. *et al.* (2012) 'Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations', *Cancer*. 2011/07/16, 118(4), pp. 908–913. doi: 10.1002/cncr.26377.
- Mendelsohn, J. and Baselga, J. (2003) 'Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(14), pp. 2787–99. doi: 10.1200/JCO.2003.01.504.
- Milner, J. and Medcalf, E. A. (1991) 'Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation.', *Cell*, 65(5), pp. 765–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2040013> (Accessed: 25 September 2018).
- Milner, J., Medcalf, E. A. and Cook, A. C. (1991) 'Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes.', *Molecular and cellular biology*, 11(1), pp. 12–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986215> (Accessed: 25 September 2018).
- Mishra, S. K. *et al.* (2001) 'Dynamic chromatin remodeling on the HER2 promoter in human breast cancer cells', *FEBS Lett*, 507(1), pp. 88–94. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682064>.

Mitra, A. B. *et al.* (1994) 'ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix.', *Cancer research*, 54(3), pp. 637–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7905784> (Accessed: 25 September 2018).

Modugno, M. *et al.* (2002) 'p53-dependent downregulation of metastasis-associated laminin receptor', *Oncogene*, 21(49), pp. 7478–7487. doi: 10.1038/sj.onc.1205957.

Mougiakakos, D. *et al.* (2010) 'Regulatory T Cells in Cancer', in *Advances in cancer research*, pp. 57–117. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07003-X.

Muller, P. A. and Vousden, K. H. (2013) 'p53 mutations in cancer', *Nat Cell Biol*, 15(1), pp. 2–8. doi: 10.1038/ncb2641.

Murray-Zmijewski, F., Slee, E. A. and Lu, X. (2008) 'A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(9), pp. 702–12. doi: 10.1038/nrm2451.

Narisawa-Saito, M. *et al.* (2007) 'HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes', *Oncogene*, 26(21), pp. 2988–2996. doi: 10.1038/sj.onc.1210118.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G. and Halazonetis, T. D. (2010) 'Genomic instability — an evolving hallmark of cancer', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), pp. 220–228. doi: 10.1038/nrm2858.

Olayioye, M. A. *et al.* (2000) 'The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.', *The EMBO journal*, 19(13), pp. 3159–67. doi: 10.1093/emboj/19.13.3159.

Olivier, M. *et al.* (2009) 'Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective', *Cancer Gene Ther.* 2008/09/20, 16(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/cgt.2008.69cgt200869 [pii].

Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010) 'TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use', *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010/02/26, 2(1), p. a001008. doi: 10.1101/cshperspect.a001008.

Olsson, A. *et al.* (2007) 'How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression?', *Cell death and differentiation*, 14(9), pp. 1561–75. doi: 10.1038/sj.cdd.4402196.

Oren, M. (2003) 'Decision making by p53: life, death and cancer', *Cell Death Differ.*, 10, pp. 431–442. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401183>.

Oren, M. and Rotter, V. (2010) 'Mutant p53 gain-of-function in cancer', *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2(2), p. a001107. doi: 10.1101/cshperspect.a001107.

Park, J. W. *et al.* (2008) 'Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2', *Clin Breast Cancer*, 8(5), pp. 392–401. doi: 10.3816/CBC.2008.n.047.

Pawson, T. and Warner, N. (2007) 'Oncogenic re-wiring of cellular signaling pathways.', *Oncogene*, 26(9), pp. 1268–75. doi: 10.1038/sj.onc.1210255.

Perona, R. (2006) 'Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors.', *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 8(2), pp. 77–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632420> (Accessed: 24 September 2018).

- Petitjean, A. *et al.* (2007) 'Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database', *Hum Mutat.* 2007/02/22, 28(6), pp. 622–629. doi: 10.1002/humu.20495.
- Piccolo, S. R. and Frey, L. J. (2008) 'Somatic mutation signatures of cancer.', *AMIA ... Annual Symposium proceedings. AMIA Symposium*, pp. 202–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18999255> (Accessed: 24 September 2018).
- De Potter, I. Y. *et al.* (2001) 'Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation.', *Experimental cell research*, 271(2), pp. 315–28. doi: 10.1006/excr.2001.5390.
- Powers, M. V and Workman, P. (2006) 'Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors', *Endocr Relat Cancer*, 13 Suppl 1, pp. S125-35. doi: 10.1677/erc.1.01324.
- Reichert, U. *et al.* (2007) 'Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus.', *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(1), pp. 120–9. doi: 10.1038/modpathol.3800712.
- Resnick, M. A. and Inga, A. (2003) 'Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), pp. 9934–9. doi: 10.1073/pnas.1633803100.
- Roskoski Jr., R. (2014) 'The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer', *Pharmacol Res*, 79, pp. 34–74. doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.
- Rotmistrovsky, K., Jang, W. and Schuler, G. D. (2004) 'A web server for performing electronic PCR.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 32(Web Server issue), pp. W108-12. doi: 10.1093/nar/gkh450.
- Santoro, R., Strano, S. and Blandino, G. (2014) 'Transcriptional regulation by mutant p53 and oncogenesis', *Subcell Biochem*, 85, pp. 91–103. doi: 10.1007/978-94-017-9211-0_5.
- Schon, K. and Tischkowitz, M. (2018) 'Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53', *Breast Cancer Research and Treatment*, 167(2), pp. 417–423. doi: 10.1007/s10549-017-4531-y.
- Schuell, B. *et al.* (2006) 'HER 2/neu protein expression in colorectal cancer.', *BMC cancer*, 6(1), p. 123. doi: 10.1186/1471-2407-6-123.
- Semenza, G. L. (2008) 'Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate.', *The Journal of clinical investigation*, 118(12), pp. 3835–7. doi: 10.1172/JCI37373.
- Sigal, A. and Rotter, V. (2000) 'Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome', *Cancer Res.* 2001/01/13, 60(24), pp. 6788–6793. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156366>.
- Slamon, D. J. *et al.* (1987) 'Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.', *Science (New York, N.Y.)*, 235(4785), pp. 177–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3798106> (Accessed: 25 September 2018).
- Slamon, D. J. *et al.* (2001) 'Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2', *New England Journal of Medicine*, 344(11), pp. 783–792. doi: 10.1056/NEJM200103153441101.

- Solomon, H., Madar, S. and Rotter, V. (2011) 'Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer', *The Journal of Pathology*, 225(4), pp. 475–478. doi: 10.1002/path.2988.
- Soussi, T. (2000) 'The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 910, pp. 121-37; discussion 137–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911910> (Accessed: 27 September 2018).
- Soussi, T. *et al.* (2006) 'Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience', *Nature Reviews Cancer*, 6(1), pp. 83–90. doi: 10.1038/nrc1783.
- Soussi, T. and Bérout, C. (2001) 'Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome.', *Nature reviews. Cancer*, 1(3), pp. 233–40. doi: 10.1038/35106009.
- Soussi, T. and Lozano, G. (2005) 'p53 mutation heterogeneity in cancer.', *Biochemical and biophysical research communications*, 331(3), pp. 834–42. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.190.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000) 'The language of covalent histone modifications', *Nature*, 403(6765), pp. 41–45. doi: 10.1038/47412.
- Strano, S., Dell'Orso, S., Di Agostino, S., *et al.* (2007) 'Mutant p53: an oncogenic transcription factor', *Oncogene*, 26(15), pp. 2212–2219. doi: 10.1038/sj.onc.1210296.
- Strano, S., Dell'Orso, S., Mongiovi, A. M., *et al.* (2007) 'Mutant p53 proteins: between loss and gain of function', *Head Neck*, 29(5), pp. 488–496. doi: 10.1002/hed.20531.
- Strauss, D. C. and Thomas, J. M. (2010) 'Transmission of donor melanoma by organ transplantation.', *The Lancet. Oncology*, 11(8), pp. 790–6. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70024-3.
- Teng, M. W. L. *et al.* (2008) 'Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer', *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), pp. 988–993. doi: 10.1189/jlb.1107774.
- Vajdic, C. M. and van Leeuwen, M. T. (2009) 'Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation', *International Journal of Cancer*, 125(8), pp. 1747–1754. doi: 10.1002/ijc.24439.
- Varley, J. M. (2003) 'GermlineTP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome', *Human Mutation*, 21(3), pp. 313–320. doi: 10.1002/humu.10185.
- Vaughan, C. A. *et al.* (2014) 'Preferred binding of gain-of-function mutant p53 to bidirectional promoters with coordinated binding of ETS1 and GABPA to multiple binding sites', *Oncotarget*, 5(2), pp. 417–427. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481480>.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004) 'Cancer genes and the pathways they control', *Nat Med*, 10(8), pp. 789–799. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1087>.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J. (2000) 'Surfing the p53 network', *Nature*, 408, pp. 307–310. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35042675>.
- Vousden, K. H. and Prives, C. (2009) 'Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53', *Cell*, 137(3), pp. 413–431. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037.
- Vousden, K. H. and Ryan, K. M. (2009) 'p53 and metabolism', *Nat Rev Cancer*, 9(10), pp. 691–700. doi: 10.1038/nrc2715.
- Wajapeyee, N. and Somasundaram, K. (2003) 'Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha

- mediated growth inhibition', *J Biol Chem*, 278(52), pp. 52093–52101. doi: 10.1074/jbc.M305624200.
- Wang, Y. *et al.* (2004) 'Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma.', *Human mutation*, 24(1), pp. 21–34. doi: 10.1002/humu.20055.
- Wang, Y. *et al.* (2004) 'TP53 mutations in early-stage ovarian carcinoma, relation to long-term survival.', *British journal of cancer*, 90(3), pp. 678–85. doi: 10.1038/sj.bjc.6601537.
- Watson, I. R. and Irwin, M. S. (2006) 'Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modifications of the p53 Family', *Neoplasia*, 8(8), pp. 655–666. doi: 10.1593/neo.06439.
- Weisz, L. *et al.* (2004) 'Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function', *Cancer Res*, 64(22), pp. 8318–8327. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1145.
- Weisz, L., Oren, M. and Rotter, V. (2007) 'Transcription regulation by mutant p53', *Oncogene*, 26(15), pp. 2202–2211. doi: 10.1038/sj.onc.1210294.
- Wilson, J. R. *et al.* (2010a) 'A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations', *J Med Genet*. 2010/09/02, 47(11), pp. 771–774. doi: 10.1136/jmg.2010.078113jmg.2010.078113 [pii].
- Wilson, J. R. *et al.* (2010b) 'A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations', *J Med Genet*, 47(11), pp. 771–774. doi: 10.1136/jmg.2010.078113.
- Winston, J. S., Ramanaryanan, J. and Levine, E. (2004) 'HER-2/neu evaluation in breast cancer are we there yet?', *American journal of clinical pathology*, 121 Suppl(suppl_1), pp. S33-49. doi: 10.1309/9UNL7UXPYO6CPWBQ.
- Witsch, E., Sela, M. and Yarden, Y. (2010) 'Roles for growth factors in cancer progression.', *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(2), pp. 85–101. doi: 10.1152/physiol.00045.2009.
- Wrede, D. *et al.* (1991) 'Expression of RB and p53 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines', *Molecular Carcinogenesis*. John Wiley & Sons, Ltd, 4(3), pp. 171–175. doi: 10.1002/mc.2940040302.
- Xiao, Y. *et al.* (2009) 'Cell Lines as Candidate Reference Materials for Quality Control of ERBB2 Amplification and Expression Assays in Breast Cancer', *Clinical Chemistry*, 55(7), pp. 1307–1315. doi: 10.1373/clinchem.2008.120576.
- Xing, X. *et al.* (2000) 'The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis', *Nat Med*, 6(2), pp. 189–195. doi: 10.1038/72294.
- Yallowitz, A. R. *et al.* (2015) 'Mutant p53 Amplifies Epidermal Growth Factor Receptor Family Signaling to Promote Mammary Tumorigenesis', *Mol Cancer Res*, 13(4), pp. 743–754. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0360.
- Yan, M. *et al.* (2014) 'HER2 aberrations in cancer: implications for therapy', *Cancer Treat Rev*, 40(6), pp. 770–780. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.02.008.
- Yang, J. W., Lee, E. Y. and Kang, K. W. (2006) 'ErbB2 overexpression in p53-inactivated mammary epithelial cells', *FEBS Lett*, 580(27), pp. 6501–6508. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.059.
- Yarden, Y. and Pines, G. (2012) 'The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology', *Nat Rev Cancer*, 12(8), pp. 553–563. doi: 10.1038/nrc3309.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) 'Untangling the ErbB signalling network', *Nat Rev Mol*

Cell Biol. 2001/03/17, 2(2), pp. 127–137. doi: 10.1038/35052073.

Zalcenstein, A. *et al.* (2003) 'Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants.', *Oncogene*, 22(36), pp. 5667–76. doi: 10.1038/sj.onc.1206724.

Zhu, J. *et al.* (2015) 'Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth', *Nature*, 525(7568), pp. 206–211. doi: 10.1038/nature15251.