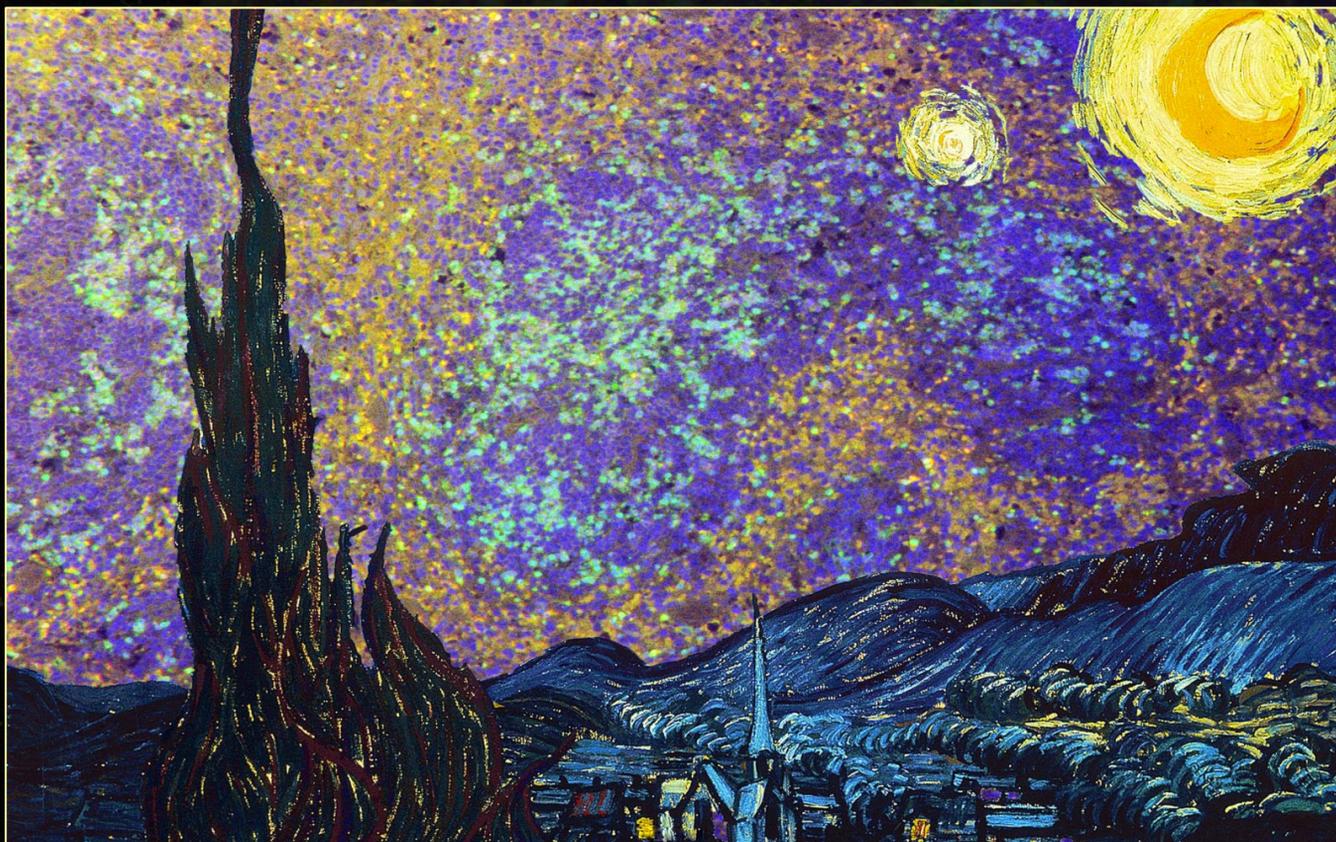


**GENERACIÓN DE UN MODELO DE RATÓN
KNOCK-IN PARA ANALIZAR LA ACTIVIDAD
SUPRESORA TUMORAL DE LA PROTEÍNA p53
LOCALIZADA EN LA MITOCONDRIA**

Laura Parrilla Monge
Salamanca, 2015





INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DOÑA RAQUEL EMILIA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, DIRECTORA DEL INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN,

CERTIFICA

Que la memoria titulada “**Generación de un modelo de ratón *knock-in* para analizar la actividad supresora tumoral de la proteína p53 localizada en la mitocondria**”, presentada por la licenciada **Laura Parrilla Monge** para optar al grado de **Doctora en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Dionisio Martín Zanca en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC/Universidad de Salamanca; y dentro del Programa de Doctorado de Neurociencias RD1393/2007, impartido en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a 9 de Noviembre de 2015.

Dra. Raquel Emilia Rodríguez Rodríguez
Directora del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

Instituto de Neurociencias de Castilla y León-INCYL
Universidad de Salamanca
C/ Pintor Fernando Gallego, 1
E-37007-Salamanca

Tél.: +34 923 29 45 00, ext. 5300
Fax: +34 923 29 4730
E-mail: incyl@usal.es
<http://www-incyl.usal.es/>

DON DIONISIO MARTÍN ZANCA, CIENTÍFICO TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, DEL CENTRO MIXTO INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA CSIC/UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA

Que la licenciada **Laura Parrilla Monge** ha realizado en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca el trabajo titulado “**Generación de un modelo de ratón *knock-in* para analizar la actividad supresora tumoral de la proteína p53 localizada en la mitocondria**” bajo mi dirección para optar al grado de **Doctora en Biología**.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a 9 de Noviembre de 2015.

Dr. Dionisio Martín Zanca
Director de la tesis

DOÑA ARANTXA TABERNEO URBIETA, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA

Que la licenciada **Laura Parrilla Monge** ha realizado en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC/Universidad de Salamanca el trabajo titulado “**Generación de un modelo de ratón *knock-in* para analizar la actividad supresora tumoral de la proteína p53 localizada en la mitocondria**”, bajo mi tutoría y dentro del Programa de Doctorado de Neurociencias RD1393/2007, impartido en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, para optar al grado de **Doctora en Biología**.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a 9 de Noviembre de 2015.

Dra. Arantxa Tabertero Urbieta
Tutora de la tesis

La investigación en nuestro laboratorio ha estado financiada por proyectos del Instituto de Salud Carlos III y de la Junta de Castilla y León, referencias PI1202847 y SAN/103/2011, respectivamente.

Durante la realización de mi trabajo de tesis doctoral he disfrutado de una beca del programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (Gobierno de España), referencia AP2010-1799.

**GENERACIÓN DE UN MODELO DE
RATÓN *KNOCK-IN* PARA ANALIZAR LA
ACTIVIDAD SUPRESORA TUMORAL DE
LA PROTEÍNA p53 LOCALIZADA EN LA
MITOCONDRIA**

**Laura Parrilla Monge
Salamanca, 2015**

Como dice el refranero español: *Es de bien nacidos el ser agradecido*; y durante este trabajo de tesis yo he recibido mucha ayuda de muchas personas, así que tengo mucho que agradecer.

En primer lugar, agradezco al Dr. Dionisio Martín-Zanca que me abriera las puertas de su laboratorio y que haya sido mi guía a lo largo de estos años. De él he aprendido muchas cosas que me servirán tanto dentro como fuera del laboratorio; entre ellas a trabajar con calma, a no rendirme y a analizar los resultados con pensamiento crítico, sin quedarme sólo con las primeras impresiones.

Quiero dar las gracias de forma muy especial a Talía por su ayuda, por el esfuerzo que hizo enseñándome y por su paciencia (que no fue poca) en lo que fueron mis primeros pasos en el laboratorio; y a Marta, que hizo que me picara el gusanillo de la ciencia.

También doy las gracias al Dr. Isidro Sánchez-García por su asesoramiento científico, su apoyo logístico durante “el exilio” y por todo el material cedido, incluyendo los ratones Sca1-BCR-ABLp210. Hago extensivo este agradecimiento al Dr. Jesús Pérez-Losada y a los compañeros de estos dos grupos: Carolina, Inés, Esther, Isa, Lucía, Idoia, Alberto, Guille, Marcos, Andrés, Sonia, María, Lourdes, Adrián y Fernando, ya que todos han estado allí para echarme una mano cuando lo he necesitado.

A los doctores Juan Pedro Bolaños y Ángeles Almeida les agradezco su colaboración y el material aportado, primero en “el exilio” y después en el IBFG. Gracias también a todos los miembros de estos grupos, sin excepción, que siempre han estado dispuestos a ayudarme con una sonrisa. Quiero mencionar especialmente a Patri, a María y a Jesús, que han sido los que más me han tenido que aguantar.

No puedo olvidarme de agradecer al Dr. Juan Carlos Arévalo y a Saray su ayuda en los cultivos de neuronas.

Además, agradezco a Alba su ayuda en los primeros cultivos de MEFs y a Carlos su ayuda en los experimentos de senescencia.

Quiero reconocer la labor de las personas encargadas de los servicios de cocina, almacén, mantenimiento y microscopía del IBFG, del Servicio de Experimentación Animal y de Patología Molecular Comparada. Su trabajo ha sido de gran ayuda para el avance de esta tesis.

En un plano más personal, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que, con sus ánimos y sus risas, han hecho más llevadero este camino y han conseguido que vaya a echar de menos esta época que ahora termina. Gracias a los *ibefegeros* Raúl, Miguel, Rebeca, Pedro y Sara, al *incylero* Fernando y a los compañeros de cultivos y de biblioteca. A mis “elegidos”: Esther, Ali, Sara, Rebeca, Sofi, Maru, Álvaro, Rosana, Marta, Sandra, Noe, Paola y Facu; gracias por pasar de ser mis compañeros de trabajo a ser mis amigos. A Chus, por su comprensión. A Alice, por enseñarme a ser valiente. A los fisiólogos Víctor, Claudia, Jose, Laurita, Alfre, Laura, María, Nuria y Cris, por sacarme de paseo y hablarme de otras cosas. Gracias también a mis amigos políticos Pinto, Trujillo, “las Anas” e Isa. Muy especialmente quiero dar las gracias a Elena y a Lucía por mucho más de lo que se puede decir en una frase, por TODO. Y *last* pero no *least*, gracias a David por aparecer y quedarse, por estar a mi lado todo este tiempo, por los ánimos y los consejos y por ser tan bonito.

Este trabajo está dedicado a mis padres y a mis hermanos. A ellos les debo ser quien soy y les agradezco muchas cosas que van más allá del apoyo y consejo que me han dado durante los años de tesis.

A mis padres, a Marta y a Juan

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	9
1. Descubrimiento de p53.....	11
2. Estructura de p53.....	12
3. Activación y regulación de p53.....	13
4. p53 en el núcleo.....	15
5. p53 en la mitocondria.....	17
6. Modelos de estudio de p53 <i>in vivo</i>	22
7. El modelo <i>knock-in</i> p53 ^{ERTAM}	24
8. Estrategias para estudiar la función de p53 en la mitocondria.....	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
RESULTADOS.....	33
1. Generación de un modelo de ratón <i>knock-in</i> , p53mitoERTAM ^{KI} , que expresa una proteína p53 dirigida a la mitocondria y regulable por tamoxifén.....	35
2. Análisis de la actividad transcripcional y localización subcelular de la proteína p53mitoER.....	41
3. Comprobación de que la proteína p53mitoER no es funcional en ausencia de 4-OHT, <i>in vivo</i>	44
4. Estudio de la funcionalidad de la proteína p53mitoER <i>in vitro</i>	48
5. Estudio de la funcionalidad de la proteína p53mitoER <i>in vivo</i>	54
6. Exploración de las causas de la ausencia de activación de p53mitoER.....	60
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
1. Experimentación animal.....	77
2. Técnicas de biología molecular.....	78
3. Técnicas de biología celular.....	96
SUMMARY.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	117
ANEXO.....	125

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Listado de abreviaturas utilizadas en esta tesis:

APAF-1: *Apoptotic protease activating factor-1*

APS: Persulfato amónico

ARF: *Alternate reading frame*

Arg: Arginina

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP: Adenosín trifosfato

BAI1: *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*

Bak: *Bcl-2 antagonist/killer*

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-xL: *B-cell lymphoma extra large*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

Bim: *Bcl-2-like protein 11*

BSA: Albúmina de suero bovino

CDKs: *Cyclin-dependent kinases*

cDNA: DNA complementario

CIA: Cloroformo con isoamiloalcohol (24:1)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DEPC: Dietilpirocarbonato

dH₂O: Agua destilada

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOC: Ácido deoxicólico

DTT: Ditiotreitól

ECT: Extracto celular total

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMT: Extracto mitocondrial total

ER = ER^{TAM}: Receptor de estrógenos modificado que sólo se une a 4-OHT

ES: *Embryonic stem*

FADD: *Fas-Associated protein with Death Domain*

FAS: *First apoptosis signal*

FasR: *First apoptosis signal receptor*

FBS: Suero bovino fetal

FBS-HI: Suero bovino fetal inactivado por calor

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FITC: Fluoresceína de isotiocianato

FOXO3a: *Forkhead box O3*

FRT: *Flipase recombinase target*

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GLUT: *Glucose transporter*

Gy: Gray

HAUSP: *Herpes virus-associated ubiquitin-specific protease*

HEK: *Human Embryonic Kidney*

HEPES: *N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)*

HIPK2: *Homeodomain-interacting protein kinase 2*

HMGB1: *High Mobility Group B1*

HRP: *Horseradish peroxidase*

Hsp90: *Heat Shock Protein 90*

IAPs: *Inhibitor of apoptosis proteins*

IM: *(Mitochondrial) Inner membrane*

IMS: *(Mitochondrial) Intermembrane space*

IP: Inmunoprecipitación

KDa: Kilodaltons

KI: *knock-in*

KO: *knock-out*

kb: Kilobases

LIF: *Leukemia inhibitory factor*

lncRNA: *Long non-coding RNA*

Lys: Lisina

Mcl-1: *Myeloid cell leukemia 1*

MdmX: *Murine double minute X*

Mdm2: *Murine double minute 2*

MEFs: *Mouse embryonic fibroblasts*

MA: *(Mitochondrial) Matrix*

MOMP: *Mitochondrial outer membrane permeabilization*

MOMPP: *Mitochondrial outer membrane permeabilization pore*

MOPS: *3-Morpholinopropanesulfonic acid*

mPTP: Poro de Transición de la Permeabilidad mitocondrial

mRNA: RNA mensajero

mtHsp70: *Mitochondrial-type Heat shock protein 70*

NEA-A: Aminoácidos no esenciales

NLS: *Nuclear localization signal*

NOXA: *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

NP40: Nonidet P40

OIL: Aceite de cacahuete

OM: *(Mitochondrial) Outer membrane*

OMG: Organismo modificado genéticamente

O/N: *Overnight*

pb: Pares de bases

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polimerase chain reaction*

PIDD: *p53-induced death domain protein*

PIN1: *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*

Polybrene: *1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide*

Pro: Prolina

Puma: *p53 upregulated modulator of apoptosis*

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

p21^{WAF1/CIP1}: *CDK interacting protein 1 (también: ciclin-dependent kinase inhibitor 1)*

qPCR: PCR cuantitativa

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay*

RNA: Ácido ribonucleico

RT: *Room temperature*

SA- β -gal: β -galactosidasa asociada a senescencia

Sca1: *Stem cell antigen 1*

SCO2: *Synthesis of cytochrome c oxidase 2 gene*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

Ser: Serina

shRNA: *Short hairpin RNA*

SMACs: *Second mitochondria-derived activator of caspases*

SSC: *Saline Sodium Citrate*

SV40: *Simian virus 40*

TAE: Tris-Acetato EDTA

tBid: *BH3 interacting-domain death agonist*

TBS: *Tris buffered saline*

TBST: TBS con Tween20

TE: Tris-EDTA

TEMED: *Tetramethylethylenediamine*

TIGAR: *TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*

TIM: *Transporter inner membrane*

TNF α : *Tumor necrosis factor- α*

TNFR: *Tumor necrosis factor receptor*

TOM: *Transporter outer membrane*

TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*

TRAP1: *TNF Receptor-Associated Protein 1*

TUNEL: *Terminal dUTP Nick End Labeling*

TX: Tamoxifén

VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje

wt: *Wild-type*

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

4-OHT: 4-Hidroxitamoxifén

7AAD: 7-Aminoactinomicina D

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La proteína p53 fue descubierta hace más de treinta años y aún hoy continúa siendo intensamente estudiada en la investigación biomédica. p53 es un factor de transcripción (TF) que regula la expresión de sus genes diana mediante unión al DNA y a otras proteínas. Los genes diana de p53 están implicados en múltiples procesos celulares: regulación del ciclo celular, senescencia, reparación del DNA, muerte celular y metabolismo, entre muchos otros. La proteína p53 también puede actuar fuera del núcleo, en el citoplasma y en las mitocondrias, donde ejerce un papel muy importante en la regulación de la muerte celular. De todas las funciones de p53, la más conocida y estudiada es la de supresión tumoral. En respuesta a diversos tipos de estrés, p53 se activa y desencadena una respuesta celular que conduce a la reparación de las células poco dañadas o a la eliminación de las células gravemente dañadas. Estas funciones se pueden perder si el gen que la codifica, *TP53* (*Trp53* en ratones), sufre mutaciones, favoreciendo así el desarrollo de diversas clases de tumores y otras enfermedades.

1. DESCUBRIMIENTO DE p53

La proteína p53 fue detectada por primera vez en 1979 porque, al formar un complejo con el antígeno T grande del virus SV40, coinmunoprecipitaba con esta proteína en extractos de células infectadas por dicho virus (Lane and Crawford 1979). Se vio también que p53 era de origen celular y no vírico, y que estaba presente a bajos niveles en células normales, pero a niveles muy altos en células tumorales (Lane and Benchimol 1990). En 1984 se observó que la proteína p53 coopera con el oncogén *H-RAS* para inducir la transformación celular. Todas estas observaciones llevaron a considerar a *TP53* un oncogén (Eliyahu, Goldfinger *et al.* 1988), (Parada, Land *et al.* 1984), (Jenkins, Rudge *et al.* 1984).

Durante los años siguientes comenzaron a verse indicios de que p53 podía no ser un oncogén, sino tener la función opuesta. Varios grupos observaron que las líneas celulares con las que trabajaban tenían el gen *Trp53* inactivado o mutado, y que los trabajos previos con los que se había demostrado su función transformante se habían realizado con formas mutantes del gen *TP53* y no con la forma *wild-type* (wt). Poco tiempo después empezó a observarse que las células tumorales no conservaban la función normal de p53, sino que *TP53* se encontraba frecuentemente mutado o delecionado en estas células. La clonación del gen *Trp53* wt a partir de tejido normal de ratón (Eliyahu, Goldfinger *et al.* 1988) permitió a la comunidad científica confirmar que *TP53* es un gen supresor tumoral. Esta nueva noción se corroboró poco después gracias a otros descubrimientos, como, por ejemplo, que la herencia de un alelo de *TP53* mutado origina el síndrome de Li-Fraumeni (una enfermedad caracterizada por una alta predisposición a tumores de diversos tipos) (Malkin, Li *et al.* 1990).

Aunque la investigación sobre p53 siempre ha estado centrada en su función como supresor tumoral, hoy se sabe que p53 participa en muchos otros procesos celulares. Además

de regular el ciclo celular, la apoptosis y la reparación del DNA, juega un papel en la fertilidad, la diferenciación, la pigmentación de la piel, la respuesta inmune innata, el envejecimiento y el metabolismo celular, etc (ver más adelante) (Meek 2015). Fue de especial interés el descubrimiento de que, en determinadas circunstancias, p53 puede translocarse a la mitocondria, donde interacciona directamente con otras proteínas e induce apoptosis en células sometidas a diferentes tipos de estrés (Marchenko, Zaika *et al.* 2000). Más recientemente, se ha demostrado que p53 actuando desde este orgánulo también es capaz de regular la muerte celular por necrosis mediante asociación directa con proteínas residentes en la matriz mitocondrial (Vaseva, Marchenko *et al.* 2012), (Guo, Sesaki *et al.* 2014), (Elkholi and Chipuk 2014).

Hoy en día el gen *TP53* es considerado el principal gen supresor tumoral, ya que su vía de señalización se encuentra inactivada en más del 50% de los tumores humanos. Por ello, tanto el gen como su proteína siguen teniendo un papel protagonista en la investigación biomédica (figura 1).

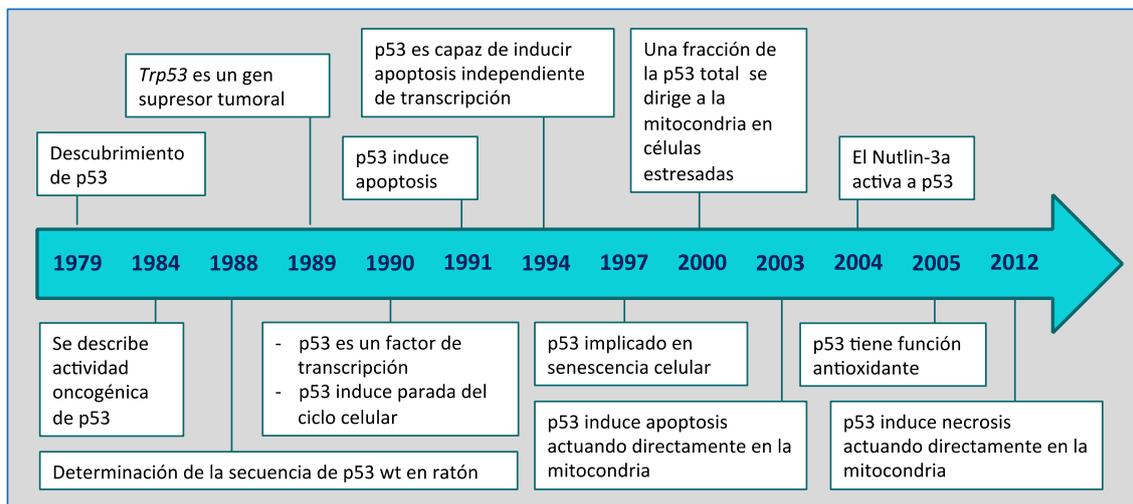


Figura 1. Cronología de los descubrimientos en torno a p53. (Adaptado de Levine & Oren, 2009).

2. ESTRUCTURA DE p53

Se cree que el gen codificante de p53 surgió a partir de un gen predecesor común de p53, p63 y p73. Este gen primitivo se encuentra hoy en día en animales simples como las anémonas y también en casi todos los invertebrados, organismos en los que tiene la función de proteger a la línea germinal de la inestabilidad genómica. En peces condriictios se habría duplicado, dando lugar al gen codificante de p53 y a un predecesor común de p63 y p73. Los peces osteíctios ya poseen los tres genes codificantes de p53, p63 y p73, todos ellos TFs cuyas funciones se han diversificado en los vertebrados superiores. Esta familia de genes ha conservado sus características estructurales y sus funciones durante millones de años y por

ello, tanto los genes como las proteínas correspondientes están muy conservados y son similares entre especies (Belyi, Ak *et al.* 2010).

El gen *TP53* consta de 11 exones que codifican una proteína con 5 regiones altamente conservadas y varios dominios funcionales, entre los cuales cabe destacar:

- Dos dominios contiguos de transactivación, situados en el extremo amino.
- Un dominio rico en prolinas.
- Un dominio de unión al DNA, muy importante en la función transactivadora. Es en este dominio donde se localizan casi todas las mutaciones asociadas al cáncer, por lo que cabría suponer que la función supresora de tumores de p53 depende de su capacidad de regular la transcripción. No obstante, se ha descrito que la interacción entre p53 y determinadas proteínas mitocondriales ocurre a través de este dominio de unión al DNA y estas mutaciones también suprimen la capacidad de p53 de inducir la muerte celular actuando directamente en la mitocondria (Mihara, Erster *et al.* 2003).
- Un dominio de oligomerización. p53 forma tetrámeros cuando actúa como factor de transcripción. Debido a esto, cuando en una célula coexisten monómeros p53 wt y p53 mutantes se forman heterotetrámeros con ambos tipos de p53 que no son funcionales. Esta capacidad de las proteínas mutantes de anular la actividad de las proteínas wt se conoce como dominancia negativa.
- Un dominio básico de regulación, en el extremo carboxilo, que incluye una señal de exportación nuclear (Bienz, Zakut-Houri *et al.* 1984), (Meek 2015).



Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la proteína p53. La proteína p53 contiene 5 regiones altamente conservadas (Box I a V) y 5 dominios con funciones diferentes. TAD 1 y 2: Dominios de transactivación. PRD: Dominio rico en prolinas. NLS: Señal de localización nuclear. TET: Dominio de oligomerización. REG: Dominio de regulación. NES: Señal de exportación nuclear. (Adaptado de Meek, 2015).

Para llevar a cabo sus funciones, p53 debe interactuar con cientos de proteínas y con el DNA, y todas estas interacciones están altamente reguladas mediante modificaciones post-traduccionales. p53 puede sufrir diversos tipos de modificaciones (fosforilación, acetilación y sumoilación, entre otras) que afectarán a la estabilidad de la unión con otras proteínas y con el DNA, además de afectar a la estabilidad de la propia p53.

3. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE p53

Para que p53 lleve a cabo su función de supresión de tumores se requiere la activación de dicha proteína. Dada la capacidad de p53 de determinar la supervivencia o muerte de las

células, un exceso de activación de esta proteína sería deletéreo para el organismo, por lo que su actividad debe estar sujeta a una regulación estricta (Montes de Oca Luna, Wagner *et al.* 1995). La ruta de señalización de p53 se activa cuando la célula recibe un daño y, como resultado, se inhibe la progresión del ciclo celular, se promueve la reparación del DNA o se inicia la muerte celular. p53 está en el centro de una encrucijada entre varias vías de señalización y desde allí integra parámetros como el tipo y la intensidad del daño recibido y el entorno celular, que determinan el tipo de respuesta que tendrá lugar. Así, se repararán o se eliminarán las células dañadas y más susceptibles de transformarse en células tumorales (Brady and Attardi 2010).

En las células sanas y en aquéllas en las que la situación de estrés se ha resuelto, la actividad de p53 debe volver a los niveles basales, lo cual se consigue mediante la modulación de la transcripción y la traducción de p53 y mediante la regulación de la estabilidad y localización de la proteína.

La forma principal de regulación de la actividad de p53, independientemente de cuál haya sido el estrés que ha inducido la respuesta, consiste en modular la interacción con su regulador negativo, Mdm2. La proteína Mdm2 ubiquitina a p53 de forma específica, marcándola para su degradación en el proteasoma. Aunque existen otras E3 ubiquitín ligasas capaces de realizar esta acción, Mdm2 es la principal reguladora de la estabilidad de p53. Pero Mdm2 no sólo es un regulador negativo de p53, sino que también es una de sus dianas transcripcionales. Así, cuando los niveles de p53 aumentan se activa la expresión de Mdm2 haciendo que también aumenten los niveles de esta ubiquitín ligasa. Los niveles altos de Mdm2 implican una mayor degradación de p53, por lo que los niveles de p53 descenderán y por tanto, también los niveles de Mdm2. Los niveles bajos de Mdm2 permitirán de nuevo la acumulación de p53, cerrándose un ciclo de retroalimentación negativa que mantiene a ambas proteínas a niveles bajos en condiciones basales de ausencia de estrés (Kubbutat, Jones *et al.* 1997). Los distintos tipos de daño celular logran la completa activación de p53 de diversas formas, pero siempre mediante la ruptura del complejo p53-Mdm2. En respuesta a daño genotóxico, por ejemplo, la quinasa ATM fosforila a p53 en el residuo Ser15, reduciendo su afinidad por Mdm2. Por su parte, el estrés oncogénico da lugar a la acumulación de ARF, que se une a Mdm2 y la secuestra en el nucleolo impidiendo la degradación de p53 (Hu, Feng *et al.* 2012).

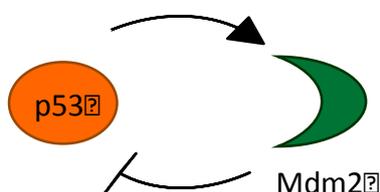


Figura 3. Ciclo de retroalimentación negativa entre p53 y Mdm2.

La regulación negativa de p53 ejercida por Mdm2 está, a su vez, regulada por Mdm4 (también llamada MdmX), que pertenece a la misma familia que Mdm2. Aunque carece de actividad E3 ubiquitín ligasa, la formación de heterodímeros Mdm2-Mdm4 es esencial para

dotar de actividad E3 ubiquitín ligasa a Mdm2 (Wang 2011). Tanto Mdm2 como Mdm4 están regulados a nivel transcripcional y mediante modificaciones post-traduccionales, como la ubiquitinación o la fosforilación, que afectan a su vida media y a su actividad, permitiendo una regulación más fina de la respuesta ejecutada por p53 (Wade, Li *et al.* 2013).

4. p53 EN EL NÚCLEO

La actividad bioquímica más estudiada de p53 es su actividad como factor de transcripción. Los tetrámeros de p53 se unen a elementos reguladores en el DNA, desde donde promueven la transcripción de algunos de sus genes diana. p53 también puede reprimir la expresión de otros genes diana mediante mecanismos indirectos, bloqueando la unión al DNA de otros TFs o reclutando correpresores y desacetilasas, por ejemplo (Riley, Sontag *et al.* 2008). También puede modular la expresión génica mediante la regulación de microRNAs o lncRNAs (Jones and Lal 2012), (Grossi, Sanchez *et al.* 2015). Existe un gran abanico de dianas de p53, que se sigue ampliando gracias a la búsqueda de nuevos elementos de respuesta a este factor de transcripción (Nikulenkov, Spinnler *et al.* 2012).

Los genes regulados por p53 están implicados en numerosos procesos celulares. Entre todos ellos cabe destacar a los relacionados con la supresión tumoral, por ser las primeras dianas descritas y por participar en la que tradicionalmente se ha considerado la función principal de p53:

- Cuando la célula recibe daño en el DNA p53 induce directamente la expresión de p21^{WAF1/CIP1}, un inhibidor de las CDKs. Esto provoca la parada del ciclo celular en los *checkpoints* de G1-S y G2-M (el-Deiry, Tokino *et al.* 1993). Además de p21 hay muchas otras proteínas reguladoras del ciclo inducidas o reprimidas por p53, como GADD45, 14-3-3 σ , CDC2 o ciclina B. Esta parada temporal en el ciclo permite a la célula dañada reparar su material genético y evita que las células hijas hereden mutaciones.
- En determinados contextos, se ha visto que la senescencia mediada por p53 está ligada a la supresión tumoral. Una de las dianas transcripcionales de p53 implicadas de esta respuesta es p21^{WAF1/CIP1} (Ventura, Kirsch *et al.* 2007).
- En respuesta a daño en el DNA y a otros tipos de estrés (como señales oncogénicas o hipoxia) p53 puede desencadenar la apoptosis, bien por la vía extrínseca, bien por la vía intrínseca. En el primer caso, p53 promueve la expresión de genes que codifican receptores de factores inductores de muerte o proteínas con dominios de muerte, como FAS o PIDD. En la apoptosis por la vía intrínseca participan proteínas como BAX, NOXA, PUMA o BCL-2, cuyos genes son dianas transcripcionales de p53, aunque su actividad también está regulada por interacción directa con la proteína p53 en la mitocondria (ver más adelante).

El inicio de la apoptosis por la **vía extrínseca** requiere factores externos a la célula, como el TNF α o el ligando de Fas, que se unen a sus receptores correspondientes, TNFR y Fas, situados en la membrana plasmática. Cuando esto sucede, se forma un complejo con las proteínas adaptadoras TRADD o FADD y la procaspasa 8. Al entrar en el complejo, la procaspasa 8 se activa e inicia la activación de las caspasas efectoras. En algunos casos, esta cascada de señalización provoca la salida de factores proapoptóticos de la mitocondria para amplificar la acción de la caspasa 8.

Los eventos moleculares que inician la apoptosis por la **vía intrínseca** tienen lugar en la mitocondria. Cuando la célula recibe el estímulo adecuado (estrés genotóxico, hipoxia o activación de oncogenes, entre otros) las proteínas proapoptóticas efectoras de la familia Bcl-2 forman oligómeros que crean un poro en la membrana mitocondrial externa denominado MOMPP. El aumento en la permeabilidad de esta membrana provoca la liberación al citoplasma de proteínas que inician una cascada de señalización que activa a las caspasas 9, 3 y 7.

Las citadas anteriormente son las respuestas clásicas de p53, sin embargo, esta proteína participa en muchos otros procesos celulares directa o indirectamente relacionados con la supresión tumoral (Biegging, Mello *et al.* 2014). Algunos ejemplos de las funciones emergentes de p53 son:

- Mantenimiento de la integridad genómica: p53 previene el daño en el DNA gracias a su función antioxidante y promueve la reparación del mismo mediante diversos mecanismos, como la reparación por escisión de base (Tron, Trotter *et al.* 1998), (Tang, Willers *et al.* 1999), (Maillet and Pervaiz 2012).
- Metabolismo celular: p53 inhibe la glicólisis a la vez que promueve la fosforilación oxidativa a través de la inducción y represión transcripcional de algunos de sus genes diana, como *TIGAR*, *GLUT* o *SCO2*. Así, p53 protege a las células de la reprogramación metabólica conocida como efecto Warburg (Soga 2013).
- Autofagia: Aunque la autofagia es un mecanismo de supervivencia cuando la célula está sometida a privación de nutrientes, en determinadas situaciones, puede contribuir a la supresión tumoral. La actividad transcripcional de p53 es fundamental para la inducción de la autofagia (Kenzelmann Broz, Spano Mello *et al.* 2013).
- Diferenciación: p53 inhibe genes implicados en pluripotencia y limita la autorrenovación de algunos tipos de células *stem*, como las neurales o las hematopoyéticas (Cicalese, Bonizzi *et al.* 2009). La pérdida de p53 permite el desarrollo de tumores menos diferenciados y más agresivos.
- Angiogénesis: p53 bloquea la formación de vasos sanguíneos estimulando la expresión de inhibidores del proceso, como la trombospondina y la proteína BAI1.
- Fertilidad y desarrollo: p53 favorece la implantación del cigoto en el útero (Hu, Feng *et al.* 2007) y es la encargada de eliminar los embriones dañados, asegurando que sólo los sanos lleguen a término (Armstrong, Kaufman *et al.* 1995) (Brady and Attardi 2010).
- Envejecimiento: El exceso de activación de p53 acelera el envejecimiento; sin embargo, la posesión de una copia extra del gen *Trp53* controlada por su promotor endógeno parece tener el efecto contrario (Tyner, Venkatachalam *et al.* 2002) (Garcia-Cao, Garcia-Cao *et al.* 2002).
- Inflamación: p53 interacciona con diversos elementos de la respuesta inflamatoria, como citoquinas o especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Cooks, Harris *et al.* 2014).

- Traducción: p53 regula la traducción de mRNAs específicos, que codifican proteínas oncogénicas o supresoras de tumores, a la vez que mantiene baja la tasa global de síntesis de proteínas (Marcel, Catez *et al.* 2015).

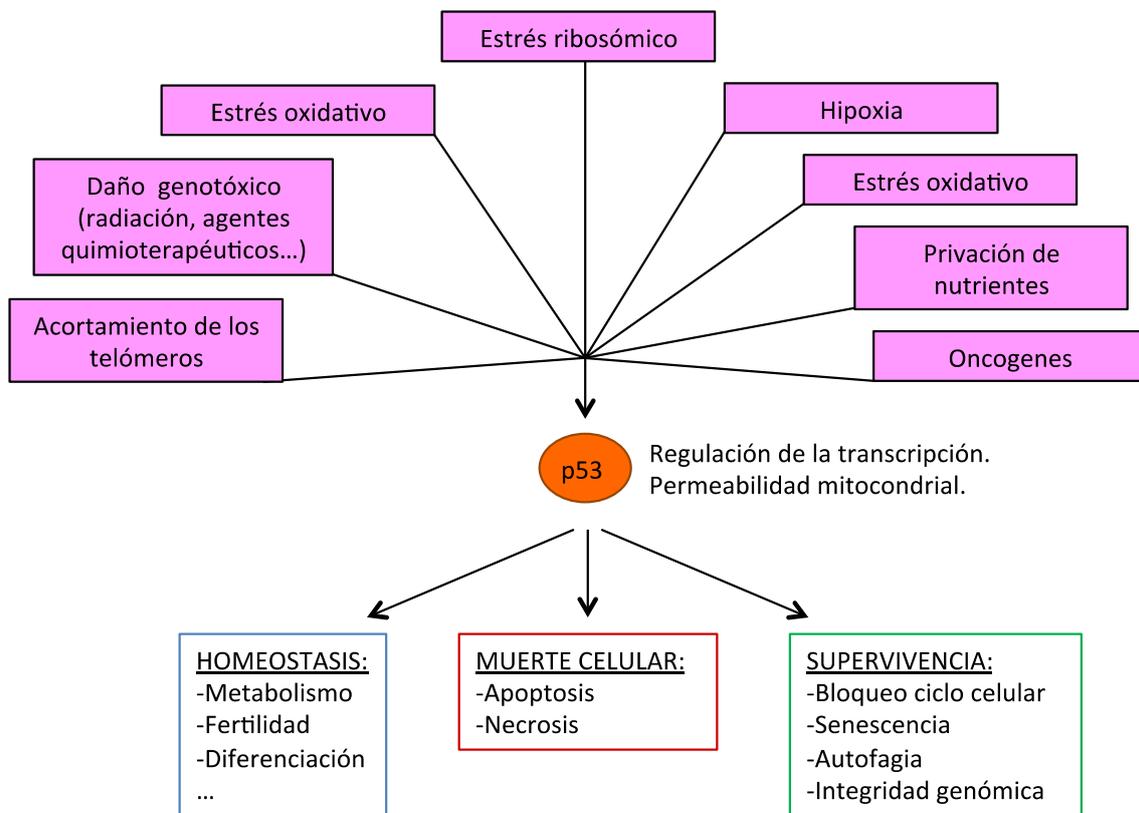


Figura 4. Activación y respuestas de p53. Los diversos tipos de estrés que activan a p53 conducen a diferentes respuestas celulares, dependiendo del tipo celular y del tipo, intensidad y duración del estrés. Algunas de las funciones biológicas, no obstante, están mediadas por p53 a niveles basales. (Adaptado de Meek, 2015).

5. p53 EN LA MITOCONDRIA

Inicialmente se pensó que p53 ejercía su función únicamente en el núcleo, como factor de transcripción. Sin embargo, a mediados de los 90 este concepto empezó a cambiar. Se descubrió que la apoptosis dependiente de p53, al menos en determinados contextos, no sólo tenía lugar por una vía distinta a la parada del ciclo celular, sino que también era independiente de la síntesis de RNA y proteínas (Wagner, Kokontis *et al.* 1994), (Caelles, Helmberg *et al.* 1994), (Haupt, Rowan *et al.* 1995). En ese momento se propuso que p53 formaba parte de la maquinaria enzimática efectora de la muerte celular, pero varios años más tarde se observó que una fracción de esta proteína se transloca a la mitocondria, un orgánulo de gran importancia en la ejecución de la apoptosis. Más aún, se pudo comprobar que la acumulación de p53 en la mitocondria bastaba para iniciar la activación de caspasas (Marchenko, Zaika *et al.* 2000). A lo largo de los años siguientes se descubrieron más funciones

de p53 independientes de la modulación transcripcional y hoy es indiscutible que las acciones de esta proteína no están restringidas a un solo compartimento celular.

La primera de las funciones extranucleares de p53 en ser descrita, y la más estudiada a día de hoy, es la inducción de la apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial, en la que el evento desencadenante es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). Fuera de la mitocondria, p53 ejerce otras funciones en el citoplasma y se cree que puede tener un papel en la regulación del metabolismo celular, la autofagia, el tráfico vesicular y la organización del citoesqueleto (Comel, Sorrentino *et al.* 2014).

5.1 Translocación de p53 a la mitocondria

Mientras que los eventos moleculares que conducen a la activación del programa transcripcional dependiente de p53 han sido intensamente estudiados, muchos de los mecanismos que regulan las actividades extranucleares de p53 están aún por definir. En primer lugar, se desconoce qué señal (o señales) es la responsable de la translocación de p53 a la mitocondria, ya que esta proteína no posee ninguna señal de localización mitocondrial en su secuencia primaria. En la p53 humana existe un polimorfismo en la posición 72 que origina dos variantes de la proteína: Pro72 y Arg72, siendo la versión Arg72 la más eficiente en la inducción de apoptosis debido a su mayor tendencia a localizarse en la mitocondria (Dumont, Leu *et al.* 2003). La acumulación de p53 en el citoplasma y la exposición de la célula a estímulos concretos parecen ser los primeros requisitos para su acción en la mitocondria, pero también son importantes ciertas modificaciones post-traduccionales.

En la actualidad hay un debate abierto acerca del compartimento celular del que procede la p53 mitocondrial, ya que podría venir del núcleo o del citoplasma. Por una parte, se ha demostrado que la proteína FOXO3a promueve la exportación nuclear de p53 y favorece su acción mitocondrial. Por otra parte, se ha comprobado que la multi-monoubiquitinación de p53 por parte de Mdm2 es la señal principal que dirige a p53 del citoplasma a la mitocondria (You, Yamamoto *et al.* 2006), (Marchenko, Wolff *et al.* 2007).

Recientemente se ha descubierto la importancia de otras modificaciones post-traduccionales. Así, la quinasa HIPK2, que es activada por el daño en el DNA, fosforila a p53 en el residuo Ser46. Ésta es la señal para reclutar a Pin1, una prolil-isomerasa que cambia la conformación de p53 reduciendo su afinidad por Mdm2. Este evento no sólo promueve la actividad transcripcional de p53, sino que también aumenta el *pool* citoplásmico de p53 monoubiquitinada que se dirigirá a la mitocondria (Sorrentino, Mioni *et al.* 2013). Esta fosforilación se mantiene en la mitocondria y facilita la unión de p53 a otras proteínas residentes en el orgánulo, como Mdm4 o HAUSP. p53 es desubiquitinada por HAUSP y se une a Mdm4 que a su vez, facilita la unión entre p53 y Bcl-2. Tras daño en el DNA la membrana mitocondrial externa también se enriquece en la forma de p53 acetilada en Lys120. Esta acetilación, si bien no se requiere para dirigir a p53 a la mitocondria, sí es necesaria para desplazar a la proteína antiapoptótica Mcl-1 del efector proapoptótico Bak (Sykes, Stanek *et al.* 2009) (figura 5).

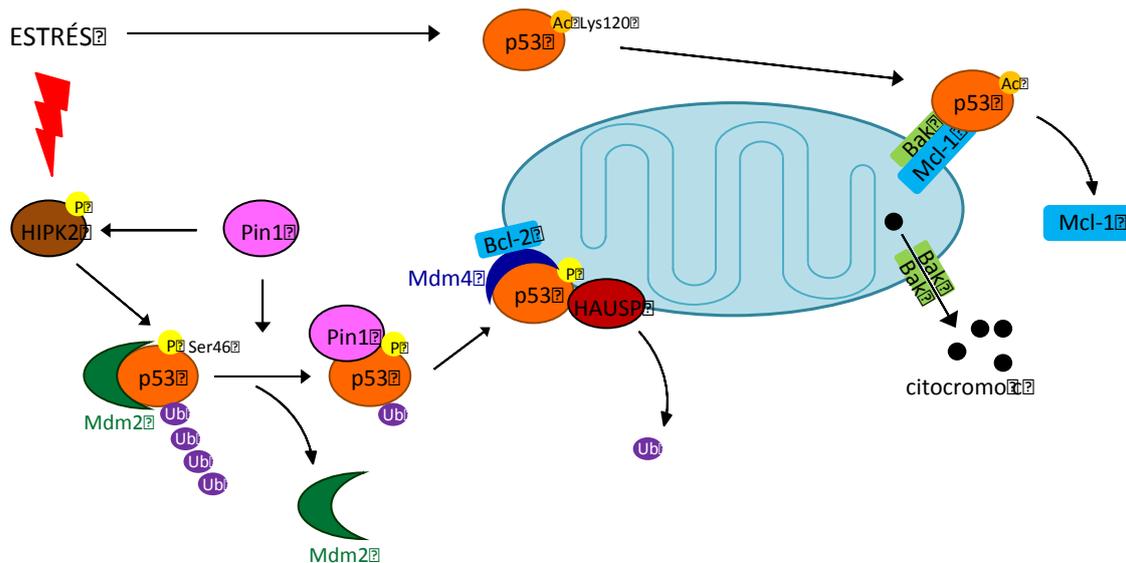


Figura 5. Translocación de p53 a la mitocondria. La acetilación, fosforilación y ubiquitinación gobiernan la translocación de p53 a la mitocondria y sus actividades en este orgánulo. Ante determinados tipos de estrés celular (daño en el DNA, estrés oxidativo y otros) p53 es acetilada y la p53 con esta modificación tiene preferencia por localizarse en la mitocondria, donde desplaza a la proteína antiapoptótica Mcl-1 liberando a Bak y permitiendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. El daño en el DNA también induce la activación de HIPK2 por parte de Pin1. HIPK2 fosforila a p53 en el residuo Ser46 y esta fosforilación es clave para promover la monoubiquitinación de p53 por parte de Mdm2. La p53 monoubiquitinada va a la mitocondria, donde es desubiquitinada por HAUSP y se une a Mdm4, la cual facilita la unión de p53 a Bcl-2 y la consiguiente liberación de citocromo c al citoplasma. Ac: Acetilación. P: Fosforilación. Ub: Ubiquitinación. (Adaptado de Comel *et al*, 2014).

5.2 Funciones de p53 en la mitocondria

Una de las principales funciones de p53 en la mitocondria es promover la apoptosis por la vía intrínseca, una ruta de señalización en la que está implicada la familia de proteínas Bcl-2 y que requiere la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP).

Las proteínas de la familia Bcl-2 comparten al menos un dominio de homología característico (BH) y se clasifican en tres grupos:

1. Las proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1, preservan la integridad de la MOM y tienen dominios BH1, BH2, BH3 y BH4.
2. Las proteínas proapoptóticas efectoras, como Bax y Bak, poseen dominios BH1, BH2 y BH3 y tienen la capacidad de inducir la MOMP mediante la formación de homooligómeros que constituyen poros.
3. Las proteínas activadoras BH3-*only*, que se subdividen en dos clases:
 - a. Las activadoras directas activan a las proapoptóticas efectoras mediante interacciones transitorias. Ejemplos de esta categoría son Bim y tBid.
 - b. Las sensibilizadoras, como Puma y Bad, hacen que las activadoras directas estén más disponibles, ya que impiden el secuestro de Bim y tBid por las antiapoptóticas.

En respuesta a estrés celular (como daño en el DNA, activación de oncogenes o hipoxia) la proteína p53 va al núcleo, donde induce la expresión de genes que codifican proteínas proapoptóticas e inhibe la expresión de los codificantes de antiapoptóticas. Pero además actúa directamente en la mitocondria, separando los complejos formados por tBid y Bax de su inhibidor Bcl-xL y liberando a Bak de la antiapoptótica Mcl-1.

Se han propuesto dos modelos para explicar la secuencia de acontecimientos que da lugar a la apoptosis. Uno de ellos sugiere que p53 se une a Bcl-2 y Bcl-xL en la membrana mitocondrial externa y los neutraliza, permitiendo la acción apoptótica de Bax y Bak (Mihara, Erster *et al.* 2003), (Tomita, Marchenko *et al.* 2006). El segundo modelo tiene en cuenta también la acción nuclear de p53. Según esto, el *pool* citoplásmico de p53 estaría inactivo por unión con Bcl-xL en condiciones basales, pero bajo estrés genotóxico p53 induciría la expresión de Puma y ésta liberaría a p53 de este secuestro, permitiendo que p53 active a Bax (Chipuk, Bouchier-Hayes *et al.* 2005), (Wolff, Erster *et al.* 2008). En cualquier caso, p53 sería equivalente a una “súper BH3-only”, capaz de actuar como activadora directa y como sensibilizadora.

Una vez liberados de sus inhibidores antiapoptóticos, Bax y Bak oligomerizan en la membrana mitocondrial externa, constituyen poros que aumentan la permeabilidad de dicha membrana y permiten la salida al citoplasma proteínas como las SMACs y el citocromo c. En el citoplasma el citocromo c se une a las proteínas APAF-1 y procaspasa 9, con las que forma un complejo denominado apoptosoma. En el apoptosoma se procesa la procaspasa 9 a su forma activa que, a su vez, activará a las caspasas efectoras 3 y 7. Por su parte, las SMACs se unen a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) y las inactivan, facilitando la activación de las caspasas.

Las actividades de p53 en la mitocondria no se restringen a la regulación de la apoptosis; recientemente se ha descubierto que, en respuesta a distintos tipos de daño y dependiendo de la intensidad del estímulo, p53 puede provocar la muerte de la célula por necrosis. El estrés oxidativo, por ejemplo, hace que p53 se dirija a la matriz mitocondrial, donde se une a la Ciclofilina D, el regulador principal del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP). Como consecuencia de esta interacción el poro se abre y la membrana mitocondrial interna se vuelve permeable a los iones. El flujo masivo de iones a la matriz hace que se pierda el potencial de protones de esta membrana, impidiendo la producción de ATP y provocando una crisis energética que conduce a la muerte por necrosis. No obstante, el mecanismo por el que p53 se transloca a la matriz mitocondrial se desconoce todavía. En una misma célula, por tanto, coexisten el programa proapoptótico y el programa pronecrótico de p53, y la decisión entre uno y otro parece depender del tipo y la intensidad del daño recibido (Vaseva, Marchenko *et al.* 2012) (figura 6).

La **apoptosis** es ejecutada por unas cisteín-proteasas llamadas caspasas. Durante este proceso la célula adquiere unas características distintivas: la célula se contrae, se forman protrusiones en su superficie (*blebbing* de la membrana plasmática), el núcleo se fragmenta y la cromatina se condensa.

La muerte por **nerosis** está caracterizada por la pérdida rápida de los potenciales de las membranas celulares, debido a la falta de energía y al fallo de los canales y bombas de iones. Normalmente el estrés que conduce a la necrosis es el exceso de Ca^{2+} citosólico y el exceso de ROS. Los rasgos celulares típicos que acompañan a la necrosis son: la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, el hinchamiento de los orgánulos, la presencia de vacuolas grandes y la ausencia de fragmentación nuclear.

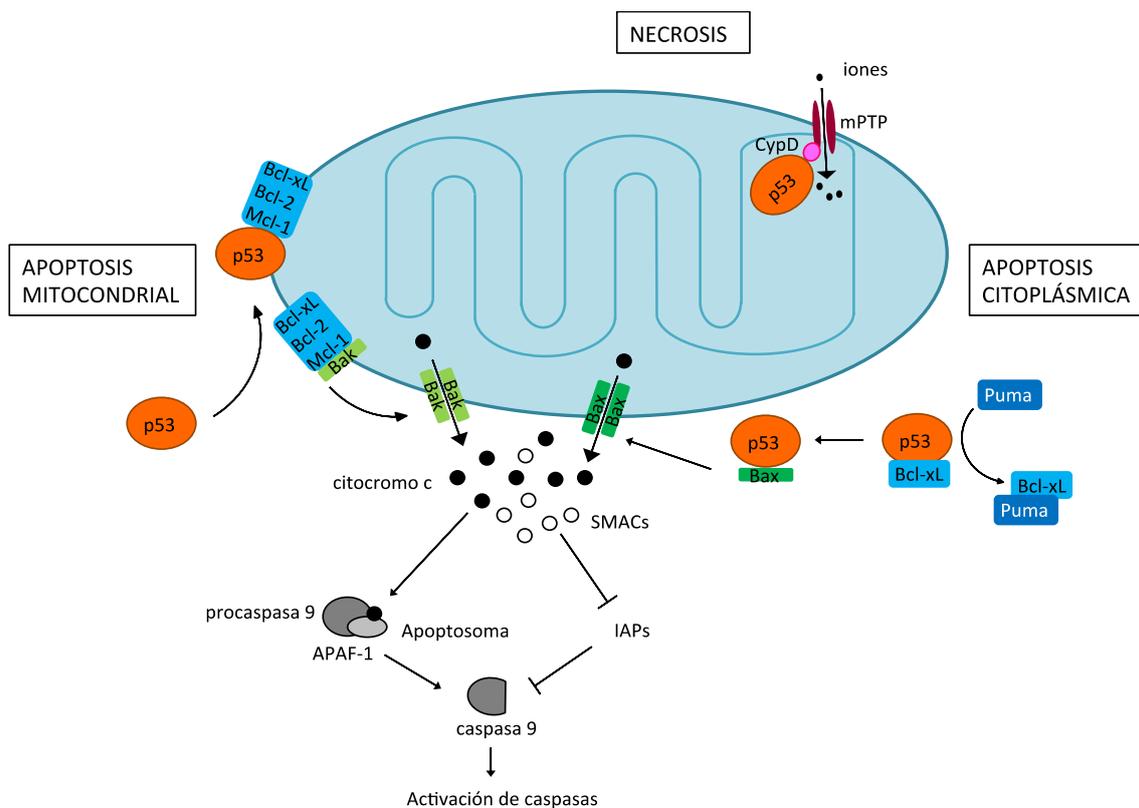


Figura 6. Esquema de las diferentes rutas de muerte celular inducidas por p53 de manera no transcripcional. **Derecha, apoptosis citoplásmica:** Bajo estrés genotóxico, p53 es activado y promueve la transcripción de Puma. En el citoplasma, Puma libera a p53 de su unión con Bcl-xL permitiendo su acción. La p53 citoplásmica activada se une transitoriamente a Bax y promueve su oligomerización en la membrana mitocondrial externa, induciendo su permeabilización y liberación del citocromo c. **Izquierda, apoptosis mitocondrial:** Cuando la célula recibe estímulos de muerte p53 se transloca a la mitocondria, donde se une a las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL, Bcl-2 y Mcl-1 para liberar a Bak. Esto permite que Bak oligomerice y forme poros que aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. **Arriba, necrosis:** El estrés oxidativo induce la translocación de p53 a la matriz mitocondrial, donde se une a la Ciclofilina D e induce la formación del mPTP. La membrana mitocondrial interna pierde su capacidad de generar ATP y se desencadena la muerte por necrosis. (Adaptado de Comel *et al*, 2014).

6. MODELOS DE ESTUDIO DE p53 *IN VIVO*

La investigación de las funciones de p53 ha avanzado considerablemente en los últimos 20 años gracias a estudios que utilizan ratones manipulados genéticamente. Como era de esperar, los ratones con alelos inactivos de *Trp53* desarrollan diversos tipos de cáncer más rápidamente que sus hermanos con copias wt de este gen (revisado por Donehower and Lozano 2009).

Durante los años siguientes al descubrimiento del gen *Trp53* se pusieron a punto nuevas tecnologías de manipulación de la línea germinal de ratones, como la transgénesis y la recombinación homóloga en células madre embrionarias (células ES). En 1989, Bernstein y colaboradores describieron el primer ratón transgénico que expresaba una forma mutante de *Trp53* (Lavigueur, Maltby *et al.* 1989). La incidencia de tumores en los ratones transgénicos era significativamente mayor que en los ratones con p53 wt, además, el amplio espectro de tumores observado en este modelo murino proporcionó una pista que llevó a la determinación de las bases genéticas del síndrome de Li-Fraumeni (Malkin, Li *et al.* 1990) (Srivastava, Zou *et al.* 1990).

Los modelos transgénicos que sobreexpresan alelos mutantes de *Trp53* en distintos tejidos continúan siendo una herramienta muy útil para el entendimiento de las funciones de p53. Han sido de especial utilidad los modelos que utilizan un promotor específico de tejido para regular la expresión de dichos alelos. Sin embargo, estos modelos se basan en la integración al azar de múltiples copias de *Trp53* en el genoma de la célula, por lo que los niveles de expresión y la actividad de la proteína p53 mutante pueden no ser comparables a los de las formas mutantes endógenas de los tumores humanos. Para generar modelos que reproduzcan más fielmente las alteraciones de *TP53* que ocurren de forma natural, desde los años 90 se viene utilizando la tecnología de la recombinación homóloga en células ES.

El primer ratón *knock out* (KO) de p53 fue descrito por Donehower y colaboradores en 1992 (Donehower, Harvey *et al.* 1992) y pronto le siguieron otros modelos semejantes desarrollados en otros laboratorios. Todos estos modelos contenían grandes deleciones del gen *Trp53* que daban lugar, tal y como se esperaba, a alelos nulos y fenotipos de cáncer semejantes en todos ellos. Tras la sorpresa inicial de que los ratones p53^{-/-} tuvieran un desarrollo prenatal y postnatal normal, un examen más minucioso realizado por Clarke y Jacks en 1995 reveló que una fracción de las hembras p53^{-/-} desarrollaba una exencefalia embrionaria letal (Armstrong, Kaufman *et al.* 1995). Al igual que en los ratones transgénicos con *Trp53* mutante, el espectro de tumores que presentaban los ratones *Trp53* KO era muy variable, si bien predominaban los linfomas de células T y los sarcomas de tejidos blandos.

El 80% de las mutaciones de *TP53* en los tumores humanos son mutaciones *missense* y algunas proteínas p53 mutantes presentan ganancia de función, un fenómeno que otorga a las células una ventaja de crecimiento no comparable a la mera ausencia de p53. Esta observación creó la necesidad de generar modelos de p53 *knock in* (KI) y estudiar su fenotipo en el contexto de un organismo entero.

La mutación R172H (R175H en humanos) interrumpe el dominio de unión a DNA de p53 y es una de las mutaciones más agresivas que ha sido estudiada *in vitro*. El primer modelo *KI* de esta mutación fue descrito en el año 2000 por Lozano y colaboradores (Liu, McDonnell *et al.* 2000). Sorprendentemente, estos ratones presentaban curvas de supervivencia semejantes a las de los ratones *KO*, pero con un potencial de metástasis mucho mayor.

Si bien han sido de gran utilidad, los modelos anteriormente descritos tienen dos limitaciones importantes. La primera es que portan las mutaciones en todas las células de su organismo y la segunda es que expresan la p53 mutante desde el momento en que son concebidos. Los avances técnicos han permitido la generación de alelos *Trp53* condicionales, en los que el gen puede ser regulado espacial y temporalmente en los tejidos somáticos de los ratones. Estos modelos ofrecen la posibilidad de eliminar o mutar el gen en tejidos específicos y en un momento determinado de la vida del animal o durante un periodo concreto. Gracias a los modelos condicionales se han hecho descubrimientos importantes en las funciones de p53.

En el año 2000 Bern y colaboradores desarrollaron el primer ratón con un alelo condicional *Trp53*, el alelo *Trp53^{flox/flox}*, que podía ser eliminado mediante la expresión de la recombinasa Cre (Marino, Vooijs *et al.* 2000). Varios años después Jacks y colaboradores generaron una variante de este modelo, con un *cassette* Lox-STOP-Lox (LSL) situado en posición 5' de la secuencia codificante del alelo mutante *Trp53^{R172H}*, con el que podían expresar la proteína p53^{R172H} en tejidos concretos cruzando este modelo con otro que expresara Cre en el tejido deseado (Olive, Tuveson *et al.* 2004).

Estos modelos se desarrollaron como estrategias para inactivar la función de p53 wt o activar una función mutante en un tipo celular concreto o en un momento determinado. Por otra parte, también se realizaron estudios orientados a restaurar la función wt de *Trp53*. Estos modelos se crearon para comprobar si la restauración de su función en células tumorales podía retrasar o revertir la tumorigénesis. Uno de estos modelos, p53^{ERTAM}, fue creado por Evan y colaboradores (Christophorou, Martin-Zanca *et al.* 2005) y permitió demostrar que la respuesta aguda frente a daño al DNA tras irradiación (mediada por p53) era irrelevante para la supresión tumoral (Christophorou, Ringshausen *et al.* 2006). Más aún, estos autores observaron que la resistencia a la aparición de linfomas inducidos por radiación, asociada a una activación retardada de p53, era completamente dependiente de ARF (un activador de p53 que responde a estrés oncogénico). Así, al menos en este contexto, el modo primario de supresión tumoral de p53 no es a través de la eliminación de las células dañadas, sino de la eliminación mediada por ARF de clones raros activados oncogénicamente tras la irradiación. Estos resultados fueron posteriormente apoyados por un trabajo de Serrano y colaboradores (Efeyan, Garcia-Cao *et al.* 2006) en el que concluyeron que la señalización oncogénica es el evento crítico del que depende la protección mediada por p53 y que la respuesta frente a daño en el DNA es menos importante.

Los modelos de p53wt activado condicionalmente sirvieron para demostrar que la restauración de la función de p53 puede inducir la regresión tumoral. Los laboratorios de Evan, Jacks y Lowe, por ejemplo, utilizaron distintas estrategias de restablecimiento de p53 y diferentes modelos tumorales, pero en todos los casos los tumores conservaban la vía de señalización de p53 intacta y ésta era totalmente restaurada cuando se reintroducía la función

de p53. Evan usó el modelo *KI* p53^{ERTAM} en un modelo de linfoma (Martins, Brown-Swigart *et al.* 2006), Jacks utilizó el sistema LSL junto con una Cre expresada ubicuamente en linfomas y sarcomas desarrollados de forma natural (Ventura, Kirsch *et al.* 2007) y Lowe se sirvió de un shRNA reprimible por doxiciclina para activar p53 en un modelo de carcinoma de hígado (Xue, Zender *et al.* 2007). Aunque todos los modelos mostraron altos niveles de supresión tumoral tras la reactivación de p53, el mecanismo de supresión tumoral dependía del tipo de tumor. Mientras que los linfomas mostraban muerte celular por apoptosis, en los sarcomas y tumores hepáticos p53 inducía senescencia. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la restauración de la funcionalidad de p53 tenga efectos terapéuticos, al menos en aquellos tumores que conserven alelos wt de *TP53*. Esto es sólo una posibilidad, ya que el alelo wt de p53 (o cualquier otro miembro de la cascada de señalización) puede perder su expresión en estadios más avanzados de la enfermedad.

La posibilidad de estudiar y manipular el gen *Trp53* en el ratón, un mamífero como el ser humano, ha facilitado en gran medida el descubrimiento de las funciones de p53, asociadas o no al cáncer. Es posible que en un futuro próximo se generen nuevos modelos que permitan una mayor comprensión del funcionamiento de esta proteína y que conduzcan a nuevos descubrimientos con potencial terapéutico frente al cáncer u otras enfermedades.

7. EL MODELO *KNOCK-IN* p53^{ERTAM}

La proteína p53 participa en diversos procesos celulares, por lo que es difícil precisar los mecanismos por los que ejerce su función supresora tumoral en cada caso concreto. Frecuentemente p53 es inactivada durante la progresión tumoral, lo que sugiere que p53 desempeña un papel en fases tardías de la evolución tumoral, como la angiogénesis, la invasión y la inestabilidad genómica. Por otra parte, p53 media la inducción de la apoptosis y la parada del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA y a la activación oncogénica, eventos requeridos en las etapas iniciales de la evolución tumoral. Actualmente el conocimiento de cómo p53 suprime la tumorigénesis *in vivo* es limitado y está por determinar en qué momento del desarrollo del tumor es crucial la pérdida de la función de p53. Cabe la posibilidad de que p53 sea necesaria sólo de forma transitoria, cuando las células presentan un daño genotóxico agudo o un evento desestabilizador del genoma. Una hipótesis alternativa es que las células tumorales tengan señales permanentes de activación de p53, por lo que necesitarían la ausencia continuada de la función de p53 a lo largo de la historia natural del tumor. Sería de gran utilidad terapéutica el establecer cuál de estas dos alternativas es la correcta, ya que la restauración de la función de p53 tendría efectos supresores tumorales sólo en aquellas células con señales constantes de activación de p53. Para analizar estas alternativas se generó el modelo p53^{ERTAM} (Christophorou, Martin-Zanca *et al.* 2005), un modelo de ratón *knock in* en el que se insertó, por recombinación homóloga, la secuencia codificante de un dominio de unión a estrógenos en fase con el extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína p53 de ratón. Este dominio de unión a estrógenos está modificado de tal forma que sólo se une a estrógenos artificiales, como el 4-hidroxitamoxifén (4-OHT), pero no a los estrógenos naturales presentes en el propio organismo (Littlewood, Hancock *et al.* 1995).

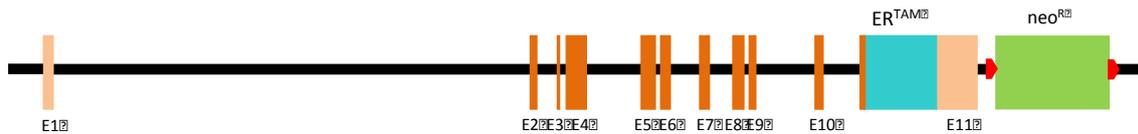


Figura 7. Esquema del alelo recombinado $p53^{ERTAM}$. El alelo $p53^{ERTAM}$ conserva las secuencias codificantes y no codificantes del gen endógeno *Trp53*. Naranja oscuro: Exones codificantes. Naranja claro: Exones no codificantes. Negro: Intrones. Azul: Secuencia codificante del dominio de unión a estrógenos (ER^{TAM}). Verde: Gen de resistencia a G418 (neo^R), flanqueado por sitios loxP (rojo).

Este gen codifica una proteína de fusión entre p53 y el dominio de unión a estrógenos modificado. Este dominio se une a la proteína Hsp90, lo cual impide la función de p53. La presencia de 4-OHT desplaza a la proteína Hsp90 volviendo funcional a p53. En este estado, p53 es competente para ejercer su función en caso de recibir los estímulos adecuados. Cuando el 4-OHT desaparece del sistema, la proteína Hsp90 vuelve a unirse al dominio de unión a estrógenos y p53 vuelve a su estado no funcional. Así se consigue un modelo en el que la función de p53 puede ser controlada de forma reversible entre un estado funcional y otro no funcional con la administración y retirada de 4-OHT. La expresión de $p53^{ERTAM}$ en el modelo está controlada por las mismas secuencias de regulación transcripcional que regulan a p53wt en cada tejido *in vivo*, con la diferencia de que la $p53^{ERTAM}$ (en adelante $p53^{ER}$) es funcionalmente competente sólo en la presencia de 4-hidroxitamoxifén (4-OHT).

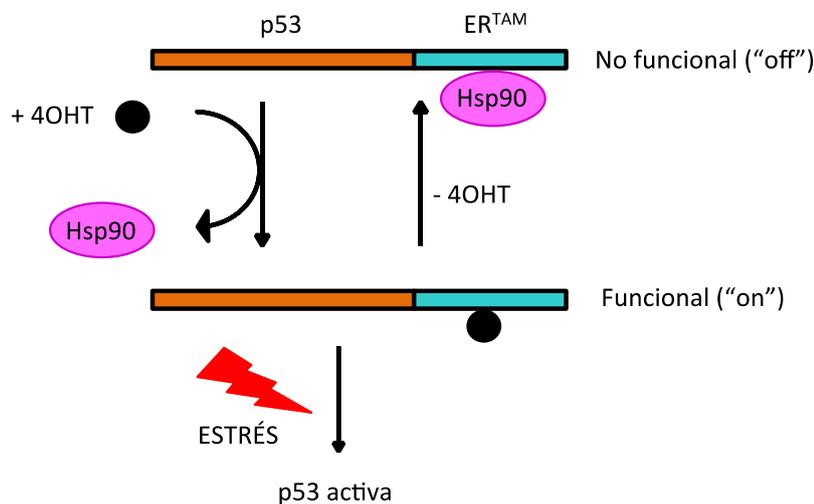


Figura 8. Esquema de la regulación de la competencia de la proteína p53ER. La proteína p53ER se encuentra en condiciones basales en una conformación no funcional, ya que está unida a la proteína Hsp90 mediante su dominio de unión a estrógenos. Cuando se suministra 4-OHT, éste desplaza a la Hsp90 permitiendo el comportamiento normal de p53. En caso de existir los estímulos adecuados, p53 se activará y desencadenará la respuesta oportuna, tal y como lo haría la p53 wt. En caso de no existir estos estímulos, p53 simplemente se autorregulará a través de Mdm2 para mantener unos niveles basales normales en la célula. Una de las ventajas de este modelo reside en la reversibilidad de estos cambios: En el momento en

que se deje de suministrar 4-OHT a la célula, p53ER volverá a su conformación no funcional. Esto permite “encender” y “apagar” la función de p53 a voluntad.

En los estudios *in vivo*, la restauración de p53 se realiza mediante la inyección intraperitoneal de tamoxifén. Esta droga es transformada en el hígado de los ratones en 4-OHT, que será distribuido a cada una de las células del organismo a través de la sangre. En los estudios *in vitro*, en cambio, es necesario añadir 4-OHT directamente, ya que las células cultivadas no tienen la capacidad de metabolizar el tamoxifén. Así, este modelo murino proporciona una herramienta perfecta para el control temporal y altamente específico de la función de p53 tanto en tejidos de ratón *in vivo* como en células primarias derivadas de estos tejidos *in vitro*.

Los ratones p53^{ER/ER} en ausencia de 4-OHT tienen una alta incidencia de linfomas espontáneos, de forma similar a los ratones p53^{-/-} isogénicos (C57BL/6 x 129/SvJ). Además, los tejidos radiosensibles, timo, bazo y epitelio intestinal, de los ratones p53^{ER/ER} no expuestos a tamoxifén son resistentes a la apoptosis inducida por radiación. Sin embargo, una administración sistémica de tamoxifén a los ratones p53^{ER/ER} rápidamente restaura la función de p53 en estos tejidos, reestableciendo su característica de radiosensibilidad tan pronto como 2 h después de la inyección intraperitoneal de tamoxifén. De forma similar, la competencia de p53 es rápidamente restaurada *in vitro* en timocitos y MEFs después de la adición de 4-OHT al medio de cultivo. El cese del tratamiento con tamoxifén en los ratones o la retirada del 4-OHT de los cultivos celulares los revierte a su estadio de deficientes en p53, demostrando así la reversibilidad rápida y repetible de la función de p53 en el modelo KI p53^{ERTAM}. Estos análisis muestran también que el 4-OHT por sí mismo no activa a p53, sino que vuelve competente a la proteína para que pueda activarse en respuesta a las señales apropiadas de daño o estrés (Christophorou, Martin-Zanca *et al.* 2005).

8. ESTRATEGIAS PARA ESTUDIAR LA FUNCIÓN DE p53 EN LA MITOCONDRIA

Desde el momento en que se descubrió que p53 tenía funciones independientes de la transcripción se puso de manifiesto la necesidad de utilizar modelos de estudio en los que las actividades transcripcionales y no transcripcionales de p53 quedaran totalmente separadas, ya que sólo de este modo se podría conocer la relevancia de cada una de ellas en la decisión del destino celular. Durante todos estos años se han puesto a punto estrategias tanto genéticas como farmacológicas para conseguir bloquear la acción nuclear de p53 y así poder concluir que el efecto obtenido al activar p53 se debe exclusivamente a su acción citoplásmica y mitocondrial.

La primera de estas estrategias, diseñada por el grupo de Moll, consistió en la introducción mediante transfección en células p53^{-/-} de un plásmido de expresión que codifica una proteína p53 provista del péptido de localización mitocondrial de la ornitín transcarbamilasa. Las proteínas con este péptido señal se dirigen a la matriz mitocondrial a través de los transportadores de las membranas externa e interna (TOM y TIM, respectivamente). En la matriz el péptido señal es procesado y la proteína es dirigida al compartimento mitocondrial

definitivo. Si bien este modelo fue útil para establecer una relación causa-efecto entre la localización mitocondrial de p53 y la apoptosis, presenta el inconveniente de que el gen *Trp53* está bajo el control de un promotor de sobreexpresión y los niveles de p53 que se alcanzan en la mitocondria son mucho más elevados que los que se alcanzan fisiológicamente en situación de estrés celular (Marchenko, Zaika *et al.* 2000). Otros modelos similares, como la expresión de una p53 con los dominios NLS mutados para impedir su importación al núcleo, se construyeron también con promotores de sobreexpresión.

Otros grupos han bloqueado el transporte de proteínas entre el citoplasma y el núcleo, con proteínas como la aglutinina de germen de trigo, con el objeto de conseguir una p53 exclusivamente extranuclear (Chipuk and Green 2004). Estos modelos ya cuentan con los niveles endógenos de p53, pero presentan el inconveniente de que el bloqueo de la importación y exportación de proteínas del núcleo interfiere con muchos otros procesos y con la modulación de la transcripción por p53.

Un modo distinto de conseguir que p53 actúe sólo en el citoplasma y la mitocondria y no en el núcleo es bloquear la expresión génica mediante el uso de drogas. Existen dos compuestos, llamados *pifithrin- α* y *pifithrin- μ* , que tradicionalmente se han utilizado para bloquear la translocación de p53 a la mitocondria y al núcleo, respectivamente (Strom, Sathe *et al.* 2006). A pesar de que el uso de *pifithrins* es más aconsejable que el uso de otros fármacos de más amplio espectro, estudios recientes indican que estas drogas no son tan específicas del transporte de p53 como se creía inicialmente, lo que nos lleva de nuevo al problema de los efectos pleiotrópicos de los fármacos utilizados (Leu, Pimkina *et al.* 2009). Sin duda, es necesario un modelo que permita estudiar las actividades mitocondriales de p53 de forma más limpia, esto es, desde una expresión de *Trp53* a niveles fisiológicos y eliminando el uso de fármacos con efectos pleiotrópicos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha demostrado que p53, además de ser un factor de transcripción, ejerce parte de sus funciones fuera del núcleo y que su acción en el citoplasma y en la mitocondria es determinante en la supervivencia o muerte de la célula. No obstante, los estudios que han llevado a esta conclusión se han realizado *in vitro* utilizando sistemas que presentan inconvenientes obvios. En algunos casos, se han realizado los experimentos en células en las que p53 puede actuar tanto a nivel nuclear como mitocondrial, con lo cual resulta difícil sacar conclusiones sobre la importancia de la función mitocondrial de dicha proteína. Otras estrategias utilizadas consisten en la sobreexpresión, en células p53^{-/-}, de una proteína p53 fusionada a una señal de localización mitocondrial. Con ello se consigue una p53 exclusivamente mitocondrial, pero se alcanzan unos niveles de p53 en este orgánulo muy superiores a los fisiológicos. Este mismo inconveniente presentan los experimentos realizados inyectando p53 directamente en la mitocondria.

Con el objeto de determinar la relevancia de las funciones mitocondriales de p53 consideramos necesario crear un modelo en el que esta proteína esté dirigida a la mitocondria a la vez que excluida del núcleo. Por ello nos planteamos crear un nuevo modelo de ratón que portara una p53 con una señal de localización mitocondrial capaz de sobreponerse a la señal de localización nuclear presente en el extremo carboxilo de esta proteína. Además, dado que la p53 localizada constitutivamente en la mitocondria podría tener efectos deletéreos para la célula, utilizamos la versión de p53 fusionada con el dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos modificado (p53ER^{TAM}), para otorgar al modelo la capacidad de controlar la funcionalidad de la proteína de forma reversible, según la disponibilidad de 4-hidroxitamoxifén. Partiendo de estas premisas, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Generar un modelo de ratón *knock-in* con una proteína p53 dirigida a la mitocondria y regulable de forma reversible por tamoxifén, p53mitoER^{TAM} (en adelante, p53mitoER).
2. Comprobar la ausencia de actividad transcripcional y la localización subcelular de la proteína p53mitoER.
3. Comprobar que la proteína p53mitoER no es funcional en ausencia de 4-hidroxitamoxifén.
4. Determinar la importancia de la acción mitocondrial de p53 en la respuesta a estrés celular, *in vitro* e *in vivo*.
5. Estudiar la capacidad de supresión tumoral de la proteína p53 localizada en la mitocondria, *in vivo*.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE UN MODELO DE RATÓN *KNOCK-IN*, $p53^{\text{mitoERTAM}}^{\text{KI}}$, QUE EXPRESA UNA PROTEÍNA $p53$ DIRIGIDA A LA MITOCONDRIA Y REGULABLE POR TAMOXIFÉN.

1a. Obtención, por recombinación homóloga, de clones de células ES portadoras del alelo $p53^{\text{mitoER}}$.

El vector de recombinación pVH7 se introdujo por electroporación en células ES de ratón heterocigóticas $p53^{\text{wt/ER}}$ (figura 9). A continuación, se seleccionaron los clones recombinantes en medio con G418 y puromicina. Las colonias de células supervivientes se recolectaron y se determinó su genotipo por Southern blot, utilizando una sonda externa al vector de recombinación (denominada "Sacl") que permite diferenciar los cuatro alelos de $p53$ posibles (figuras 10 y 11).

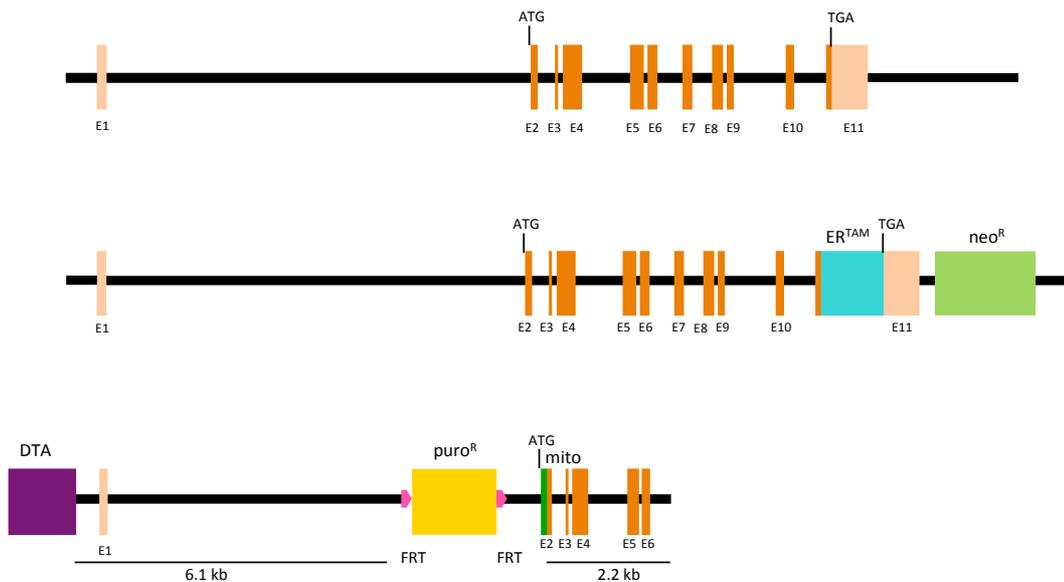


Figura 9: Esquema de los alelos de *Trp53* de las células ES electroporadas y del vector de recombinación. **Arriba:** Alelo $p53^{\text{wt}}$. **Centro:** Alelo $p53^{\text{ER}}$. **Abajo:** Vector de recombinación pVH7 linearizado. Rectángulos: Exones. Líneas gruesas: Intrones. Naranja claro: Exones no codificantes. Naranja oscuro: Exones codificantes. Azul: Región codificante de ER^{TAM} . Verde claro: Gen de resistencia a geneticina (G418). Morado: Gen de la cadena A de la toxina diftérica (DTA), para la selección negativa. Amarillo: Gen de resistencia a la puromicina, para la selección positiva. Rosa: Secuencias FRT, dianas de la enzima flipasa. Verde oscuro: Secuencia codificante de la señal de localización mitocondrial de la enzima ornitín transcarbamilasa. Se representan también los codones de inicio y fin de la traducción (ATG y TGA) y las regiones de homología del vector con los alelos de *Trp53* (6.1kb y 2.2kb).

De las 336 colonias recogidas, 6 tenían el vector integrado en el alelo $p53^{ER}$, dando como resultado el alelo $p53^{mitoER}$; y 17 lo habían integrado en el alelo $p53^{wt}$, originando el alelo $p53^{mitowt}$ (figuras 10 y 11).

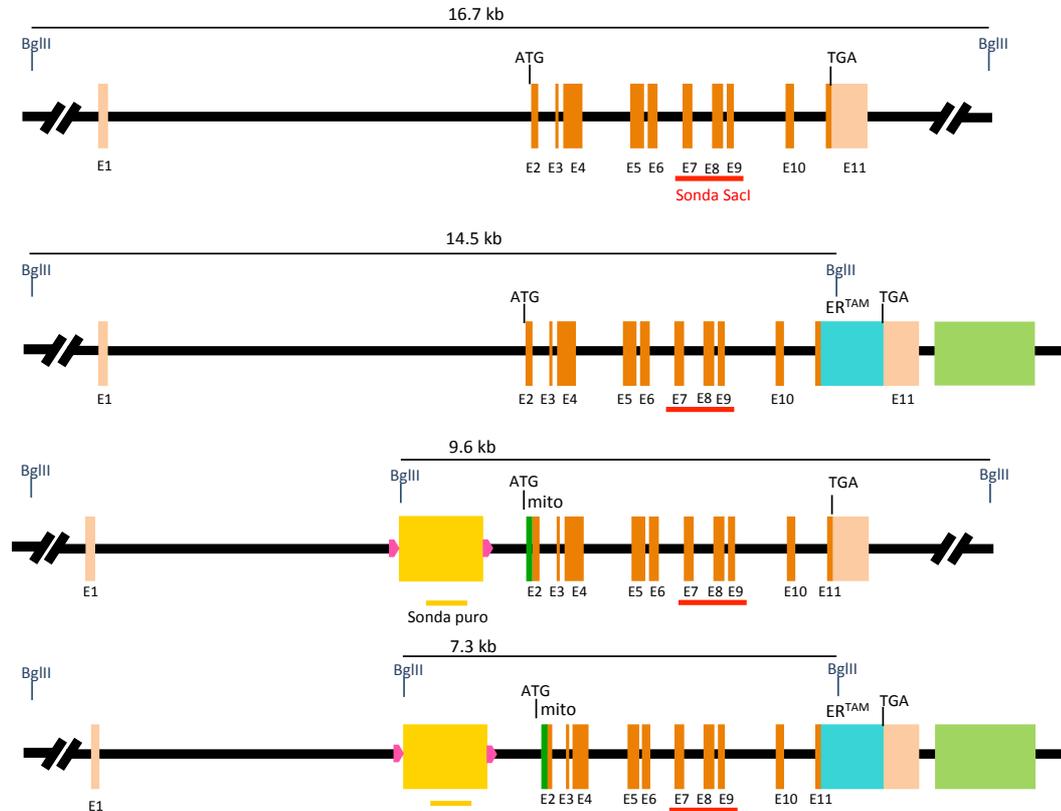


Figura 10: Esquema de los alelos de *Trp53* iniciales de las células ES ($p53^{wt}$ y $p53^{ER}$) y de los alelos resultantes de la integración del vector pVH7 ($p53^{mitowt}$ y $p53^{mitoER}$, respectivamente). De arriba a abajo: $p53^{wt}$, $p53^{ER}$, $p53^{mitowt}$ y $p53^{mitoER}$. Se muestra el tamaño de los fragmentos obtenidos mediante digestión con la enzima de restricción *Bgl*II. También se indica la localización de la sonda "Sacl" (línea roja) y la localización de la sonda "puro" (línea amarilla).

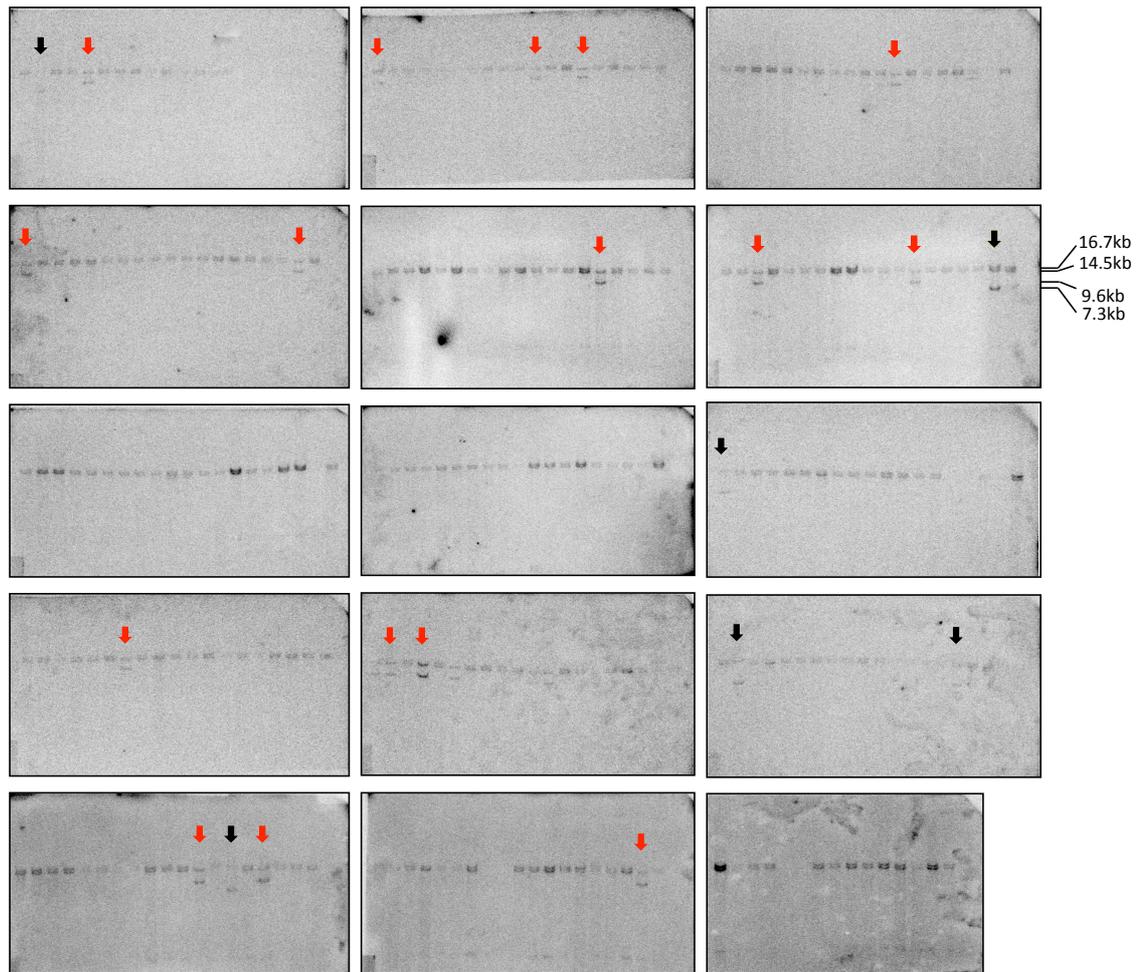


Figura 11: Genotipado por Southern blot de las colonias supervivientes a la selección con puromicina. Los DNAs correspondientes se digirieron con BglII y se hibridaron con la sonda "SacI". Alelo $p53^{wt}$: 16.7kb. Alelo $p53^{ER}$: 14.5kb. Alelo $p53^{mitowt}$: 9.6kb. Alelo $p53^{mitoER}$: 7.3kb. Flechas negras: clones recombinantes $p53^{wt/mitoER}$. Flechas rojas: clones recombinantes $p53^{mitowt/ER}$.

Para comprobar la calidad de los clones recombinantes $p53^{wt/mitoER}$ se analizaron tres parámetros: la presencia de integraciones heterólogas del vector, la ploidía de las células y la integridad de la región 5' del gen *Trp53*. En primer lugar se realizó un nuevo Southern blot, digiriendo el DNA de las colonias con BglII y utilizando la sonda denominada "puro", que corresponde a una región del gen de resistencia a la puromicina (figura 10). Esta sonda, al ser interna al vector de recombinación, permite identificar integraciones del vector en cualquier lugar del genoma de las células ES, tanto por recombinación homóloga como heteróloga. Todos los clones $p53^{wt/mitoER}$ habían integrado el vector una sola vez por recombinación homóloga, y no presentaron recombinación heteróloga, ya que la sonda "puro" detecta únicamente el mismo fragmento de 7.3kb que se detectaba con la sonda "SacI" (figura 12).

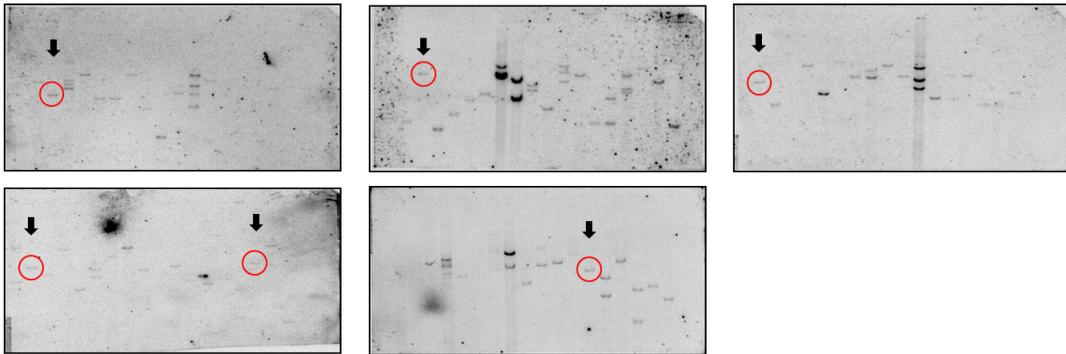
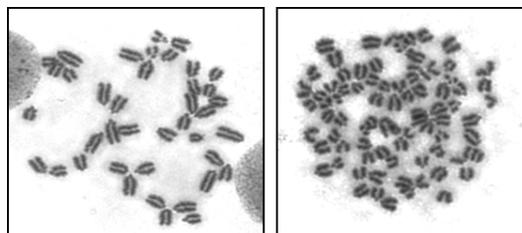


Figura 12: Identificación por Southern blot de las colonias con integración heteróloga del vector. En algunos casos se observan múltiples bandas, correspondientes a las diferentes inserciones del vector en el genoma de las células. Los clones recombinantes homólogos identificados con la sonda externa (figura 11) presentaron una única integración del vector de recombinación (círculo rojo: fragmento de 7.3kb).

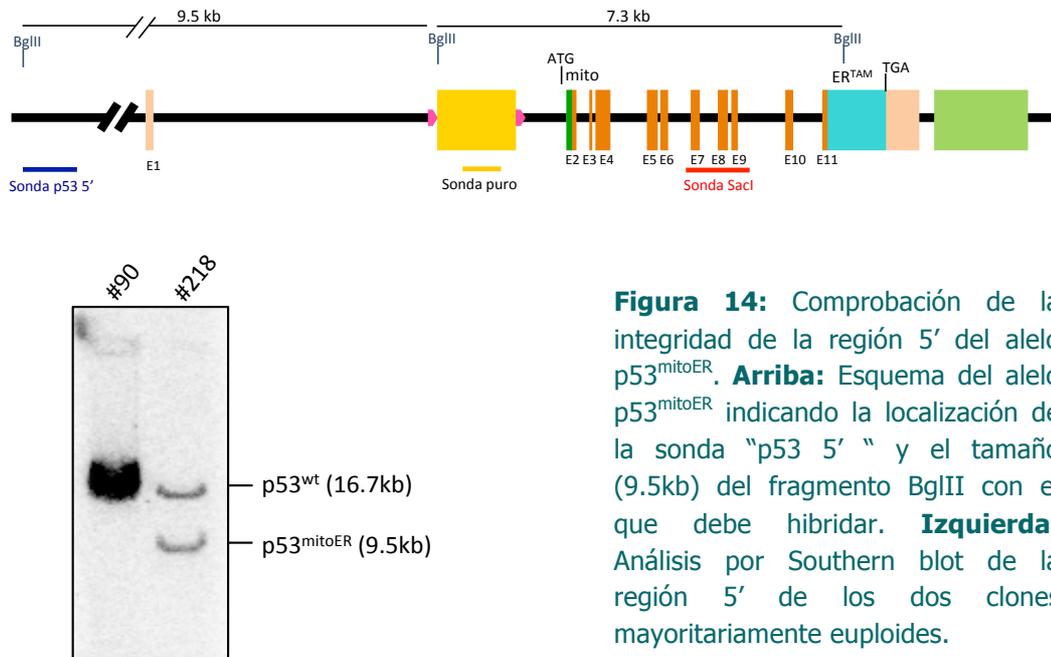
En segundo lugar, se hizo un recuento cromosómico de los 6 clones $p53^{wt/mitoER}$. Dos de los seis clones contenían un porcentaje de células euploides superior al 50%, que consideramos suficiente para su inyección en blastocistos. Los cuatro restantes presentaron un porcentaje insuficiente de células euploides o un elevado porcentaje de células con 41 cromosomas, esto es, portadoras de una trisomía que dificultaría la formación de gametos y, en definitiva, la transmisión del alelo $p53^{wt/mitoER}$ a la descendencia (figura 13).



Nº clon	Células euploides	Células trisómicas
# 43	26 %	44%
# 90	50.4%	15.6%
# 218	49%	2.2%
# 222	41%	3.6%
# 241	34.6%	22.1%
# 303	16%	54%

Figura 13: Recuento cromosómico de clones de células ES. **Arriba:** Microfotografías de los cromosomas de los clones de células ES (63X). **Izquierda:** núcleo normal diploide (40 cromosomas). **Derecha:** núcleo tetraploide (80 cromosomas). **Abajo:** Tabla resumen de los resultados del recuento. En azul los dos clones con porcentajes de células euploides más altos.

En tercer lugar se comprobó que en los dos clones mayoritariamente euploides la región 5' del alelo $p53^{\text{mitoER}}$ estuviera intacta, ya que con la sonda "Sacl" sólo se había analizado la región 3' del mismo. Para ello se realizó un nuevo Southern blot, utilizando la enzima BglII para digerir el DNA de los clones e hibridando con una sonda denominada "p53 5' ". El clon #218 presentó las dos bandas esperadas: una de 16.7kb correspondiente al alelo $p53^{\text{wt}}$ y otra de 9.5kb correspondiente al alelo $p53^{\text{mitoER}}$. El clon #90, por el contrario, carecía de la banda correspondiente al alelo $p53^{\text{mitoER}}$ (figura 14).



1b. Generación de ratones quiméricos y eliminación del marcador de selección.

Se inyectaron células ES del clon #218 en la masa celular interna de blastocistos de 3-4 días de edad del linaje C57BL/6. Los blastocistos quiméricos se insertaron en el útero de hembras pseudopreñadas y se dejó que la gestación llegara a término. Se obtuvieron dos ratones macho quiméricos (figura 15). Cuando las quimeras alcanzaron la madurez sexual se cruzaron con hembras CD1. Ambas quimeras transmitían el alelo $p53^{\text{mitoER}}$ con alta eficiencia a la descendencia, siendo el 41% de las crías portadoras del mismo.

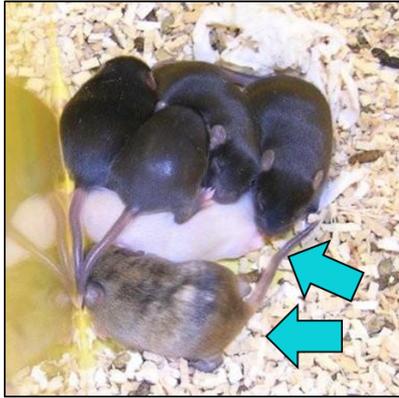


Figura 15: Camada obtenida de los blastocistos inyectados con células ES tras su gestación en hembras pseudopreñadas. Dos de las crías (flechas azules) son quiméricas, ya que presentan regiones de color chinchilla correspondiente a las células ES electroporadas (de fondo genético 129/SvJ) y zonas de pelaje negro correspondiente a los blastocistos receptores (de fondo genético C57BL/6).

Las quimeras se cruzaron con hembras C57BL/6 pertenecientes a una cepa CAG-FLPe, que expresa la enzima flipasa en oocitos (Kanki, Suzuki *et al.* 2006). Algunas de las crías de este cruce portaban el alelo $p53^{\text{mitoER}}$ sin el gen de resistencia a la puromicina debido a la recombinación entre los sitios FRT mediada por la enzima flipasa (figura 16).

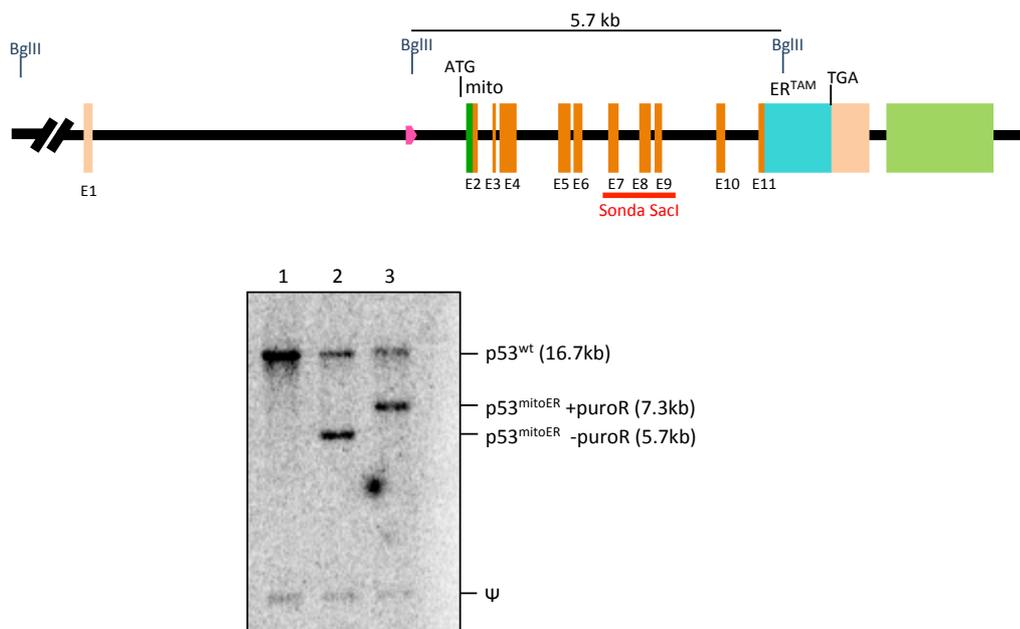


Figura 16: Eliminación del gen de resistencia a la puromicina. **Arriba:** Esquema del alelo $p53^{\text{mitoER}}$ después de la recombinación entre las secuencias FRT. Se indica la localización de la sonda "SacI" y el tamaño de la banda BglII esperada. **Abajo:** Análisis por Southern blot de los ratones descendientes del cruce Quimera X CAG-FLPe. 1: Individuo $p53^{\text{wt/wt}}$. 2: Individuo $p53^{\text{wt/mitoER}}$ con el alelo *KI* procesado. 3: Individuo $p53^{\text{wt/mitoER}}$ con el alelo *KI* sin procesar. Ψ : Pseudogén *Trp53*.

1c. Generación de una colonia de ratones p53mitoER.

Se cruzaron entre sí los ratones heterocigóticos $p53^{wt/mitoER}$ sin el gen de resistencia a puromicina para obtener ratones $p53^{wt/wt}$, $p53^{wt/mitoER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$. A continuación se cruzaron los descendientes entre sí para aumentar el número de ratones de los tres genotipos y se retrocruzaron 8 veces con ratones puros C57BL/6, de esta forma se obtuvieron ratones con un fondo genético 95% C57BL/6.

2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA p53mitoER.

2a. La proteína p53mitoER no induce la expresión de los genes diana de p53 en MEFs sometidos a radiación gamma.

Al ser nuestro objetivo estudiar las funciones de p53 en la mitocondria independientemente de las funciones en el núcleo, uno de los requisitos que debía cumplir la proteína p53mitoER es el de no tener actividad como factor de transcripción. Para comprobarlo, MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ se trataron con 4-OHT o vehículo (etanol), se irradiaron con radiación gamma para inducir daño en el DNA y se determinó la expresión de genes diana de p53. Paralelamente, se realizó el mismo experimento con MEFs $p53^{ER/ER}$ y MEFs $p53^{-/-}$. El análisis mediante PCR cuantitativa reveló que, mientras que en los MEFs $p53^{ER/ER}$ tratados con 4-OHT e irradiados (esto es, con una p53 funcional y activada por estrés) aumentan los niveles de mRNA de las dianas transcripcionales típicas de p53; en los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados de la misma forma no sucede lo mismo. Es más, los niveles de mRNA de estas dianas transcripcionales de p53 son semejantes en los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ y en los MEFs $p53^{-/-}$ (figura 17).

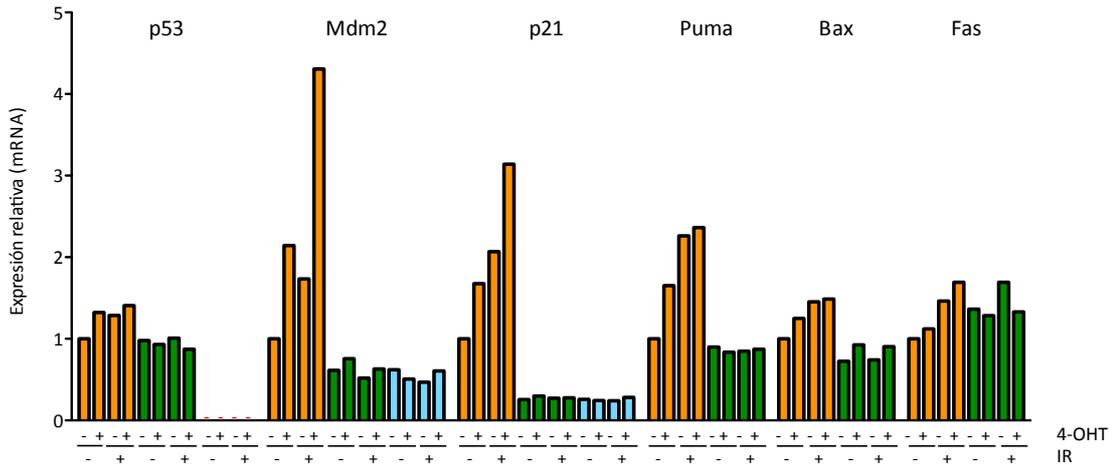


Figura 17: Representación gráfica de los niveles relativos de mRNA de p53 y cinco de sus dianas transcripcionales (Mdm2, p21, Puma, Bax y Fas) en MEFs p53^{ER/ER} (naranja), p53^{mitoER/mitoER} (verde) y p53^{-/-} (azul) tratados con 4-OHT o vehículo y sometidos a radiación gamma.

2b. La proteína p53mitoER está localizada en la mitocondria.

Se realizó una tinción de inmunofluorescencia en MEFs p53^{mitoER/mitoER} y en MEFs p53^{ER/ER}, tratados con 4-OHT o con vehículo para determinar la localización subcelular de p53. Se utilizó la Ciclofilina D como marcador de las mitocondrias. Se observó que la proteína p53ER está localizada en el núcleo y en el citoplasma, tanto en las células tratadas con vehículo, como en las tratadas con 4-OHT. En cambio, la proteína p53mitoER está excluida del núcleo y colocaliza con Ciclofilina D en ausencia y en presencia de 4-OHT (figura 18).

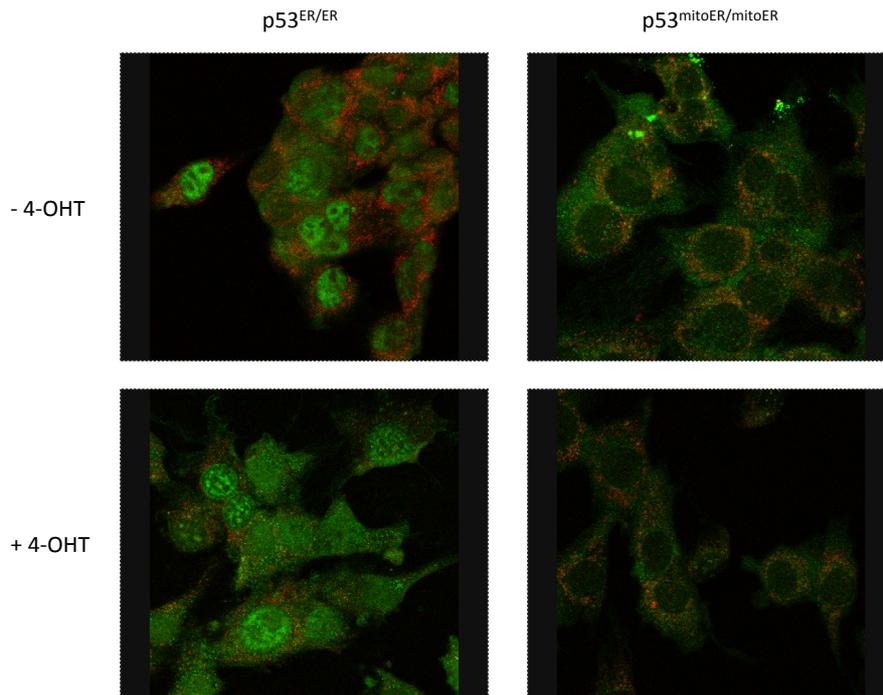


Figura 18: Localización de p53 y Ciclofilina D mediante inmunofluorescencia. Verde: p53 (detectada con Alexa488). Rojo: Ciclofilina D (detectada con Alexa568).

Por otra parte, se purificó la fracción mitocondrial de MEFs p53^{mitoER/mitoER} y MEFs p53^{ER/ER} tratados con 4-OHT o vehículo y se analizó por Western blot la presencia de p53 en las mitocondrias. Se comprobó que una fracción de la proteína p53mitoER, que no varía con la presencia o ausencia de 4-OHT, está en las mitocondrias. En comparación, la proteína p53ER está presente en este orgánulo en menor cantidad, pese a ser más abundante en el extracto de célula total (figura 19).

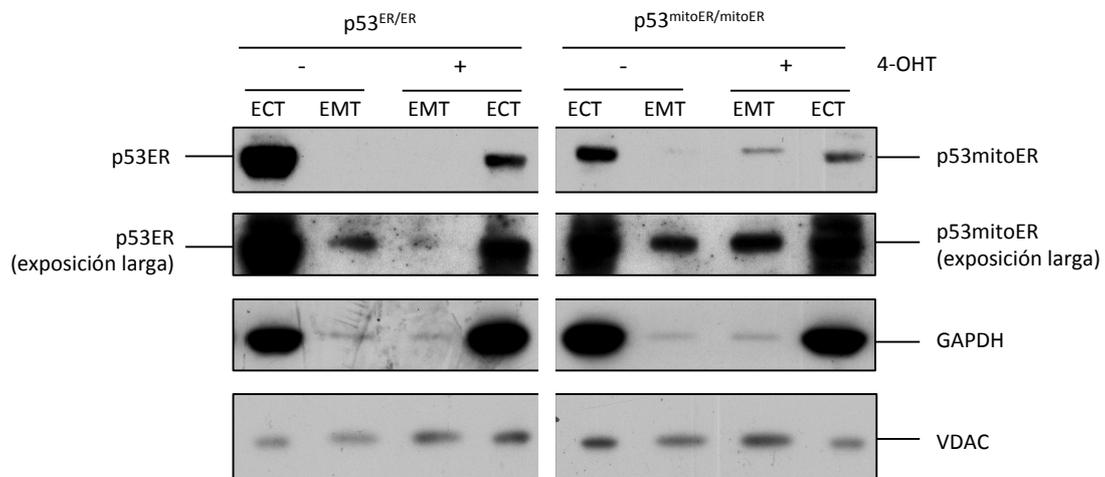


Figura 19: Análisis por Western blot de la presencia de p53ER y p53mitoER en las mitocondrias de MEFs p53^{ER/ER} y MEFs p53^{mitoER/mitoER} tratados con 4-OHT o vehículo. ECT: Extracto celular total. EMT: Extracto mitocondrial total. GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, una proteína presente en el citoplasma. VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje, una proteína mitocondrial.

Finalmente, las mitocondrias purificadas se sometieron a fraccionamiento submitocondrial y se encontró la proteína p53mitoER tanto en la membrana externa como en la interna. La proteína p53ER, al ser mucho más escasa en esta fracción celular, no se detectó en ninguno de los compartimentos mitocondriales (figura 20).

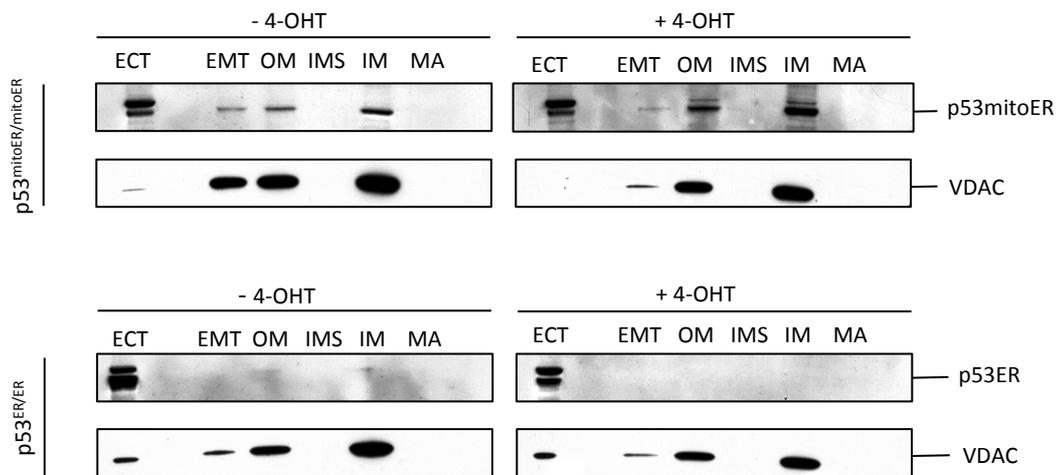


Figura 20: Análisis por Western blot de la localización de p53ER y p53mitoER dentro de la mitocondria en MEFs p53^{mitoER/mitoER} (arriba) y p53^{ER/ER} (abajo) tratados con 4-OHT o vehículo. ECT: Extracto celular total. EMT: Extracto mitocondrial total. OM: Membrana externa. IMS: Espacio intermembrana. IM: Membrana interna. MA: Matriz mitocondrial. VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje, una proteína residente de la membrana externa.

3. COMPROBACIÓN DE QUE LA PROTEÍNA p53mitoER NO ES FUNCIONAL EN AUSENCIA DE 4-HIDROXITAMOXIFÉN, *IN VIVO*.

3a. Los ratones homocigóticos p53^{mitoER/mitoER} no tratados tienen una vida media más corta que los ratones heterocigóticos y que los p53^{wt/wt} no tratados.

Del mismo modo que la proteína p53ER no es funcional en condiciones basales y sí lo es cuando se inyecta tamoxifén a los ratones, se esperaba que la proteína p53mitoER tampoco fuera funcional en ausencia de este fármaco. Se realizó una curva de supervivencia de tipo Kaplan-Meier de animales p53^{wt/wt}, p53^{wt/mitoER} y p53^{mitoER/mitoER}

que habían muerto de forma natural, es decir, que no habían sido sacrificados. Como se esperaba, los ratones homocigóticos $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ tienen una vida media mucho más corta (21.7 semanas) que los ratones heterocigóticos $p53^{\text{wt/mitoER}}$ (70 semanas) y que los ratones $p53^{\text{wt/wt}}$ (104 semanas) (figura 21).

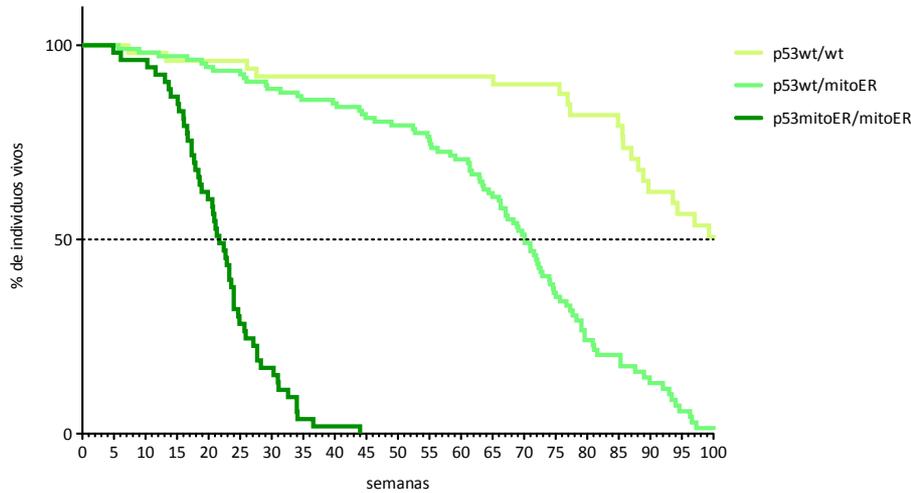


Figura 21: Supervivencia de los ratones de la colonia $p53^{\text{mitoER}}$. Representación gráfica del porcentaje de individuos vivos de cada genotipo a lo largo del tiempo. $p53^{\text{wt/wt}}$, n=50. $p53^{\text{wt/mitoER}}$, n=107. $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$, n=53.

3b. El análisis macroscópico de los órganos de los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ muestra una tendencia al desarrollo de sarcomas e hiperplasia del timo.

Los animales seleccionados para el análisis histológico fueron sacrificados cuando presentaron signos de enfermedad avanzada o deterioro físico. El análisis macroscópico de los tejidos reveló una tendencia de los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ a desarrollar sarcomas de tejidos blandos (con un 31% de penetrancia) e hiperplasia del timo (con un 50% de penetrancia). Este espectro de tumores es similar al de los ratones $p53^{-/-}$, lo cual es coherente con la ausencia de función de $p53^{\text{mitoER}}$ en animales no tratados con tamoxifén (figura 22).

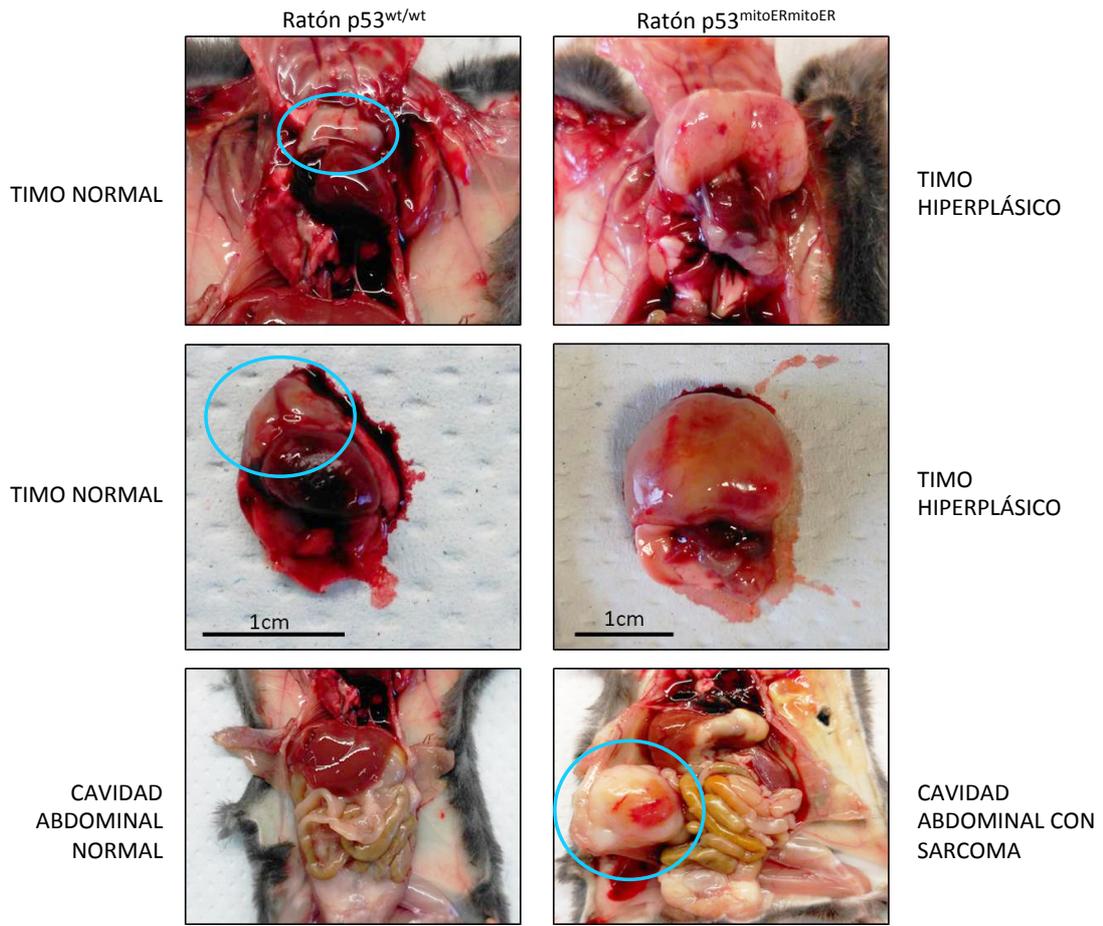


Figura 22: Aspecto macroscópico de los órganos de un ratón $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ enfermo (14.5 semanas) en comparación con un ratón $p53^{\text{wt/wt}}$ sano (22 semanas). Se aprecia el aumento del tamaño del timo y la aparición de sarcomas, mayoritariamente en el abdomen.

3c. El análisis anatomopatológico de los tejidos de los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ muestra la presencia de sarcomas pleomórficos y linfomas de alto grado.

El estudio a nivel microscópico de los tejidos reveló que los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ desarrollan diferentes tipos de neoplasias. El 50% de los ratones homocigóticos analizados mostró linfoma de alto grado, en la mayoría de los casos originado en el timo. Casi la totalidad de los linfomas observados había invadido otros tejidos. Por otra parte, casi un tercio de los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ mostró sarcomas pleomórficos o con alto índice mitótico, en su mayoría localizados en el abdomen. El 40% de estos sarcomas había metastatizado a otros tejidos (figuras 23 y 24).

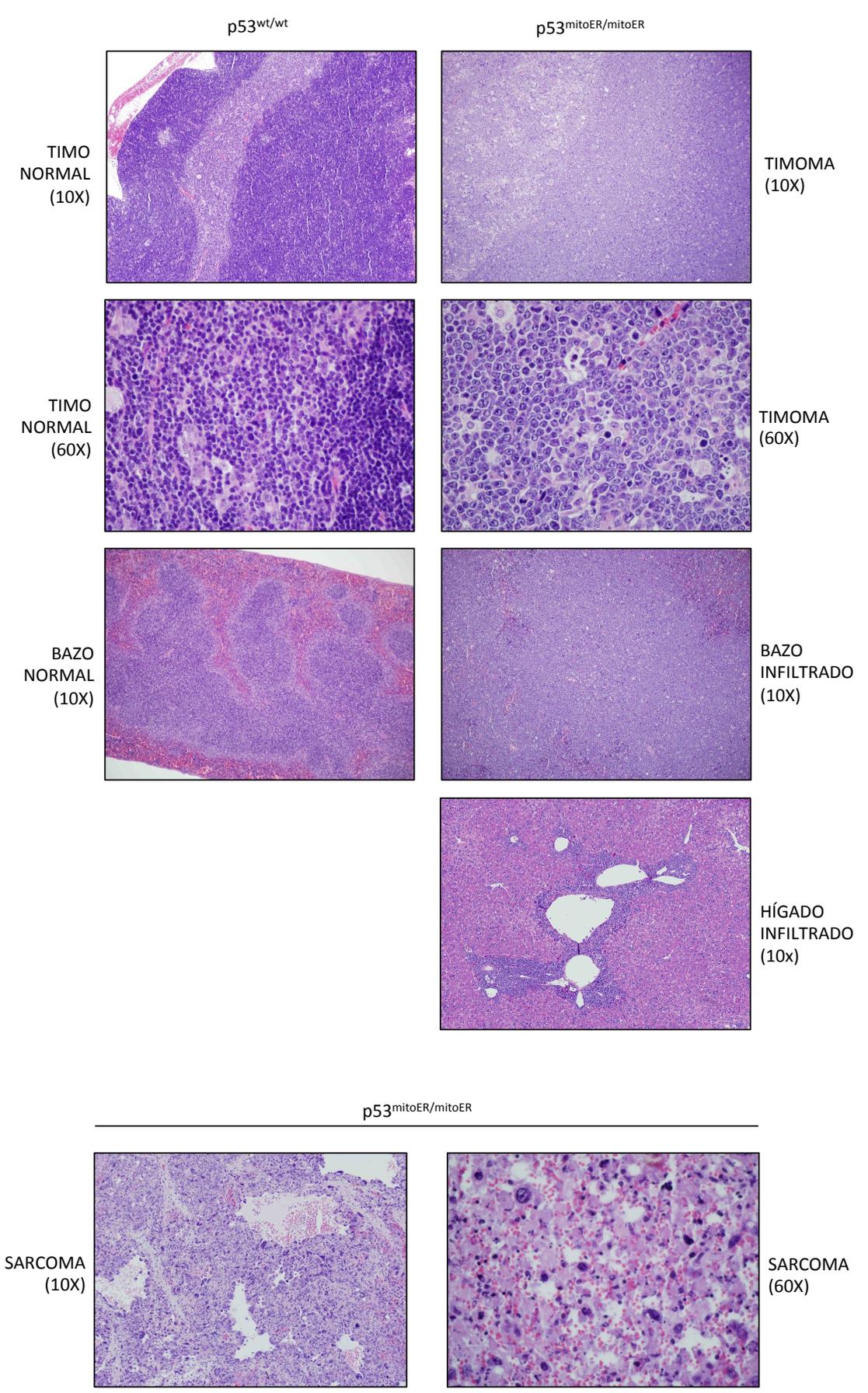


Figura 23: Aspecto microscópico de los tejidos de los ratones enfermos. Se muestran microfotografías de cortes histológicos de timo, bazo y sarcoma teñidos con hematoxilina y eosina. Izquierda: Tejidos correspondientes a un ratón sano ($p53^{wt/wt}$, 22 semanas). Derecha: Tejidos correspondientes a un ratón enfermo ($p53^{mitoER/mitoER}$, 26.1 semanas).

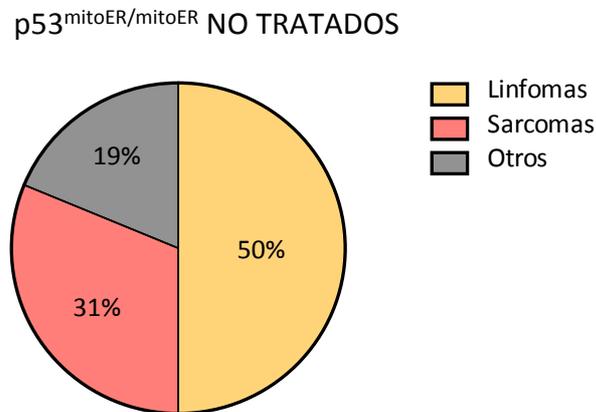


Figura 24: Frecuencia de aparición de las distintas neoplasias en ratones $p53^{mitoER/mitoER}$ no tratados, sacrificados cuando presentaban signos visibles de enfermedad o deterioro ($n=16$).

4. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA $p53^{mitoER}$ *IN VITRO*.

4a. Los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ sometidos a pases seriados en cultivo no detienen su ciclo celular.

Los MEFs tienen la capacidad de dividirse *in vitro*, pero sólo durante un número limitado de pases, conocido como Límite de Hayflick (Hayflick 1965). Superado este límite, los MEFs sufren una parada en el ciclo celular dependiente de p53, que es debida al acortamiento de sus telómeros. Por tanto, los MEFs con al menos una copia funcional de p53 dejan de dividirse tras pases sucesivos, mientras que los obtenidos de ratones $p53^{-/-}$ son capaces de dividirse sin límite; en otras palabras, son células inmortales.

Para comprobar si la proteína $p53^{mitoER}$ es capaz de provocar esta parada, se realizó un cultivo prolongado de MEFs, sometiendo a las células a pases sucesivos en presencia de vehículo o de 4-OHT. En cada pase se hizo un recuento de las células recogidas y se sembraron. Finalmente, se analizaron por Western blot los niveles de p53 y de p21, un inhibidor de CDKs cuya expresión está inducida por p53, que frena el ciclo celular ante determinados tipos de estrés. Se observó que los MEFs $p53^{wt/wt}$ pararon su ciclo celular tras varios pases, independientemente del tratamiento con 4-

OHT o vehículo. Los MEFs $p53^{ER/ER}$ tratados con 4-OHT también dejaron de dividirse y su velocidad de expansión se igualó con la de los $p53^{wt/wt}$. En cambio, los MEFs $p53^{ER/ER}$ tratados con vehículo, al no tener una p53 funcional, fueron capaces de dividirse ilimitadamente durante todo el tiempo que se mantuvieron en cultivo. Por su parte, los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ con ambos tratamientos se comportaron de forma similar a los MEFs $p53^{ER/ER}$ sin 4-OHT. Además, en los MEFs que se dividieron sin límite no se observó el aumento en los niveles de p21 que sí ocurre en los MEFs que pararon el ciclo (figura 25).

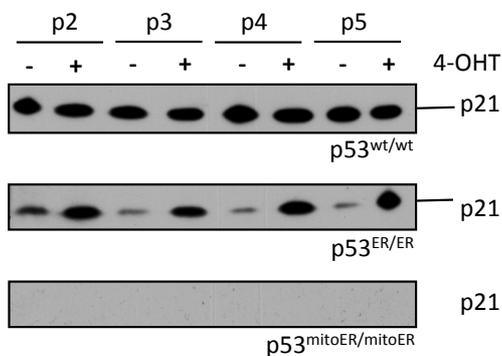
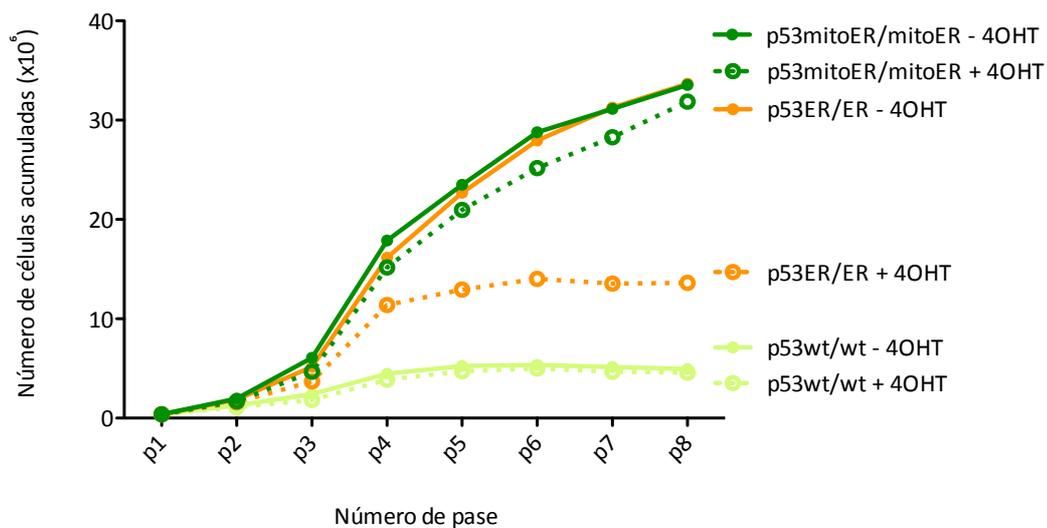


Figura 25: Capacidad de división de MEFs sometidos a subcultivos seriados. **Arriba:** Representación gráfica del número de MEFs acumulados en cada pase. Líneas continuas: células tratadas con vehículo. Líneas quebradas: células tratadas con 4-OHT. **Izquierda:** Niveles de p21 en MEFs de los distintos genotipos y condiciones en los primeros pases del experimento.

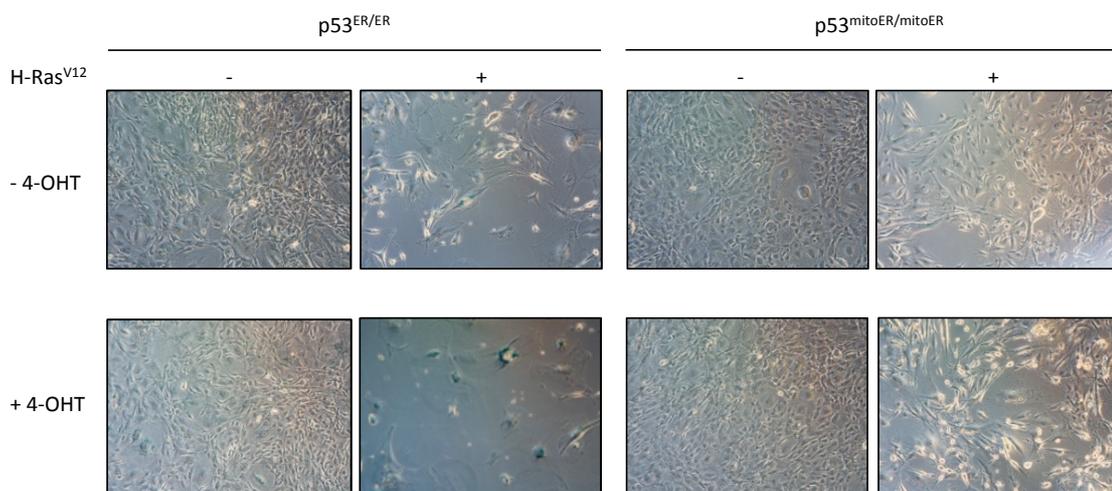
4b. El tratamiento con Nutlin-3a no induce senescencia en MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$.

La droga Nutlin-3a se une a Mdm2 en su "bolsillo" de unión a p53, impidiendo la unión entre p53 y su inhibidor (Vassilev, Vu *et al.* 2004). Como consecuencia de la unión entre Mdm2 y Nutlin-3a, desciende la tasa de degradación de p53 y la acumulación de p53 resultante induce senescencia en las células. Para comprobar la capacidad de las células $p53^{mitoER/mitoER}$ de entrar en senescencia, se trataron MEFs con 4-OHT o con vehículo y se añadió Nutlin-3a. Se realizó la tinción de β -galactosidasa

Figura 26: Senescencia celular inducida por Nutlin-3a. **Arriba:** Morfología y tinción SA- β -gal de MEFs $p53^{wt/wt}$, $p53^{ER/ER}$, $p53^{mitoER/mitoER}$ y $p53^{-/-}$ tratados con Nutlin-3a o vehículo (DMSO) en presencia o ausencia de 4-OHT. Se observa que los MEFs $p53^{ER/ER}$ tratados con Nutlin-3a y 4-OHT se tiñen de azul y presentan la forma típica de las células senescentes, similar a los $p53^{wt/wt}$, mientras que los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados de la misma forma conservan su forma normal y no tienen actividad SA- β -gal, similar a los $p53^{-/-}$. **Abajo:** Análisis por Western blot de los niveles de Mdm2 y p21 en MEFs $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados con Nutlin-3a o vehículo y con 4-OHT o vehículo. Asterisco rojo: Banda inespecífica.

4c. La sobreexpresión de Ras oncogénico no induce senescencia en MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$.

Los fibroblastos de ratón que sobreexpresan el oncogén H-Ras^{V12}, entran en senescencia debido a la acción de p53. No obstante, la sobreexpresión de H-Ras^{V12} en un contexto celular de p53 inactivado es equivalente a un evento oncogénico secundario que conduce a la transformación celular (Serrano, Lin *et al.* 1997). Decidimos estudiar la posibilidad de que Ras oncogénico indujera la entrada en senescencia en MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$. Para ello se infectaron MEFs $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$, que previamente habían sido tratados con 4-OHT o vehículo, con retrovirus portadores de H-Ras^{V12}. Este oncogén hizo que los MEFs $p53^{ER/ER}$ tratados con 4-OHT entraran en senescencia, pero no tuvo ese efecto en MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados de la misma forma. En ausencia de 4-OHT las células $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$ infectadas adquirieron características de células transformadas: perdieron la inhibición por contacto y crecieron incluso en suspensión. Más aún, los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ infectados y tratados con 4-OHT también adquirieron estas características. Mediante Western blot se pudo comprobar el aumento en los niveles de Ras y ARF que experimentaron los MEFs infectados con retrovirus portadores del oncogén (figura 27).



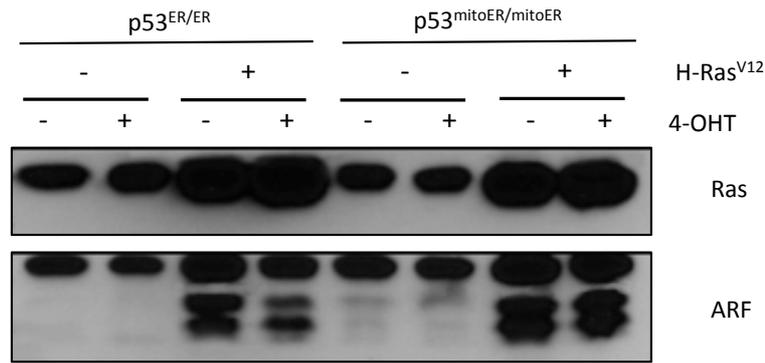


Figura 27: Senescencia inducida por Ras oncogénico. **Arriba:** Morfología y tinción SA- β -gal de MEFs $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$ infectados con H-Ras V12 en presencia o ausencia de 4-OHT. Se observa que, sin Ras oncogénico, todas las células son capaces de crecer y dividirse normalmente. En ausencia de 4-OHT los MEFs $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$ infectados con H-Ras V12 adquieren características de células transformadas, proliferando incluso en suspensión. Los MEFs $p53^{ER/ER}$ infectados con Ras oncogénico y tratados con 4-OHT entran en senescencia gracias a la acción de p53. En cambio, los MEFs $p53^{mitoER/mitoER}$ infectados y tratados con 4-OHT mantienen las características de célula transformada. **Abajo:** Análisis por Western blot de los niveles de Ras y ARF en MEFs $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados con 4-OHT o vehículo e infectados con virus portadores de Ras oncogénico o portadores del vector vacío.

4d. Los timocitos $p53^{mitoER/mitoER}$ no experimentan apoptosis tras ser sometidos a radiación gamma.

Los timocitos primarios sometidos a radiación gamma son un modelo clásico de apoptosis dependiente de p53 (Lowe, Schmitt *et al.* 1993). Se sabe que durante este proceso de apoptosis una fracción de p53 se localiza en la mitocondria (Mihara, Erster *et al.* 2003). Para estudiar la capacidad de la proteína p53mitoER de inducir apoptosis en timocitos irradiados se aislaron estas células a partir de ratones $p53^{mitoER/mitoER}$ y de ratones $p53^{ER/ER}$ y se trataron con 4-OHT o con vehículo. Se sometieron a radiación gamma y se tiñeron con Anexina V y 7AAD a distintos tiempos tras el daño. El análisis por citometría de flujo mostró que los timocitos $p53^{ER/ER}$ tratados con 4-OHT e irradiados iniciaron la apoptosis pocas horas después de la irradiación, mientras que los timocitos $p53^{ER/ER}$ no irradiados o tratados con vehículo mostraron unos niveles de apoptosis mucho más bajos. Por el contrario, los timocitos $p53^{mitoER/mitoER}$, independientemente del tratamiento, presentaron porcentajes de células Anexina V + muy inferiores, similares a los observados en los timocitos $p53^{ER/ER}$ sin daño en el DNA o tratados con vehículo, esto es, con una p53 no funcional (figura 28).

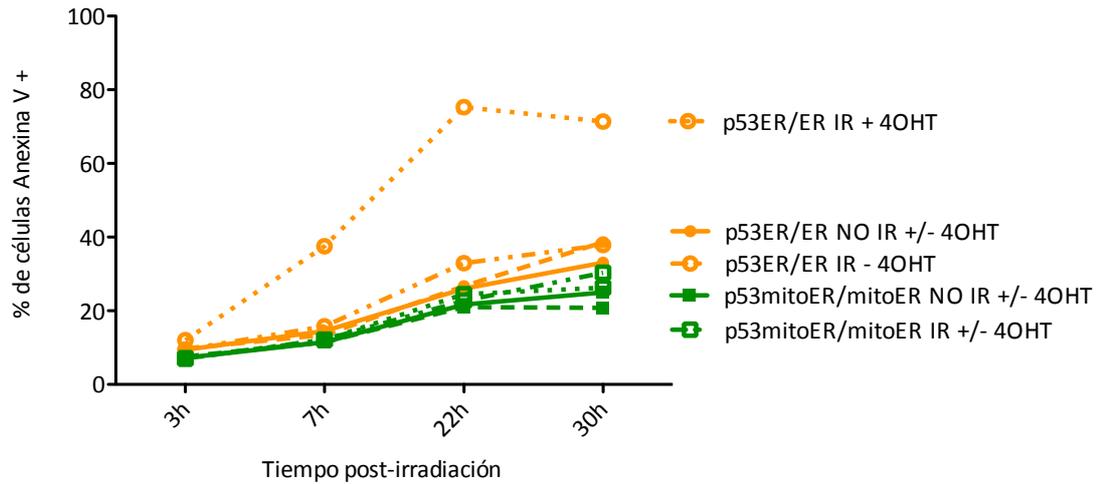


Figura 28: Apoptosis de timocitos primarios sometidos a radiación gamma. Representación gráfica del porcentaje de células Annexina V + en los diferentes tiempos tras la irradiación. Resultado de un experimento representativo (n=3).

4e. La radiación gamma no desencadena la muerte por necrosis en timocitos $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$.

Durante el proceso de necrosis las células liberan pasivamente la proteína HMGB1, que es un mediador de la inflamación. Como esta proteína no es liberada por células apoptóticas, la detección de HMGB1 en el medio extracelular sirve como medida de los niveles de necrosis en células en cultivo (Klune, Dhupar *et al.* 2008). Para comprobar si los timocitos primarios irradiados experimentaban muerte por necrosis además de por apoptosis, se realizó un Western blot de una alícuota del medio en el que habían sido cultivadas las células. Se observó que los timocitos $p53^{\text{ER/ER}}$ liberan HMGB1 progresivamente tras la irradiación, y que la cantidad de proteína liberada es mayor en los timocitos tratados con 4-OHT e irradiados. En cambio, en los timocitos $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ la liberación de HMGB1 es más lenta y no parece depender del tratamiento con 4-OHT ni del daño en el DNA recibido (figura 29).

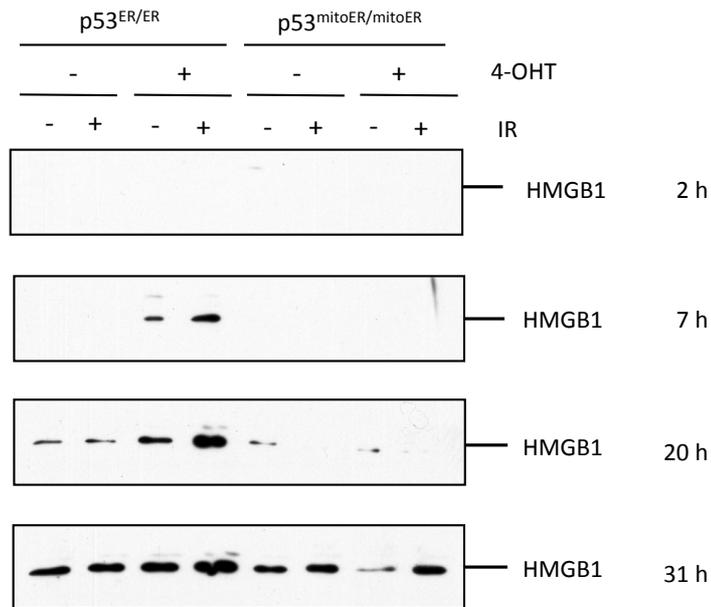


Figura 29: Detección por Western blot de la proteína HMGB1 liberada por timocitos tratados con 4-OHT o vehículo e irradiados con 3Gy de radiación gamma o no irradiados. A la derecha se indica el tiempo transcurrido tras la irradiación.

4f. La proteína p53mitoER no induce necrosis en MEFs tratados con H₂O₂.

Para determinar si la proteína p53mitoER puede desencadenar la necrosis en situación de estrés oxidativo se trataron MEFs con H₂O₂ y con 4-OHT o vehículo y se determinó la liberación al medio extracelular de la proteína HMGB1 mediante Western blot, a partir del medio en el que estaban cultivados los MEFs. Se observa que los MEFs p53^{ER/ER} y p53^{wt/wt} liberan HMGB1 en tal cantidad que dejan de apreciarse diferencias al cabo de pocos minutos de tratamiento con H₂O₂. En comparación, los MEFs p53^{mitoER/mitoER} secretan HMGB1 de forma más tardía y en menor cantidad (figura 30).

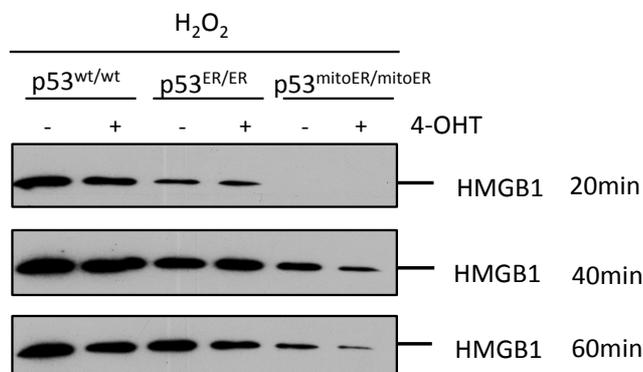


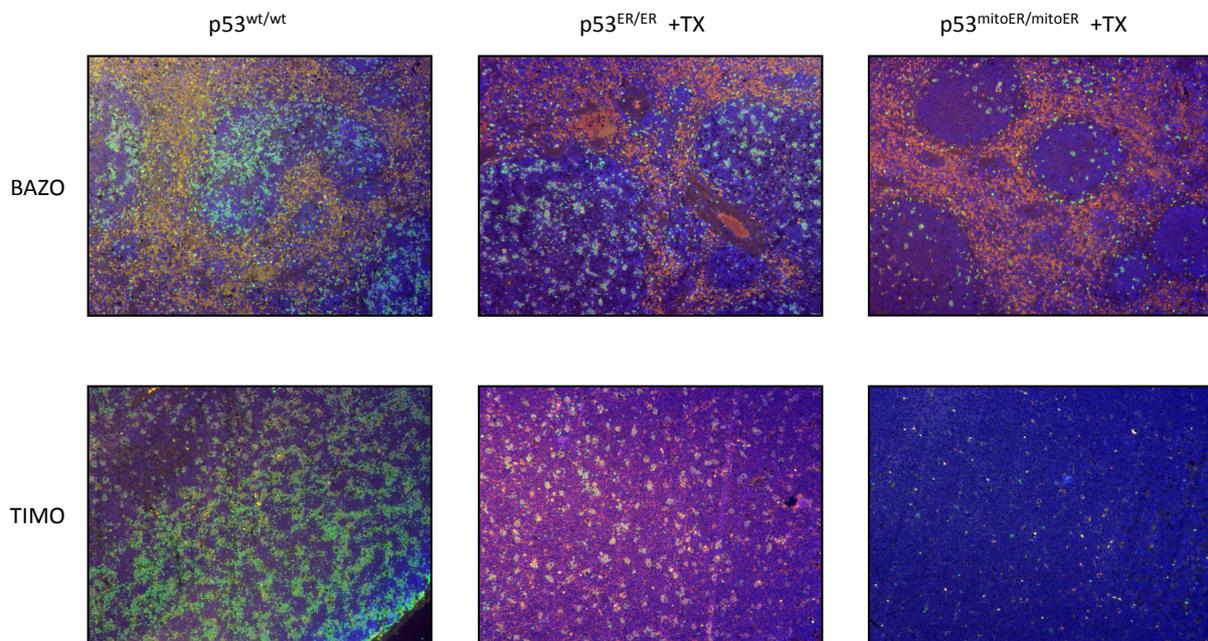
Figura 30: Detección por Western blot de la HMGB1 liberada al medio por MEFs tratados con H₂O₂ (0.5mM) en presencia de 4-OHT o vehículo. A la derecha se indica la duración del tratamiento con H₂O₂.

5. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA p53mitoER *IN VIVO*.

5a. Los tejidos radiosensibles de los ratones p53^{mitoER/mitoER} sometidos a radiación gamma no experimentan apoptosis.

La proteína p53 es la responsable de inducir apoptosis en los tejidos radiosensibles del ratón como respuesta al daño en el DNA ocasionado por la radiación ionizante. Así, los ratones p53^{-/-} son resistentes a radiación gamma ya que sus tejidos no sufren apoptosis. Tal y como se comprobó en el trabajo de caracterización del modelo p53ER (Christophorou, Martin-Zanca *et al.* 2005), los ratones p53^{ER/ER} irradiados sólo experimentan apoptosis en sus tejidos radiosensibles si previamente han sido tratados con tamoxifén, esto es, si tienen una p53 funcional. Los ratones p53^{ER/ER} tratados con vehículo, por el contrario, se comportan de forma similar a los p53^{-/-}.

Para estudiar la capacidad de la proteína p53mitoER de inducir apoptosis *in vivo*, ratones p53^{mitoER/mitoER} y p53^{ER/ER} fueron tratados con tamoxifén durante dos días y posteriormente se sometieron a radiación gamma. Al mismo tiempo, se aplicó la misma dosis de radiación a ratones p53^{wt/wt}. Los tejidos radiosensibles se fijaron y se realizó la tinción TUNEL. Se vio que los niveles de apoptosis en los órganos radiosensibles de los ratones p53^{mitoER/mitoER} irradiados y tratados con tamoxifén son inferiores a los que presentan los ratones p53^{ER/ER} tratados de la misma manera y los ratones p53^{wt/wt} (figura 31).



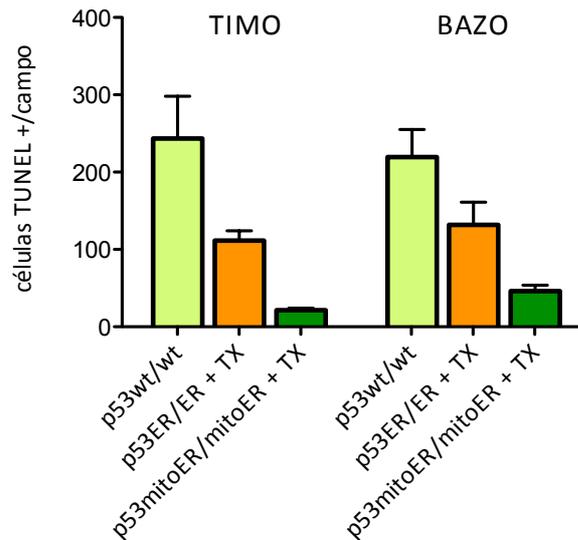


Figura 31: Apoptosis en tejidos radiosensibles de ratones irradiados. **Arriba:** Microfotografías representativas del bazo y el timo de un ratón $p53^{wt/wt}$, uno $p53^{ER/ER}$ y uno $p53^{mitoER/mitoER}$ (63X). A los dos últimos se les había administrado intraperitonealmente 1mg/día de tamoxifén durante dos días. A continuación, los tres ratones fueron irradiados con 3Gy de radiación gamma, Verde: células apoptóticas. Azul: núcleos celulares. **Abajo:** Recuento del número de células TUNEL+ por cada campo (n=9 campos).

5b. El tratamiento con tamoxifén no tiene efecto sobre la vida media de los ratones $p53^{mitoER/mitoER}$, ni la de los ratones $p53^{wt/mitoER}$.

Con el objeto de comprobar el efecto de la restauración de la funcionalidad de la proteína $p53^{mitoER}$ en la supervivencia de los ratones, se inyectó tamoxifén o vehículo (aceite de cacahuete) por vía intraperitoneal a individuos de los tres genotipos y se realizó una curva de tipo Kaplan-Meier. Se comprobó que no hay diferencias significativas entre la vida media de los ratones $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados con tamoxifén (23.5 semanas) y los tratados con vehículo (23 semanas). De forma similar, los individuos $p53^{wt/mitoER}$ tratados con tamoxifén presentan una vida media semejante a los $p53^{wt/mitoER}$ tratados con vehículo (48 y 49 semanas, respectivamente). Tal y como se esperaba, el tamoxifén no afecta a la supervivencia de los ratones $p53^{wt/wt}$ (los tratados con tamoxifén tienen una vida media de 82 semanas y los tratados con vehículo, de 85 semanas) (figura 32).

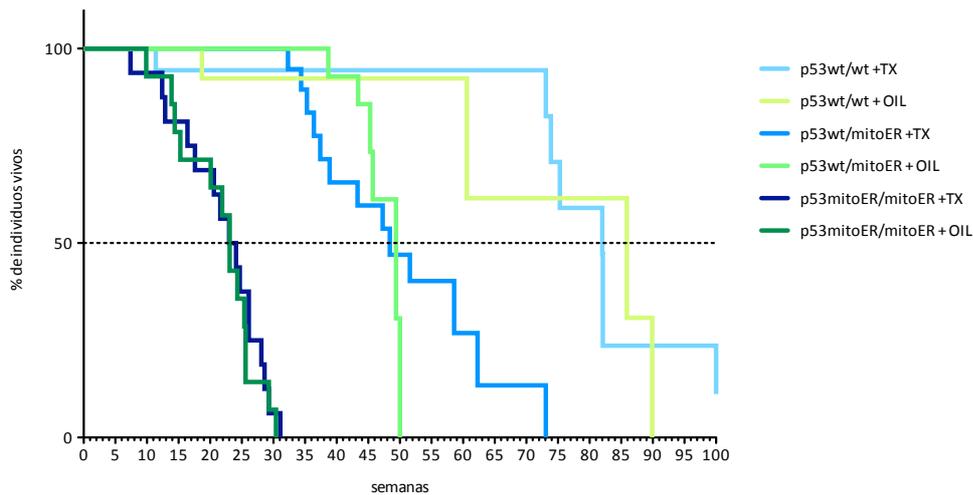


Figura 32: Supervivencia de los ratones de la colonia p53mitoER tratados con 1mg de tamoxifén al día durante 7 días seguidos o con 100 μ l de vehículo al día durante 7 días seguidos. p53^{wt/wt} +TX, n=18. p53^{wt/wt} +OIL, n=13. p53^{wt/mitoER} +TX, n= 19. p53^{wt/mitoER} +OIL, n= 18. p53^{mitoER/mitoER} +TX, n= 16. p53^{mitoER/mitoER} +OIL, n= 14.

5c. El análisis macroscópico de los órganos de los ratones p53^{mitoER/mitoER} tratados con tamoxifén muestra la misma tendencia al desarrollo de sarcomas e hiperplasia del timo que los ratones p53^{mitoER/mitoER} no tratados.

Algunos de los animales tratados con tamoxifén o con aceite se seleccionaron para el estudio histológico y se sacrificaron cuando presentaban signos de deterioro o enfermedad avanzada. El análisis macroscópico de los tejidos reveló que el fenotipo tumoral de los ratones p53^{mitoER/mitoER} tratados con tamoxifén es similar al de los ratones del mismo genotipo tratados con vehículo o no tratados (figura 22).

5d. El análisis anatomopatológico de los tejidos de los ratones p53^{mitoER/mitoER} tratados con tamoxifén muestra la presencia de sarcomas y linfomas similares a los encontrados en los ratones p53^{mitoER/mitoER} no tratados.

Los ratones p53^{mitoER/mitoER} tratados con tamoxifén desarrollaron linfomas de alto grado en el 50% de los casos, la mayoría originados en el timo, el 60% de los cuales invadía otros tejidos. Por otra parte, el 44% de los ratones p53^{mitoER/mitoER} tratados con tamoxifén presentó sarcomas pleomórficos, de los cuales el 40% habían metastatizado en el momento del sacrificio del animal (figura 33).

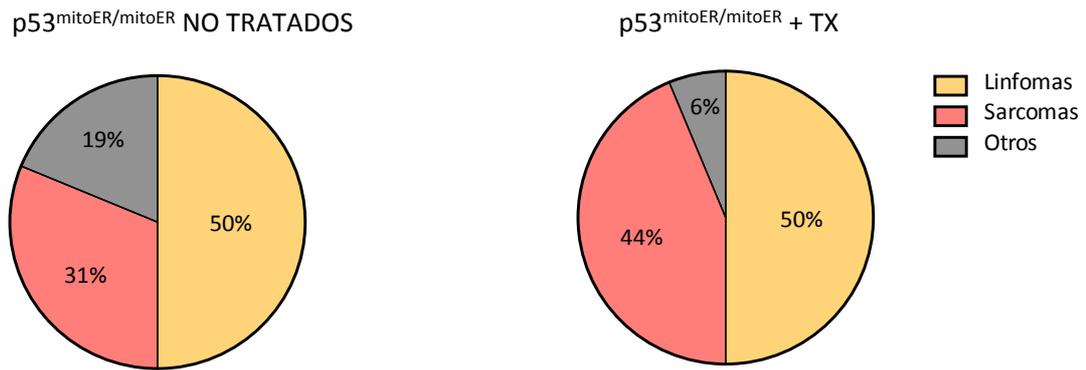


Figura 33: Frecuencia de aparición de las distintas neoplasias en ratones $p53^{mitoER/mitoER}$ tratados con tamoxifén y sacrificados ante signos visibles de enfermedad o deterioro. No tratados: $n=16$. Tratados con tamoxifén: $n=16$.

5e. El tratamiento con tamoxifén no tiene efecto sobre la vida media de los ratones $p53^{mitoER/mitoER}$ portadores del oncogén p210BCR-ABL.

Como se ha descrito antes, los ratones $p53^{mitoER/mitoER}$ son una fenocopia de los ratones $p53^{-/-}$ en condiciones basales, ya que, igual que ellos, desarrollan tumores espontáneos y de un origen similar a temprana edad. En vista de que la inyección de tamoxifén no parece suprimir la aparición de tumores espontáneos en los ratones $p53^{mitoER/mitoER}$, se decidió estudiar la funcionalidad de esta proteína en un contexto de estrés celular por expresión de un oncogén determinado, en este caso p210BCR-ABL ya que está demostrado que la restauración de la funcionalidad de la proteína p53ER alarga la supervivencia de los ratones $p53^{ER/ER}$ portadores de este oncogén (Velasco-Hernandez, Vicente-Duenas *et al.* 2013). Se generó una línea de ratones $p53^{mitoER}$ X Sca1-BCR-ABL-p210 mediante el cruce de un ratón portador del alelo $p53^{mitoER}$ con un ratón Sca1-BCR-ABL-p210, un modelo de Leucemia Mieloide Crónica humana generado expresando el oncogén p210BCR-ABL en las células Sca1+. Como resultado de este cruce se pretendía obtener un nuevo modelo murino que desarrollara esta enfermedad hematológica y poseyera una proteína p53 localizada en la mitocondria y regulable de forma reversible por 4-OHT.

Los seis genotipos posibles en este modelo son:

- $p53^{wt/wt}$
- $p53^{wt/wt}; BCR-ABL$
- $p53^{wt/mitoER}$
- $p53^{wt/mitoER}; BCR-ABL$
- $p53^{mitoER/mitoER}$
- $p53^{mitoER/mitoER}; BCR-ABL$

Se realizó una curva de tipo Kaplan-Meier con animales de los seis genotipos que habían muerto de forma natural. Se observa que la ausencia de función de p53 y la presencia del oncogén p210BCR-ABL tienen un efecto sinérgico sobre la mortalidad de los ratones. Así, los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$; BCR-ABL tienen una supervivencia menor (16.9 semanas) que los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ sin el oncogén (26.5 semanas) y los ratones $p53^{\text{wt/wt}}$; BCR-ABL (51 semanas). Los ratones $p53^{\text{wt/mitoER}}$; BCR-ABL también tienen una vida media más corta (39.7 semanas) que los individuos $p53^{\text{wt/mitoER}}$ que no portan el oncogén (68.4 semanas) (figura 34).

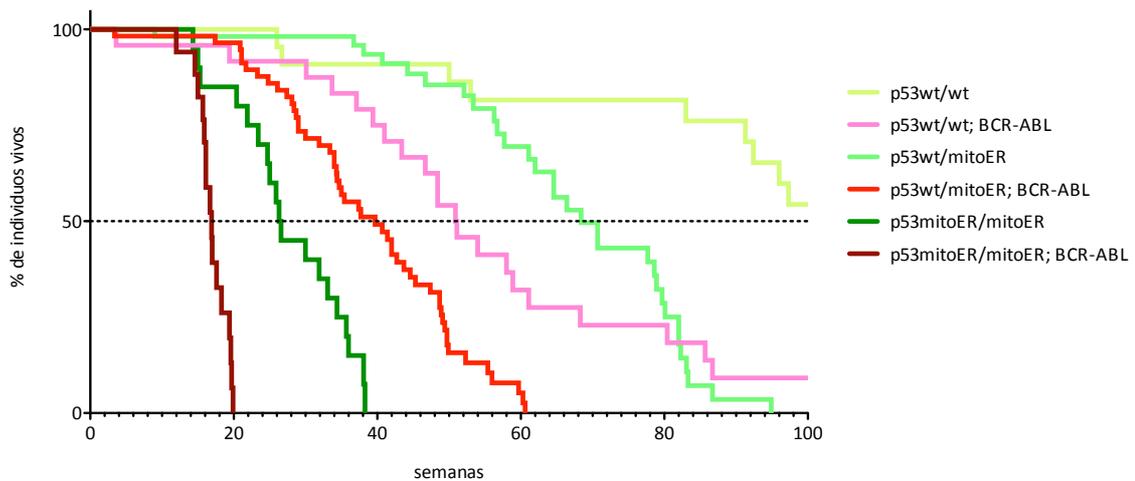


Figura 34: Supervivencia de los ratones de la colonia $p53^{\text{mitoER}}$ X $Sca1$ -BCR-ABL- $p210$. Representación gráfica del porcentaje de individuos vivos de cada genotipo a lo largo del tiempo. $p53^{\text{wt/wt}}$, n=10. $p53^{\text{wt/wt}}$; BCR-ABL, n=21. $p53^{\text{wt/mitoER}}$, n=31. $p53^{\text{wt/mitoER}}$; BCR-ABL, n=51. $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$, n=19. $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$; BCR-ABL, n=16.

Para analizar si la restauración de la función de $p53^{\text{mitoER}}$ retrasaba el desarrollo de esta enfermedad en este modelo, se trataron con tamoxifén 5 ratones de cada uno de los genotipos que se indican en la figura 35 y se realizó una curva Kaplan-Meier. Aunque este estudio no ha concluido, los resultados preliminares parecen indicar que los ratones $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$; BCR-ABL tratados con tamoxifén tienen una vida media semejante a los ratones del mismo genotipo sin tratar.

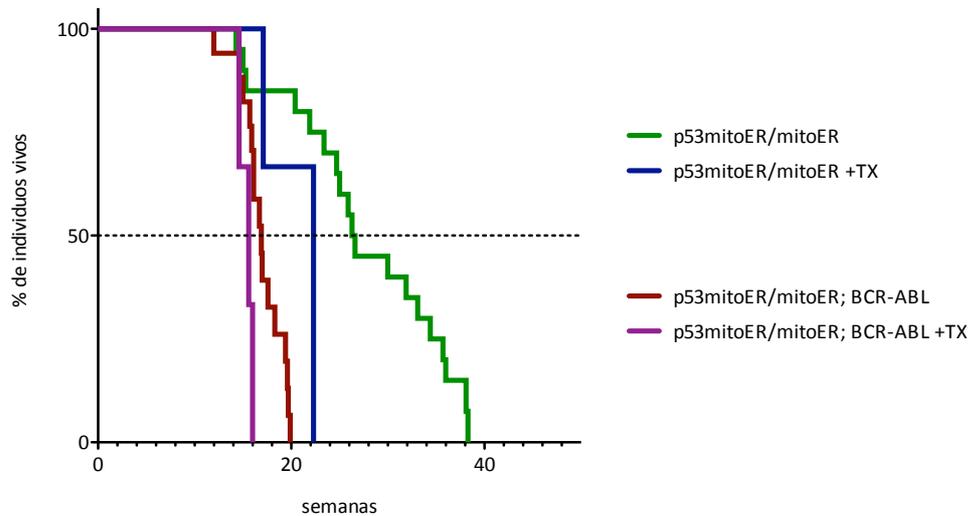


Figura 35: Supervivencia de los ratones de la colonia p53mitoER X Sca1-BCR-ABL-p210 tratados con 1mg de tamoxifén al día durante 7 días seguidos. Representación gráfica del porcentaje de individuos vivos a lo largo del tiempo. p53^{mitoER/mitoER} +TX, n=2. p53^{mitoER/mitoER}; BCR-ABL +TX, n=3.

6. EXPLORACIÓN DE LAS CAUSAS DE LA AUSENCIA DE ACTIVACIÓN DE p53mitoER.

Tal y como se esperaba, la proteína p53mitoER, al igual que la p53ER, no tiene actividad en ausencia de 4-OHT. No obstante, los resultados mostrados anteriormente parecen indicar que los tratamientos con 4-OHT *in vitro* y con tamoxifén *in vivo* no logran restaurar la funcionalidad de p53mitoER. Nos propusimos, por tanto, explorar las posibles causas por las que p53mitoER no es funcional en presencia de este estrógeno.

6a. El alelo p53^{mitoER} no presenta ninguna mutación en su secuencia codificante.

En primer lugar quisimos descartar la presencia de mutaciones en el alelo p53^{mitoER} que pudieran cambiar la secuencia de aminoácidos y alterar la funcionalidad de la proteína. Por tanto, secuenciamos los exones del alelo p53mitoER como se indica en Materiales y Métodos (tabla 1 y figura 36) y se observó que el alelo p53^{mitoER} no presenta mutaciones que alteren la secuencia primaria de la proteína.

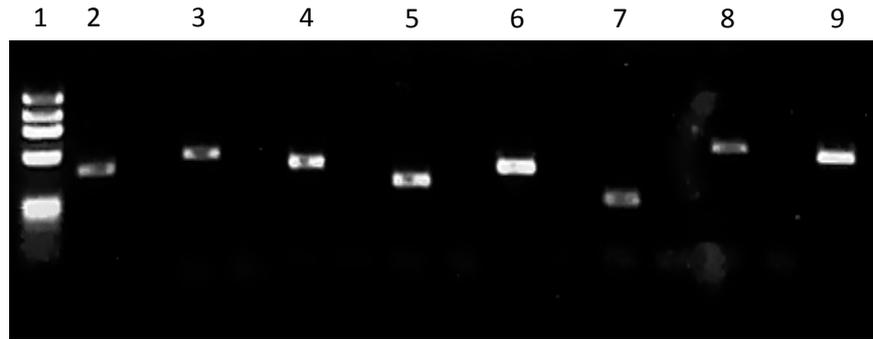


Figura 36: Amplificación de los exones codificantes del alelo p53mitoER. Una alícuota de cada reacción de amplificación se resolvió en gel de agarosa del 1.8%. **1:** Marcador de peso molecular ϕ 29 HaeIII. **2:** Fragmento correspondiente al exón 2. **3:** Fragmento correspondiente a los exones 3 y 4. **4:** Fragmento correspondiente a los exones 5 y 6. **5:** Fragmento correspondiente al exón 7. **6:** Fragmento correspondiente a los exones 8 y 9. **7:** Fragmento correspondiente al exón 10. **8:** Fragmento correspondiente a la región codificante del exón 11 y la región 5' de la secuencia codificante del ER. **9:** Fragmento correspondiente a la región 3' de la secuencia codificante del ER y a la región no codificante del exón 11.

6b. La proteína p53mitoER se asocia a chaperonas de forma distinta que la proteína p53ER.

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas de fusión con el dominio de unión a estrógenos ER están unidas a la chaperona Hsp90 en condiciones basales, esto las mantiene en un estado no funcional hasta que se suministra 4-OHT a la célula, o tamoxifén al animal, y el estrógeno sintético desplaza a la chaperona. Debido a la localización mitocondrial de la p53mitoER consideramos la posibilidad de que esta proteína no estuviera unida a la Hsp90 en condiciones basales, sino a una chaperona propia de este orgánulo.

Para confirmar esta hipótesis decidimos, en primer lugar, comprobar si la proteína p53mitoER se une a Hsp90 en condiciones basales. Se realizó una inmunoprecipitación de p53 a partir de lisados celulares postnucleares, en condiciones de bajo porcentaje de detergente para conservar las uniones proteína-proteína. Tras separar las proteínas inmunoprecipitadas en un gel de acrilamida, se observó que la chaperona Hsp90 coimmunoprecipita con p53ER en ausencia de 4-OHT, pero esta asociación desaparece en presencia de 4-OHT. Por el contrario, en los MEFs p53^{mitoER/mitoER} no se observa coimmunoprecipitación de Hsp90 con p53 en ningún caso (figura 37).

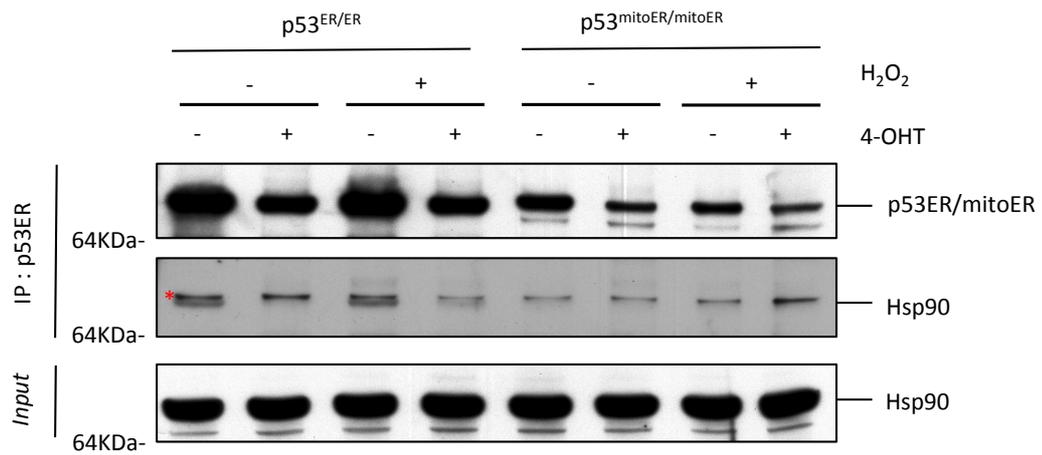


Figura 37: Estudio de la asociación entre p53ER, p53mitoER y Hsp90. p53ER está asociada a Hsp90 en condiciones basales, asociación que desaparece en presencia de 4-OHT. No se detecta interacción entre p53mitoER y Hsp90 en ninguna de las condiciones. IP: Inmunoprecipitación.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La proteína p53 ha sido objeto de estudio intensivo desde su descubrimiento hace más de treinta años. Casi desde el primer momento se observó que p53 modula la expresión génica, por lo que su actividad como factor de transcripción está bien documentada, si bien hoy en día nuevas investigaciones siguen contribuyendo a definir aún más su mecanismo de acción. En cambio, el descubrimiento de que p53 se transloca a la mitocondria es muy posterior, por lo que su acción directa en este orgánulo está mucho menos explorada. En la actualidad está establecido que una fracción de la p53 celular se dirige a la mitocondria como consecuencia de determinados tipos de estrés y provoca la muerte de la célula, bien sea por apoptosis o por necrosis. Tras daño en el DNA, por ejemplo, p53 inicia la apoptosis por la vía intrínseca desde la membrana mitocondrial externa, donde interacciona con diferentes proteínas de la familia Bcl-2 y provoca la permeabilización de esta membrana y la salida de factores proapoptóticos al citoplasma (Wolff, Erster *et al.* 2008). Por otra parte, cuando la célula recibe otros tipos de daño, como el estrés oxidativo, p53 se transloca a la matriz mitocondrial y se une a la Ciclofilina D, lo que desencadena la apertura del Poro de Transición de la Permeabilidad mitocondrial, la pérdida del potencial de la membrana interna y la muerte de la célula por necrosis (Vaseva, Marchenko *et al.* 2012).

Pese a que en los últimos años se ha avanzado mucho en la investigación de la actividad mitocondrial de p53, todos los estudios que han posibilitado este avance han sido realizados en células en cultivo o en mitocondrias aisladas. Muchos de ellos, además, presentan inconvenientes obvios, como son la presencia de p53 en la mitocondria a unos niveles muy superiores a los fisiológicos o el uso de fármacos con efectos inespecíficos.

En este trabajo de tesis nos propusimos generar un modelo de ratón que permitiera estudiar las funciones mitocondriales de p53 *in vitro* e *in vivo* en ausencia de su función nuclear. Para asegurar unos niveles fisiológicos de p53 en la célula, la expresión del locus *Trp53* en este nuevo modelo debía estar regulada por su promotor natural. Además, la proteína p53 resultante debía estar dirigida a la mitocondria a la vez que excluida del núcleo, para que su acción transcripcional no se sumara a la acción mitocondrial. El nuevo modelo *knock-in* se generó reemplazando, mediante recombinación homóloga, el gen p53 endógeno por el alelo p53^{mitoER}. Este alelo codifica una proteína, p53mitoER, que posee el péptido señal de la ornitín transcarbamilasa en el extremo amino y, en el extremo carboxilo, el dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos modificado. Las proteínas de fusión con dicho dominio son regulables por 4-OHT, de forma que su actividad se puede “encender” y “apagar” reversiblemente en presencia o ausencia de esta hormona.

Hemos generado una colonia de ratones p53mitoER de los tres genotipos posibles: p53^{wt/wt}, p53^{wt/mitoER} y p53^{mitoER/mitoER}.

Para validar el modelo, en primer lugar comprobamos la presencia de p53mitoER en las mitocondrias utilizando microscopía confocal e inmunofluorescencia, así como fraccionamientos celulares. A continuación, corroboramos que la radiación gamma activa la

respuesta transcripcional de p53ER y no la de p53mitoER, este resultado indicó que esta última no es capaz de ejercer como factor de transcripción.

La proteína de fusión p53mitoER, además de estar localizada en la mitocondria y no tener función transcripcional, debe ser regulable por 4-OHT, lo que significa que en estado basal es inactiva y se vuelve funcional cuando se suministra tamoxifén a los ratones o 4-OHT a los cultivos celulares. Estudiamos la supervivencia de los ratones que no habían sido tratados con tamoxifén y observamos que los homocigóticos p53^{mitoER/mitoER} tienen una vida media similar a los ratones p53^{-/-} descritos por Jacks (Jacks, Remington *et al.* 1994), y mucho más corta que los p53^{wt/wt}, lo cual es coherente con la carencia de una p53 funcional. La vida media de los heterocigóticos p53^{wt/mitoER} es mucho más larga que la de los p53^{mitoER/mitoER}, indicando que la proteína p53mitoER no actúa como dominante negativa sobre la p53wt. A la vez, la vida media de los heterocigóticos es más corta que la de los p53^{wt/wt}, posiblemente porque los primeros sólo tienen una copia funcional de *Trp53*. La mortalidad temprana de los ratones p53^{mitoER/mitoER} se debe al desarrollo precoz de tumores, cuyo espectro es similar al de los p53^{-/-}, esta observación también es acorde con la falta de función de p53mitoER en condiciones basales.

A continuación, analizamos los efectos de la activación de la proteína p53mitoER sobre la supervivencia y el ciclo celular. Tal y como se ha explicado en la introducción, el 4-OHT provoca un cambio conformacional en la proteína p53ER que “enciende” su funcionalidad, de modo que p53ER es competente para actuar, pero para activarse debe ocurrir un daño o estrés celular. Se esperaba que la actividad de p53mitoER estuviese regulada del mismo modo, por lo que se sometieron a distintos tipos de estrés a las células p53^{mitoER/mitoER} tratadas con 4-OHT.

En determinadas circunstancias, la activación de p53 induce parada en el ciclo celular, bien sea temporal o irreversible. El estrés por pases seriados, el tratamiento con Nutlin-3a y la sobreexpresión del oncogén H-Ras^{V12} provocaron parada en el ciclo celular y senescencia en los MEFs p53^{ER/ER} tratados con 4-OHT, pero no en los MEFs p53^{mitoER/mitoER}. Estas respuestas en las células p53^{ER/ER} estuvieron acompañadas de un aumento en los niveles de p21 y/o Mdm2, algo que no sucedió en las p53^{mitoER/mitoER}. Estos resultados sugieren que la falta de respuesta de los MEFs p53^{mitoER/mitoER} tratados con 4-OHT se debe a que la proteína p53mitoER carece de actividad transactivadora.

A la vista de los resultados anteriores nos propusimos estudiar otras actividades de p53, como la capacidad de inducir muerte celular. Está establecido que los timocitos primarios en cultivo sometidos a radiación ionizante sufren una apoptosis que depende de p53 y es concomitante con el transporte de ésta a la mitocondria (Lowe, Schmitt *et al.* 1993), (Mihara, Erster *et al.* 2003). Mientras que los timocitos p53^{ER/ER} tratados con 4-OHT sufrieron muerte por apoptosis y necrosis tras la irradiación, los p53^{mitoER/mitoER} conservaron la viabilidad. Por otra parte, el estrés oxidativo induce la translocación de p53 a la matriz mitocondrial y desencadena la necrosis (Vaseva, Marchenko *et al.* 2012); sin embargo, los MEFs p53^{mitoER/mitoER} tratados con H₂O₂ no sufrieron muerte por necrosis en presencia de 4-OHT. Para comprobar la capacidad de p53mitoER de inducir muerte celular *in vivo*, irradiamos ratones tratados con tamoxifén y cuantificamos los niveles de apoptosis en los órganos radiosensibles. Los ratones p53^{mitoER/mitoER} presentaron niveles de apoptosis muy inferiores a los ratones p53^{ER/ER} o p53^{wt/wt}, lo que nos llevó a pensar que el tamoxifén no había logrado “encender” la funcionalidad de la

proteína p53mitoER. Los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que la proteína p53mitoER no es capaz de inducir la muerte celular en situaciones en las que, por el tipo celular y el tipo de estrés aplicado, esperábamos activar la acción mitocondrial de p53.

A continuación, nos propusimos caracterizar con mayor detalle la función supresora de tumores de p53mitoER *in vivo*. Tratamos con tamoxifén a ratones p53^{mitoER/mitoER}, que desarrollan tumores espontáneos a temprana edad. El tamoxifén no alargó la vida de estos ratones y el tipo y la agresividad de los tumores desarrollados permanecieron inalterados. También inyectamos tamoxifén a ratones p53^{mitoER/mitoER} portadores del oncogén p210BCR-ABL, causante de Leucemia Mieloide Crónica. Trabajos previos en nuestro laboratorio habían demostrado que el tratamiento con tamoxifén alarga la vida de los ratones p53^{ER/ER}; BCR-ABL y retrasa el progreso de la enfermedad (Velasco-Hernandez, Vicente-Duenas *et al.* 2013), por lo que consideramos que el modelo p53mitoER X Sca1-BCR-ABL-p210 sería de utilidad para despejar dudas acerca de la funcionalidad de p53mitoER. Los ratones p53^{mitoER/mitoER}; BCR-ABL tampoco experimentaron cambios en su vida media tras el tratamiento con tamoxifén. Estos resultados nos llevan a pensar que la proteína p53mitoER carece de función supresora de tumores, al menos frente a estos dos tipos de tumores.

La respuesta mediada por p53 depende en gran medida del tipo de daño recibido y del tipo de célula que lo recibe; en unas situaciones p53 actuará casi exclusivamente como factor de transcripción, mientras que en otras será de gran importancia su acción en la mitocondria. Durante el trabajo de caracterización del modelo p53mitoER hemos sometido a las células p53^{mitoER/mitoER} a varios tipos de daño que se sabe que inducen la translocación de p53 a la mitocondria y todos los resultados han revelado la ausencia de actividad de p53mitoER. Esta falta de respuesta, incluso con tipos de estrés que parecían los adecuados y en modelos celulares en los que se había testado la proteína de fusión p53ER, nos llevó a plantearnos que la proteína p53mitoER podía tener características que imposibilitaran su acción y que no habían sido previstas en el diseño del modelo.

Una posibilidad es que el alelo p53^{mitoER} haya sufrido mutaciones en la secuencia codificante que alteren la proteína. Se determinó la secuencia de los exones y del dominio ER y no se encontró ninguna mutación que originara un cambio de aminoácido.

Como se ha explicado en la introducción, la proteína p53ER está unida a Hsp90 en condiciones basales. Cuando se añade 4-OHT al cultivo celular o tamoxifén al ratón, este estrógeno desplaza a la chaperona y provoca un cambio conformacional de p53 que “enciende” su funcionalidad. Asumimos, en el momento de diseñar el modelo, que la proteína p53mitoER sería regulable del mismo modo que p53ER. No obstante, la reiterada ausencia de actividad de p53mitoER nos llevó a pensar que, por su localización subcelular, esta proteína podía no estar disponible para unirse a 4-OHT. Tal vez p53mitoER no está asociada a Hsp90 en condiciones basales, sino a alguna chaperona residente en la mitocondria. En experimentos de inmunoprecipitación a partir de extractos celulares postnucleares de MEFs p53^{ER/ER} y p53^{mitoER/mitoER} observamos que p53ER se asocia a Hsp90 en condiciones basales, pero no detectamos esta interacción con p53mitoER. Si p53mitoER estuviera asociada con una chaperona mitocondrial de estructura similar a Hsp90, la afinidad entre el dominio ER y la nueva chaperona podría ser diferente y cambiar la dinámica del desplazamiento mediado por

el 4-OHT. En el hipotético caso de que la unión entre p53mitoER y la chaperona mitocondrial fuera más estable, el 4-OHT podría no ser capaz de desplazarla y haría que p53mitoER se mantuviera en un estado no funcional. Otra posibilidad es que p53mitoER no esté accesible al 4-OHT por el hecho de que este estrógeno sintético no sea capaz de atravesar las membranas mitocondriales, en especial la membrana interna, cuya permeabilidad es mucho menor que la de la membrana externa. Actualmente, estamos diseñando experimentos que nos permitan esclarecer a qué chaperona se une la p53mitoER y si el 4-OHT desplaza esta unión.

Entre las diversas chaperonas mitocondriales, TRAP1 y mtHsp70 son candidatas a unirse a p53mitoER debido a su similitud con Hsp90 y a su abundancia. Si logramos determinar qué chaperona se une a p53mitoER, tal vez podamos encontrar el modo de romper esta interacción para “encender” por fin la funcionalidad de esta proteína y estudiar la importancia de la actividad mitocondrial de p53 *in vivo*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Hemos generado un modelo de ratón *knock-in*, p53mitoER^{TAM}, que expresa una proteína p53 dirigida a la mitocondria y potencialmente regulable por 4-hidroxitamoxifén.
2. La proteína p53mitoER se localiza en la mitocondria y carece de actividad transcripcional.
3. Los ratones homocigóticos p53^{mitoER/mitoER} no tratados son una fenocopia de los ratones p53^{-/-}, puesto que desarrollan tumores espontáneos a temprana edad, principalmente linfomas y sarcomas.
4. Las células p53^{mitoER/mitoER} tratadas con 4-OHT no experimentan parada en el ciclo celular, no entran en senescencia, y no mueren por apoptosis o necrosis, en respuesta a estímulos inductores de estas respuestas celulares.
5. La irradiación de ratones p53^{mitoER/mitoER} tratados previamente con tamoxifén no induce apoptosis en tejidos radiosensibles.
6. El tratamiento con tamoxifén de los ratones p53^{mitoER/mitoER} y de los ratones p53^{mitoER/mitoER}; BCR-ABL no retrasa la aparición de tumores espontáneos, ni de leucemia mieloide crónica, respectivamente.

CONCLUSIONS

1. We have generated a *knock-in* mouse model, p53mitoER^{TAM}, expressing a p53 protein which is directed to the mitochondria and potentially regulatable by 4-hydroxytamoxifen.
2. The p53mitoER protein is located in the mitochondria and lacks transcriptional activity.
3. Untreated p53^{mitoER/mitoER} mice are a phenocopy of p53^{-/-} mice, since they develop spontaneous tumors at early age, mainly lymphomas and sarcomas.
4. p53^{mitoER/mitoER} cells, when treated with 4-hydroxytamoxifen, do not undergo cell cycle arrest, senescence, apoptosis or necrosis, when exposed to the relevant stimuli.
5. Tamoxifen-treated p53^{mitoER/mitoER} mice do not undergo apoptosis in their radiosensitive tissues upon exposure to gamma irradiation.
6. Tamoxifen treatment does not delay spontaneous tumor development in p53^{mitoER/mitoER} mice, and does not delay Chronic Myeloid Leukemia development in p53^{mitoER/mitoER}; BCR-ABL mice.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

1a. Ratones modelo utilizados

Para realizar este trabajo se utilizaron los siguientes modelos de ratón:

- Ratones p53mitoERTAM^{KI}: linaje mixto C57BL/6 x 129/SvJ retrocruzados 8 veces con C57BL/6, generados en este trabajo de tesis.
- Ratones p53ERTAM^{KI}: linaje mixto C57BL/6 x 129/SvJ retrocruzados 8 veces con C57BL/6 (Christophorou, Martin-Zanca *et al.* 2005).
- Ratones Sca1-BCR-ABL-p210: linaje mixto CBA x C57BL/6J (Perez-Caro, Cobaleda *et al.* 2009). Proporcionados por el laboratorio del Dr. Isidro Sánchez-García (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca).
- Ratones CAG-FLPe: linaje puro C57BL/6 (Kanki, Suzuki *et al.* 2006).

Los ratones se mantuvieron en racks de jaulas ventiladas, a temperatura y humedad relativa constantes (20°C y 65%, respectivamente) y con agua y alimento *ad libitum* en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron sacrificados para la obtención de las muestras o ante la evidencia de sufrimiento de acuerdo con las *Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research*. Todas las manipulaciones a los ratones se realizaron de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Bioética y el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

A las 3 semanas de edad los ratones se separaron por sexos y se marcaron para su identificación. También se les cortó el extremo de la cola (aproximadamente 3mm) para la extracción de DNA, que se utilizó para el genotipado de los animales por PCR o por Southern Blot.

Las manipulaciones que se realizaron a los ratones fueron:

- Extracción de sangre del plexo mandibular.
- Inyección intraperitoneal.
- Radiación ionizante (5Gy) (GammaCell 1000 Elite, con fuente de ¹³⁷Cs).
- Sacrificio por dislocación cervical o asfixia con CO₂.

1b. Tratamientos de los ratones

Se les administró 1mg de tamoxifén al día durante 7 días consecutivos por inyección intraperitoneal. El tamoxifén utilizado para este fin se disolvió en aceite de cacahuete a una concentración de 10mg/ml con ayuda de un homogeneizador y se guardó a -20°C.

Como control, a otros ratones se les inyectaron 100µl de aceite de cacahuete al día durante 7 días consecutivos por vía intraperitoneal.

Tamoxifén	
100mg	Tamoxifén
10ml	Aceite de cacahuete

1c. Recogida de tejidos

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les realizó una necropsia junto con un análisis macroscópico de los órganos.

Las muestras se recogieron para dos fines diferentes:

a) Anatomía Patológica: Aproximadamente la mitad del cerebro, del timo, del corazón, del pulmón, del bazo, del páncreas, un trozo de hígado, un trozo de intestino, un riñón, un testículo/ovario y una rodilla se fijaron por inmersión durante 24h en formaldehído al 3.7% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol. La rodilla se descalcificó posteriormente por tratamiento con Osteosoft® (Millipore).

b) Obtención de DNA, RNA, proteína: Porciones similares de los órganos citados se congelaron con N₂ líquido y después se mantuvieron a -80°C.

Los tejidos fijados en formaldehído se incluyeron en bloques de parafina según el método estándar. Estos bloques fueron cortados con el microtomo en secciones de 3µm. Las secciones de los órganos se desparafinaron, rehidrataron y tiñeron con hematoxilina y eosina también según el protocolo estándar.

El diagnóstico anatómico-patológico fue realizado por Teresa Flores, Carolina Vicente-Dueñas, Óscar Blanco y María del Carmen García, según la clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2a. Extracción de DNA genómico

El DNA de los ratones se aisló a partir del extremo de la cola, que había sido recogido a las tres semanas de edad. El tejido se digirió en 700µl de *buffer* de lisis a 55°C durante 2-16h.

Buffer de lisis para extracción de DNA
85% Solución de Fornace
10mM EDTA pH 8
1% SDS
50µg/ml Proteínasa K

Solución de Fornace
8.56% Sacarosa
50mM Tris pH 8
25mM KCl
5mM MgCl ₂

A continuación, se añadieron 70µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 770µl de fenol (cuyo pH había sido previamente equilibrado mezclándolo, en proporción 5:1, con Tris-HCl 1M pH 8.5). Se mezclaron todos los componentes por inversión 100 veces y se centrifugaron a 13000xg durante 15min a 4°C para separar las fases orgánica y acuosa. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un volumen de cloroformo: isoamiloalcohol (24:1) (CIA). Después se centrifugó a 11000xg durante 10min a temperatura ambiente para separar de nuevo las fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se precipitó el DNA añadiendo un volumen de isopropanol frío. Se centrifugó a 13000xg durante 15min a 4°C y se lavó el *pellet* de DNA dos veces con etanol al 70%. Finalmente se dejó secar al aire y se resuspendió en 25-100µl de TE 0.1X durante al menos 12h a temperatura ambiente.

TE 0.1X
1mM Tris pH 8
0.1mM EDTA

2b. Genotipado de los ratones

2b. I. PCR del exón 2 de p53

Para la distinción del alelo p53^{wt} y el alelo p53^{mitoER}, la región amplificada fue el exón 2 del gen, ya que el alelo p53^{mitoER} posee en este exón la secuencia codificante de una señal de localización mitocondrial de la que el alelo p53^{wt} carece.

Para la reacción de amplificación se utilizaron como molde 50ng de DNA genómico, aproximadamente. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

- **intron1:** 5'- TTCTGTCTCCATGTTCTG -3'
- **intron2rev:** 5'- ACACCCAACACCATACCATG -3'

Se utilizó la enzima *SuperHot Taq* DNA polimerasa, que está acoplada a un anticuerpo que la mantiene inactiva hasta que se incubó a 94°C durante al menos 4min.

La mezcla de cada reacción de amplificación fue la siguiente:

0.6µl	DNA molde
2.5µl	Buffer 10X
0.375µl	MgCl ₂ 100mM
1µl	dNTPs 10mM
0.25µl	intron1 20µM
0.25µl	intron2rev 20µM
0.3µl	SuperHot Taq DNA polimerasa 5u/µl
19.725 µl	dH ₂ O

La reacción de amplificación se llevó a cabo según los siguientes pasos:

	Temperatura	Tiempo	
Activación de la enzima	94°C	4min	Amplificación (40 ciclos)
Desnaturalización	94°C	1min	
Anillamiento	59°C	1min	
Extensión	72°C	2min	
Extensión final	72°C	10min	

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Los fragmentos amplificados se resolvieron en gel de agarosa al 1.8% en tampón TAE.

TAE
40mM Tris-acetato pH 8
1mM EDTA

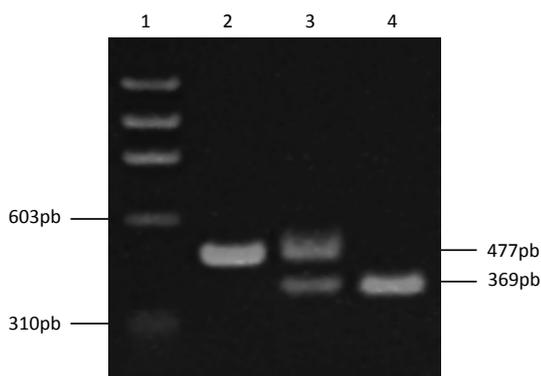


Figura 38: Fotografía de un gel de agarosa del 1.8% teñido con bromuro de etidio. El fragmento de 477pb corresponde al alelo p53^{mitoER} y el de 369pb, al alelo p53^{wt}. 1: Marcador de peso molecular ϕ X174 HaeIII. 2: Individuo p53^{mitoER/mitoER}. 3: Individuo p53^{wt/mitoER}. 4: Individuo p53^{wt/wt}.

2b. II. PCR del exón 11

Para la distinción del alelo p53^{wt} y el alelo p53^{ER} en los ratones de la línea p53ERTAM^{KI}, se amplificó el exón 11 (al que está fusionada la secuencia codificante del dominio ER) según el protocolo descrito en Christophorou *et al*, 2005.

Para la reacción de amplificación también se utilizaron como molde unos 50ng de DNA genómico y los oligonucleótidos siguientes:

- **intron10.1:** 5'-TGAGGGACAAGGTATGGTGTC-3'
- **904L:** 5'-AACCTAGAAGTAGGGGTG-3'
- **mer550rev:** 5'-TGGCACTCTCTTTGCCAGTTG-3'

La mezcla de cada reacción de amplificación fue la siguiente:

0.6µl	DNA molde
2.5µl	Buffer 10X
0.375µl	MgCl ₂ 100mM
1µl	dNTPs 10mM
0.25µl	intron10.1 20µM
0.25µl	904L 20µM
0.25µl	mer550rev 5.6µM
0.3µl	SuperHot Taq DNA polimerasa 5u/µl
19.475 µl	dH ₂ O

La reacción de amplificación se llevó a cabo según los siguientes pasos:

	Temperatura	Tiempo	
Activación de la enzima	94°C	4min	Amplificación (40 ciclos)
Desnaturalización	94°C	1min	
Anillamiento	55°C	1min	
Extensión	72°C	2min	
Extensión final	72°C	10min	

La reacción de amplificación y el análisis de los fragmentos amplificados se realizaron como en el caso anterior.

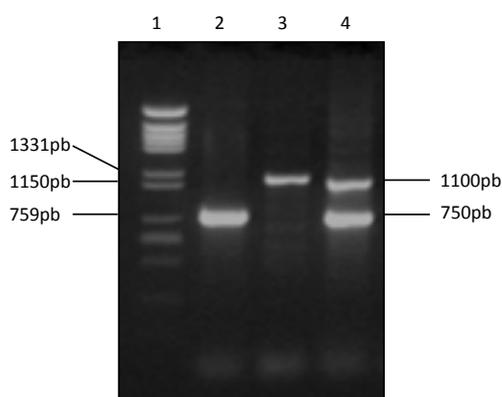


Figura 39: Fotografía de un gel de agarosa del 1.8% teñido con bromuro de etidio. El fragmento de 1100pb corresponde al alelo p53^{wt} y el de 750pb, al alelo p53^{ER}. 1: Marcador de peso molecular ϕ 29 HaeIII. 2: Individuo p53^{ER/ER}. 3: Individuo p53^{wt/ER}. 4: Individuo p53^{wt/wt}.

2b. III. Southern blot

Se utilizó la técnica del Southern blot para determinar el genotipo de las colonias de células ES seleccionadas y también para comprobar si el alelo $p53^{\text{mitoER}}$ estaba correctamente integrado en el genoma de los ratones fundadores del nuevo linaje. Posteriormente se realizó Southern blot de forma rutinaria para genotipar a los ratones, ya que con esta técnica se puede identificar qué ratones portan el transgén p210BCR-ABL y qué alelos de p53 poseen ($p53^{\text{wt}}$, $p53^{\text{ER}}$ o $p53^{\text{mitoER}}$).

Digestión, electroforesis y transferencia:

El DNA genómico de los ratones (entre 5 y 10µg) fue digerido con las enzimas EcoRV o BglII, durante aproximadamente 12h, a 37°C. Las mezclas de las reacciones de digestión fueron las siguientes:

29.6 µl	dH ₂ O
7µl	Buffer R u O 10X
0.7µl	DTT 100mM
0.7µl	Espermidina 100mM
2µl	EcoRV o BglII 10u/µl
30µl	DNA

La electroforesis se realizó en geles de agarosa del 1% en TAE, durante 4h a 90V. A continuación, los geles se incubaron en tres volúmenes de solución desnaturalizante a RT durante al menos 1h.

Solución desnaturalizante	
1.5M	NaCl
0.5M	NaOH

Tras la desnaturalización, el DNA se transfirió del gel a una membrana de nylon cargada positivamente (*ImmobilonTM-Ny⁺*, Millipore) por capilaridad, utilizando solución desnaturalizante nueva. La transferencia se realizó durante al menos 12h a RT. Después la membrana se neutralizó con SSC 2X durante 5min, se dejó secar y se irradió con luz ultravioleta en un *Stratalinker* (Stratagene) para unir covalentemente el DNA a la membrana.

SSC 2X	
300mM	NaCl
30mM	Citrato sódico

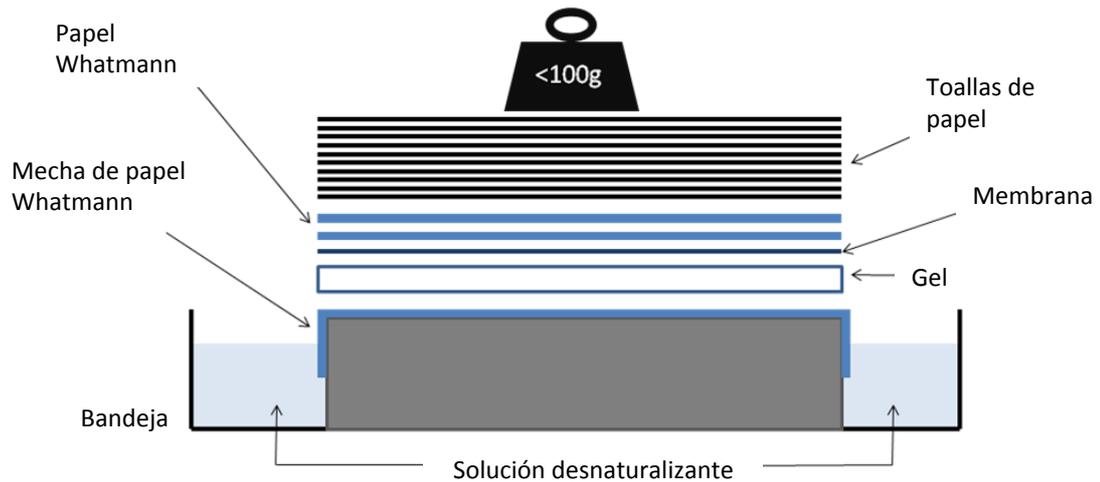


Figura 40: Esquema de la transferencia tipo puente para Southern blot.

Prehibridación:

La membrana con el DNA transferido y fijado se prehibridó al menos una hora a 65°C con *Buffer Church & Gilbert* (Church & Gilbert, 1984) con 150µg/ml de DNA de esperma de salmón (ssDNA), que previamente había sido desnaturalizado a 100°C durante 10min.

<i>Buffer Church & Gilbert</i>
1% BSA, Fracción V
1mM EDTA
0.5M Tampón fosfato pH 7.1-7.2
7% SDS

Sondas utilizadas:

La sonda utilizada para reconocer la región 5' del gen p53 fue un fragmento de DNA de 977pb correspondiente a dicha región (figura 14). Este fragmento se obtuvo mediante PCR a partir del plásmido pDT-2, que contiene la región 5' de p53 y fue cedido por Allan Bradley, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

- **p53 5':** 5'-ATCGTACTTACCACTTGCAAC-3'
- **p53 5'rev:** 5'-AGTTCAGACTACAACCTCCAG-3'

La mezcla de reacción de amplificación (25µl) fue la siguiente:

2ng	Plásmido pDT-2
2.5µl	Buffer 10X
0.375µl	MgCl ₂ 100mM
1µl	dNTPs 10mM
0.25µl	p53 5' 20µM
0.25µl	p53 5'rev 20µM
0.3µl	SuperHot Taq DNA polimerasa 5u/µl

La reacción fue llevada a cabo en el termociclador antes mencionado, según los siguientes pasos:

	Temperatura	Tiempo	
Activación de la enzima	94°C	4min	Amplificación (40 ciclos)
Desnaturalización	94°C	1min	
Anillamiento	59°C	1min	
Extensión	72°C	2min	
Extensión final	72°C	10min	

El fragmento amplificado se resolvió en gel de agarosa al 1.2% en tampón TAE y se purificó con el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

La sonda utilizada para reconocer la región 3' del gen *Trp53* es un fragmento *SacI* de 800pb del plásmido pDM136, que contiene un inserto *HindIII-BamHI* de 3.5Kpb que incluye los exones 7 a 11 de *Trp53* en el vector pSP72.

Para reconocer el transgén BCR-ABL (y también el gen *Abl* endógeno) se utilizó como sonda un fragmento *Bsu36I* de 836pb del plásmido E1A2 (proporcionado por el laboratorio del Dr. Isidro Sánchez-García, Centro de Investigación del Cáncer). Este plásmido contiene el cDNA de p190BCR-ABL en el vector pCD1a.

Para la purificación de las sondas, el plásmido pDM136 fue digerido con la enzima *SacI* y el plásmido E1A2 fue digerido con *Bsu36I*. Las reacciones de digestión fueron las siguientes:

30µl	Buffer J o E 10X
3µl	DTT 100mM
3µl	BSA 100mM
5µl	<i>SacI</i> o <i>Bsu36I</i> (10u/µl)
20-25µg	Plásmido pDM136 o E1A2
Hasta 300µl	dH ₂ O

Los productos de cada digestión se separaron por tamaño en gel de agarosa al 1.5% y los fragmentos de 800pb y 836pb se purificaron con el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

Posteriormente, las sondas se marcaron radiactivamente con α -³²PdCTP mediante el método de *Random Priming*, siguiendo los pasos indicados a continuación:

20-40ng (max 12µl)	Sonda purificada
170ng (2µl)	Hexanucleótidos
5min a 100°C	
2min a 0°C	
2µl	<i>Buffer 2</i> 10X
3µl	Mix dNTPs (dATP, dTTP, dGTP) (0.5mM cada uno)
5µl (50µCi)	α - ³² PdCTP 3000Ci/mmol
0.8µl (4u)	DNA polimerasa Klenow exo-
30min a 37°C	
1µl	EDTA 0.5M pH 8
28µl	Tris 1M pH 8

Por último, las sondas marcadas se purificaron con las columnas *ilustra*TM *ProbeQuant*TM (GE Healthcare) para eliminar los nucleótidos no incorporados.

Hibridación y lavados:

Las membranas prehibridadas se incubaron durante 17-24h a 65°C en *Buffer* Church & Gilbert con 150µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y las sondas radiactivas desnaturalizadas.

A continuación, las membranas se lavaron 3 veces durante 30min con abundante volumen de solución de lavado, a 65°C.

Solución de lavado

0.1% SDS

0.1% SSC

Por último, se expuso una pantalla BAS-III (Fujifilm) colocándola frente a las membranas durante 24h y se obtuvo la imagen correspondiente a la señal radiactiva mediante el escaneo de la pantalla en un Personal Molecular Imager (BioRad).

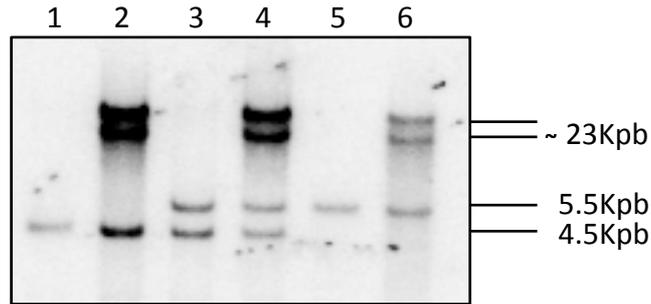


Figura 41: Determinación del genotipo de los ratones mediante Southern blot. DNA genómico digerido con la enzima EcoRV. Imagen obtenida con Personal Molecular Imager. 1: Individuo $p53^{wt/wt}$. 2: Individuo $p53^{wt/wt}$; BCR-ABL. 3: Individuo $p53^{wt/mitoER}$. 4: Individuo $p53^{wt/mitoER}$; BCR-ABL. 5: Individuo $p53^{mitoER/mitoER}$. 6: Individuo $p53^{mitoER/mitoER}$; BCR-ABL.

Stripping:

Para hibridar la membrana con una segunda sonda es necesario eliminar la sonda anterior. Esto se consigue mediante el proceso de *Stripping*. En primer lugar, se sumergió la membrana en 100ml de NaOH 100mM, durante 20-30min a RT. En segundo lugar, la membrana se lavó con abundante dH_2O . A continuación, se neutralizó el pH con 100ml de SSC 2X durante 5min y se lavó de nuevo con dH_2O . Por último, la membrana se prehibridó e hibridó tal como se describe anteriormente.

2c. Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el “método de un solo paso” (Chomczynski & Sacchi, 1987). Según este método, las células se lisan con una solución de tiocianato de guanidina.

Buffer de lisis para extracción de RNA

4M Tiocianato de guanidina
100mM Tris pH 7
0.5% Sarcosyl
0.1M β -Mercaptoetanol

Después de la lisis, se homogeneizó la muestra con la pipeta P1000. A continuación, se añadió una décima parte del volumen de acetato de sodio 2M pH 4, un volumen de fenol (neutralizado con Tris-HCl como se describe anteriormente) y una décima parte del volumen final de cloroformo: isoamiloalcohol (24:1). En estas condiciones de pH, el DNA de alto peso molecular no es soluble en la fase acuosa, mientras que el RNA sí lo es. Tras agitar durante 1min, se incubó 15min en hielo, se centrifugó 15min a $4^{\circ}C$, se

separó la fase acuosa y se le añadió un volumen de isopropanol frío. Se precipitó el RNA 1 hora a -20°C y se volvió a centrifugar 15min a 4°C . El *pellet* de RNA se lavó dos veces con etanol al 70% en H_2O tratada con DEPC, se dejó secar y finalmente se resuspendió en H_2O tratada con DEPC.

2d. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica que permite determinar la cantidad de un RNA mensajero concreto en una muestra, previa conversión a cDNA. La cantidad de mRNA se puede dar en valores absolutos o en valores relativos a un mRNA presente en todas las muestras y cuya cantidad no varía en las diferentes condiciones del experimento. Este RNA de referencia suele ser el RNA ribosómico, o el mRNA de los llamados genes *housekeeping*.

En primer lugar, el mRNA extraído de las muestras es convertido a cDNA en una reacción catalizada por la enzima retrotranscriptasa. En segundo lugar, se lleva a cabo la qPCR utilizando como molde el cDNA. En la reacción de qPCR se incluyen los oligonucleótidos específicos de cada secuencia a amplificar, además de una sonda TaqMan[®]. Esta sonda está unida en su extremo 5' a un fluorocromo *reporter* y en su extremo 3', a la proteína MGB (*Minor Groove Binder*) más un *quencher* no fluorescente (NFQ). Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre el *quencher* y el fluorocromo hace que este último no emita fluorescencia.

La polimerasa inicia la extensión a partir de cada uno de los oligonucleótidos y, cuando llega a la sonda, anillada al molde, la digiere con su actividad 5' exonucleasa. Esto hace que el fluorocromo se separe del *quencher* y emita fluorescencia, que es detectada por una cámara CCD. Esta emisión de fluorescencia ocurre en cada ciclo y es directamente proporcional al número de moléculas de DNA que se están sintetizando. Debido a las características de esta qPCR, las sondas anilladas inespecíficamente no emiten fluorescencia (porque la polimerasa no las digiere), a la vez que los productos amplificados inespecíficamente no se detectan (porque la sonda no se une a esas secuencias).

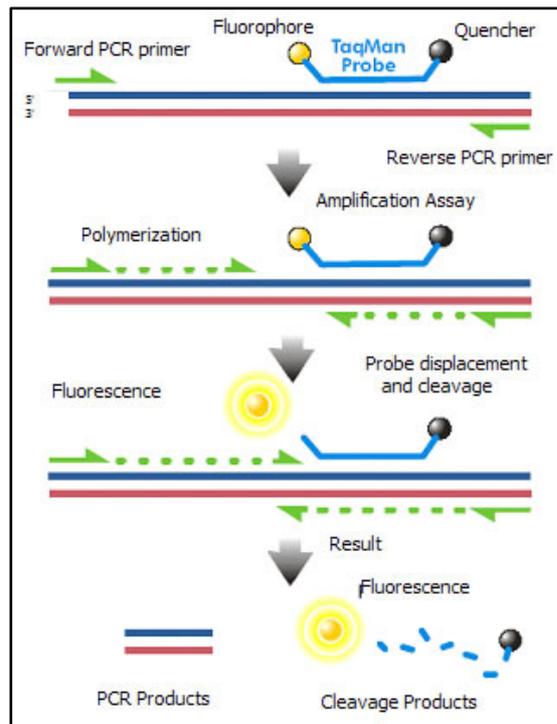


Figura 42: Técnica de PCR cuantitativa. Esquema del proceso de amplificación del cDNA y detección de la señal en la técnica de PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan® (adaptado de About TaqMan® Chemistry, Applied Biosystems).

El RNA de cada muestra se resuspendió en 15µl de H₂O tratada con DEPC y se cuantificó, en un espectrofotómetro (HITACHI U-2000). Para comprobar la integridad de estos RNAs se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

El cDNA se sintetizó a partir de 0.5µg de RNA total utilizando el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems). La mezcla de reacción fue la siguiente:

8µl	dH ₂ O tratada con DEPC
10µl	Buffer retrotranscriptasa 2X
1µl	Transcriptasa reversa 20X
1µl (0.5µg)	RNA

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) según el siguiente programa:

	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	37°C	60min
Inactivación de la enzima	95°C	5min
	4°C	Indefinido

Para las reacciones de qPCR se utilizaron los siguientes *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems):

- p53 (Mm01731287_m1)
- p21 (Mm00432448_m1)
- Mdm2 (Mm01233136_m1)
- Bax (Mm00432050_m1)
- Fas (Mm01204974_m1)
- Puma (Mm00519268_m1)
- Gusb (Mm01197698_m1), usado como control endógeno.

Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Las muestras de cDNA se llevaron hasta un volumen de 41µl con H₂O tratada con DEPC. La mezcla utilizada para cada reacción de qPCR (20µl) fue la siguiente:

7.5µl	dH ₂ O tratada con DEPC
10µl	<i>TaqMan® Gene Expression Mastermix 2X</i>
1µl	<i>TaqMan® Gene Expression Assays 20X</i>
1.5µl	cDNA

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron:

		Temperatura	Tiempo
Activación de la enzima		50°C	2min
		95°C	10min
Amplificación (40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	15s
	Anillamiento/Extensión	60°C	1min

Los datos se analizaron con el software SDS (Applied Biosystems). Los resultados fueron normalizados respecto de la expresión del control endógeno (Gusb) y las cantidades relativas de expresión se dieron en referencia a una muestra calibradora (el cDNA de los MEFs p53^{ER/ER} no irradiados y tratados con vehículo).

2e. Secuenciación

Para la secuenciación de los exones del alelo p53^{mitoER} se diseñaron 8 pares de oligonucleótidos de modo que los fragmentos amplificados a partir de estos 8 pares abarcaran toda la región codificante del gen. Las secuencias de los oligonucleótidos y los exones amplificados por cada par se indican en la tabla siguiente.

Exones amplificados	Tamaño	Oligonucleótidos
Exón 2	477pb	-intron1: 5'- TTCTGTCCTCCATGTTCTG -3' -intron2rev: 5'- ACACCCAACACCATACCATG -3'
Exones 3 y 4	571pb	-intron2p53: 5'-TGACTACATAGCAAGTTGGAGGC-3' -intron4p53rev: 5'-ACAGTCTACAGGCTGAAGAGG-3'
Exones 5 y 6	501pb	-intron4p53: 5'-TTGACACCTGATCGTTACTCGG-3' -intron6p53rev: 5'-AGTCAACATCAGTCTAGGCTGG-3'
Exón 7	379pb	-intron6p53: 5'-AGGTCACCTGTAGTGAGGTAGG-3' -intron7p53rev: 5'-CAGCCAAAGGTCCAGTTACAGG-3'
Exones 8 y 9	475pb	-intron7p53: 5'-TGGCTGCAGATATGACAAGAGG-3' -intron9p53rev: 5'- ATACATGCGAGAGACAGAGGC-3'
Exón 10	288pb	-intron9p53: 5'- AGTGGAGCCAGCTTAAGTTGG-3' -intron10p53rev: 5'-ACTACAAAGGCTGAGCTGGAG-3'
Exón 11 y ER	676pb	-intron10p53: 5'- TTCCAAGCCTTGATCAAGGAGG-3' -2329p53mitorev 5'-ACAACTCTTCACCCTGCAGG-3'
ER y exón 11	605pb	-2238p53mito: 5'-AAATGTGTGGAAGGCATGGTGG-3' -2843p53mitorev: 5'-AGTCATAAGACAGCAAGGAGAGG-3'

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los exones del gen p53^{mitoER}.

La mezcla de reacción de amplificación (25µl) fue la siguiente:

0.75µl	DNA genómico 30ng/µl
12.5µl	DNA AmpliTools Complex Master Mix 2X
0.25µl	Oligonucleótido <i>forward</i> 20µM
0.25µl	Oligonucleótido <i>reverse</i> 20µM
11.25µl	dH ₂ O

La reacción fue llevada a cabo en el Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems), siguiendo los siguientes pasos:

	Temperatura	Tiempo	
Activación de la enzima	94°C	4min	Amplificación (40 ciclos)
Desnaturalización	94°C	30s	
Anillamiento	51°C	30s	
Extensión	72°C	45s	

Los productos de las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa del 1.8% para comprobar que, en cada caso, se había amplificado un solo fragmento del tamaño esperado (figura 36).

Los productos de cada reacción de PCR se secuenciaron directamente utilizando los oligonucleótidos empleados en la amplificación. Los productos de PCR se purificaron con el *ISAP PCR cleanup kit*. Para ello, 10ng de la reacción de PCR se incubaron con 10

unidades de Exonucleasa I y con 2 unidades de fosfatasa alcalina de gamba a 37°C durante 5min; a continuación las enzimas se inactivaron a 80°C durante 10min.

A esta mezcla se le añadieron 3 picomoles de oligonucleótido (hasta completar 8µl de volumen final) y se secuenciaron utilizando el *Big Dye Terminator kit 3.1*, y un *genetic analyzer ABI 3100*.

2f. Western blot

La técnica del Western blot permite la detección de proteínas específicas en una muestra determinada. En primer lugar las proteínas presentes en la muestra se separan por tamaño mediante electroforesis en geles de acrilamida. Después se transfieren a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, que se incuba con anticuerpos que reconocen específicamente a las proteínas de interés. A continuación la membrana se incuba con un segundo anticuerpo, acoplado a HRP, que reconoce al primer anticuerpo. Por último, se obtiene una señal luminosa mediante la adición de los sustratos de la HRP, esta señal será recogida en una película autorradiográfica.

2f. I. Extracción de proteína:

La extracción de las proteínas se realizó lisando las células con el *buffer* RIPA suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.

<i>Buffer</i> RIPA (2X)
100mM Tris pH 8
300mM NaCl
2% NP40
1% DOC
0.2% SDS

Tras incubar la muestra en RIPA más inhibidores durante 20min en hielo y agitación, el lisado se transfirió a un tubo con *beads* de circonio (Precellys 24) y se rompió el DNA sometiendo a la muestra a dos ciclos de intensidad 5.5 y 30seg de duración en la FastPrep-24 (MP Biomedicals). A continuación, la muestra se centrifugó a 150xg durante 10min a 4°C. Se transfirió el lisado a un nuevo tubo y se centrifugó a 4°C y 21000xg durante 10min. Por último, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se almacenó a -80°C.

2f. II. Cuantificación de la proteína:

Se determinó la concentración de la proteína extraída utilizando el *DC Protein Assay* (BioRad), que es un método colorimétrico basado en el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951).

2f. III. Electroforesis y transferencia:

Para la electroforesis se utilizaron geles de gradiente del 4 al 12% de acrilamida (*NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels*, Life Technologies) y también geles de acrilamida al 10%, preparados de la siguiente manera:

<i>Running gel</i>	
1,7ml	Acrilamida 30%
1,25ml	Tris 1,5M pH 8,8 + 0,4% SDS
2ml	dH ₂ O
50µl	APS 10%
5µl	TEMED

<i>Stacking gel</i>	
0,65ml	Acrilamida 30%
1,25ml	Tris 0,5M pH 6,8 + 0,4% SDS
3ml	dH ₂ O
50µl	APS 10%
5µl	TEMED

El *buffer* utilizado para la electroforesis en geles de gradiente fue MOPS-SDS y *buffer* Tris-Glicina, en el caso de utilizar geles al 10%.

<i>Buffer MOPS-SDS 1X</i>
50mM MOPS
50mM Tris base
0,1% SDS
1mM EDTA

<i>Buffer Tris-Glicina 1X</i>
25mM Tris base
192mM Glicina

En cada carril se cargó un máximo de 35µg de proteína celular, o bien 45µl de medio extracelular clarificado. Las muestras se cargaron en los pocillos con un volumen adecuado de tampón de carga 6X.

Tampón de carga (6X)
300mM Tris HCl pH 6.8
12% SDS
60% Glicerol
600mM β-Mercaptoetanol
0.24% Azul de bromofenol

La electroforesis en geles de gradiente se realizó a 100V constantes durante 3h. La electroforesis en geles del 10% de acrilamida se realizó a 130V durante 1h 30min.

Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (*Immobilon P*, Millipore), previamente activada con metanol y dH₂O durante 15s y 2min, respectivamente. La transferencia se realizó según el “montaje húmedo” en tampón de transferencia, aplicando una corriente de 450mA constantes, durante 1h 30min y en hielo. Después, la membrana se tiñó con Rojo Ponceau, que tiñe inespecíficamente las proteínas y permite comprobar que se han transferido correctamente a la membrana.

Tampón de transferencia
25mM Tris base
192mM Glicina
20% Metanol

Rojo Ponceau
0,1% Rojo Ponceau
5% Ácido acético

2f. IV. Detección:

A continuación, la membrana se lavó con TBST y se bloqueó con TBST + 5% BSA (en caso de utilizar el anticuerpo anti-p21, se bloqueó con PBS + 10% FBS) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana y a proteínas que no son de interés.

TBST
10mM Tris pH 7.5
100mM NaCl
1mM EDTA
0.1% Tween20

La membrana se incubó con el anticuerpo primario O/N a 4°C y con agitación. Los anticuerpos y las diluciones se indican en la tabla siguiente. Para diluir el anticuerpo se utilizó la solución de bloqueo correspondiente.

Anti-p53	1:500
Anti-p53 fosforilado en Ser15	1:500
Anti-p21	1:1000
Anti-Ciclofilina D	1:1000
Anti-Mdm2	1:250
Anti-GAPDH	1:10000
Anti-VDAC	1:1000
Anti-ARF	1:200
Anti-Ras	1:250
Anti-Hsp90	1:750
Anti-HMGB1	1:1000

Para eliminar el exceso de anticuerpo, la membrana se lavó con TBST 4 veces durante 10 minutos, a RT en agitación. Después se incubó con el anticuerpo secundario anti-*Rabbit* o anti-*Mouse* diluido (1:10000 y 1:5000, respectivamente) en solución de bloqueo, durante 1 hora a RT y en agitación; y se lavó como se describe anteriormente.

Por último, se obtuvo una señal luminosa utilizando el *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción lumínica que tiene lugar consiste en la oxidación del luminol con peróxido de hidrógeno. Esta oxidación está catalizada por la enzima HRP conjugada al anticuerpo secundario y da como resultado un compuesto excitado que emite luz a 428nm al volver a su estado basal. Para detectar esta señal se utilizaron películas autorradiográficas de AGFA y de GE Healthcare (Hyperfilm ECL), estas últimas de mayor sensibilidad.

2f. V. *Stripping*:

Para detectar una proteína diferente en la misma membrana, se debían eliminar previamente los anticuerpos utilizados para detectar la proteína anterior. Para ello se lavó la membrana con glicina 100mM pH 2.5 durante 15min a RT y, a continuación, se lavó con SDS al 1% durante 15min a RT. Finalmente, se lavó con TBST y se bloqueó de nuevo.

2g. Coimmunoprecipitación de proteínas

Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron en *buffer* de lisis sin detergente. A continuación, se centrifugaron a 600xg durante 5min a 4°C y, tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron en *buffer* de lisis con detergente. Ambas soluciones se prepararon a concentración 2X y se suplementaron con un cóctel de inhibidores de proteasas inmediatamente antes de su uso.

<i>Buffer</i> de lisis para coIP (2X)
40mM HEPES pH7.4
260mM NaCl
2mM EGTA
2mM EDTA
2% NP40 (Sólo en el <i>buffer</i> con detergente)

Tras 7min en hielo se centrifugaron las células, ya lisadas, a 1000xg a 4°C durante 10min. Se separó el sobrenadante y se incubó 1 hora más en hielo para la completa rotura de las membranas intracelulares. Después, se centrifugó a 15000xg durante 10min a 4°C y se descartó el *pellet*.

Las muestras se diluyeron 1:1 con buffer de lisis sin NP40 y se añadió el anticuerpo anti-p53 acoplado a agarosa (previamente lavado tres veces en *buffer* de lisis sin NP40). La inmunoprecipitación se dejó O/N a 4°C en agitación suave y se lavaron las muestras tres veces con 1.5ml de *buffer* de lavado. Tras cada lavado se centrifugó a 500xg durante 2min a 4°C y se retiró el sobrenadante.

Buffer de lavado para coIP
50mM HEPES pH7.5
150mM NaCl
10% Glicerol
0.5 % NP40

Después del último lavado, se retiró del todo el líquido sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en un volumen igual de tampón de carga para Western blot (2X) con un 2% más de SDS. Las proteínas inmunoprecipitadas y coimmunoprecipitadas se eluyeron del anticuerpo mediante un tratamiento de 3min a 85°C. Por último, se cargaron las muestras en geles de gradiente del 4 al 12% de acrilamida y se continuó con el Western blot de la forma ya descrita, con la salvedad de que se utilizó TrueBlot (eBioscience) 1:1000 en lugar de los anticuerpos secundarios convencionales.

2h. Tinción de inmunofluorescencia

Para estudiar la localización subcelular de p53 realizamos una inmunocitoquímica en MEFs (ver preparación más adelante) homocigóticos p53^{mitoER/mitoER} y p53^{ER/ER}. Esta técnica es similar al Western blot, ya que consiste en la detección de la proteína de interés mediante el uso de anticuerpos primarios, que reconocen específicamente a esta proteína, y anticuerpos secundarios, acoplados a fluorocromos, que reconocen específicamente al anticuerpo primario.

Los MEFs se sembraron en placas de vidrio (LAB-TEK) y se trataron con 4-OHT 100nM o vehículo durante 10-12 horas. Después, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con formalina al 3.7% durante 20min a RT. Una vez fijadas, se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.2% en PBS durante 5min a RT. Las células permeabilizadas se lavaron 3 veces y se trataron con glicina 50mM en PBS durante 20min a RT. Este aminoácido reacciona con la formalina residual y detiene la fijación. A continuación se bloqueó la preparación durante 30min a RT y se incubó con el anticuerpo primario O/N a 4°C.

Solución de bloqueo (en PBS)
0.05% Triton-X100
15% Suero de cabra

Solución de anticuerpo primario (en PBS)
3% BSA
1:500 Anti-p53
5µg/ml Anti-Ciclofilina D

La preparación se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario durante 45min a RT.

Solución de anticuerpo secundario (en PBS)
10% Suero de cabra
0.05% Triton-X100
1:1000 Anti- <i>Rabbit</i> -Alexa488
1:1000 Anti- <i>Mouse</i> -Alexa568

Las células se lavaron de nuevo con PBS y se tiñeron con DAPI 700nM durante 10min a RT. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y una vez con agua. Por último, se montó el porta añadiendo unas gotas de *SlowFade Antifade Kit* (Molecular Probes) y sellando el cubre con esmalte de uñas. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Olympus IX71 o un Confocal Leica TCS-SL y se procesaron con el sistema Delta Vision.

2i. Tinción TUNEL

Los órganos de los ratones irradiados se fijaron por inmersión y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 2µm de grosor, se desparafinaron y rehidrataron. Las secciones se permeabilizaron con proteinasa K durante 30min a 37°C y se lavaron 2 veces con PBS.

Solución de proteinasa K (en PBS)
15µg/ml Proteinasa K
10mM Tris HCl (pH 7.4-8)

A continuación, las secciones se tiñeron con el *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron con DAPI 700nM durante 10min a RT. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y una vez con agua. Los portas se montaron añadiendo unas gotas de Vectashield® (Vector Laboratories). Las fotografías se hicieron en un microscopio Leica DM 6000B, a 63X.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

3a. Generación de células ES p53^{wt/mitoER}.

Las células ES p53^{wt/ER} fueron generadas según se describe en Christophorou *et al.* (2005).

3a. I. Construcción del vector de recombinación:

El vector de recombinación pVH7 había sido generado anteriormente por Talía Velasco Hernández y Sonja Holzmann y contiene un inserto que abarca desde la región 5' del exón 1 hasta el intrón 6 del gen *Trp53* en el vector BlueScript II SK+ (figura 9). Además, este vector contiene en el intrón 1 el gen Pac (Puromicin-N-acetiltransferasa), que confiere resistencia a la puromicina, flanqueado por sitios FRT (*Flipase Recognition Target*), bajo el promotor Mus PGK1. En el extremo 5' del exón 2 y en fase con él, el vector porta la secuencia codificante de la señal de localización mitocondrial de la enzima ornitín transcarbamilasa. En el intrón 6 se encuentra el gen DTA, que codifica una subunidad de la toxina diftérica, cuya expresión está regulada por el promotor del gen HSV Timidina quinasa.

El vector se linearizó mediante digestión con la enzima PvuI. La mezcla para la digestión del plásmido fue la siguiente:

500µl	dH ₂ O
100µl	Buffer D 10X
10µl	DTT 100mM
10µl	BSA 100mM
30µl	PvuI 10u/µl
360µl	Plásmido pVH7 (280ng/µl)

Tras comprobar en un gel de agarosa que la digestión había sido total, el DNA cortado se extrajo con fenol, fenol: CIA (1:1) y CIA, se precipitó con isopropanol y el *pellet* lavado y seco se resuspendió en 70µl de TE 0.1X.

3a. II. Electroporación de las células ES:

Las células ES se deben sembrar sobre un lecho de *feeders*. Los *feeders* son fibroblastos embrionarios de ratón que han sido tratados con 12µg/ml de Mitomicina C durante 4h, por lo que no son capaces de dividirse pero sí mantienen un metabolismo activo y secretan factores que ayudan a que las células ES permanezcan en un estado indiferenciado.

Medio de cultivo para <i>feeders</i>	
500ml	DMEM
50ml	FBS-HI
5ml	Penicilina/Estreptomicina 100X
5ml	L-Glutamina 100X

Medio de cultivo para células ES*	
500ml	DMEM
91.5ml	FBS-HI
6ml	Penicilina/Estreptomicina 100X
6ml	L-Glutamina 100X
6ml	NEA-A
4.87µl	β-mercaptoetanol 14.2M
60.9µl	LIF
100ng/ml	Inhibidor del receptor de FGF PD173074

*Ver Anexo "Referencias reactivos"

Una vez que los *feeders* estuvieron adheridos a la placa y a una confluencia del 90-100%, se sustituyó el medio de cultivo de *feeders* por medio de células ES, para que liberasen estos factores y creasen un entorno más propicio para las células ES. Una hora después se sembraron las células ES sobre los *feeders* con el medio condicionado.

Las células ES se expandieron durante al menos dos pases en medio suplementado con G-418 (300µg/ml), para evitar el crecimiento de colonias de células ES p53^{wt/wt} (no portadoras del gen de resistencia a esta droga).

Para la electroporación, las células ES se recogieron con tripsina y se lavaron dos veces con PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. Se contaron y se repartieron en cubetas de electroporación *Gene Pulser Cuvette* (BioRad) a razón de 15-30 millones de células por cubeta. Se añadió 1µg de plásmido pVH7 linealizado por cada millón de células y se incubó la mezcla 10min en hielo. La electroporación se realizó en un electroporador BTX ECM 600 bajo las siguientes condiciones: 240V, R9 y 500µF. Las células se incubaron a hielo otros 10min y finalmente se sembraron en placas nuevas con *feeders* y medio condicionado.

3a. III. Selección de las células recombinantes:

24h después de la electroporación se añadieron G-418 (250µg/ml) y puomicina (1.5µg/ml) al medio de cultivo de las células ES con objeto de que sólo sobrevivieran aquellas células en las que se había integrado el vector.

3a. IV. Recolección de los clones recombinantes:

Tras cinco días en cultivo en presencia de G-418 y puomicina, empezaron a ser visibles colonias de células ES. Estas colonias se recogieron por aspiración con una pipeta automática P200 y se disgregaron durante 5min a 37°C en 100µl de tripsina, en

placas de 96 pocillos. A continuación, se sembraron sobre *feeders* en placas de 24 pocillos y en presencia de ambas drogas.

3a. V. Congelación de células ES:

Cuando las colonias de células ES sembradas individualmente, una vez que alcanzaron la confluencia, se tripsinizaron durante 5min a 37°C. A la suspensión de células se añadió un volumen igual de medio de congelación. Los viales con las células se llevaron inmediatamente a hielo, a continuación a -80°C O/N y finalmente, a N₂ líquido.

Medio de congelación
FBS-HI
20% DMSO

3a. VI. Recuento cromosómico:

Para comprobar que los clones recombinantes homólogos eran euploides, los cromosomas se tiñeron y se contaron de la siguiente manera: Los cultivos de células ES en crecimiento exponencial fueron tratados con 0.25µg/ml de colchicina durante 2-3h a 37°C para bloquear las mitosis. Pasado este tiempo se tripsinizaron y la suspensión de células se centrifugó a 200xg durante 10min a RT. El *pellet* se resuspendió en el líquido restante golpeando suavemente con el dedo y se añadieron 5ml de KCl 0.075M gota a gota, para provocar la lisis osmótica de las células. Después de incubar la mezcla durante 10-15min a RT, se centrifugó a 200xg durante 10min a RT. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* de la misma forma que en el paso anterior. Seguidamente, se añadieron gota a gota 5ml de solución de fijación (metanol: ácido acético, 3:1) recién preparada agitando el tubo suavemente. Se incubó de nuevo durante 15-30min a RT y se centrifugó a 200xg durante 10min a 4°C. A continuación, se resuspendió el *pellet* y se añadieron otros 5ml de solución de fijación de la forma ya descrita. Se incubaron las células 10-15min a RT y se centrifugaron a 200xg durante 10min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en el líquido que quedó tras aspirar el sobrenadante y se añadieron 0.5ml de solución de fijación. Para preparar las muestras para verlas al microscopio se dejaron caer, desde aproximadamente 80cm de altura, gotas de 20µl de esta preparación sobre portas inclinados unos 45°. Las muestras se dejaron secar sobre los portas y se tiñeron con PBS: Giemsa (10:1) durante 10min a RT. Por último, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Las fotografías para el recuento de los cromosomas se realizaron en un microscopio Zeiss Axioskop equipado con una cámara RT-Spot-Monochrome a 63X.

3a. VII. Inyección de células ES en blastocistos:

Las células ES recombinantes escogidas fueron descongeladas y sembradas sobre *feeders*. El día anterior a la inyección en blastocistos se tripsinizaron y sembraron en

placas nuevas e, inmediatamente antes de la inyección, se substituyó el medio de cultivo completo por medio sin antibióticos. Las células se tripsinizaron de nuevo y se observaron individualmente. Para la inyección se escogieron las células ES esféricas, con superficie lisa y de tamaño similar a las células de los blastocistos receptores, obtenidos de hembras C57BL/6 superovuladas y fecundadas 3-4 días antes de la inyección. Posteriormente, los blastocistos quiméricos se introdujeron en el útero de hembras pseudopreñadas y se dejó que la gestación llegara a término para que nacieran los ratones quiméricos, portadores del alelo $p53^{\text{mitoER}}$ en algunas de sus células. La obtención de blastocistos, la inyección de células ES en blastocistos y su implantación en hembras pseudopreñadas fueron realizadas por Manuel Sánchez Martín, en la Unidad de Generación de OMGs del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

3b. Cultivo de MEFs

3b. I. Preparación de MEFs:

Los MEFs se obtuvieron a partir de embriones de 13.5 días (E13.5) de hembras $p53^{\text{wt/mitoER}}$ y $p53^{\text{ER/ER}}$ que habían sido cruzadas con machos de su mismo genotipo.

Tras sacrificar a las hembras se extrajeron los embriones y se lavaron individualmente en placas con 5 ml de PBS. A cada embrión se le quitó el cerebro y el hígado (fetal), y se guardó este último para el genotipado.

A continuación, los embriones fueron desmenuzados con una cuchilla e incubados con 5ml de tripsina durante 30min a 37°C. La tripsina se neutralizó con 15ml de medio de cultivo para MEFs y se pasó la suspensión celular a través de un *Cell-strainer* (BD) de 70µm. Las células se centrifugaron 5min a 300xg y se resuspendieron en 20ml de medio fresco. Por último se sembraron las células de cada embrión en dos placas de 10cm de diámetro.

Medio de cultivo para MEFs	
500ml	DMEM
50ml	FBS-HI
5ml	Penicilina/Estreptomicina 100X
5ml	L-Glutamina 100X
5mg	Ciprofloxacino
2 µl	β-mercaptoetanol 14.2M

Cuando los MEFs llenaron las placas, fueron congelados en alícuotas de 1-1.5 millones de células.

Para la congelación de los MEFs, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células 1 vez con PBS. Se trataron con tripsina durante 5min a 37°C y se neutralizó la tripsina

con 10 volúmenes de medio de cultivo. Se centrifugó la suspensión celular 5 min a 300xg. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco y repartidas en viales de congelación. Se añadió a cada vial un volumen de medio de congelación e, inmediatamente después, se pusieron los viales en hielo. A continuación, se mantuvieron a -80°C O/N y, por último, se guardaron en N₂ líquido.

Los viales de MEFs se descongelaron a 37°C y se mezclaron inmediatamente con diez volúmenes de medio de cultivo fresco. El DMSO se usa para evitar la formación de cristales de agua durante la congelación, pero es tóxico para las células. Por eso, durante la descongelación, el DMSO debe diluirse lo más rápidamente posible.

3b. II. Estrés celular por pases sucesivos:

Este experimento se realizó con MEFs homocigóticos p53^{wt/wt}, p53^{mitoER/mitoER} y p53^{ER/ER}, tratados con 4-OHT 100nM o con vehículo (etanol).

Se sembraron 300000 células de cada una de las condiciones del experimento (p53^{wt/wt} 4-OHT, p53^{wt/wt} etanol, p53^{mitoER/mitoER} 4-OHT, p53^{mitoER/mitoER} etanol, p53^{ER/ER} 4-OHT y p53^{ER/ER} etanol) en placas de 6cm de diámetro y 48h después se recogieron con tripsina y se contaron en una cámara Thoma. De nuevo se sembraron 300000 células de cada condición, y así sucesivamente hasta que las células de al menos una de las condiciones dejaron de dividirse.

3b. III. Fraccionamiento celular:

Con el objeto de obtener la fracción mitocondrial pura, se realizó el fraccionamiento celular de MEFs homocigóticos p53^{mitoER/mitoER} y p53^{ER/ER} que habían sido previamente tratados con 4OHT 100nM o con vehículo. El procedimiento para obtener las mitocondrias requiere, en primer lugar, romper la membrana plasmática de las células para que se liberen los orgánulos. Después se descartan los núcleos por centrifugación y se separan las mitocondrias del resto de los componentes celulares por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. El fraccionamiento se realizó en frío para minimizar la movilidad de las proteínas entre los distintos compartimentos celulares y añadiendo inhibidores de proteasas en todos los tampones utilizados.

Los MEFs se lavaron dos veces con 10ml de PBS frío/placa de 15cm de diámetro antes de recogerlos con un *Cell-scaper* (Falcon). Se centrifugaron a 1000xg durante 5min a 4°C, se lavaron una vez más con 50ml de TD Washing *buffer* y se centrifugaron de igual modo que en el paso anterior. A continuación, se resuspendieron en el *buffer* hipotónico CARSB y se dejaron 10min en hielo para permitir que las células se hincharan. Las membranas plasmáticas se rompieron con un homogeneizador Wheaton utilizando un émbolo con ajuste *Tight*; el proceso se monitorizó por observación en un microscopio de contraste de fases.

TD Washing <i>buffer</i>
135mM NaCl
5mM KCl
25mM Tris HCl pH 7.6 a 4°C

CARSB <i>buffer</i>
10mM NaCl
1.5mM CaCl ₂
10mM Tris HCl pH 7.5 a 4°C

Cuando el 90% de las células tuvieron la membrana plasmática rota, se añadieron $\frac{2}{3}$ del volumen de *Buffer MS* frío. Estos MEFs se centrifugaron dos veces a 1300xg durante 5min a 4°C para que los núcleos sedimentaran.

<i>Buffer MS</i>
210mM Manitol
70mM Sacarosa
5mM EDTA
5mM Tris HCl pH 7.6 a 4°C

El sobrenadante se transfirió a un tubo con un gradiente discontinuo de sacarosa, preparado previamente depositando 3ml de *buffer* Sacarosa 1M sobre 3ml de *buffer* Sacarosa 1.5M. Se centrifugó a 85000xg en una ultracentrífuga OPTIMA L-80 XP (Becton Dickinson) durante 45min a 4°C, sin frenado de parada.

<i>Buffer</i> sacarosa 1M
1M Sacarosa
2mM DTT
5mM EDTA
10mM Tris HCl pH 7.6 a 4°C

<i>Buffer</i> sacarosa 1.5M
1.5M Sacarosa
2mM DTT
5mM EDTA
10mM Tris HCl pH 7.6 a 4°C

A continuación, se recogió la interfase pinchando el tubo perpendicularmente con una jeringa de 21G y aspirando. Se transfirió a un tubo nuevo, se le añadieron 4 volúmenes de *Buffer MS* frío y se centrifugó a 16000xg, 15min a 4°C. Se lavó el *pellet* de mitocondrias una vez más con *Buffer MS* y se resuspendió en el volumen deseado de *Buffer MS*. En este punto, la suspensión de mitocondrias se guardó a -80°C o se utilizó directamente para el fraccionamiento mitocondrial.

3b. IV. Fraccionamiento mitocondrial:

Para separar las cuatro fracciones de la mitocondria (OM o membrana externa, IMS o espacio intermembrana, IM o membrana interna y MA o matriz) se realiza una lisis secuencial de sus membranas. En primer lugar se rompe la OM mediante choque osmótico, que se logra con un *buffer* hipotónico (*Swelling buffer*) y un *buffer*

hipertónico (*Shrinking buffer*), lo que permite coleccionar la OM y IMS y liberar los mitoplastos. Seguidamente, se rompe la IM mediante tratamiento con el *buffer* hipotónico y se libera la matriz.

Swelling buffer

10mM KH_2PO_4 pH 7.4 a 4°C

Shrinking buffer

10mM KH_2PO_4 pH 7.4 a 4°C

32% Sacarosa

30% Glicerol

10mM MgCl_2

Antes de comenzar el fraccionamiento mitocondrial se separó una alícuota para cuantificar la proteína presente en las mitocondrias purificadas. A continuación, las muestras se centrifugaron a 16000xg, 10min a 4°C, y se resuspendieron en *Swelling buffer* a una concentración de 200µg/ml. Las mitocondrias se dejaron en hielo durante 20min para permitir que se hincharan. Pasado este tiempo, se añadió el mismo volumen de *Shrinking buffer* y se centrifugaron a 10000xg durante 10min a 4°C. En este punto, el sobrenadante contiene la OM y el IMS, mientras que los mitoplastos están en el *pellet*. Se guardó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con una mezcla 1:1 de *Swelling buffer* y *Shrinking buffer*. Tras centrifugar de nuevo a 10000xg durante 10min a 4°C, se hizo un *pool* con los dos sobrenadantes y otro con los dos *pellets*. Los mitoplastos se resuspendieron en *Swelling buffer* a 200µg/ml y se dejaron en hielo 20min para romper la IM. A continuación, los tubos con OM+ IMS y los tubos con IM+MA se centrifugaron a 140000xg durante 60min a 4°C (OPTIMA TLX, Becton Dickinson). Por último, se separaron los *pellets* (correspondientes a la OM y la IM) de sus respectivos sobrenadantes (correspondientes al IMS y la MA) y se resuspendieron los *pellets* en RIPA con inhibidores de proteasas.

3b. V. Infección de MEFs con retrovirus:

Los virus se empaquetaron en células HEK-293T cotransfectadas con el vector pCL-Eco, que expresa las proteínas estructurales de virus ecotrópicos, y con el vector pLPC-H-Ras^{V12} o el vector pLPC-puro (control negativo). Los retrovirus se recolectaron filtrando el medio de los cultivos de estas células 48; 56 y 72h después de la transfección.

Para estudiar la senescencia inducida por el oncogén H-Ras^{V12}, MEFs p53^{mitoER/mitoER} y MEFs p53^{ER/ER} se infectaron tres veces utilizando los virus recién recolectados, en presencia de 8µg/ml de polybrene. Tras tres días de selección con 2µg/ml de puomicina las células resistentes se recolectaron, se sembraron a densidades determinadas y se trataron con 100nM 4-OHT o vehículo. Después de varios días en cultivo se tiñeron para determinar la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (ver más adelante).

3c. Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia

La mayoría de las células tiene una capacidad de replicación limitada, por lo que su vida suele culminar en un estadio de senescencia, una situación en la que el ciclo celular se para irreversiblemente y, aunque las células son viables, presentan patrones anormales de expresión de genes y proteínas. El estado de senescencia está caracterizado por la falta de respuesta a factores de crecimiento, una actividad metabólica sostenida y cambios en la morfología de la célula. Las bases moleculares para esta respuesta han sido ampliamente estudiadas y en la actualidad se consideran una combinación de al menos tres mecanismos: acortamiento de los telómeros, sobreexpresión del locus CDKN2A (que codifica INK4A y ARF) y una acumulación de daño en el ADN (Collado *et al*, 2010).

La mayoría de las células expresan una β -galactosidasa lisosomal cuya actividad óptima tiene lugar a pH 4. Sin embargo, únicamente las células senescentes muestran actividad β -galactosidasa a pH 6, que se conoce como SA- β -Gal (β -galactosidasa asociada a senescencia) (Dimri *et al*, 1995).

La tinción β -Gal de las células senescentes se realizó siguiendo el protocolo descrito en Dimri *et al*, 1995.

Los MEFs fueron tratados con 4-OHT 100nM o con vehículo durante 8-16h. Pasado este tiempo, la mitad de los MEFs de cada condición fue tratada con Nutlin-3 a/b 20 μ M y la otra mitad, con un volumen equivalente de vehículo (en este caso DMSO). Entre 3 y 5 días después, cuando las células habían adquirido la morfología de células senescentes, se lavaron con PBS y se fijaron durante 5min con solución de fijación a RT.

Solución de fijación (en PBS)

2% Formaldehído
0.2% Glutaraldehído

A continuación, se lavaron dos veces más con PBS y se tiñeron en solución de tinción SA- β -Gal durante 48h a 37°C en una cámara humidificada, en la oscuridad.

Solución de tinción SA- β -Gal

40mM Buffer citrato/fosfato pH 6
5mM Ferrocianuro potásico
5mM Ferricianuro potásico
150mM NaCl
2mM MgCl ₂
1mg/ml X-Gal (stock a 20mg/ml en DMF)

Buffer citrato/fosfato pH 6

18.3ml	Ácido cítrico 0.1M
32.1ml	Fosfato bisódico 0.2M

3d. Cultivo de timocitos

Los timocitos son los progenitores hematopoyéticos presentes en el timo que se diferencian a lo largo del proceso de timopoyesis diferenciando dando lugar a los linfocitos T maduros. Al recibir una dosis suficiente de radiación ionizante, los timocitos entran en un proceso de apoptosis dependiente de p53.

Para realizar el cultivo de timocitos primarios se utilizaron ratones homocigóticos $p53^{ER/ER}$ y $p53^{mitoER/mitoER}$ de menos de 6 semanas de edad.

Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO_2 seguida de dislocación cervical y se les extrajo el timo. Este órgano fue lavado con PBS + 0.1% BSA. Inmediatamente después, se disgregó presionando con el émbolo de una jeringa de 1ml sobre un *Cell-strainer* de $70\mu m$ y se llevó la suspensión celular a un volumen de 20ml con PBS + 0.1% BSA.

Por debajo de la suspensión celular se añadieron 12ml de Ficoll-Paque® y se centrifugó a $700\times g$ durante 35min sin freno. Se recogió la interfase con una pipeta Pasteur de plástico y se llevó a 15ml con PBS + 0.1% BSA. En este punto se recogió una alícuota de $10\mu l$ y se diluyó 1:1 con Trypan blue y se hizo un recuento de células en una cámara Thoma.

La suspensión celular se centrifugó 10min a $400\times g$ y el *pellet* de células se lavó una vez más con 20ml de PBS + 0.1% BSA. Las células se repartieron en tubos correspondientes a las distintas condiciones del experimento. Tras otra centrifugación a $400\times g$ durante 10min, las células se resuspendieron en medio de cultivo de timocitos con 4-OHT a 100nM o con vehículo, a una concentración de 10^6 células/ml.

Medio de cultivo de timocitos	
500ml	DMEM
25ml	FBS-HI
5ml	Penicilina/Estreptomicina 100X
5ml	L-Glutamina 100X
2 μl	β -mercaptoetanol 14.2M

Las células se sembraron en placas de 6cm de diámetro y se irradiaron (ver más adelante).

3e. Irradiación de células

Antes de llegar a una confluencia del 100% los MEFs fueron tratados con 4-OHT 100nM o con vehículo. Aproximadamente 4 horas más tarde la mitad de las placas de cada tratamiento recibió una dosis de 8Gy de radiación ionizante. 8 horas después, las células se lisaron para obtener RNA.

Los timocitos fueron irradiados aproximadamente una hora después del tratamiento con 4-OHT 100nM o vehículo. La mitad de las placas de cada tratamiento se sometió a 3Gy de radiación ionizante. A continuación, se incubaron a 37°C y 5% CO₂ y se recogieron a distintos tiempos para ver los niveles de apoptosis por citometría de flujo mediante tinción con AnexinaV y 7AAD (ver más adelante).

Las irradiaciones se realizaron en un equipo GammaCell 1000 Elite, provisto de una fuente de ¹³⁷Cs.

3f. Clarificación del medio de cultivo

En condiciones normales, la proteína HMGB1 forma parte de la estructura de la cromatina. Sin embargo, cuando la célula sufre algún daño es liberada al exterior celular, donde sirve de señal para la activación de la respuesta inmune innata. Se ha comprobado que la HMGB1 es liberada pasivamente por las células necróticas, mientras que las células apoptóticas no la liberan.

Para determinar los niveles de HMGB1 liberada se trataron MEFs con 4-OHT 100nM o con vehículo y con H₂O₂ 0.5mM y se recogió 1ml de medio de cultivo a distintos tiempos. El medio se centrifugó a 300xg durante 5min a 4°C para eliminar las células enteras. Se transfirieron 950µl a un tubo nuevo, que se centrifugó a 2100xg durante 5min a 4°C para eliminar los fragmentos de células en suspensión. Se transfirieron 900µl a un tubo nuevo y se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso. Para determinar la HMGB1 liberada se utilizó la técnica del Western blot. El medio de cultivo de los timocitos irradiados se clarificó siguiendo el mismo procedimiento.

3h. Citometría de flujo (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Aunque las distintas células de un organismo tengan una dotación genética idéntica, la carga proteica varía enormemente entre unas y otras. La citometría de flujo permite diferenciar células en función de las proteínas que expresan. Esta técnica consiste en marcar una suspensión celular con uno o varios fluorocromos. La suspensión se hace circular en forma de gotas microscópicas por un campo de

detección atravesado por un rayo láser. Este láser incide sobre las células y se dispersa en función de las características ópticas de dichas células, activando también los fluorocromos con los que están marcadas. Gracias a sensores específicos se analizan y cuantifican las poblaciones en estudio en función de sus propiedades físicas, como el tamaño (FSC, *forward scattered*) y la complejidad interna (SSC, *side scattered*), y del marcaje realizado.

3h. I. Tinción AnexinaV-7AAD:

Esta doble tinción se utiliza para cuantificar los niveles de apoptosis y necrosis en una población celular determinada. La AnexinaV se une con gran afinidad y especificidad a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se encuentra en la hemimembrana interna en células sanas, pero que pasa a la hemimembrana externa a medida que la apoptosis progresa. Así, la AnexinaV sólo se unirá a las células apoptóticas, ya que sólo estas células tienen la fosfatidilserina accesible. Por otro lado, el 7AAD es un compuesto intercalante que se une al DNA, pero sólo es capaz de penetrar en las células que tienen la membrana rota, ya sea porque están en fase de apoptosis avanzada o porque están en proceso de muerte por necrosis. Así, las células en apoptosis temprana estarán teñidas con AnexinaV pero no con 7AAD, porque su membrana todavía está intacta. Las células en apoptosis avanzada serán positivas para los dos marcajes, ya que tienen la membrana rota y el 7AAD ha penetrado. Las células necróticas, en cambio, se marcarán sólo con 7AAD.

Las células se lavaron una vez con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo y, a continuación, se lavaron una vez con *Binding buffer* para asegurar una concentración de Ca^{2+} suficiente para la unión de la AnexinaV.

Binding buffer

10mM HEPES/NaOH pH 7.4
140mM NaCl
2.5mM CaCl_2

A continuación, las células se resuspendieron en 100µl de *Binding buffer* y se marcaron con 0.7µl de AnexinaV y 1µl de 7AAD durante 15min a RT en oscuridad. Antes de pasar las células por el citómetro de flujo se añadieron 400µl de *Binding buffer*.

SUMMARY

SUMMARY

1. INTRODUCTION

The p53 protein takes part in many cell processes and it is considered one of the most important tumor suppressors. Upon cell stress, p53 is activated and stops the malignant transformation of the damaged cell by inducing cell cycle arrest, senescence or cell death.

It has been recently discovered that p53, independently of its activity as a transcription factor, can trigger cell death by direct action in the mitochondria (Marchenko, Zaika *et al.* 2000). Upon certain types of stress, a fraction of cytoplasmic p53 goes to the outer mitochondrial membrane and interacts with the Bcl-2 family of proteins. p53 inhibits the antiapoptotic Bcl-2 and Bcl-xL and allows the activation of the proapoptotic Bax and Bak, who constitute pores in this membrane making it more permeable. Then, some proapoptotic factors, such as cytochrome c, go from the intermembrane space to the cytoplasm and start caspase activation and apoptotic death. Furthermore, upon oxidative stress p53 is transported to the mitochondrial matrix, where it binds Cyclophilin D and triggers the opening of the mitochondrial Permeability Transition Pore. This causes the loss of the inner mitochondrial membrane potential and the necrotic cell death (Vaseva, Marchenko *et al.* 2012).

The *knock-in* p53ER^{TAM} mouse model (from now on, p53ER) carries a p53^{ER} allele, which encodes a p53 fusion protein with the hormone-binding domain of the modified estrogen receptor ER^{TAM}. This ER domain only binds 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) and not the endogenous mouse estrogens (Christophorou, Martin-Zanca *et al.* 2005). The p53ER protein is non-functional in the absence of 4-OHT because it is bound to Hsp90. 4-OHT displaces Hsp90, so the addition of this estrogen causes a conformational change in p53ER rendering it functional to respond to the appropriate stimuli. Previously in Dr. Martín-Zanca's group this p53ER model has been used, in combination with a Sca1-BCR-ABLp210 model which causes chronic myeloid leukemia, to demonstrate that the restoration of p53 function increases survival of leukemic mice (Velasco-Hernandez, Vicente-Duenas *et al.* 2013).

2. OBJETIVES

The main purpose of this thesis is to generate and validate a *knock-in* mouse model expressing a p53 protein that is directed to mitochondria and is regulatable by 4-OHT. With this model, we expect to study the importance of p53 activity in the mitochondria, independently of its activity as a transcription factor.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3a. Generation, by homologous recombination, of the p53^{mitoER} allele.

This work started with a recombination vector that encodes exons 1 to 6 of p53. Exon 2 was fused with the sequence encoding the mitochondrial localization peptide of the enzyme ornithine transcarbamylase. This vector carried in intron 1 the Pac gene (that confers resistance to puromycin) flanked with FRT sites. The vector was introduced by electroporation in heterozygous mouse ES cells, p53^{wt/ER}. These cells were selected in medium with puromycin. 330 colonies of resistant cells were harvested and we checked by Southern blot, using a probe that was external to the vector, which colonies had integrated the vector by homologous recombination. We also checked by Southern blot, using a probe that was internal to the vector, how many times had each clone integrated the vector. Six p53^{wt/mitoER} clones had been obtained and all of them had a single homologous recombination of the vector. Next, we checked among the p53^{wt/mitoER} clones the presence of aneuploidies by chromosome staining with Giemsa. Besides, we checked by Southern blot the integrity of the 5' region of the p53^{mitoER} allele, using a probe corresponding to this region. The most appropriate p53^{wt/mitoER} clone was injected in mouse blastocytes. The chimeric blastocytes were inserted in the uterus of pseudopregnant female mice and we obtained two chimeric male mice.

3b. Generation of the p53mitoER colony.

We crossed our chimeric mice with mice expressing the flipase enzyme. This enzyme recombined the FRT sites and removed the Pac gene from the genome of the offspring. By crossing p53^{wt/mitoER} mice without the Pac gene we got a colony of mice of the three possible genotypes: p53^{wt/wt}, p53^{wt/mitoER} and p53^{mitoER/mitoER}.

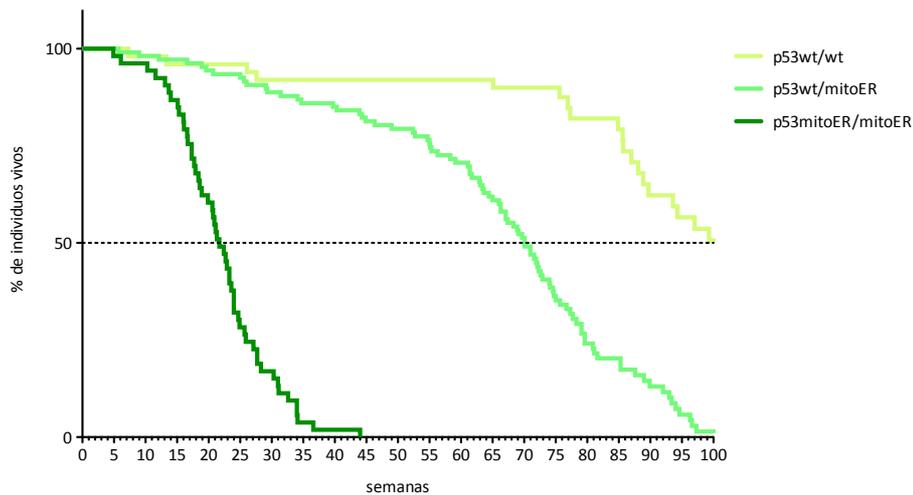
3c. Study of the transcriptional activity and subcellular localization of the p53mitoER protein.

p53^{ER/ER} and p53^{mitoER/mitoER} MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) were treated with 4-OHT or vehicle and were gamma-irradiated. After RNA isolation and conversion to cDNA, we performed a qPCR that showed that, in the p53^{ER/ER} cells, the mRNA levels of the typical p53 targets had increased. This increase did not occur in p53^{mitoER/mitoER} cells. This result suggests that the p53mitoER protein lacks transcriptional activity, as we had expected.

In order to check the subcellular localization of the p53mitoER protein, we performed an immunofluorescence staining of MEFs that had been treated with 4-OHT or vehicle. Anti-p53 and anti-Ciclophilin D antibodies were used. We observed that the p53ER protein was located in the nucleus and in the cytoplasm, both with and without 4-OHT. Meanwhile, the p53mitoER was never located in the nucleus and it colocalized with Ciclophilin D both with and without 4-OHT. We also performed cell fractionation and we observed that the p53mitoER protein was more abundant in isolated mitochondria than the p53ER protein.

3d. The p53^{mitoER} protein is not functional in the absence of 4-OHT.

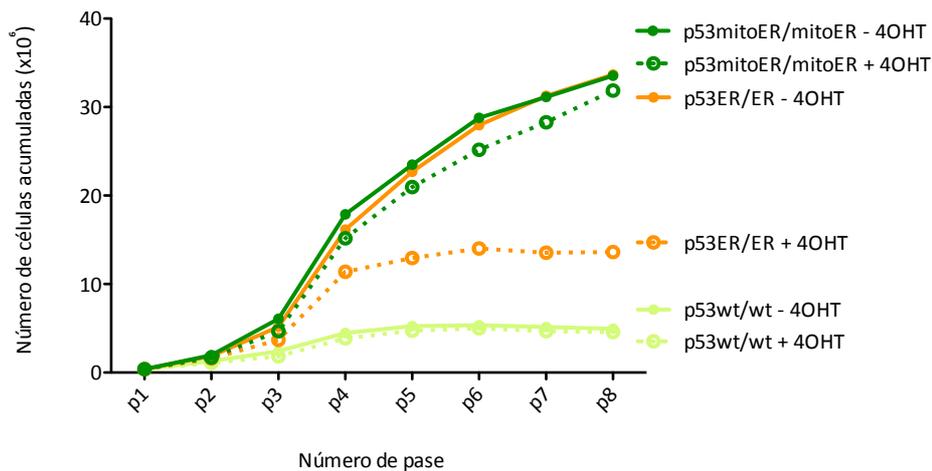
To further validate the p53^{mitoER} model, the p53^{mitoER} protein had to lack any activity in the absence of 4-OHT. We studied the survival of untreated mice of the three genotypes and observed that the p53^{mitoER/mitoER} mice had a shorter lifespan than the p53^{wt/mitoER} and the p53^{wt/wt} mice. Moreover, the p53^{mitoER/mitoER} mice had a similar survival than the p53^{-/-} mice and developed the same spectrum of tumors, which consisted mainly of sarcomas and thymic lymphomas.



Survival of untreated mice of the p53^{mitoER} colony. p53^{wt/wt}, n=50. p53^{wt/mitoER}, n=107. p53^{mitoER/mitoER}, n=53.

3d. *In vitro* study of p53^{mitoER} protein activity.

To study whether the p53^{mitoER} protein is capable of inducing cell cycle arrest we performed an experiment in which p53^{ER/ER}, p53^{wt/wt} and p53^{mitoER/mitoER} MEFs were subjected to serial passages in the presence or absence of 4-OHT. After a few passages, all the p53^{wt/wt} MEFs and the p53^{ER/ER} MEFs treated with 4-OHT underwent cell cycle arrest. On the other hand, the p53^{ER/ER} MEFs treated with vehicle, which did not have a functional p53 protein, continued dividing passage after passage. The p53^{mitoER/mitoER} cells, both with and without 4-OHT did not arrest their cell cycle, either.

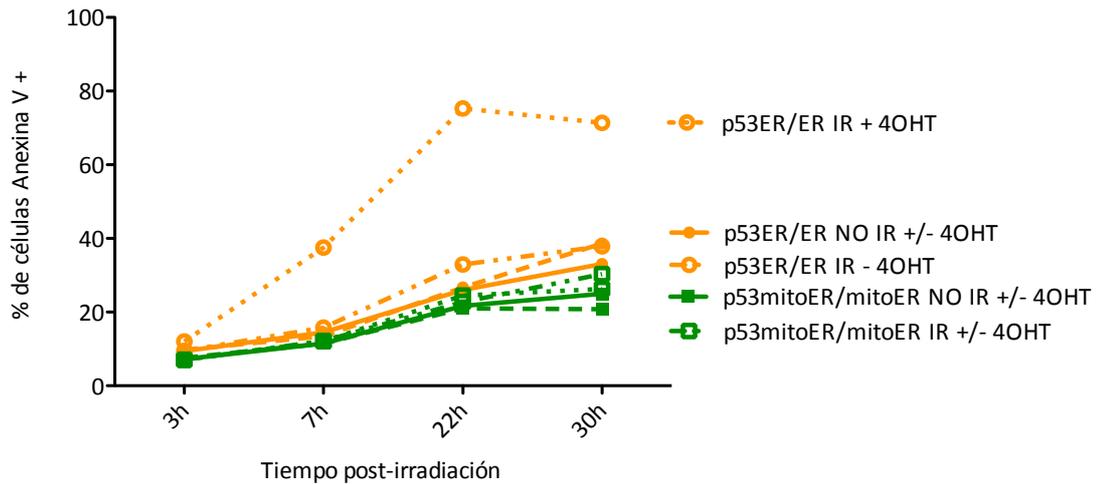


Cell division ability in MEFs subject to serial passages.

We also treated MEFs with Nutlin-3a in the presence or absence of 4-OHT, to see if the p53mitoER protein could trigger senescence. We observed that p53^{ER/ER} MEFs with a functional p53 protein (that is, treated with 4-OHT) entered senescence when Nutlin-3a was added to the culture. The p53^{mitoER/mitoER} MEFs did not behave in the same way, as they conserved a normal morphology and they did not show Senescence-Associated- β -galactosidase activity, regardless of the treatment with 4-OHT and Nutlin-3a.

In this two experiments, the p53^{ER/ER} MEFs that entered cell cycle arrest and senescence also showed an increase in their p21 levels. We concluded that the p53^{mitoER/mitoER} MEFs could not respond to these kinds of stress because the p53mitoER protein has no activity as a transcription factor.

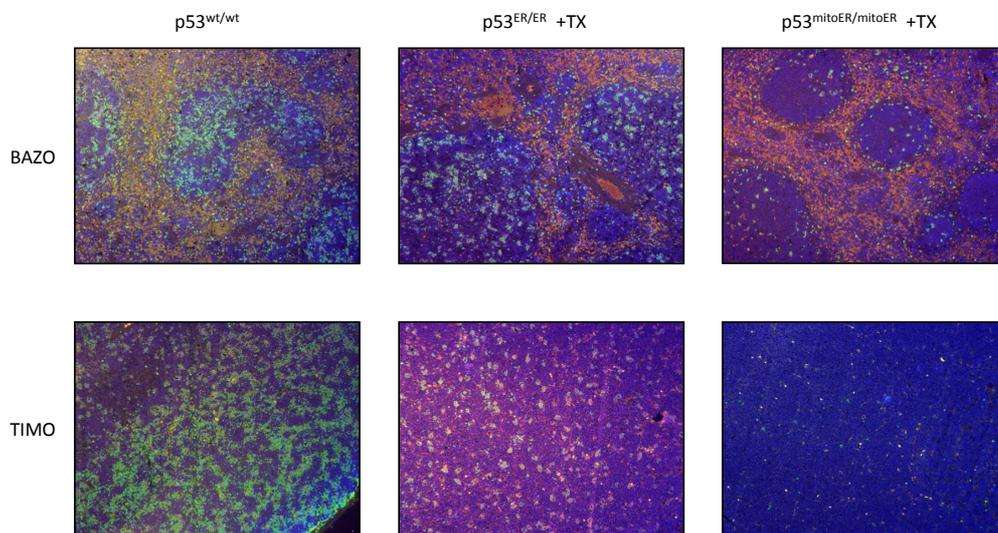
It has been shown that primary thymocytes, when irradiated with gamma radiation, they enter a p53-dependent apoptosis. Also, concomitant to this cell death, a fraction of p53 goes to mitochondria (Mihara, Erster *et al.* 2003). We gamma-irradiated p53^{ER/ER} and p53^{mitoER/mitoER} primary thymocytes that had been treated with 4-OHT or vehicle. The 4-OHT-treated and irradiated p53^{ER/ER} cells reached high levels of apoptosis, as we could see by Annexin V staining. The p53^{mitoER/mitoER} thymocytes, on the other hand, showed low levels of apoptosis regardless of the treatment and radiation. We also checked the amount of HMGB1 protein that these cells had released to the culture medium, as this is a way to study the levels of necrotic death. Again, the p53^{ER/ER} thymocytes, when irradiated and treated with 4-OHT, released more HMGB1 and thus had higher levels of necrosis than the p53^{mitoER/mitoER} thymocytes treated in the same way. When p53^{ER/ER} and p53^{mitoER/mitoER} MEFs were treated with H₂O₂ in the presence or absence of 4-OHT we obtained the same result: oxidative stress did not induce necrotic cell death in p53^{mitoER/mitoER} cells, even in the presence of 4-OHT.



Apoptosis levels in primary thymocytes treated with 4-OHT or vehicle and gamma-irradiated.

3e. *In vivo* study of p53mitoER protein activity.

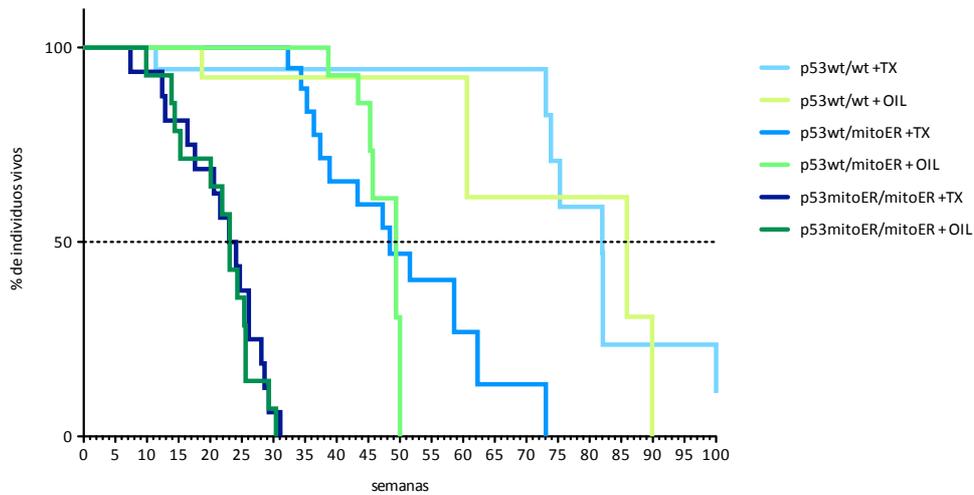
In order to test the ability of the p53mitoER protein to induce apoptosis *in vivo*, we treated with tamoxifen and then gamma-irradiated p53^{ER/ER} and p53^{mitoER/mitoER} mice. In parallel we gamma-irradiated p53^{wt/wt} mice. Then, we performed TUNEL staining of their radiosensitive tissues. Both the p53^{ER/ER} and the p53^{wt/wt} mice showed apoptotic cells in thymus and spleen; unlike the p53^{mitoER/mitoER} mice, whose tissues had much lower levels of apoptosis.



TUNEL staining of radiosensitive tissues. Representative microphotographs (63X).

We studied the tumor suppressor activity of the p53mitoER protein in two contexts: first, the spontaneous tumors that the p53^{mitoER/mitoER} mice develop; and second, the chronic myeloid leukemia that the Sca1-BCR-ABLp210 mice develop. For this second approach, we generated a mouse colony harboring both the p53^{mitoER} allele and the BCR-ABL oncogene. Treatment with tamoxifen did not lengthen the survival of p53^{mitoER/mitoER} mice, and they developed the same

spectrum of spontaneous tumors. $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$; BCR-ABL mice, when treated with tamoxifen, also developed leukemia at the same age as untreated $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$; BCR-ABL mice.



Survival of the tamoxifen-treated or vehicle-treated mice of the $p53^{\text{mitoER}}$ colony. $p53^{\text{wt/wt}}$ +TX, n=18. $p53^{\text{wt/wt}}$ +OIL, n=13. $p53^{\text{wt/mitoER}}$ +TX, n= 19. $p53^{\text{wt/mitoER}}$ +OIL, n= 18. $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ +TX, n= 16. $p53^{\text{mitoER/mitoER}}$ +OIL, n= 14.

3f. Exploring the causes of the absence of $p53^{\text{mitoER}}$ activation.

All previous experiments have shown that the $p53^{\text{mitoER}}$ protein lacks the ability of inducing cell cycle arrest, senescence, apoptosis or necrosis, even after the treatment with tamoxifen or 4-OHT. We checked the sequence of the exons and ER domain in the $p53^{\text{mitoER}}$ allele and we confirmed the absence of mutations in this allele.

Next, we considered the possibility that the $p53^{\text{mitoER}}$ protein might not be accessible to 4-OHT due to its subcellular localization. The ER fusion proteins remain inactive in basal conditions because they are bound to Hsp90. When 4-OHT is added, it takes the place of Hsp90 allowing the activation of the fusion protein. Maybe $p53^{\text{mitoER}}$ is bound to a mitochondrial chaperone instead of Hsp90. If this was the case, the interaction between $p53^{\text{mitoER}}$ and the mitochondrial chaperone might be of a strength that 4-OHT was not capable of disrupting the complex. By performing coimmunoprecipitation experiments, we have observed an association between Hsp90 and $p53^{\text{ER}}$ and not between Hsp90 and $p53^{\text{mitoER}}$.

Nowadays, we are designing experiments to determine which mitochondrial chaperone is bound to $p53^{\text{mitoER}}$ in basal conditions; and also to test the ability of 4-OHT to enter the mitochondria through the outer and inner membranes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, J. F., et al. (1995). "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice." Curr Biol **5**(8): 931-936.
- Belyi, V. A., et al. (2010). "The origins and evolution of the p53 family of genes." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(6): a001198.
- Biegging, K. T., et al. (2014). "Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression." Nat Rev Cancer **14**(5): 359-370.
- Bienz, B., et al. (1984). "Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53." Embo j **3**(9): 2179-2183.
- Brady, C. A. and L. D. Attardi (2010). "p53 at a glance." J Cell Sci **123**(Pt 15): 2527-2532.
- Caelles, C., et al. (1994). "p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes." Nature **370**(6486): 220-223.
- Cicalese, A., et al. (2009). "The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells." Cell **138**(6): 1083-1095.
- Comel, A., et al. (2014). "The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities." FEBS Lett **588**(16): 2600-2609.
- Cooks, T., et al. (2014). "Caught in the cross fire: p53 in inflammation." Carcinogenesis **35**(8): 1680-1690.
- Chipuk, J. E., et al. (2005). "PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53." Science **309**(5741): 1732-1735.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2004). "Cytoplasmic p53: bax and forward." Cell Cycle **3**(4): 429-431.
- Christophorou, M. A., et al. (2005). "Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo." Nat Genet **37**(7): 718-726.
- Christophorou, M. A., et al. (2006). "The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression." Nature **443**(7108): 214-217.
- Donehower, L. A., et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." Nature **356**(6366): 215-221.
- Donehower, L. A. and G. Lozano (2009). "20 years studying p53 functions in genetically engineered mice." Nat Rev Cancer **9**(11): 831-841.
- Dumont, P., et al. (2003). "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." Nat Genet **33**(3): 357-365.
- Efeyan, A., et al. (2006). "Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53." Nature **443**(7108): 159.
- el-Deiry, W. S., et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.

- Eliyahu, D., et al. (1988). "Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species." *Oncogene* **3**(3): 313-321.
- Elkholi, R. and J. E. Chipuk (2014). "How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis." *Bioessays* **36**(1): 46-51.
- Garcia-Cao, I., et al. (2002). ""Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally." *Embo j* **21**(22): 6225-6235.
- Grossi, E., et al. (2015). "Expanding the p53 regulatory network: LncRNAs take up the challenge." *Biochim Biophys Acta*.
- Guo, X., et al. (2014). "Drp1 stabilizes p53 on the mitochondria to trigger necrosis under oxidative stress conditions in vitro and in vivo." *Biochem J* **461**(1): 137-146.
- Haupt, Y., et al. (1995). "Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53." *Genes Dev* **9**(17): 2170-2183.
- Hayflick, L. (1965). "THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS." *Exp Cell Res* **37**: 614-636.
- Hu, W., et al. (2012). "The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2." *Genes Cancer* **3**(3-4): 199-208.
- Hu, W., et al. (2007). "p53 regulates maternal reproduction through LIF." *Nature* **450**(7170): 721-724.
- Jacks, T., et al. (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." *Curr Biol* **4**(1): 1-7.
- Jenkins, J. R., et al. (1984). "Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53." *Nature* **312**(5995): 651-654.
- Jones, M. and A. Lal (2012). "MicroRNAs, wild-type and mutant p53: more questions than answers." *RNA Biol* **9**(6): 781-791.
- Kanki, H., et al. (2006). "High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background." *Exp Anim* **55**(2): 137-141.
- Kenzelmann Broz, D., et al. (2013). "Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses." *Genes Dev* **27**(9): 1016-1031.
- Klune, J. R., et al. (2008). "HMGB1: endogenous danger signaling." *Mol Med* **14**(7-8): 476-484.
- Kubbutat, M. H., et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." *Nature* **387**(6630): 299-303.
- Lane, D. P. and S. Benchimol (1990). "p53: oncogene or anti-oncogene?" *Genes Dev* **4**(1): 1-8.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* **278**(5701): 261-263.
- Lavigne, A., et al. (1989). "High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene." *Mol Cell Biol* **9**(9): 3982-3991.

- Leu, J. I., et al. (2009). "A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70." Mol Cell **36**(1): 15-27.
- Littlewood, T. D., et al. (1995). "A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins." Nucleic Acids Res **23**(10): 1686-1690.
- Liu, G., et al. (2000). "High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4174-4179.
- Lowe, S. W., et al. (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-849.
- Maillet, A. and S. Pervaiz (2012). "Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance." Antioxid Redox Signal **16**(11): 1285-1294.
- Malkin, D., et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-1238.
- Marcel, V., et al. (2015). "p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity." Oncogene **34**(44): 5513-5523.
- Marchenko, N. D., et al. (2007). "Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation." Embo j **26**(4): 923-934.
- Marchenko, N. D., et al. (2000). "Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling." J Biol Chem **275**(21): 16202-16212.
- Marino, S., et al. (2000). "Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum." Genes Dev **14**(8): 994-1004.
- Martins, C. P., et al. (2006). "Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors." Cell **127**(7): 1323-1334.
- Meek, D. W. (2015). "Regulation of the p53 response and its relationship to cancer." Biochem J **469**(3): 325-346.
- Mihara, M., et al. (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." Mol Cell **11**(3): 577-590.
- Montes de Oca Luna, R., et al. (1995). "Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53." Nature **378**(6553): 203-206.
- Nikulenkov, F., et al. (2012). "Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis." Cell Death Differ **19**(12): 1992-2002.
- Olive, K. P., et al. (2004). "Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome." Cell **119**(6): 847-860.
- Parada, L. F., et al. (1984). "Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation." Nature **312**(5995): 649-651.
- Perez-Caro, M., et al. (2009). "Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment." Embo j **28**(1): 8-20.

- Riley, T., et al. (2008). "Transcriptional control of human p53-regulated genes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 402-412.
- Serrano, M., et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Soga, T. (2013). "Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming." Cancer Sci **104**(3): 275-281.
- Sorrentino, G., et al. (2013). "The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53." Cell Death Differ **20**(2): 198-208.
- Srivastava, S., et al. (1990). "Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome." Nature **348**(6303): 747-749.
- Strom, E., et al. (2006). "Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation." Nat Chem Biol **2**(9): 474-479.
- Sykes, S. M., et al. (2009). "Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53." J Biol Chem **284**(30): 20197-20205.
- Tang, W., et al. (1999). "p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in gamma-irradiated mouse fibroblasts." Cancer Res **59**(11): 2562-2565.
- Tomita, Y., et al. (2006). "WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization." J Biol Chem **281**(13): 8600-8606.
- Tron, V. A., et al. (1998). "p53-dependent regulation of nucleotide excision repair in murine epidermis in vivo." J Cutan Med Surg **3**(1): 16-20.
- Tyner, S. D., et al. (2002). "p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes." Nature **415**(6867): 45-53.
- Vaseva, A. V., et al. (2012). "p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis." Cell **149**(7): 1536-1548.
- Vassilev, L. T., et al. (2004). "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2." Science **303**(5659): 844-848.
- Velasco-Hernandez, T., et al. (2013). "p53 restoration kills primitive leukemia cells in vivo and increases survival of leukemic mice." Cell Cycle **12**(1): 122-132.
- Ventura, A., et al. (2007). "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo." Nature **445**(7128): 661-665.
- Wade, M., et al. (2013). "MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy." Nat Rev Cancer **13**(2): 83-96.
- Wagner, A. J., et al. (1994). "Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1." Genes Dev **8**(23): 2817-2830.
- Wang, X. (2011). "p53 regulation: teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX." Cell Cycle **10**(24): 4225-4229.

Wolff, S., et al. (2008). "p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity." Cell Res **18**(7): 733-744.

Xue, W., et al. (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." Nature **445**(7128): 656-660.

You, H., et al. (2006). "Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9051-9056.

ANEXOS

ANEXO I: Reactivos utilizados en este trabajo de tesis

- Aceite de cacahuete (Sigma, P2144)
- Acetato de sodio (Merck, 1-06236)
- Ácido cítrico (Panreac, 131018)
- Acrilamida (BioRad, 151-0156)
- Anexina-FITC (Abcam, ab14082)
- Anti-ARF (Santa Cruz Biotechnologies, sc-32748)
- Anti-Ciclofilina D (Calbiochem, AP1035)
- Anti-GAPDH (Sigma, G8795)
- Anti-HMGB1 (Abcam, ab18256)
- Anti-Hsp90 (Santa Cruz Biotechnologies, sc-7947)
- Anti-Mdm2 (Abcam, ab16895)
- Anti-mouse (BioRad, 170-6516)
- Anti-mouse-Alexa568 (Invitrogen, A11031)
- Anti-p21 (BD Pharmingen, 556431)
- Anti-p53 (Novocastra, NCL-p53-CM5p)
- Anti-p53 acoplado a agarosa (Santa Cruz Biotechnologies, sc-6243)
- Anti-p53 fosforilado en Ser15 (Cell signaling, 9284S)
- Anti-rabbit (BioRad, 170-6515)
- Anti-rabbit-Alexa488 (Invitrogen, A11008)
- Anti-Ras (Calbiochem, OP40)
- Anti-VDAC (Calbiochem, PC548)
- APS (BioRad, 161-0700)
- BglIII (Fermentas, ER0082)
- β -mercaptoetanol para cultivos celulares (Sigma M7522)
- β -mercaptoetanol para Western blot (BioRad, 161-0710)
- Bromophenol blue (Sigma, B8026)
- BSA (Sigma, A7030)
- BSA Fracción V (Sigma, A9647)
- Bsu36I (New England Biolabs, R0524)
- Buffer D (Promega, R004A)
- Buffer E (Promega, R005A)
- Buffer J (Promega, R009A)
- Buffer O (Fermentas, OR5)
- Buffer R (Fermentas, BR5)
- Buffer 2 (New England Biolabs, B7002S)
- Ciprofloxacino (KABI)
- Cloroformo (Merck, 1-32950)
- Colchicina (Gibco, 15212-012)
- DAPI (Sigma, D9542)
- DEPC (Sigma, D5758)
- DiIc1 (Immunostep, MitoStep)

- DMEM para células ES y timocitos (Gibco, 21969-035)
- DMEM para fibroblastos (Sigma, D6546)
- DMF (Sigma, D4551)
- DMSO (Sigma, 154938)
- *DNA Amplitools Complex Master Mix* (Biotools B&M Labs, 4519)
- DNA de esperma de salmón (Roche, 223 646)
- DNAsa (Sigma, D5025)
- dNTPs para PCR (Invitrogen, 10297-018)
- dNTPs para Southern blot (Boehringer, 1 227 049)
- DOC (Sigma, D2510)
- DTT (Sigma, D9779)
- EcoRV (Fermentas, ER0301)
- EDTA (Sigma, E5134)
- EGTA (Sigma, E8145)
- Etanol (Merck, 1-00983)
- FBS para células ES (StemCell Technologies, 06952)
- FBS para fibroblastos y timocitos (Lonza, DE14-801F)
- Fenol (Sigma, P1037)
- Ferricianuro potásico (Sigma, P8131)
- Ferrocianuro potásico (Sigma, P9387)
- Ficoll-Paque® (Amersham, 17-1440-03)
- Formaldehído (Panreac, 252931-1212)
- Formalina para inmunofluorescencia y β -galactosidasa (Sigma, HT5011)
- Fosfato bisódico (Sigma, S5136)
- Giemsa (Merck, 1-09204)
- Glicerol (Merck, 1-04092)
- Glutaraldehído (Sigma, G5882)
- Goat serum (Jackson, 005-000-121)
- G-418 (Gibco, 066-1811)
- HEPES (Sigma, H3375)
- Hexanucleótidos (Pharmacia, 27-2166-01)
- *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, 4387406)
- *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, 11 732 668 001)
- Inhibidores de proteasas (Roche, 05 892 970 001)
- Inhibidores de fosfatasas (Roche, 04 906 845 001)
- *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche, 11 684 809 910)
- *I'SAP PCR cleanup kit* (IBIAN Technologies; iO5-S100).
- Isoamiloalcohol (Merck, 979)
- Isopropanol (Merck, 1-09634)
- KCl (Merck, 1-04933-0500)
- Klenow DNA polimerasa exo- (New England Biolabs, M0212S)
- L-Glutamina para células ES (StemCell Technologies, 07100)
- L-Glutamina para fibroblastos y timocitos (Lonza, BE17-605E)

- LIF (StemCell Technologies, 02740)
- Manitol (Panreac, 142067)
- Metanol (Merck, 1-06009-2511)
- $MgCl_2$ (Merck, 1-05833-1000)
- Mitomicina C (Sigma, M0503)
- MOPS (Sigma, M1254)
- NaCl (Merck, 1-06404)
- NaOH (Merck, 1-06462)
- NEA-A (StemCell Technologies, 07600)
- NP40 (Fluka, 74385)
- Nutlin-3 (Calbiochem, 444143)
- Osteosoft® (Millipore, 101728)
- PCR Kit: buffer, $MgCl_2$ y SuperHot Taq DNA polimerasa (Bioron, i01-H02)
- Penicilina/Estreptomicina para células ES (StemCell Technologies, 07500)
- Penicilina/Estreptomicina para fibroblastos y timocitos (Lonza, DE17-603E)
- Polybrene (Sigma, 107689)
- Proteinasa K (Roche, 03 115 801 001)
- Puromicina (Calbiochem, 540222)
- PvuI (Promega, R6321)
- Rojo Ponceau (Sigma, P7170)
- Sacl (Promega, R6061)
- Sacarosa (Merck 1-07651)
- Sarcosyl (Sigma, L7414)
- SDS (BioRad, 161-0301)
- Tamoxifén (Sigma, T5648)
- *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, 4369510)
- TEMED (BioRad, 161-0800)
- Tiocianato de guanidina (Fluka, 50990)
- Tripsina para células ES (StemCell Technologies, 07901)
- Tripsina para fibroblastos (Lonza, BE-17-161E)
- Tris base (Analar Normapur, 103156X)
- Tris HCl (Merck, 6-48317)
- Triton-X100 (Sigma, T8787)
- TrueBlot (eBioscience, 18-8816)
- Trypan blue (Sigma, T8154)
- Tween20 (Sigma, P1379)
- Vectashield® (Vector Laboratories, H-1000)
- X-Gal (Cell Signalling, 9860)
- Yoduro de propidio/RNAsa (Immunostep, PI/RNase)
- 7-AAD (Becton Dickinson, 559925)
- 4-OHT (Sigma, H7904)