



Posgrado en
Biología Experimental



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental
Unidad Iztapalapa

**“ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE MPS1 EN LA
INDUCCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE
CENTROSOMAS POR MUTANTES DE P53 EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER”**

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

Lic. En Biol. Exp. José Edwin Dolores García

Declaración de originalidad

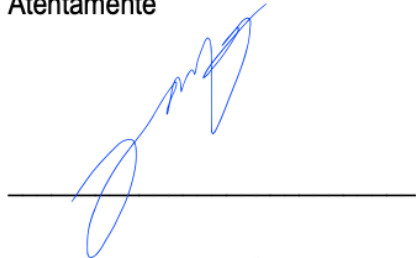
El (La) que suscribe **José Edwin Dolores García**, alumno (a) del posgrado en **Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **"ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE MPS1 EN LA INDUCCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE CENTROSOMAS POR MUTANTES DE P53 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER"**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de **Maestro en Biología Experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 18 de Junio del 2021.

Atentamente



José Edwin Dolores García

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Epigenética y Cáncer/Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología, México; bajo la dirección al frente de los mismos de la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez y el Dr. José De La Luz Díaz Chávez, respectivamente. Además del laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa., bajo la dirección del Dr. Héctor Fernando Serrano.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí la beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 753889/889717, en el período 2019-2021.

Los miembros del jurado, designados por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis “ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE MPS1 EN LA INDUCCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE CENTROSOMAS POR MUTANTES DE P53 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER” que presenta José Edwin Dolores García con fecha del examen 18 de junio de 2021.

MIEMBROS DEL JURADO



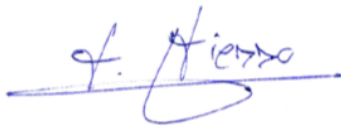
PRESIDENTE

Dr. José De La Luz Díaz Chávez
Laboratorio de Carcinogénesis
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología



SECRETARIO

Dr. Carlo César Cortés González
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología



VOCAL

Dr. Francisco Fierro Fierro
Departamento de Biotecnología, DCBS.
Universidad Autónoma Metropolitana



VOCAL

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz
Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS.
Universidad Autónoma Metropolitana

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Laboratorio de Epigenética y Cáncer, Subdirección de Investigación Básica -
Instituto Nacional de Cancerología. Tel: (55) 36935200. ext. 221. Correo
electrónico: dgisabel@hotmail.com

DIRECTOR

Dr. Héctor Fernando Serrano

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa, Tel: (55) 5804 4733. Correo electrónico: hser@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. José de La Luz Díaz Chávez

Laboratorio de Carcinogénesis, Subdirección de Investigación Básica – Instituto
Nacional de Cancerología. Tel: (55) 36935200 ext. 239. Correo electrónico:
jdiazchavez03@gmail.com

Resumen

La pérdida de función del supresor de tumores p53 debido a mutaciones provoca inestabilidad genómica en las células cancerosas. Las mutaciones de p53, se presentan en más del 50% de todos los tipos de cáncer en humanos; se caracterizan por una ganancia de función oncogénica y pérdida de las funciones de p53 silvestre en las células cancerosas. La amplificación de los centrosomas es reconocida como un proceso que favorece la inestabilidad genómica en células cancerosas, por lo que se considera importante en el inicio y la progresión del cáncer. En este sentido, se ha reportado que la sobre-expresión y/o estabilización de la proteína Mps1, está implicada en el proceso de la amplificación de los centrosomas durante el desarrollo de cáncer; en condiciones normales, Mps1 tiene un importante papel en el checkpoint de mitosis en el ciclo celular y se acumula en los centrosomas en una etapa tardía de G2. En este trabajo, analizamos si la mutante de p53-R248Q es capaz de inducir la amplificación de centrosomas y si la proteína Mps1 está involucrada en este proceso.

Nuestros resultados sugieren que la mutación R248Q de p53 induce la aparición de múltiples centrosomas en líneas celulares de cáncer; observamos este fenómeno en la línea celular Saos-2 (nula para p53) transfectadas de manera estable con la mutante p53-R248Q y en la línea celular OVCAR-3 que presenta esta mutación endógenamente. Para analizar si este proceso aberrante derivado de la mutación p53-R248Q estaba siendo regulado por la proteína Mps1, analizamos los niveles de la proteína Mps1 pero encontramos resultados contradictorios, en las células OVCAR-3 observamos niveles altos de Mps1, mientras que en las células Saos-2 transfectadas con la mutante p53-R248Q los niveles de Mps1 disminuyeron en comparación con el control. En resumen, podemos concluir que la mutante p53-R248Q induce la amplificación de centrosomas en nuestro modelo celular, sin embargo este proceso no es regulado por la proteína Mps1, por lo que la mutante p53-R248Q podría tener un papel importante en el desarrollo de aneuploidías, a través de la reduplicación de los centrosomas, ocasionando una errónea segregación de los cromosomas, pero hacen falta más estudios para elucidar el

posible mecanismo de amplificación de centrosomas inducido por las proteínas mutantes de p53.

Abstract

Loss of function of the p53 tumor suppressor due to mutations causes genomic instability in cancer cells. Mutations of p53, which occur in more than 50% of all human cancers, are characterized by a gain of oncogenic function and loss of wild-type p53 function in cancer cells. Centrosome amplification is known to be a process that favors genomic instability in cancer cells and is therefore considered important in cancer initiation and progression. In this way, it has been reported that overexpression and/or stabilization of the Mps1 protein is involved in the process of centrosome amplification during cancer development; under normal conditions, Mps1 has an important role in the mitosis checkpoint in the cell cycle and accumulates in centrosomes at a late G2 stage. In this work, we analyzed whether the p53-R248Q mutant is able to induce centrosome amplification and whether the Mps1 protein is involved in this process.

Our results suggest that the R248Q mutation of p53 induces the appearance of multiple centrosomes in cancer cell lines; we observed this phenomenon in the Saos-2 cell line (null for p53) stably transfected with the p53-R248Q mutant and in the OVCAR-3 cell line that endogenously presents this mutation. To analyze whether this aberrant process derived from the p53-R248Q mutation was being regulated by the Mps1 protein, we analyzed Mps1 protein levels but found contradictory results, in OVCAR-3 cells we observed high levels of Mps1, while in Saos-2 cells transfected with the p53-R248Q mutant Mps1 levels were decreased compared to the control. In summary, we can conclude that the p53-R248Q mutant induces centrosome amplification in our cell model, however, this process is not regulated by the Mps1 protein, so the p53-R248Q mutant could have an important role in the development of aneuploidy through centrosome reduplication, causing chromosome missegregation, however, further studies are needed to elucidate the possible mechanism of centrosome amplification induced by the p53 mutant proteins.

Índice

Introducción	8
El cáncer	8
Funciones de la proteína p53	9
Mutaciones de p53 en el cáncer	10
Ganancia de función de p53 en la inestabilidad genómica	13
Impacto de las mutaciones de p53 en la ploidía de las células cancerosas	13
Inestabilidad genómica en el cáncer	14
Amplificación de centrosomas en el cáncer	15
Participación de MPS1 en la amplificación de centrosomas	18
Resumen	5
Abstract	6
Antecedentes	20
Justificación	22
Pregunta de investigación	23
Hipótesis	23
Objetivo General	23
Objetivos particulares	23
Diseño experimental	24
Materiales y métodos	24
Resultados	28
Amplificación de plásmidos	28
p53-R248Q induce la amplificación de centrosomas	30
La mutante de p53 R248Q disminuye la expresión de Mps1	32
Pifitrina- α disminuye los niveles de p53-R248Q en OVCAR-3	33
Pifitrina- α no afecta la sobrevivencia celular en OVCAR-3	34
Pifitrina- α disminuye la amplificación de centrosomas en OVCAR-3	36
Discusión	38
Conclusión	42
Referencias	43

Introducción

El cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial en la que la acumulación de aberraciones genómicas en las células como mutaciones, deleciones, translocaciones o todas ellas conducen a la inestabilidad genética, permitiendo a las células una autonomía para proliferar sin control, resistir a la muerte celular y reprogramar el metabolismo celular. En consecuencia, las células cancerosas adoptan la capacidad de migrar, inducir angiogénesis, invasión y metástasis para formar masas de tejidos desordenados que invaden y destruyen el tejido normal y su función. Durante el cáncer, estos procesos se desencadenan cuando las células atraviesan por una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que inactivan diversos genes supresores de tumores, en especial los encargados del control del ciclo celular que guardan un equilibrio en la proliferación celular (Ozaki & Nakagawara, 2011., Fouad & Aanei, 2017).

Por otro lado, también se lleva a cabo la activación de oncogenes que favorecen el crecimiento y la proliferación celular exacerbada, causando un desbalance entre el control del ciclo celular, el crecimiento de las células y otros fenómenos importantes que favorecen el desarrollo del cáncer (Graziano & Gonzalo, 2017). De esta manera las células tumorales aprovechan este tipo de fenómenos para obtener los suficientes componentes celulares esenciales; principalmente ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, que dictaminan el fenotipo celular del cáncer (Currie *et al.*, 2013).

Dentro del desbalance entre genes supresores de tumores y protooncogenes que ocurren en el cáncer, así como las modificaciones sobre algunos principales actores moleculares involucrados en vías de señalización que regulan de una forma normal a la célula, las alteraciones sobre estos, tales como mutaciones, permiten a las células cancerosas tomar ventaja en su progresión; a través de la hiper-activación de las vías de señalización y la inactivación de genes supresores de tumores que inhiben esenciales reguladores negativos de la señalización (Sever & Brugge,

2015). Las mutaciones oncogénicas afectan genes provocando su sobre-expresión o producen proteínas mutadas. Estas proteínas se encuentran frecuentemente involucradas en vías de señalización que se ven comúnmente sobre-activadas durante la fisiopatología del cáncer; por ejemplo, receptores tirosina-cinasa (RTKs: EGFR), GTPasas pequeñas (Ras), serina-treonina cinasas (Raf y Akt), tirosina-cinasas citoplasmáticas (Src y Abl), cinasas lipídicas (PI3Ks), incluso receptores nucleares (ER), así como factores de transcripción (c-Myc y NF- κ B), remodeladores de cromatina (EZH2) y efectores del ciclo celular (CDKs y ciclinas) (Sever & Brugge, 2015).

La inactivación de reguladores negativos del ciclo celular debido a deleciones y diversas mutaciones, recae principalmente en el supresor de tumor p53; también llamado “guardián del genoma”, p53 es el gen que se muta con mayor frecuencia en el cáncer, sus principales funciones son el control de la proliferación celular, apoptosis y respuesta al daño del DNA (Sever & Brugge, 2015).

Funciones de la proteína p53

El conjunto de mutaciones que ocurre durante el inicio y el desarrollo del cáncer afectan directamente a las proteínas que participan en la respuesta al daño del DNA, el arresto del ciclo celular y la apoptosis, entre ellas se encuentran factores de transcripción que tienen como blanco ciertos genes que regulan este tipo de procesos, como la proteína supresora de tumores p53, la cual está conformada por tres dominios funcionales: el de trans-activación, en el extremo NH₂-terminal, el de unión al DNA y el de oligomerización que se encuentra en el COOH-terminal. Este último permite que p53 sea funcional al formar un homo-tetrámero, el cual se ensambla en respuesta al daño del DNA y al estrés celular. La proteína p53 se acumula en el núcleo debido a modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones y acetilaciones que provocan su activación, liberándolo de la proteína E3 ubiquitina ligasa (MDM2) que lo mantiene en constante degradación por el proteosoma, en el citoplasma de la célula. De esta manera cuando las células presentan estrés causado por el daño al DNA, p53 induce la expresión de genes de

reparación y que detienen el ciclo celular, en caso de que el daño no sea reparado; así mismo, p53 puede promover la expresión de genes que inducen la muerte celular para evitar que el daño se propague hacia las células hijas (You & Jones, 2012., Ozaki & Nakagawara, 2011., Amelio & Melino, 2020).

Mutaciones de p53 en el cáncer

Además de las funciones específicas de p53, en respuesta al estrés celular, se ha encontrado que esta proteína juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, pues se sabe que más de la mitad de los tipos de cáncer humano presentan mutaciones que repercuten directamente en la pérdida de función de p53. Se ha reportado que el 95% de estas mutaciones se presentan en la región del gen que corresponden a los exones 5 a 8, que codifican para el dominio de unión al DNA. En consecuencia, se traduce una proteína p53 mutada que carece de la capacidad de unirse a las secuencias de los promotores de sus genes blanco. Así mismo, las mutantes de p53 pueden ejercer un efecto dominante negativo sobre la proteína p53 silvestre, debido a la formación de hetero-oligómeros con p53 silvestre, donde predomina la forma mutante de p53 que actúa como un inhibidor dominante negativo, esta inactivación se debe principalmente a la vida media de p53 silvestre (20 minutos) comparado con el de la mutante (2 a 12 horas) (Ozaki & Nakagawara, 2011).

Por otro lado, existen evidencias de que algunas mutantes de p53 no sólo pierden las funciones supresoras de la proteína p53 silvestre, sino que son capaces de activar la expresión de factores de crecimiento y oncogenes que conducen a la progresión del cáncer, es decir, se genera la ganancia de función de p53 mutada. Este fenómeno fue demostrado mediante un modelo de ratón homocigoto recesivo para p53 ($p53^{-/-}$), con pérdida funcional, pero que posteriormente desarrolló varios tipos de tumores tempranos. El tiempo de aparición de tumores en los ratones heterocigotos ($p53^{+/-}$) es mayor que en los ratones homocigotos recesivos; sin embargo, los ratones heterocigotos eventualmente desarrollan tumores y estos

generalmente presentan mutaciones del alelo p53 silvestre (Tarapore & Fukasawa, 2002., Walerych *et al*, 2018).

Entre los genes supresores de tumores, p53 es considerado como un gen supresor de tumores canónico ya que es capaz de responder a diferentes tipos de estrés en las células, así como coordina vías de señalización y procesos efectoros que protegen a la homeostasis de las células y a estabilidad genómica (Mantovani *et al*, 2018). Su inactivación otorga las ventajas necesarias para el desarrollo y progresión del cáncer, por lo que datos encontrados en humanos, ratones y ensayos en líneas celulares han asociado las mutaciones de p53 con diversos aspectos de la tumorigénesis, incluyendo la síntesis de DNA, proliferación y sobrevivencia celular, quimiorresistencia, amplificación de centrosomas, puntos de arresto de mitosis anormales y la metástasis (Freed-Pastor & Prives, 2012., Strano *et al*, 2007). De esta forma, se conoce que existen mutaciones somáticas y germinales en el gen TP53, las mutaciones somáticas se encuentran alrededor del 38%-50% en cáncer de ovario, cabeza y cuello, esófago, colorectal y de riñón; otro 5% de estas mutaciones están presentes en leucemia primaria, sarcoma, melanoma y cáncer cervical y de testículo. En lo que respecta a las mutaciones germinales las cuales causan el síndrome de Li-Fraumeni que predispone a un amplio espectro de cánceres de aparición temprana, alrededor del 50% de estas se concentran en el cáncer de mama y sarcoma de tejidos blandos y huesos, seguidos de carcinomas de la corteza suprarrenal y tumores cerebrales. Debido a estas alteraciones genéticas que se producen en p53, este supresor de tumores no puede regular las diversas vías biológicas canónicas para limitar el desarrollo de los tumores, como inducir la muerte celular o la senescencia de las células cancerosas o incluso promover sus funciones supresoras de tumores a través de la señalización de citoquinas deteniendo el ciclo celular y activando la apoptosis, así como regular una adaptación metabólica del microambiente tumoral acoplado a la glucosa (Mantovani *et al*, 2018., Olivier *et al*, 2009., Blagih *et al*, 2020).

La mayoría de las mutaciones de p53 son de sentido erróneo (*missense mutations*; en inglés), son de tipo somáticas y ocurren principalmente en el dominio de unión al DNA. Las mutantes de proteínas p53 derivadas de tumores se denominan con letras y números, donde la primera letra representa el aminoácido antes de la mutación, el número representa la posición del aminoácido contando desde el amino terminal y la última letra representa el aminoácido presente en la proteína p53 mutada; por ejemplo, en p53-R175P hay un cambio de arginina (R) por prolina (P) en el aminoácido 175.

De las mutantes de p53 se han identificado algunas como la señalada de p53-R175P, que pueden inducir el arresto del ciclo celular pero no la apoptosis. Sin embargo, no todas las mutaciones de p53 son iguales y los eventos mutagénicos en el DNA generalmente surgen por eventos exógenos (mutágenos ambientales) o por eventos endógenos espontáneos (errores de la replicación, depurinación o errores en la reparación del DNA). Así mismo, algunas mutantes de p53 pueden ejercer efectos de ganancia de función o algunas otras pueden ser seleccionadas durante las tumorigénesis por el hecho de suprimir la actividad de p53-WT. Es por eso que las mutaciones de p53 se pueden clasificar como mutantes de contacto al DNA (Clase I), que son mutaciones de sentido erróneo en los residuos de aminoácidos que normalmente pueden direccionar el contacto con las secuencias blanco del DNA, representadas por p53-R248Q; y mutantes conformacionales (Clase II) que afectan la estructura de la proteína, representada por p53-R175H (Freed-Pastor & Prives, 2012., Strano *et al.*, 2007). Se han considerado ciertas mutaciones en sitios “calientes” (*hot spot*) con sentido erróneo en el gen TP53, con la ganancia de función de la proteína, que afectan a un grupo de residuos con alta frecuencia de mutaciones que, en conjunto, representan alrededor de un tercio de todas las mutaciones de p53. Los aminoácidos que son generalmente observados como *hot spot* se encuentran mutados en muchos tipos de cáncer (mutaciones como: R175, G245, R248, R249, R273 y R282) (Freed-Pastor & Prives, 2012., Strano *et al.*, 2007).

Ganancia de función de p53 en la inestabilidad genómica

Algunas de las mutaciones en p53 como la R175H impacta sobre la inestabilidad genómica; por ejemplo se ha reportado en un modelo de ratón que la mutante p53-R175H, ejerce un mayor impacto en la promoción tumoral en comparación con células p53 $-/-$, debido a que los ratones mueren más rápido y presentan más tumores, esto debido a su capacidad de inhibir a proteínas responsables en la respuesta al daño al DNA ,como ATM, promoviendo la inestabilidad genómica. Así mismo, se ha observado que las mutantes R248W y R273H inducen las translocaciones intercromosómicas (Xu, 2008, Liu *et al.*, 2009). Por otro lado, en líneas celulares de cáncer se han desarrollado diferentes métodos para inducir mutaciones *hot spot* de p53 y aprovechar las mutaciones endógenas que estas puedan tener. Así se ha estudiado en adenocarcinoma de colon que las mutantes R273H y R175H de p53 en las células LoVo presentaron aneuploidías en comparación con LoVo p53 silvestre. Sin embargo, sólo en R175H se encontraron telómeros más largos que en R273H en comparación con p53 silvestre, y en R275H se encontró la disminución de la expresión de ATM y ATR, lo que indica que las mutantes p53 son suficientes para generar inestabilidad genómica (Samassekou *et al.*, 2014,). De hecho, diferentes reportes, indican que las mutaciones de p53, además de promover aneuploidías, inducen la amplificación de genes relacionados con la quimiorresistencia en pacientes con cáncer de ovario (Zhang *et al.*, 2017). Por lo tanto, es evidente que la ganancia de función de las mutaciones de p53 correlaciona con presencia de la inestabilidad genómica en cáncer.

Impacto de las mutaciones de p53 en la ploidía de las células cancerosas

Las mutantes de p53 inducen la síntesis descontrolada de factores de crecimiento y otros oncogenes que conducen hacia la carcinogénesis, así mismo participan directa o indirectamente sobre algunos o todos los eventos que caracterizan principalmente al cáncer, como la resistencia a la muerte celular, mantenimiento de la señalización proliferativa, la inmortalidad replicativa, evasión de supresores de crecimiento, inducción de la angiogénesis y la inestabilidad genómica. Respecto a esta última característica existen evidencias experimentales y clínicas que sugieren

una fuerte correlación entre la pérdida o ganancia de función de p53 y la inestabilidad cromosómica (cambios en el número de juego de cromosomas de una célula o “ploidía”) considerándose como una vía de gran impacto hacia la carcinogénesis (Hanahan & Weinberg, 2011., Tarapore & Fukasawa, 2002). Dadas las acumulaciones de aberraciones genómicas, p53 ha sido considerada como una de las primeras líneas de defensa, así como genes que se encuentran involucrados en el ciclo celular y el daño al DNA para mantener la estabilidad genómica (Blagosklonny, 2000., Eischen, 2016). Se ha propuesto que los cambios de la ploidía en las células cancerosas se deben a una tasa elevada de la segregación de los cromosomas, donde la pérdida de p53 juega un papel importante desencadenando inestabilidad genómica, entre ella las aneuploidías, es decir, la aparición de un número anormal de cromosomas que se observan en los cariotipos de este tipo de células y, con frecuencia, varían de 40 a 60 cromosomas (Thompson & Compton, 2010).

Inestabilidad genómica en el cáncer

Para que una célula cuente con las condiciones necesarias que requiere para conservar su integridad y esta se propague en las células hijas es necesario que cuenten con una maquinaria específica que guarde su estabilidad, especialmente de su material genético ya que mantener una buena homeostasis genómica da a la célula un adecuado funcionamiento sobre los errores en la duplicación del DNA, estrés endógeno causado por el metabolismo celular (ROS) y daños causados por agentes carcinogénicos exógenos, tales como luz ultravioleta, radiación ionizante o químicos que dañan al DNA. Dado que estos procesos pueden ser vulnerables en la progresión del ciclo celular, deben ser bien regulados. Sin embargo, cuando estos eventos no se ven controlados, pueden poner en riesgo la integridad del genoma y desarrollar aberraciones en las células a través de diferentes tipos de errores, tales como mutaciones principalmente. Eventualmente estas anomalías podrán dar paso a desordenes que engloba en gran parte la inestabilidad genómica/cromosómica y pueden culminar en defectos en el desarrollo,

deterioración de tejido, envejecimiento prematuro y cáncer (Wang & Lindahl, 2016., Wei Dai, 2014., Aguilera & García-Muse, 2013).

La inestabilidad genómica es considerada un *hallmark* del cáncer y tiene una estrecha relación con p53, la inestabilidad genómica puede dar paso a la iniciación y progresión del cáncer, puede comenzar a presentarse desde el daño a los telómeros, modificaciones epigenéticas y daño al DNA, y la amplificación de centrosomas (Hanel & Moll, 2012). En condiciones normales, los cromosomas son segregados por la unión al huso de microtúbulos altamente organizado que se forma durante la división celular; el huso tiene simetría de espejo con los ásteres de los microtúbulos que fueron duplicados, conectados por un entrecruzamiento con microtúbulos polares de cada polo del huso. Por esta estructura simétrica, las cromátidas duplicadas se unen y se separan diametralmente durante la anafase para dar proporciones iguales a cada célula hija; sin embargo, una de las principales causas de la inestabilidad cromosómica en células tumorales radica en errores durante la división mitótica debido a que los husos mitóticos suelen tener más de dos polos, provocando que los cromosomas se segreguen de manera asimétrica, dejando a las células hijas con un número anormal de cromosomas. Estos mecanismos, a su vez, están asociados a un centro organizador de microtúbulos, que no es necesario para la formación del huso, pero si es importante para lograr la segregación normal de los cromosomas en células animales, denominado centrosoma (Saunders, 2005).

Amplificación de centrosomas en el cáncer

El centrosoma es el principal organizador de microtúbulos en las células animales, es un pequeño organelo no membranoso (1-2 μm de diámetro), se cree que está compuesto por más de 150 proteínas y normalmente se encuentran en la periferia del núcleo. Juega un papel importante en la polaridad, migración y división celular, durante la interfase participan en el transporte de vesículas, la distribución adecuada de pequeños organelos y dan forma y polaridad celular. El centrosoma está conformado por un núcleo centriolar altamente organizado, compuesto por un par

de cilindros de microtúbulos dispuestos ortológicamente en forma de barril (centriolos) que se encuentran embebidos en una estructura proteínica compleja, denominado material pericentriolar. Durante la división celular, cada célula hija debe recibir solo un centrosoma y este debe duplicarse sólo una vez durante la fase S, al igual que el DNA antes de la siguiente mitosis. En la mitosis los dos centrosomas forman los polos del huso y dirigen la formación de husos mitóticos bipolares que son importantes para una correcta segregación de los cromosomas a las células hijas durante la citocinesis. Los centrosomas y el DNA son los únicos dos organelos que atraviesan por una duplicación semi-conservativa una sola vez por cada ciclo celular (Godinho & Pellman, 2014., Gönczy, 2015., Saunders, 2005., Fukasawa, 2005).

Los centrosomas juegan otros papeles importantes, como controlar la iniciación de la citocinesis y la entrada a la fase S del ciclo celular (Godinho & Pellman, 2014., Saunders, 2005).

En una amplia variedad de tipos de cáncer en humanos: mama, próstata, colon, ovario, páncreas e incluso neoplasias hematológicas como mieloma múltiple, linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin, leucemia mieloide crónica y aguda se ha observado la prevalencia de anomalías centrosomales. Los defectos en los centrosomas se dividen en aberraciones estructurales, donde las alteraciones se dan en el tamaño del centriolo, principalmente en el aumento de su longitud, y aberraciones numéricas o amplificación de centrosomas, estas últimas se encuentran descritas con más frecuencia en el cáncer por las importantes alteraciones que provocan en el ciclo de duplicación del centrosoma, que cuenta con una estricta regulación de muchos de sus componentes (Godinho & Pellman, 2014). El cambio en la ploidía de las células va acompañado de la formación de husos mitóticos monopolares o multipolares que resulta en la segregación anormal de los cromosomas a las células hijas, este tipo de defecto puede desencadenar el proceso de la carcinogénesis en gran medida debido a problemas con los centrosomas (Krämer *et al.*, 2002). Se ha reportado que la amplificación de centrosomas y otros cambios en ellos ocurren muy temprano en la carcinogénesis,

están relacionados con el incremento de la inestabilidad genómica y con tumores con mal pronóstico, convirtiéndose en un biomarcador de enfermedad avanzada en el cáncer (Godinho & Pellman, 2014., Saunders, 2005., Levine *et al.*, 2017).

En líneas celulares de cáncer, el aumento en la replicación de los centrosomas está asociado con la baja actividad de p53 silvestre o por su inactivación debido a mutaciones (Saunders, 2005., Lopes *et al.*, 2018). Se han descrito dos posibles mecanismos por los cuales los centrosomas pueden llegar a amplificarse en células nulas para p53 (Tarapore & Fukasawa, 2002):

- 1) Omitir el proceso de la citocinesis. Si las células cumplen de manera normal con el ciclo celular, incluida la síntesis del DNA, pero omiten la citocinesis y reanudan el siguiente ciclo celular, las células contarán con el doble de la cantidad normal de DNA y el número de centrosomas.
- 2) Fallo en el ciclo de duplicación del centrosoma. Si las células pasan por rondas de duplicación de centrosomas en un ciclo celular, el resultado será un mayor número de centrosomas, a pesar de que contengan cantidades normales de DNA.

Es por eso que la homeostasis de los centrosomas se encuentra altamente regulada por las células; sin embargo, durante el inicio y el desarrollo del cáncer, el agotamiento de la regulación centrosomal en las células transformadas puede resultar en la amplificación de los centrosoma y estas células los pueden amplificar de manera frecuente en formas múltiples (>2). En este sentido, células tripolares pueden realizar citocinesis, algunas de estas células hijas provenientes de esta división son viables, pero sufren una aneuploidía severa, otras células hijas no son viables debido a cambios en el cariotipo que son frecuentemente graves. Las células con los husos con polos (>3) no sufren citocinesis y se convierten en células grandes binucleadas o mononucleadas, estas células pueden ser arrestadas en presencia de p53 y eventualmente dirigirse hacia la muerte celular; sin embargo, cuando p53 está ausente en el *checkpoint* de citocinesis, este tipo de células continúan su ciclo

y se convierten en células multi-nucleadas (>2), encontrándose células con hasta 8 núcleos (Fukasawa, 2005).

Participación de Mps1 en la amplificación de centrosomas

En la duplicación normal de centrosomas se requieren de proteínas que generalmente tienen un papel importante en el ciclo celular y se encuentran regulando de manera ordenada este tipo de procesos desde la interfase hasta llegar a la mitosis. Por ejemplo, Mps1 (Mono polar spindle 1; en inglés) es una proteína-quinasa necesaria en el *checkpoint* de mitosis; esta quinasa se ha encontrado en todos los eucariontes y su función en el *checkpoint* se encuentra conservada. Reside principalmente en el citoplasma durante G1, cuando la célula se encuentra en una etapa tardía G2 se acumula en los centrosomas y la envoltura nuclear (Kasbek *et al.*, 2009., Liu & Winey, 2012., Krämer *et al.*, 2002). De hecho, los niveles del mensajero y proteína de Mps1 y su actividad quinasa alcanzan un punto máximo durante la mitosis. En la fase de G1/S, Mps1 muestra un incremento importante de alta actividad específica que coincide con la duplicación de centrosomas; un segundo incremento importante se da en la fase G2/M que coincide con *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico (Pike & Fisk, 2011). La función de Mps1 es regulada por Cdk2, la asociación de Cdk2-Ciclina A fosforila en Thr468 a Mps1 para evitar su degradación mediada por proteosoma, lo que permite su acumulación en el centrosoma donde participa en su duplicación. Resulta interesante que se han reportado niveles elevados de mRNA y proteína de Mps1 en distintos tipos de cáncer humano: cerebro, mama, pulmón, colon, próstata, ovario, páncreas, ducto biliar y cabeza y cuello (Kasbek *et al.*, 2009., Liu & Winey, 2012., Krämer *et al.*, 2002).

Mps1 se identificó originalmente por tener un papel importante en la duplicación del cuerpo polar del huso en la levadura *ciernes*, Mps1 fue nombrado para el fenotipo de las células mutantes que no llevan a cabo la duplicación del cuerpo polar del huso y forman husos monopolares al entrar en mitosis. Gracias a la identificación de esta proteína se lograron conocer otros procesos celulares donde tiene un papel

importante: la detención mitótica inducida por hipoxia y el *checkpoint* del ensamblaje meiótico en moscas, además de la regeneración de tejidos en peces. Por otro lado, se ha visto la participación de Mps1 en humanos en procesos tales como la duplicación de los centrosomas, regulación en el *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico, la señalización de las proteínas SMAD, el *checkpoint* post-mitótico dependiente de p53, respuesta al daño del DNA dependiente de Chk2 y la citocinesis (Pike & Fisk, 2011).

Una de las principales regulaciones de Mps1 en el ciclo celular se encuentra en la fase G1 a S, que en las células de los vertebrados marca un punto de no retorno, donde se ha mostrado un incremento de la actividad cinasa de esta proteína en esta transición con poco cambio asociado a niveles de proteína total, por lo que se podría tratar de una función específica de Mps1 en la duplicación de los centrosomas controlado por una modificación post-traducciona. En ratones, se ha observado que Cdk2 suprime la degradación de Mps1 mediada por proteosoma a su vez que en células humanas la sobreexpresión de Ciclina A-Cdk2 causan la reduplicación de centrosomas. Tomando esto en conjunto se ha reportado que la asociación de Ciclina A-Cdk2 regula específicamente la degradación de Mps1 en una cierta región de la proteína, conocido como MDS (Mps1 Degradation Signal; en inglés) que corresponden a los aminoácidos 420-507 que están codificados por los exones 12 y 13 de Mps1. El MDS es responsable de la eliminación dependiente de proteosoma de Mps1 de los centrosomas en ausencia de la actividad de Cdk2 y existe un único sitio que puede ser fosforilado por Ciclina A-Cdk2 en Thr468 (Pike & Fisk, 2011). En general se puede enunciar que la supresión de la degradación de Mps1 basta para provocar la reduplicación de los centrosomas y se han descrito al menos tres procesos importantes por los cuales esto puede suceder experimentalmente para tratar de entender como se comporta Mps1 en los distintos tipos de cáncer en humanos (Kasbek *et al.*, 2009):

- 1) Inhibir la maquinaria de degradación (proteosoma).
- 2) Sobre-regulación de Cdk2 (sobreexpresión de Ciclina A1 o A2)

- 3) Mutaciones de Mps1 que asemejan la fosforilación de Cdk2 o remueven la señal de degradación de Mps1.

Antecedentes

Los cambios en la ploidía mediada por p53 se han observado en líneas celulares de cáncer con p53 mutada, teniendo un incremento en la tendencia dirigida hacia la formación de aneuploidías, lo cual estaría resultando en un incremento de la supervivencia de estas células en ausencia de la vigilancia genómica mediada por p53. En condiciones normales, la proteína p53 se localiza en los centrosomas antes y después de su duplicación, controla la replicación de los centrosomas, independientemente de su papel como regulador transcripcional. La proteína p53 se disocia de los centrosomas en las células con alteraciones mitóticas y se estabiliza en el citoplasma, induciendo el arresto en el siguiente ciclo celular en G1. Cuando dichas alteraciones mitóticas ocurren en las células nulas para p53, el arresto en el ciclo celular no se lleva a cabo (Saunders, 2005), por lo que se ha enunciado que la pérdida de p53 es una parte esencial para iniciar la amplificación de los centrosomas, debido a que los cambios en estos y su amplificación se han visto mayormente en tumores con la persistente actividad de p53 mutado (Saunders, 2005). Así mismo se ha demostrado que la inactivación mutacional de p53 inicia múltiples rondas de replicación de centrosomas dentro de un solo ciclo celular, donde p21 (CIP1/WAF1) inhibidor de Cdk2 juega un rol importante en su regulación, ya que la expresión inducida de p21 en células p53^{-/-} restaura parcialmente el control de la duplicación de centrosomas, por lo contrario la reducción de p21, así como la sobreexpresión del inhibidor de p53, mdm2 da como resultado la amplificación del centrosoma y poliploidía en las células. Datos de este tipo se muestran en células epiteliales primarias de ratones nulas para p53, ya que en cultivos celulares prolongados muestran hiper-amplificación de centrosomas e inestabilidad cromosómica con alta frecuencia en las células de pasaje temprano a medio, de modo que la heterogeneidad en el número de cromosomas como la amplificación de centrosomas disminuye en las células de pasaje tardío (Tarapore *et al.*, 2001., Mussman *et al.*, 2000).

Los defectos de los centrosomas y la generación de aneuploidías, como una de las características del cáncer, se propusieron originalmente en 1914 por Boveri, quien observó que las células cancerosas comúnmente tienen ciertas alteraciones en los centrosomas, principalmente el aumento en su número y con ello postuló que los cambios en la funcionalidad de los centrosomas pueden ser clave para la formación del cáncer. Estudios realizados en distintos tipos de cáncer se han visto ligados con aneuploidías e inestabilidad cromosómica, debido a que los defectos de los centrosomas siempre van acompañados con cambios en el complejo cromosómico, algunos estudios sugieren que estos cambios ocurren relativamente tarde en la progresión del tumor; sin embargo, otros reportes señalan que los defectos en los centrosomas aparecen muy temprano en etapas pre-malignas de la formación del tumor, incluso antes de que aparezcan lesiones detectables. Los defectos en los centrosomas se han observado en varios tipos de carcinomas humano: vesícula biliar, pulmón, hueso, ovario, hígado, páncreas, colon, próstata, cabeza y cuello (Saunders, 2005., Fisk *et al.*, 2003). La amplificación de centrosomas se ha reportado en lesiones pre-malignas de ratones transgénicos que expresan las oncoproteínas E6, E7 o ambas del virus del papiloma humano (VPH16), entre el 30-72% de carcinomas pre-invasivos en cuello uterino, mama y próstata lo que es raramente observado en tejido normal. Así mismo, datos observados en células de carcinoma cervical han demostrado defectos en los centrosomas que incrementan severamente durante la progresión del tumor, aumentando la amplificación de centrosomas hasta un 70% (Saunders, 2005). En nuestro laboratorio se demostró que la oncoproteína E7 es capaz de aumentar la expresión de Mps1, una proteína importante en la regulación de la duplicación de los centrosomas. Resulta interesante que una mutante carente de los exones 12 y 13 de Mps1 (Mps1 Δ 12/13), brinda a la proteína mayor estabilidad e induce un aumento en la replicación de centrosomas en distintas líneas celulares. Además, la expresión de una mutante negativa de Mps1, carente de actividad cinasa y su depleción con siRNAs, previenen la duplicación de los centrosomas (Fisk *et al.*, 2003., Kasbek *et al.*, 2009). Debido a que varios reportes indican que algunas mutantes de p53 pueden inducir

la amplificación de centrosomas y la pérdida en la regulación de las proteínas implicadas en la duplicación de estos (Ghaleb *et al.*, 2020), así como también Mps1 puede inducir este fenómeno; como se ha reportado en ratones con linfoblastomas que cuentan con la delección heterocigótica de p53, más alteraciones en la proteína Mps1, la cual provoca aneuploidía, desalineación y rezago de cromosomas (Fojijer *et al.*, 2014).

En nuestro laboratorio se ha analizado la presencia de la proteína Mps1 en diferentes tipos de líneas celulares que cuentan con características específicas de p53: Saos-2, proveniente de un osteosarcoma que cuenta con una delección homocigota de p53, MCF-10A & SKBR3; cáncer de mama, que cuenta con p53 silvestre y una mutación R175H de p53 respectivamente, OVCAR-3; cáncer de ovario, que cuenta con la mutación R248Q de p53 y C33A; cáncer de cérvix, que cuenta con la mutación R273C de p53. Derivado del panel, las densitometrías reflejan una cantidad elevada de Mps1 en OVCAR-3 comparado con Saos-2, resultados que coinciden dado que existen reportes de una frecuencia elevada de la mutación R248Q en p53 que produce inestabilidad genómica, es por eso que se hipotetizó que las mutantes de p53 son capaces de inducir la sobre-expresión de Mps1 y, por lo tanto, la amplificación de los centrosomas.

Justificación

Actualmente el cáncer es un problema de salud pública que afecta a una gran parte de la población a nivel mundial, convirtiéndose en una de las principales causas de muerte. Se ha observado que las células que cuentan con p53 mutado (OVCAR-3) presentan una alta tasa de inestabilidad cromosómica en comparación con células nulas para p53 (Saos-2); sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales las mutantes de p53 podrían inducir la inestabilidad genómica.

Una de las principales causas de la inestabilidad genómica es la amplificación de centrosomas. Por lo que es importante estudiar el mecanismo de amplificación de los centrosomas para identificar proteínas implicadas en la agresividad de los tumores, por ejemplo, en nuestro laboratorio se identificó que la proteína Mps1 está

implicada en la amplificación de centrosomas inducida por la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano del tipo 16 (VPH16). En este sentido, y para avanzar en el conocimiento de estos mecanismos, proponemos ahora analizar el papel de las mutantes de p53 (específicamente R248Q) sobre la regulación de la proteína Mps1 y su asociación sobre la amplificación de centrosomas en líneas celulares de cáncer (Saos-2, OVCAR-3 y MCF-7).

Los resultados que se obtengan del presente estudio permitirán conocer la relación que existe entre la proteína cinasa Mps1 involucrada en el ciclo celular y las mutaciones (R248Q) que pueden llegarse a presentar en la proteína p53 en el cáncer.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto de la mutante p53-R248Q sobre la proteína MPS1 en células y la amplificación de centrosomas?

Hipótesis

La proteína mutante p53-R248Q induce la amplificación de centrosomas a través de un aumento en la expresión de Mps1 en líneas celulares de cáncer.

Objetivo General

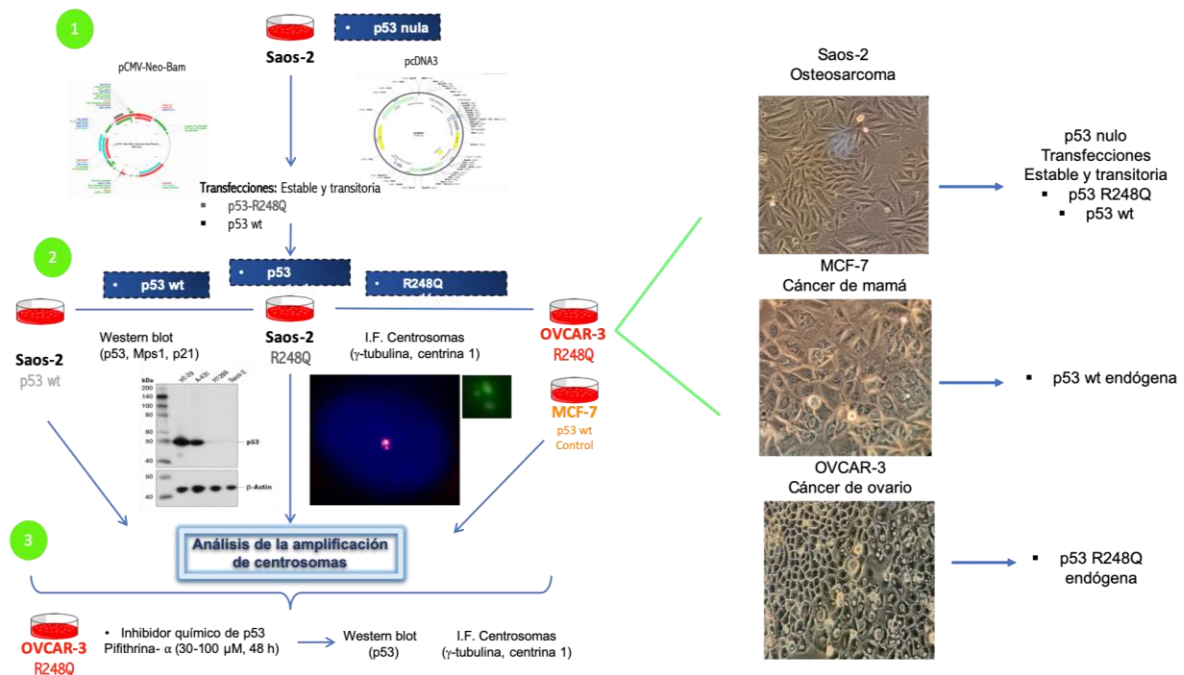
Determinar si la mutante p53-R248Q induce la sobre-expresión de Mps1 y si el aumento de esta proteína es necesaria para la amplificación de centrosomas en líneas celulares de cáncer que expresan p53 silvestre, nula, mutada y endógena.

Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto de la mutante p53-R248Q en la amplificación de centrosomas en la línea celular p53 nula (Saos-2), transfectada con p53-R248Q y p53-R248Q de expresión endógena (OVCAR-3), comparada con p53 silvestre (MCF-7).

2. Evaluar los niveles de proteína de Mps1 en las líneas celulares Saos-2 transfectada con la mutante p53-R248Q, OVCAR-3 (p53-R248Q endógena) en comparación con MCF-7 (p53-wt).
3. Inhibir a la mutante p53-R248Q en la línea celular OVCAR-3 para evaluar su efecto en la amplificación de centrosomas.

Diseño Experimental



Materiales y métodos

Cultivo celular

Se utilizó la línea celular Saos-2 (ATCC® HTB-85™) derivada de un osteosarcoma humano, el número de cromosomas es hipo-triploide con 56 cromosomas por célula y cuenta con la supresión del gen TP53 de manera homocigota (p53 nula). Saos-2 es adecuada como huésped de transfección.

Así mismo se utilizó la línea celular OVCAR-3 [OVCAR3] (ATCC® HTB-161™) derivada de un adenocarcinoma de ovario humano, es una línea celular aneuploide y cuenta con la mutación R248Q del gen TP53 (p53-R248Q endógena).

Las células MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]) derivadas de un adenocarcinoma humano (cáncer de mama), contienen a p53 funcional localizado en el núcleo (p53 wt) por lo que fue utilizada como control en los experimentos.

Para mantener el crecimiento de las líneas celulares se utilizó el medio DMEM modificado con alta glucosa, L-glutamina, rojo fenol y piruvato de sodio (#11995-065), suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) (FBS, Certified, United States, Gibco[®] #16000044). Las células se mantuvieron incubadas a 37°C (5% de CO₂ y 95% de aire a humedad de saturación).

Transformación de bacterias E. coli

Para realizar la amplificación de los plásmidos, se utilizaron bacterias competentes *E. coli* para realizar la ligación del DNA exógeno correspondiente al plásmido de p53-R248Q y p53 wt, ambos contienen el gen de resistencia a ampicilina. Seguido de un choque térmico para lograr la transformación de las bacterias y posteriormente se realizó la clonación de las bacterias en un agar de selección con ampicilina.

Transfecciones

Para inducir la expresión de la proteína mutante de p53 R248Q (o de la expresión del p53 wt en células Saos-2 (p53 nula) se realizaron transfecciones con Lipofectamine 3000[®] (Invitrogen, USA). En una placa de 24 pozos se cultivaron 1.5×10^5 células por pozo, al día siguiente se mezclaron el DNA y la Lipofectamina en medio Opti-MEM. Después se lavaron 2 veces las células con 250 μ L de Opti-MEM, para posteriormente agregar los complejos en cada pozo. La incubación se realizó a 37°C durante 6 horas. Finalmente se retira el medio, y se agrega nuevo medio con SFB 10% e incuba hasta el momento de evaluar la transfección a las 48 horas (transfecciones transitorias) y para las transfecciones estables se administró al medio de cultivo el antibiótico seleccionador G418 (1200 ng/ μ L) y después de mantuvo a una concentración de 800 ng/ μ L.

Western Blot

Para comprobar el contenido de la proteína p53 y MPS1 (TTK) en las líneas celulares, se sembraron 2,000,000 de células en platos de cultivo P60 (Corning, EE. UU.) y se permitió la adherencia de la monocapa durante al menos 16 horas. Una vez adheridas y con el fin de obtener proteínas citosólicas, se utilizó un buffer de lisis para la extracción de proteínas de mamífero (Cell Signaling #9803) complementado con un coctel de inhibidor de proteasas (Cell Signaling #5871) y PMSF. Se colectaron las células y se centrifugaron a 12 879 g durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se colectaron y las concentraciones de proteína fueron cuantificadas por el método de Lowry. La proteína (30-80 µg/ml) se utilizó en SDS-PAGE al 10% y se transfirió a membranas PVDF de 0.45 µm. Después se bloqueó con leche sin grasa al 5% durante 1 h. Para detectar las proteínas se utilizó la detección por quimioluminiscencia en una película de rayos X.

Las membranas se probaron contra los anticuerpos siguientes:

- p53 anticuerpo primario monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology sc-126), acoplado a HRP.
- TTK, anticuerpo primario monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology sc-56968), y posteriormente con la proteína que une las cadenas ligeras del tipo kappa de anticuerpos de ratón (m-IgGk BP-HRP: sc-516102).
- β-actina (Sigma A2228) fue utilizado como control de carga.

Inmunofluorescencias

Para analizar la amplificación de los centrosomas se realizaron inmufluorescencias para observar centrosomas maduros por microscopia confocal. Se sembraron 48 000 células/cm² sobre laminillas o cubreobjetos estériles en platos de 6 o 12 pozos (Corning, EE. UU.) y se permitirá su adherencia de la monocapa pasadas 16 horas. Después las células serán fijadas con metanol frío (-20°C) durante 10 minutos, para después agregar acetona fría (-20°C) durante 1 minuto y se probaron contra anticuerpos que permitieron observar centrosomas maduros, debido a esto se realizó la co-localización de los siguientes anticuerpos en las distintas líneas celulares:

- Centrina 1 (Sigma C7736)
- γ Tubulina (Sigma GTU-88)

Inhibición de la expresión de p53

Para realizar la inhibición de la proteína p53 en la línea celular OVCAR-3 (R248Q) y analizar su efecto en la amplificación de centrosomas, se utilizó un inhibidor químico de p53; Phifitrina- α (sc-45050), probado anteriormente en nuestro laboratorio en concentraciones de 30 μ M-100 μ M durante 48 h. Se utilizó como vehículo DMSO y fue administrado en el medio de cultivo sin suero fetal bovino.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos se representan en gráficos correspondientes mostrando la media de los valores \pm la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Las pruebas estadísticas que se aplicaron fue una ANOVA seguido de una prueba de Tukey (* $p < 0.01$). Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism.

Resultados

Amplificación de plásmidos

Con el fin de obtener el modelo de estudio completo con el que se trabajó experimentalmente en este proyecto, se comenzó por generar la amplificación del plásmido que contiene el gen correspondiente a p53 wt (Fig.1 a, b), para posteriormente hacer transfecciones transitorias en la línea celular Saos-2 que cuenta con una deleción homocigota para p53. En nuestro laboratorio ya se contaba con células transfectadas establemente con la mutante R248Q (Saos-2 R248Q). Se obtuvieron 5 colonias candidatas, a las cuales se les hizo la extracción de DNA, para obtener DNA plásmidico de p53 wt por una MiniPrep. Se evaluó la cantidad de proteína de p53 de cada una de las colonias transformadas a través de transfecciones transitorias en células Saos-2 para seleccionar solo una y de esta forma continuar las transfecciones en los próximos experimentos (Fig. 1. c). De acuerdo con el panel de western blot, la cantidad de proteína de p53 silvestre en el plásmido 3 (P3) correspondiente a la colonia 3 de las bacterias transformadas fue la ideal y seleccionada para su amplificación por una MaxiPrep (Fig, 2). Una vez seleccionado el plásmido (P3) se amplifico y se realizó una curva de transfección de este en las células Saos-2, donde no observamos diferencias en su morfología ni muerte celular significativa (Fig. 2. a). El análisis de los niveles de proteína de p53 wt se analizó por un panel de western blot, correspondiente a la transfección de 0.5-2.5 μ g de plásmido, observamos una efectiva transfección del plásmido en todas las concentraciones de plásmido utilizadas. Sin embargo, para fines técnicos se seleccionó trabajar para los siguientes experimentos con 1.0 μ g de plásmido, debido a que una concentración muy elevada de p53 wt puede inducir apoptosis y no nos permitiría utilizarlo como control de nuestros experimentos con la mutante de p53 R248Q (Fig. 2. b).

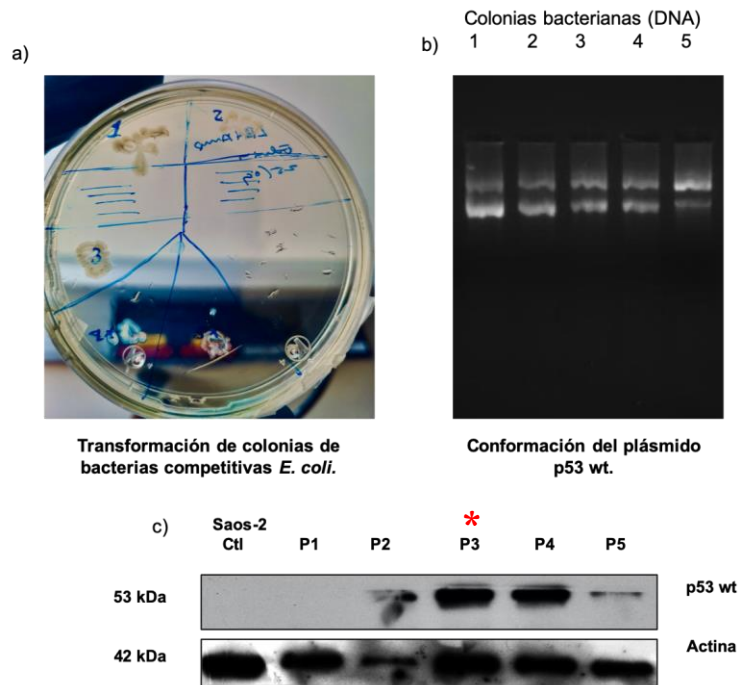


Figura 1. Amplificación del plásmido p53 wt. a) Transformación de bacterias *E. coli* competentes con el plásmido pcDNA3.0 con 5 colonias candidatas resistentes a ampicilina. b) Gel de agarosa que muestra la configuración y contenido de DNA plásmidico de las 5 colonias candidatas que se obtuvo por una MiniPrep. c) El total de proteínas fue aislado de Saos-2 (Ctl; control, 5 colonias bacterianas transformadas por p53 wt en *E. coli*) para un análisis de western blot para p53 wt. La actina se utilizó como control de carga.

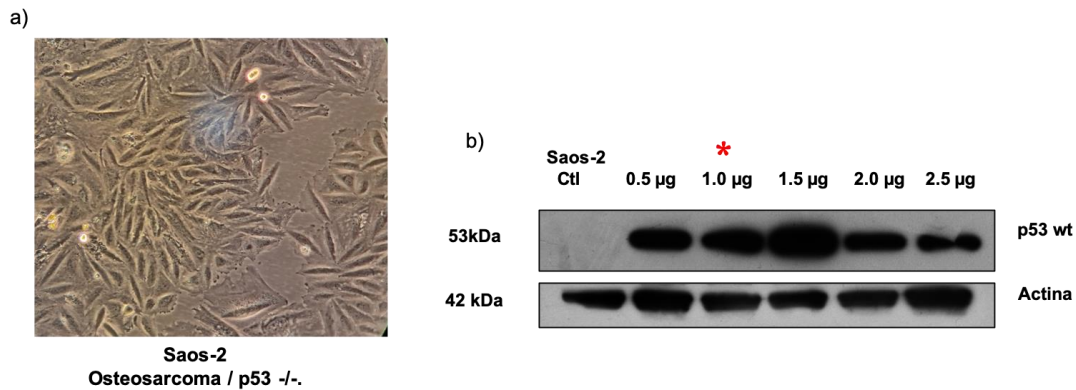


Figura 2. Curva de transfección de p53 wt. a) Cultivo de células Saos-2 transfectadas con p53 wt durante 48 h. b) El total de proteínas fue aislado de Saos-2 (Ctl; control, 0.5-2.5 µg de plásmido) para un análisis de western blot correspondiente a una curva de transfección de p53 wt. La actina se utilizó como control de carga.

p53 R248Q induce la amplificación de centrosomas

Se estima que en más del 50% de todos los tipos de cáncer en humanos, el gen TP53 se encuentra mutado, las cuales son mutaciones de tipo “missense”, conduciendo a la inestabilidad genómica en el cáncer, en este sentido se sabe que uno de los procesos que inducen inestabilidad genómica en cáncer es la amplificación de centrosomas, por lo que nosotros probamos si la mutante de p53 es capaz de inducir este fenómeno en nuestro modelo celular. En nuestros resultados obtenidos por inmunofluorescencia, identificamos a los centrosomas con γ tubulina (rojo), indicador de microtúbulos asociados a centrosomas y centrina 1 (verde), que marca los centriolos centrosomales; las células que se tomaron en cuenta para el conteo de centrosomas fueron las que co-localizaban entre los anticuerpos anteriores. Observamos que la sobre-expresión de la proteína p53-R248Q en células Saos-2 aumentan la cantidad de centrosomas maduros comparado con Saos-2 (p53 -/-) y MCF-7 (p53 wt), además observamos que las células OVCAR-3 que presentan de manera endógena esta mutación en p53 también tienen niveles elevados de centrosomas. De hecho, la transfección transitoria en Saos-2 de p53 wt disminuye la amplificación de centrosomas comparada con Saos-2 (p53 -/-), indicando que tanto la ausencia de p53 wt como la

presencia de una proteína mutante de p53 favorecen la amplificación de centrosomas (Fig. 3).

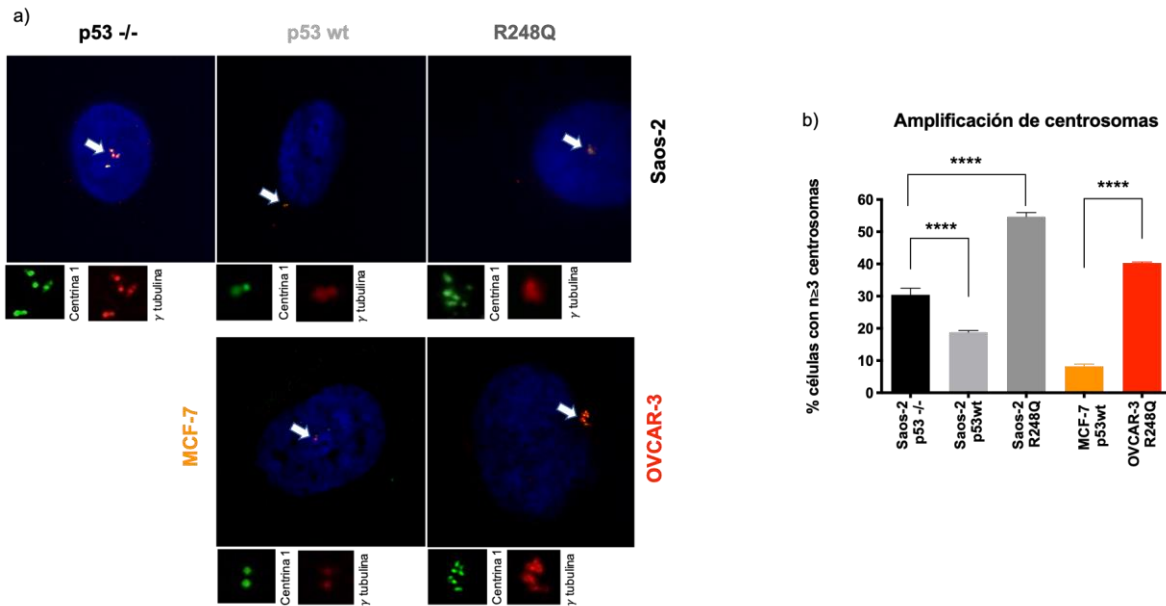


Figura 3. p53-R248Q induce la amplificación de centrosomas. a) Inmunodetección de centrosomas maduros en líneas celulares de cáncer. Imágenes representativas de las células, representando centrosomas (flecha blanca). Se realizó inmunofluorescencia contra γ tubulina (rojo) y centrina (verde), marcando el núcleo con DAPI (azul). El objetivo empleado fue 100X. b) Porcentaje de células con múltiples centrosomas. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes ($n=3$) no menos de 500 células mononucleadas con señal positiva de γ tubulina y centrina 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0.01$.

La mutante de p53-R248Q disminuye la expresión de Mps1

Debido a que se ha reportado que la estabilización de la proteína Mps1 tiene un papel relevante en la amplificación de los centrosomas en células cancerosas, nosotros evaluamos si las mutantes de p53 podrían estar regulando la expresión de esta proteína. Encontramos que, la línea celular OVCAR-3 (R248Q endógena) presenta niveles altos de la proteína de Mps1 en comparación con MCF-7 (p53 wt), este resultado sugería que la mutación de p53 incrementaban los niveles de proteína de Mps1, sin embargo, en las células transfectadas con la mutante de p53 R248Q en un sistema celular limpio correspondiente a la línea celular Saos-2 (p53 -/-) los niveles de MPS1 disminuyeron en comparación con las células transfectadas con p53 wt (Fig. 4. b). Para corroborar que nuestros resultados no se debieran a una deficiencia en la transfección, evaluamos los niveles de la proteína p53, donde observamos niveles elevados de esta proteína en Saos-2 R248Q, similar a lo observado en OVCAR-3 debido a que las mutantes de p53 son más estables y se acumulan en las células, comparados con Saos-2 y MCF-7 respectivamente (Fig. 4. b, c). Como se esperaba los niveles de proteína de p53 en Saos-2 p53 wt incrementaron comparados con Saos-2 control. Además, para demostrar que la proteína p53 wt funciona correctamente y que la mutante R248Q presenta una pérdida de función analizamos los niveles de proteína de p21 como control en nuestro panel por ser un blanco canónico de p53, los resultados corresponden a lo esperado; la mutación R248Q, es una mutación que interrumpe el contacto con el DNA, por lo que observamos que los niveles de p21 disminuyen en Saos-2 R248Q y OVCAR-3. Por el contrario, los niveles de p21 aumentaron en presencia de p53 wt, en Saos-2 p53 wt y MCF-7 (Fig. 4. b, c).

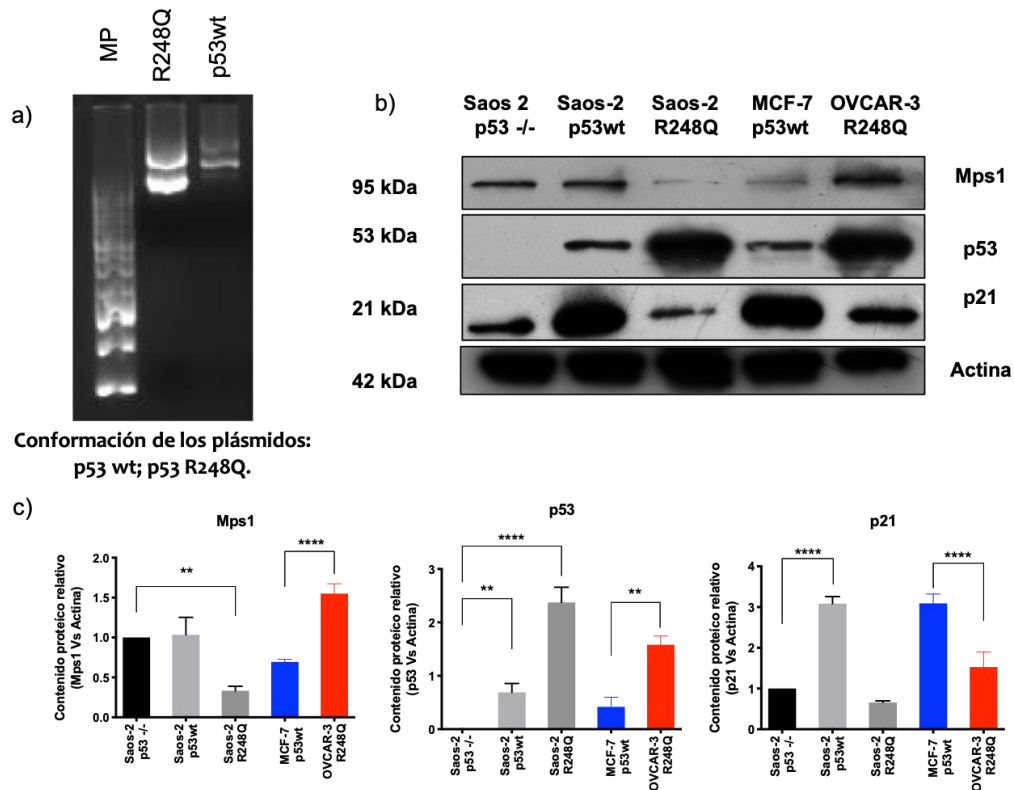


Figura 4. La mutante de p53-R248Q disminuye la expresión de Mps1. a) Gel de agarosa que muestra la configuración y contenido de DNA plásmidico de p53-R248Q y p53 wt. b) El total de proteínas fue aislado de Saos-2 (p53 -/-, p53 wt, p53-R248Q), MCF-7 y OVCAR-3 para un análisis de western blot correspondiente para las proteínas Mps1, p53 y p21. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes (n=3). La actina se utilizó como control de carga. c) Densitometrías correspondientes al análisis del western blot, considerando el contenido proteico relativo Vs. Actina de cada una de las proteínas representadas. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0.01$.

Pifitrina- α disminuye los niveles de p53-R248Q en OVCAR-3

Para corroborar si la amplificación de centrosomas es un efecto específico de la mutante de p53 R248Q evaluamos si la inhibición de la mutante p53-R248Q disminuía la amplificación de centrosomas en OVCAR-3 para esto utilizamos la Pifitrina- α , un inhibidor químico de p53. La Pifitrina- α ha sido utilizada como un inhibidor específico de la actividad transcripcional de p53 (Sohn *et al.*, 2009). Probamos una curva de concentración de Pifitrina- α que va de 30 μ M-100 μ M durante 48 h. Las células OVCAR-3 tratadas con las concentraciones de 75 μ M y 100 μ M, mostraron una disminución en los niveles de proteína de p53 en nuestro

panel de western blot (Fig. 5. a). El análisis densitométrico reflejo diferencias sólo en la concentración de 100 μM en comparación con el control sin tratamiento (Fig 5. b). Sin embargo, decidimos continuar utilizando las concentraciones de 75 μM y 100 μM para los siguientes experimentos, debido a que el efecto principal de la Pifitrina- α es la inactivación transcripcional de p53 y la disminución en los niveles de la proteína es un efecto secundario.

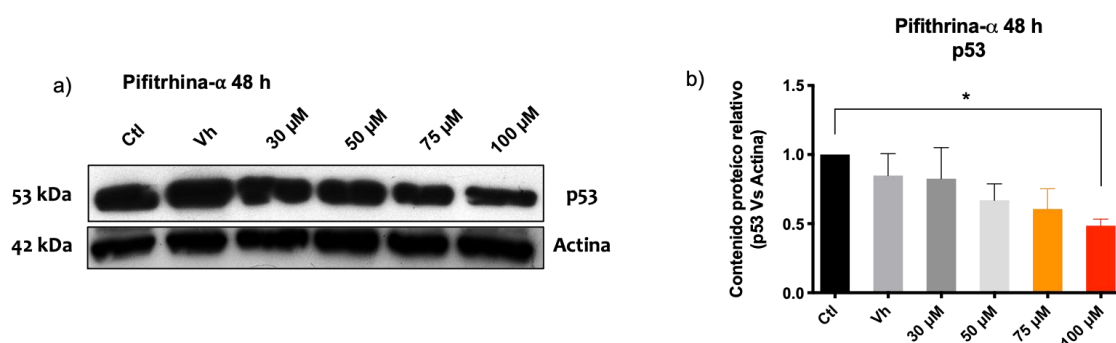


Figura 5. Pifitrina- α disminuye los niveles de p53-R248Q en OVCAR-3. a) El total de proteínas fue aislado de OVCAR-3 (30 μM -100 μM) para un análisis de western blot correspondiente para la proteína p53. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). La actina se utilizó como control de carga. b) Densitometrías correspondientes al análisis del western blot, considerando el contenido proteico relativo Vs. Actina de la proteína p53. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $p<0.01$.

Pifitrina- α no afecta la sobrevivencia celular en OVCAR-3

Con el objetivo de descartar que el inhibidor químico de p53 no alterara la sobrevivencia de las células a las concentraciones utilizadas, para evaluar el efecto sobre la amplificación de centrosomas por la mutante p53-R248Q, se realizó una curva de sobrevivencia celular a las 24 h y 48 h mediante el ensayo de cristal violeta (Fig. 6. a, c). Los resultados de la cuantificación colorimétrica no mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados respecto al control (Fig. 6. b, d), por lo que determinamos que los efectos que se evaluarían en el siguiente experimento sobre la amplificación de centrosomas no se vieran afectados por una

inducción de muerte celular provocado por una dosis tóxica del tratamiento de las células con pifitrina- α .

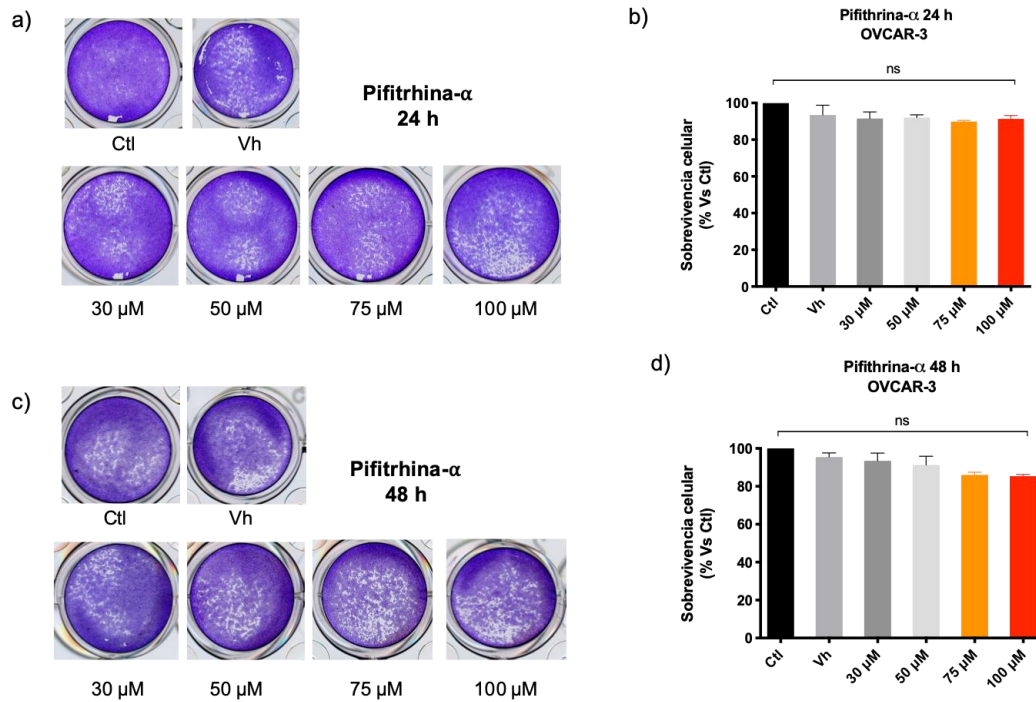


Figura 6. Pifithrina- α no afecta la supervivencia celular en OVCAR-3. a) Células OVCAR-3 teñidas con cristal violeta (Ctl; control, Pifithrina- α 30 μ M-100 μ M) a las 24 h. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). b) Porcentajes de la supervivencia celular en células OVCAR-3 (Ctl, Pifithrina- α 30 μ M-100 μ M) a las 24 h. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes ($n=3$). c) Células OVCAR-3 teñidas con cristal violeta (Ctl; control, Pifithrina- α 30 μ M-100 μ M) a las 48 h. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes ($n=3$). d) Porcentajes de la supervivencia celular en células OVCAR-3 (Ctl; control, Pifithrina- α 30 μ M-100 μ M) a las 48 h. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes ($n=3$). ns; representa sin significancias.

Pifitrina- α disminuye la amplificación de centrosomas en OVCAR-3

Con este último experimento, se analizó el efecto de la inhibición química de la mutante de p53 R248Q en las células OVCAR-3 sobre la amplificación de los centrosomas. Las concentraciones con las que continuamos trabajando fueron 75 μ M y 100 μ M a las 48 h, para posteriormente realizar la inmunofluorescencias de centrosomas maduros a dichas concentraciones marcando a γ tubulina, indicador de microtúbulos asociados a centrosomas y centrina 1, que marca los centriolos centrosomales (Fig. 7. a) las células que se tomaron en cuenta para el conteo de centrosomas fueron las que co-localizaban entre los anticuerpos anteriores. Nuestros resultados indican una disminución significativa en el porcentaje de la amplificación de los centrosomas con las concentraciones 75 μ M y 100 μ M Vs control (Fig 7. b). Los resultados que encontramos en nuestro análisis de western blot (Fig.5) indicaban que sólo había diferencia en la disminución de p53-R248Q en OVCAR-3 con la concentración de Pifitrina- α 100 μ M, sin embargo, en el análisis de amplificación de centrosomas también se encontraron diferencias significativas en las células tratadas con la concentración de 75 μ M.

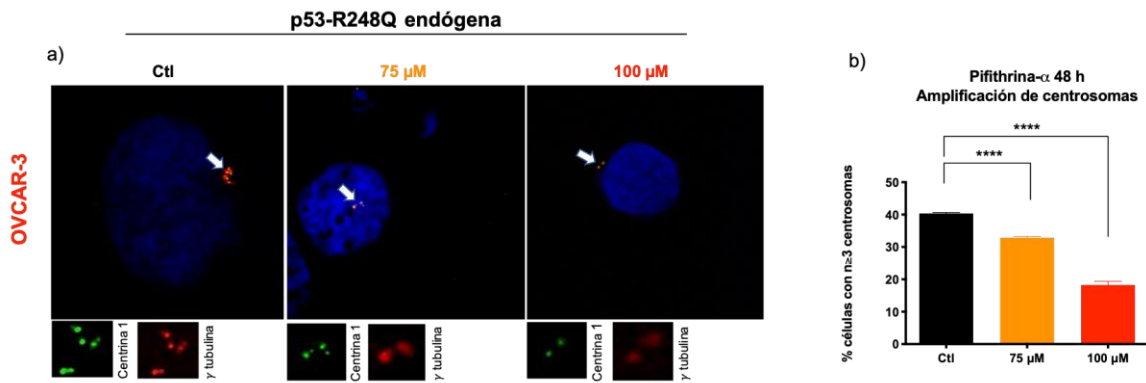


Figura 7. Pifithrina- α disminuye la amplificación de centrosomas en OVCAR-3. a) Inmunodetección de centrosomas maduros en líneas celulares de cáncer. Imágenes representativas de las células, representando centrosomas (flecha blanca). Se realizó inmunofluorescencia contra γ tubulina (rojo) y centrina (verde), marcando el núcleo con DAPI (azul). El objetivo empleado fue 100X. b) Porcentaje de células OVCAR-3 (Ctl; control, Pifithrina- α 75 μ M-100 μ M, 48 h) con múltiples centrosomas. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) no menos de 500 células mononucleadas con señal positiva de γ tubulina y centrina. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0.01$.

Discusión

La inestabilidad genómica en el cáncer es un proceso característico que exhiben las células debido a la pérdida de función de proteínas supresoras de tumores, principalmente debido a mutaciones, translocaciones o deleciones (Ozaki & Nakagawara, 2011). La proteína p53 es un factor de transcripción clave en el cuidado de las células ante eventos mutacionales endógenos y exógenos que pueden poner en peligro la estabilidad del genoma, se encarga principalmente de responder ante el daño ocurrido en el DNA, arrestando el ciclo celular y conduciendo hacia la apoptosis a través de la activación de ciertos genes y de esta manera garantizar que el daño no se propague hacia las células hijas, sin embargo, en más del 50% de los tipos de cáncer en humanos, p53 se encuentra mutado, predominando las mutaciones de sentido erróneo, que residen en el dominio de unión al DNA de la proteína (Ozaki & Nakagawara, 2011). La proteína p53 mutada forma hetero-olímeros con p53 silvestre, por lo que la proteína supresora de tumores p53 silvestre pierde su función como supresor de tumor y adquiere funciones oncogénicas, potencializando los procesos carcinogénicos en las células, como la inestabilidad genómica. Este proceso se puede originar por una errónea segregación de los cromosomas durante la mitosis en las células. En este trabajo, nosotros investigamos las aberraciones presentes en los centrosomas respecto al estado de la proteína p53. Durante la mitosis, dos centrosomas forman los polos del huso mitótico y direccionan la formación de husos mitóticos bipolares, el cual es un proceso esencial para la correcta segregación de los cromosomas, sin embargo, la presencia de más de dos centrosomas (amplificación de centrosomas) afecta en gran medida la citocinesis durante la mitosis a través de la formación de más de dos husos mitóticos polares (Fig. 3) lo que resulta en una mitosis multipolar, células multinucleadas y la aparición de un catástrofe mitótica en las células cancerosas, aumentando en los errores de segregación cromosómica, como la aneuploidía, amplificaciones y deleciones (Krämer *et al.*, 2002).

En este estudio, observamos una amplificación de centrosomas significativa en células que contenían la mutante R248Q de p53; además en las células OVCAR-3

con la mutante endógena p53-R248Q encontramos múltiples centrosomas comparado con una línea celular con p53 wt (MCF-7). De hecho, en las células transfectadas transitoriamente con p53 wt (Saos-2 p53 wt) disminuyen el número de múltiples centrosomas comparadas con Saos-2 R248Q (Fig. 3). Nuestros resultados, coinciden con lo que se reportado recientemente en un modelo de cáncer de mama en ratón que contiene la mutante p53-R172H (R175 en humanos) donde se observó la aparición de múltiples centrosomas en presencia de esta mutante, interesantemente en este estudio encontraron que la mutante p53-R172H induce la sobre-expresión de la proteína Nek2, la cual es necesaria para el ensamblaje y el mantenimiento de los centrosomas, además encontraron que al eliminar a Nek2 por CRISPR, la amplificación de centrosomas disminuía; en estudios previos ya se había demostrado que la sobre-expresión de Nek2 puede inducir amplificación de centrosomas (Ghaleb *et al.*, 2020), sin embargo, en este trabajo no demostramos si la amplificación de centrosomas es dependiente de la regulación de Nek2 por la mutante p53-R172H, por lo que sería importante analizar si la amplificación de centrosomas mediada por la mutante R248Q y otras mutantes de p53 es dependiente de Nek2.

El mecanismo por el cual las mutantes de p53 inducen la amplificación de centrosomas podría deberse a ganancia de función y a su actividad como factor de transcripción, se sabe que las proteínas mutantes de p53, activan la transcripción de genes blanco distintos a p53 silvestre (Nakazawa *et al.*, 2019). La actividad transcripcional de mutantes de p53 ejerce su función sobre los promotores de oncogenes que permiten la progresión del ciclo celular, por ejemplo, se ha reportado que en células cancerosas (p53 nula) transfectadas con las mutantes de p53 provoca el aumento de la transcripción del promotor de c-myc (Nakazawa *et al.*, 2019). En este contexto, la amplificación de los centrosomas pudiera estar relacionada con la progresión del ciclo celular y la constante actividad transcripcional de mutantes de p53 que induce vías de señalización importantes que brindan al cáncer la evasión de la muerte celular y la proliferación exacerbada que va de la mano con una errónea segregación de los cromosomas en las células que pueden ser provocada por un exceso de centrosomas. Por otro lado, respecto a los

resultados que reflejan un aumento de centrosomas en las células que cuentan con p53 nula (Saos-2) y después de que estas células son transfectadas con p53 silvestre, el número de centrosomas disminuye, podemos asociarlo con el aumento en los niveles de proteína de p21 encontrados en Saos-2 p53 wt (Fig. 4. b), p21 es un blanco canónico de la proteína p53 silvestre, p21 puede inhibir la progresión del ciclo celular a través del bloqueo del complejo Cdk2/Ciclina E que es conocido por ser iniciador clave en la duplicación de los centrosomas (Shinmura *et al.*, 2006); se sabe que Cdk2 participa en la duplicación normal de centrosomas (Shinmura *et al.*, 2006), además en fibroblastos de ratón nulos para p53 similar a nuestro modelo celular (Saos-2) se reportó que Cdk2 y Cdk4 inducen la amplificación de centrosomas (Arsene *et al.*, 2009); por lo tanto, el aumento en los niveles de p21 con la transfección de p53 wt podría estar inhibiendo a este complejo y favoreciendo la disminución de la amplificación de los centrosomas (Fig. 3).

Por otro lado, se sabe que la proteína Mps1 juega un papel importante durante la duplicación de los centrosomas durante el ciclo celular, y además se han encontrado niveles elevados de mRNA y proteína de Mps1 en distintos tipos de cáncer (Kasbek *et al.*, 2009., Liu & Winey, 2012). Mps1 en el ciclo celular, cuenta con actividad cinasa y alcanza su punto máximo durante la etapa de la mitosis, durante la fase G1/S, muestra un incremento con una elevada actividad específica que coincide con la duplicación de los centrosomas y un segundo incremento importante en la fase de G2/M que coincide con su participación conocida en el checkpoint de mitosis (Pike & Fisk, 2011). La regulación de esta proteína se ha visto controlada por fosforilaciones de Ciclina A-Cdk2 en Thr468 de Mps1, este efecto se encarga de suprimir la degradación de Mps1 mediada por proteosoma y la sobre-expresión de este complejo en cáncer coincide con la reduplicación de los centrosomas (Pike & Fisk, 2011). En general, la supresión de la degradación de Mps1 es suficiente para encontrar múltiples centrosomas en líneas celulares de cáncer (Kasbek *et al.*, 2007).

Además, en nuestro laboratorio, se demostró que la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano del tipo 16 (VPH16) es capaz de aumentar la expresión de Mps1

y con ello la aparición de múltiples centrosomas, a su vez que la inhibición por shRNAs dirigidos hacia Mps1 disminuye la amplificación de los centrosomas significativamente. En concordancia con estos resultados la línea celular OVCAR-3 que presenta de manera endógena la mutante R248Q tiene niveles altos de Mps1 y amplificación de centrosomas (Fig. 3, 4). Por esta razón, nosotros investigamos si la mutante R248Q podría aumentar la expresión de Mps1; sin embargo, observamos el efecto contrario, en las células Saos-2 R248Q los niveles de la proteína Mps1 disminuyeron comparada con Saos-2 y Saos-2 transfectadas con p53 wt (Fig. 4). Por lo tanto, nuestra teoría de que Mps1 podría estar participando en la amplificación de centrosomas no fue válida.

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la amplificación de centrosomas por mutantes de p53-R248Q aún se desconoce, así como las posibles proteínas que pueden estar involucradas en la amplificación de centrosomas inducida por esta mutante de p53. Dentro de la replicación de los centrosomas existen una gran variedad de proteínas con funciones importantes durante el ciclo celular, como perspectivas hasta este punto, un análisis *in silico* de expresión diferencial en células con la mutación p53-R248Q permitiría dar paso a conocer nuevas proteínas blanco asociadas a la inestabilidad genómica y las aberraciones en centrosomas de las células cancerosas.

Por último, debido a que las células OVCAR-3 presentan múltiples centrosomas y contienen la mutación endógena de p53-R248Q, decidimos inhibir químicamente a la proteína mutante de p53 con el reactivo Pifitrina- α , para evaluar si el efecto de la amplificación de los centrosomas se debía a la presencia de esta mutante de p53. La Pifitrina- α es un inhibidor específico de la actividad transcripcional de p53 (Sohn *et al.*, 2009., Zhu *et al.*, 2020). La proteína mutante R248Q en las células OVCAR-3 es muy estable, sin embargo, encontramos que a una concentración de 100 μM de Pifitrina- α , los niveles de proteína de p53 disminuyen significativamente y la sobrevivencia celular a las concentraciones evaluadas no se vio afectada en las células tratadas comparas con el control. Nuestros resultados indicaron una

disminución de múltiples centrosomas con el tratamiento de Pifitrina- α , este resultado sugiere que la mutante p53-R248Q si participa en la inducción de múltiples centrosomas. Debido a que la Pifitrina- α , es considerado un inhibidor de la actividad transcripcional de p53, es posible que el mecanismo de la amplificación de centrosomas mediado por la mutante p53-R248Q se debe a la activación o represión transcripcional de uno o varios genes asociados con la amplificación de centrosomas, esto se puede ver reflejado con el tratamiento de Pifitrina- α con la dosis de 75 μM , donde no observamos disminución de los niveles de p53 (Fig. 5) pero si encontramos una disminución en el número de centrosomas (Fig. 7).

Conclusión

En nuestro trabajo, demostramos que la mutante p53-R248Q induce la amplificación de centrosomas, sin embargo, este proceso no es regulado por la proteína Mps1; por otro lado, la pifitrina revierte la amplificación de centrosomas mediada por la mutante p53-R248Q, lo que sugiere que el mecanismo por el cual esta mutante de p53 induce amplificación de centrosomas, está asociado a su actividad como factor de transcripción, pero hacen falta más estudios para elucidar el posible mecanismo de amplificación de centrosomas inducido por las proteínas mutantes de p53.

Referencias

- Adon, A. M., Zeng, X., Harrison, M. K., Sannem, S., Kiyokawa, H., Kaldis, P., & Saavedra, H. I. (2010). Cdk2 and Cdk4 regulate the centrosome cycle and are critical mediators of centrosome amplification in p53-null cells. *Molecular and cellular biology*, 30(3), 694–710. <https://doi.org/10.1128/MCB.00253-09>
- Aguilera A, García-Muse T (2013). Causes of Genome Instability. *Annual Review of Genetics*, 47(1),1-32.
- Ahmed Fouad, Y., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal Of Cancer Research*, 7(5), 1016-1036.
- Amelio, I., & Melino, G. (2020). Context is everything: extrinsic signalling and gain-of-function p53 mutants. *Cell Death Discovery*, 6(1). doi: 10.1038/s41420-020-0251-x
- Blagih, J., Buck, M. D., & Vousden, K. H. (2020). p53, cancer and the immune response. *Journal of Cell Science*, 133(5), jcs237453. <https://doi.org/10.1242/jcs.237453>
- Blagosklonny, M. V. (2000). p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *The FASEB Journal*, 14(13), 1901-1907. <https://doi.org/10.1096/fj.99-1078rev>
- Contadini, C., Monteonofrio, L., Virdia, I., Prodosmo, A., Valente, D., & Chessa, L. et al. (2019). p53 mitotic centrosome localization preserves centrosome integrity and works as sensor for the mitotic surveillance pathway. *Cell Death & Disease*, 10(11). doi: 10.1038/s41419-019-2076-1
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T., & Farese, R. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism*, 18(2), 153-161. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017
- El-Hizawi S, P. Lagowski J, Kulesz-Martin M, Albor A. (2002). Induction of Gene Amplification as a Gain-of-Function Phenotype of Mutant p53 Proteins. *Cancer Research*, 62(11):3264-3270.
- Foijer, F., Xie, S. Z., Simon, J. E., Bakker, P. L., Conte, N., Davis, S. H., ... Sorger, P. K. (2014). Chromosome instability induced by Mps1 and p53 mutation generates aggressive lymphomas exhibiting aneuploidy-induced stress. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 111(37), 13427-13432.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1400892111>

Freed-Pastor, W., & Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development*, 26(12), 1268-1286. doi: 10.1101/gad.190678.112

Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letters*, 230(1), 6-19.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.028>

Fukasawa, K. (2008). p53, cyclin-dependent kinase and abnormal amplification of centrosomes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews On Cancer*, 1786(1), 15-23. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.04.002

Ghaleb, A., Padellan, M., & Marchenko, N. (2020). Mutant p53 drives the loss of heterozygosity by the upregulation of Nek2 in breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01370-y>

Godinho, S., & Pellman, D. (2014). Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650), 20130467. doi: 10.1098/rstb.2013.0467

Gönczy, P. (2015). Centrosomes and cancer: revisiting a long-standing relationship. *Nature Reviews Cancer*, 15(11), 639-652. <https://doi.org/10.1038/nrc3995>

Graziano, S., & Gonzalo, S. (2017). Mechanisms of oncogene-induced genomic instability. *Biophysical Chemistry*, 225, 49-57. doi: 10.1016/j.bpc.2016.11.008

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanel, W., & Moll, U. M. (2012). Links between mutant p53 and genomic instability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2), 433-439. <https://doi.org/10.1002/jcb.23400>

Kasbek, C., Yang, C., & Fisk, H. (2009). Mps1 as a link between centrosomes and genomic instability. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 50(8), 654-665. doi: 10.1002/em.20476

Kasbek, C., Yang, C., Yusof, A., Chapman, H., Winey, M., & Fisk, H. (2007). Preventing the Degradation of Mps1 at Centrosomes Is Sufficient to Cause Centrosome Reduplication in Human Cells. *Molecular Biology Of The Cell*, 18(11), 4457-4469. doi: 10.1091/mbc.e07-03-0283

Krämer, A., Neben, K., & Ho, A. (2002). Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia*, 16(5), 767-775. doi: 10.1038/sj.leu.2402454

Levine, M., Bakker, B., Boeckx, B., Moyett, J., Lu, J., & Vitre, B. et al. (2017). Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Developmental Cell*, 40(3), 313-322.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2016.12.022

Liu, D. P., Song, H., & Xu, Y. (2009). A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene*, 29(7), 949-956. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.376>

Liu, X., & Winey, M. (2012). The MPS1 Family of Protein Kinases. *Annual Review Of Biochemistry*, 81(1), 561-585. doi: 10.1146/annurev-biochem-061611-090435

Lopes, C., Mesquita, M., Cunha, A., Cardoso, J., Carapeta, S., & Laranjeira, C. et al. (2018). Centrosome amplification arises before neoplasia and increases upon p53 loss in tumorigenesis. *Journal Of Cell Biology*, 217(7), 2353-2363. doi: 10.1083/jcb.201711191

Mantovani, F., Collavin, L., & Del Sal, G. (2018). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death & Differentiation*, 26(2), 199-212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>

Mussman, J. G., Horn, H. F., Carroll, P. E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. A., & Fukasawa, K. (2000). Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene*, 19(13), 1635-1646. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203460>

Nakazawa S, Sakata KI, Liang S, Yoshikawa K, Iizasa H, Tada M, Hamada JI, Kashiwazaki H, Kitagawa Y, Yamazaki Y. Dominant-negative p53 mutant R248Q increases the motile and invasive activities of oral squamous cell carcinoma cells. *Biomed Res*. 2019;40(1):37-49. doi: 10.2220/biomedres.40.37. PMID: 30787262.

Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2009). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>

Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, 3(1), 994-1013. doi: 10.3390/cancers3010994

Pike, A. N., & Fisk, H. A. (2011). Centriole assembly and the role of Mps1: defensible or dispensable? *Cell Division*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-6-9>

Pike, A., & Fisk, H. (2011). Centriole assembly and the role of Mps1: defensible or dispensable?. *Cell Division*, 6(1), 9. doi: 10.1186/1747-1028-6-9

Samassekou, O., Bastien, N., Lichtensztejn, D., Yan, J., Mai, S., & Drouin, R. (2014). Different TP53 mutations are associated with specific chromosomal rearrangements, telomere length changes, and remodeling of the nuclear architecture of telomeres. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(11), 934-950. <https://doi.org/10.1002/gcc.22205>

Saunders, W. (2005). Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells. *Seminars In Cancer Biology*, 15(1), 25-32. doi: 10.1016/j.semcancer.2004.09.003

Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(4), a006098. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>

Shimura, K., Bennett, R. A., Tarapore, P., & Fukasawa, K. (2006). Direct evidence for the role of centrosomally localized p53 in the regulation of centrosome duplication. *Oncogene*, 26(20), 2939–2944. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210085>

Sigal, A., & Rotter, V. (2000) Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome. *Cancer Research*, 60(24):6788-6793.

Sohn, D., Graupner, V., Neise, D. *et al.* Pifithrin- α protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ* 16, 869–878 (2009). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.17>

Strano, S., Dell'Orso, S., Di Agostino, S., Fontemaggi, G., Sacchi, A., & Blandino, G. (2007). Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*, 26(15), 2212-2219. doi: 10.1038/sj.onc.1210296

Tarapore, P., & Fukasawa, K. (2002). Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene*, 21(40), 6234-6240. doi: 10.1038/sj.onc.1205707

Tarapore, P., Horn, H. F., Tokuyama, Y., & Fukasawa, K. (2001). Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway. *Oncogene*, 20(25), 3173-3184. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204424>

Thompson, S., & Compton, D. (2010). Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *The Journal Of Cell Biology*, 188(3), 369-381. doi: 10.1083/jcb.200905057

Walerych, D., Prusko, M., Zyla, L., Wezyk, M., Gaweda-Walerych, K., & Zylicz, A. (2018). Wild-type p53 oligomerizes more efficiently than p53 hot-spot mutants and overcomes mutant p53 gain-of-function via a "dominant-positive" mechanism. *Oncotarget*, 9(62). doi: 10.18632/oncotarget.25944

Wang, J., & Lindahl, T. (2016). Maintenance of Genome Stability. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(3), 119-121. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.06.001>

Wei Dai, Y. Y. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165>

Xu, Y. (2008). Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants. *Oncogene*, 27(25), 3501-3507. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211023>

You, J., & Jones, P. (2012). Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?. *Cancer Cell*, 22(1), 9-20. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.008

Zhang, M., Zhuang, G., Sun, X., Shen, Y., Wang, W., Li, Q., & Di, W. (2017). TP53 mutation-mediated genomic instability induces the evolution of chemoresistance and recurrence in epithelial ovarian cancer. *Diagnostic Pathology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13000-017-0605-8>

Zhu, J., Singh, M., Selivanova, G. *et al.* Pifithrin- α alters p53 post-translational modifications pattern and differentially inhibits p53 target genes. *Sci Rep* **10**, 1049 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58051-1>

Zyss, D., & Gergely, F. (2009). Centrosome function in cancer: guilty or innocent?. *Trends In Cell Biology*, 19(7), 334-346. doi: 10.1016/j.tcb.2009.04.00



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00230

Matrícula: 2192802316

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE MFS1 EN LA INDUCCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE CENTROSOMAS POR MUTANTES DE P53 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ
- DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
- DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO
- DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JOSE EDWIN DOLORES GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JOSE EDWIN DOLORES GARCIA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

JOSE DE LA LUZ DIALCA
DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ

VOCAL

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

SECRETARIO

DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ