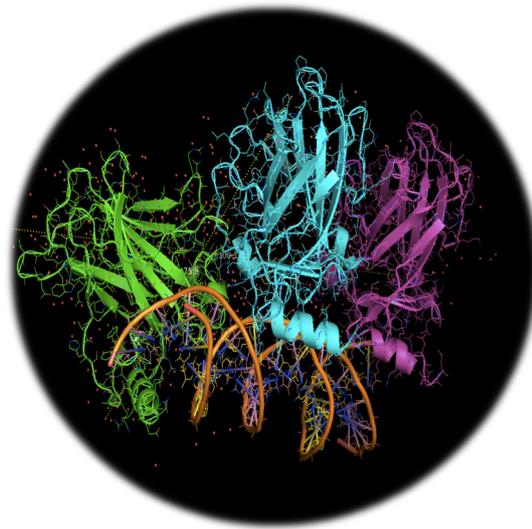




# VÍA DE LA P53: ORÍGENES, INACTIVACIÓN EN CÁNCER Y APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS



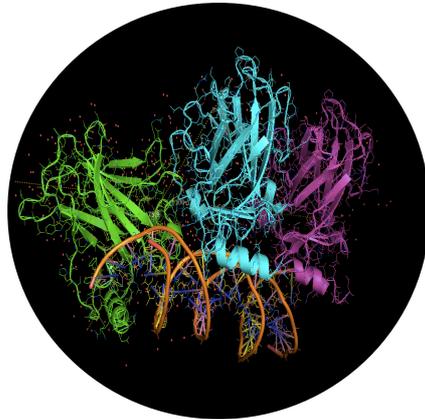
Federico de Novales de la Puente





TRABAJO FIN DE GRADO

# VÍA DE LA P53: ORÍGENES, INACTIVACIÓN EN CÁNCER Y APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS



## Revisión bibliográfica

Grado en Farmacia

Federico de Novales de la Puente

Tutor: Martiniano Santiago Pavón

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Farmacia

**Universidad de Sevilla**

Sevilla, 15 Junio de 2018



## **RESUMEN**

La proteína p53 es un componente fundamental para la homeostasis de la célula que en condiciones normales se encuentra regulada a la baja y es en respuesta a estrés cuando aumenta su expresión y su actividad.

En las últimas décadas esta proteína ha cobrado gran importancia debido a su implicación en diversos tipos de cánceres y, por este motivo, los diferentes estudios realizados hasta la fecha han buscado profundizar en el entendimiento de la función y la estructura de esta proteína, así como conocer los fenotipos en que se traducen las diferentes mutaciones descritas en p53. De este modo, en función de la alteración producida se podrá establecer una diana terapéutica para el diseño de moléculas que puedan resultar efectivas en el tratamiento del tumor en cuestión. En esta revisión haremos un repaso de las principales mutaciones descritas en p53 que están relacionadas con procesos tumorales y de las principales posibles estrategias terapéuticas que hasta la fecha hayan resultado ser más prometedoras de cara al tratamiento de este tipo de patologías.

**PALABRAS CLAVE:** p53, proteína intrínsecamente desordenada, estabilización de p53, cáncer, terapia.

## ABREVIATURAS

- Atg10, gen asociado a autofagia 10.
- Bai1, inhibidor-1 de angiogénesis específico del cerebro.
- Bax, proteína X asociada a BCL-2.
- BCL, proteína de linfoma de células B.
- -Btg2, gen 2 de translocación de células B.
- CBP, proteína de unión a CREB.
- Cdkn1 $\alpha$ , inhibidor de quinasa 1 $\alpha$  dependiente de ciclina.
- Col4a1, colágeno  $\alpha$ -1 tipo IV.
- CREB, proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc.
- CTD, dominio regulador C-terminal.
- Ddb2, proteína 2 de unión a ADN asociada a daño.
- Epha2, receptor-2 de efrinas tipo A.
- Foxo3, "forkhead box O3".
- Gadd45 $\alpha$ , factor 45 $\alpha$  inducible por daño en el ADN y parada del crecimiento.
- Gls2, glutaminasa-2.
- GOF, ganancia de funciones.
- Gpx1, glutatión peroxidasa-1.
- IDP, proteína intrínsecamente desordenada.
- LIF, factor inhibidor de la leucemia.
- Mgmt, O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa.
- NCBD, dominio nuclear de unión a coactivador.
- NMD, degradación mediada por mutaciones terminadoras.
- Noxa, activador de NADPH oxidasa.
- Pai1, inhibidor del activador del plasminógeno 1.
- Pig3, proteína 3 inducible por p53.
- Pml, leucemia promielocítica.
- PR, región rica en prolina.
- PTC, codones de terminación prematura.
- PTM, modificaciones postraduccionales.
- Puma, vía de sobrerregulación de p53 moduladora de apoptosis.
- P53r2, ribonucleótido reductasa inducible por p53-inducible.
- Saos-2, células de sarcoma osteogénico.
- Sesn, sestrina.
- TAD, dominio de transactivación.
- TET, dominio de tetramerización.
- Tigar, regulador de apoptosis y glucólisis inducido por TP53.
- Tpp1, tripeptidil peptidasa-1.
- Tsc2, esclerosis tuberosa-2.
- Tsp1, trombospondina-1.
- Wip1, fosfatasa 1 inducida por p53 silvestre (wild-type).

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1	CONCEPTO Y FUNCIÓN DE P53 .....	5
1.2	ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE P53. ....	7
1.3	REGULACION DE LA FUNCIÓN DE P53 MEDIANTE SUS REGIONES INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS.....	9
2.	OBJETIVOS.....	11
3.	METODOLOGÍA.....	11
4.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....	12
4.1	DIFERENTES ASPECTOS DE LAS ALTERACIONES DE P53 EN CÁNCER.....	12
4.1.1	MUTACIONES DE P53 EN CÁNCER .....	12
4.1.2	GANANCIA DE FUNCIONES DE P53 MUTADA.....	13
4.1.3	ESPECIFICIDAD DE P53 DEPENDIENTE DE TEJIDO.....	14
4.1.4	CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES DE P53 EN CÁNCER. ....	16
4.1.5	AGREGACIÓN DE P53. ....	19
4.2	ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	19
4.2.1	MOLÉCULAS QUE ESTABILIZAN P53.....	19
4.2.2	RESTAURACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON ZINC EN LA P53 MUTADA MEDIANTE METALCHAPERONAS.....	21
4.2.3	INHIBIDORES DE LA INTERACCIÓN P53-MDM2/MDMX.....	22
4.2.4	RESTAURAR LA FUNCIÓN PERDIDA EN P53 CON MUTACIONES SIN SENTIDO.....	24
5.	CONCLUSIONES .....	26
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	27



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CONCEPTO Y FUNCIÓN DE P53

La proteína p53 es un supresor de tumores fundamental para el organismo debido a sus numerosas funciones en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la inhibición de la tumorigénesis en la célula (Vogelstein et al., 2000). La principal actividad de p53 es la de ser un activador transcripcional de un amplio repertorio de genes mediante reconocimiento y unión a secuencias específicas de ADN (Vousden and Prives, 2009). En condiciones normales, los niveles de p53 están regulados a la baja y es en respuesta a estímulos como daño en el ADN, estrés ribosomal o estrés metabólico, entre otras situaciones, cuando la p53 es postraduccionalmente modificada con el fin de conseguir una rápida estabilización y la consiguiente activación de cientos de genes con múltiples funciones celulares (Vousden and Prives, 2009). En términos generales, podemos afirmar que p53 es esencial en el mantenimiento de la homeostasis mediante la reparación o eliminación de células que experimentan daños en su genoma (Paradox 2016), o dicho de otro modo, la proteína p53 activa transcripcionalmente genes que determinan si la célula vive o muere (Kenzelmann Broz et al., 2013).

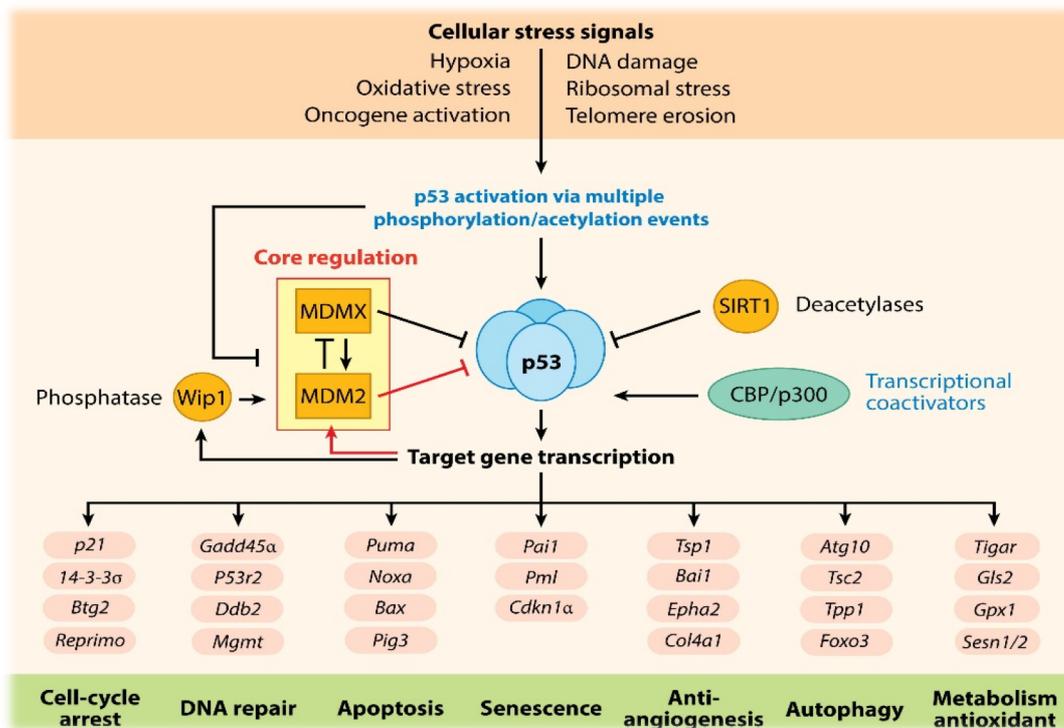


Figura 1. Vía de la p53 (tomada de Joerger and Fersht, 2008)

Como se puede observar en la figura 1, el factor de transcripción tetramérico p53 es activado frente a estrés celular mediante cascadas de fosforilación. Dependiendo del tipo de estrés o estímulo que experimente la célula, esta activación resultará en una regulación a la alta o a la baja de genes implicados en frenado del ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis y senescencia. Además de estas funciones importantes de p53, también se han identificado muchas otras dianas de p53 que juegan papeles importantes en autofagia, antiangiogénesis, protección frente a estrés oxidativo, regulación del metabolismo homeostático y mantenimiento de células madre.

En células que no están sometidas a estrés, los niveles de p53 están regulados a la baja conformando una vía en la que la propia proteína induce la transcripción de genes que conducen a la síntesis de su propio inhibidor, MDM2. Este inhibidor, junto con su homólogo MDMX, ubiquitina a p53, lo que conlleva a su exportación fuera del núcleo y su posterior degradación por el proteosoma.

De este modo, sabemos que p53, en condiciones de disponibilidad limitada de nutrientes, puede inducir autofagia, proceso por el cual se destruyen componentes innecesarios o disfuncionales intracelularmente (White, 2016). A su vez, este proceso de autofagia modula a la baja los niveles de p53 con lo que se evita daño celular y degeneración de tejido (White, 2016). Otra función de p53 es la de frenar el ciclo celular actuando sobre diversas dianas y la primera identificada como tal fue el inhibidor del ciclo celular CDKN1A, también conocido como p21, el cual, juega papeles importantes en el frenado del ciclo celular y senescencia (Franklin et al., 2000). Esta proteína p21 es de las dianas de p53 que experimenta mayor activación frente a estrés, por lo que sirve como indicador de actividad de p53. Se ha visto que ratones con el gen p21 anulado desarrollan tumores en estadios avanzados y se sabe que esta delección de p21 rara vez ocurre en cánceres humanos, lo cual, indica que no sería un potente supresor de tumores. Por esto, se desarrolló un modelo de ratón el cual presenta el gen de la luciferasa introducido en el promotor de p21 con el objetivo de monitorizar con éxito la actividad de p53 in vivo (Tinkum et al., 2011). Por otro lado, la senescencia también ha sido estudiada en modelos tumorales de ratones. Por ejemplo, se vio que la restauración de la actividad p53 en ratones que desarrollaron carcinoma hepatocelular y sarcoma en tejidos blandos con una ausencia previa de p53 resultó en un aclaramiento tumoral mediante mecanismos propios de senescencia (Xue et al., 2007). En otro estudio se

observó que el tratamiento con doxorubicina indujo senescencia en modelos de ratón con cáncer de mama que conservaban la forma silvestre de p53 (Jackson et al., 2012), mientras que aquellos modelos con la p53 mutada no, lo cual indicaría la importancia de la actividad p53 en la senescencia y su implicación en el manejo de procesos tumorales.

Hemos comentado anteriormente que p53 determina si una célula vive o muere. En cuanto a muerte celular, p53 ha demostrado ser un potente inductor de diferentes tipos de ésta. Por ejemplo, en respuesta a daño en el ADN por radiación ionizante, p53 induce apoptosis en el timo y desarrollo del sistema nervioso central in vivo, mientras que dicho fenotipo no se observó en ratones con el gen p53 anulado (Lee et al., 2001).

Y al igual que p53 puede inducir muerte celular, en casos de modificaciones perjudiciales del metabolismo, la proteína puede responder a estos cambios remodelando las vías metabólicas alteradas consiguiendo la supervivencia de la célula (Berkers et al., 2013).

## 1.2 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE P53.

Para comprender mejor la disposición estructural de p53, lo primero que debemos conocer es el concepto de proteína intrínsecamente desordenada (IDP). Este tipo de proteínas suelen presentar una estructura heterogénea, ya sea de forma parcial donde encontraríamos regiones ordenadas y regiones sin una estructura claramente definida, o bien que la estructura no definida se extienda a lo largo de toda la proteína en su conjunto. En cualquier caso, este desorden estructural no sólo no priva a las IDPs de sus funciones, sino que se piensa que les proporciona mayor flexibilidad a la hora de interactuar con otros componentes celulares, haciendo de ellas un tipo de proteínas muy versátiles funcionalmente hablando (Uversky, 2015)

La p53 se presenta activa en humanos como homotetrámero de 393 aminoácidos cada monómero, cuya organización estructural es compleja, consistente en un dominio de activación (TAD) N-terminal intrínsecamente desordenado, una región rica en prolinas, un dominio de unión a ADN (DBD), un dominio de tetramerización por donde se unen los monómeros y un dominio de regulación C-terminal intrínsecamente desordenado (figura 2). Como proteína modular que es, con grandes regiones intrínsecamente

desordenadas, presenta gran adaptabilidad conformacional con lo que consigue gran versatilidad a la hora de interactuar, así como modular la afinidad de unión mediante regiones modificables postraduccionalmente. Además el nivel de complejidad aumenta con el hecho de que la familia de genes de p53 expresan múltiples isoformas, a veces, con funciones antagónicas (Khoury and Bourdon, 2011).

La p53 tiene una topología con disposición dímero-dímero (Rajagopalan et al., 2011). Las subunidades que se encuentran en el dominio de tetramerización correspondiente a los residuos 325-355 están compuestas de cadenas beta cortas seguidas de un giro al que le sigue una alfa-hélice (figura 2). Los dímeros son estabilizados vía intermolecular mediante láminas beta antiparalelas y empaquetamiento antiparalelo de hélices alfa. Dos de estos dímeros estabilizados se ensamblan formando un tetrámero a través de interacciones hidrofóbicas hélice-hélice, dando lugar a un haz de cuatro hélices. La oligomerización regula la localización subcelular de p53 mediante enmascaramiento de una zona de señalización rica en leucina localizada en el dominio de tetramerización que participa en la exportación nuclear de la proteína. En un estudio se cuantificaron las proporciones de monómeros, dímeros y tetrámeros de p53 en células vivas usando espectroscopía de fluorescencia. En células no sometidas a estrés cuyos niveles de p53 eran bajos, los tres estados oligoméricos presentaban proporciones variables, pero frente a daño en el ADN se producía la rápida formación del tetrámero antes de que los niveles de p53 aumentaran, lo que sugiere la estabilización del estado tetramérico por medio de factores adicionales como proteínas accesorias y modificaciones postraduccionales (PTMs) (Gaglia et al., 2013). Curiosamente, en otro estudio se vio que la p63 humana TAp63 $\alpha$ , un parálogo de p53 que se expresa abundantemente en ovocitos no estresados, queda atrapada en un estado dimérico latente e inactivo después de la biosíntesis a través de la interacción de dímeros primarios con partes del dominio de transactivación y el dominio inhibidor C-terminal. Los tetrámeros activos se forman después de la fosforilación inducida por el daño del ADN (Deutsch et al., 2011).

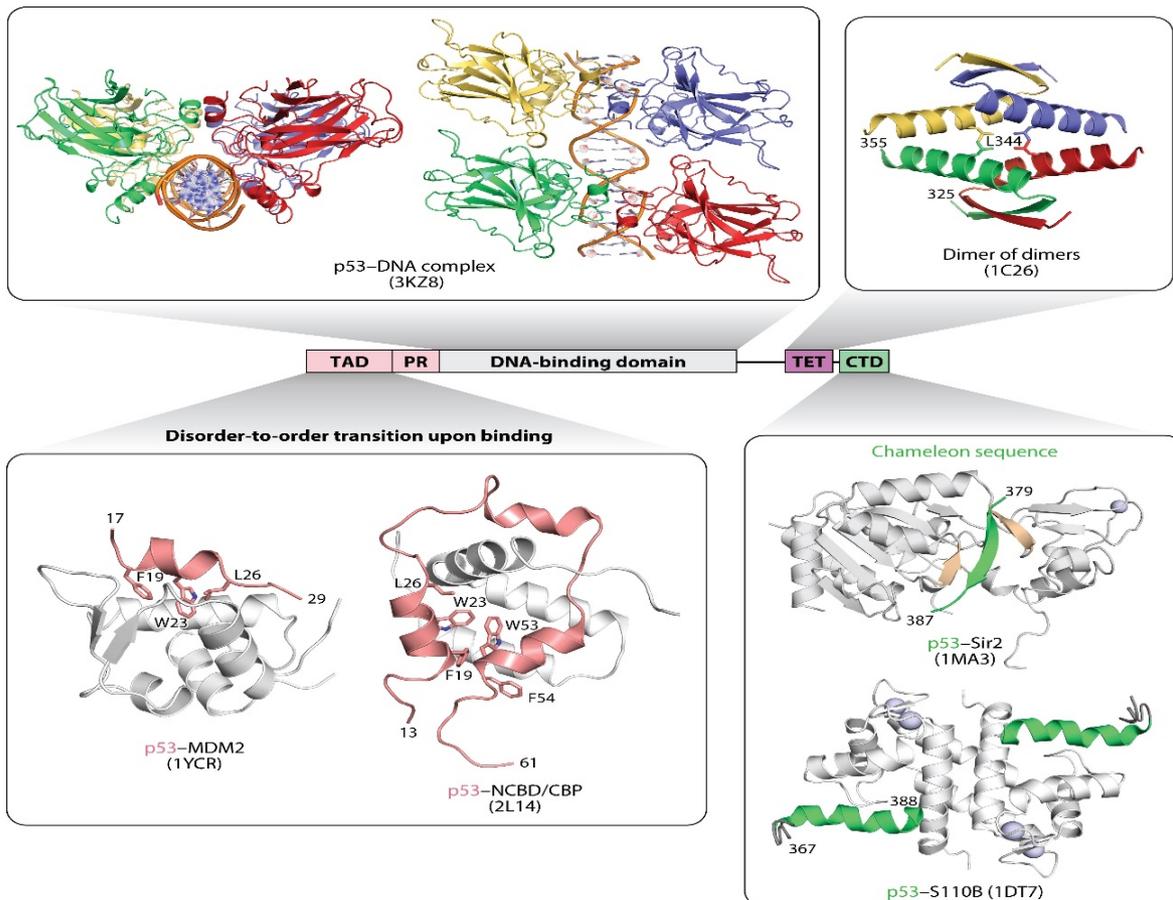


Figura 2. Organización estructural de p53 (Tomada de Joerger and Fersht 2016).

Los números de identificación del Protein Data Bank para las estructuras se dan entre paréntesis.

### 1.3 REGULACION DE LA FUNCIÓN DE P53 MEDIANTE SUS REGIONES INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS

El dominio de transactivación N-terminal intrínsecamente desordenado interactúa con componentes claves de la maquinaria de transcripción basal, como los coactivadores transcripcionales p300 y la proteína de unión a CREB (CBP) y, también, con los reguladores negativos MDM2 y MDMX. Este dominio puede ser dividido en dos subdominios, llamados TAD1 (que comprende los residuos 1-40) y TAD2 (que comprende los residuos 40-61), con regiones de estructura helicoidal donde se observa una transición de desorden a orden una vez que se unen a otras proteínas. Los residuos del subdominio TAD1 forman una hélice alfa anfipática al unirse al dominio N-terminal

de MDM2 y MDMX. En la interacción p53-MDM2/MDMX (Figura 2), la hélice de TAD1 se une a una hendidura hidrofóbica a través de tres residuos hidrofóbicos altamente conservados [Phe<sub>19</sub>, Trp<sub>23</sub> y Leu<sub>26</sub>] que se alinean a lo largo de un lado de la hélice y ocupan distintos bolsillos (Popowicz et al., 2008). El dominio de unión al coactivador nuclear de CBP interactúa con el TAD completo (Figura 2). En este caso, ambos están intrínsecamente desordenados en su estado independiente y se pliegan de forma sinérgica al unirse, con residuos de TAD 18-26 y 46-54 que adoptan una conformación en espiral como en los complejos mencionados anteriormente con péptidos derivados de TAD1 y TAD2 (Lee et al., 2010b).

La fosforilación es un factor importante en la regulación de la función de p53 porque modula las afinidades de enlace de antagonistas que compiten por el mismo sitio. La fosforilación de Thr<sub>18</sub>, por ejemplo, dificulta la unión del TAD1 con MDM2 y la fosforilación de Tyr<sub>99</sub> de MDMX inducida por estrés debilita la unión de péptidos derivados de p53 en, aproximadamente, dos órdenes de magnitud (Chen et al., 2016). Por el contrario, la fosforilación de la Thr<sub>18</sub> y otros residuos de serina y treonina, los cuales suelen ser focos de fosforilación, en el TAD aumenta su afinidad por varios dominios de CBP/p300 de forma aditiva (Lee et al., 2010b). Por lo tanto, la fosforilación, no sólo es útil para activar y desactivar rápidamente la función p53, sino que sucesivas fosforilaciones también permiten una respuesta gradual frente al estrés genotóxico (Lee et al., 2010a).

El dominio regulador C-terminal intrínsecamente desordenado también está sujeto a extensas PTMs y tiene un papel importante en la activación, degradación, localización celular y en el rastreo unidimensional de sitios de unión a p53 a lo largo del ADN. Este dominio también contiene un sitio de unión muy activo que interactúa con multitud de proteínas reguladoras (Tafvizi et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido recopilar información actualizada sobre la proteína p53 en cuanto a función y estructura, y sobre su papel en los diversos procesos tumorales estudiados hasta la fecha, así como evaluar aquellas posibles dianas que permitan establecer estrategias terapéuticas prometedoras en el tratamiento de los diferentes tipos de cánceres.

## 3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este trabajo bibliográfico se ha realizado una extensa búsqueda en la base de datos PubMed principalmente, usando como palabras clave: “p53”, “proteína intrínsecamente desordenada”, “estabilización de p53”, “cáncer”, “terapia”. De este modo, se comenzó por la búsqueda de los conceptos más básicos acerca de la vía de señalización de la proteína p53 y continuando con los aspectos que relacionan dicha proteína con la patología del cáncer, así como las aproximaciones terapéuticas más destacadas. Todo ello de manera conjunta con Mendeley, usado como base de datos para los artículos consultados y como gestor de las referencias bibliográficas.

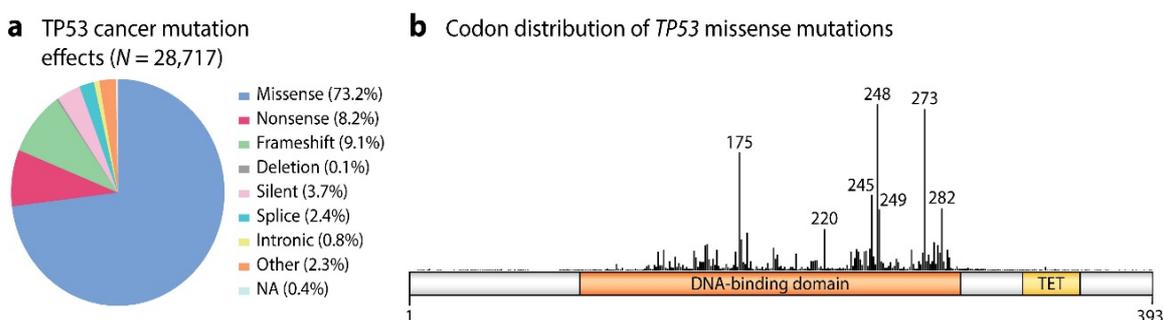
## 4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 4.1 DIFERENTES ASPECTOS DE LAS ALTERACIONES DE P53 EN CÁNCER

#### 4.1.1 MUTACIONES DE P53 EN CÁNCER

En el 50% o más de los diferentes tipos de cáncer humano, p53 experimenta mutaciones que la inactivan. La prevalencia de las mutaciones en p53 varía significativamente según el tipo de cáncer y también depende de la etapa de desarrollo del tumor, con prevalencias que van desde menos del 5% en cáncer de cuello uterino y el 10% en leucemia hasta un 80% en cáncer de pulmón no microcítico y 90% en cáncer de ovario (Leroy et al., 2014). La mayoría de las mutaciones de p53 asociadas al cáncer se localizan en el DBD. En concreto, las mutaciones somáticas más frecuentes se localizan en R175H, Y220C, G245S, R248Q / W, R249S, R273C / H, y R282W (Figura 3b). Mutaciones en las regiones intrínsecamente desordenadas de p53 son relativamente raras, y en el caso del dominio de tetramerización, las mutaciones ahí son un caso especial, ya que la frecuencia con la que se han observado mutaciones somáticas en él es relativamente baja, pero sí que se han encontrado mutaciones en células germinales en el TET, siendo R337H la mutación más frecuente observada en estas (Leroy et al., 2014).

Estas mutaciones que experimenta p53 no sólo se traducen en pérdida de actividad transcripcional, sino que también se da una ganancia de funciones (GOF), resultado de dichas alteraciones en la proteína, que provocan en la célula comportamientos tumorales agresivos como veremos a continuación.



**Figura 3.** Mutaciones de p53 en cáncer. a) Frecuencia de los diferentes tipos de mutaciones somáticas asociadas al cáncer. b) Distribución relativa de las mutaciones con cambio sentido en el codón de p53. (Tomadas de la base de datos de mutaciones en p53 de la International Agency for Research on Cancer's <http://p53.iarc.fr/>).

#### 4.1.2 GANANCIA DE FUNCIONES DE P53 MUTADA

Las mutaciones con cambio de sentido representan casi el 75% de todas las mutaciones de p53 en cánceres humanos (Figura 3a). El cambio de una sola base puede alterar un aminoácido, eliminando o alterando la actividad transcripcional de p53. Así mismo, ya se vio que la modificación de cualquiera de las cinco argininas, las cuales son puntos calientes de mutación en p53, desactiva la secuencia específica de unión al ADN. Además, se ha observado que pueden aparecer mutaciones en el DBD (algunas de ellas en estos puntos calientes), las cuales pueden producirse por la exposición a factores tan comunes como la luz ultravioleta, el tabaquismo o la exposición a la aflatoxina u otros carcinógenos químicos (Olivier et al., 2010).

El hecho de que la mayoría de las alteraciones de p53 en tumores sean mutaciones con cambio de sentido sugiere que las células que expresan p53 mutada tienen ventaja frente a las células con deficiencia en p53. Los primeros estudios indicaron que células tumorales con deficiencia en p53 silvestre presentaban nuevas propiedades tras la sobreexpresión de proteínas p53 mutantes (Dittmer et al., 1993). Por otro lado, se ha visto que células que presentan las formas mutadas más comunes de p53, a diferencia de aquellas que no las expresan, mostraron mayor poder metastásico (Hsiao et al., 1994). En el síndrome de Li-Fraumeni, personas con mutaciones sin sentido en p53 muestran mayor incidencia de cáncer y una edad más temprana de aparición del tumor (9-15 años antes, dependiendo de estudio), que individuos con otros tipos de mutaciones (Zerdoumi et al., 2013).

Esta GOF se ha podido comprobar generando ratones heterocigotos para p53 alterando uno de los alelos mediante knockin. Por ejemplo, los modelos de ratón heterocigóticos con las mutaciones p53R172H y p53R270H, las cuales emulan las alteraciones en los puntos calientes de mutación propios de cánceres humanos correspondientes, respectivamente, a los aminoácidos 175 y 273, desarrollaron tumores con alto poder de metástasis que no se ven en ratones p53<sup>+/-</sup> (Lang et al., 2004). De esto podemos sacar dos observaciones, en primer lugar, a pesar de que los ratones heterocigotos p53R172H desarrollaron tumores altamente metastásicos, las curvas de supervivencia fueron idénticas a las de los ratones p53<sup>+/-</sup>. En segundo lugar, el análisis de los tumores en los ratones heterocigotos y homocigotos p53R172H mostraron que la proteína p53

mutante no se mostraba necesariamente estable, lo que sugiere que las alteraciones específicas de cada tumor provocadas por el conjunto de mutaciones acumuladas son las que determinan la estabilidad de p53 mutada. De hecho, los análisis de tejido no tumoral en ratones homocigotos p53R172H indicó que la p53 mutada no era estable en células normales. Frente a esto, hay que ver si Mdm2, la ubiquitina ligasa E3 que induce la degradación proteosomal de p53 silvestre, también podría regular la p53 mutada. En ratones con fenotipo p53R172H/R172H; Mdm2<sup>-/-</sup>, la pérdida de Mdm2 estabilizó la proteína mutada p53R172H. Esto condujo a la disminución de la latencia del tumor y aumento de metástasis en comparación con ratones con ambos alelos anulados en los dos genes p53/Mdm2 (Terzian et al., 2008). Por lo tanto, en este caso, la estabilización de la p53 mutada condujo a fenotipos más agresivos que los encontrados en ratones que carecen de p53. De esta forma, lo que sugieren estos estudios es que las formas mutadas de p53 que se muestran estables presentan actividades adicionales a la proteína silvestre, que promueven la proliferación e invasión de células tumorales, lo que apoya la idea de GOF en fenotipos con p53 mutada en procesos de tumorigénesis.

#### 4.1.3 ESPECIFICIDAD DE P53 DEPENDIENTE DE TEJIDO

Muchos de los genes dianas de p53 que se han identificado han resultado ser específicos del tipo de célula y de tejido. Por ejemplo, en un estudio reciente, en el que p53 se estabilizó a través de la eliminación somática de Mdm2, los niveles de p21 se elevaron 200 veces en el riñón en comparación con 7 y 12 veces en el hígado y bazo, respectivamente (Zhang et al., 2014). También se observó que Puma, otra diana transcripcional de p53, aumentó 18 veces en el riñón, pero no aumentó en el hígado. Por otro lado, en otro estudio sobre la radiación gamma, cuatro dianas apoptóticas de p53 (DR5, Bid, Puma y Noxa) se indujeron en el yeyuno e íleon, los dos tejidos más sensibles a la radiación (Fei et al., 2002), mientras que los perfiles de activación de las diferentes dianas de p53 fueron diferentes en el colon transversal y el descendente. Sorprendentemente, incluso dentro del mismo tejido, diferentes compartimentos mostraron diferente regulación de la actividad de p53. En el caso del hígado, el principal gen activado frente a la radiación gamma fue p21.

Además, p53 activa transcripcionalmente el gen del factor inhibidor de la leucemia (LIF), que codifica una citoquina clave para la implantación del embrión. Se vio que hembras con el gen p53 anulado presentaban defectos de implantación, los cuales disminuyeron con la administración de LIF exógeno. Aunque en otros tejidos se expresa LIF frente a radiación gamma de manera dependiente de p53, el único defecto observado en hembras con el gen LIF anulado fue fallo de implantación en blastocitos (Hu et al., 2007). Lo que resaltan estos estudios es la importancia que puede tener una sola diana de p53 para un tejido específico: el útero en este caso.

Ratones que expresaban niveles bajos de Mdm2 también presentaron patologías concretas dependientes de p53 tales como mayor pigmentación de la epidermis, reducción de los túbulos seminíferos, disminución de los espermatozoides en los testículos o una disminución del número de los folículos ováricos (Pant et al., 2016). Ninguno de los defectos se recuperó mediante la eliminación de p21, pero los fenotipos reproductivos fueron recuperados por la pérdida de Puma, lo que resalta nuevamente la idea de que la respuesta de p53 es específicamente dependiente de dosis y tejido. Es importante destacar que la eliminación de una única diana de p53 aguas abajo como es Puma revirtió el fenotipo reproductivo dependiente de p53, mientras que el fenotipo de la piel parece estar controlado por la señalización del ligando Kit. Este ligando Kit es otra diana de p53 que se expresa en melanocitos, siendo p53 la que controla su migración y acumulación (Zeron-Medina et al., 2013).

Por otra parte, existen cofactores específicos de células o tejidos que regulan la actividad de p53 a través de interacción proteína-proteína y que también puede contribuir a la especificidad tisular o celular de la actividad de p53. Un estudio reciente mostró que el dominio del extremo C terminal de p53 regula la expresión génica de una manera específicamente dependiente de la diana y el tejido en cuestión. En este estudio se generó un alelo murino de p53 con una depleción de los 24 aminoácidos que componen el dominio del C-terminal (p53 $\Delta$ CTD). En la médula ósea y el timo, p53 $\Delta$ CTD estaba sobreactivado. Esto incrementó la senescencia y la transcripción de p21 en la médula ósea, e indujo la apoptosis y la transcripción de Puma y Noxa en el timo, lo que sugiere que el dominio del C-terminal disminuye la actividad de p53 en aquellos tejidos. En el hígado, sin embargo, p53 $\Delta$ CTD mostró alteración en su actividad. En el bazo, la proteína p53 $\Delta$ CTD estaba sobreexpresada, sugiriendo que este dominio es importante en el

control de los niveles de proteína p53 en este tejido. Sorprendentemente, p53 $\Delta$ CTD sobreexpresada no condujo ni a senescencia ni a fenotipos de apoptóticos en el bazo (Hamard et al., 2013). Todo esto sugiere que el dominio C-terminal podría unirse a cofactores específicos de células o tejidos, determinando la especificidad anteriormente mencionada de p53. Además, el dominio C-terminal podría resultar esencial en el mantenimiento estructural de la proteína mediante la regulación de interacciones entre los otros dominios de p53 y ligandos específicos del tipo celular.

#### 4.1.4 CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES DE P53 EN CÁNCER.

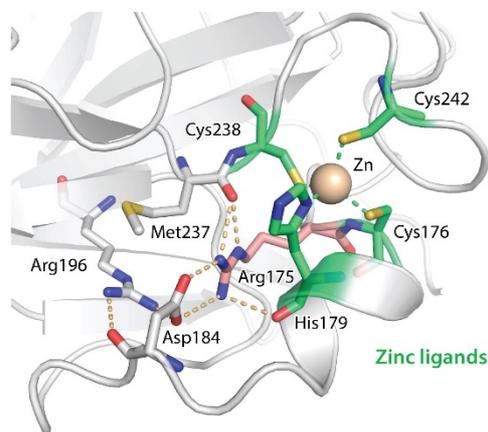
Las mutaciones asociadas a cáncer que se dan en p53 tienen efectos funcionales y estructurales diversos y se localizan, principalmente, en el DBD. Principalmente, las más observadas son mutaciones esenciales que eliminan sitios de interacción con ADN y mutaciones que alteran la estructura del DBD, comprometiendo la estabilidad cinética y termodinámica del dominio. Es decir, mutaciones en cualquiera de los tres residuos clave de arginina en la zona de enlace p53DNA -Arg<sub>248</sub>, Arg<sub>273</sub> o Arg<sub>280</sub>- resulta en una unión deficiente a ADN por parte de p53 y en una pérdida de actividad transcripcional (Dearth et al., 2007). Las llamadas mutaciones de contacto, aquellas que interfieren directamente en la unión al ADN, como por ejemplo, R273C y R273H eliminan un grupo guanidinio que forma enlaces importantes con la cadena de ADN en el centro de la interacción p53-DNA, sin afectar prácticamente a la estructura general o la estabilidad del DBD (Eldar et al., 2013). En el caso de R248W, la mutación no solo elimina una cadena lateral que interactúa, sino que también bloquea directamente la unión al ADN mediante la introducción de una cadena lateral hidrofóbica grande. Los efectos de las mutaciones estructurales sobre la estabilidad y la actividad de unión al ADN dependen de la ubicación en la que se dé y del tipo de mutación (Joerger and Fersht, 2007). Debido a la baja estabilidad intrínseca de su DBD, que se desnaturaliza a 44-45° C, p53 es muy susceptible a la inactivación por mutaciones que comprometan esa estabilidad estructural, y es por eso que formas mutada de p53 se encuentran en sus formas no plegadas a temperatura corporal (Bullock et al., 2000). Las sustituciones de aminoácidos grandes por otros más pequeños son altamente desestabilizantes. En el caso de V143A

y F270L, por ejemplo, crean cavidades internas en el núcleo hidrofóbico del sándwich  $\beta$ , pero a pesar de la pérdida de interacciones hidrofóbicas, retienen todas las características estructurales de la proteína silvestre en su estado plegado (Joerger et al., 2006). Y220C es otra forma mutada de p53 resultado de la sustitución de aminoácidos grande por otro más pequeño, que también presenta pérdida de interacciones hidrofóbicas. Pero en este caso la zona afectada se encuentra a nivel superficial en lugar de una cavidad interna. Por el contrario, en la mutación V157F, donde se sustituye a una valina por un residuo de fenilalanina mucho más grande, se produce un plegamiento del núcleo hidrofóbico del DBD, energéticamente desfavorable, en la zona donde se produce la mutación. En el caso de la mutación R282W, se desestabiliza el DBD al verse interrumpida la red de enlaces hidrógeno que se forman entre dos hélices que se conectan entre sí formando un giro (Joerger et al., 2006).

La característica común de estas formas de p53 mutadas a nivel estructural es que se desestabilizan a partir de 3-4 kcal/mol, lo que corresponde a una temperatura de desnaturalización de aproximadamente 5-7° C más baja que la p53 silvestre, aunque conservan las características estructurales generales del DBD de la proteína silvestre en su estado plegado, especialmente los sitios funcionales. Lo que da como resultado fenotipos sensibles a la temperatura. Es por esto que se inactivan a 37° C, pero muestran actividad transcripcional por debajo de temperaturas fisiológicas, es decir, a temperaturas a las que las formas mutada de la proteína no están desnaturalizadas (Dearth et al., 2007). Como hablaremos más adelante, las formas mutadas de p53 suponen una diana terapéutica de gran importancia en el tratamiento del cáncer, ya que el objetivo será restablecer la actividad normal de la proteína mediante estabilizadores moleculares. Sin embargo, muchas mutaciones estructurales en la superficie de unión al ADN no están asociadas con fenotipos sensibles a la temperatura ya que, además de desestabilizar la proteína, también inducen cambios estructurales locales que afectan a la unión con el ADN en el estado plegado. La interrupción de la red de enlace en la Arg<sub>249</sub> por mutación a serina en el mutante R249S, por ejemplo, perturba la conformación de horquilla en L3 que es crucial para el correcto posicionamiento de la Arg<sub>248</sub>, residuo de contacto con el ADN (Suad et al., 2009).

Por otro lado, las mutaciones que resultan en la pérdida de zinc son particularmente nocivas, ya que provocan la desestabilización del DBD con sólo 3 kcal/mol e impide la

unión al ADN, porque la unión del zinc es crucial para la integridad estructural de la región L2-L3, que interactúa con elementos de respuesta del surco menor del ADN (Bullock et al., 2000). Estas mutaciones afectan directamente a cualquiera de los ligandos de zinc, como las mutaciones C176F, H179R, C238Y y C242S, o residuos en las inmediaciones de interacción del zinc, como en el caso de la mutación más frecuente en cáncer, R175H (Figura 4). La sustitución de Arg<sub>175</sub> por una histidina no sólo interrumpe el puente salino con Asp<sub>184</sub>, sino que también altera la esfera de coordinación del zinc, lo que resulta en una afinidad de unión al zinc drásticamente reducida y despliegue global a temperatura corporal (Yu et al., 2014). La mutación R175H da lugar a un fenotipo no sensible a la temperatura. Por el contrario, una mutación que sustituya la arginina por un aminoácido con una cadena lateral más pequeña que la histidina es mucho menos perjudicial para la función de p53. La mutación R175A, por ejemplo, solo tiene una leve desestabilización in vitro y la mutación R175C apenas tiene un efecto sobre la actividad transcripcional de p53, lo que sugiere que en estos dos casos hablaríamos de mutaciones pasajeras, en lugar de mutaciones conductoras (Leroy et al., 2014).



**Figura 4.** Esfera de coordinación del zinc con p53 (Tomada de Petitjean et al., 2007)

#### 4.1.5 AGREGACIÓN DE P53.

Por otro lado, ya se vio que los agregados de p53 eran, probablemente, incluso más importante que la inestabilidad termodinámica de las formas mutadas (Kraiss et al., 1991). La inactivación de p53 y sus mutantes in vitro se da rápidamente a temperaturas por debajo de la temperatura de desnaturalización. El DBD se despliega y luego se agrega irreversiblemente (Friedler et al., 2003), dando lugar a diversas morfologías, incluyendo amorfas, fibrilares y priónicas, dependiendo de las condiciones experimentales (Ano Bom et al., 2012). Recientemente se observó que un péptido, que penetra en las células, diseñado para bloquear la secuencia amiloidogénica en el DBD, ha demostrado restaurar la función supresora de tumores de p53 en el cáncer de óvulo (Soragni et al., 2016).

Además, también se han observado que moléculas estabilizadoras de la proteína de las que hablaremos a continuación han evitado que se produzca esta agregación. Aun así, es importante tener en cuenta que la eficacia de cada estrategia depende del contexto y no resultan igual de prometedoras para todos los casos.

## 4.2 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Una vez conocidas las principales alteraciones que se observan en la proteína p53 mutada y se ha establecido su relación con diferentes procesos tumorales, podemos estudiar diferentes estrategias cuyas dianas sean estas alteraciones descritas, con el objetivo de recuperar las funciones perdidas de la proteína.

### 4.2.1 MOLÉCULAS QUE ESTABILIZAN P53.

En este caso, la idea es usar moléculas que al unirse a la proteína estabilicen su conformación activa y esto se puede conseguir mediante dos estrategias principales: diseñar el fármaco de manera que su diana sea un sitio de unión presente en la superficie tanto de la p53 silvestre como de la mutada, o que la diana del fármaco se

una a una región específica, propia del mutante en concreto. La primera estrategia propuesta es un reto, debido a la ausencia de bolsillos de unión bien definidos en el DBD. Se ha visto que, por ejemplo, FL-CDB3, un péptido de nueve residuos marcado con fluoresceína derivado de la proteína de unión a p53 53BP2, se une y estabiliza a la p53 silvestre y a la mutante in vitro y aumenta la expresión de p53 en líneas celulares tumorales que presentaban p53 mutada. Además, se sugirió que podría haber una diana para moléculas estabilizadoras entre el giro L1 y la lámina beta S3 alrededor de la cisteína Cys<sub>12</sub>, localizada en el DBD. Como ejemplo de molécula que se une, tanto a la p53 silvestre como a la mutada, tenemos el ácido estíctico, el cual se comprobó que inducía la expresión de p21 in vitro en células tumorales humanas Saos-2 (mutación R175H) de una manera dosis-dependiente (Wassman et al., 2013).

Por otro lado, para el caso de moléculas dirigidas específicamente a formas mutadas de p53 se debe destacar el mutante oncogénico Y220C, tratándose de la novena mutación de p53 más común en cáncer. La mutación que sustituye una tirosina por una cisteína resulta en una pérdida de interacciones hidrofóbicas, que desestabilizan la proteína con 4 kcal/mol, creando una grieta en la superficie de la misma que puede usarse como diana de moléculas estabilizadoras (figura 5) (Joerger et al., 2006).

Es importante destacar que el sitio de mutación está lejos de las regiones funcionales de la proteína, minimizando así cualquier posible efecto inhibitorio de la unión. Mediante cribado y diseño virtual, se descubrió una molécula a base de carbazol, PhiKan083, que se une a esta grieta, aumentando la temperatura de desnaturalización del mutante y ralentizando así su velocidad de desnaturalización (Boeckler et al., 2008). Posteriormente, se identificaron una serie de estabilizadores de Y220C, estructural y químicamente diferentes, con modos de unión únicos en células tumorales humanas. También, la agregación se puede inhibir eficazmente en el caso de Y220C porque los ligandos diseñados que estabilizan la proteína también pueden ralentizar la cinética de agregación (Liu et al., 2013).

La disponibilidad de estructuras cristalinas de alta resolución de numerosos complejos Y220C-ligando ha proporcionado información importante sobre la plasticidad estructural de la grieta superficial que se genera por la mutación, revelando un bolsillo hidrofóbico que se abre de forma transitoria, y que se modula mediante la Cys<sub>220</sub> (Figura 5). De esta manera, se ha podido analizar con mayor profundidad los diferentes modos

en que interactúan proteína y ligando, proporcionando un marco para el diseño de ligandos más potentes (Joerger et al., 2015)

Una de las estructuras principales, PK7088, es biológicamente activa en las células tumorales que albergan la mutación Y220C, aumentando los niveles de proteína mutante plegada en la conformación de la proteína silvestre y restaurando así sus funciones transcripcionales, además de inducir apoptosis dependiente de p53-Y220C (Liu et al., 2013). De esta manera, todos estos datos apoyan la idea de que restaurar la actividad transcripcional de p53 silvestre en sus formas mutadas mediante el diseño de moléculas que estabilicen estructuralmente dicha proteína mutada es una estrategia de terapia frente al cáncer prometedora.

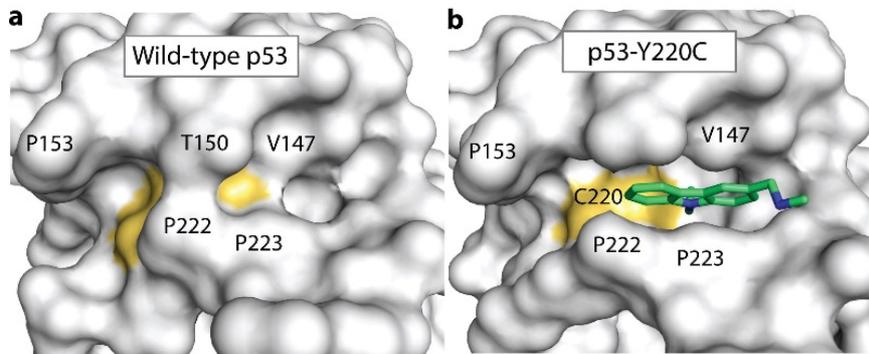


Figura 5. Mutante de p53 Y220C como diana de moléculas estabilizadoras. a) Entorno de la tirosina 220 en la superficie molecular de p53 silvestre señalada en amarillo. b) Superficie molecular del mutante Y220C con la molécula estabilizadora PhiKan083, donde se puede observar la grieta inducida por la mutación en la superficie de la proteína (Tomada de Boeckler et al. 2008).

#### 4.2.2 RESTAURACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON ZINC EN LA P53 MUTADA MEDIANTE METALLOCHAPERONAS.

Sabemos que la actividad transcripcional de p53 depende de su interacción con zinc y ésta, a su vez, está determinada por el estado redox de la célula y de la biodisponibilidad del zinc. La pérdida de esta interacción puede dar lugar a un desplegamiento de la proteína, aunque también hay que tener en cuenta que un exceso de zinc puede provocar un plegamiento incorrecto y la consiguiente agregación de p53 (Butler and Loh,

2007). En base a esto, en un estudio de cribado de moléculas diseñadas contra líneas de células tumorales se identificó una, ZMC1, que inducía la inhibición del crecimiento y la apoptosis en aquellas líneas con deficiencia en la interacción con zinc (R175H) (Yu et al., 2012). A diferencia de los estabilizadores, ZMC1 no restaura la actividad de p53 perdida en sus formas mutadas por unión directa, sino que el mecanismo propuesto es que actúe como una metalochaperona. Es decir, dos moléculas de ZMC1 se unirían a un ion zinc y lo transportarían a través de la membrana celular como un ionóforo específico del metal, aumentando los niveles de zinc intracelular a una concentración que permite la interacción zinc-R175H previamente perdida (Blanden et al., 2015). Hay que tener en cuenta, en lo que respecta a la toxicidad de estas moléculas, que se ha visto que existe otro mecanismo de ZMC1 independiente de zinc, relacionado con la quelación de hierro que afecta al estado redox de la célula y aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno.

#### 4.2.3 INHIBIDORES DE LA INTERACCIÓN P53-MDM2/MDMX

Se sabe que MDM2 y MDMX están sobre expresados en muchos tumores que conservan p53 silvestre, lo que se traduce en inhibición de la función de p53. Por lo tanto, inhibir la función MDM2/MDMX, bloquear su interacción con p53, o ambos, suponen, a priori, estrategias terapéuticas prometedoras en estos cánceres. En el caso de la molécula de reactivación de p53 e inducción de apoptosis en células tumorales (también conocida por sus siglas en inglés RITA o como NSC-652287) activa la respuesta de p53 frente a daño del ADN, sugiriéndose en un principio que bloqueaba la interacción p53-MDM2 al unirse directamente al dominio N-terminal. Aunque, en estudios de resonancia magnética nuclear no se ha detectado in vitro esa interacción (Krajewski et al., 2005) y, por otro lado, hay evidencia de que la muerte celular inducida por RITA no depende de p53, sino que se desencadena por entrecruzamiento de ADN (Wanzel et al., 2016). Asimismo, se han identificado diversos inhibidores de la actividad E3 ligasa del MDM2, pero se ha sugerido, que la inhibición de la actividad E3 ligasa es insuficiente para restaurar completamente la actividad de p53; por lo que puede ser necesario combinar inhibidores con un antagonista de MDM2/MDMX para lograr el efecto terapéutico deseado en células tumorales (Wade et al., 2013a).

Hasta la fecha, el inhibidor de MDM2 más potente y selectivo que se ha diseñado es AM-7209, el cual se une con una constante de disociación de 38 pM y ha demostrado tener actividad antitumoral prometedora in vivo. Curiosamente, la estructura del complejo AM-7209-MDM2 revela que la región N-terminal de MDM2 (residuos 6-24) está ordenada y se pliega al unirse con el ligando de forma que este cambio en la conformación interferiría con la unión a p53 (Rew et al., 2014).

Debido a las diferencias claras en los sitios de unión a p53 de MDM2 y MDMX, especialmente, en el bolsillo donde se encuentra la Leu<sub>26</sub>, los inhibidores diseñados para unirse a MDM2 resultan ser inhibidores débiles de MDMX. Sin embargo, ya sabemos que para conseguir una activación satisfactoria de la vía p53 en células tumorales con p53 silvestre se requiere una inhibición efectiva de ambos, MDM2 y MDMX (Wade et al. 2013b). Por esto, se están desarrollando antagonistas duales de MDM2 y MDMX. Como ejemplo de estos antagonistas duales tenemos a la indolil hidantoína RO-2443, que se une a ambas proteínas con baja afinidad, del orden de nanomolar. La unión induce homo y heterodimerización por sus dominios N-terminal, que se estabiliza mediante acoplamiento aromático de dos moléculas inhibitoras y una tirosina de cada una de las dos cadenas de MDM2 y MDMX. En este modo de unión, el grupo indolilo de RO-2443 se une al bolsillo Phe<sub>19</sub> de un monómero de MDM2/X, mientras que el grupo di-fluorofenilo intreracciona con el Trp<sub>23</sub> del otro monómero, quedando libre el bolsillo de la Leu<sub>26</sub>. Este tipo de inhibidores reactiva la vía de p53 en células tumorales que sobre expresan MDMX y que no responden bien a inhibidores de MDM2 convencionales (Graves et al., 2012).

También se han estudiado péptidos hidrocarbonados que interaccionan con  $\alpha$ -hélices, estabilizando la conformación activa de la  $\alpha$ -hélice y mejorando la farmacocinética. De este modo, se ha visto que este tipo de péptidos restaura la función de p53 en líneas celulares tumorales que sobre expresan MDM2/MDMX (Chang et al., 2013).

Por otro lado, cabe destacar que MDMX contiene un dominio autoinhibidor que reduce su afinidad por el TAD de p53 en aproximadamente 100 veces menos, en comparación con la de su dominio N-terminal. Se trata de una secuencia que contiene dos residuos de triptófano altamente conservados, Trp<sub>200</sub> y Trp<sub>201</sub>, la cual, se vuelve a plegar en el dominio N-terminal, de una forma similar a la forma en la que se une el TAD de p53. Esta autoinhibición regula a la baja mediante la interacción con la Caseína quinasa I $\alpha$ ,

que enmascara el dominio de la secuencia de autoinhibición (Chen et al., 2015). Conociendo esto, bloquear la interacción con la Caseína quinasa 1 $\alpha$  puede ser una estrategia complementaria para inhibir la interacción p53-MDMX.

#### 4.2.4 RESTAURAR LA FUNCIÓN PERDIDA EN P53 CON MUTACIONES SIN SENTIDO

Muchas de las enfermedades genéticas que se heredan son causadas por mutaciones sin sentido, lo que da lugar a codones de terminación prematura (PTC) y a la degradación rápida del ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD). Por esto, la idea de suprimir estos codones y de estabilizar el ARNm frente a NMD parece una buena estrategia terapéutica frente a una gran serie de trastornos genéticos. En esta línea, por ejemplo, se ha visto que los aminoglucósidos se unen al centro decodificador del ribosoma, suprimiendo el codón de terminación en enfermedades genéticas, como la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne (Keeling et al., 2014). De este modo, esta estrategia podría tener éxito en el tratamiento de cánceres relacionados con mutaciones de p53 sin sentido.

Se sabe que el 8% de las mutaciones somáticas de p53 relacionadas con cáncer dan lugar a PTC (Figura 3a), lo que supone más de medio millón nuevos casos de cáncer al año en todo el mundo. Y que la eficiencia de lectura del PTC depende de la propia secuencia del codón en particular y del contexto que rodea a dicha secuencia (Lee and Dougherty, 2012).

Las mutaciones que dan PTC más frecuentes son R196X y R213X. De acuerdo con esto, en un estudio se observó que sólo 3 de los 11 PTC que se dan en p53 de forma natural podían suprimirse con gentamicina, siendo R213X la mutación que mejor respondía al antibiótico. Asimismo, también se observó que el tratamiento, de forma separada, con gentamicina y geneticina (G418) de las células tumorales que presentaban formas mutadas de p53 (R196X o R213X) estabilizó el ARNm frente a NMD, restaurando la síntesis de p53 completamente y reduciendo la viabilidad de las células tumorales tratadas (Floquet et al., 2011). Sin embargo, la aplicación clínica de este tipo de antibióticos para estos casos presenta una gran limitación debido a su toxicidad.

Un paso clave en la NMD es el reclutamiento de la proteína adaptadora SMG7, una proteína parecida a 14-3-3, por parte de la helicasa UPF1 al complejo de unión al exón.

En esta línea, se identificaron moléculas, mediante screening virtual, que interrumpían la formación del complejo SMG7-UPF1 y aumentaban la expresión de ARNm portador de PTCs a concentraciones de escala nanomolar con mínima toxicidad. Una de estas moléculas, NMDI14, demostró actuar de forma sinérgica con G418, dando lugar a un aumento en la expresión de p53 e indujo muerte celular en aquellas líneas celulares con mutaciones sin sentido que originaban PTCs (Martin et al., 2014).

Una vez más, vemos que la idea de centrar la terapia en una sola diana no es lo más efectivo, sino que estudiar estrategias con dos o incluso más dianas de forma simultánea parece ser mucho más eficiente en cuanto a eficacia y seguridad.

## 5. CONCLUSIONES

-Es evidente la importancia del papel que juega p53 en el cáncer, no sólo por la pérdida de su actividad transcripcional, sino también por la GOF que presentan las formas mutadas de esta proteína que conducen a la célula a comportamientos tumorales.

-La especificidad dependiente de tejido y del contexto en sí, observada en la vía de señalización de p53, debe ser estudiada con mayor profundidad, con el fin de identificar las dianas adecuadas y establecer las estrategias terapéuticas adecuadas para cada tipo de cáncer.

-Actualmente, es necesario insistir y profundizar en el estudio de las estrategias terapéuticas estudiadas hasta la fecha, que mejoren los perfiles de seguridad y eficacia, y parece ser que el camino más prometedor para ello es estudiar el efecto sinérgico que puedan tener las diferentes moléculas diseñadas para las diversas dianas existentes en la vía de p53.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ano Bom APD, Rangel LP, Costa DCF, de Oliveira GAP, Sanches D, Braga CA, et al. Mutant p53 Aggregates into Prion-like Amyloid Oligomers and Fibrils. *J Biol Chem*. 2012 Aug 10;287(33):28152–62.
- Berkers CR, Maddocks ODK, Cheung EC, Mor I, Vousden KH. Metabolic Regulation by p53 Family Members. *Cell Metab*. 2013 Nov 5;18(5):617–33.
- Blanden AR, Yu X, Wolfe AJ, Gilleran JA, Augeri DJ, O'Dell RS, et al. Synthetic Metallochaperone ZMC1 Rescues Mutant p53 Conformation by Transporting Zinc into Cells as an Ionophore. *Mol Pharmacol*. 2015 Mar 26;87(5):825–31.
- Boeckler FM, Joerger AC, Jaggi G, Rutherford TJ, Veprintsev DB, Fersht AR. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc Natl Acad Sci*. 2008a Jul 29;105(30):10360–5.
- Bullock AN, Henckel J, Fersht AR. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*. 2000 Mar 7;19(10):1245–56.
- Butler JS, Loh SN. Zn<sup>2+</sup>-Dependent Misfolding of the p53 DNA Binding Domain. *Biochemistry*. 2007 Mar 13;46(10):2630–9.
- Chang YS, Graves B, Guerlavais V, Tovar C, Packman K, To K-H, et al. Stapled  $\alpha$ -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Sep 3;110(36):E3445-54.
- Chen L, Borchers W, Wu S, Becker A, Schonbrunn E, Daughdrill GW, et al. Autoinhibition of MDMX by intramolecular p53 mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 14;112(15):4624–9.
- Chen X, Gohain N, Zhan C, Lu W-Y, Pazgier M, Lu W. Structural basis of how stress-induced MDMX phosphorylation activates p53. *Oncogene*. 2016 Apr 6;35(15):1919–25.
- Dearth LR, Qian H, Wang T, Baroni TE, Zeng J, Chen SW, et al. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*. 2007 Feb;28(2):289–98.
- Deutsch GB, Zielonka EM, Coutandin D, Weber TA, Schäfer B, Hannewald J, et al. DNA Damage in Oocytes Induces a Switch of the Quality Control Factor TAp63 $\alpha$  from Dimer to Tetramer. *Cell*. 2011 Feb;144(4):566–76.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, et al. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*. 1993 May 1;4(1):42–6.
- Eldar A, Rozenberg H, Diskin-Posner Y, Rohs R, Shakked Z. Structural studies of p53 inactivation by DNA-contact mutations and its rescue by suppressor mutations via alternative protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2013 Oct 1;41(18):8748–59.
- Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS. Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7316–27.
- Floquet C, Deforges J, Rousset J-P, Bidou L. Rescue of non-sense mutated p53 tumor

- suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res.* 2011 Apr;39(8):3350–62.
- Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional Collaboration between Different Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Suppresses Tumor Growth with Distinct Tissue Specificity. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug 15;20(16):6147–58.
- Friedler A, Veprintsev DB, Hansson LO, Fersht AR. Kinetic Instability of p53 Core Domain Mutants. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):24108–12.
- Gaglia G, Guan Y, Shah J V., Lahav G. Activation and control of p53 tetramerization in individual living cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 Sep 17;110(38):15497–501.
- Graves B, Thompson T, Xia M, Janson C, Lukacs C, Deo D, et al. Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Jul 17;109(29):11788–93.
- Hamard P-J, Barthelery N, Hogstad B, Mungamuri SK, Tonnessen CA, Carvajal LA, et al. The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo. *Genes Dev.* 2013 Sep 1;27(17):1868–85.
- Hsiao M, Low J, Dorn E, Ku D, Pattengale P, Yeargin J, et al. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *Am J Pathol.* 1994 Sep;145(3):702–14.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature.* 2007 Nov 29;450(7170):721–4.
- Jackson JG, Pant V, Li Q, Chang LL, Quintás-Cardama A, Garza D, et al. p53-Mediated Senescence Impairs the Apoptotic Response to Chemotherapy and Clinical Outcome in Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2012 Jun 12;21(6):793–806.
- Joerger AC, Ang HC, Fersht AR. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Oct 10;103(41):15056–61.
- Joerger AC, Bauer MR, Wilcken R, Baud MGJ, Harbrecht H, Exner TE, et al. Exploiting Transient Protein States for the Design of Small-Molecule Stabilizers of Mutant p53. *Structure.* 2015 Dec 1;23(12):2246–55.
- Joerger AC, Fersht AR. Structure–function–rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene.* 2007 Apr 2;26(15):2226–42.
- Joerger AC, Fersht AR. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annu Rev Biochem.* 2008;77(1):557–82.
- Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem.* 2016 Jun 2;85(1):375–404.
- Keeling KM, Xue X, Gunn G, Bedwell DM. Therapeutics Based on Stop Codon Readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014 Aug 31;15(1):371–94.
- Kenzelmann Broz D, Mello SS, Biegging KT, Jiang D, Dusek RL, Brady CA, et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev.* 2013;27(9):1016–31.
- Khoury MP, Bourdon J-C. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer.* 2011 Apr 1;2(4):453–65.

- Kraiss S, Spiess S, Reihnsaus E, Montenarh M. Correlation of metabolic stability and altered quaternary structure of oncoprotein p53 with cell transformation. *Exp Cell Res*. 1991 Jan;192(1):157–64.
- Krajewski M, Ozdowy P, D’Silva L, Rothweiler U, Holak TA. NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro. *Nat Med*. 2005 Nov 1;11(11):1135–6.
- Lang GA, Iwakuma T, Suh Y-A, Liu G, Rao VA, Parant JM, et al. Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):861–72.
- Lee CW, Ferreon JC, Ferreon ACM, Arai M, Wright PE. Graded enhancement of p53 binding to CREB-binding protein (CBP) by multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci*. 2010a Nov 9;107(45):19290–5.
- Lee CW, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Structure of the p53 Transactivation Domain in Complex with the Nuclear Receptor Coactivator Binding Domain of CREB Binding Protein. *Biochemistry*. 2010b Nov 23;49(46):9964–71.
- Lee H-LR, Dougherty JP. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacol Ther*. 2012 Nov;136(2):227–66.
- Lee Y, Chong MJ, McKinnon PJ. Ataxia telangiectasia mutated-dependent apoptosis after genotoxic stress in the developing nervous system is determined by cellular differentiation status. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6687–93.
- Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 Mutations in Human Cancer: Database Reassessment and Prospects for the Next Decade. *Hum Mutat*. 2014 Jun;35(6):672–88.
- Liu X, Wilcken R, Joerger AC, Chuckowree IS, Amin J, Spencer J, et al. Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jul 1;41(12):6034–44.
- Martin L, Grigoryan A, Wang D, Wang J, Breda L, Rivella S, et al. Identification and Characterization of Small Molecules That Inhibit Nonsense-Mediated RNA Decay and Suppress Nonsense p53 Mutations. *Cancer Res*. 2014 Jun 1;74(11):3104–13.
- Organización Mundial de la Salud. TP53 mutation database of the International Agency for Research on Cancer. 2013 [en Línea]. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: <http://p53.iarc.fr/>
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan 1;2(1):a001008.
- Pant V, Xiong S, Chau G, Tsai K, Shetty G, Lozano G. Distinct downstream targets manifest p53-dependent pathologies in mice. *Oncogene*. 2016;35(44):5713–21.
- Paradox T. *The Paradox of p53: What, How, and Why?* 2016;
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V., Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):622–9.
- Popowicz G, Czarna A, Holak T. Structure of the human Mdmx protein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Cell Cycle*. 2008 Aug 28;7(15):2441–3.

- Rajagopalan S, Huang F, Fersht AR. Single-Molecule characterization of oligomerization kinetics and equilibria of the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res.* 2011 Mar 1;39(6):2294–303.
- Rew Y, Sun D, Yan X, Beck HP, Canon J, Chen A, et al. Discovery of AM-7209, a Potent and Selective 4-Amidobenzoic Acid Inhibitor of the MDM2–p53 Interaction. *J Med Chem.* 2014 Dec 26;57(24):10499–511.
- Soragni A, Janzen DM, Johnson LM, Lindgren AG, Thai-Quynh Nguyen A, Tiourin E, et al. A Designed Inhibitor of p53 Aggregation Rescues p53 Tumor Suppression in Ovarian Carcinomas. *Cancer Cell.* 2016 Jan 11;29(1):90–103.
- Suad O, Rozenberg H, Brosh R, Diskin-Posner Y, Kessler N, Shimon LJW, et al. Structural Basis of Restoring Sequence-Specific DNA Binding and Transactivation to Mutant p53 by Suppressor Mutations. *J Mol Biol.* 2009 Jan;385(1):249–65.
- Tafvizi A, Huang F, Fersht AR, Mirny LA, van Oijen AM. A single-molecule characterization of p53 search on DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Jan 11;108(2):563–8.
- Terzian T, Suh Y-A, Iwakuma T, Post SM, Neumann M, Lang GA, et al. The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes Dev.* 2008 May 15;22(10):1337–44.
- Tinkum KL, Marpegan L, White LS, Sun J, Herzog ED, Piwnica-Worms D, et al. Bioluminescence imaging captures the expression and dynamics of endogenous p21 promoter activity in living mice and intact cells. *Mol Cell Biol.* 2011 Sep 15;31(18):3759–72.
- Uversky VN. The multifaceted roles of intrinsic disorder in protein complexes. *FEBS Lett.* 2015 Sep 14;589(19PartA):2498–506.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307–10.
- Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009;137(3):413–31.
- Wade M, Li Y-C, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013a Feb 10;13(2):83–96.
- Wade M, Li Y-C, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013b Feb 10;13(2):83–96.
- Wanzel M, Vischedyk JB, Gittler MP, Gremke N, Seiz JR, Hefter M, et al. CRISPR-Cas9–based target validation for p53-reactivating model compounds. *Nat Chem Biol.* 2016 Jan 23;12(1):22–8.
- Wassman CD, Baronio R, Demir Ö, Wallentine BD, Chen C-K, Hall L V., et al. Computational identification of a transiently open L1/S3 pocket for reactivation of mutant p53. *Nat Commun.* 2013 Dec 29;4(1):1407.
- White E. Autophagy and p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Apr 1;6(4):a026120.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007 Feb 24;445(7128):656–60.

- Yu X, Blanden AR, Narayanan S, Jayakumar L, Lubin D, Augeri D, et al. Small molecule restoration of wildtype structure and function of mutant p53 using a novel zinc-metallochaperone based mechanism. *Oncotarget*. 2014 Oct 15;5(19):8879–92.
- Yu X, Vazquez A, Levine AJ, Carpizo DR. Allele-Specific p53 Mutant Reactivation. *Cancer Cell*. 2012 May 15;21(5):614–25.
- Zerdoumi Y, Aury-Landas J, Bonaïti-Pellié C, Derambure C, Sesboué R, Renaux-Petel M, et al. Drastic Effect of Germline *TP53* Missense Mutations in Li-Fraumeni Patients. *Hum Mutat*. 2013 Mar;34(3):453–61.
- Zeron-Medina J, Wang X, Repapi E, Campbell MR, Su D, Castro-Giner F, et al. A Polymorphic p53 Response Element in KIT Ligand Influences Cancer Risk and Has Undergone Natural Selection. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):410–22.
- Zhang Y, Xiong S, Li Q, Hu S, Tashakori M, Van Pelt C, et al. Tissue-specific and age-dependent effects of global Mdm2 loss. *J Pathol*. 2014 Aug;233(4):380–91.