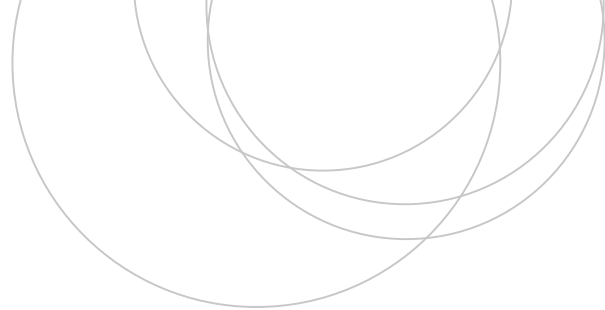


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

# p53 proteinaren eginkizuna kolon-ondesteko minbizian

Egilea:

Julen Viana Errasti

Zuzendariak:

Guiomar Pérez de Nanclares Leal

Ana Maria Zubiaga Elordieta

© 2021. Julen Viana Errasti

## Aurkibidea

Sarrera .....	1
Hipotesiak eta helburuak .....	3
Materialak eta metodoak .....	4
1. <i>TP53</i> genearen aldaeren identifikazioa eta ikerketa .....	4
1.1 Laginen eskuratzea .....	4
1.2 p53 proteinaren azterketa immunohistokimikoa .....	4
1.3 Azterketa molekularra .....	4
1.4 <i>In silico</i> azterketa.....	6
2. <i>TP53</i> cDNAren mutagenesia.....	6
Emaitzak.....	7
1. <i>TP53</i> genearen aldaeren identifikazioa eta ikerketa.....	7
1.1 Analisi molekularren emaitzak.....	7
1.2 <i>In silico</i> azterketaren emaitzak: Domeinuak eta funtzioak aztertuz .....	9
2. Plasmido mutanteen lorpena.....	9
3. Bi aldaera cis egoeran.....	10
Eztabaida .....	10
Ondorioak .....	13
Bibliografia.....	13
Eranskina .....	16

## Sarrera

Kolon-ondesteko minbizia (CRC, *colorectal cancer*, ingeleraz) bigarren minbizi motarik ohikoena da mundu mailan. Mendebaldeko herrialdeen populazioaren %5ak beren bizitzan zehar CRC pairatuko duela estimatzen da. Nahiz eta tumore mota honen karakterizazioarako erabiltzen diren teknika genetikoaren eta molekularren aurrerapen nabarmena eman den, CRCa oso pronostiko txarrarekin lotzen da oraindik, epe luzeko biziraupen tasa oso txikiak baitauzka gaixotasun garatua daukaten pazienteen artean<sup>1</sup>.

Hori horrela, osasun-sistemen erronka garrantzitsua bihurtu da arriskuko biztanlerian diagnostiko goiztiar bat bermatzea. Esate baterako, helburu hori lortzeko, Osakidetza Kolon-ondesteko Minbiziaren Baheketa Programa (KOMBP) onartu zuen 2008an. Programa hori 50 eta 69 urte bitarteko biztanleriari bideratuta dago (arriskuko biztanleria), ebidentzia zientifikoak gaixotasun honen hilkortasuna %16-33 murriztu daitekeela zehaztu duelako, baldin eta minbizia fase goiztiarrean aurkitzen bada<sup>2</sup>.

Kolon-ondesteko tumore gehienak polipo batetik sortzen dira. Prozesu honen hasieran kripta aberrante bat sortzen da kolon-ondestean, geroago lesio pre-neoplasiko bilakatuko dena (polipoa), eta azkenik kolon-ondesteko adenokartzinoma sortzen da, 10-15 urte inguruko epean. Lesio neoplasiko hau gertatzeko 3 bide daude: adenomatik kartzinomarako bide tradizionala (desegonkortasun kromosomikoaren bidea ere deitzen dena, kasuen %70-90), neoplasia zerradunaren bidea (edo promotoreen metilazioaren bidea, kasuen %10-20a) eta mikrosateliten desegonkortasunaren bidea (kasuen %2-7a). Desegonkortasun kromosomikoa jarraitzen duten fenotipoak hainbat aldaketa sekuentzialen ondoren garatzen dira, normalean, *APC* genean mutazio bat gertatzen da, eta ondoren *RAS*ren aktibazioa edota *TP53*ren funtzio galera<sup>3</sup>.

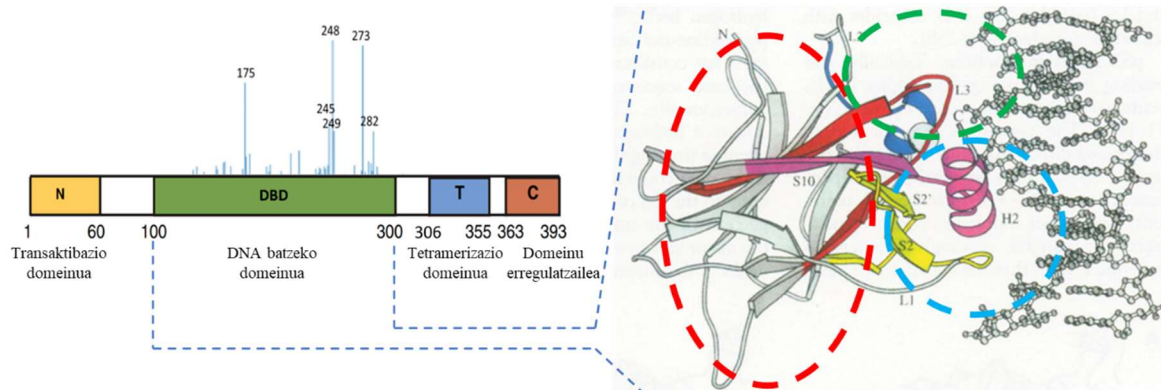
Giza minbizietan mutatua agertu ohi den genea *TP53* da, p53 proteina tumore-supresorea kodifikatzen duena. Proteina horren funtzio nagusia gene desberdinen transkripzioaren aktibazioa eragitea da eta homotetramero gisa jarduten du. Konkretuki, ziklo zelularren gene erregulatzaileen, DNAREN konponketa mekanismoen eta apoptosi prozesuaren aktibazioa aurrera eramaten du. Hori dela eta, genomaren zaindari bezala ere ezagutua da<sup>4</sup>.

p53 proteinaren erregulatzaile nagusia MDM2 (*Murine Double Minute 2*) E3 ubiquitina ligasa da. Egoera normalean, horrek p53 proteinaren ubiquitinazioa erregulatzen du eta bere degradazioa induzitu proteosomaren bidez. *MDM2* bera ere p53 proteinaren itu gene bat denez, p53 aktibatzen denean bere degradazioa bultzatuko du mekanismo horrek suposatzen duen *feedback* negatiboaren bidez<sup>5</sup>.

p53 proteinak 393 aminoazido ditu eta 4 domeinu funtzional nagusitan banatzen da: amino muturreko transaktibazio domeinua (N, 1-60 hondarrak), DNARI lotzeko domeinu zentrala (DBD, *DNA binding domain*, ingelesez, 100-300 hondarrak), tetramerizazio domeinua (T, 306-355 hondarrak) eta karboxilo muturreko domeinu erregulatzailea (C, 363-393 hondarrak)<sup>6</sup>.

Proteinaren funtzionaltasunaren ikuspegitik, DBD domeinurik garrantzitsuena da. Izan ere, honen bidez, itu geneetan dagoen 5'-PuPuPu-C(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' adostasun-sekuentzia ezagutzen du p53k, eta horien

transkripzioa bultzatzen du. Domeinu horren baitan zeregin desberdinak dituzten hiru motibo desberdintzen dira: Nukleo hidrofobikoa osatzen duten  $\beta$ -orriak (*NDBL/beta-sheets*), DNAREN zirrikitu zabalera (*major groove*) batzen den bira-urkila-helize motiboa (L1/S/H2) eta zirrikitu estura (*minor groove*) batzen den 2. eta 3. biren motiboa (L2/L3)(1. irudia) <sup>7,8</sup>.



**1. irudia:** p53 proteinaren domeinuen banaketa (ezkerra) eta DBDaren estruktura (eskuina). (Ezkerra) Irudiaren azpiko zatian proteinaren domeinu bakoitza osatzen duten aminoazidoen posizioa katean azaltzen dira. Goiko zatiko barretan DBDaren hondar desberdinen mutazioen maiztasun erlatiboak irudikatuta daude. Distribuzio hori International Agency for Research on Cancer (IARC) datubaseko informazioarekin eginda dago. Egokitutako irudia <sup>6</sup>. (Eskuina) DBDaren eta DNAREN arteko interakzioaren irudian DBDaren motibo desberdinak ikus daitezke. NDBL-beta-sheets (zirkulu gorria) ez du interakzioan parte hartzen. Bestalde, L1/S (horiz)/H2(arrosaz) motiboak (zirkulu urdina) DNAREN zirrikitu zabala batzen duen bitartean, L2(urdinez)/L3(gorritz) motiboak (zirkulu berdea) DNAREN zirrikitu estua batzen du. Egokitutako irudia <sup>8</sup>.

Proteina honetan aurkituriko aldaera patogeniko gehienak zentzu-aldaketazko (*missense*) mutazioak dira. Horrela, p53 proteina osoa itzultzen bada ere, ez da funtzionala izango. Nahiz eta aldaerak proteina osoan zehar gerta daitezkeen, gehienak DNAREN lotzeko domeinuan (DBD) gertatzen dira. Zehazki, mutazioen >%30a domeinu honetako 8 kodoitan kontzentratzen dira, eta horietatik 6 puntu beroak (*hot spot*) dira: R175, G245, R248, R249, R273 eta R282. Domeinu horren papera ezinbestekoa da p53 proteinaren iturri geneen transkripzioa aktibatzeko, eta beraz, aminoazido bakarreko mutazio batek p53 proteinaren eta iturri geneen arteko afinitate galera eragingo du, transkripzioa murriztuz <sup>9,10</sup>.

Mutazio hauek bi taldetan bana daitezke<sup>8</sup>:

- DNAREN zuzenean lotzen zaizkien hondarren **kontaktu-guneen aldaerak** (*contact site mutants*). Horiek p53 proteinaren aktibitate transkripzionala aldatzen dute, baina bere estruktura berdina geratzen da. Esaterako, R248 eta R273 hondarretan gertatzen diren aldaerak.
- **Aldaera konformazionalak** (*conformational mutants*), aldiz, DNAREN lotzen zaion domeinuaren estrukturan egonkortzea eragiten dute. Adibidez, R175 eta R282 hondarretan gertatzen diren aldaerak.

Hala ere, funtzio espezifikoagoak dauzkaten hondarrak ere badaude DBDn. Horien artean, zink atomoa batzen duten hondarrak eta ubikitinazio-, ADP-erribosilazio- eta fosforilazio-guneak nabarmentzen dira<sup>11</sup>.

Aipatutako aldaera mota edozein izanda, p53 proteina basatiaren funtzio galera (*Loss-Of-Function*, LOF) edo murrizketa ematen da, hau da, proteina mutatuak efektu dominante negatiboa dauka basatiarengan. Izan ere, tumore kasu gehienetan, p53ren mutazioak heterozigosian ageri dira, hau da, alelo bat mutaturik dago eta beste aleloak basatia izaten jarraitzen du. Proteina mutatuak ahalmena dauka proteina basatiarekin elkarrekintzak

eratzeko, baina hortik sortzen diren heterotetrameroak inaktiboak dira<sup>12</sup>. Gainera, aldaera batzuk p53 ez adieraztea eragiten duten aldaerak baino pronostiko txarragoa aurkezten dute; adibidez migrazio, proliferazio edota farmakoekiko erresistentzia areagotuak. Zentzu-aldaketazko kasu guztietan proteinaren gehiegizko adierazpena ematen da<sup>13</sup>.

Bestalde, aldaera patogenikoen %10a inguru, mutazio bukatzaileak (*nonsense*) dira, p53 proteina motzagoa eta desegonkorragoa sortzen dutenak. Genotipo hori proteinaren adierazpen gabeziarekin lotzen da, izan ere, proteina akastunak sor ditzakeen arriskuak ekiditeko, mRNA molekula akastunaren degradazioa bultzatzen da zitoplasman, *nonsense mediated decay* (NMD) mekanismoaren bidez<sup>14</sup>. Hala ere, aldaera hauek ez daukate dominante negatibo efekturik, eta beraz, bigarren gertaera bat behar dute *TP53* alelo basatia inaktibatzeke eta tumorigenesia induitzeko. Horrek azalduko luke mutazio mota hauen maiztasun txikiagoa tumoreetan<sup>10</sup>.

Gainera, mutazio desberdinek proteina mailan izan dezaketen eraginetaz gain, DNAREN aldaketa epigenetikoek paper oso garrantzitsua joka dezakete minbizien garapenean. Konkretuki, DNAREN metilazioaren desregulazioa minbizi mota askorekin lotu da. Alde batetik, promotoreetan kokatu ohi diren CpG irlen metilazioak geneen transkripzio tasa aldatuko dute, eta bestetik, genearen irakurtarauan (*Open Reading Frame*, ORF) ematen diren CpG dinukleotidoen metilazioak mutazioen agerpena erraz dezake<sup>15</sup>. Hori kontuan hartuta, aipatutako sei puntu bero hondarretatik, bostetan gertatzen diren aldaeren maiztasun emendatuak fenomeno horri lotu zaizkio, horien kodoietan CpG metilatuak agertzen baitira<sup>16</sup>

Anatomia patologikoko laborategietan p53ren kontrako immunohistokimika gehien erabiltzen den pronostiko-markatzaileetako bat da, hala CRCan, nola minbizi mota askotan. Azterketa molekularren garapenak emaitza immunohistokimikoen eta aurkitutako aldaera motaren arteko korrelazioa zehaztea ahalbidetu du. Izan ere, p53 gainadierazpenak zentzu-aldaketazko aldaera baten presentzia iragarri dezake eta, era berean, bere adierazpen gabeziak aldaera bukatzaile batena<sup>17</sup>.

## Hipotesia eta helburuak

p53 proteinaren kuantifikazio immunohistokimikoa CRCan, eta beste neoplasietan, erabilgarria izan daitekeen pronostiko-tresna da. Izan ere, p53ren eredu immunohistokimikoak *TP53*an gertatzen diren aldaera zehatzekin lotuta egon daitezke. Konkretuki, tindaketa gabezia genearen aldaera bukatzaile baten presentziarekin lotu daiteke, gainadierazpenak zentzu-aldaketazko aldaera bat iragarri dezakeen bitartean.

Hori horrela, lan honen helburua p53 proteinaren genotipo-fenotipo korrelazioa baieztatzea da CRC laginetan, hau da, *TP53* genearen aldaera moten eta p53 proteinaren adierazpen mailaren arteko korrelazioa egiaztatzea, eta baita aldaera horien esanahi biologikoa ulertzea ere. Horrez gain, aldaera patogenikoen maiztasun desberdinen zergatia eztabaidatuko da. Horretarako:

- Pazienteen ehun tumoraletako p53 proteinaren tindaketa immunohistokimikoa objetiboki kuantifikatuko da.

- Biologia Molekularreko metodoak diren PCRa, elektroforesia eta Sanger sekuentziazioa burutuko dira *TP53* genearen aldaerak bilatzeko.
- Immunohistokimikarekin eta Biologia Molekularreko metodoekin lortutako emaitzen korrelazioa egingo da.
- *TP53* cDNAREN mutagenesi zuzendua burutuko da. Lortutako p53 proteinaren aldaera desberdinak erabilgarriak izango dira beraien eragin funtzionala aztertzeko.

## Materialak eta metodoak

### 1. *TP53* genearen aldaeren identifikazioa eta ikerketa

#### 1.1 Laginen eskuratzea

Ikerketa honetan Arabako Unibertsitate Ospitalean (AUO, Txagorritxu), 2010 eta 2015 urteen artean operatutako 99 kolon-ondesteko adenokartzinomen laginak aztertu ziren (60 gizonezko eta 39 emakumezko). Pazienteen batezbesteko adina  $57,3 \pm 7$  zen. Paziente bakoitzetik erauzitako tumore-ehuna eta ehun osasuntsua formalinan fixatuta eta parafinan kontserbatuta zeuden (FFPE). Guztira 190 kolon operatu baziren ere, lan honetan aztertutakoak immunohistokimika positiboena (>90%) eta negatiboena (<2%) zeukatenak izan ziren. Eskuratutako lagin guztiak kodetuta zeuden, gaixoen anonimotasun osoa errespetatuz.

#### 1.2 p53 proteinaren azterketa immunohistokimikoa

p53 proteinaren detekzioa eta kuantifikazioa AUOKo Anatomia Patologikoko zerbitzuak burutu zuen immunohistokimika (IHK) teknikaren bidez. Horretarako, CONFIRM™ anti-p53(DO-7) antigorputz primarioa erabili zen, fabrikatzailearen gomendioak jarraituz (Roche® Molecular Systems, Branchburg, NJ, AEB). Kuantifikaziorako Qupath softwarea<sup>18</sup> erabili zen.

#### 1.3 Azterketa molekularra

##### 1.3.1 DNAREN ERAUZKETA

Parafinazko blokeetatik DNA erauzteko, Cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, AEB) delakoa erabili zen, kit komertzialeko protokoloa jarraituz.

Erauzitako DNAREN kantitatea eta kalitatea UV espektroskopia bidez ebaluatu zen Nanodrop espektrofotometro batean (ThermoFisher, Wilmington, Alemania), eta absorbantzia uhin-luzera hauetan neurtu zen:

- 260 nm-tan ( $A_{260}$ ): azido nukleikoen absorbantzia maximoa.
- 280 nm-tan ( $A_{280}$ ): proteinen absorbantzia maximoa.
- 230 nm-tan ( $A_{230}$ ): gatz kaotropiko, karbohidrato eta fenol bezalako kontaminatzaileen absorbantzia maximoa.

Erauzitako laginen purutasuna determinatzeko, Nanodrop-ak  $A_{260}/A_{280}$  eta  $A_{260}/A_{230}$  ratioak kalkulatu dituzte. Gure analisietarako onartutako laginek honako baldintzak bete behar zituzten:  $A_{260}/A_{280}$  ratioaren baloreak 1,8 eta 2 artekoak izatea; eta  $A_{260}/A_{230}$  ratioaren baloreak 2 baino gehiagokoak izatea.

### 1.3.2 PCRa

Behin DNA laginak edukita, *TP53* genearen 5-8 exoien anplifikazioa burutu zen (NM\_000546 edo ENST00000269305 baliokidea erreferentziazko transkripto gisa erabili ziren), baita hauen exoi-introi lotura gunea ere. Prozesu hau aurrera eramateko polimerasaren kate-erreakzioa (PCR) egin zen, BioRad C-1000 termozikladorea (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, AEB) erabiliz. Bostgarren, zazpigarren eta zortzigarren exoiak anplifikatzeko, aurretik argitaratutako hasle bikoteak erabili ziren<sup>19</sup>. Seigarren exoia anplifikatzeko, hasle bikote berri bat diseinatu behar izan zen (1. taula). Hasle guztiei M13 bakteriofagoari dagokion sekuentzia bat gehitu zitzaizen 5' muturrean (*aurreranzko* M13 haslea: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'; *atzeranzko* M13 haslea: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') ondoren burutuko zen sekuentziazioa errazteko.

Hasle bikoteak aukeratzekoan, garrantzitsua zen aplikoiaren luzera gehienez 200 bp-takoa izatea, nahiz eta sekuentziazioaren etekin maximoa handiagoa izan. Izan ere, ezaguna da parafinatan murgilduriko ehunetatik erauzitako DNAREN osotasuna kalteturik egon daitekeela, formalina bidezko fixapena dela-eta. Formalinak DNAREN lotura gurutzatuak eragiten ditu, DNA harizpi bakarraren edota bikoitzaren fragmentazioa sorraraziz, eta horrek eragin zuzena du DNAREN kalitatean eta PCRAREN EFIZIENTZIAN<sup>20</sup>.

*1. taula: TP53 genearen anplifikazioa egiteko erabilitako hasleen sekuentziak. M13 bakteriofagoari dagokion sekuentziak ez dira azaltzen. Aplikoiaren luzera ere agertzen da.*

Anplikoia	Exoia	Aurreranzko haslea	Atzeranzko haslea	Luzera(bp)
5.1	5	5'-GACITTCAACTCTGTCTCCTTC-3'	5'-TGGCCATCTACAAGCAGTCA-3'	157
5.2	5	5'-CCTGTGCAGCTGTGGGTTGATT-3'	5'-AGATAGCGATGGTGAGCAGCTG-3'	147
6	6	5'-AGAGACGACAGGGCTGGTTGC-3'	5'-TCCCAGAGACCCAGTTGCAAA-3'	202
7	7	5'-CTCATCTTGGGCTGTGTTAT-3'	5'-CTTGCCACCCTGCACACT-3'	167
8.1	8	5'-ACTGCCTCTTCTCTCTTTTC-3'	5'-AATCTCCGAAGAAAGGGGAGCCT-3'	138
8.2	8	5'-ACGGAACAGCTTTGAGGTGCGT-3'	5'-AAGAAGCGGTGGAGGAGACCAA-3'	159

PCR erreakziorako bolumena 10 µl-takoa izan zen, eta erreaktiboaren kontzentrazioak hurrengoak izan ziren: 1X NH<sub>4</sub> tanpoia, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,25 mM desoxinukleotido trisfosfatoak, 0,375 µM hasleak, 0,05 U BIOTAQ™ DNA polimerasa (Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania) eta lagin bakoitzeko 100 ng DNA. Anplifikaziorako baldintzak hiru fasetan banatu ziren. Lehenengoan hasierako desnaturalizazioa burutzen da 5 minutuz 95°C-tan. Bigarrena 40 zikloko anplifikazio fasea da, ziklo bakoitzean desnaturalizazioa minutu batez 95°C-tan, hibridazioa minutu batez 64°C-tan eta luzapena (polimerizazioa) minutu batez 72°C-tan burutzen direlarik. Hirugarrenean azken luzapena burutzen da 10 minutuz 72°C-tan, eta ondoren 4°C-tan uzten da erreakzioa.

PCR emaitzak ikuskatzeko, %1,5-eko agarosazko gela prestatu zen TAE 1X tanpoian, eta laginak elektroforesi bidez migratu ziren, TAE 1X tanpoian.

### 1.3.3 PCR produktuen purifikazioa

Jarraian, PCR produktuen garbiketa ExoSAP-IT™ (ThermoFisher) erabiliz burutu zen, ekoizlearen protokoloa jarraituz, erabili ez diren hasleak eta dNTPak degradatzeko.

### 1.3.4 Sanger sekuentziakzioa

Purifikatutako aplikoiak sekuentziatzeko Sanger metodoa jarraitu zen BigDye 3.1™ kit komertziala (ThermoFisher) erabiliz. Erreakzio-bolumena 10 µl-takoa izan zen eta erreaktiboa ekoizlearen argibideei jarraituz gaineratu ziren: 2 µl BigDye sekuentziakzio-tanpoia 5X, 1 µl BigDye sekuentziakzio-aurrenahastura, 0,5µl DMSOa, 0,25µM hasleak (FM13 harizpi zuzenaren sekuentziakzioarako eta RM13 alderantzizko harizpiarentzako, saioidi desberdinetan) eta aplikoi purifikatuaren 2,5 µl.

Sekuentziakzio erreakzioa BioRad C-1000 termozikladorean burutu zen ekoizlearen baldintzak (ThermoFisher) jarraituz: hasierako desnaturalizazioa 96°C-tan 1 minutuz, ondoren 25 ziklo (desnaturalizazioa 96°C-tan 10 segunduz, hibridazioa 50°C-tan 5 segunduz eta luzapena 60°C-tan minutu 1 eta 15 segunduz), azkeneko luzapenik gabe eta atsedenean utziz 4°C-tan.

Ondoren, sekuentziakzioaren produktuen purifikazioa burutu zen prezipitazio bidez, EtOH/EDTA/NaAc protokoloa jarraituz (ThermoFisher). Horrela, DNA katera batu ez diren ddNTP fluoreszenteak kentzen dira.

### 1.3.5 Sekuentzien analisia

Bukatzeke, lorturiko DNA sekuentziak ABI 3500 analizatzaile genetikoan aztertu ziren. Behin sekuentziak edukita, hauen kalitatearen azterketa egin zen lehendabizi, Sequencing Analysis v5.4 (ThermoFisher) softwarearen bidez, eta ondoren, sortutako fitxategiak Variant Reporter v1.1 (ThermoFisher) softwarea esportatu ziren. Azken horrek, lortutako sekuentziak erreferentzia-genomaren sekuentziaren aurka lerrokatzen ditu, horrela aldaeren identifikazioa ahalbidetuz. Aldaera bi harizpietan agertzen bada, softwareak zuzenean identifikatzen du. Alterazio genetikoak detektatu ziren laginen kasuan, aldaera egiaztatzeke prozedura esperimental osoa errepikatu zen lagin berarekin, eta gainera, paziente berberarengandik erauzitako ehun ez-tumoral batekin ere prozedura osoa burutu zen, alterazio germinal bat zen ala ez jakiteke.

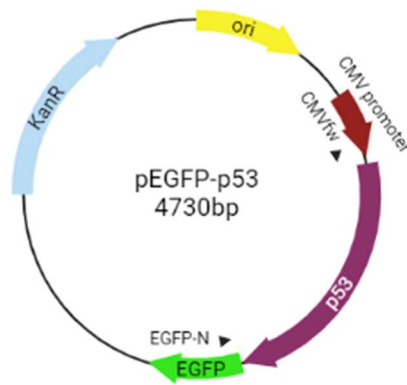
### 1.4 In silico azterketa

Identifikatutako aldaerak lehenago erregistratuta zeudenentz Ensembl-en (<https://www.ensembl.org>) egiaztatzen, eta Varsome plataformaren bidez (<https://varsome.com>) euren patogenizitatea aztertu zen. Halaber, aldaera bakoitzaren informazio espezifikoa lortzeko, IARC-ko TP53 datubasea (<https://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>) eta PHANTM datubasea (<http://mutantp53.broadinstitute.org/>) erabili ziren. Aldaera bakoitzarekin erlazionaturiko artikuluak IARC-ko TP53 datubasean eta COSMIC-en (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) bilatu ziren.

## 2. TP53 cDNAren mutagenesia

TP53ren mutazioak daramatzaten plasmidoak mutagenesi zuzenduaren bidez sortu ziren. Horretarako, TP53 cDNA basatia daraman pEGFP-p53 plasmidoa eskuratu zen (Addgene, Watertown, MA, AEB) (2. irudia) eta QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, AEB) kit komertziala erabiliz, mutazio puntualak ezarri zitzaizkion plasmido basatiari.





2. irudia: pEGFP-p53 plasmidoa. Plasmidoak, bere burua erreplikatzeko (ori) eta p53 proteina adierazteko beharrezko sekuentziak (CMV promoter) izateaz gain, kanamizinarekin kontrako erresistentzia genea (KanR) darama. Horrez gain, TP53ren sekuentzia aurrera eramateko hasleak ere irudikatuta daude: CMVfw eta EGFP-N.

Mutante bakoitza sortzeko diseinatu ziren hasle bikoteak 2. taulan azaltzen dira. Mutagenesi prozedura burutu ondoren, XL10-Gold bakterio kompetenteak DNA plasmidikoarekin transformatu ziren. Ondoren, kanamizina zeukaten agar-plaketan erein ziren eta gau osoz inkubatu 37°C-tara koloniai hazteko. Bakterioetatik intereseko plasmidoa erauzteko, zotz esterilak erabiliz, agar-plakan hazitako 3 kolonia aukeratu ziren mutante bakoitzerako, eta LB/kanamizina 50ml disoluziodun saiodietan inokulatu ziren. Saiodi hauek 37°C-tan eta irabiopean inkubatu ziren gauan zehar. Hazkuntza medioa zentrifugatu zen (4000rpm, 10 minutuz) bakterioak biltzeko, eta Miniprep prozedura aurrera eramanez (ThermoFisher) plasmido purifikatua lortzeko, ekoizlearen protokoloa jarraituz.

Azkenik, eskuratutako plasmidoak sekuentziatzen bidali ziren CNIOra (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid) esperotako mutazioak zituazela ziurtatzeko. Sekuentziak egiteko ikerketa etxe honen katalogoan eskuragarri dauden CMVfw (*forward*: 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3') eta EGFP-N (*reverse*: 5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3') hasleak aukeratu ziren, gure plasmidoaren sekuentzia amankomunarekiko osagarriak baitira. Azkenik, sekuentzia egokiak zituzten bakterioak -80°C-tan gorde ziren.

2. taula: Mutagenesirako erabilitako hasle bikoteak. Aldatutako base-parea gorri irudikatuta dago.

Aldaera	Aurreranzko haslea	Atzeranzko haslea	Tm (°C)
A159V	5'-GCACCCGCGTCCGCGT <b>T</b> CATGGCCATCTACAAG-3'	5'-CTTGTAGATGGCCATG <b>A</b> CGCGGACGCGGGTGC-3'	84,2
R175H	5'-CGGAGGTTGTGAGGC <b>A</b> CTGCCCCACCATGAG-3'	5'-CTCATGGTGGGGG <b>C</b> AGTGCCTCACAACCTCCG-3'	84,2
S241A	5'-CTACATGTGTAACAGT <b>G</b> CCTGCATGGGCGGC-3'	5'-GCCGCCATGCAGG <b>C</b> ACTGTTACACATGTAG-3'	80,3
R273H	5'-GAACAGCTTTGAGGTG <b>A</b> TGTTTGTGCTGTCC-3'	5'-GGACAGGCACA <b>A</b> ATGCACCTCAAAGCTGTT-3'	79,1

## Emaitzak

### 1. TP53 genearen aldaeren identifikazioa eta ikerketa

#### 1.1 Análisi molekularren emaitzak

Aztertutako 99 adenokartzinometatik 61k aldaera bakarra zeukaten TP53 genean, eta batek bi zeuzkan. DNAn eragiten duten aldaketari dagokionez, 61 ordezkapen mutazioak ziren eta 2 *indel* mutazioak. Azken hauen

artean, base bakarrek txertaketa bat eta delezio bat gertatu ziren. Ordezkapenen artean, 53 trantsizioak (%86,9) izan ziren eta 8 transbertsioak (%13,1). Horretaz aparte, 38 aldaera (%62,3) CpG guneetan gertatu ziren, guztiak trantsizioak izanik. Aldaerak ez dira uniformeki sakabanatzen: 5. exoian 19 aurkitu ziren, 6.ean 8, 7.ean 12 eta 8.ean 23. Horrez gain, moztitsasketa mutazio bat aurkitu zen 6. introian (c.672+1G>T).

Aldaerek proteinan eragiten dituzten aldaketei dagokionez, hauxe aurkitu zen: 49 zentzu-aldaketazko mutazio, eta proteina motzagoa sortzen duten (*protein-truncating*) 14 mutazio (11 bukatzaile, 2 irakurtarau aldaketa eta moztitsasketa mutazio bat).

Identifikatutako aldaera guztiak aurrez deskribatuta zeudela egiaztatu zen, beraz, horien patogenizitatearen arabera sailkatu ziren. Varsome plataformaren arabera, c.385dupG; p.A129Gfs\*20 aldaera ustez patogenikoa (*likely pathogenic*) da, eta beste aldaera guztiak patogenikoak ziren. Hala ere, ClinVar datubaseren irizpideen arabera, c.476C>T; p.Ala159Val eta c.721T>G; p.S241A aldaerek garrantzi ezezaguna (*Uncertain significance*) dute.

3. taula: Puntu bero hondarretan aurkitutako aldaeren kantitate absolutua eta erlatiboa.

Aminoazido posizioa	Identifikatutako aldaera (NM_000546)	Aldaketa proteinan (NP_000537)	Maiztasuna		Maiztasun erlatiboa (%)	
R175	c.524G>A	p.R175H	8		12,7	
R245	-	-	-		-	
R248	c.742C>T	p.R248W	4	6	6,3	9,5
	c.743G>A	p.R248Q	2		3,2	
R249	-	-	-		-	
R273	c.817C>T	p.R273C	4	9	6,3	14,2
	c.818G>A	p.R273H	5		7,9	
R282	c.844C>T	p.R282W	6		9,5	

Guztira, 33 aldaera patogeniko desberdin identifikatu ziren (aipatutako 3 horiek barne hartuta)(1. taula gehigarria), *TP53* genearen 29 hondar desberdinetan sakabanatuta. Identifikatutako aldaeretatik 29 (%46) puntu bero hondarretan kontzentratu ziren (3. taula).

4. taula: Mutazio mota desberdinen eta p53 immunohistokimikaren arteko korrelazioa. Ehuneko bakoitza bere lerroari dagokio.

IHK maila	Guztira	p53 basatia	TP53 mutaturia (N=62)			
			Zentzu-aldaketa	Bukatzailea	Irakurtaraua	Moztitsasketa
IHK>90%	69	21 (%30,4)	48 (%69,6)	-	-	-
IHK<2%	30	16 (%53,3)	-	11 (%36,7)	2 (%6,7)	1 (%3,3)

Zentzu-aldaketazko mutazio guztiek IHK positiboa (>%90) aurkeztu zuten bitartean, proteina motzeko mutazio guztiek tindatze gabezia erakutsi zuten (<%2). Hala ere, lagin kopuru garrantzitsu batek ez zuen mutaziorik aurkeztu, ez IHK positiboko laginetan (21, %30,4), ez IHK negatiboetan ere (16, %53,3) (4. taula).

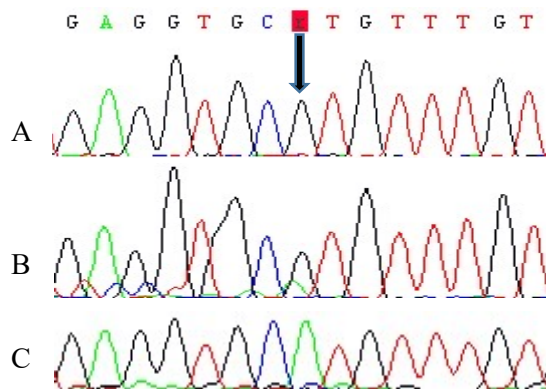
### 1.2 *In silico* azterketaren emaitzak: Domeinuak eta funtzioak aztertuz

Zentzu-aldaketazko aldaera guztiak DBDan daukaten funtzioaren arabera sailkatu ziren: 20 DNAREN kontaktu-guneak (%40,8), 23 konformazionalak (%47,0), 4 zinkari lotzeko hondarrak (%8,2), ubiquitinazio-gune bat (%2,0) eta ADP-erribosilazio beste gune bat (%2,0).

IARC eta PHANTM datubaseen arabera, identifikatutako zentzu-aldaketazko mutazio guztiek aktibitate transkripzional murriztua (<%27, p53 basatiarekin alderatuta) aurkezten dute eta ez-funtzionaltzat hartu dira legamietan, bere funtzioa eta domeinua edozein izanda ere. Agertzen diren aldaera ohikoenekin bakarrik giza zeluletan ere egin dira analisi funtzionalak. Hori dela eta, p53ren lau aldaera hautatu ziren giza zeluletan analisi funtzional bat egiteko aurrerantzean, konkretuki R273H eta S241A kontaktu-guneko mutazioak, eta R175H eta A159V mutazio konformazionalak. Talde bakoitzetik, hurrenez hurren, aldaera oso ikertu bat aukeratu zen (emaitzak literaturarekin alderatzeko eta kontrol positibo gisa izateko) eta hain ikertua ez den beste bat, zehazki Varsome eta ClinVar plataformetan desadostasunak izan dituztenak. Horrela, azken horien patogenizitatea analiza dezakegu, baita bi aldaera talde desberdinek izan dezaketen funtzionaltasun desberdintasunak aztertu ere.

## 2. Plasmido mutanteen lorpena

TP53ren cDNA basatitik hasita mutagenesi zuzendua burutu zen hasle espezifikoak erabiliz (2. taula), eta plasmido mutatuarekin bakterioak transformatu ziren. Klonazioaren efizientzia ez zen handia izan (3-5 arteko kolonia kopurua klon bakoitzetik). Hala ere, aurrera jarraitu genuen eta sekuentziatzera bidali genituen beraietatik erazutako plasmidoak. Bestalde, A159V mutantea lortzeko mutagenesian ez zen lortu koloniarik haztea, beraz, hasle berriak diseinatu ziren: 5-CCGCGTCCGCGTCATGGCCATCTAC-3' (*aurreranzkoa*) eta 5'-GTAGATGGCCATGACGCGGACGCGG-3' (*atzeranzkoa*) (Tm=78,4°C). Hasle berriekin lau kolonia lortu ziren.



**3. irudia:** Ehun osasuntsuaren (A), ehun tumoralaren (B) eta plasmido mutatuaren (C) elektroferograma partzialak. Intereseko posizioa gezi bat eta r (G>A aldaketa) batez adierazita dago. Pertsona osasuntsuaren sekuentzian piko beltz bakarra ikus daiteke, erreferentziako sekuentziari dagokiona. Tumore-ehunean, piko beltza eta piko berde txiki bat ikus daitezke, sekuentzia mutatuari dagokiona. Mutatutako aleloaren intentsitatea txikiagoa da, ziurrenik mutazioa zelula kopuru txiki batean gertatu delako, hau da, mosaikoan dago.

Zorionez, mutante guztien kasuan, 3 kolonietatik erazitako plasmidoaren sekuentziazioak mutagenesi prozesua arrakastatsua izan zela aditzera eman zuen, hau da, intereseko base parearen ordezkapena eman zela egiaztatu genuen (3. irudia). Atal honen hurrengo urratsak izango lirateke, plasmido mutante hauek giza zeluletan transfektatzea eta beraien analisi funtzionala burutzea.

### 3. Bi aldaera cis egoeran

2013ko apirilean, 43 urteko gizon bat lehen mailako arreta medikuarenera joan zen min abdominala eta pisu galera pairatzen ari zelako. Gorozkietako analisisan odol hondarrak agertu ziren. Orduan, kolonoskopia baten bidez tumore bat identifikatu zioten ondestean eta patologoek adenokartzinoma bezala diagnostikatu zuten. Adenokartzinoma 2013ko urriaren 31an erauzi zioten. 6 hilabete ondoren (2014ko maiatzean), jarraipen-kontrol batean, gibelean masa bat aurkitu zioten ordenagailu bidezko tomografia (TAC) baten bidez. Tumorea metastasia zen.

Ondesteko tumoreak p53 IHK oso positiboa aurkeztu zuen (%98,3). Ikerketa molekularren bidez, 2 zentzu-aldaketazko mutazio aurkitu ziren heterozigosi egoeran: oso ohikoa den c.524G>A; p.R175H eta arraroagoa den c.455C>T; p.P152S. Gibelean masa bat aurkitu zioten ordenagailu bidezko tomografia (TAC) baten bidez. Tumorea metastasia zen.

Ondesteko tumoreak p53 IHK oso positiboa aurkeztu zuen (%98,3). Ikerketa molekularren bidez, 2 zentzu-aldaketazko mutazio aurkitu ziren heterozigosi egoeran: oso ohikoa den c.524G>A; p.R175H eta arraroagoa den c.455C>T; p.P152S. Gibelean masa bat aurkitu zioten ordenagailu bidezko tomografia (TAC) baten bidez. Tumorea metastasia zen.

Ondesteko tumoreak p53 IHK oso positiboa aurkeztu zuen (%98,3). Ikerketa molekularren bidez, 2 zentzu-aldaketazko mutazio aurkitu ziren heterozigosi egoeran: oso ohikoa den c.524G>A; p.R175H eta arraroagoa den c.455C>T; p.P152S. Gibelean masa bat aurkitu zioten ordenagailu bidezko tomografia (TAC) baten bidez. Tumorea metastasia zen.

Ondesteko tumoreak p53 IHK oso positiboa aurkeztu zuen (%98,3). Ikerketa molekularren bidez, 2 zentzu-aldaketazko mutazio aurkitu ziren heterozigosi egoeran: oso ohikoa den c.524G>A; p.R175H eta arraroagoa den c.455C>T; p.P152S. Gibelean masa bat aurkitu zioten ordenagailu bidezko tomografia (TAC) baten bidez. Tumorea metastasia zen.

	Ehun osasuntsua		Ondesteko ehuna (tumorala) 1		Ondesteko ehuna (tumorala) 2		Ehun hepatikoa (tumorala)	
	c.455	c.524	c.455	c.524	c.455	c.524	c.455	c.524
Aurreranzkoa								
Atzeranzkoa								

4. irudia: Ehun osasuntsuan eta tumore ehunetan pazienteen identifikatutako bi aldaerak erakusten dituen elektroferograma partzialak. Ondesteko ehun tumoraletan, bi bloke aztertu ziren mutazioen presentzia baieztatzeko. Ikus daiteke aldaerak ondestean heterozigotoak direla (bi koloreko bi piko), gibelean metastasian aldaera mutatuak dagokienez piko bakarra ikusten den bitartean. Aurreranzko haslearen irakurketa atzeranzko haslearen irakurketaren osagarria da.

### Eztabaida

Baldintza zelular osasuntsuetan p53 proteinaren sintesi eta degradazio prozesuak estuki erregulatuta daude; horrela, proteinaren adierazpen maila txikia da, baina hautemangarria<sup>21</sup>. Hori dela eta, proteostasian ematen den edozein aldaketa neurgarria izango da entsegu immunohistokimikoetan, p53ren tindaketa mailaren aldakuntza bat egongo delako. Biomarkatzaileen tindatze mailak pazienteen pronostikoaren zehaztapenean daukan garrantzia kontuan hartuta<sup>22</sup>, funtsezkoa da tindaketaren kuantifikazioa ahalik eta objektiboena izatea. Helburu horretan hainbat ikerketak Qpath softwarearen erabilera azpimarratu dute jadanik<sup>18</sup>. Softwareak %0-100eko heina erabiliz, tindaketa ematen diren aldaera txikiak behatzeko aukera ematen du. Tindaketa ehuneko maila zehatzaren determinazioak tindaketa heina desberdinek gaixotasunaren pronostikoarekin daukaten korrelazioa ezartzeko aukera eman du. Izan ere, muturreko immunofenotipoak, bereziki p53ren

gainadierazpena, heriotza-tasa altuagoekin lotu dira, bitarteko adierazpena daukaten fenotipoekin alderatuz<sup>23</sup>. Hala ere, muturreko immunofenotipoak zehazteko baldintzak ez dira bateratu literaturan<sup>17,24</sup>, tindaketa gabeziaren heinak <%1-10 artean egonik, eta gainadierazpenarenak >%50-75 artean egonik. Beraz, ikerketa honetan muturreko immunofenotipoak <%2 eta >%90 bezala zehaztu ziren, ahalik eta lagin gehienetan *TP53* mutatua aurkitzeko helburuarekin.

Era berean, aurreko literaturan fenotipo horien eta *TP53* genotipoaren arteko korrelazio bat deskribatu dute. Konkretuki, zentzu-aldaketazko aldaerak p53 proteinaren gainadierazpenarekin lotu diren bitartean, aldaera bukatzaileak adierazpen gabeziarekin lotu dira<sup>17,21</sup>. Gure emaitzek aurreko literaturarekin bat egiten dute, nahiz eta muturreko immunofenotipoa aurkezten duten lagin askotan ez den *TP53* genean mutaziorik aurkitu.

Ehun tumoraletan mutaziorik ez aurkitzeko arrazoiak desberdinak izan daitezke. Hasteko, erabilitako sekuentziazio metodoaren detekzio-mugak kontuan hartu behar dira. Izan ere, aldaerak %10-20 mosaikoan egon behar du gutxienez Sanger sekuentziazioarekin detektagarria izateko<sup>25</sup>. Horrek azalduko luke zergatik, NGSrekin burututako beste ikerlanekin alderatuz<sup>17</sup>, aldaera gutxiago identifikatzea lortu dugun (%69,6 vs. %80,2, IHK positiboa duten laginen artean). Horretaz aparte, kalitate baxuko DNA parafinatuarekin lan egitean agertzen diren zailtasunek inpaktu gehiago izan dezakete Sanger sekuentziazio teknikan, NGS batekin alderatuz. Bi lagin ikerketatik kanpo geratu ziren haien kalitatea eskasegia zelako.

Bestalde, kontuan izan behar dugu bakarrik proteinaren 5-8 exoiak sekuentziatu direla. Nahiz eta aldaeren %90 inguru exoi horietan gertatzen diren (IARC, 2019ko uztaillean), beste exoietan edota edozein introitan agertzen diren aldaerak galtzen ditugu.

Horrez gain, ezin dugu minbizi baten garapenaren testuingurua *TP53* genearen egoerara laburtu, kartzinogenesisia gertatzeko bide desberdinak daude eta<sup>3</sup>. Adibidez, MDM2 proteinaren funtzio galera emango balitz, ezingo luke p53ren ubiquitinazioa bultzatu, eta ondorioz, degradazioa aktibatu. Kasu horretan, p53 proteinaren gainadierazpena behatuko litzateke, nahiz eta *TP53*ren bi aleloak basatiak izan.

Bukatzeko, p53 fenotipoa eta *TP53* genotipoaren arteko korrelazioa aztertu duten ikerketa askok hein zabalagoak ezarri dituzte fenotipo positiboak aukeratzeko orduan<sup>17,24</sup> eta mutazioak maiztasun handiagoz aurkitu dituzte. Beraz, lagin immunopositiboen heina handituko bagenu, beharbada mutazio maiztasuna handituko litzateke.

p53 proteinaren proteostasian gertatzen diren aldaketek, abantaila bat suposatu behar dute zelularentzat kartzinogenesi prozesuan laguntzeko. Alde batetik, proteina motzagoa sortzen duten mutazioak p53 proteinaren adierazpen gabeziarekin lotu dira<sup>21</sup>, beraz, zelulak ezingo du apoptosia bideratu, besteak beste. Mota horretako aldaera gehienak bukatzaileak dira. Literaturan proposatzen den era berean, ikerketa honetan aurkitutako aldaera bukatzaile guztiek p53ren adierazpen gabezia aurkezten dute. Proteinaren adierazpenaren gabeziaren arrazoietakoa bat mRNA akastunaren degradazioa izango litzateke deskribatu den NMD (*nonsense mediated decay*, ingeleraz) prozesuaren ondorioz<sup>14</sup>. Izan ere, prozesu honek suposatzen duen abantaila *in vitro* demostratu da: NMD prozesuaren inhibitzaileen aurrean, p53 proteina akastun desegonkorra adierazten da, zelulen bideragarritasun eza lortuz<sup>26</sup>. Dena den, deskribatutako prozesuak ez du alelo basatia inaktibatzen, hau

da, aldaera mota hori ez da dominante negatiboa; horrek azalduko luke horien maiztasuna txikiagoa izatea<sup>10</sup>. Beraz, aldaera hauek patogenikoak izateko beste gertaera bat espero litzateke, esate baterako, alelo basatiaren inaktibazioa heterozigositatearen galeraren bidez (LOH, *loss of heterozygosity*, ingelesez).

Bestalde, beste minbizi motetan gertatzen den bezala<sup>24,27-29</sup>, CRCan ere zentzu-aldaketazko aldaeren eta p53 gainadierazpenaren arteko korrelazioa demostratu da<sup>17</sup>. Lan honetan ere, zentzu-aldaketazko aldaera guztiak IHK positiboarekin lotu dira (guztiak >%90,81 aurkezten dute), aldatzen den hondarraren funtzioa edozein izanda (DNA kontaktu guneak, konformazionalak, zink atomoa batzekoak eta PTM desberdinak pairatzen dituztenak). Hondar mota bakoitzaren aldaketak proteinaren gainadierazpena indultzeko arrazoiak desberdinak izan daitzeke. Alde batetik, aldaera konformazionalak p53 proteinaren egonkortasuna emendatzen dutela badirudi. Baldintza normaletan, p53 nahiko desegonkorra da<sup>24</sup>, beraz, mutazio hauen bidez proteinaren agregazioa eman liteke, proteinaren funtzio galera ez-zuzena gertatuz<sup>30</sup>. Fenomeno bera gerta liteke zink atomoa batzen duten hondarrekin. Izan ere, nahiz eta txikia izan, hondar hauetan gertatzen diren aldaerek aktibitate transkripzional handiena mantentzen dutenak dira (1. taula gehigarria). Horrela, hondar hauen ordezkapenek proteinaren egonkortasuna eta agregazioa sortuko lukete, inaktibazio ez-zuzena pairatuz.

Bestalde, kontaktu aldaerak DNAn lotzeko funtsezkoak diren hondarren ordezkapenean oinarritzen dira. Beraz, esperotakoa da proteina mutatuaren eta itu geneen arteko interakzioa eraldatua egongo dela. MDM2 proteinaren gene kodetzailea p53ren itu bat denez, mota honetako aldaerak gertatzean ez litzateke MDM2 adieraziko, eta ondorioz, p53 ezingo litzateke ubikinatuta ezta degradatuta ere.

Horrez gain, DBDan itzulpen-ondoko eraldaketa desberdinak pairatu ditzaketen hondar ugari deskribatu dira, eta batzuk esperotako baino maiztasun handiagoz mututzen dira, proteinaren degradazioan paper garrantzitsu bat jokatzen dutela pentsarazten duena<sup>11</sup>. Horien artean, ikerketa honetan identifikatu diren K132 ubikitinazio gunearen eta E258 ADP-ribosilazio gunearen aldaerak dira. K132N aldaeraren kasuan, aminoazido ordezkapen horrek ubikitinazioa ekidindo du gune honetan eta beraz proteinaren degradazioa oztopatuko da. Gure datuetan ez da aldatutako hondarraren funtzioaren menpeko IHK maila desberdintasunik aurkitu.

Legamietan egindako saioretan aktibitate transkripzionalaren desberdintasunik behatu ez denez kontaktu aldaeren eta konformazionalen artean (1. taula gehigarria), mutagenesi prozesua burutu zen, bi talde horien aktibitatea giza zeluletan bereiztu nahian. Horretarako, talde bakoitzetik oso ikertuak eta giza lerro zelularretan aktibitate transkripzional oso txikia aurkezten duten<sup>31</sup> puntu bero aldaera bi aukeratu ziren (R273H eta R175H), prozesuaren kontrol bezala edukitzeko, eta hain ikertuta ez zeuden beste bi (S241A eta A159V). Mutagenesi prozesua arrakastatsua izan zen eta plasmidoak prest daude giza zeluletan transfektatuak izateko.

Nahiz eta proteina mutatuak kartzinogenesi prozesuan daukan eginkizuna funtsezkoa izan, ikerketa askok aldaeren arteko maiztasun-desberdintasunean DNAn eraldaketa epigenetikoek daukaten ekarpena argudiatzen dute, CpG guneen metilazioa, hain zuzen ere. Eraldaketa honen desregulaketa behatu da minbizi mota askotan<sup>15</sup>. CpG guneen metilazioa gene baten ORFan ematen bada, zentzu aldaketazko eta aldaera bukatzaileen agerpena erraztuko da, izan ere, 5-metilzitosinaren berezko desaminazioak timinaren agerpena

eragiten du, DNA konpontzeko mekanismoak hautemateko zaila den akatsa, alegia<sup>32</sup>. Ikerketa honetan, 48 zentzu-aldaketazko mutazioetatik 29 CpG guneetan kokatzen diren 4 puntu beroetan (R175, R248, R273 eta R282) bakarrik kontzentratu dira.

Badirudi CRCan beste minbizi motetan baino eginkizun handiagoa daukala metilazioak. Alde batetik, beste ehunetan espezifikokoak diren puntu bero aldaerak ez dira CpG guneetan gertatzen, baizik eta ingurune faktoreen esposizioa lotu dira, tabakoaren kearena biriki-minbizian, amina aromatikoena maskuri-minbizian edo argi ultramorearena azaleko minbizian<sup>33</sup>. Aldiz, CRCan espezifikokoak diren puntu bero guztiak CpG metilatuetan kokatzen dira; minbizi mota honetan adinak eta dieta desegokiak bideratutako aldaketa epigenetikoak daukaten garrantziaren adierazgarri dena<sup>34</sup>. Ikerketa honetan identifikatutako aldaeren maiztasun erlatibo handienak puntu bero hondar horiek aurkezten dituzte, G245 hondarra izan ezik, azaltzeko zaila den emaitza, alegia. Beste alde batetik, aldaera bukatzaileak ere minbizi motaren arabera maiztasun desberdinak aurkezten dituzte. Ikerketa honetan aurkitutako 11 aldaeretatik 9 CRCan esperotako baino maiztasun handiagoz agertzen diren eta CpG gune metilatuetan kokatzen diren R196, R213 eta R306 hondarretan<sup>21</sup> identifikatu dira. Azaldu den bezala, aldaera bukatzaile guztiek efektu berdina daukate (NMD), beraz kasu honetan agerikoagoa da CpG metilatuek daukaten garrantzia.

Bukatzeko, bi mutazio pairatu zituen adenokartzinomaren kasua oso berezia da, izan ere, kartzinomen %0,5ak baino gutxiagok pairatzen ditu mutazio anizkoitzak<sup>35</sup>. Gainera, tumore metastasikoan bakarrik alelo mutatua agertzen da bi posizioetan. Gertaera hori azaltzeko bi hipotesi planteatu ditugu. Alde batetik, bi aldaera berdinak beste kromosoman ere ematea posible litzateke, hala ere, hori gertatzeko probabilitatea arbuigarria da. Bestetik, aldaerak *cis* egoeran egongo balira (kromosoma berdinean), posible litzateke alelo osasuntsuaren delezioa gertatu izana edo alelo mutatuaren disomia, azken horren garrantzia kartzinogenesisian frogatu baita<sup>36</sup>. Hipotesi hau berresteko, MLPA edo mikrosateliteen azterketaren teknikak buruto lirateke.

## Ondorioak

Beste minbizi motetan frogatu den bezala, p53 proteinaren muturreko adierazpena, hala gainadierazpena nola adierazpen gabezia, *TP53* aldaera mota zehatzekin lotzen da. Hala ere, muturreko fenotipoa daukaten lagin askoren genotipoa basatia dela behatu da, beraz, sekuentziazio teknikaren emaitzak hobetze aldera, NGSen erabilera edota *TP53* genearen ORF osoaren sekuentziazioa planteatzen da. Halaber, CRCan *TP53* genearen aldaera ohikoenetan DNAREN metilazioak daukan garrantzia azpimarratzen da.

Ikerketa honetan lortutako datuekin idatzitako *abstracta European Congress of Pathology* kongresuaren 33. edizioan aukeratua izan da poster batean aurkezteko.

## Bibliografia

1. Villéger, R. *et al.* Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis. *World J. Gastroenterol.* **24**, 2327–2347 (2018).
2. Osakidetza. Kolon-ondesteetako minbiziaren baheketa-programa.

<https://www.osakidetza.euskadi.eus/minbizia-gaixotasuna/-/kolon-ondesteetako-minbiziaren-baheketa-programa/> (2021).

3. Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. & Wallace, M. B. Colorectal cancer. *Lancet* **394**, 1467–1480 (2019).
4. Kanapathipillai, M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
5. Goh, A. M., Coffill, C. R. & Lane, D. P. The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* **223**, 116–126 (2011).
6. Silva, J. L., Gallo, C. V. D. M., Costa, D. C. F. & Rangel, L. P. Prion-like aggregation of mutant p53 in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 260–267 (2014).
7. May, P. & May, E. Corrigendum: Twenty years of p53 research: Structural and functional aspects of the p53 protein (Oncogene (1999) 18 (7621-7636)). *Oncogene* **19**, 1734 (2000).
8. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science (80-. )*. **265**, 346–355 (1994).
9. Antoun, S. *et al.* Different TP53 mutants in p53 overexpressed epithelial ovarian carcinoma can be associated both with altered and unaltered glycolytic and apoptotic profiles. *Cancer Cell Int.* **18**, 1–10 (2018).
10. Shahbandi, A. & Jackson, J. G. Analysis across multiple tumor types provides no evidence that mutant p53 exerts dominant negative activity. *npj Precis. Oncol.* **3**, 1–3 (2019).
11. Nguyen, T.-A., Menendez, D., Resnick, M. A. & Anderson, C. W. Mutant TP53 Posttranslational Modifications: Challenges and Opportunities. *Hum. Mutat.* **35**, 738–755 (2014).
12. Willis, A., Jung, E. J., Wakefield, T. & Chen, X. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* **23**, 2330–2338 (2004).
13. Muller, P. A. J. & Vousden, K. H. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304–317 (2014).
14. Zhang, M. *et al.* Synergistic rescue of nonsense mutant tumor suppressor p53 by combination treatment with aminoglycosides and Mdm2 inhibitors. *Front. Oncol.* **7**, 1–12 (2018).
15. Molnár, B. *et al.* Gene promoter and exon DNA methylation changes in colon cancer development - mRNA expression and tumor mutation alterations. *BMC Cancer* **18**, 1–14 (2018).
16. Giacomelli, A. O. *et al.* Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer. *Nat. Genet.* **50**, 1381–1387 (2018).
17. Oh, H. J. *et al.* p53 expression status is associated with cancer-specific survival in stage III and high-risk stage II colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Br. J. Cancer* **120**, 797–805 (2019).
18. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, 1–7 (2017).
19. Asai, T. *et al.* High frequency of TP53 but not K-ras gene mutations in Bolivian patients with gallbladder cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 5449–54 (2014).



20. Panchal, N. K., Bhale, A., Chowdary, R., Verma, V. K. & Beevi, S. S. PCR amplifiable DNA from breast disease FFPE section for mutational analysis. *J. Biomol. Tech.* **31**, 1–6 (2020).
21. Murnyák, B. & Hortobágyi, T. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget* **7**, 64910–64920 (2016).
22. Oh, H. J. *et al.* p53 expression status is associated with cancer-specific survival in stage III and high-risk stage II colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Br. J. Cancer* **120**, 797–805 (2019).
23. Morikawa, T. *et al.* Tumor TP53 expression status, body mass index and prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **131**, 1169–1178 (2012).
24. Ando, K. *et al.* Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. *Cancer Med.* **4**, 75–83 (2015).
25. Rohlin, A. *et al.* Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum. Mutat.* **30**, 1012–1020 (2009).
26. Köbel, M. *et al.* Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **38**, S123–S131 (2019).
27. Tessier-Cloutier, B. *et al.* Major p53 immunohistochemical patterns in in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod. Pathol.* **33**, 1595–1605 (2020).
28. Coggi, G. *et al.* p53 Protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma: A molecular and immunohistochemical study with clinicopathologic correlations. *Cancer* **79**, 425–432 (1997).
29. Boyle, D. P. *et al.* The prognostic significance of the aberrant extremes of p53 immunophenotypes in breast cancer. *Histopathology* **65**, 340–352 (2014).
30. Yemelyanova, A. *et al.* Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: An immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod. Pathol.* **24**, 1248–1253 (2011).
31. Kakudo, Y., Shibata, H., Otsuka, K., Kato, S. & Ishioka, C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res.* **65**, 2108–2114 (2005).
32. Iii, W. M. R., Coetzee, G. A., Olumi, A. F. & Jones, P. A. Human LDL Receptor and p53 Genes HI. *Science* **29179**, 1288–90 (1990).
33. Petitjean, A. *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.* **28**, 622–9 (2007).
34. Lao, V. V. & Grady, W. M. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 686–700 (2011).
35. Soussi, T. & Bérout, C. Significance of TP53 mutations in human cancer: A critical analysis of mutations at CPG dinucleotides. *Hum. Mutat.* **21**, 192–200 (2003).
36. Beristain, E. *et al.* Disomy as the genetic underlying mechanisms of loss of heterozygosity in SDHD-paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1012–1016 (2013).

## Eranskina

1. taula gehigarria: Identifikatutako aldaera guztien ezaugarri nagusiak. #Aldaera lagin bat baino gehiagotan identifikatu bada, lortutako IHK baloreen heina erakusten da. ¥Aldaera 6. introian dago.

Identifikatutako bariantea (NM_000546)	DNA mutazio mota	CpG gunea	Exoia	Identifikatutako bariantea (NP_000537)	Mutazio proteiko mota	Maiztasuna	Motiboa	Funtzioa (IARC)	Aktibitate transkripzionala (%) (PHANTM)	IHK heina(%)#
c.383delC	Delezioa	-	5	p.P128Lfs*42	Irakurtaraua	1	-	-	-	0,05
c.385dupG	Txertaketa	-	5	p.A129Gfs*20	Irakurtaraua	1	-	-	-	0
c.396G>T	Transbertsioa	Ez	5	p.K132N	Zentzu-aldaketa	1	L1/S/H2	Ubikitinazio gunea	9,41	91,66
c.455C>T	Trantsizioa	Ez	5	p.P152S	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	Konformazionala	15,94	98,3
c.476C>T	Trantsizioa	Ez	5	p.A159V	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	Konformazionala	16,63	98,61
c.489C>A	Transbertsioa	Ez	5	p.Y163*	Bukatzailea	1	NDBL/beta-sheets	-	-	0
c.511G>T	Transbertsioa	Ez	5	p.E171*	Bukatzailea	1	L2/L3	-	-	0
c.524G>A	Trantsizioa	Bai	5	p.R175H	Zentzu-aldaketa	8	L2/L3	Konformazionala	10,11	97,77-100
c.527G>A	Trantsizioa	Ez	5	p.C176Y	Zentzu-aldaketa	2	L2/L3	Zink batuketa	21,99	90,81-98,77
c.536A>G	Trantsizioa	Ez	5	p.H179R	Zentzu-aldaketa	1	L2/L3	Zink batuketa	26,29	97,96
c.577C>T	Trantsizioa	Ez	6	p.H193Y	Zentzu-aldaketa	1	L2/L3	Konformazionala	17,03	92,37
c.586C>T	Trantsizioa	Bai	6	p.R196*	Bukatzailea	4	NDBL/beta-sheets	-	-	0,04-1,14
c.614A>G	Trantsizioa	Ez	6	p.Y205C	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	Konformazionala	10,11	98,94
c.637C>T	Trantsizioa	Bai	6	p.R213*	Bukatzailea	3	NDBL/beta-sheets	-	-	0-0,47

Identifikatutako bariantea (NM_000546)	DNA mutazio mota	CpG gunea	Exoia	Identifikatutako bariantea (NP_000537)	Mutazio proteiko mota	Maiztasuna	Motiboa	Funtzioa (IARC)	Aktibitate transkripzionala (%) (PHANTM)	IHK heina(%)#
c.641A>G	Trantsizioa	Ez	6	p.H214R	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	Konformazionala	9,76	98,21
c.701A>C	Transbertsioa	Ez	7	p.Y234C	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	Konformazionala	9,79	96,39
c.713G>A	Trantsizioa	Ez	7	p.C238Y	Zentzu-aldaketa	1	L2/L3	Zink batuketa	16,1	98,74
c.721T>G	Transbertsioa	Ez	7	p.S241A	Zentzu-aldaketa	1	L2/L3	DNA batuketa	13,09	91,1
c.736A>G	Trantsizioa	Ez	7	p.M246V	Zentzu-aldaketa	1	L2/L3	DNA batuketa	7,19	99,42
c.742C>T	Trantsizioa	Bai	7	p.R248W	Zentzu-aldaketa	4	L2/L3	DNA batuketa	0,09	93,22-98,88
c.743G>A	Trantsizioa	Bai	7	p.R248Q	Zentzu-aldaketa	2	L2/L3	DNA batuketa	0,21	94,71-99,01
c.772G>A	Trantsizioa	Ez	7	p.E258K	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	ADP-ribosilazioa	4,86	99,22
c.797G>A	Trantsizioa	Ez	8	p.G266E	Zentzu-aldaketa	1	NDBL/beta-sheets	Konformazionala	1,65	97,76
c.817C>T	Trantsizioa	Bai	8	p.R273C	Zentzu-aldaketa	4	L1/S/H2	DNA batuketa	0,76	96,14-97,98
c.818G>A	Trantsizioa	Bai	8	p.R273H	Zentzu-aldaketa	5	L1/S/H2	DNA batuketa	2,51	96,71-99,99
c.820G>T	Transbertsioa	Ez	8	p.V274F	Zentzu-aldaketa	1	L1/S/H2	Konformazionala	0,18	91,14
c.823T>C	Trantsizioa	Ez	8	p.C275R	Zentzu-aldaketa	1	L1/S/H2	DNA batuketa	3,13	99,72
c.824G>T	Transbertsioa	Ez	8	p.C275F	Zentzu-aldaketa	1	L1/S/H2	DNA batuketa	0	97,77
c.844C>T	Trantsizioa	Bai	8	p.R282W	Zentzu-aldaketa	6	L1/S/H2	Konformazionala	0,18	94,06-99,08

Identifikatutako bariantea (NM_000546)	DNA mutazio mota	CpG gunea	Exoia	Identifikatutako bariantea (NP_000537)	Mutazio proteiko mota	Maiztasuna	Motiboa	Funtzioa (IARC)	Aktibitate transkripzionala (%) (PHANTM)	IHK heina(%)#
c.853G>A	Trantsizioa	Ez	8	p.E285K	Zentzu-aldaketa	1	L1/S/H2	Konformazionala	4,06	99,38
c.856G>A	Trantsizioa	Ez	8	p.E286K	Zentzu-aldaketa	1	L1/S/H2	DNA batuketa	16,56	91,07
c.916C>T	Trantsizioa	Bai	8	p.R306*	Bukatzailea	2	C-term/NLS	-	-	0-0,87
c.672+1G>T	Transbertsioa	Ez	6 <sup>y</sup>	-	Moztitsaske ta	1	-	-	-	0,1