

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ATUAÇÃO DA MUTAÇÃO R337H EM TP53 EM PACIENTES DE LI-FRAUMENI
EM AUTOFAGIA, SENESCÊNCIA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular do
Centro de Biotecnologia da UFRGS
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre

MICHELE OLIVEIRA HÜTTEN
ORIENTADOR: Dr GUIDO LENZ

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2016

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com o Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O financiamento foi realizado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). O projeto de pesquisa teve aprovação ética e metodológica pelos comitês de ética e pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 13-0019.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família. Foi muito importante todo o apoio emocional e até mesmo financeiro por parte de todos para a minha jornada acadêmica. Minha mãe, minha irmã e meus avós são as pessoas mais importantes para mim e, portanto, apesar e qualquer divergência que tenhamos tudo que eles me ensinaram e viveram comigo foi essencial para minha formação pessoal.

Ao meu namorado Hans, que é sempre muito compreensivo e parceiro, aquele que eu descobri em pouco tempo que nada tinha tanta graça sem o apoio ou a presença dele. Aos meus amigos mais próximos, Juliano, Fernanda, Miguel, Mardja, Lia, Darlan e Alan, que nem sempre têm as palavras que eu gostaria de ouvir, mas sim as que eu preciso ouvir e sempre dão um jeito de me ajudar a passar qualquer momento triste ou aproveitar qualquer momento feliz.

A todos do LabSinal que me auxiliaram durante minha graduação e no mestrado. Ao Andrew, que me orientou durante toda a iniciação científica e me ensinou quase tudo que sei sobre cultivo celular; À Gio, que é uma mãezona, sempre preocupada e atenciosa; À Fran e a Emy, que são sempre minhas segundas opiniões com qualquer dúvida em experimentos e me ensinaram diversas técnicas ao longo do mestrado. À Karen, que mantém tudo em ordem e cuida de toda a vidraria e autoclavagem, uma pessoa essencial para a ausência de contaminações na cultura.

À professora Patricia Prolla, ao Gabriel Macedo e à Patricia Luciana pela colaboração e pelo auxílio na utilização de toda infraestrutura do HCPA.

E por ultimo, mas não menos importante, ao meu orientador, professor Guido, que foi o primeiro professor a me dar uma ideia crítica sobre artigos científicos e um grande incentivador da curiosidade, mantendo sempre o espírito pesquisador ativo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
1. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI.....	10
1.1 <i>Histórico.....</i>	10
1.2 <i>Diagnóstico da síndrome.....</i>	11
2. O GENE TP53 E SUA PROTEÍNA.....	13
2.1 <i>Funções.....</i>	13
2.2 <i>Características do gene TP53, regulação e domínios da proteína.....</i>	15
2.3 <i>Mutações em TP53 e prognóstico clínico das mutações.....</i>	17
2.4 <i>P53 como reguladora de senescência.....</i>	19
2.5 <i>P53 como reguladora de autofagia.....</i>	21
3. MUTAÇÃO R337H EM TP53 E SUAS PROPRIEDADES.....	24
OBJETIVOS.....	26
1. OBJETIVO GERAL.....	26
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
RESULTADOS E METODOLOGIA EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
1. ABSTRACT.....	28
2. BACKGROUND.....	29
3. METHODS.....	31
4. RESULTS.....	34
5. DISCUSSION.....	41
6. CONCLUSION.....	43
7. ADDITIONAL FILES.....	44
8. REFERENCES.....	48
RESULTADOS ADICIONAIS.....	52
1. FORMAÇÃO DE COLÔNIAS SEMELHANTES À CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS EM FIBROBLASTOS COM E SEM MUTAÇÃO EM P53.....	52

2. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE P53 NÃO É AFETADA PELA MUTAÇÃO P.R337H EM TP53 EM ESTADO BASAL.....	53
DISCUSSÃO	55
PERSPECTIVAS.....	60
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
CURRÍCULO	69

Lista de abreviaturas

ACC – adrenocortical carcinoma

ADR – carcinoma adrenocortical

AMPK – AMP-activated protein kinase / quinase ativada por AMP

AO – acridine orange

ARF – alternative reading frame

AVOs – acidic vesicular organelles

CDK – cycli-dependent kinase / quinase dependente de ciclina

CDKI – CDK inhibitor / inibidor de CDK

CNS – central nervous system

CPD – cumulative population doubling

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO – dimethyl sulfoxide

FBS – fetal bovine serum

GLUT – glucose transporter / transportador de glicose

iPSC – induced pluripotent stem cell / célula tronco pluripotente induzida

LC3 – light chain 3

LFL – Li-Fraumeni Like

LFS – Li-Fraumeni syndrome / síndrome de Li-Fraumeni

mTORC1 – mammalian target of Rapamycin

PD – population doubling

PE – phosphatidylethanolamine

Rb – Retinoblastoma

SA- β -GAL – senescence associated β -galactosidase

SCO1 – cytochrome c oxidase / citocromo c oxidase

SNARE - soluble NSF attachment receptor

SNC – sistema nervoso central

SQSTM1 – sequestosome 1

ULK1 – UNC-51-like kinase 1

Lista de Figuras

Figura 1: Ativação da p53 e suas atuações.

Figura 2: Estrutura do gene TP53 e domínios da p53.

Figura 3: Mutações em TP53.

Figura 4: Regulação da senescência por p53.

Figura 5: Via detalhada da autofagia.

Figura 1 do artigo científico: Growth rates of Control Fibroblasts and TP53 mutated fibroblasts.

Figura 2 do artigo científico: p.R337H TP53 mutation can impair autophagy roles of p53.

Figura 3 do artigo científico: p.R337H TP53 mutation protects fibroblasts against stress-induced premature senescence.

Figura 4 do artigo científico: Increased total numbers of mitochondria in Doxorubicin treated p.R337H TP53 mutated cells.

Figura 5 do artigo científico: Increased total numbers of mitochondria in Doxorubicin treated p.R337H TP53 mutated cells.

Figura suplementar 1 do artigo científico: p.R337H TP53 mutation can impair autophagy roles of p53

Figura suplementar 2 do artigo científico: p.R337H TP53 mutation protects fibroblasts against stress-induced premature senescence

Figura suplementar 3 do artigo científico: Increased total numbers of mitochondria in Doxorubicin treated p.R337H TP53 mutated cells

Figura suplementar 4 do artigo científico: Functionality of mitochondria in Control and p.R337H mutated fibroblasts before and after Doxorubicin and Cisplatin treatments

Figura adicional 1: Formação de colônias semelhantes à células tronco pluripotente induzidas em fibroblastos com e sem mutação em p53

Figura adicional 2: Localização subcelular de p53 não é afetada pela mutação p.R337H em TP53 em estado basal

Resumo

Introdução: As síndromes de Li-Fraumeni (LFS) e Li-Fraumeni *Like* (LFL) são síndromes hereditárias de predisposição a câncer frequentemente associadas à mutações germinativas no gene TP53. Devido à importância de p53 e diversidade de processos celulares que ela regula, várias vias de sinalização podem ser afetadas pela doença. Nesse estudo discutimos o impacto da mutação p.R337H na proliferação, senescência, autofagia, população e funcionalidade mitocondrial.

Métodos: As taxas de proliferação foram avaliadas pelo ensaio de *Population Doubling*. Os experimentos de senescência, autofagia, massa total e funcionalidade mitocondrial foram realizados por citometria de fluxo.

Resultados: As células contendo a mutação proliferaram mais do que as células controle. Além disso, as células mutadas não ativaram autofagia sob tratamento de Rapamicina nem senescência sob tratamento de Doxorubicina ou Cisplatina e exibiram maior população mitocondrial, mas com funcionalidade inalterada após os tratamentos.

Conclusão: os dados sugerem que a mutação p.R337H em TP53 afeta a indução de senescência realizada por p53 e suas funções pró-autofágicas, bem como seu controle. As células mutadas proliferam mais do que células sem mutação em TP53 e exibiram maior massa mitocondrial sem perda de funcionalidade após o tratamento com Doxorubicina.

Palavras-chave: Síndrome de Li-Fraumeni, TP53, p53, senescência, autofagia.

Abstract

Background: Li-Fraumeni (LFS) and Li-Fraumeni Like (LFL) syndromes are hereditary cancer predisposition syndromes frequently associated with germline mutation in TP53. Due to the importance of the protein p53 and its regulation of several important cellular processes, impairment in some pathways can be implicated. Here we discuss the impact of p.R337H TP53 mutation on proliferation, senescence, autophagy, mitochondrial population and functionality.

Methods: Growth rates were assayed with Population Doubling assay. Senescence and autophagy were assessed through flow cytometry and functionality and total population of mitochondria were also analyzed through flow cytometry.

Results: mutated cells proliferated more than control cells. TP53 mutated cells didn't build up autophagy under Rapamycin treatment nor senescence under Doxorubicin or Cisplatin treatments and showed more mitochondrial mass, but no alterations in mitochondrial functionality after Doxorubicin treatment.

Conclusion: data suggests that p.R337H TP53 mutation affect senescence induction by p53 and pro-autophagic actions of p53. Mutated cells proliferate more than control cells and exhibited larger mitochondrial mass without effects in their functionality in response to Doxorubicin treatment.

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, TP53, p53, senescence, autophagy.

Introdução

1. Síndrome de Li-Fraumeni

1.1 Histórico

A síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer com padrão de herança autossômico dominante. A síndrome foi primeiramente descrita pelos pesquisadores Frederick P. Li e Joseph F. Fraumeni que, a partir da revisão de registros médicos de mais de 600 crianças norte-americanas diagnosticadas com rabdomyossarcoma, puderam identificar a alta ocorrência de diversos tipos de tumores (como sarcomas de partes moles e câncer de mama, por exemplo) em famílias. Assim, pelo agrupamento incomum de tumores malignos nestes agregados familiares, que indicavam o padrão de herança autossômico dominante, a nova síndrome de câncer familiar chamada Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) foi descrita (Li e Fraumeni, 1969).

Diferentemente de outras síndromes de câncer em tecidos específicos, a LFS apresenta risco aumentado para um espectro variado de tumores em idade precoce. Inicialmente, os tumores mais comumente observados são o conjunto chamado hoje em dia de “tumores centrais” ou “*core tumors*”, que são sarcomas de partes moles, osteossarcomas, câncer de mama, tumores do sistema nervoso central (SNC), leucemias e carcinoma adrenocortical (ADR) (Li e Fraumeni, 1969; Li *et al.*, 1988). Porém, um espectro mais amplo foi posteriormente relatado, incluindo, por exemplo, câncer de pulmão, próstata, estômago, tumores de células germinativas e melanomas (Hartley *et al.*, 1989; Nichols *et al.*, 2001).

Estima-se que portadores da síndrome tenham 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 40 anos de idade, em contraste com a população em geral, que apresenta apenas 1% de probabilidade (Malkin *et al.*, 1990; Birch *et al.*, 2001). Além disso, o risco de desenvolver algum tipo de tumor ao longo da vida é de 73% para homens, e o mesmo aparece aumentado para mulheres, chegando a 100%, uma diferença causada pelo câncer de mama, altamente prevalente entre mulheres diagnosticadas com Li-Fraumeni. Outro fator importante é o risco do desenvolvimento de lesões secundárias, uma vez que pacientes que desenvolveram algum tumor na infância são mais predispostos à

ocorrência de múltiplos tumores primários ao longo da vida (Li *et al.*, 1988; Hisada *et al.*, 1998; Chompret, 2002)

O diagnóstico da síndrome é primeiramente clínico, de acordo com a observação dos casos de tumores relatados dentro de uma família. A definição clássica e mais bem aceita é a presença de um probando (indivíduo avaliado) com diagnóstico de sarcoma antes dos 45 anos de idade, que possua um familiar em primeiro grau com câncer antes dos 45 anos de idade e ainda outro familiar em primeiro ou segundo grau que também teve câncer antes dos 45 anos de idade ou um sarcoma em qualquer idade (Li *et al.*, 1988). Apesar de o mecanismo molecular associado à síndrome não ser completamente compreendido, diversos estudos apontam a etiologia genética da doença relacionada à mutação do gene TP53. Mutações nesse gene são comumente encontradas em diversos tipos tumorais esporádicos, então a partir do final da década de 80 foi sendo evidenciada a associação da mutação desse gene com a doença. Cerca de 70% das famílias portadoras da doença apresentam mutação no gene TP53 (Hartley *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989; Garber *et al.*, 1991; Varley *et al.*, 1997; Birch *et al.*, 1998).

1.2 Diagnóstico da síndrome

O diagnóstico é realizado pela apresentação clínica do paciente. O critério clássico e mais bem aceito é aquele definido por Li e Fraumeni (1988), mas outros pesquisadores também desenvolveram critérios semelhantes e menos restritivos, denominando as variantes da Síndrome de Li-Fraumeni como Síndrome de Li-Fraumeni *Like* (LFL). O quadro abaixo sumariza os critérios de definição para LFS e LFL designados por Li e Fraumeni, Birch, Chompret e Eeles. Após a identificação clínica, indivíduos que preenchem os critérios recebem indicação de passar por teste genético para avaliar mutação em TP53 (Li *et al.*, 1988; Birch, 1994; Eeles, 1995; Frebourg *et al.*, 2001; Tinat *et al.*, 2009).

Quadro 1. Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni

Critério Clássico LFS

- I. Sarcoma na infância ou idade jovem (antes de 45 anos de idade) **E**
- II. Familiar de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) **E**
- III. Familiar de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.

Critério LFL de Birch

- I. Câncer na infância (em qualquer idade) ou sarcoma, ou tumor do SNC, ou ADR em idade jovem (antes dos 45 anos) **E**
- II. Familiar de primeiro ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, SNC, ADR ou leucemia) em qualquer idade **E**
- III. Familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes do 60 anos.

Critério LFL de Eeles

- I. Pelo menos dois parentes de primeiro ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, SNC, ADR, leucemia, melanoma, câncer de próstata ou pancreático) diagnosticado em qualquer idade.
- I. Sarcoma diagnosticado em qualquer idade **E**
- II. Pelo menos dois outros tumores diagnosticados em pelo menos um parente de primeiro ou segundo grau: câncer de mama antes dos 50 anos; **OU** tumor do SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata ou pancreático antes dos 60 anos; **OU** sarcoma em qualquer idade.

Critério LFL de Chompret

- I. Diagnóstico de sarcoma, câncer de mama, SNC ou ADR antes dos 36 anos **E**
- II. Parente de primeiro ou segundo grau com qualquer dos canceres acima (exceto câncer de mama se o paciente teve câncer de mama), **ou** parente com múltiplos tumores primários em qualquer idade **OU**

- III. Múltiplos tumores primários, incluindo dois dos seguintes: sarcoma, câncer de mama, SNC, ou ADR, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos independentemente de histórico familiar; **OU**
- IV. ADR em qualquer idade, independentemente de histórico familiar.

Critério de Chompret modificado

- I. Paciente índice com câncer do espectro da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, SNC, ADR, leucemia ou carcinoma brônquio-alveolar) ocorrendo antes dos 46 anos **E**
- II. Parente de primeiro ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni ocorrendo antes dos 56 anos (exceto câncer de mama se o paciente índice teve câncer de mama), **ou** múltiplos tumores; **OU**
- III. Paciente índice com múltiplos tumores, com pelo menos dois deles do espectro de Li-Fraumeni, e com o primeiro ocorrendo antes dos 46 anos; **OU**
- IV. ADR ou carcinoma do plexo coroide ocorrendo em qualquer idade ou câncer de mama ocorrendo antes dos 36 anos sem mutação em BRCA1 ou BRCA2.

2. O gene TP53 e sua proteína

2.1 Funções

A proteína p53 foi descoberta por diversos grupos independentes e foi descrita em 1979, com sua função inicialmente atribuída ao desenvolvimento tumoral (Deleo *et al.*, 1979; Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979). No entanto, com passar dos anos a pesquisa constante dessa proteína revelou sua importância como supressora tumoral, sendo até mesmo atualmente considerada como “guardiã do genoma”, devido sua grande atuação e versatilidade em diversas vias celulares que visam impedir a progressão tumoral (Lane, 1992; Vousden e Lu, 2002; Oren, 2003). Tamanha é a importância dessa proteína que pelo menos metade dos cânceres humanos apresenta mutação no gene TP53 (Harris, 1996; Hernandez-Boussard *et al.*, 1999; Hainaut e Hollstein, 2000; Olivier *et al.*, 2010).

A via da p53 é composta por uma rede complexa de proteínas que evoluíram para responder a diferentes sinais de estresse, principalmente de dano ao DNA, a fim de evitar a propagação do erro e impedir a proliferação descontrolada das células. O tempo de meia vida dessa proteína é curto, durando cerca de 10 a 30 minutos, e em condições de homeostase celular seus níveis são mantidos baixos (Picksley e Lane, 1993; Kubbutat *et al.*, 1997). As situações de estresse que podem ativar a transcrição de p53 são, por exemplo, radiação ionizante ou ultravioleta, hipóxia, encurtamento telomérico, dano ao DNA e sinalização oncogênica (Kastan *et al.*, 1991; El-Deiry, 2003; Harris e Levine, 2005), e suas funções principais envolvem sua atuação como fator de transcrição, bem como a interação com outras proteínas a partir da formação de complexos (Kern *et al.*, 1991; Farmer *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2000).

A expressão dos genes regulados por p53 e a atuação dessa proteína em complexos depende da natureza e da intensidade do estresse, do tipo celular e do microambiente em que a célula está inserida. Assim, a proteína pode regular diferencialmente os processos celulares de acordo com a situação específica em que a célula se encontra. Os mecanismos controlados por p53 são, por exemplo, proliferação, senescência, parada no ciclo celular, reparo ao dano no DNA, apoptose e autofagia (Figura 1) (El-Deiry, 2003; Oren, 2003; Levine e Oren, 2009).

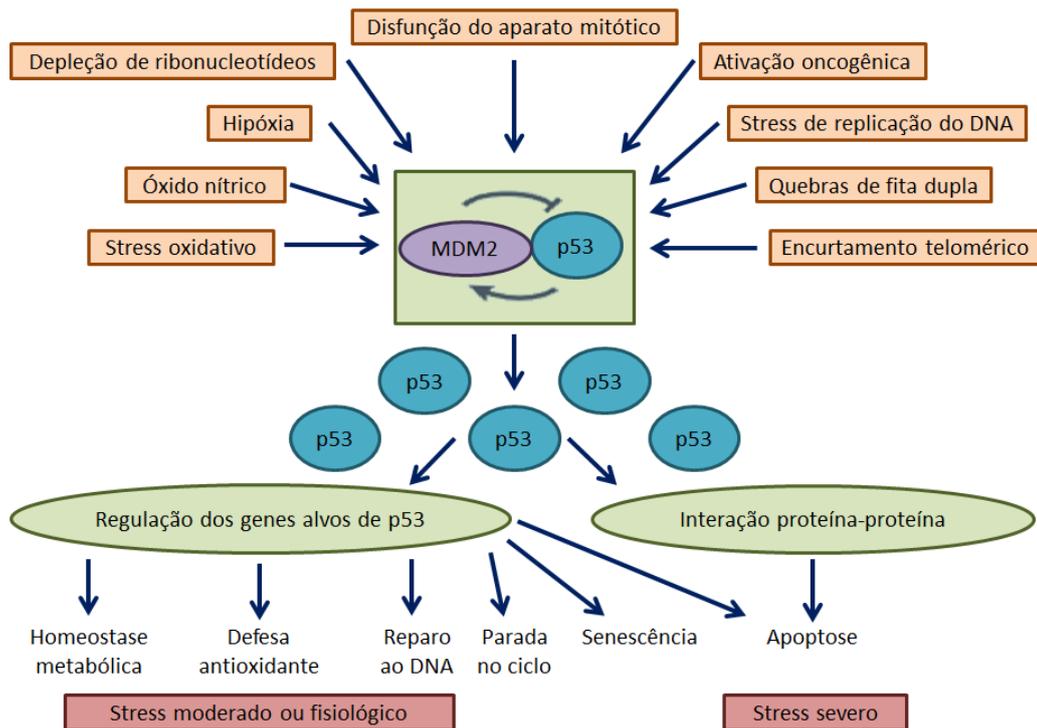


Figura 1. Ativação da p53 e suas atuações. Depois de variados sinais de estresse (em laranja), p53 tem sua função como supressora tumoral tanto por sua atuação como fator de transcrição, como por interações proteína-proteína, regulando diversos processos celulares dependendo do tipo e da intensidade do estresse inicial. **Adaptado de Levine e Oren (2009).**

2.2 Características do gene TP53, regulação e domínios da proteína.

O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) e possui 11 éxons, sendo 10 deles codificantes (Figura 2). O gene codifica uma proteína de 393 aminoácidos com domínios bem definidos com funções específicas (Figura 2) (Harris, 1996; Sorrell *et al.*, 2013).

Os primeiros 93 aminoácidos da proteína compõem o domínio N-terminal, que possui um domínio de transativação, que é a região responsável pela interação com proteínas regulatórias e a maquinaria de transcrição, e um domínio rico em prolínas, que vai até o resíduo 93, que está envolvido com a função pró-apoptótica de p53 e também sua regulação (Fields e Jang, 1990; Sakamuro *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2003). A região central, que vai dos resíduos 94 a 322, contém o domínio de ligação ao DNA, e é composta por aminoácidos que interagem diretamente com o DNA em sequências específicas (Cho *et al.*, 1994).

A maior parte das mutações associadas a tumores se encontra nesta região da proteína (Figura 3) (Harris, 1996; Petitjean, Mathe, *et al.*, 2007). Por fim, a região C-terminal tem múltiplas funções. Essa região contém os principais sinais de localização nuclear e é dividida em um domínio de oligomerização, através do qual a p53 forma dímeros para, posteriormente, formar os tetrâmeros ativos, e um domínio de regulação negativa (Clore *et al.*, 1994).

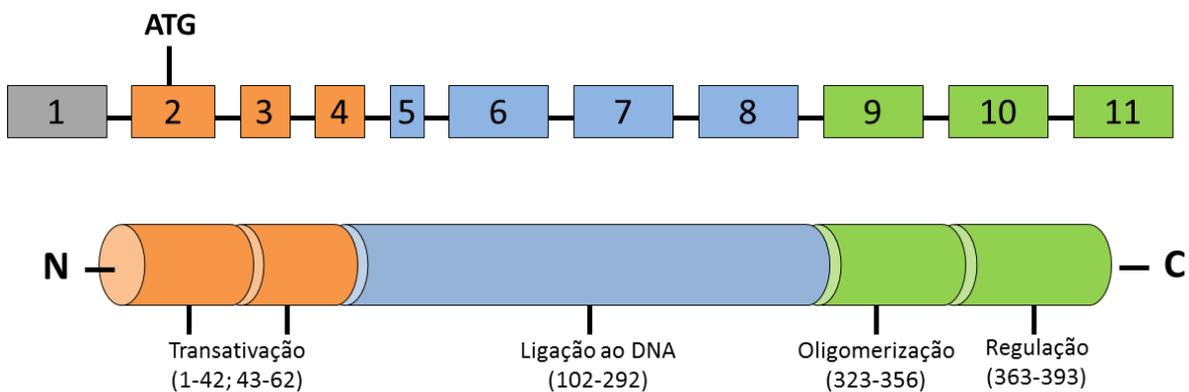


Figura 2. Estrutura do gene TP53 e domínios da p53. O gene TP53 com os éxons representados por quadrados e a proteína p53 com os diferentes domínios representados por cilindros. As cores representam quais partes do gene correspondem aos domínios. **Baseado na IARC TP53 DATABASE e em Sorrell *et al.* (2013).**

A região promotora de TP53 possui pelo menos nove motivos conservados de ligação de fator de transcrição, e assim diversos fatores de transcrição podem afetar a transcrição do gene, como, por exemplo, NFkB, HOXA5 e PAX. No entanto, apesar da importância da regulação pelos fatores de transcrição e, também, por microRNAs, a regulação principal de p53 envolve modificações pós-traducionais, bem como interações proteína-proteína e regulação da estabilidade da proteína (Fu *et al.*, 1996; Webster e Perkins, 1999; Appella e Anderson, 2001; Saldana-Meyer e Recillas-Targa, 2011; Vijayakumaran *et al.*, 2015).

Devido à sua meia vida curta, p53 não permanece no núcleo, e pode ser endereçada para degradação por proteossoma no citoplasma. É quando ocorre

um sinal de estresse que ocorre a estabilização no núcleo ou impedimento da sua degradação. O principal modulador da proteína, o MDM2, funciona como uma ubiquitina ligase, e assim, pela ubiquitinação da proteína, ocorre o endereçamento de p53 ao proteossoma para degradação (Haupt *et al.*, 1997; Michael e Oren, 2003). Além disso, MDM-2 pode bloquear diretamente a atividade transcricional de p53 por se ligar ao domínio de transativação (Momand *et al.*, 1992). Por ser um dos produtos da transcrição mediada por p53, MDM2 auxilia na auto-regulação dessa proteína, uma vez que ocorre uma retroalimentação negativa por esse processo (Picksley e Lane, 1993; Moll e Petrenko, 2003). Outra proteína moduladora desse sistema é a proteína p14/ARF (*Alternative Reading Frame*), que se liga a MDM2 e assim impede a degradação de p53 e sua inativação transcricional (Kamijo *et al.*, 1998).

Além da ubiquitinação, outras as modificações pós-traducionais que p53 pode sofrer incluem acetilação, fosforilação e sumoilação. A fosforilação de algumas regiões de p53 realizada, por exemplo, por quinases que regulam o ciclo celular, leva à dissociação do complexo p53/MDM2 (Michael e Oren, 2003). Acetilação e sumoilação induzem modificações conformacionais discretas na proteína que apresentam afinidade por elementos específicos de resposta ao DNA (Moll e Petrenko, 2003).

2.3 Mutações em TP53 e prognóstico clínico das mutações

Dada sua importância como supressor tumoral, o gene TP53 é o alvo mais frequente de mutação em cânceres humanos, com mais de 50% dos tipos tumorais tendo uma mutação nesse gene (Harris, 1996; Hainaut e Hollstein, 2000; Xu *et al.*, 2014). Frequentemente sua inativação se dá por mutações do tipo *missense*, ou troca de sentido, na qual ocorre alteração nos aminoácidos da p53 (Petitjean, Achatz, *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2010). Das mais de 25 mil casos de mutações descritas até hoje nesse gene, a maior parte ocorre no domínio de ligação ao DNA (Figura 3) (Olivier *et al.*, 2003).

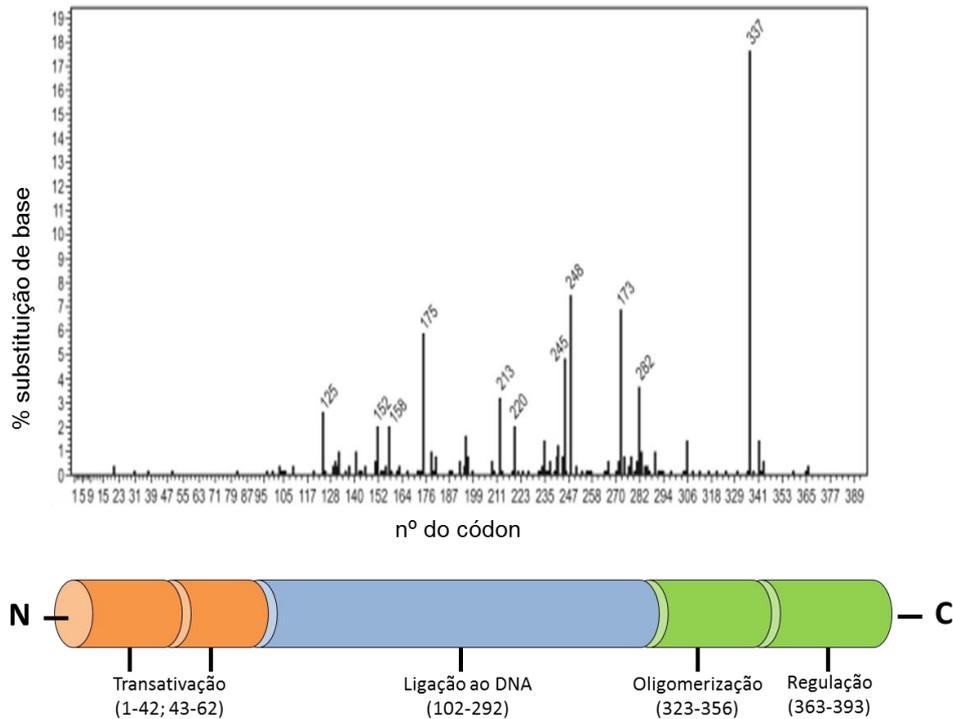


Figura 3. Mutações em TP53. Acima, gráfico mostrando sítios mais comuns de substituição de base. Abaixo, representação da estrutura da proteína para relacionar códon e regiões. **Baseado na IARC TP53 DATABASE e adaptado de Sorrell *et al.* (2013).**

No entanto, nem toda mutação em TP53 causa perda de função. Cada vez mais pesquisas trazem evidências de que tais mutações podem gerar um ganho de função que predispõe a diversos tipos tumorais. O que ocorre é que sem atividade correta de p53 a célula é incapaz de ter um controle adequado no ciclo celular e proliferação, possibilitando um crescimento desenfreado das células e, assim, um possível tumor. Mas verifica-se que não é apenas a falta de controle da p53, mas também a existência de propriedades adicionais dessa proteína que permitem a geração de tumores, uma vez que camundongos com p53 mutada apresentaram maior espectro de tumores e mais metástases em comparação com camundongos p53^{+/-} (Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004; Hanel *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014)

Além disso, diversas evidências apontam para o fato de que mutações específicas predisponham a alguns tipos tumorais ou que o genótipo do paciente possa prever o seu desfecho clínico ou a severidade da doença. Infelizmente

ainda faltam dados para tal afirmação concreta, mas uma vez que a clínica vem buscando se focar em tratamento personalizado, pelo menos a noção básica de quais tipos tumorais ou de quais efeitos determinada mutação pode gerar já é um grande avanço para o possível tratamento e melhoria na qualidade de vida de pacientes portadores da LFS (Birch *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2003; Petitjean, Achatz, *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2010).

2.4 P53 como reguladora de senescência

O controle do ciclo celular e a apoptose são atividades muito importantes de p53, essenciais na proteção contra o desenvolvimento do câncer. A parada no ciclo celular é transitória e tem por objetivo viabilizar o reparo de danos ocorridos ao DNA antes que a célula comece o processo de síntese replicativa de DNA (parada em G1) ou antes de iniciar a divisão celular (parada em G2). O reparo do dano é essencial para que um erro não se perpetue nas próximas gerações, evitando, assim, que o acúmulo progressivo de lesões mutagênicas leve à transformação neoplásica (Cosme-Blanco *et al.*, 2007; Vousden e Prives, 2009).

A senescência é a parada considerada irreversível no ciclo celular. As células senescentes ficam incapazes de responder a quaisquer estímulos de fatores de crescimento e adquirem um formato mais achatado e alargado, bem como a expressão de biomarcadores de senescência, como a β -galactosidase (senescence associated β -galactosidase ou SA- β -gal), e aumento da expressão de p53, p21 e p16 (Qian e Chen, 2013; Rufini *et al.*, 2013). Em culturas com células senescentes foi visto a volta de proliferação e foi considerado que, em situações muito específicas, a senescência pode ser revertida. No entanto, estes foram estudos populacionais, que oferecem uma visão pouco específica sobre células únicas. Assim, apesar de existirem relatos de reversão da senescência em populações celulares, não há clareza se a pequena porcentagem proliferativa da cultura desviou o resultado final para um falso positivo, ou se de fato células senescentes voltaram ao estado proliferativo. Como, além de danos oncogênicos, encurtamento telomérico também pode ativar essa via, a senescência se torna importante tanto para supressão tumoral quanto para o envelhecimento normal do corpo humano (Beausejour *et al.*, 2003; Collado *et al.*, 2005).

Mecanicamente, as principais reguladoras do ciclo celular são as ciclinas, as CDKs (quinases dependentes de ciclina) e as inibidoras das CDKs (CKIs), que formam complexos em sequências em cada fase do ciclo. Existem vários inibidores de CDKs e o controle da senescência considerado clássico e mais estudado segue por uma rede de proteínas envolvendo p53, p21, p16 e Rb, como mostrado na Figura 4 (Rufini *et al.*, 2013). A proteína do Retinoblastoma (pRb) exerce controle negativo no ciclo celular, pois mantém o E2F, um fator de transcrição fundamental para a progressão no ciclo, preso no citoplasma. Quando ocorrem estímulos mitóticos, Rb é fosforilada pela ação do complexo formado por diferentes ciclinas e CDKs e, assim, se desliga de E2F, permitindo a transcrição de genes envolvidos na síntese do DNA. A p16, por sua vez, gera uma cascata de ligações que culmina na inibição de CDK2, impedindo, assim, a fosforilação de Rb, e possibilitando a parada no ciclo (Sherr e Roberts, 1999; Baker *et al.*, 2011). Quanto à outra via, p21 é um dos alvos de transcrição de p53, e também atua inibindo a formação de complexos entre ciclinas e CDKs e, portanto, também acaba impedindo a fosforilação de Rb. No entanto, apenas essas duas proteínas não regulam sozinhas o ciclo celular, apesar de serem as mais estudadas. Outro exemplo da importância da ação de p53 é a transcrição do fator E2F7 que, apesar de ser da família do E2F, não permite a transcrição dos genes relacionados ao ciclo, mas reprime sua expressão ao se ligar no DNA (Mcconnell *et al.*, 1998; Cosme-Blanco *et al.*, 2007; Chandler e Peters, 2013).

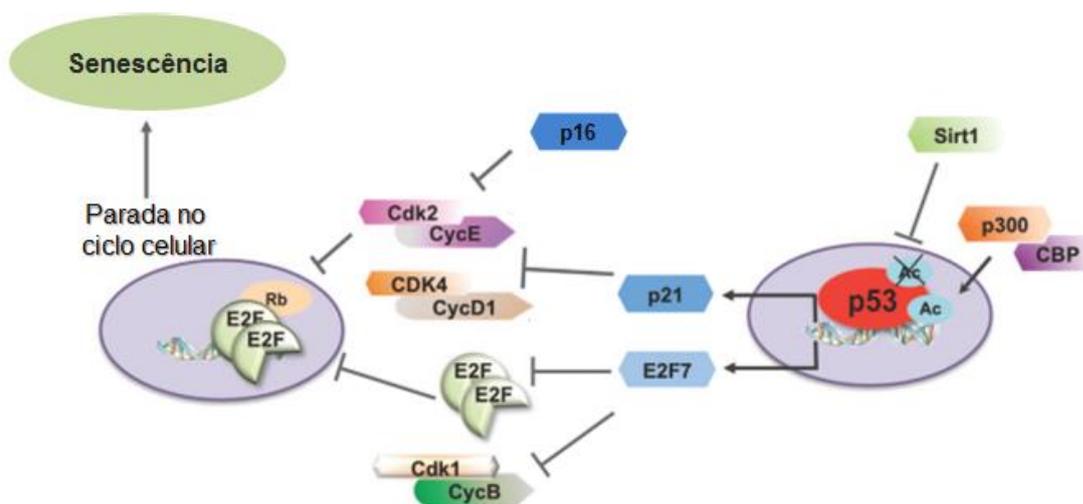


Figura 4. Regulação da senescência por p53. Ativação de p53 leva à transcrição de E2F7 e p21, inibidores de E2F, que transcreve genes do ciclo. p16

também tem papel importante na regulação da senescência por inibir o complexo ciclina E/CDK2, que impedem a ação negativa de Rb sobre E2F. **Adaptado de Ruffiniet al. (2013).**

2.5 P53 como reguladora de autofagia

Autofagia é um mecanismo fisiológico de degradação própria dos componentes celulares. O processo envolve a formação de vesículas de membrana dupla (os autofagossomos) que englobam proteínas ou organelas a serem degradados, e se fusionam aos lisossomos para a digestão e reciclagem desses componentes. Essa via supre a célula em um estado basal com aminoácidos e mantém as funções normais a célula ao degradar proteínas ou organelas danificadas. Além disso, o mecanismo funciona como adaptação a estresse, pois o fluxo autofágico é aumentado em resposta a diversos tipos de estímulos, incluindo privação de nutrientes, hipóxia e estresse oxidativo, permitindo a sobrevivência das células sob tais situações (Levine e Abrams, 2008; Marino *et al.*, 2014).

Por apresentar tais características, a autofagia tem um papel duplo no câncer, funcionando como supressor de dano tecidual, inflamação crônica e auxiliando no *turnover* de organelas, a autofagia impede o estabelecimento de um ambiente propício ao desenvolvimento de tumores. Diversas pistas sobre o papel antitumoral desse mecanismo se encontram na inativação ou mutação de proteínas dessa via, como, por exemplo, perda alélica do gene BECN1 (Beclin 1) em 40 a 75% dos cânceres de ovário, mama e próstata, ou como o acúmulo da proteína p62 em células com autofagia deficiente pode promover iniciação tumoral pancreática ou hepática (Yang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014). Do outro lado, a função pró-tumoral da autofagia ocorre pela sobrevivência metabólica das células tumorais. Uma vez que as células cancerígenas possuem altas taxas proliferativas, a autofagia auxilia na manutenção desses tumores, bem como na sua malignidade. Além disso, a adaptação a estresse pode funcionar como protetora em casos de quimioterapia e no ambiente hipóxico formado dentro da massa tumoral crescente (Morselli *et al.*, 2009; White *et al.*, 2015).

A autofagia pode ser iniciada quando a proteína AMPK (quinase ativada por AMP), conhecida como “sensora de energia”, é ativada devido à alta taxa AMP: ATP (estado de baixa energia) e fosforila a proteína ULK1 (UNC-51-like kinase 1) que, por sua vez, forma um complexo que fosforila Beclina-1 e VPS34, as quais darão início à formação de uma membrana de isolamento. A partir desse momento entram em ação outras proteínas ATGs, que coordenam toda a formação do autofagossomo. Durante esse processo ocorre a clivagem da proteína LC3 (light chain 3) e adição de fosfatidiletanolamina (PE) à LC3 para ancoragem na membrana do autofagossomo. O passo final do processo envolve a ligação e fusão ao lisossomo, realizado por proteínas SNARE (soluble NSF attachment receptor) like. O complexo mTORC1 (mammalian target of rapamycin) inibe a autofagia por fosforilar a ULK1 de forma a impedir sua fosforilação por AMPK (Figura 5). A proteína p62, ou SQSTM1 (sequestosome 1) tem papel importante na autofagia por se ligar à proteínas ubiquitinadas e também à LC3, endereçando os componentes celulares para dentro do autofagossomo e, portanto, sendo degradada ao longo do processo autofágico (Kim *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2013; Shaid *et al.*, 2013; Marino *et al.*, 2014).

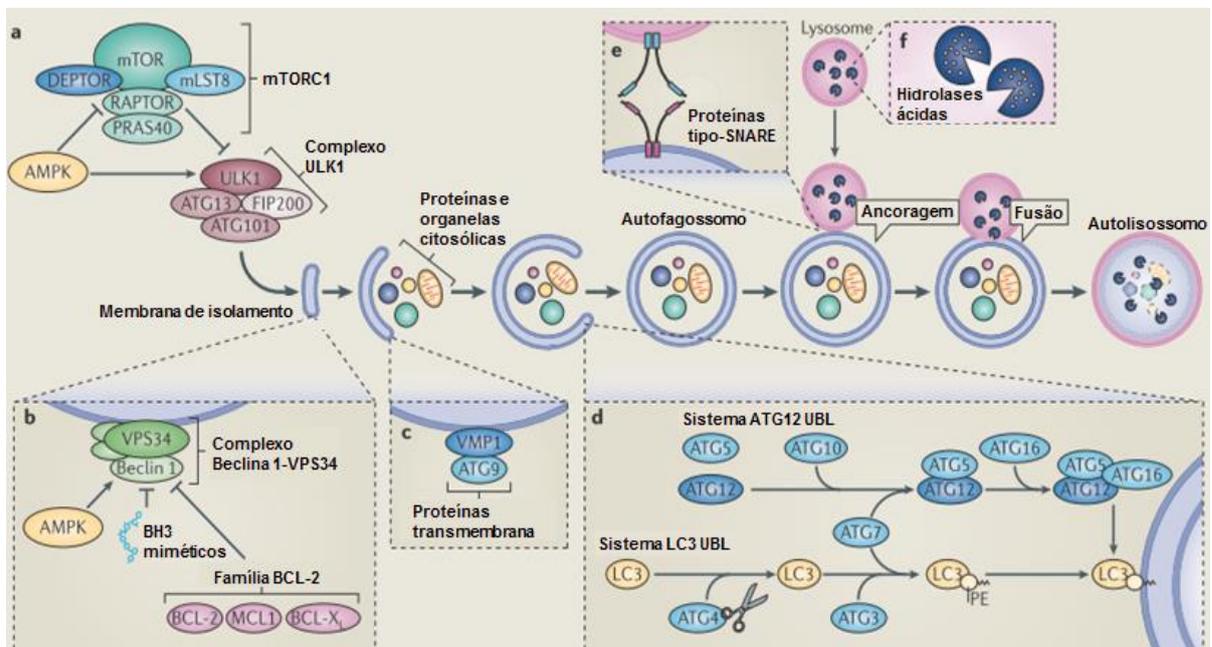


Figura 5. Via detalhada da autofagia. Em a: controle negativo da autofagia por mTORC1 e indução da via pelo complexo ULK1, que envolve desde a formação

do autofagossomo até a fusão com o lisossomo. Em b: complexo que gera a membrana de isolamento. Em c: complexo que dá sequência a formação do autofagossomo. Em d: proteínas ATGs que ligam LC3 à membrana para formação do autofagossomo. Em e: ancoragem do lisossomo ao autofagossomo por proteínas tipo SNARE. Em f: hidrolases ácidas no interior do lisossomo que realizam a digestão dos componentes celulares. **Adaptado de Mariño et al. (2014).**

Quanto à p53, seu papel é condicionado à sua localização subcelular (Maiuri *et al.*, 2010). Ao estar presente no núcleo e funcionar como fator de transcrição, p53 induz a transcrição de vários genes relacionados à autofagia. Por exemplo, as subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ de AMPK são transativadas por p53, que também aumenta expressão dos genes sestrina 1 e sestrina 2, que são ativadores da AMPK (Riley *et al.*, 2008; Kenzelmann Broz *et al.*, 2013). Por outro lado, quando presente no citoplasma, p53 bloqueia a autofagia, uma vez que esse processo é muito aumentado quando ocorre a deleção do sinal de exportação nuclear de p53 ou em células anucleadas (Morselli *et al.*, 2008; Tasdemir *et al.*, 2008).

Além disso, p53 vem cada dia sendo mais associada a metabolismo e funções mitocondriais. Por exemplo, privação de nutrientes leva a desregulação na via AKT-mTOR e aumento na expressão de AMPK, que leva ao aumento da expressão de p53. Também ADP e ATP podem diretamente modular a habilidade de p53 se ligar ao DNA, com ADP promovendo e ATP inibindo essa interação (Okorokov e Milner, 1999; Horn e Vousden, 2007; Jones *et al.*, 2005). Em relação também a funções mitocondriais, além da função clássica na desregulação da membrana mitocondrial durante o processo de apoptose, vem sendo dado destaque para habilidade de p53 em inibir a expressão dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 e estimular a expressão da citocromo c oxidase 2, causando redução no fluxo da via glicolítica e aumento na fosforilação oxidativa (Vousden e Ryan, 2009; Galluzzi *et al.*, 2011).

3. Mutação R337H em TP53 e suas propriedades

Em 2001, Ribeiro *et al* detectaram a troca de uma arginina por uma histidina no códon 337 em 35 crianças com ADR em Curitiba, no Brasil. Nesse estudo os autores descartaram a hipótese de um efeito fundador, pois a análise de polimorfismos nesses pacientes mostrou marcadores muito diferentes entre eles (Ribeiro *et al.*, 2001). No entanto, estudos posteriores mostram que existe um efeito fundador para essa mutação, encontrando um haplótipo ancestral comum de origem Caucasiana/Portuguesa aos indivíduos analisados, e fatores históricos contribuíram para que essa mutação com penetrância relativamente baixa fosse mantida numa população ampla Brasileira (Garritano *et al.*, 2010; Paskulin *et al.*, 2015). Além disso, enquanto mutações em TP53 ocorrem em cerca 0,02% da população mundial, é estimado que a mutação R337H se encontre em torno de 0,3% da população do Sul do Brasil, contrastando fortemente com as taxas a nível mundial (Lalloo *et al.*, 2003; Achatz *et al.*, 2007; Palmero *et al.*, 2008).

Por ser uma mutação localizada no domínio de oligomerização de p53, ocorreu a suposição de que p53 não seria capaz de formar tetrâmeros e que todas suas funções como supressora tumoral seriam afetadas. Assim, Ribeiro e colaboradores fizeram um ensaio de promotor-reporter, e constataram que p53-R337H ativou o promotor tanto quanto p53 selvagem, enquanto que outra mutação testada, R248W, que afeta o domínio de ligação ao DNA de p53, se manteve inativa. Além disso, superexpressão por microinjeção de p53-R337H em uma linhagem sem p53 endógena foi capaz de suprimir crescimento de colônias e de induzir apoptose tanto quanto p53 selvagem (Ribeiro *et al.*, 2001). Além disso, a Arginina da posição 337 normalmente participa da ponte de sal formada entre os monômeros de p53 para a estabilização da formação dos dímeros da proteína, mas foi demonstrado que a Histidina perturba essa interação iônica e desestabiliza a proteína de maneira dependente ao pH. Então, em pH fisiológico cerca de 20% das proteínas estão desnaturadas a 37 °C, demonstrando a importância da troca desses aminoácidos para a estabilização dos dímeros de p53 (Digiammarino *et al.*, 2002).

Por fim, além desses parâmetros celulares estudados, é limitada a quantidade de informação relacionada aos aspectos funcionais dessa mutação. A

mutação R337H em TP53 predispõe a um amplo espectro de tumores, semelhante a outras mutações associadas à LFS, mas a frequência de carcinomas adrenocorticais pode chegar a ser duas vezes maior em portadores dessa mutação (Achatz *et al.*, 2007; Borges e Ayres, 2015). Portanto, devido à alta frequência dessa mutação no sul do Brasil e a chance aumentada de desenvolvimento de tumor pelos pacientes, torna-se importante não só a pesquisa clínica, mas também a pesquisa básica para melhor compreensão dos aspectos de biologia celular afetados pela mutação R337H.

Objetivos

1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo estudar parâmetros de senescência e autofagia em cultura de fibroblastos de pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni, visando trazer mais informações sobre os aspectos de biologia celular das mutações em TP53. Essas informações são importantes não somente para elucidar como diferentes mutações podem afetar as diferentes vias em que p53 atua, mas também para buscar mais entendimento sobre mecanismos de carcinogênese associados à síndrome.

2. Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de proliferação celular de culturas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni em comparação com um indivíduo controle
- Avaliar a resposta do mecanismo de autofagia frente ao tratamento com indutor Rapamicina em culturas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni em comparação com um indivíduo controle
- Avaliar tanto o estado de senescência basal (o qual ocorre naturalmente após as passagens em cultura) quanto o estado de senescência induzida por stress em culturas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni em comparação com um indivíduo controle
- Avaliar se a população mitocondrial é alterada em estado basal ou sob tratamentos quimioterápicos em culturas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni em comparação com um indivíduo controle
- Avaliar se a função mitocondrial é afetada em estado basal ou sob tratamentos quimioterápicos em culturas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni em comparação com um indivíduo controle
- Avaliar a localização subcelular de p53 após ativação de autofagia ou de senescência em culturas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni em comparação com um indivíduo controle

Resultados e metodologia em formato de Artigo Científico

**ROLE OF R337H TP53 MUTATION FROM LI-FRAUMENI PATIENTS IN
AUTOPHAGY, SENESENCE AND MITOCHONDRIAL FUNCTION**

(Formatado para submissão no periódico BMC Cancer)

Role of R337H TP53 mutation from Li-Fraumeni patients in autophagy, senescence and mitochondrial function

Michele Oliveira Hütten¹, Mardja Manssur Bueno e Silva¹, Emily Schlee Villodre¹, Franciele Cristina Kipper¹, Patricia Ashton-Prolla³ and Guido Lenz^{1, 2*}

1. Abstract

Background: Li-Fraumeni (LFS) and Li-Fraumeni Like (LFL) syndromes are hereditary cancer predisposition syndromes frequently associated with germline mutation in TP53. Due to the importance of the protein p53 and its regulation of several important cellular processes, impairment in some pathways can be implicated. Here we discuss the impact of p.R337H TP53 mutation on proliferation, senescence, autophagy, mitochondrial population and functionality.

Methods: Growth rates were assayed with Population Doubling assay. Senescence and autophagy were assessed through flow cytometry and functionality and total population of mitochondria were also analyzed through flow cytometry.

Results: Mutated cells proliferated more than control cells. TP53 mutated cells didn't build up autophagy under Rapamycin treatment nor senescence under Doxorubicin or Cisplatin treatments and showed more mitochondrial mass, but no alterations in mitochondrial functionality after Doxorubicin treatment.

Conclusion: data suggests that p.R337H TP53 mutation affect senescence induction by p53 and pro-autophagic actions of p53. Mutated cells proliferate more than control cells and exhibited larger mitochondrial mass without effects in their functionality in response to Doxorubicin treatment.

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, TP53, p53, senescence, autophagy.

*Correspondence: lenz@ufrgs.br

¹ Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431 – Lab. 107, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

² Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

³ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

2. Background

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a familial cancer predisposition syndrome, which is inherited in an autosomal dominant manner [1]. There is increased risk to a series of cancers in LFS patients, the most common being soft tissue sarcomas, osteosarcomas, breast cancer, central nervous system (CNS) cancers, leukemia and adrenocortical carcinoma (ACC) [1, 2]. In contrast with the general population, that has only 1% of chance to develop a tumor until the age of 40 years, at least 50% of LFS carriers will develop cancer until this age [3]. The molecular mechanism behind this disorder is not yet fully understood, but germline mutations in TP53 gene occur in up to 70% of families with the syndrome [4, 5].

The protein encoded by TP53, p53, is a tumor suppressor protein of 53 kDa that regulates several cellular processes and is mutated in at least 50% of all known cancers [6, 7]. It acts primarily as a transcription factor, and it responds to several stress signals, such as hypoxia, oncogenic activation, DNA damage and telomere shortening. The actions of this protein depends of the microenvironment the cell, on the nature and the intensity of the signal, and among the mechanisms

controlled by p53 are cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair and autophagy [8, 9].

The most frequent TP53 germline mutations associated with Li-Fraumeni syndrome are single nucleotide missense substitutions. In overthousands of mutations catalogued in TP53 the most common region affected is the region responsible for p53 binding to DNA [7]. Two reported hotspot mutations less commonly found in sporadic tumors are in codon 152, which affects DNA binding domain of p53, and codon 337, which affects the oligomerization domain, but they may have less functional impact than other mutations. Although the prevalence of Li-Fraumeni syndrome is not fully established, germline mutations in p53 are estimated to happen in 0.02% of the population worldwide [10]. Interestingly, the mutation p.R337H that has been initially reported in Brazilian children with ACC with documented familial history of other cancers and later discovered to be present in 0.3% of the general population in Southern Brazil, in a serious contrast with worldwide rates [11, 12].

Since p53 is a key protein in stress response, the pathways it controls have been exhaustively investigated since its discovery, but there is yet much information to uncover. Even though there is much of information on molecular epidemiology and phenotypic presentation of several common TP53 germline mutations [4], the information on functional molecular and cellular aspects of some mutations is still very limited. It was shown that mutant R337H p53 can accumulate in nuclei of ACC tumor cells, and it can maintain pro-apoptotic roles when overexpressed by microinjection in lineages lacking endogenous p53 [13].

Moreover, this change of arginine to histidine disrupts salt bridges between dimers of p53 in a pH dependent manner [14].

Here we present information on to what extent of p53 functions the p.R337H mutation affect. To better understand molecular cell biology of Li-Fraumeni Syndrome, we evaluated growth rates, basal and induced senescence, basal and induced autophagy, function and total population of mitochondria under different types of stress in fibroblasts obtained from patients with p.R337h mutations in TP53 in comparison with a control patient without any mutation in TP53.

3. Methods

Reagents

Doxorubicin, Cisplatin and the fluorescent dye acridine orange (AO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). JC-1, C₁₂FDG β -galactosidase substrate and Mitotracker were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Doxorubicin were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Acros Organics, NJ, USA) and Cisplatin and AO were dissolved in water. All culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

Cell Culture

Fibroblasts obtained from forearm biopsy of patients with R337H heterozygous (hereafter named p53 +/-) and homozygous (hereafter named p53 -/-) mutations and control fibroblasts obtained from belly biopsy from individual without any identified mutation in TP53 (hereafter named Control) were cultured in DMEM High Glucose supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 1%

penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (HCPA-GPPG) under protocol number 13-0019. All participants signed informed consent. Germline TP53 testing was done according to standard protocols (http://www-p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf).

Cumulative Population Doubling assay

Cells from patients and from control individual were plated in the density of 1×10^4 cells per well in a 24-wells plate and were counted in flow cytometer GUAVA EasyCyte using GUAVA software ExpressPro (Guava Technologies, Hayward, CA) and re-plated in days 3, 7 and 9. Using the formula $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$, where $N(t)$ is the number counted in given day and $N(t_0)$ is the initial amount plated, the PD (population doubling) is estimated and plotted in a graph showing cumulative values of PD (CPD).

Autophagy assay

Acidic vacuolar organelles (AVOs) quantification: acridine orange (AO) is a marker of AVOs that fluoresces green in the whole cell except in acidic compartments (mainly late autophagosomes), where it fluoresces red. Cells were plated at 1.5×10^4 cells per well in a 24-wells plate, followed by treatment with Rapamycin 200 nM for 24h. After this, cells were incubated with 1 mg/mL of AO for 15 min at room temperature. To quantify the percentage of cells with AVOs (i.e. red marked cells), treated cells were detached from the plate, marked with AO as cited above

and analyzed by flow cytometry, using a flow cytometer GUAVA EasyCyte and GUAVA software ExpressPro (Guava Technologies, Hayward, CA).

SA-beta-gal assay

For senescence measurement, a total of 1×10^4 cells were plated in a 24-wells plate and treated with Doxorubicin 10 nM or Cisplatin 3 μ M for 48h, followed by medium replacement. Seven days later, cells were washed twice with PBS, and incubated with 33 μ M of C₁₂FDG (5-Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galactopyranoside), a fluorogenic substrate of β -galactosidase, diluted in DMEM for 2h at 37°C. Then, cells were detached from plate and green fluorescence were evaluated using a flow cytometer GUAVA EasyCyte and GUAVA software ExpressPro (Guava Technologies, Hayward, CA) and results are presented as percentage of SA- β -gal-positive (green) cells.

Mitochondrial mass and functionality assay

Determination of Mitochondrial Mass: MitoTracker Green FM is green-fluorescent mitochondrial stain which appears to localize to mitochondria regardless of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m). A total of 1.5×10^4 cells were plated in a 24-wells plate and treated with Doxorubicin 10 nM or Cisplatin 3 μ M for 48h, followed by medium replacement. Seven days later, cells were washed twice with PBS, centrifuged at 1200g for 5min and marked with Mitotracker 200 nM diluted in DMEM for 30 min at 37°C. Then, cells were again centrifuged and re-suspended in PBS, followed for analysis in a GUAVA EasyCyte flow cytometer using GUAVA software ExpressPro (Guava Technologies, Hayward, CA).

Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\psi_m$) Determination: JC-1 can correlate mitochondrial membrane potential, a fundamentally important determinant of cell function and health. JC-1 emits a green fluorescence (490 nm excitation/530 nm emission) in depolarized mitochondrial membrane potentials. At normal and hyperpolarized $\Delta\psi$, JC-1 is concentrated inside mitochondria and forms aggregates, which shift the emission from 530 to 590 nm, increasing red fluorescence emission. For mitochondrial functionality evaluation, a total of 1.5×10^4 cells were plated in a 24-well plate and treated with Doxorubicin 10nM or Cisplatin 3 μ M for 48h, followed by medium replacement. Seven days later, cells were washed twice with PBS, centrifuged at 1200 g for 5 min and marked with JC-1 2 μ M diluted in DMEM for 30 min at 37°C. Then, cells were again centrifuged and re-suspended in PBS, followed for analysis in a GUAVA EasyCyte flow cytometer using GUAVA software ExpressPro (Guava Technologies, Hayward, CA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Tukey post-hoc test to compare all group samples on the experiments. 'p' value under 0.05 was considered significant. Analyses were performed using the Graph Pad InStat software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Results

Growth rates of Control fibroblasts and TP53 mutated fibroblasts

Since p53 is a protein that regulates several anti-proliferative processes, it becomes interesting to test if R337H TP53 mutations affect proliferation. Comparing slopes of control, p53 +/- and p53 -/- there were statistical significant

difference between growth rates of control and mutated fibroblasts (Figure 1), p.R337H TP53 mutated fibroblasts duplicate at least 1.4 times the amount of control in the same period of days.

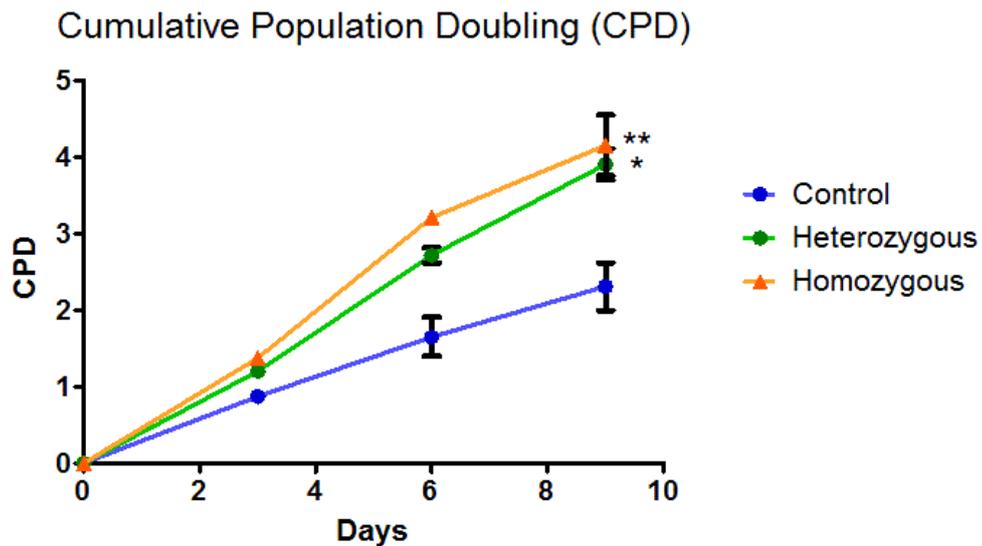


Figure 1 Growth rates of Control Fibroblasts and TP53 mutated fibroblasts.

Cells were plated in day 0, counted and re-plated in days 3, 7 and 9. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in comparison of slope of Control cells versus slopes of p53 +/- and p53 -/- cells. N = 2, two replicates each.

p.R337H TP53 mutation affects autophagy induction by rapamycin

Autophagy has become a central process in cancer biology and the role of p53 in controlling autophagy depends on its localization. If, by one side, p53 can induce autophagy through its action in nuclei as a transcription factor, it can also repress autophagy if present in the cytoplasm [15, 16]. In order to know which of these actions is affected by the R337H mutation, cells were tested to analyze their basal autophagy state and the activation of this process through Rapamycin treatment.

Control and mutated fibroblasts did not differ in the basal proportion of cells considered autophagic. However, when cells are treated with Rapamycin (Rapa), while Control cells display a large activation of autophagy, p53 +/- cells shows less, but also significant induction and p53 -/- couldn't respond in the same way, suggesting that pro-autophagic roles of p53 can be affected by p.R337H mutation (Figure 2 and Figure S1).

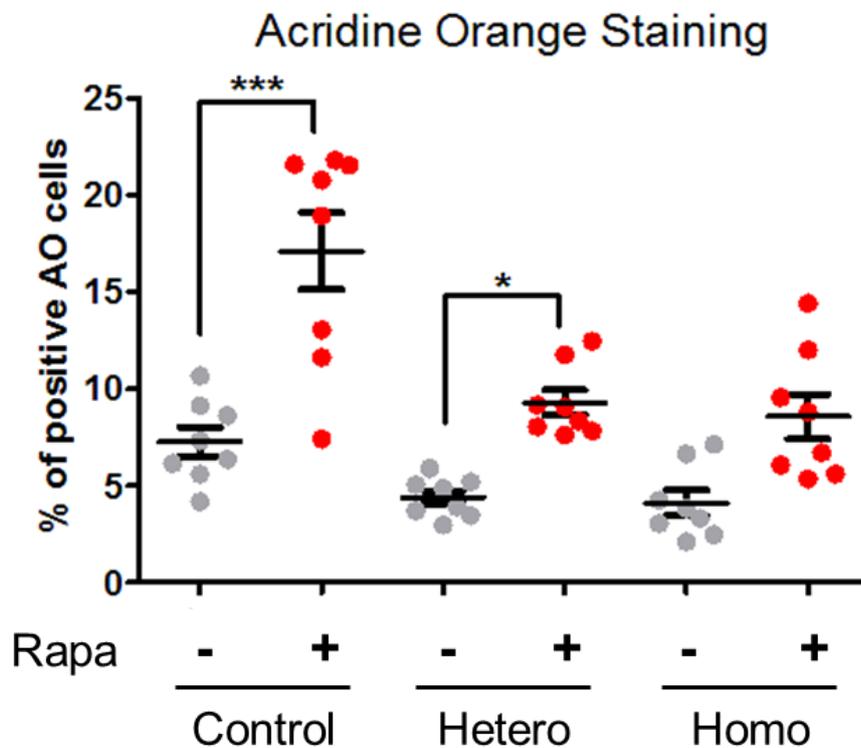


Figure 2 p.R337H TP53 mutation can impair autophagy roles of p53. Cells were treated for 24h with Rapamycin 200 nM. Graph shows percentage of red marked cells. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ in relation to non-treated groups as indicated. N = 4, two replicates each.

p.R337H TP53 mutation protects fibroblasts against stress-induced premature senescence

Doxorubicin and Cisplatin, two drugs widely used in many types of cancer, can cause cell death through apoptosis, but in low doses they can induce cells to undergo senescence [17, 18]. In this context, Control and TP53 mutated cultures were treated with Doxorubicin (Dox) 10 nM and Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h and analyzed 7 days after drug removal. A well accepted marker for senescence is the enzyme β -galactosidase, also called senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) [19]. There was no strong activation of senescence in any of the cultures (Figure 3 and Figure S2). However, in basal conditions there were significant less senescent cells in p.R337H p53 +/- than in Control. Also, surprisingly comparing groups of different cells with the same treatment, the percentage of senescence in mutated cultures treated with both drugs is significantly lower than in Control cells in the same condition, suggesting that the presence of inappropriate protein p53 protects cells against stress-induced premature senescence (Figure 3 and Figure S2).

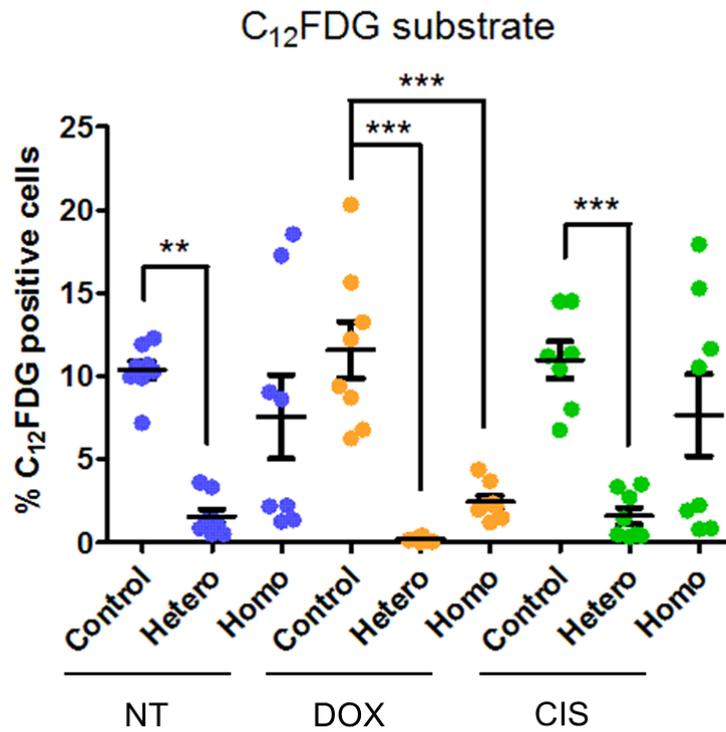


Figure 3 p.R337H TP53 mutation protects fibroblasts against stress-induced premature senescence. Cells were treated with Doxorubicin (Dox) 10nM or Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h. Seven days after drug removal, C₁₂FDG, a fluorogenic substrate of senescence associated β -galactosidase, were added for 2h. Graph shows percentage of green marked cells (C₁₂FDG positive) or cells with active β -galactosidase. ** p<0.01 in relation to non-treated Control cells. ### p<0.001 in relation to Dox treated Control cells. aa p<0.01 and aaa p<0.001 in relation to Cis treated Control cells. N=4, two replicates each.

Total mitochondrial population in Control and mutated fibroblasts before and after Doxorubicin and Cisplatin treatments

Several recent studies show that p53 can regulate either pro- or anti-oxidant factors, switching cells between glycolysis and aerobic respiration and balance

vital and lethal functions of mitochondria [20-22]. Moreover, increased mitochondrial network is known to be a trait of senescent cells [23]. The cultures were analyzed under Cisplatin and Doxorubicin treatment conditions using mitochondrial marker MitoTracker Green FM. Surprisingly, even though there were less senescent cells in Dox treated p53 $-/-$ and p53 $+/-$ cultures than in non-treated ones, there was an increase in mitochondria quantity after this treatment for all groups of cells (Figure 4 and Figure S3).

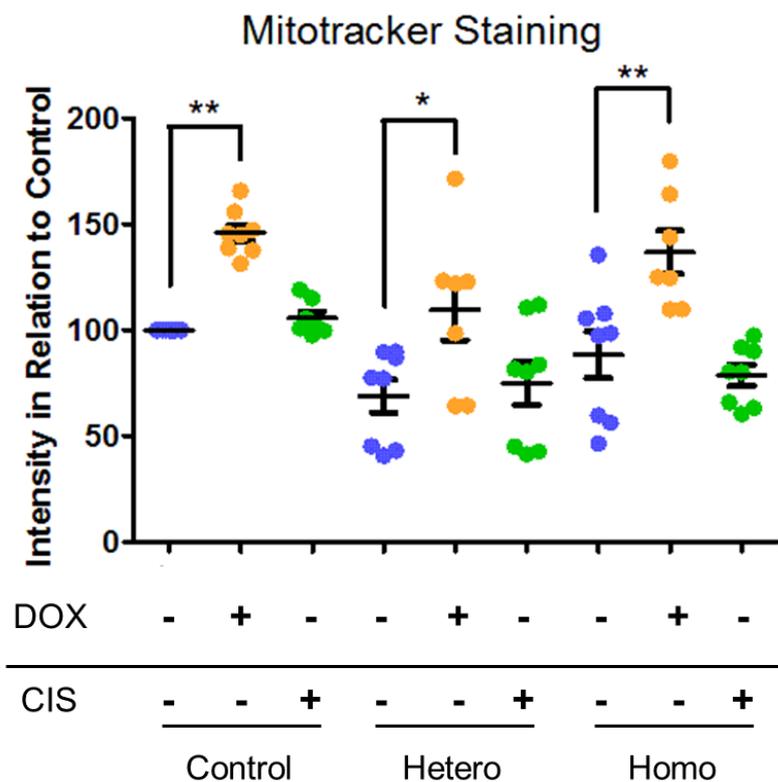


Figure 4 Increased total numbers of mitochondria in Doxorubicin treated p.R337H TP53 mutated cells. Cells were treated with Doxorubicin (Dox) 10nM or Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h. Seven days after drug removal, cells were marked for 30 min with MitoTracker Green FM, a fluorescent mitochondrial stain. Graph shows

intensity of green in relation to Control non-treated cells. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in relation to indicated non-treated groups. N = 4, two replicates each.

Functionality of mitochondria in Control and mutated fibroblasts before and after Doxorubicin and Cisplatin treatments

Polarized mitochondria are healthy, while depolarization reflects low functionality, especially after apoptotic stimuli that destabilize mitochondrial outer membrane [24]. Knowing total mass of mitochondria is not necessarily related to mitochondrial function, JC-1 was used to measure mitochondria functionality. JC-1 emits green fluorescence in depolarized mitochondria, but it forms aggregates that fluoresce red in hyperpolarized or normal mitochondria. Cells were treated for 48h with Doxorubicin or Cisplatin and were analyzed seven days after drug removal. The ratio of intensity of Red per Green was considered as indicator of mitochondrial functionality, and there were no difference between any groups of cells (Figure 5), showing that even though total mass of mitochondria was increased in control and mutated cells after Dox treatments, their functionality was not affected.

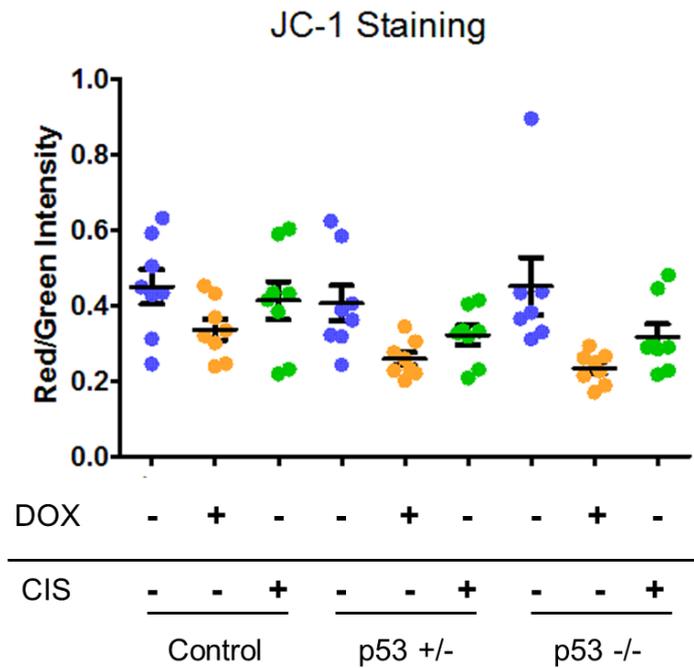


Figure 5 Functionality of mitochondria in Control and p.R337H mutated fibroblasts before and after Doxorubicin and Cisplatin treatments. Cells were treated with Doxorubicin (Dox) 10nM or Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h. Seven days after rug removal, cells were marked for 30 min with JC-1, a fluorescent dye that can correlate to mitochondrial functionality. Graph shows ratio of red intensity for green intensity. N = 4, two replicates each.

5. Discussion

Protein p53 is a widely studied protein because of its multiple features. It is known as “the guardian of the genome” and, in response to a variety of signals, such as oncogenic activation or DNA damage, it controls, for example, apoptosis, senescence and autophagy [8, 9, 25-27]. Since every mutation has its own functionality [7, 28-31], and knowing that germline TP53 p.R337H mutation predispose to a variety of cancers [12, 32], it is reasonable to hypothesize that many cellular functions could be impaired. Indeed, mutated p.R337H Homozygous

and Heterozygous cells duplicated significantly more than Control, showing that anti-proliferative roles of p53 is affected by this mutation. This is a very important biological feature, especially because the more a cell proliferates, more chances it gets to develop a new mutation to guide it towards tumorigenesis [33-35]. And this becomes even more concerning since p53 is not fully functional to repair an occasional DNA damage or to stop these cells from cycling after the damage is done [30, 34, 36].

One of the newly studied roles of p53 involves autophagy pathways. This protein has a dual role in this process, since it can either activate autophagy through transcription of diverse proteins that modulate this pathway, or it can repress this mechanism when present in the cytoplasm by somewhat unstudied signalization [15, 16]. In this context, one or both functions of p53 could be impaired by p.R337H mutation. When cells were treated with Rapamycin, p53 +/- cells induced autophagy, although less than Control cells, and this was not seen in p53 -/- cells, showing that pro-autophagic roles of p53 are affected by this mutation. Furthermore, since autophagy has a dual role in cancer by preventing tumorigenesis or helping tumor maintenance [37], this mechanism should be better studied to help understanding the association of this process with tumorigenesis in these cells, and more importantly if the lack of autophagy could be beneficial to patients after they have an established tumor, since this tumor cannot be maintained by autophagy.

Lastly, cells were analyzed after Doxorubicin and Cisplatin treatments, two widespread drugs used in various tumor types, to better understand the impact of the R337H mutation in chemotherapy-induced senescence and alterations in

mitochondrial function [18, 24, 38]. None of the treatments caused a significant amount of senescence in mutated or non-mutated cultures. Nevertheless, both p53 +/- and p53 -/- cells had a low percentage of senescent cells after Dox treatment compared to Control cells in the same condition, suggesting that p.R337H mutation can disturb p53 senescence induction.

Mitochondrial function is closely related to p53, since destabilization of the outer membrane of this organelle is the most prominent feature of intrinsic apoptotic pathway [21]. However, several new studies have been implicating p53 to metabolism and vital functions of mitochondria, involving its ability to control the switch between aerobic respiration and glycolysis, and even on helping the maintenance of mitochondrial genome [20, 22]. After Dox treatment both mutated cells exhibited a higher population of mitochondria compared to their non-treated pairs. Moreover, regardless this increase in mitochondrial mass, there were no alteration in mitochondrial functionality in any of the analyzed groups. Interestingly, though, is that even if there were no difference between intensity ratios of Red per Green in these groups, there were a different distribution of population in flow cytometry graphs (Figure S4), showing different phenotypes of cells in basal state and under different treatments. With this data it becomes interesting to test if autophagy is also impaired during Dox or Cis treatments, since this is a process that helps destroying mitochondrion.

6. Conclusion

Taken together, this data suggests that p.R337H TP53 mutation affect some, but not all roles of p53. Mutated fibroblasts showed increased proliferation rates, lower autophagy and senescence activation, and accumulation of less functional

mitochondria than non-treated pairs under Dox treatment. Learning what functions of p53 are affected germline TP53 mutations can, in the future, help a better management of Li-Fraumeni syndrome patients

7. Additional files

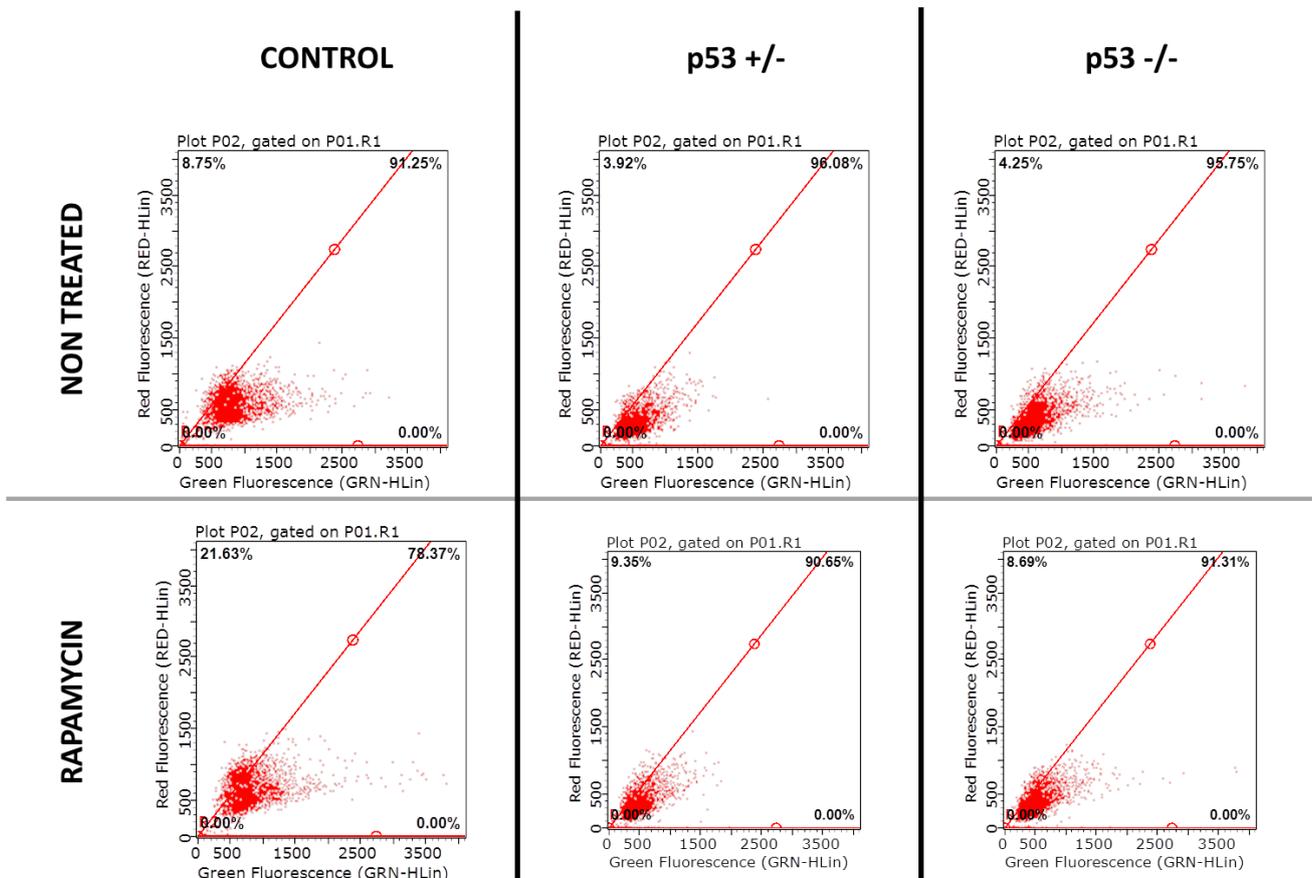


Figure S1 p.R337H TP53 mutation can impair autophagy roles of p53. Cells were treated with Rapamycin 200nM for 24h. Representative flow cytometry graphs showing differences between mutated and control fibroblasts in basal conditions and under Rapa treatment. Cells that passed the established threshold of red were counted as AO positive. N = 4, two replicates each.

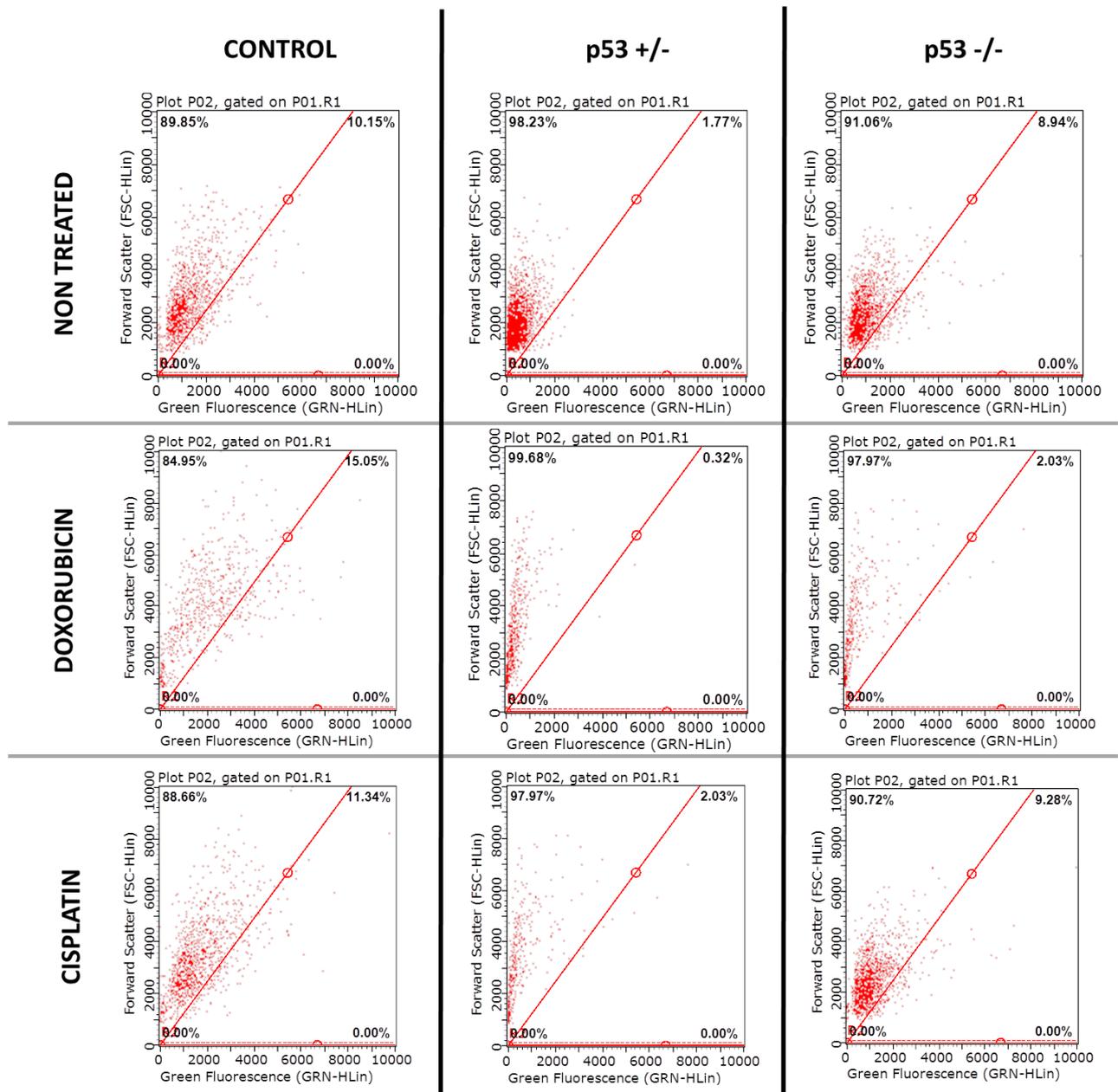


Figure S2 p.R337H TP53 mutation protects fibroblasts against stress-induced premature senescence. Cells were treated with Doxorubicin (Dox) 10 nM or Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h. Seven days after drug removal, C₁₂FDG, a fluorogenic substrate of senescence associated β -galactosidase, were added for 2h. Representative flow cytometry graphs showing differences between mutated and Control cells under different treatments. Cells that passed the established green threshold were considered senescent. N = 4, two replicates each.

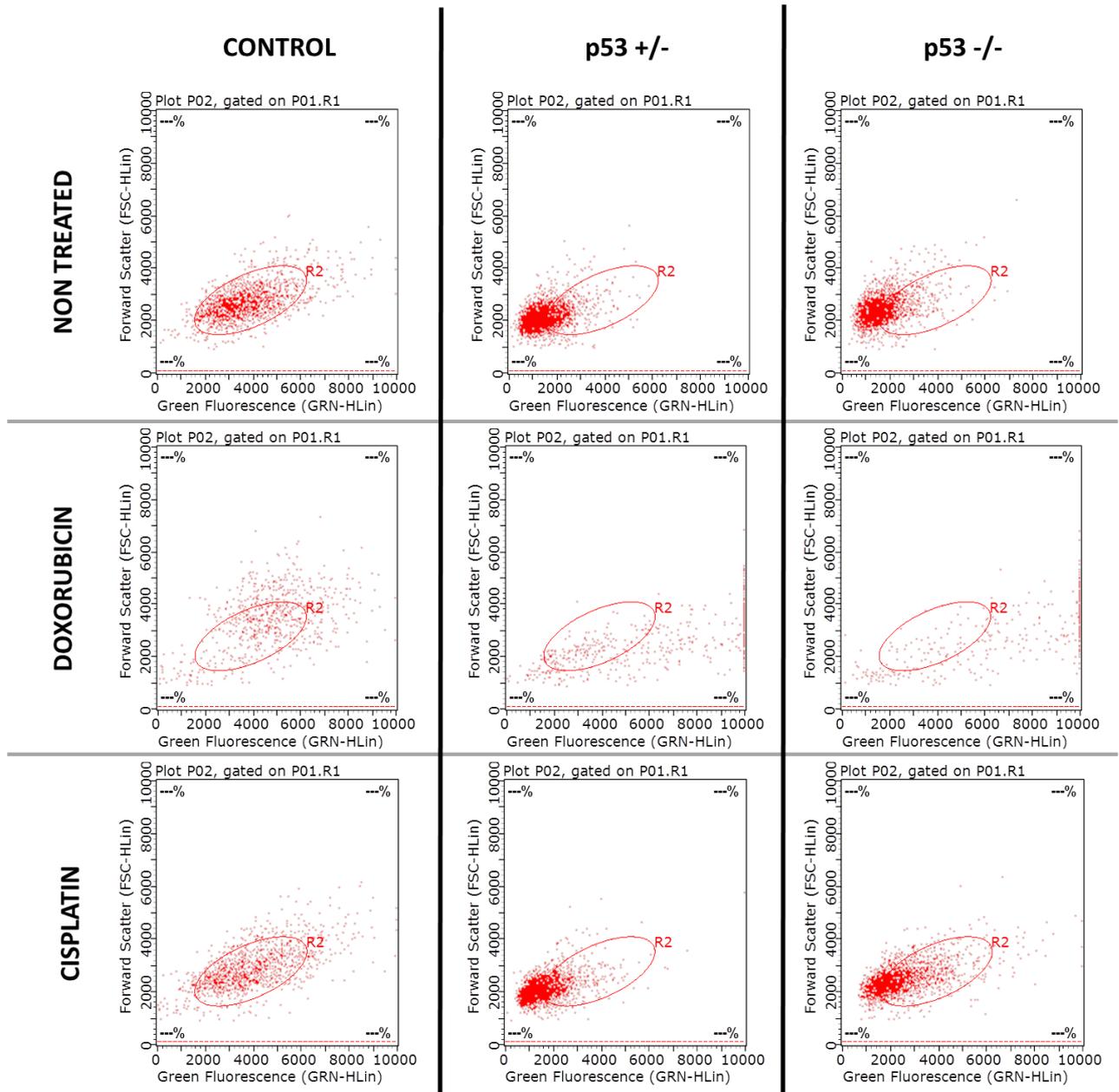


Figure S3 Increased total numbers of mitochondria in Doxorubicin treated p.R337H TP53 mutated cells. Cells were treated with Doxorubicin (Dox) 10 nM or Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h. Seven days after drug removal, cells were marked for 30 min with MitoTracker Green FM, a fluorescent mitochondrial stain. The intensity of green was counted to represent mitochondrial mass. Figure shows representative flow cytometry graphs with arbitrary gates to show different

localization of populations according to treatments and genotype. N = 4, two replicates each.

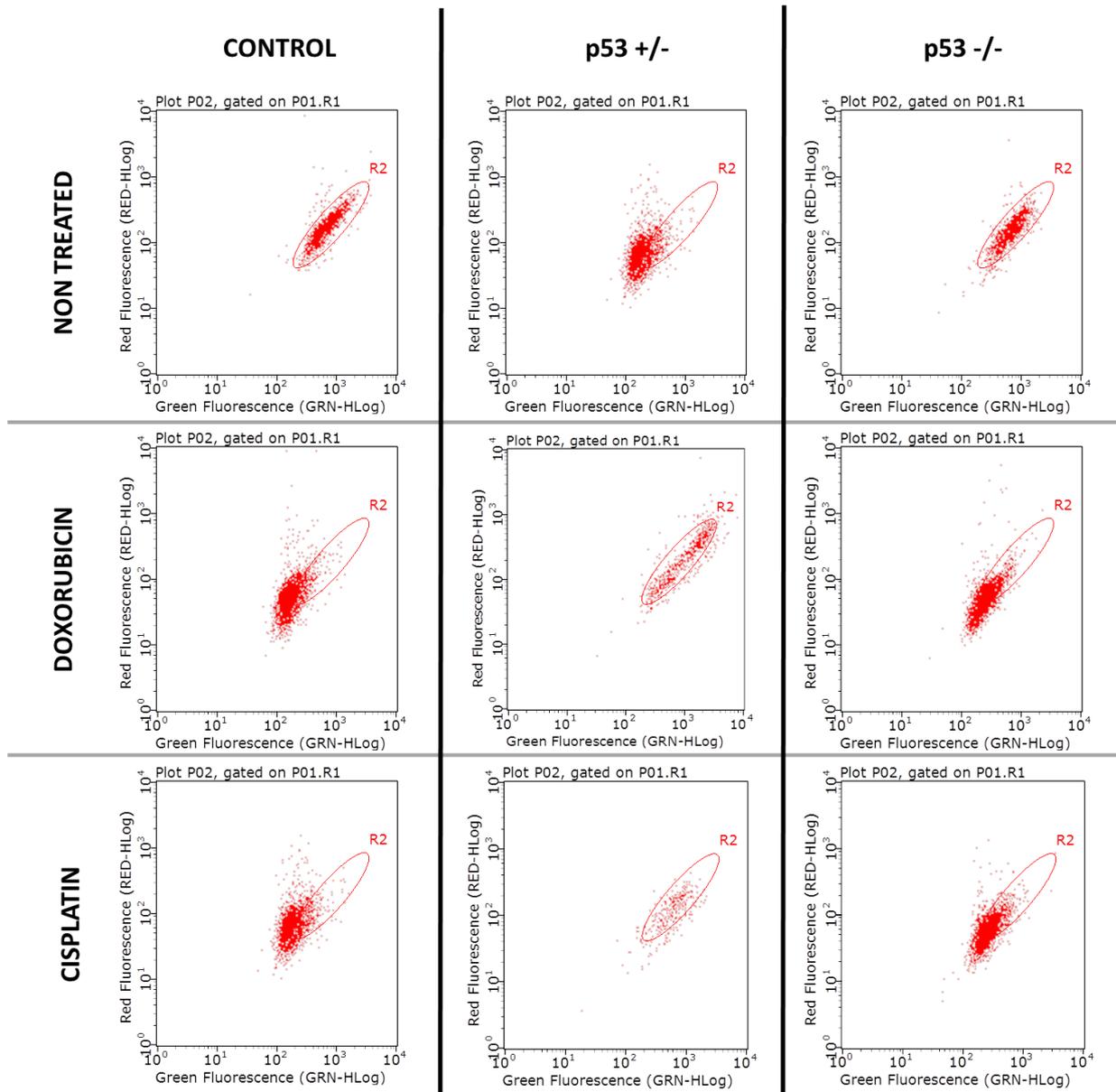


Figure S4 Functionality of mitochondria in Control and p.R337H mutated fibroblasts before and after Doxorubicin and Cisplatin treatments. Cells were treated with Doxorubicin (Dox) 10 nM or Cisplatin (Cis) 3 μ M for 48h. Seven days after rug removal, cells were marked for 30 min with JC-1, a fluorescent dye that can correlate to mitochondrial functionality. Figure shows representative flow

cytometry graphs with arbitrary gates to show different localization of populations according to treatments and genotype. N = 4, two replicates each..

Abbreviations

LFS: Li-Fraumeni syndrome; LFL: Li-Fraumeni Like; CNS: central nervous system; ACC: adrenocortical carcinoma; AVOS: Acidic vacuolar organelles; AO: Acridine Orange; CPD: cumulative population doubling; Dox: Doxorubicin; Cis: Cisplatin.

Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Authors Contribution

MOH planned and performed the majority of experiments and wrote the manuscript. MMBS, ESV, FCK participated and contributed to design of several of the experiments. PAP contributed with patient fibroblasts biopsies and supervised the study. GL supervised the study and wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology).

8. References

1. Li FP, Fraumeni JF, Jr.: **Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome.** *Journal of the National Cancer Institute* 1969, **43**(6):1365-1373.

2. Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW: **A cancer family syndrome in twenty-four kindreds.** *Cancer research* 1988, **48**(18):5358-5362.
3. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA *et al*: **Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.** *Science* 1990, **250**(4985):1233-1238.
4. Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DG, Harris M, Tricker KJ, Varley JM: **Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome.** *Oncogene* 1998, **17**(9):1061-1068.
5. Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF, Dreyfus MG, Fraumeni JF, Jr., Li FP: **Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome.** *Cancer research* 1991, **51**(22):6094-6097.
6. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P *et al*: **Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types.** *Nature* 1989, **342**(6250):705-708.
7. Hainaut P, Hollstein M: **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** *Advances in cancer research* 2000, **77**:81-137.
8. Oren M: **Decision making by p53: life, death and cancer.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(4):431-442.
9. Vousden KH, Prives C: **Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53.** *Cell* 2009, **137**(3):413-431.
10. Lalloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, Evans DG, Early Onset Breast Cancer Study G: **Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history.** *Lancet* 2003, **361**(9363):1101-1102.
11. Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP *et al*: **Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil.** *Cancer letters* 2008, **261**(1):21-25.
12. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR *et al*: **The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families.** *Cancer letters* 2007, **245**(1-2):96-102.
13. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G *et al*: **An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(16):9330-9335.
14. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW: **A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer.** *Nature structural biology* 2002, **9**(1):12-16.

15. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G: **Autophagy regulation by p53**. *Current opinion in cell biology* 2010, **22**(2):181-185.
16. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F *et al*: **Regulation of autophagy by cytoplasmic p53**. *Nature cell biology* 2008, **10**(6):676-687.
17. Lafkas D, Trimis G, Papavassiliou AG, Kiaris H: **P53 mutations in stromal fibroblasts sensitize tumors against chemotherapy**. *International journal of cancer* 2008, **123**(4):967-971.
18. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB: **A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents**. *Cancer research* 1999, **59**(15):3761-3767.
19. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O *et al*: **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(20):9363-9367.
20. Vousden KH, Ryan KM: **p53 and metabolism**. *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(10):691-700.
21. Vaseva AV, Moll UM: **The mitochondrial p53 pathway**. *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1787**(5):414-420.
22. Park JH, Zhuang J, Li J, Hwang PM: **p53 as guardian of the mitochondrial genome**. *FEBS letters* 2016, **590**(7):924-934.
23. Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H: **Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence**. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(31):22977-22983.
24. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M, Kroemer G: **Mitochondrial liaisons of p53**. *Antioxidants & redox signaling* 2011, **15**(6):1691-1714.
25. Levine AJ, Oren M: **The first 30 years of p53: growing ever more complex**. *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(10):749-758.
26. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G: **Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis**. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014, **15**(2):81-94.
27. Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Bieging KT, Jiang D, Dusek RL, Brady CA, Sidow A, Attardi LD: **Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses**. *Genes & development* 2013, **27**(9):1016-1031.
28. Hanel W, Marchenko N, Xu S, Yu SX, Weng W, Moll U: **Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis**. *Cell death and differentiation* 2013, **20**(7):898-909.
29. Fernandez-Cuesta L, Oakman C, Falagan-Lotsch P, Smoth KS, Quinaux E, Buyse M, Dolci MS, Azambuja ED, Hainaut P, Dell'orto P *et al*: **Prognostic and predictive value of TP53 mutations in node-positive breast cancer patients treated with anthracycline- or anthracycline/taxane-based**

- adjuvant therapy: results from the BIG 02-98 phase III trial. *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(3):R70.
30. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M: **Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database.** *Human mutation* 2007, **28**(6):622-629.
 31. de Moura Gallo CV, Azevedo ESMG, de Moraes E, Olivier M, Hainaut P: **TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives.** *Mutation research* 2005, **589**(3):192-207.
 32. Borges LM, Ayres FM: **R337H mutation of the TP53 gene as a clinical marker in cancer patients: a systematic review of literature.** *Genetics and molecular research : GMR* 2015, **14**(4):17034-17043.
 33. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: **Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.** *Cancer research* 1991, **51**(23 Pt 1):6304-6311.
 34. Buganim Y, Solomon H, Rais Y, Kistner D, Nachmany I, Brait M, Madar S, Goldstein I, Kalo E, Adam N *et al*: **p53 Regulates the Ras circuit to inhibit the expression of a cancer-related gene signature by various molecular pathways.** *Cancer research* 2010, **70**(6):2274-2284.
 35. Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D: **Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4.** *Science* 1995, **267**(5195):249-252.
 36. Appella E, Anderson CW: **Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses.** *European journal of biochemistry / FEBS* 2001, **268**(10):2764-2772.
 37. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G: **Anti- and pro-tumor functions of autophagy.** *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1793**(9):1524-1532.
 38. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF: **Therapy-induced senescence in cancer.** *Journal of the National Cancer Institute* 2010, **102**(20):1536-1546.

Resultados adicionais

1. Formação de colônias semelhantes à células tronco pluripotente induzidas em fibroblastos com e sem mutação em p53

Um importante avanço no campo das células-tronco foi a indução de células somáticas a um estado de células-tronco pluripotente induzida (iPSC – induced pluripotent stem cell). Tal método, chamado de reprogramação, foi primeiramente desenvolvido por Takahashi e Yamanaka em 2006 através da expressão de 4 fatores de transcrição (Oct4, Sox2, c-myc e KLF4) em fibroblastos de camundongo e posteriormente desenvolvido para fibroblastos humanos (Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Quando eficientemente reprogramadas, as células formam colônias com características morfológicas e expressão de genes de células tronco pluripotentes. As iPSCs podem ser utilizadas dentro de um contexto genético específico ou a partir de células de pacientes para estabelecer modelos de doença e progressão ou para novas abordagens terapêuticas (Lowry e Plath, 2008; Yu *et al.*, 2009; Malik e Rao, 2013).

O objetivo inicial deste projeto de mestrado era de modular a síndrome de Li-Fraumeni através da ferramenta de reprogramação. Ao utilizar os fibroblastos de pacientes com diferentes mutações para formar iPSCs e diferenciar as mesmas em diferentes tipos celulares, poderia ser feita avaliação em diferenças na expressão de variados marcadores teciduais para avaliar a progressão ao câncer e poder compreender melhor a doença. Além disso, devido aos processos anti-proliferativos que p53 controla, sua ausência pode melhorar a eficiência de reprogramação (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009).

Sendo assim, foi testado se a mutação p.R337H em p53 pode afetar a eficiência de reprogramação em fibroblastos de pacientes de Li-Fraumeni. 30×10^4 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e infectadas com retrovírus contendo os fatores de Yamanaka. Dois dias após a infecção, o meio foi trocado para meio específico de células embrionárias humanas (hESC). Depois de duas semanas em cultura começou a ser observada a formação de estruturas semelhantes à colônias e no dia 21 as colônias formadas foram contadas e fotografadas. Como demonstrado pela Figura adicional 1, após a reprogramação,

os fibroblastos formaram colônias semelhantes à colônias de iPSC, mas não houve diferença na quantidade de colônias formadas.

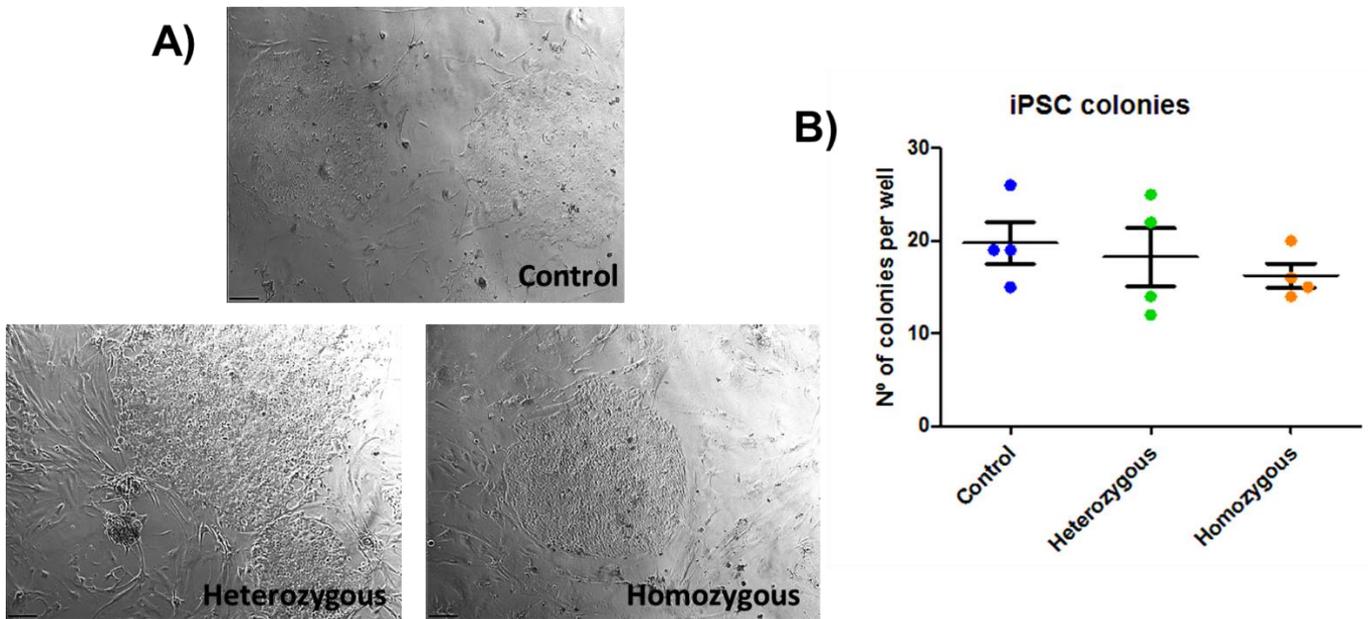


Figura adicional 1. Formação de colônias semelhantes à células tronco pluripotente induzidas em fibroblastos com e sem mutação em p53. Células foram infectadas por retrovírus contendo os fatores de Yamanaka (Oct 4, Sox 2, c-myc e KLF4). Dois dias após a infecção, o meio foi trocado para meio hESC, específico para culturas embrionárias humanas. 21 dias depois foram visualizadas e contadas as colônias formadas. N = 1. A) fotos representativas das colônias. Aumento 50x, barra de escala 5 μ M. B) gráfico da contagem das colônias em cada poço. N=1, quatro replicatas.

2. Localização subcelular de p53 não é afetada pela mutação p.R337H em TP53 em estado basal

Como a localização subcelular de p53 afeta sua ação sobre a autofagia (Maiuri *et al.*, 2010), foi feito um ensaio de imunofluorescência para testar se a mutação R337H altera a localização de p53. 1×10^4 células foram plaqueadas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços e fixadas com metanol. As células foram incubadas com PBS contendo 0,2% de Tween 2% de BSA por 30 minutos à

temperatura ambiente. Após esse processo, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo monoclonal de camundongo para p53 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). O anticorpo secundário *anti-mouse* Alexa-555 (Cell Signaling, Danvers, MA) foi incubado por 2 h e os núcleos foram marcados com DAPI por 15 minutos. Depois de tiradas as fotos, o programa ImageJ foi utilizado para medir o “*gray value*” do núcleo e do citoplasma de células controle e células p53 +/- e p53 -/-. Assim, o “*gray value*” mede a intensidade dos pixels das diferentes regiões das células e foi feita uma razão entre núcleo e citoplasma para avaliar onde p53 estava mais presente em cada uma das culturas. O experimento mostrou que não houve diferença na localização da p53 entre células com ou sem mutação em TP53 durante o estado basal (Figura adicional 2).

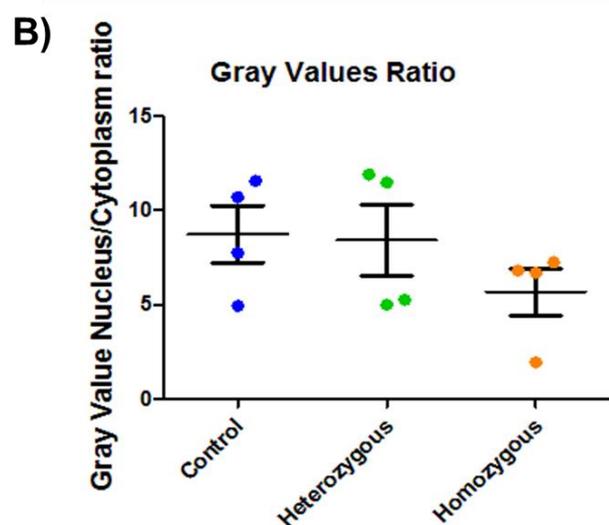
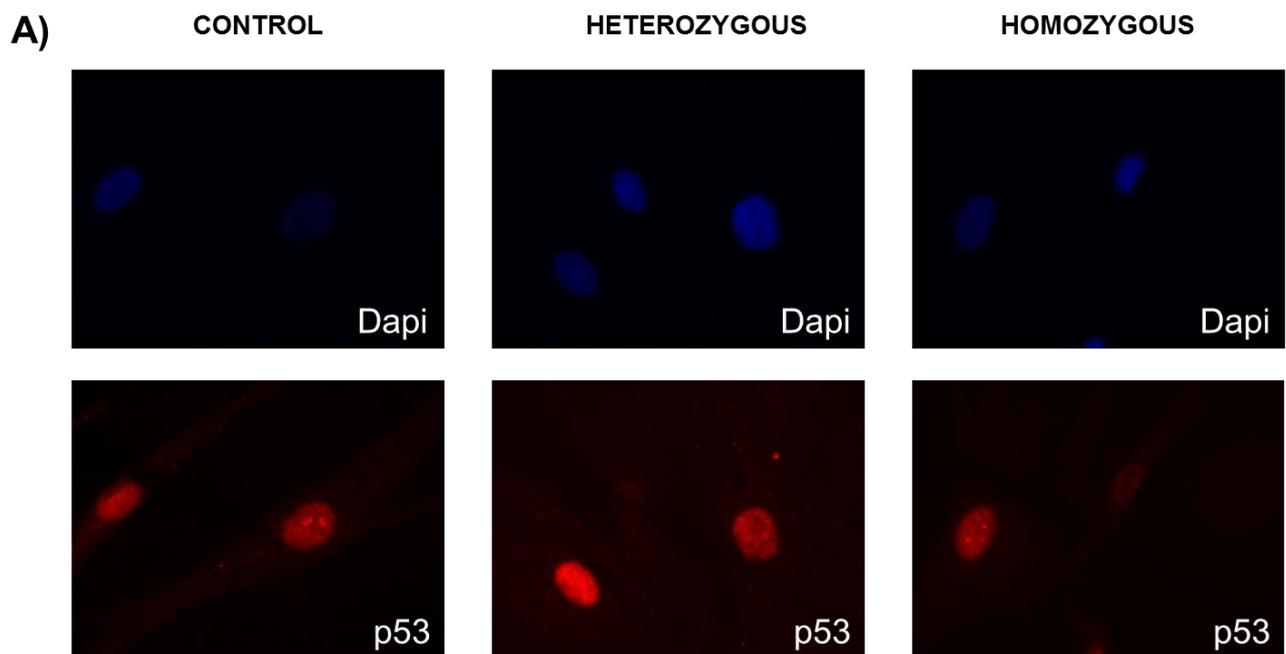


Figura adicional 2. Localização subcelular de p53 não é afetada pela mutação p.R337H em TP53 em estado basal. Células foram plaqueadas e marcadas com anticorpo anti-p53 (Santa Cruz). A) Figuras representativas das culturas de fibroblastos com e sem mutação em p53. Aumento de 200x. B) Quantificação da proporção núcleo/citoplasma de p53. N=1, quatro replicatas.

Discussão

Pela variedade de estímulos a que p53 responde e a variedade de mecanismos celulares que ela controla, p53 é uma importantíssima supressora tumoral. Considerada como a “guardiã do genoma” (Lane, 1992), essa proteína

pode ativar ou reprimir diversas vias, a fim de evitar propagação de danos ao DNA e impedir a proliferação descontrolada das células (Kastan *et al.*, 1991; Harris e Levine, 2005). Os mecanismos mais conhecidos regulados por p53 são senescência, parada no ciclo celular, reparo ao dano no DNA, apoptose e autofagia (El-Deiry, 2003; Oren, 2003). No entanto, devido sua importância, p53 vem sendo continuamente estudada desde sua descoberta, e a complexidade de eventos regulada por ela apenas aumenta (Levine e Oren, 2009; Vousden e Prives, 2009).

Tamãha é a relevância de p53 que mutações são encontradas em pelo menos 50% de todos os tipos tumorais (Hainaut e Hollstein, 2000). Esforços coletivos vêm sendo feitos para melhor descrever as ações de p53 mutantes, e mesmo que algumas mutações sejam associadas a prognósticos e determinados tipos tumorais, nenhum avanço abrangente foi feito, uma vez que cada mutação tem sua própria característica ao afetar as funções da proteína (Olivier *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004; Petitjean, Achatz, *et al.*, 2007). Tal fato torna-se especialmente importante para portadores da síndrome de Li-Fraumeni, pois novas descobertas sobre as mutações em p53 podem melhorar a qualidade de vida para esses pacientes e até mesmo aumentar o entendimento sobre os mecanismos de tumorigênese associados à doença (Frebouurg *et al.*, 2001).

Um importante avanço para a modulação de diversas doenças foi a criação da ferramenta de indução de células somáticas a um estado de células-tronco pluripotente induzidas (iPSC – *induced pluripotent stem cell*), chamado de reprogramação, onde as células tronco formadas podem ser diferenciadas para variados tecidos e comparações moleculares são realizadas entre células de pacientes acometidos por diferentes doenças e indivíduos controles para melhor entendimento das doenças (Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007) (Lowry e Plath, 2008; Yu *et al.*, 2009; Malik e Rao, 2013). Dessa forma, o objetivo inicial deste projeto de mestrado era de obter uma maior compreensão a nível celular e molecular sobre a síndrome de Li-Fraumeni através da ferramenta de reprogramação. Além disso, devido aos processos anti-proliferativos que p53 controla, sua ausência pode melhorar a eficiência de reprogramação, o que torna interessante também avaliar o quanto a mutação R337H afeta a capacidade de

p53 impedir a formação de células tronco pluripotentes induzidas (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009).

Dessa forma, as culturas de fibroblastos com e sem mutação em p53 foram infectadas por retrovírus contendo os fatores de Yamanaka e passaram pela manutenção de meio específico para células embriônicas, meio hESC, e 21 dias após a indução foram visualizadas colônias com fenótipo de iPSCs. Em resultado preliminar, não foram observadas alterações na quantidade de colônias formadas após a reprogramação (Figura adicional 1). Infelizmente, contagem de colônias não é um método válido para avaliar eficiência de indução de iPSC, e as colônias necessitam de melhor caracterização molecular para confirmar pluripotência, mas a técnica de reprogramação é muito importante na modulação da doença, podendo trazer novo entendimento sobre a carcinogênese associada a mutações de p53 e deve ser melhor estudada. Lee e colaboradores publicaram em 2015 um estudo utilizando iPSC formadas a partir fibroblastos de pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni e demonstraram, a partir da diferenciação das iPSC em osteoblastos, que pacientes com diferentes mutações em TP53 tinham maior assinatura gênica relacionada à osteossarcomas do que pacientes sem mutação, provando a importância da modulação da doença, pois esses resultados puderam dar uma melhor compreensão da alta prevalência de osteossarcomas nos pacientes com as mutações estudadas (Lee *et al.*, 2015). Além dos fatos mencionados, não obtivemos muito sucesso na reprodução dos resultados da formação de iPSC devido à passagem avançada das células (utilizadas sempre no mínimo a partir de passagem 12), então esse objetivo foi deixado de lado, mas análises de mecanismos celulares foram realizadas ainda dentro do contexto de gerar melhor entendimento sobre a doença, trazendo informações sobre o quanto a mutação R337H, uma mutação altamente prevalente no sul do Brasil (Achatz *et al.*, 2007), pode afetar as diferentes ações de p53.

Para esse estudo foram utilizados fibroblastos obtidos através da biópsia do braço de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni contendo a mutação p.R337H em hetero ou homozigose e fibroblastos obtidos através da biópsia da barriga de um paciente sem mutação identificada (nomeada Controle). Através do ensaio de *population doubling* foi possível constatar uma maior taxa de

proliferação nas células mutadas em relação ao controle sem mutação (Figura 1 do artigo científico). Tal fato torna-se importante uma vez que células mais proliferativas têm maior tendência a gerar tumores (Kastan *et al.*, 1991; Buganim *et al.*, 2010).

Para a avaliação de autofagia, as células foram tratadas com Rapamicina. Apenas a cultura Controle apresentou indução de autofagia após o tratamento, mostrando que a mutação afetou a função pró-autofágica de p53 (Figura 2 do artigo científico). Assim sendo, dadas as funções ambíguas de p53, esse mecanismo deve ser mais bem estudado, uma vez que a incapacidade de ativar o mecanismo autofágico pode tanto estar favorecendo a tumorigênese como pode indicar melhor prognóstico para esses pacientes, uma vez que os tumores estabelecidos podem apresentar menor resistência a quimioterápicos (Yang *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2013). Numa tentativa de explicar por que a função nuclear de p53 na autofagia foi alterada pela mutação p.R337H, as culturas foram submetidas a um ensaio de imunofluorescência. Como resultado preliminar, após a utilização de anticorpo para p53 foram tiradas fotos das células e, através do programa ImageJ, os “grayvalues”, ou intensidade da fluorescência, foram medidos no núcleo e no citoplasma, gerando um gráfico da razão de p53 presente no núcleo/citoplasma. Nesse experimento não foi encontrada diferença de localização da proteína entre células controle e células mutadas para p53 em um estado basal (Figura adicional 2). No entanto, Ribeiro *et al.*, ao descreverem a mutação encontrada em crianças com ADR em 2001, mostraram um acúmulo da proteína com a mutação R337H no núcleo de células do tumor dos pacientes, contrastando com os dados obtidos nesse presente trabalho utilizando fibroblastos de pacientes (Ribeiro *et al.*, 2001). Com isso, torna-se ainda mais importante detalhar a diferença na localização subcelular de p53 entre fibroblastos com ou sem mutação, avaliando se diferentes estímulos estressores, como quimioterapia ou privação de nutrientes, podem induzir o acúmulo da proteína no núcleo, ou se apenas em células já transformadas esse perfil é visto, como demonstrado por Ribeiro e colaboradores (Ribeiro *et al.*, 2001).

Para avaliar senescência, rede mitocondrial e funcionalidade mitocondrial, foram utilizados tratamentos com Doxorubicina (Doxo) e Cisplatina (Cis), dois

quimioterápicos amplamente utilizados em diversos tipos tumorais (Chang *et al.*, 1999; Ewald *et al.*, 2010; Galluzzi *et al.*, 2011). Apesar de nenhum dos dois tratamentos terem induzido senescência de forma significativa em nenhuma das culturas, as células mutadas apresentaram níveis mais baixos de senescência do que o Controle não somente em estado basal, mas também após o tratamento (Figura 3 do artigo científico). De forma mais interessante, a porcentagem de células senescentes foi menor no tratamento com Doxo tanto para células p53 +/- e p53 -/- em relação aos seus pares não tratados, sugerindo que a mutação p.R337H afeta a modulação da senescência de p53.

Por fim, como um dos eventos mais importantes da via intrínseca da apoptose é a desestabilização da membrana exterior da mitocôndria, a proteína p53 é intimamente relacionada à função mitocondrial. No entanto, aparentemente p53 também pode exercer funções ambíguas nas mitocôndrias. Estudos têm mostrado que a proteína está relacionada ao controle metabólico celular ao reduzir o fluxo da via glicolítica por inibir transportadores de glicose (GLUT) e indução indireta de SCO2 (citocromoc oxidase), aumentando a fosforilação oxidativa. Além disso, p53 até mesmo foi encontrada auxiliando na manutenção do genoma mitocondrial (Vaseva e Moll, 2009; Vousden e Ryan, 2009; Park *et al.*, 2016). Assim, após o tratamento com Doxo e Cis a população e funcionalidade mitocondrial foram avaliadas. Tanto células mutadas quanto controles obtiveram uma população maior de mitocôndrias quando tratadas com Doxo (Figura 4 do artigo científico). Entretanto, apesar desse aumento na massa mitocondrial, não houve alteração na funcionalidade mitocondrial em nenhum grupo. Juntando os dados, o acúmulo de mitocôndrias pode ser explicado pela falta de autofagia em células mutadas, sendo necessário avaliar se a função pró-autofágica de p53 também é afetada nessas condições.

Assim sendo, o presente estudo traz novos conhecimentos sobre a biologia celular de fibroblastos com a mutação germinativa p.R337H em p53. No entanto, novos estudos ainda devem ser feitos para maior compreensão de mecanismos como, por exemplo, resistência à quimioterapia, para melhor manejo e tratamento dos pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni.

Perspectivas

- Avaliar o mecanismo por trás da alteração na sinalização de p53 à indução de autofagia, avaliando, por exemplo, se sua localização subcelular pode ser afetada sob outros tratamentos indutores de autofagia, como dano em DNA e starvation.
- Utilizar a ferramenta de reprogramação celular para diferenciar fibroblastos de pacientes em diferentes tecidos e avaliar, através de sequenciamento do mRNA, quais alterações gênicas associadas à mutação em p53 podem estar relacionadas ao desenvolvimento de tumores em pacientes de Li-Fraumeni.
- Avaliar como células com diferentes mutações em TP53 reagem a diferentes estímulos estressantes, não apenas quimioterapia, mas também radiação, para melhor compreensão de quais vias podem favorecer a resistência ou reincidência tumoral.
- Evidenciar se o *background* genético pode causar diferentes desfechos em células de pacientes com a mesma mutação em TP53, pela utilização de células de pacientes diferentes com a mesma mutação em comparação com uma célula controle em que diferentes mutações foram inseridas através do sistema CRISPR/Cas9.

Conclusões

Através do presente estudo, pudemos identificar que a mutação p.R337H afeta apenas uma parcela das atividades de p53. Fibroblastos mutados apresentaram maiores taxas de proliferação, menor ativação de autofagia e senescência e acúmulo de mitocôndria pouco funcionas sob tratamento com Doxorubicina. O aprendizado sobre quais aspectos de p53 são afetados pelas diferentes mutações em TP53 podem, no futuro, auxiliar no manejo e tratamento de pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni.

Referências

- ACHATZ, M. I. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett**, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, Jan 8 2007.
- APPELLA, E.; ANDERSON, C. W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 10, p. 2764-72, May 2001.
- BAKER, D. J. et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. **Nature**, v. 479, n. 7372, p. 232-6, Nov 10 2011.
- BEAUSEJOUR, C. M. et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. **EMBO J**, v. 22, n. 16, p. 4212-22, Aug 15 2003.
- BIRCH, J. M. Li-Fraumeni syndrome. **Eur J Cancer**, v. 30A, n. 13, p. 1935-41, 1994.
- BIRCH, J. M. et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene**, v. 20, n. 34, p. 4621-8, Aug 2 2001.
- BIRCH, J. M. et al. Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. **Oncogene**, v. 17, n. 9, p. 1061-8, Sep 3 1998.
- BORGES, L. M.; AYRES, F. M. R337H mutation of the TP53 gene as a clinical marker in cancer patients: a systematic review of literature. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 17034-43, 2015.
- BUGANIM, Y. et al. p53 Regulates the Ras circuit to inhibit the expression of a cancer-related gene signature by various molecular pathways. **Cancer Res**, v. 70, n. 6, p. 2274-84, Mar 15 2010.
- CHANDLER, H.; PETERS, G. Stressing the cell cycle in senescence and aging. **Curr Opin Cell Biol**, v. 25, n. 6, p. 765-71, Dec 2013.
- CHANG, B. D. et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. **Cancer Res**, v. 59, n. 15, p. 3761-7, Aug 1 1999.
- CHO, Y. et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, v. 265, n. 5170, p. 346-55, Jul 15 1994.
- CHOMPRET, A. The Li-Fraumeni syndrome. **Biochimie**, v. 84, n. 1, p. 75-82, Jan 2002.

CLORE, G. M. et al. High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. **Science**, v. 265, n. 5170, p. 386-91, Jul 15 1994.

COLLADO, M. et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 642, Aug 4 2005.

COSME-BLANCO, W. et al. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. **EMBO Rep**, v. 8, n. 5, p. 497-503, May 2007.

DELEO, A. B. et al. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 5, p. 2420-4, May 1979.

DIGIAMMARINO, E. L. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, v. 9, n. 1, p. 12-6, Jan 2002.

EDWARDS, S. J. et al. The proline-rich region of mouse p53 influences transactivation and apoptosis but is largely dispensable for these functions. **Oncogene**, v. 22, n. 29, p. 4517-23, Jul 17 2003.

EELES, R. A. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv**, v. 25, p. 101-24, 1995.

EL-DEIRY, W. S. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7486-95, Oct 20 2003.

EWALD, J. A. et al. Therapy-induced senescence in cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 20, p. 1536-46, Oct 20 2010.

FARMER, G. et al. Wild-type p53 activates transcription in vitro. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 83-6, Jul 2 1992.

FIELDS, S.; JANG, S. K. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. **Science**, v. 249, n. 4972, p. 1046-9, Aug 31 1990.

FREBOURG, T. et al. [Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. **Bull Cancer**, v. 88, n. 6, p. 581-7, Jun 2001.

FU, L.; MINDEN, M. D.; BENCHIMOL, S. Translational regulation of human p53 gene expression. **EMBO J**, v. 15, n. 16, p. 4392-401, Aug 15 1996.

GALLUZZI, L. et al. Mitochondrial liaisons of p53. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1691-714, Sep 15 2011.

GARBER, J. E. et al. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res**, v. 51, n. 22, p. 6094-7, Nov 15 1991.

GARRITANO, S. et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat**, v. 31, n. 2, p. 143-50, Feb 2010.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Adv Cancer Res**, v. 77, p. 81-137, 2000.

HANEL, W. et al. Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 7, p. 898-909, Jul 2013.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1187-98, Jun 1996.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2899-908, Apr 18 2005.

HARTLEY, A. L. et al. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? **Cancer Genet Cytogenet**, v. 42, n. 2, p. 221-6, Oct 15 1989.

HAUPT, Y. et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 296-9, May 15 1997.

HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MONTESANO, R.; HAINAUT, P. Analysis of somatic mutations of the p53 gene in human cancers: a tool to generate hypotheses about the natural history of cancer. **IARC Sci Publ**, n. 146, p. 43-53, 1999.

HISADA, M. et al. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 8, p. 606-11, Apr 15 1998.

HONG, H. et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1132-5, Aug 27 2009.

KAMIJO, T. et al. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 14, p. 8292-7, Jul 7 1998.

KASTAN, M. B. et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res**, v. 51, n. 23 Pt 1, p. 6304-11, Dec 1 1991.

KAWAMURA, T. et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1140-4, Aug 27 2009.

KENZELMANN BROZ, D. et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. **Genes Dev**, v. 27, n. 9, p. 1016-31, May 1 2013.

KERN, S. E. et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1708-11, Jun 21 1991.

KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 132-41, Feb 2011.

KUBBUTAT, M. H.; JONES, S. N.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 299-303, May 15 1997.

LALLOO, F. et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. **Lancet**, v. 361, n. 9363, p. 1101-2, Mar 29 2003.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15-6, Jul 2 1992.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v. 278, n. 5701, p. 261-3, Mar 15 1979.

LANG, G. A. et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 861-72, Dec 17 2004.

LEE, D. F. et al. Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 161, n. 2, p. 240-54, Apr 9 2015.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749-58, Oct 2009.

LEVINE, B.; ABRAMS, J. p53: The Janus of autophagy? **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 637-9, Jun 2008.

LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Rhabdomyosarcoma in Children: Epidemiologic Study and Identification of a Familial Cancer Syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, p. 1365-73, 1969.

LI, F. P. et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res**, v. 48, n. 18, p. 5358-62, Sep 15 1988.

LINZER, D. I.; LEVINE, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell**, v. 17, n. 1, p. 43-52, May 1979.

LOWRY, W. E.; PLATH, K. The many ways to make an iPS cell. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 11, p. 1246-8, Nov 2008.

MAIURI, M. C. et al. Autophagy regulation by p53. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 181-5, Apr 2010.

MALIK, N.; RAO, M. S. A review of the methods for human iPSC derivation. **Methods Mol Biol**, v. 997, p. 23-33, 2013.

MALKIN, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-8, Nov 30 1990.

MARINO, G. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 81-94, Feb 2014.

MARION, R. M. et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1149-53, Aug 27 2009.

MCCONNELL, B. B. et al. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. **Curr Biol**, v. 8, n. 6, p. 351-4, Mar 12 1998.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 1, p. 49-58, Feb 2003.

MOLL, U. M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. **Mol Cancer Res**, v. 1, n. 14, p. 1001-8, Dec 2003.

MOMAND, J. et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1237-45, Jun 26 1992.

MORSELLI, E. et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 9, p. 1524-32, Sep 2009.

MORSELLI, E. et al. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. **Cell Cycle**, v. 7, n. 19, p. 3056-61, Oct 2008.

NICHOLS, K. E. et al. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 2, p. 83-7, Feb 2001.

NIGRO, J. M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, n. 6250, p. 705-8, Dec 7 1989.

OLIVE, K. P. et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 847-60, Dec 17 2004.

OLIVIER, M. et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res**, v. 63, n. 20, p. 6643-50, Oct 15 2003.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 1, p. a001008, Jan 2010.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 4, p. 431-42, Apr 2003.

PALMERO, E. I. et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett**, v. 261, n. 1, p. 21-5, Mar 8 2008.

PARK, J. H. et al. p53 as guardian of the mitochondrial genome. **FEBS Lett**, v. 590, n. 7, p. 924-34, Apr 2016.

PASKULIN, D. D. et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143262, 2015.

PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2157-65, Apr 2 2007.

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**, v. 28, n. 6, p. 622-9, Jun 2007.

PICKSLEY, S. M.; LANE, D. P. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? **Bioessays**, v. 15, n. 10, p. 689-90, Oct 1993.

QIAN, Y.; CHEN, X. Senescence regulation by the p53 protein family. **Methods Mol Biol**, v. 965, p. 37-61, 2013.

RIBEIRO, R. C. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 9330-5, Jul 31 2001.

RILEY, T. et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 402-12, May 2008.

RUFINI, A. et al. Senescence and aging: the critical roles of p53. **Oncogene**, v. 32, n. 43, p. 5129-43, Oct 24 2013.

RUSSELL, R. C. et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 741-50, Jul 2013.

SAKAMURO, D. et al. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. **Oncogene**, v. 15, n. 8, p. 887-98, Aug 18 1997.

SALDANA-MEYER, R.; RECILLAS-TARGA, F. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. **Epigenetics**, v. 6, n. 9, p. 1068-77, Sep 1 2011.

SHRIDHAR, S. et al. Ubiquitination and selective autophagy. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 1, p. 21-30, Jan 2013.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, Jun 15 1999.

SORRELL, A. D. et al. Tumor protein p53 (TP53) testing and Li-Fraumeni syndrome : current status of clinical applications and future directions. **Mol Diagn Ther**, v. 17, n. 1, p. 31-47, Feb 2013.

SUI, X. et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e838, 2013.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, Nov 30 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, Aug 25 2006.

TASDEMIR, E. et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 676-87, Jun 2008.

TINAT, J. et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 26, p. e108-9; author reply e110, Sep 10 2009.

VARLEY, J. M. et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res**, v. 57, n. 15, p. 3245-52, Aug 1 1997.

VASEVA, A. V.; MOLL, U. M. The mitochondrial p53 pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 5, p. 414-20, May 2009.

VIJAYAKUMARAN, R. et al. Regulation of Mutant p53 Protein Expression. **Front Oncol**, v. 5, p. 284, 2015.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 8, p. 594-604, Aug 2002.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-31, May 1 2009.

VOUSDEN, K. H.; RYAN, K. M. p53 and metabolism. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 10, p. 691-700, Oct 2009.

WEBSTER, G. A.; PERKINS, N. D. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 5, p. 3485-95, May 1999.

WHITE, E.; MEHNERT, J. M.; CHAN, C. S. Autophagy, Metabolism, and Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 22, p. 5037-46, Nov 15 2015.

XU, J. et al. Heterogeneity of Li-Fraumeni syndrome links to unequal gain-of-function effects of p53 mutations. **Sci Rep**, v. 4, p. 4223, 2014.

YANG, A. et al. Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. **Cancer Discov**, v. 4, n. 8, p. 905-13, Aug 2014.

YANG, Z. J. et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1533-41, Sep 2011.

YU, J. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 797-801, May 8 2009.

ZHAO, R. et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. **Genes Dev**, v. 14, n. 8, p. 981-93, Apr 15 2000.

Currículo

Michele Oliveira Hütten

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8642508568411017>
- Última atualização do currículo em 13/06/2016

Bacharel em Biomedicina, graduada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2013). Atualmente é bolsista de mestrado CAPES pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, no departamento de Biofísica da mesma universidade, sob orientação do prof. Dr. Guido Lenz. Tem experiência na área de biologia celular e molecular de tumores cerebrais (glioma) in vitro e desenvolve trabalho relacionado à reprogramação celular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Michele Oliveira Hütten 

HÜTTEN, M. O.

Nome

Nome em citações bibliográficas

Endereço

Endereço Profissional
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.
AC Campus da UFRGS
Agronomia
91501970 - Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: (051) 33087620
URL da Homepage: <http://www.ufrgs.br/labsinal/>

Formação acadêmica/titulação

2014
Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Comparação da Eficiência de Reprogramação e Cinética de Cultivo de Células-tronco Pluripotentes Induzidas Originadas de Fibroblastos de Pacientes com Mutações Germinativas no Gene TP53 e Indivíduos sem Mutação Identificada, Orientador:  Guido Lenz.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2010 - 2013
Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Avaliação dos Efeitos do Silenciamento de XIAP no Mecanismo de Autofagia em Gliomas.
Orientador: Guido Lenz.

2007 - 2009

Ensino Médio (2º grau).
Colégio Unificado Canoas, UNI, Brasil.

Atuação Profissional

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2013

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estágio Curricular Supervisionado, Carga horária: 40

Outras informações

Estágio realizado em Banco de Sangue

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestrado Acadêmico, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2011 - 2014

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Outras informações

Atividade realizada no Laboratório de Sinalização e Plasticidade celular do Departamento de Biofísica. Bolsista do programa Pronex ITI

Vínculo institucional

2011 - 2011

Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Estágio Voluntário de Iniciação Científica, Carga horária: 20

Idiomas

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Espanhol

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1.  [HÜTTEN, M. O.](#); SILVA, A. O. ; LENZ, G. . XIAP silencing and p53 superexpression cooperate in glioma cell death. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

2. SILVA, A. O. ; [HÜTTEN, M. O.](#) ; LOPEZ, P. L. C. ; LENZ, G. . Knockdown of XIAP cooperates with the overexpression of p53 in reducing cell proliferation and enhancing cell death in Gliomas. 2012. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).