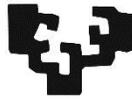


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Tesis doctoral:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE EPÍTOPOS DE LA REGIÓN C-
TERMINAL DE PTEN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE MUTACIONES
TUMORALES N-TERMINALES: VALIDACIÓN EN CÁNCERES
GENITOURINARIOS**

Janire Mingo Gómez de Oteo

Junio, 2019

Director: Dr. Rafael Pulido Murillo

Tutora: Dra. Ana Zubiaga

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

Esta tesis doctoral se realizó en el grupo Biomarcadores en Cáncer del Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia, gracias a la beca otorgada por el Gobierno Vasco (Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador no doctor, Departamento de Educación).

Agradecimientos

Poder dedicarte a lo que te gusta y a lo que has invertido tantos años de trabajo y estudio no es algo sencillo cuando se habla de ciencia. Sin embargo, yo me considero muy afortunada al haber podido crecer profesional y personalmente durante la trayectoria de mi tesis doctoral. Esto no hubiera sido posible sin mi director de tesis, Rafael Pulido, al que siempre le estaré agradecida por haberme brindado esta oportunidad, por haber confiado en mi persona desde el primer momento y por haberme enseñado tantos conocimientos en todo este tiempo. Por otro lado, también me gustaría agradecer a Caroline todos los consejos y aporte de conocimientos que me ha facilitado.

Me gustaría dar las gracias a todas mis compañeras de trabajo, por haber aportado día a día lo mejor de sí mismas, amenizando el trabajo en el laboratorio. Laura, Olaia, Lorena, Sandra y Leire, muchas gracias por haber estado a mi lado todo este tiempo. Y, por supuesto, a todos los demás compañeros que he tenido en Biocruces. Esti Ruiz, por ser la primera persona que me acogió en mi llegada, siempre con esa gran sonrisa y transmitiendo tanto positivismo. Javi, por todo su apoyo y paciencia en el microscopio. Gustavo y Ana, por la ayuda con la secuenciación. Patricia, Edurne, Pablo, Loli, Miren, Arantza, Lucía, Gabi, Susana, Piedad, Ane, Iñigo, Naiara, Iker, Esti Tamayo, etc., por demostrar que son grandes personas y profesionales, a los que sin duda alguna les deseo todo lo mejor. Tampoco puedo olvidarme del departamento de Patología del Hospital Universitario de Cruces, por su excelente ayuda en inmunohistoquímica, así como del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid por su ayuda y aportaciones en el trabajo con levaduras.

A toda la gente que me ha apoyado, aunque muchas veces sin saber muy bien lo que hacía. A mi familia, mis padres, por conseguir que siempre luche por lo que quiero, por enseñarme a no rendirme nunca, por transmitirme los mejores valores de responsabilidad, perseverancia y esfuerzo, y, sobre todo, por transmitirme amor y cariño, dos piezas fundamentales que no deben faltar nunca en esta vida. No existen tantas palabras en el mundo que puedan agradecer todo lo que han hecho por mí. A mis abuelos, que siempre han querido lo mejor para su nieta, sé que estaríais orgullosos de mí. A mi abuela Josefina, con esas ganas de vivir y aprovechar cada instante de esta vida, es un claro ejemplo de admiración y superación; gracias por enseñarme el valor de las palabras bondad y humildad, y por estar siempre a mi lado, sé que siempre lo estarás.

Y por supuesto, agradecer a la persona que me ha apoyado día a día, Eneko, siempre tan optimista y con tantísima paciencia, poniendo tanto esfuerzo y consiguiendo todo lo que te propones, un ejemplo a seguir para muchas personas. Mil gracias por todo, por creer en mí, por saber escucharme y transmitirme tranquilidad cuando más lo necesito, por hacerme reír como nadie y por tratarme con tanta ternura. Por todos esos viajes y momentos entrañables con nuestro rayito, con su

fidelidad y cariño incondicional. Y, sobre todo, gracias por todos tus consejos y reflexiones, por enseñarme que la vida se puede ver desde muchas perspectivas; pero a mí me encanta desde donde yo la veo, porque no se puede ser más feliz teniendo a la mejor persona a mi lado. También me gustaría dar las gracias a toda tu familia, por todo el cariño que me han brindado y por estar siempre ahí.

Por último, espero que algún día las condiciones en investigación puedan mejorar, porque las personas que realmente se esfuerzan y ponen todo su ser en la ciencia merecen poder tener un trabajo digno; el cual les haga felices y puedan dedicarse a ello sin tener que abandonar lo que tantos años les ha costado conseguir.

Haz lo que amas, ama todo lo que hagas.

Gracias por ser el mejor ejemplo.



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Mutagénesis dirigida	1
1.1. Método de mutagénesis dirigida <i>QuikChange</i>	2
1.2. Alanina <i>scanning</i>	3
2. PTEN	4
2.1. Función de la proteína PTEN.....	4
2.2. Composición de dominios de la proteína PTEN.....	6
2.3. Regulación de PTEN	7
2.3.1. Regulación transcripcional	7
2.3.2. Regulación postranscripcional.....	8
2.3.3. Modificaciones postraduccionales	8
2.4. Isoformas de PTEN.....	13
2.4.1. PTEN-L/ α	13
2.4.2. Otras isoformas de PTEN.....	15
2.5. Localización subcelular de PTEN	16
2.5.1. PTEN en la membrana plasmática	16
2.5.2. PTEN nuclear	17
2.5.3. PTEN en la mitocondria y retículo endoplásmico (RE)	19
2.5.4. PTEN extracelular	19
2.6. Alteraciones genéticas.....	19
2.7. PTEN en el cáncer genitourinario	21
2.8. Anticuerpos anti-PTEN frente a la región C-terminal	24
II. HIPÓTESIS	27
III. OBJETIVOS	31
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. Técnicas de biología molecular	37
1.1. Mutagénesis dirigida.....	37
1.2. Purificación de ADN plasmídico	37

1.3. Plásmidos	39
2. Cultivos de células de mamíferos.....	40
2.1. Líneas celulares	40
2.2. Métodos de transfección	40
2.3. Lisis de cultivos celulares	41
3. Detección de proteínas mediante <i>Western blot</i>.....	42
3.1. Electroforesis de proteínas	42
3.2. Transferencia	42
3.3. Revelado.....	43
4. Microscopía de fluorescencia	43
5. Inmunohistoquímica (IHC) e hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	45
6. Métodos de trabajo en el modelo experimental de levadura	46
6.1. Cepa de levadura y medios de cultivos	46
6.2. Transformación de la levadura y condiciones de crecimiento.....	46
6.3. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriadas decimales	47
7. Análisis estadístico	47
V. RESULTADOS	49
1. Mutagénesis dirigida: generación de colecciones de sustituciones de aminoácidos .	51
1.1. Mutagénesis dirigida en un solo paso de PCR usando oligonucleótidos mutagénicos estandarizados de longitud predefinida	51
1.2. Mutagénesis dirigida en un solo tubo usando combinaciones de plásmidos de ADNc	54
1.3. Mutagénesis en un solo tubo que usa combinaciones de oligonucleótidos estandarizados para mutar aminoácidos consecutivos: implicaciones en la mutagénesis por barrido.....	56
1.4. Combinaciones de oligonucleótidos dirigidos al mismo aminoácido: mutagénesis de sitio único	59
2. Caracterización de epítomos de la región C-terminal de PTEN	62
2.1. Especificidad y sensibilidad de los AcM anti-PTEN	62
2.2. Definición de los epítomos reconocidos por los AcM anti-PTEN en la cola C-terminal de PTEN	65

2.3. Mutaciones que mimetizan la fosforilación de PTEN y mutaciones asociadas a tumores en la región C-terminal de PTEN afectan a la inmunoreactividad de forma dependiente de anticuerpo	70
3. Estudio de variantes de PTEN de la región N-terminal	76
3.1. La variante de PTEN Q17E del dominio N-terminal	76
3.2. La variante Q17E muestra una actividad fosfatasa ligeramente reducida y es estable en las células	77
3.3. La variante Q17E se acumula en el núcleo	80
3.4. Variantes hereditarias y asociadas a tumores del extremo N-terminal de PTEN causan acumulación nuclear de PTEN	83
3.4.1. Estudio funcional <i>in vivo</i> de variantes N-terminales	83
3.4.2. Estudio de la localización celular de variantes N-terminales	83
3.5. Sistema Genitourinario. Análisis de las variantes del extremo N-terminal en PTEN y PTEN-L	86
3.5.1. Abundancia relativa de proteína y localización subcelular	86
3.5.2. Actividad funcional	90
3.5.3. Localización subcelular	91
VI. DISCUSIÓN	95
1. El protocolo de mutagénesis dirigida optimizado para un mejor rendimiento y eficiencia	97
2. Anticuerpos anti-PTEN reconocen diferentes epítomos de la cola C-terminal de PTEN99	
3. Mutaciones de la zona N-terminal afectan a la localización, estabilidad y actividad de PTEN	102
3.1. Las variantes N-terminales de tumores del Sistema Genitourinario afectan de diferente manera a PTEN y PTEN-L	104
4. PTEN como biomarcador y como diana terapéutica	106
VII. CONCLUSIONES	111
VIII. BIBLIOGRAFÍA	115
IX. ANEXOS	133

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpos monoclonales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína quinasa B
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASD	Trastornos del espectro autista
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATM	<i>Protein kinase ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BCa	Cáncer de vejiga
BCA	Ácido bicinconínico
BMI1	<i>B lymphoma Mo-MLV</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Pares de bases
BSA	Seroalbúmina bovina
CAMK2	Calmodulina quinasa 2
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CBF1	<i>C-repeat binding factor 1</i>
CBP	Proteína de unión a CREB
CCRCC	Carcinoma de células renales de células claras
CENP-C	Proteína C centromérica
CHIP	<i>Carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein</i>
CHX	Cicloheximida
CK2	<i>Casein kinase 2</i>
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CLS	Señal de localización citoplásmica
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGR-1	<i>Early growth response protein 1</i>
ETS	<i>E26 transformation-specific</i>
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FBS	Suero fetal bovino
GAPDH	Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
IHC	Inmunohistoquímica
LB	Medio de Luria-Bertani
LKB1	<i>Liver Kinase</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLMs	Motivos de localización N-terminales
NLS	Señal de localización nuclear
MAMs	Membranas asociadas a mitocondrias
MAST	<i>Microtubule-associated serine/threonine</i>
MBH	Hélice de unión a la membrana
miRNAs	Micro-ARNs
MMAC1	<i>Mutated in multiple advanced cancers 1</i>
MP	Membrana plasmática
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
MVP	<i>Major vault protein</i>
ncRNAs	ARNs no codificantes
OBB	<i>Odyssey Blocking Buffer</i>
PBM	Motivo de unión a PIP ₂
PBS	Tampón fosfato salino
PCa	Cáncer de próstata
PCAF	<i>Acetyltransferase P300/CBP-associated factor</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	Dominios de interacción proteína-proteína
PHTS	Síndrome tumoral hamartomatoso asociado a PTEN
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKB	Proteína quinasa B
PIK1	<i>Polo-like kinase 1</i>
PIK3	<i>Polo-like kinase 3</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
PTPs	Proteínas fosfatasa de tirosinas
PVDF	Polifluoruro de vinideno
QCM	<i>QuikChange site-directed mutagenesis</i>
RAK	<i>Tyrosine-protein kinase FRK</i>
RCC	Carcinoma de células renales
RE	Retículo endoplásmico
ROCK	<i>RhoA-associated protein kinase</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
SD	Desviación estándar
SD	Medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa
SDM	<i>Site-Directed Mutagenesis</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEP1	<i>Tensin-like phosphatase</i>
T_m	Temperatura de fusión
TMA	<i>Tissue microarrays</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane Serine Protease 2</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
WT	Tipo silvestre (<i>wild type</i>)
WWP1	<i>WW domain-containing ubiquitin E3 protein ligase 1</i>
WWP2	<i>WW domain-containing ubiquitin E3 protein ligase 2</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
YPD	Medio rico de crecimiento de levaduras (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>)

RESUMEN

PTEN es uno de los genes supresores tumorales mutados con mayor frecuencia en cánceres humanos. La proteína *PTEN* regula negativamente la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la cual se encuentra hiperactivada en muchos tumores en humanos, y su expresión se pierde parcial o totalmente en una gran cantidad de tumores, lo que la convierte en un excelente candidato biomarcador en oncología clínica. *PTEN* consta de un dominio fosfatasa catalítico N-terminal, un dominio C2 de unión a membrana y un extremo C-terminal con un motivo de unión a proteínas PDZ. *PTEN-L* es una isoforma de *PTEN* que muestra una región traducida de forma alternativa en el extremo N-terminal.

En esta tesis doctoral, en primer lugar, hemos optimizado el rendimiento de la metodología de mutagénesis dirigida con el objetivo de poder obtener un gran número de mutaciones de *PTEN* con la mayor eficacia posible. En segundo lugar, hemos caracterizado molecularmente los epítomos de la región C-terminal de *PTEN* reconocidos por anticuerpos monoclonales (AcM) anti-*PTEN*. Estos AcM se emplean en inmunohistoquímica, una de las técnicas de diagnóstico más universales en la oncología clínica moderna. Además, hemos visto que las mutaciones asociadas a tumores de la región C-terminal y mutaciones que simulan la fosforilación en esta región de *PTEN* afectan a la inmunorreactividad de los AcM. Nuestro análisis puede contribuir a la validación de AcM anti-*PTEN* como herramientas de diagnóstico y pronóstico en oncología clínica, facilitando un diagnóstico de cáncer más preciso basado en la expresión del supresor tumoral *PTEN*.

Por último, hemos caracterizado funcionalmente las mutaciones N-terminales de *PTEN* hereditarias y encontradas en tumores. Nuestros resultados indican que la localización subcelular y la actividad fosfatasa de *PTEN* dependen de la integridad de su extremo N-terminal. Asimismo, hemos encontrado diferencias entre las variantes N-terminales de *PTEN* y *PTEN-L* en tumores genitourinarios. Nuestros resultados sugieren una regulación funcional de *PTEN* específica de isoformas, lo cual sería relevante en la patogenicidad causada por las alteraciones en estas proteínas.

I. INTRODUCCIÓN

1. Mutagénesis dirigida

El estudio de las secuencias nucleotídicas de los genes se ha generalizado en las últimas décadas debido a la importante información que proporciona y a su gran aplicabilidad clínica y experimental (1, 2). A pesar de los avances en la recopilación de información de las secuencias de ADN, queda mucho trabajo experimental pendiente en cuanto al estudio de las propiedades de las proteínas codificadas. Son muchas las mutaciones somáticas identificadas en tumores, así como las mutaciones germinales encontradas en pacientes con trastornos hereditarios (3, 4), y la evaluación estructural y funcional de las correspondientes variantes proteicas supone una gran demanda en investigación básica y en la medicina traslacional. La mutagénesis dirigida se ha convertido en un método esencial para estudiar la relación estructura-función de las proteínas. Por ello, la generación de colecciones completas de mutaciones de ADNc clonadas en plásmidos de expresión adecuados es un paso importante para el posterior análisis funcional de alto rendimiento de proteínas (5).

La mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, así como bibliotecas de oligonucleótidos generadas aleatoriamente, ha sido muy utilizada para generar variantes de proteínas (6, 7). Sin embargo, de esta manera no se logra obtener colecciones completas y definidas de mutaciones. Por otro lado, la mutagénesis de saturación, como es la sustitución de un aminoácido por cada uno de los otros 19 residuos, es una herramienta adecuada para crear diversidad y estudiar la actividad de las proteínas (8, 9), además de ofrecer información sobre las limitaciones de aminoácidos en posiciones definidas dentro de las mismas (10). Esta mutagénesis de saturación, basada en PCR, usa oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos aleatoria en el codón de interés. Sin embargo, la obtención de todas las mutaciones no es sencillo (11-14). Para estudiar mutaciones relacionadas con enfermedades se requiere un conjunto definido de sustituciones de aminoácidos por residuo, por lo que es necesario optimizar la obtención selectiva de residuos mutados, con el objetivo de obtener grandes colecciones de mutaciones definidas.

1.1. Método de mutagénesis dirigida *QuikChange*

Existe una gran variedad de enfoques para la mutagénesis dirigida mediante PCR (15). Actualmente, el kit comercial *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis* (SDM) (Agilent Technologies) es uno de los métodos más utilizados. *QuikChange* utiliza plásmidos circulares como moldes para la reacción de PCR (que contienen la secuencia que se desea mutar), y oligonucleótidos superpuestos con la mutación deseada. La etapa de replicación del ADN es una reacción de amplificación lineal cíclica en la que una polimerasa de alta fidelidad copia el plásmido completo, deteniéndose al alcanzar el extremo 5' del oligonucleótido (16, 17). El ADN molde metilado es digerido mediante la enzima de restricción DpnI, lo cual elimina el ADN parental no mutado en la reacción. Finalmente, el producto se transforma en bacterias *E. coli* (*Escherichia coli*) con la finalidad de obtener el ADN mutado (Figura 1).

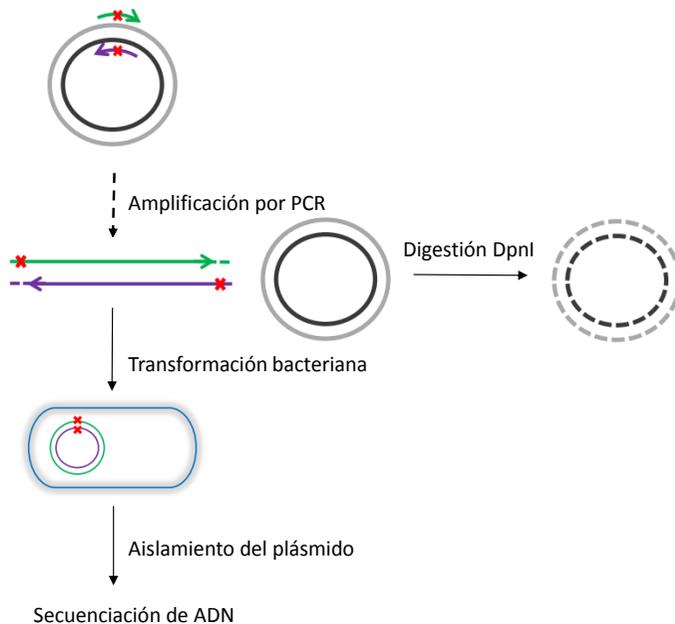


Figura 1. Representación esquemática del proceso de mutagénesis basado en el protocolo de *QuikChange*. Amplificación por PCR de la secuencia que se desea mutar, utilizando oligonucleótidos superpuestos con la mutación deseada. Digestión del ADN metilado con la enzima DpnI, y transformación del producto obtenido en bacterias *E.coli*. Obtención del ADN y posterior comprobación mediante secuenciación.

Según este método, los oligonucleótidos mutagénicos utilizados requieren de 25 a 45 bases nucleotídicas y la temperatura de fusión (T_m) debe ser igual o mayor a 78°C de acuerdo con la siguiente fórmula matemática:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ Mismatch}$$

Donde N es el número de bases del oligonucleótido. Además, otro de los requisitos es que los oligonucleótidos deben tener un contenido mínimo de GC del 40% y deben terminar en una o más bases C o G.

Sin embargo, el uso de pares de oligonucleótidos completamente solapados con una T_m de más de 78°C hace que el método *QuikChange* sea difícil de usar en muchas ocasiones, ya que se requieren oligonucleótidos largos para lograr T_m tan altas (18). Esto supone una restricción importante en el uso de estos protocolos, implicando un alto coste y complicaciones experimentales cuando se requieren grandes cantidades de mutaciones. De hecho, muchas veces la eficacia de la PCR es baja y, a menudo, no se obtiene ningún producto, incluso después de varias rondas de optimización.

Se han hecho muchos intentos para mejorar la eficiencia de la mutagénesis. Se han desarrollado métodos alternativos que utilizan pares de oligonucleótidos mutagénicos parcialmente superpuestos, pero siguen siendo largos y su diseño es bastante complejo (19-22). Otras modificaciones del protocolo SDM incluyen el uso de tres oligonucleótidos y un gradiente de PCR de un solo paso (23), dos reacciones de PCR separadas para cada mutación (24), el ensamblaje enzimático de los productos de PCR superpuestos (25) o dos reacciones de PCR secuenciales usando los denominados megaprimers, además de los oligonucleótidos mutagénicos (26, 27). Esto puede mejorar la eficiencia mutagénica, pero también aumenta los costes y la complejidad metodológica.

1.2. Alanina *scanning*

El método de alanina *scanning* es un método de sustitución sistemática de aminoácidos por alanina, el cual se ha aplicado con éxito para mapear

sistemáticamente epítomos y regiones funcionales en proteínas. En este método, los residuos proteicos se sustituyen individualmente por alanina, aminoácido con cadena lateral inerte no voluminosa (28). Es muy útil para estudiar la contribución de residuos específicos a la estructura y función de la proteína, así como para evaluar la contribución de residuos cargados en la superficie de la proteína sin interrumpir el plegamiento de su núcleo (29). Para llevarlo a cabo se requiere la producción de un gran número de mutantes puntuales mediante mutagénesis dirigida, lo que requiere el diseño y uso de un gran número de pares de oligonucleótidos, siendo un proceso laborioso, lento y propenso a errores. A pesar de que se han creado herramientas bioinformáticas para facilitar el diseño de oligonucleótidos mutagénicos a gran escala (30, 31), sigue siendo arduo cuando se quiere mutar grandes partes de una proteína.

En resumen, pese a que la eficiencia de la mutagénesis dirigida ha mejorado en los últimos años, sigue habiendo puntos importantes que se pueden optimizar, relacionados con el diseño de oligonucleótidos, coste y tiempo invertido, sobre todo cuando se necesita hacer mutaciones a gran escala.

2. PTEN

El gen *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), también conocido como *MMAC1* (*mutated in multiple advance cancers 1*) y *TEP1* (*tensin-like phosphatase*), fue identificado hace dos décadas como un gen supresor tumoral comúnmente inactivado en cánceres humanos y mutado en la línea germinal de pacientes con síndromes de cáncer hereditario. Localizado en el cromosoma 10q23.3 y formado por 9 exones, se encuentra mutado frecuentemente en cánceres humanos y, a menudo, muestra pérdida de heterocigosidad en tumores (32-34).

2.1. Función de la proteína PTEN

PTEN ejerce funciones esenciales, tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, y forma parte de la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K),

que genera en la membrana plasmática fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) en respuesta a estímulos extracelulares, y cuyo principal efector es la proteína quinasa B (PKB o Akt) (Figura 2). Esta ruta se encuentra hiperactivada en muchos tumores, promoviendo la supervivencia, crecimiento, proliferación y migración celular (35, 36). Aunque PTEN pertenece a la familia de las fosfatasas de tirosina (PTPs), su principal acción como supresor de tumores se debe a su actividad catalítica fosfatasa de lípidos sobre PIP₃, convirtiéndolo en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), razón por la cual contrarresta la activación de la ruta PI3K/PTEN/Akt (37).

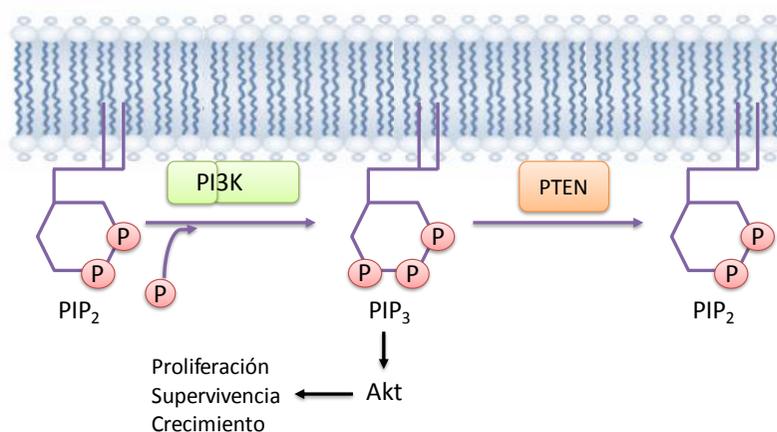


Figura 2. Ruta de señalización de PI3K/PTEN/Akt. La PI3K activada fosforila PIP₂ para producir PIP₃ en la membrana plasmática regulando varios procesos celulares. PTEN en la membrana actúa desfosforilando PIP₃ y dando lugar a PIP₂.

PTEN también participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La pérdida o mutaciones de PTEN están asociadas con defectos en la replicación del ADN y alteraciones en el huso mitótico, causando inestabilidad cromosómica. Por lo tanto, PTEN protege el genoma controlando múltiples procesos cromosómicos (38, 39). La deficiencia de PTEN también influye en muchos procesos metabólicos que afectan al crecimiento de células cancerosas y a la proliferación. PTEN interviene en la regulación de la glucólisis, la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno, el metabolismo de los lípidos y el metabolismo mitocondrial (40, 41). Por último, PTEN tiene un papel

relevante en la regulación de la motilidad celular, particularmente en el control de la direccionalidad de la quimiotaxis, y se ha sugerido que PTEN es potencialmente importante en el control de la angiogénesis en los tumores cerebrales (42).

2.2. Composición de dominios de la proteína PTEN

Formada por 403 aminoácidos, PTEN consta de un extremo N-terminal seguido por el dominio fosfatasa catalítico, un dominio C2 de unión a membrana y un extremo C-terminal con un motivo de unión a proteínas PDZ (43) (Figura 3).

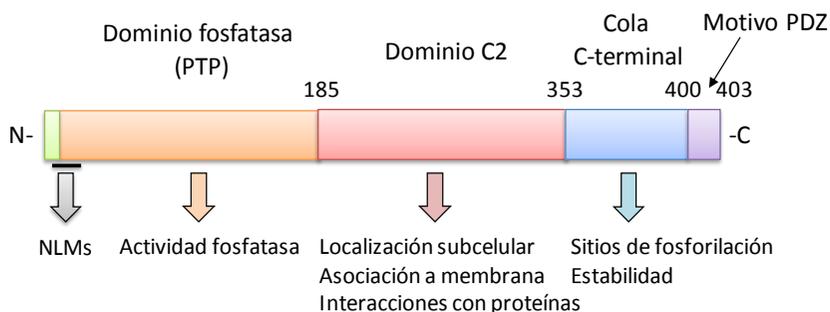


Figura 3. Dominios funcionales de la proteína PTEN. Motivos de localización N-terminal (NLMs): NLS, señal de localización nuclear; PBM, motivo de unión a PIP_2 ; CLS, señal de localización citoplásmica. PTP, dominio fosfatasa (aminoácidos 7-185); C2, dominio de unión a membrana (aminoácidos 185-353); cola C-terminal (aminoácidos 353-403) que incluye el motivo de unión a proteínas PDZ (aminoácidos 400-403).

La región N-terminal de PTEN es importante para el control de su localización subcelular y su función. Contiene una señal de localización nuclear (NLS, residuos 8-32) (44) y un motivo de unión a PIP_2 (residuos 6-14) (45) implicado en el direccionamiento a la membrana plasmática y activación de la enzima (43, 46, 47). El dominio fosfatasa (PTP) catalítico N-terminal (residuos 14-185) posee actividad frente a sustratos de proteína y lípidos como el PIP_3 (37). El dominio C2 (residuos 186-353) independiente de Ca^{2+} es necesario para reclutar PTEN a la membrana y ayudar a posicionar el dominio catalítico con respecto a su sustrato PIP_3 (43). Además, se ha visto que la expresión ectópica del dominio C2 de PTEN, en ausencia del dominio fosfatasa, es

capaz de reprimir la movilidad celular (48). La cola C-terminal (residuos 353-403), es diana de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la acetilación y la escisión por caspasa-3 (49-52). Desempeña un papel regulador en la función de PTEN al mediar interacciones intermoleculares e intramoleculares que regulan la estabilidad, la localización subcelular y la catálisis de PTEN (53-57). La eliminación de la cola C-terminal genera una proteína relativamente inestable, que se acumula en las membranas y en el núcleo (44, 47, 58, 59). La cola C-terminal contiene un motivo de unión a proteínas PDZ, que media la unión a proteínas de anclaje y reguladoras, tales como quinasas, fosfatasa o proteínas antioxidantes. El motivo PDZ también controla la unión de PTEN a la membrana (60-62).

PTEN posee tres regiones desestructuradas, las cuales no se han podido resolver mediante cristalización: la cola C-terminal, incluyendo el motivo de unión PDZ (residuos 353-403); un bucle interno de función desconocida en el dominio C2 (residuos 286-309); y el extremo N-terminal (residuos 1-7) (43).

2.3. Regulación de PTEN

Los cambios genéticos en el gen *PTEN* tienen grandes repercusiones en el desarrollo de patologías relacionadas con PTEN. Por otra parte, la desregulación de las funciones de PTEN es igualmente importante en enfermedades (63).

2.3.1. Regulación transcripcional

La transcripción de *PTEN* está regulada negativa y positivamente por diferentes factores de transcripción. El supresor tumoral p53, así como la proteína de respuesta a crecimiento EGR-1 (*early growth response protein 1*), el regulador metabólico PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*) y el factor de transcripción ATF2 (*activating transcription factor 2*) regulan de manera positiva la expresión génica de *PTEN* (64-67). *PTEN* también es regulado negativamente por el complejo Polycomb BMI1 (*B lymphoma Mo-MLV*), SNAIL, c-Jun y el factor nuclear kappa-B (NF-kB) (*nuclear factor kappa B*) (68-70). Además, NOTCH1 regula la transcripción de *PTEN* positiva y

negativamente a través del factor de transcripción CBF1 (*C-repeat binding factor 1*) (71).

La expresión de *PTEN* también está suprimida por mecanismos epigenéticos. En varios tipos de tumores se ha visto hipermetilación del promotor de *PTEN*, dando lugar a un silenciamiento transcripcional del gen, especialmente en tumores donde *PTEN* no está frecuentemente mutado o delecionado, como en melanoma y cáncer de pulmón (72-74).

2.3.2. Regulación postranscripcional

La expresión de *PTEN* está controlada por ARNs no codificantes (ncRNAs) epigenética y postranscripcionalmente. La regulación postranscripcional por micro-ARNs (miRNAs) es un mecanismo por el cual la expresión de genes supresores de tumores se desregula en cánceres. Los niveles elevados de algunos miRNAs, se correlacionan con una reducción de ARN mensajero (ARNm) de *PTEN* teniendo efectos en la tumorigénesis *in vivo* (75-77). Entre ellos, destacan el miRNA-19 y el miRNA-21; los cuales están afectados en cáncer y desregulan a *PTEN* en una gran variedad de tumores, incluyendo hepatocarcinomas, cánceres de ovario y pulmón. La inhibición del miRNA-21 está relacionada con un aumento en la expresión de *PTEN* dando lugar a un descenso en la migración y proliferación celular (78-80). Recientemente, se ha encontrado que los niveles del miRNA-25 son controlados por la activación de ERK regulando así negativamente los niveles de *PTEN* en melanoma (81).

2.3.3. Modificaciones postraduccionales

Oxidación

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden oxidar la cisteína (Cys124) localizada en el sitio activo y suprimir la actividad fosfatasa de *PTEN*. Por ello, un aumento en los niveles de estrés oxidativo intracelular puede desencadenar la inactivación de *PTEN* inducida por ROS y la activación de la ruta de señalización PI3K (82).

Fosforilación

La fosforilación de PTEN es uno de los principales mecanismos de regulación de la función de la proteína. PTEN es fosforilado en su dominio C2 y en el extremo C-terminal (Tabla 1). La fosforilación de residuos de la cola C-terminal inhibe la actividad catalítica de PTEN y estabiliza la proteína mediante la asociación de la cola C-terminal con el dominio C2, dando lugar a una conformación “cerrada” menos propensa a degradarse, pero a su vez, menos apta para interactuar con proteínas de membrana a través del dominio C2 (54). Por lo tanto, pese a ser más estable, esta conformación es menos activa. La autodesfosforilación de la cola C-terminal de PTEN libera su interacción inhibidora con el dominio C2, favoreciendo la competencia funcional de PTEN (83).

Se ha propuesto que PTEN puede existir en tres estados de activación distintos, dependiendo del estado de fosforilación de la cola (84): un estado completamente fosforilado (inactivo contra los sustratos de lípidos y proteínas), un estado parcialmente desfosforilado (que carece de fosfatos en la Ser366 y Thr370) que es activo solo contra sustratos solubles que incluyen fosfoproteínas, y un estado totalmente desfosforilado activo (Figura 4). Los estados de activación están mediados por interacciones inhibidoras intramoleculares entre la cola y los dominios C2 y fosfatasa, que ocluyen tanto la región de unión a la membrana como el sitio activo.

PTEN homodimeriza en la membrana plasmática (proceso fundamental para su completa activación). PTEN homodimerizado se encuentra en una conformación activa, ejerciendo su capacidad completa de fosfatasa lipídica (85). Mutantes de PTEN catalíticamente inactivos asociados a cáncer heterodimerizan con PTEN no mutado e inhiben la actividad catalítica de PTEN de una manera dominante negativa. La dimerización y, por tanto, la activación de PTEN están negativamente reguladas por la fosforilación de la cola C-terminal (85). La cola C-terminal de PTEN estabiliza la formación del dímero, por lo que la conformación cerrada dificulta dicha formación (86). Alteraciones en la fosforilación de la cola C-terminal también afectan a la localización nuclear de PTEN (44).

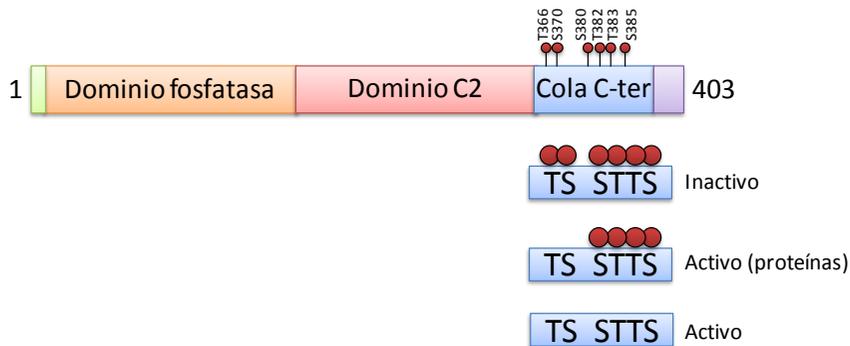


Figura 4. Estados de fosforilación de la proteína PTEN. Un estado inactivo (completamente fosforilado en los residuos T366, S370, S380, T382, T383 y S385 de la cola C-terminal), un estado activo solo contra fosfoproteínas (fosforilado en los residuos S380, T382, T383 y S385) y un estado activo (completamente desfosforilado).

Una de las principales quinasas que fosforila a PTEN en la región C-terminal es la CK2 (*Casein kinase 2*). Muchos sustratos de la CK2 son productos oncogénicos o proteínas supresoras tumorales, por lo que se le atribuye una función importante en la regulación del crecimiento celular (87). La CK2 fosforila a PTEN en los residuos Ser370, Ser380, Thr382, Thr383 y Ser385, regulando su estabilidad, actividad y localización subcelular (51). Además, la fosforilación de estos residuos por CK2 inhibe la proteólisis de PTEN por caspasa-3 durante la apoptosis (52). La GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) fosforila a PTEN en la Ser362 y Thr366 (88). A diferencia de la CK2, a la GSK3 β se le atribuye una función anti-oncogénica. Ambas quinasas pueden actuar sinérgicamente en la regulación de la actividad de PTEN. De especial interés para esta tesis, la ATM (*Protein kinase ataxia telangiectasia mutated*) fosforila la Thr398, controlando la exclusión de PTEN del núcleo en respuesta a estrés genotóxico y sensibilizando las células al daño del ADN (89).

Tabla 1. Quinasas de PTEN. Sitios de fosforilación de PTEN y sus efectos.

Quinasas	Sitios de fosforilación	Efectos en PTEN	Referencias
CK2	Ser370, Ser380, Thr382, Thr383, Ser385	Aumento de estabilidad, disminución de la actividad y localización subcelular (citoplasmática)	(51)
GSK3β	Ser362, Thr366	Descenso de la estabilidad y actividad	(88)
LKB1	Ser380, Thr382, Thr383, Ser385	Aumento de actividad	(90)
ROCK	Ser229, Thr232, Thr319, Thr321	Aumento de actividad y localización subcelular	(91)
Src	Tyr240, Tyr315	Descenso de actividad	(92, 93)
Plk1	Thr366, Ser370, Ser380, Thr382, Thr383	Aumento de la estabilidad y actividad	(94)
Plk3	Thr366, Ser370	Aumento de estabilidad y actividad	(95)
ATM	Thr398	Descenso de la localización nuclear en respuesta a estrés genotóxico	(89)
RAK	Tyr336	Aumento de estabilidad y actividad	(96)
CK1	Ser385	Desconocidos	(88)
MAST	Desconocidos	Desconocidos	(62)

CK2, casein kinase 2; GSK3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; LKB1, liver Kinase; ROCK, rhoA-associated protein kinase; Src, Src Kinase; Plk1, polo-like kinase 1; Plk3, polo-like kinase 3; ATM, protein kinase ataxia telangiectasia mutated; RAK, tyrosine-protein kinase FRK; CK1, casein kinase 1; MAST, microtubule-associated serine/threonine.

Ubiquitinación

La ubiquitinación de PTEN inhibe su actividad fosfatasa y está potenciada por el estrés hiperosmótico y la localización de membrana, por lo que la fosforilación C-terminal regula de manera indirecta la ubiquitinación (97). PTEN está regulado por poliubiquitinación y monoubiquitinación. La poliubiquitinación conduce a la degradación a través del proteosoma, mientras que la monoubiquitinación afecta a la localización subcelular facilitando la entrada al núcleo. La sobreexpresión de NEDD4-1 desencadena la poliubiquitinación de PTEN para la degradación proteosomal y, además, aumenta la monoubiquitinación de la Lys13 y Lys289, lo que promueve su localización nuclear (98, 99). Otras ubiquitin ligasas que contribuyen a la ubiquitinación

y degradación de PTEN son WWP2 (*WW domain-containing ubiquitin E3 protein ligase 2*) (100), XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) (101) y CHIP (*Carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein*) (102). Recientemente, se ha visto que la poliubiquitinación de PTEN en la Lys342 y Lys344 por la WWP1 (*WW domain-containing ubiquitin E3 protein ligase 1*) suprime la dimerización y reclutamiento de PTEN a la membrana, inhibiendo su función supresora tumoral. Además, se ha identificado que el indol-3-carbinol funciona como un potente inhibidor de la WWP1 reactivando la función de PTEN (103).

Acetilación

La acetilación también puede regular la actividad y función de PTEN. La histona acetiltransferasa PCAF (*acetyltransferase P300/CBP-associated factor*) acetila la Lys125 y Lys128 del dominio fosfatasa en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, inhibiendo la actividad de PTEN (104). El motivo PDZ del dominio C-terminal de PTEN también es acetilado por la proteína de unión al factor de transcripción de respuesta cAMP, CREB (CBP) en la Lys402, afectando a la interacción de PTEN con proteínas con dominios PDZ (50).

Sumoilación

La sumoilación de PTEN en la Lys266, localizada en el *loop* CBR3, promueve la unión de PTEN a la membrana mediante interacciones electrostáticas (105). PTEN sumoilado también está involucrado en el proceso de reparación del ADN. La sumoilación en la Lys254 da lugar a retención nuclear (89). Se ha visto, que tras estrés genotóxico la quinasa ATM fosforila a PTEN en la Thr398, en asociación con una reducción de los niveles de SUMO-PTEN. Las funciones de SUMO-PTEN ocurren al mismo tiempo que el ensamblaje de complejos de reparación del ADN, aunque el papel de PTEN en este proceso todavía no está claro (106).

Además, se han descrito otras modificaciones postraduccionales de PTEN, como nitrosilación (107, 108), alquilación (109), carbonilación (110) y ribosilación (111).

2.4. Isoformas de PTEN

2.4.1. PTEN-L/α

En 2013, Parsons y colaboradores descubrieron una nueva isoforma de PTEN que denominaron PTEN-Long (64,9 kDa), la cual se traduce a partir de un codón CUG conservado (112). Los tripletes que difieren del AUG (primera metionina de PTEN canónico) en solo un nucleótido también pueden iniciar la síntesis de la cadena polipeptídica en células de mamífero en un contexto apropiado (113). Esta isoforma, que posteriormente ha sido denominada PTEN α por otro grupo de investigación (114), muestra una región traducida de forma alternativa en el extremo N-terminal, con 173 aminoácidos adicionales a la proteína canónica. Con el fin de unificar la nomenclatura y la numeración de aminoácidos, se ha propuesto la nomenclatura PTEN-L para esta isoforma (115).

En la extensión N-terminal de PTEN-L existe una señal de secreción que se corresponde con una secuencia corta de poli-alaninas (A12-A17-L) y un sitio de escisión (S22-L), que permiten la secreción de PTEN-L fuera de la célula. La secuencia N-terminal también contiene un motivo de poli-argininas (R47-R52-L), que actúa como una secuencia de internalización que permite la entrada de PTEN-L en las células (112), aunque también se ha propuesto como una señal de localización nuclear (116) (Figura 5). Por otra parte, PTEN-L también ha sido localizado en la mitocondria, participando en el proceso de transporte de electrones e induciendo la actividad de la citocromo c oxidasa y la producción de ATP, así como regulando negativamente la mitofagia (114, 117, 118).

Por último, se ha propuesto que la extensión N-terminal de PTEN-L sirve para dotar a PTEN de mayor estabilidad conformacional, lo que facilitaría sus funciones fuera de la célula (119).

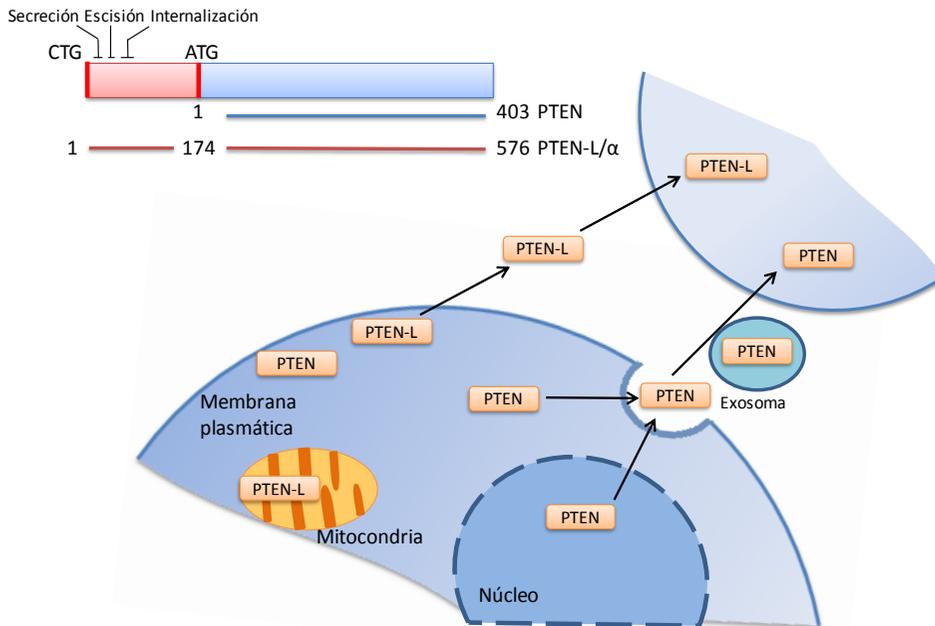


Figura 5. Isoformas de PTEN y formas de secreción. PTEN-L puede actuar en su célula de origen de manera similar al PTEN canónico asociándose a la membrana. Asimismo, PTEN-L puede ser liberado al espacio extracelular donde puede interactuar con proteínas y lípidos extracelulares, así como con glucoproteínas de la superficie de otras células para entrar en ellas. PTEN-L también se localiza en mitocondrias regulando funciones mitocondriales. Por otro lado, PTEN canónico también puede ser secretado en exosomas (ver apartado de localización). Arriba, está representado PTEN (403 aminoácidos, línea azul) y PTEN-L (576 aminoácidos, línea roja). Se indica la secuencia de secreción de poli-alaninas (A12-A17-L), el sitio de escisión (S22-L) y el motivo de internalización de poli-argininas (R47-R52-L) de PTEN-L.

PTEN-L puede compartir los mismos mecanismos de regulación que PTEN canónico, aunque pueden existir mecanismos de regulación alternativos que afecten específicamente a su extensión N-terminal (117).

Actividad de PTEN-L

PTEN-L tiene actividad enzimática, pero su catálisis está menos caracterizada que la de PTEN. Se ha visto que PTEN-L está activado de manera constitutiva, independientemente de PIP_2 . Quizás algunos de los residuos N-terminales adicionales en PTEN-L se unen al motivo PIP_2 e imitan la unión de PIP_2 . Se ha propuesto la existencia de un elemento de unión a la membrana en la extensión N-terminal de

PTEN-L, denominada hélice de unión a la membrana (MBH) (residuos 151-174), la cual podría interactuar con la superficie de la membrana o funcionar como una hélice transmembrana. La MBH altera el mecanismo de unión a la membrana de PTEN-L en comparación con PTEN, lo que también podría dar cuenta de diferencias en las cinéticas de ambas enzimas (84).

2.4.2. Otras isoformas de PTEN

Recientemente, se ha informado de la existencia de más proteoformas de PTEN no iniciadas por AUG que se expresan en células humanas: PTEN-M, PTEN-N y PTEN-O (120). La isoforma PTEN-M (también llamada PTEN β) comprende una extensión N-terminal de 146 aminoácidos en comparación con la proteína canónica PTEN (Figura 6). PTEN-M no contiene la secuencia de señal de secreción N-terminal, y se localiza predominantemente en el nucleolo, regulando negativamente la transcripción del ADN ribosómico, la biogénesis de los ribosomas y la proliferación celular (121). Se ha observado que todas estas proteoformas de PTEN pueden reducir la fosforilación de Akt a niveles similares a los de PTEN y PTEN-L (120).

Además, se han identificado varias variantes de *splicing* en PTEN (122, 123), entre las que destaca PTEN- Δ , la cual carece de los 61 residuos C-terminales de PTEN codificados por el exón 9 (124) (Figura 6).

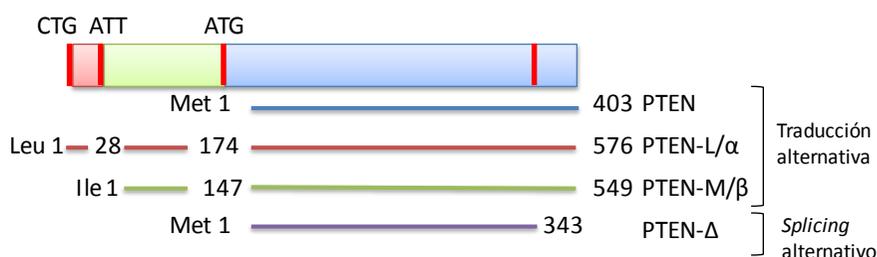


Figura 6. Isoformas de PTEN. PTEN (403 aminoácidos, línea azul). PTEN-L/α (576 aminoácidos, línea roja) su aminoácido 174 es el aminoácido 1 de PTEN canónico. PTEN-M/β (549 aminoácidos, línea verde) posee 146 aminoácidos N-terminales adicionales respecto a PTEN. La isoforma de *splicing* PTEN-Δ (343 aminoácidos, línea morada) carece de la cola C-terminal.

2.5. Localización subcelular de PTEN

2.5.1. PTEN en la membrana plasmática

La interacción de PTEN con la membrana plasmática es esencial para que PTEN desfosforile PIP_3 , controlando correctamente la proliferación y el crecimiento celular. El motivo de unión a PIP_2 N-terminal, el dominio C2 y la cola C-terminal de PTEN están implicados en su direccionamiento a la membrana.

El motivo N-terminal conservado de PTEN es necesario para la correcta orientación en la membrana, la actividad celular y la función supresora tumoral (125, 126). La unión de PTEN a PIP_2 hace que los gradientes locales de PIP_2 y PIP_3 influyan en la unión a la membrana y en la activación de PTEN (127). De hecho, se han encontrado mutaciones somáticas asociadas a tumores en el extremo N-terminal que reducen su capacidad para unirse a la membrana plasmática. Además, el gradiente PIP_3 - PIP_2 regula la movilidad celular y polaridad en muchos tipos celulares (128-130).

Aunque la unión a la membrana y la actividad de PTEN están reguladas negativamente por la fosforilación de su cola C-terminal (55, 61, 131) (Figura 7), las mutaciones en esta región parece que no afectan de forma directa a la actividad catalítica de la proteína, sino más bien a su estabilidad, causando solo una pérdida parcial de la función (58, 132, 133). De hecho, la frecuencia de mutaciones en la cola C-terminal asociadas a tumores es baja comparada con otras regiones de PTEN.

La unión de PTEN a la membrana es dinámica y transitoria, se une durante unos pocos milisegundos, tiempo suficiente para degradar varias moléculas de PIP_3 . La baja afinidad de PTEN por la membrana indica que, en condiciones normales, PTEN está en una conformación cerrada. La asociación dinámica de la membrana podría modularse temporal o espacialmente para alterar la actividad de PTEN en situaciones fisiológicas específicas y podría tener implicaciones importantes para la función supresora tumoral (134).

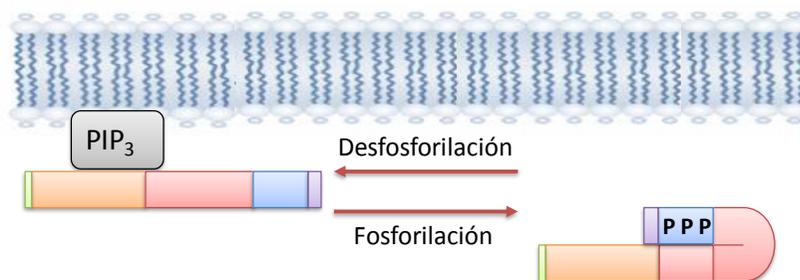


Figura 7. Regulación conformacional de PTEN. La cola C-terminal de PTEN fosforilada da lugar a una conformación cerrada de PTEN localizándose en el citoplasma. La desfosforilación de la cola abre la conformación dirigiendo a PTEN a la membrana.

2.5.2. PTEN nuclear

Se ha sugerido que la entrada y acumulación de PTEN en el núcleo puede controlarse mediante una variedad de mecanismos moleculares.

-Coexistencia de regiones reguladoras intrínsecas tanto de entrada nuclear positiva (NLS-like) como de entrada nuclear negativa (motivos de exclusión nuclear) en la molécula PTEN (44). La región N-terminal de PTEN es importante para el control de la localización subcelular y su función. Contiene una secuencia de localización nuclear NLS-like (residuos 8-32) y un motivo de unión a PIP_2 implicado en el direccionamiento a la membrana plasmática (47). La coexpresión con una proteína RanGTPasa dominante negativa bloquea la acumulación de PTEN en el núcleo, también afectada por la coexpresión con importinas. En concreto se ha visto que la importina-11 es requerida para el importe nuclear de PTEN (135).

-Existencia de secuencias similares a la NLS en PTEN que median la entrada nuclear por la proteína MVP (*major vault protein*) (136).

-Modelo de difusión pasiva. PTEN podría ingresar en el núcleo por difusión pasiva, independiente de Ran, a través de poros nucleares (137). Utilizando proteínas de fusión PTEN de tamaño variable, se ha observado que las proteínas de fusión PTEN grandes (4100 kDa) no muestran localización nuclear, mientras que PTEN solo (47 kDa) o una

proteína de fusión fluorescente verde GFP-PTEN (74 kDa) están presentes tanto en el citoplasma como en el núcleo.

En el núcleo, PTEN regula la estabilidad del genoma, la reparación del ADN, el ciclo celular, la expresión génica y la apoptosis (89, 138). La falta de PTEN nuclear en algunos cánceres humanos se asocia con progresión tumoral y se ha propuesto como un factor de mal pronóstico para algunos tipos de tumores (138, 139). Dentro del núcleo, PTEN interacciona con la proteína C de unión específica del centrómero (CENP-C) para modular la estabilidad del centrosoma (140). Asimismo, se encuentra involucrado en la regulación transcripcional, controlando la remodelación de la cromatina. Se asocia con la histona H1, a través de su dominio C-terminal, promoviendo la condensación de la cromatina, por lo que la pérdida de PTEN o de su dominio C-terminal daría lugar a la descondensación y activación génica (141).

En un principio, se describió que PTEN se localizaba en el núcleo como consecuencia del ciclo celular (142), aunque más adelante se observó que en el núcleo completaba sus funciones supresoras de tumores, controlando la progresión del ciclo celular al disminuir los niveles de ciclina D1 en el núcleo y regulando la senescencia celular y el metabolismo (143, 144).

Por otro lado, se ha observado que la función de PTEN en el núcleo es independiente de su actividad catalítica que más bien depende de la interacción física de PTEN con proteínas nucleares, tales como el supresor tumoral p53. Estas interacciones se ven afectadas por las alteraciones de la cola C-terminal (145), la cual es también importante para su localización nuclear (146), estando involucrada en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la supresión de la tumorigénesis (147). Asimismo, se ha sugerido que PTEN nuclear puede mediar en la supresión del crecimiento, independientemente de la actividad de Akt, mientras que PTEN citoplásmico media la inducción de apoptosis (148, 149). Estas observaciones que definen un papel proapoptótico para el PTEN citoplásmico se contradicen con otros estudios, donde se asigna una función proapoptótica al PTEN nuclear (44).

2.5.3. PTEN en la mitocondria y retículo endoplásmico (RE)

PTEN también interactúa con orgánulos que contienen membranas intracelulares, como el retículo endoplásmico y las membranas asociadas a las mitocondrias (MAMs) (150). En las mitocondrias, mantiene la producción de ROS y contribuye a la apoptosis dependiente de estas. PTEN-L se localiza parcialmente en la mitocondria lo que favorece el mantenimiento de la estructura y función mitocondrial. También se ha sugerido que PTEN-L colabora con PTEN canónico en la regulación mitocondrial del metabolismo energético (114).

2.5.4. PTEN extracelular

PTEN puede ser exportado dentro de vesículas extracelulares tipo exosomas, e internalizarse en células receptoras, donde puede desempeñar su actividad funcional como supresor tumoral. La secreción de PTEN en exosomas requiere Ndfip1, una proteína adaptadora para los miembros de la familia Nedd4 de ubiquitin ligasas E3. Además, la lisina 13 de PTEN, se requiere para su ubiquitinación por Nedd4-1, siendo importante para el transporte exosómico de PTEN (151). Esta capacidad de PTEN de ejercer sus funciones, en células receptoras, tiene importantes implicaciones para la supresión tumoral, aunque también se ha propuesto que los exosomas podrían propagar versiones de PTEN mutado causante de tumorigénesis (152). PTEN también puede secretarse sin ser empaquetado en vesículas, debido a su isoforma PTEN-L.

2.6. Alteraciones genéticas

Se han identificado mutaciones somáticas asociadas a tumores en el promotor y en los nueve exones de PTEN, incluyendo mutaciones de cambio de aminoácido, sin sentido, deleciones e inserciones (Figuras 8 y 9A). Asimismo, en carcinoma de endometrio, glioblastoma y cáncer de próstata, la deleción monoalélica o completa de *PTEN* es algo bastante frecuente (153) y muchos tipos tumorales presentan una regulación negativa en la expresión del ARNm de PTEN (Figura 9B). La mayoría de las mutaciones identificadas causan pérdida total o parcial de la función de PTEN, y

muchas mutaciones de cambio de aminoácido pueden actuar, además, como un factor dominante negativo para inhibir la actividad catalítica de PTEN silvestre (85).

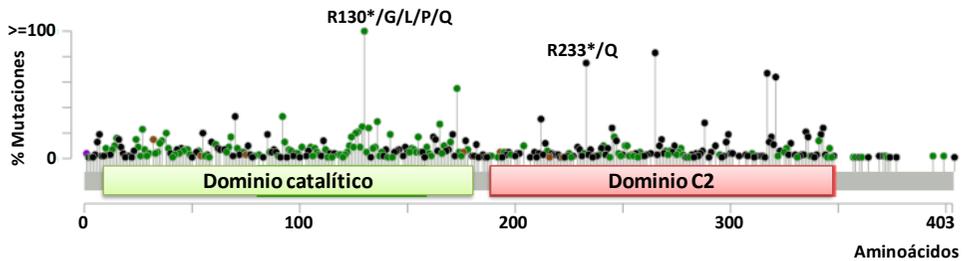


Figura 8. Frecuencia de mutaciones de PTEN en tumores. Los puntos verdes representan mutaciones con cambio de aminoácido. Los puntos marrones representan mutaciones que cambian el marco de lectura. Los puntos negros indican mutaciones que causan codones de terminación prematura. Los puntos morados representan residuos con alteraciones mixtas. Datos obtenidos de la base de datos cBioPortal (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) (<http://cbiportal.org/>).

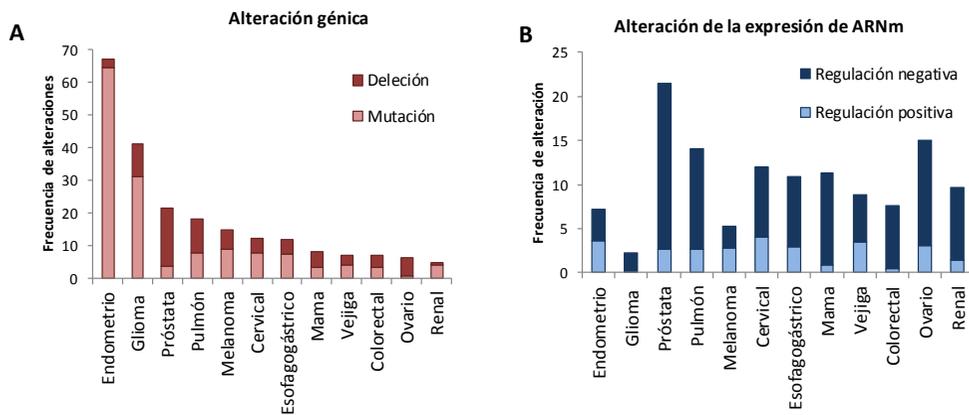


Figura 9. Alteraciones de PTEN en tumores humanos. **A)** Frecuencia de deleciones y mutaciones del gen *PTEN* en tumores. **B)** Frecuencia de regulación negativa y positiva del ARNm de *PTEN* en tumores. Los tumores de endometrio y de glioma son los que mayor frecuencia de mutación de *PTEN* presentan, mientras que los tumores de próstata presentan alta frecuencia de deleciones y regulación negativa del ARNm de *PTEN*. Datos obtenidos de la base de datos cBioPortal (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) (<http://cbiportal.org/>).

El gen *PTEN* también se encuentra frecuentemente mutado en la línea germinal de pacientes con determinados síndromes tumorales hereditarios, los cuales están caracterizados por trastornos del desarrollo, déficits neurológicos, hamartomas múltiples y un mayor riesgo de cáncer de mama, tiroides y endometrio. Se denominan síndromes tumorales hamartomatosos asociados a *PTEN* (PHTS), e incluyen el síndrome de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos, el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba y los síndromes de Proteus y Proteus-like (154-156). Las mutaciones de *PTEN* en pacientes con PHTS provocan la desregulación de la señalización de PI3K y la activación de Akt (157). Estudios recientes caracterizan algunas mutaciones de línea germinal de *PTEN* asociadas a PHTS con macrocefalia y retrasos del neurodesarrollo (158, 159), donde un 20% de los individuos diagnosticados con macrocefalia y trastorno del espectro autista (ASD) poseen mutaciones en la línea germinal de *PTEN* (160). ASD es un trastorno del neurodesarrollo con una media de edad en el primer diagnóstico de 3,8 años (161). La mayoría de los casos de ASD no tienen un origen genético conocido. Además, la presentación clínica de esta enfermedad es muy heterogénea, tal y como se refleja en la diversidad genética del trastorno (162). Se ha comprobado que en ratones la delección de *PTEN* en células progenitoras neurales o neuronas postmitóticas da lugar a macrocefalia, arborización dendrítica excesiva y características autistas (163, 164).

2.7. PTEN en el cáncer genitourinario

El cáncer urológico incluye, principalmente, neoplasias de la próstata, vejiga urinaria y del riñón, tres tipos distintos de tumores de relativa alta incidencia contra los que no se dispone de terapias dirigidas efectivas.

El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en la población masculina española, y constituye la tercera causa de mortalidad asociada a cáncer en varones. Es un cáncer de latencia larga, que evoluciona desde estadios tempranos de baja malignidad a adenocarcinomas de bajo y alto grado y a metástasis (165, 166). En cuanto a los cambios en la expresión genética, el gen del receptor de andrógenos (*AR*) es frecuentemente el más alterado en las metástasis del PCa (167,

168). Una de las alteraciones moleculares más frecuente que ocurre en el PCa es la fusión o reordenación de genes. El 50% de los casos muestran fusiones de genes de respuesta a andrógenos (*TMPRSS2* (*Transmembrane Serine Protease 2*)) con factores de transcripción oncogénicos de la familia *ETS* (*E26 transformation-specific*) (principalmente *ERG*) (169, 170).

La inactivación completa de *PTEN* en próstata desencadena un cáncer de próstata invasivo (171). En ratones *knock-out* para el gen *PTEN*, se ha observado un aumento en la proliferación y en el tamaño de células epiteliales de la próstata, grandes áreas de hiperplasia, lesiones de neoplasia intraepitelial y un aumento de peso de la próstata, lo cual indica una contribución importante a la tumorigénesis (172, 173). Además, la eliminación homocigótica de *PTEN* conduce a cambios en la expresión génica observados también en los cánceres de próstata humanos (174).

El cáncer renal ocupa el undécimo lugar en cuanto a la incidencia en la población masculina española, sin que existan terapias específicas efectivas frente a las formas avanzadas de este tipo de cáncer. La mayor parte (95%) de los cánceres renales son carcinomas de células renales (RCC), de los cuales existen varios tipos, con etiología, clasificación histológica y pronóstico diferente. El más frecuente y el de peor pronóstico es el RCC de células claras (CCRCC) (75%). El RCC papilar (15%) y el RCC cromóforo (5%) son menos frecuentes y presentan menor agresividad. La heterogeneidad intratumoral es una propiedad intrínseca compartida por varios tipos de cáncer y se puede presentar a nivel histopatológico, inmunohistoquímico y genético, siendo el RCC uno de los tipos de cáncer donde se manifiesta con mayor intensidad (175). Aproximadamente, el 5% de CCRCC se consideran que tienen un componente hereditario, que a menudo se puede atribuir a una única alteración en la línea germinal (176-178).

El cáncer de vejiga (BCa) ocupa el quinto lugar (cuarto lugar en población masculina) en cuanto a incidencia del cáncer en España, englobando un grupo heterogéneo de carcinomas. El carcinoma de células transicionales es el más frecuente (90%), el cual se presenta mayoritariamente (70%) como carcinoma no músculo-

infiltrante, con pronóstico favorable, pero con frecuente recurrencia y progresión hacia mayor malignidad. Las formas de carcinoma músculo-infiltrante son de peor pronóstico, con una tasa de mortalidad del 50% a los 5 años (179).

Modelos de ratón que eliminan *PTEN* del epitelio urogenital desarrollan carcinomas con una alta frecuencia en próstata, pero con una baja frecuencia en vejiga, a pesar de haber hiperplasia en ambos órganos. En vejiga, la proliferación celular es inicialmente alta en ratones deficientes en *PTEN* recién nacidos, pero en pocos días se inhibe por la inducción de p21. Por el contrario, la proliferación permanece elevada en próstata donde nunca se induce p21, lo que sugiere que la inducción de p21 es un mecanismo compensador específico de la vejiga para inhibir la proliferación causada por la delección de *PTEN* (180).

La asociación entre pérdida de función de *PTEN* y malignidad en cánceres urológicos está ampliamente documentada. En tumores avanzados de PCa el 70% de los casos son deficientes en el gen o en la actividad de *PTEN* y el 10% de los tumores de próstata presentan mutaciones puntuales en *PTEN* (181-183). La expresión de *PTEN* disminuye frecuentemente en los casos avanzados de BCa y RCC, aunque la frecuencia de delección génica de *PTEN* en estos cánceres es considerablemente menor a la observada en PCa (184, 185) y la pérdida completa ocurre en menos del 10% (186). Además, mutaciones de línea germinal de *PTEN* han sido asociadas con el desarrollo de carcinoma de células renales (187).

El patrón de mutaciones de próstata y riñón es similar (Figura 10); sin embargo, los tumores de próstata están enriquecidos en delecciones génicas. En carcinomas de vejiga podemos observar que hay menos mutaciones totales en comparación con los otros dos tumores (Figura 9A). También existen diferencias entre los dos dominios principales de *PTEN*. El dominio PTP sigue un patrón mutacional similar en los 3 tipos de tumores, exceptuando el número de mutaciones sinónimas, que es mayor en vejiga. El dominio C2 muestra diferencias, sobre todo en el número de delecciones que abundan en próstata; sin embargo, en vejiga se puede observar un mayor número de mutaciones sin sentido (Figura 10) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>).

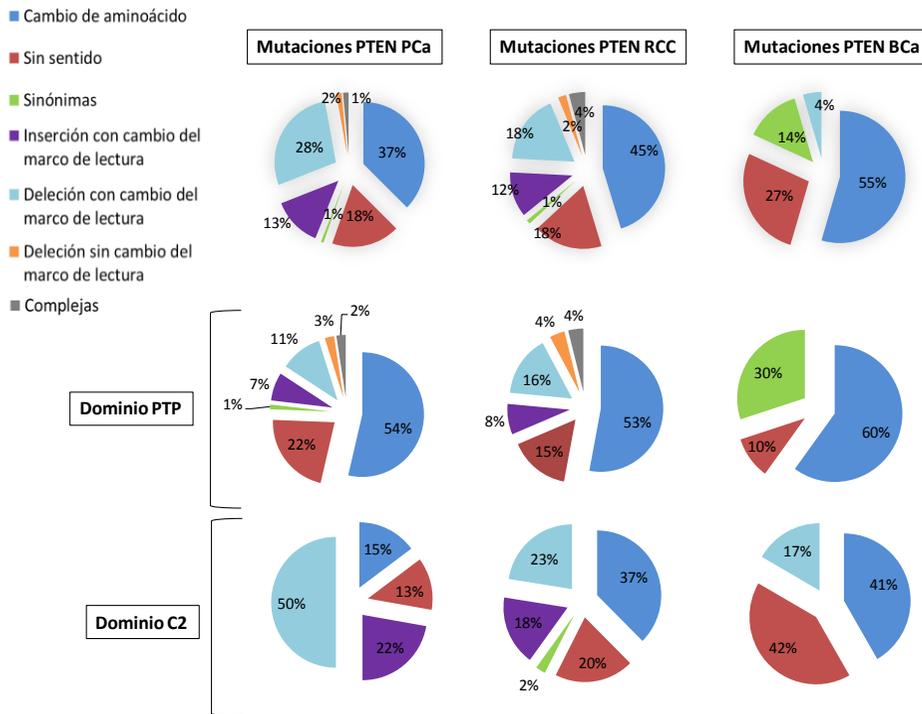


Figura 10. Porcentaje de diferentes tipos de mutaciones puntuales del gen *PTEN* en los tumores genitourinarios (próstata, vejiga y riñón). Los datos han sido obtenidos de la base de datos COSMIC (188) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>).

2.8. Anticuerpos anti-PTEN frente a la región C-terminal

La inmunohistoquímica analítica (IHC), se basa en el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) que se dirigen a proteínas biomarcadoras específicas, y constituye una de las primeras líneas de diagnóstico en la oncología clínica moderna. Esta técnica proporciona información molecular y local a nivel de célula individual sobre la expresión del biomarcador en todo el tumor y su microentorno, guiando al patólogo en el diagnóstico y pronóstico de la mayoría de las neoplasias malignas sólidas (189-191).

La especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad son factores esenciales para validar anticuerpos monoclonales como herramientas de IHC en la práctica clínica (192-195). Sin embargo, a menos que se utilicen péptidos sintéticos cortos como inmunógenos en la obtención de AcM, la definición topológica y bioquímica precisa del

epítipo reconocido por el AcM es a menudo pasada por alto. Dicha caracterización es importante para proporcionar información sobre posibles reactividades cruzadas del antígeno y para mejorar el diseño de los AcM (196). La precisión en el mapeo de epítipos es importante en proteínas con mecanismos de traducción alternativos o de *splicing* alternativo del ARNm, así como en proteínas que sufren modificaciones postraduccionales, como la fosforilación (197). Además, muchos de estos marcadores proteicos a menudo sufren mutaciones en tumores, lo que puede afectar al reconocimiento por los AcM (198, 199).

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de PTEN en tumores complementa los datos genéticos y de expresión del ARNm, proporcionando información sobre la célula individual que expresa la proteína. La pérdida de expresión de la proteína PTEN confiere ventajas para el crecimiento tumoral, por lo que PTEN se ha convertido en un importante marcador de pronóstico en varios cánceres humanos, como el cáncer de mama o de próstata, ambos de alta prevalencia (200-203). Aunque existe variabilidad entre los diferentes estudios que analizan la presencia de PTEN en tumores mediante IHC, cuando se consideran los datos de una forma global se observa un patrón relativamente homogéneo de la alteración de la expresión de PTEN en neoplasias humanas. La mayoría de los tipos de tumores muestran una pérdida total o parcial de la expresión de la proteína PTEN en el 40-50% de los casos (Figura 11). Por ejemplo, la pérdida de la proteína PTEN se ha encontrado en casi un 50% de los casos de cáncer de mama mediante análisis inmunohistoquímicos (204). Resultados similares han sido descritos en tumores de pulmón, colon y próstata, entre otros (205-207). La incidencia de la pérdida de PTEN en tumores humanos es alta, incluso en ausencia de alteraciones genéticas de PTEN, lo que hace importante el examen por IHC de la expresión de PTEN en tejidos neoplásicos. Sin embargo, la detección de PTEN en tumores mediante IHC todavía no se ha implementado de manera rutinaria como criterio de diagnóstico o pronóstico oncológico.

Existe variabilidad entre los distintos AcM anti-PTEN usados en IHC, por lo que se han realizado estudios para optimizar, validar y normalizar los AcM disponibles (208-

215). La caracterización precisa de la reactividad de estos AcM anti-PTEN es importante antes de implementar su uso estandarizado en oncología clínica.

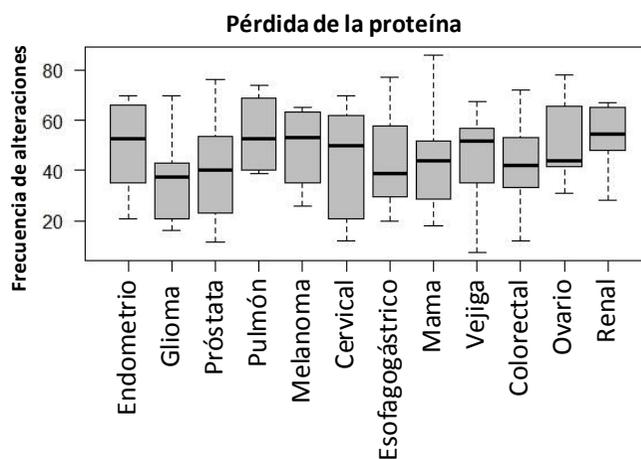


Figura 11. Diagrama de cajas de la frecuencia de pérdida de la proteína PTEN en tumores humanos, según lo detectado por IHC. Los bigotes representan el mínimo y el máximo de todos los datos; las cajas representan los valores entre el cuartil 1 y 3, y las líneas dentro de las cajas representan la mediana. Los datos corresponden a una amplia selección de estudios con distintos AcM anti-PTEN, como se describe en (216).

II. HIPÓTESIS

Ante los antecedentes descritos sobre el supresor tumoral PTEN, postulamos que:

1. La obtención de mutaciones de PTEN a gran escala requiere la optimización de los protocolos de mutagénesis dirigida.
2. El diagnóstico oncológico de precisión basado en la expresión de PTEN en muestras biológicas requiere la detallada caracterización de los epítomos reconocidos por los AcM anti-PTEN utilizados. Modificaciones postraduccionales de la proteína PTEN y mutaciones en el gen *PTEN* en pacientes podrían afectar al reconocimiento de los AcM.
3. La región N-terminal de PTEN posee un gran potencial regulador, por lo que mutaciones en esta región asociadas a enfermedad podrían afectar de diferente forma a la localización, estabilidad y actividad de la proteína.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido estudiar la patogenicidad de alteraciones en la proteína PTEN. Los objetivos específicos son:

1. Optimizar el rendimiento y la eficacia del proceso de mutagénesis dirigida cuando se desean grandes cantidades de sustituciones de aminoácidos.
2. Realizar una caracterización molecular de epítomos de la región C-terminal de PTEN, utilizando AcM anti-PTEN comerciales con posible aplicabilidad clínica.
3. Analizar funcionalmente las mutaciones encontradas en pacientes en la región N-terminal de PTEN. Comparar las variantes encontradas en esta región en cánceres genitourinarios (próstata, riñón y vejiga) en PTEN y PTEN-L.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Técnicas de biología molecular

1.1. Mutagénesis dirigida

Para la introducción de mutaciones en una secuencia de ADN presente en un plásmido, se utilizó una optimización del protocolo de mutagénesis dirigida *QuikChange*. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μ l.

Tabla 2. Condiciones utilizadas en la reacción de PCR.

	Temperatura	Tiempo
18 ciclos	95°C (Desnaturalización)	1 min
	95°C (Desnaturalización)	50 seg
	60°C (Alineamiento)	50 seg
	68°C (Elongación)	5 min
	68°C (Elongación final)	7 min

Para la reacción de PCR se utilizó la ADN polimerasa Pwo (Roche, Switzerland), y las condiciones de PCR que se utilizaron se indican en la tabla 2. El producto de PCR fue tratado a 37°C durante 2 h con 0,15 μ l de DpnI (20 U/ μ l; New England Biolabs), con el fin de digerir el ADN parental metilado, quedando el ADN amplificado que posee la mutación, el cual se puede usar directamente para transformar bacterias competentes.

1.2. Purificación de ADN plasmídico

Para transformar bacterias se mezcló 1 μ l (0,5 μ g) de ADN plasmídico, o 2 μ l del producto de una mutagénesis tratado con DpnI, en un tubo de polipropileno con 10 μ l de TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) y 10 μ l de TCM 10X (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂). Tras 5 min en frío, se añadió 25 μ l de bacterias competentes *Escherichia coli* DH5 α generadas con el método de CaCl₂.

Para generar las bacterias competentes, se inoculó 5 ml de medio LB (Luria-Bertani) (1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl) con una colonia bacteriana fresca y se incubó a 37°C toda la noche en agitación. Al día siguiente, se

incubó 1 ml del inóculo en 50 ml de medio LB y se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0,6. A partir de aquí, se trabajó en frío para mantener la integridad de las bacterias. A continuación, se centrifugó 10 min a 4000 rpm a 4°C, y el *pellet* obtenido se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M. Tras volver a centrifugar, el *pellet* fue finalmente resuspendido en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y 20% glicerol y se hicieron alícuotas de las células competentes obtenidas, las cuales se conservaron a -80°C.

Una vez mezclado el ADN y las bacterias competentes, se incubó durante 30 min en hielo. En un baño de agua a 42°C se realizó el choque térmico durante 90 segundos, agitando de vez en cuando. Tras 10 min a temperatura ambiente, se añadió 0,5 ml de medio selectivo LB y se incubó 80 min en agitación a 37°C. Finalmente, se sembró en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml, a 37°C durante 24 h.

El ADN plasmídico de las colonias obtenidas fue extraído por dos métodos en función de nuestros requerimientos:

-Purificación a pequeña escala (miniprep) mediante el kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel). Para ello, las colonias se incubaron en 5 ml de LB+ampicilina toda la noche a 37°C en agitación.

-Purificación a gran escala (midiprep) con el kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel). Este método se empleó cuando se precisaba mayores cantidades de ADN y se realizó a partir de las colonias bacterianas crecidas en 100 ml de LB+ampicilina con agitación a 37°C durante toda la noche.

Digerimos 3 µg del ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción adecuadas, usando como marcador de tamaño (kb) fago λ digerido con la enzima BstEII. Las digestiones se resolvieron en un gel de agarosa al 1% con Gel Red™ Nucleic Acid Stain (Biotium) y se visualizaron con el sistema de imagen G:BOX y su programa de análisis Gene Snap (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Todas las mutaciones generadas fueron comprobadas mediante secuenciación de ADN (ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies)) llevada a cabo por la Plataforma de Genética-Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia. El análisis de las secuencias de ADN lo realizamos usando el programa BioEdit.

1.3. Plásmidos

Los plásmidos pENTR PTPRZ-B y pCDNA3-PTPRZ-B fueron proporcionados por W. Hendriks (Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands) (217). Los plásmidos pRK5 PTEN, pYES2 PTEN, YCpLG myc-p110 α -CAAX, pRK5 GST-PTEN, pRK5 Flag-PTEN, pRK5 PTEN-GFP y pSG5 AKT1 han sido descritos previamente (44, 51, 218). Las mutaciones en dichos plásmidos fueron obtenidas mediante mutagénesis dirigida. El plásmido pYES2 PTEN-L (residuos 22-576) fue proporcionado por V. Cid (Universidad Complutense, Madrid) (219). El plásmido pRK5 PTEN-L (residuos 1-576) se generó subclonando el plásmido pGEX 6P1 PTEN long (proporcionado por N. Leslie, Institute of Biological Chemistry, Biophysics and Bioengineering, Edinburgh, Scotland) y añadiendo los 20 aminoácidos N-terminales de PTEN-L mediante PCR. pRK5 PTEN- Δ (residuos 1-343-Ser), así como todas las mutaciones de sustitución de aminoácidos de PTEN, PTEN-L, GST-PTEN, PTEN-GFP y PTEN-L-GFP se obtuvieron a partir de los plásmidos pRK5/pYES2 PTEN, pRK5/pYES2 PTEN-L, pRK5 GST-PTEN, pRK5 PTEN-GFP y pRK5 PTEN-L-GFP mediante mutagénesis dirigida (220). Los plásmidos pCDNA3.1 SERPINB9-Flag (NP_004146.1) y pReceiver CAMK2G-Flag (NP_751911.1) se adquirieron de GenScript y GeneCopoeia, respectivamente. Todas las mutaciones se confirmaron mediante digestiones de restricción y secuenciación de ADN. La numeración de nucleótidos y aminoácidos para las variantes de PTEN corresponde a las secuencias con los números de acceso NM_000314.4 y NP_000305.3, respectivamente.

2. Cultivos de células de mamíferos

2.1. Líneas celulares

Las células COS-7 (línea celular de riñón de mono) y MCF7 (línea celular humana de adenocarcinoma de mama), que expresan PTEN de forma endógena, se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Lonza, USA) complementado respectivamente con 5% y 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS), 1 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina.

Las células LNCaP (línea celular humana de adenocarcinoma de próstata) y Caki (línea celular humana de carcinoma renal) fueron cultivadas en RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) complementado con 10% FBS, 1 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina. Las células LNCaP no expresan PTEN endógeno a diferencia de las células Caki.

Las células U87-MG (línea celular humana de glioblastoma), que no expresan PTEN endógeno, se cultivaron en DMEM complementado con 10% FBS, 1 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina.

Todas estas líneas celulares adherentes se cultivaron rutinariamente en placas de poliestireno de 100x20 mm (Corning, Nueva York, EUA) en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Para despegar las células de la placa se utilizó tripsina (Lonza).

2.2. Métodos de transfección

Las células COS-7 se transfectaron mediante un protocolo de transfección transitoria con DEAE dextrano. Para ello, plaqueamos las células subconfluentes ($1,5 \times 10^4$ células/cm²) y las incubamos 16-36 h antes de la transfección. Tras un lavado con PBS (Tampón fosfato salino) para eliminar los restos celulares, las células se incubaron durante 4 h en una solución con DMEM 2% FBS, 10 mM de cloroquina, 10 mg/ml de dextrano y 1 µg de ADN plasmídico. Las células transfectadas se incubaron 2 min con una solución de PBS y 10% DMSO (dimetilsulfóxido). Finalmente, después de

lavar las células con PBS, se cultivaron en su respectivo medio de cultivo durante 48 h antes de ser procesadas.

Para los experimentos de transfección de construcciones GFP, con el objetivo de estudiar la localización subcelular, utilizamos un método de transfección con una mayor eficiencia. Dicho método está basado en el compuesto GenJet (SignaGen). Tras plaquear las células COS-7, una vez subconfluentes, procedimos a la transfección. Para ello, se incubó DMEM con 1 µg de ADN plasmídico al que se añadió 3 µl de la solución GenJet, y se dejó incubar 15 min. A las células se les cambió el medio antes de añadirles la solución de transfección, la cual se incubó durante 24 h, tras este periodo de tiempo se procedió a cambiar el medio. Las células fueron procesadas 48 h post-transfección.

Las células U87-MG, LNCaP y MCF7 se transfectaron con Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Para ello, se realizaron dos incubaciones por separado; por un lado, una solución de OptiMEM junto con 1 µg de ADN plasmídico y una solución de Plus Reagent; por otro lado, se incubó OptiMEM con lipofectamina. Transcurridos 10 min, se mezclaron ambas incubaciones durante 30 min. A continuación, se retiró el medio de las células y se añadió medio sin antibióticos, antes de añadir la mezcla de transfección. Las células fueron procesadas tras 48 h.

En los experimentos de estabilidad de proteínas, las células se trataron con 800 µg/ml de cicloheximida (Sigma-Aldrich) durante 6 h antes de lisarlas.

2.3. Lisis de cultivos celulares

Para obtener el extracto proteico se lavaron las células con PBS, posteriormente se incubaron durante 10 min a 4°C en 200 µl de tampón de lisis *Mammalian Protein Extraction Reagent* (M-PER, Thermo Fisher Scientific) suplementado con inhibidores de proteasas *cOmplete EDTA-free* (Roche, Switzerland), así como de fosfatasa *PhosSTOP* (Roche, Switzerland). El lisado celular resultante se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Esta centrifugación permitió obtener un sobrenadante con el lisado celular eliminando las membranas celulares. La concentración de proteína total la determinamos mediante el kit Pierce™ *BCA Protein*

Assay (Thermo Fisher) basado en el método del ácido bicinconínico o BCA. Con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) se realizó una recta de calibrado, la cual nos permitió calcular la absorbancia correspondiente a la concentración proteica de la muestra. Para medir la absorbancia a 280 nm se usó un fotómetro BioPhotometer (Eppendorf).

3. Detección de proteínas mediante *Western blot*

3.1. Electroforesis de proteínas

Para la separación electroforética de proteínas se cargaron cantidades idénticas de proteína (50 µg) en geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes y reductoras, a un voltaje de 20 V durante toda la noche o a 150 V durante 2 h. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido *Precision Plus Protein* (Bio-Rad) para estimar el tamaño aparente de las proteínas.

3.2. Transferencia

Posteriormente, transferimos las proteínas del gel a membranas de PVDF (Immobilon®-FL Millipore) activadas con metanol, mediante el sistema de electrotransferencia semiseca (Thermo Scientific Owl serie HEP), 1 h a 200 mA y 30 min a 100 mA. Una vez acabada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con *Odyssey Blocking Buffer* (OBB), seguidamente se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3). Al día siguiente, tras sucesivos lavados en tampón NET-gelatina (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,25% gelatina, 0,05% Tritón X-100) durante 1 h, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con un fluorocromo, anti-conejo o anti-ratón IgG-IRDyeR 800CW (o IgG-Alexa Fluor 680) (LI-

COR Biosciences) diluidos 1:20000 en tampón OBB, durante 1 h a temperatura ambiente.

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados en los experimentos de *Western blot*.

Anticuerpo	Compañía	Dilución
Anti-PTEN (6H2.1)	Merck Millipore	1:1000
Anti-PTEN (SP218)	Spring Bioscience	1:400
Anti-PTEN (17.A)	Thermo Scientific	1:1
Anti-PTEN (Y184)	Abcam	1:5000
Anti-PTEN (138G6)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-PTEN (D4.3)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-PTEN N-ter (2824)	Andrés-Pons <i>et al.</i> (2005)	1:1000
Anti-GST	Torres <i>et al.</i> (2001)	1:1000
Anti-Akt	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-fosfo-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anti-Flag	Sigma-Aldrich	1:50

3.3. Revelado

La inmunoreacción se detectó por fluorescencia con el Odyssey® CLx (LI-COR, USA), y con su software *Image Studio™* se cuantificó las densidades de banda de proteína. Como control de carga proteica, se utilizó la expresión de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Todos los experimentos de *Western blot* se realizaron, al menos, dos veces, con resultados equivalentes.

4. Microscopía de fluorescencia

La localización subcelular de PTEN en células COS-7 se estudió mediante inmunofluorescencia. Se añadieron 5×10^4 células/ml de COS-7 en cada compartimento de las cámaras BD Falcon (Bioscience USA), que se componen de un portaobjetos de vidrio tratado para proporcionar una superficie consistente para el crecimiento celular. Se transfectaron las células con 1 μ g de ADN y a los dos días se lavaron con PBS antes de ser fijadas y permeabilizadas con metanol a -20°C durante 5 min. Tras bloquear las

células con 3% de BSA en PBS durante 10 min a 4°C, se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-PTEN 425.A (221) en líquido ascítico a una concentración 1:200 en PBS-BSA durante 1 h a 37°C. Una vez lavadas con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (Thermo Fisher Scientific) (47, 221) a una dilución 1:200 en PBS-BSA, durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se tiñeron los núcleos con medio de montaje 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, USA). La localización subcelular de PTEN-GFP en células COS-7 se visualizó directamente mediante microscopía de fluorescencia estándar. Para la cuantificación de la distribución subcelular de PTEN, se contaron al menos 50 células positivas para cada experimento. Las células se clasificaron en diferentes grupos en función de la tinción observada: tinción nuclear (N), tinción citoplásmica (C) o tinción tanto en el núcleo como en el citoplasma (N/C).

La medición de la localización de la membrana plasmática de GFP-Akt1 en levadura, como un indicador indirecto de los niveles celulares de PIP₃, se realizó mediante microscopía de fluorescencia (47, 218). Se examinaron como mínimo 100 células y se clasificaron para cada condición, localización citoplásmica o asociada a membranas.

El análisis de las muestras se realizó en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-E. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital CCD ORCA-ER (Hamamatsu, Shizuka, Japón) y el programa de adquisición NIS-Elements (Nikon, Tokio, Japón). Además, se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B empleando un objetivo 20X HI Plan I (N.A. 0,30) (0,3225 μm/px), y el programa de adquisición Image J.

5. Inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para los experimentos de IHC, se obtuvieron 81 tumores de adenocarcinoma de próstata de los archivos del Departamento de Patología del Hospital Universitario de Cruces, y se usaron secciones histológicas de tejido (TMA) (*tissue microarrays*). Las muestras se clasificaron como positivas o negativas en base a su tinción por los AcM (Tabla 4). La inmunotinción se realizó en *immunostainers* automatizados (EnVision FLEX, Dako Autostainer Plus; Dako, Glostrup, Denmark) siguiendo los métodos de rutina.

Los experimentos de FISH se realizaron con una sonda de color dual que contiene una sonda centromérica para el cromosoma 10 (CEN10, espectro naranja) y una sonda PTEN en 10q23 (PTEN, espectro verde) (Zytolight, SPEC PTEN/CEN 10 sonda de color dual, Z-2078-200, ZytoVision, German). Las secciones de tejido de 5 μm se desparafinaron y se deshidrataron en un gradiente de etanol, seguido de desnaturalización en ácido cítrico 10 mM durante 4 min. Después del tratamiento con proteinasa K durante 20 min a 37°C, se añadieron las sondas y se desnaturalizó a 75°C durante 10 min, y se dejó hibridando a 37°C toda la noche. Tras lavar los portaobjetos, se tiñeron con DAPI. Los portaobjetos teñidos se interpretaron manualmente mediante microscopía de fluorescencia. Para cada caso, se evaluaron un mínimo de 50 núcleos en interfase no superpuestos. La delección de PTEN se definió como $\geq 15\%$ de núcleos tumorales que contienen una o ninguna señal del locus *PTEN* y dos señales CEP10.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales anti-PTEN empleados en los experimentos de IHC y FISH.

AcM anti-PTEN	Compañía	Dilución
6H2.1	Merck Millipore	1:50 Tris/EDTA pH 9
SP218	Spring Bioscience	1:100 Tris/EDTA pH 9
17.A	Thermo Scientific	1:1 Citrato pH 6,1
Y184	Abcam	1:100 Citrato pH 6,1
138G6	Cell Signaling Technology	1:50 Tris/EDTA pH 9
D4.3	Cell Signaling Technology	1:20 Tris/EDTA pH 9

6. Métodos de trabajo en el modelo experimental de levadura

6.1. Cepa de levadura y medios de cultivos

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada fue YPH499 (MATa ade2-101 trp163 leu2-1 ura3-52 his3- Δ 200 lys2-801). *S. cerevisiae* carece de la señalización a través de PIP₃. La expresión ectópica de variantes hiperactivas de p110 α (subunidad catalítica de PI3K) no tiene ningún efecto fenotípico, pero cuando se recluta en la membrana plasmática, mediante prenilación (p110 α -CAAX), proporciona una inhibición del crecimiento de la levadura debido a la disminución en los niveles esenciales de PIP₂.

El medio de cultivo general no selectivo para el crecimiento de las levaduras fue YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) (1% extracto de levadura, 2% peptona y 20% glucosa), líquido o sólido en placas con agar (2%). Para el crecimiento de las levaduras transformadas se usó medio sintético (SD) (0,5% sulfato amónico, 0,17% base nitrogenada sin aminoácidos, 20% de carbohidratos y 20% de una solución de aminoácidos). El carbohidrato utilizado para el crecimiento de la levadura fue la glucosa. En los ensayos de crecimiento en gota de levadura se añadió galactosa en vez de glucosa para inducir la expresión del gen deseado bajo el promotor GAL. En cada ensayo se añadió una solución suplementada con los aminoácidos apropiados en función de los plásmidos correspondientes (medio SD-UL; la leucina y el uracilo se usan como marcadores de selección). Los medios se ajustaron a pH 5,8 y las levaduras crecieron a 30°C durante al menos 3 días.

6.2. Transformación de la levadura y condiciones de crecimiento

Los cultivos de levadura fueron transformados utilizando el método de acetato de litio. Para ello, se hicieron crecer los cultivos a 30°C en 5 ml de medio YPD hasta una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,5. Los cultivos se diluyeron en 25 ml de medio YPD y se incubaron durante 3 h. Tras centrifugarlos (2500 rpm, 5 min), el *pellet* fue resuspendido en 25 ml de agua estéril, tras volver a centrifugar se resuspendió en 2,4 ml de polietilenglicol 50%, 360 μ l de acetato de litio 1 M y 50 μ l de ADN de esperma de

salmón (Sigma, 10 mg/ml), y se añadió 1 µl de ADN (0,5 µg/µl). Tras 30 min de incubación en agitación a 30°C, se les dio un choque térmico durante 30 min a 42°C. Finalmente, las levaduras se sembraron en placas de medio selectivo SD para seleccionar las células transformadas.

6.3. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriadas decimales

Para llevar a cabo el ensayo de crecimiento en gota, se inoculó una colonia de levaduras durante 18 h en 2 ml de medio SD-UL con 20% glucosa y se incubó 18 h a 30°C en agitación. Posteriormente, los cultivos se diluyeron con agua estéril hasta obtener una DO_{600} de 0,15 y se hicieron 3 diluciones seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000). Las gotas de levaduras se depositaron en placas SD-UL, con glucosa como control de crecimiento o con galactosa para inducir la expresión de los genes regulados por el promotor GAL. Las levaduras se hicieron crecer a 30°C durante al menos tres días.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 23 y Microsoft Excel. Para determinar si las diferencias entre los grupos eran significativas, se aplicó el estadístico T-student para los datos con distribución normal. Los valores de P menores que 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

1. Mutagénesis dirigida: generación de colecciones de sustituciones de aminoácidos

1.1. Mutagénesis dirigida en un solo paso de PCR usando oligonucleótidos mutagénicos estandarizados de longitud predefinida

Para los experimentos de optimización del protocolo de mutagénesis dirigida hemos utilizado dos proteínas implicadas en enfermedades humanas y de gran interés para el análisis mutacional, PTEN y PTPRZ-B. Nuestro procedimiento de mutagénesis se basa en el protocolo *QuikChange™* (Agilent Technologies). Comenzamos realizando experimentos de mutagénesis comparativa usando oligonucleótidos solapantes de diferente longitud, T_m y contenido en GC. Los oligonucleótidos poseen el codón mutado en el centro, rodeado de una longitud idéntica de bases en ambos lados (Figura 12). Mutamos diferentes aminoácidos de PTEN y PTPRZ-B, utilizando los oligonucleótidos diseñados por nosotros en comparación con oligonucleótidos sugeridos por el programa (QCM) *QuikChange Primer Design Program* (www.agilent.com/genomics/qcpd) (Tablas 5 y 6).

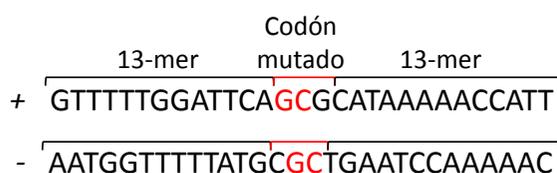


Figura 12. Ejemplo de par de oligonucleótidos mutagénicos. Corresponden a la mutación K60A de PTEN. La lisina 60, con triplete AAG, es sustituida por una alanina, GCG (en rojo). El triplete a mutar se encuentra en el centro de los 29 nucleótidos totales que constituyen cada oligonucleótido.

Resultados

Tabla 5. Mutagénesis dirigida para mutaciones en PTEN usando oligonucleótidos de diferente longitud, contenido en GC y Tm.

	K60A		L100A		K80A		F200A		Q97H		D107A				
Longitud ¹	45	29	45	29	45	29	45	29	37 (QCM)	29	41 (QCM)	29			
% GC	33	34	42	41	42	45	38	38	43	41	41	48			
Tm ²	76	65	80	68	80	70	78	67	78	71	79	74			
Colonias ³	1	5	40	38	118	3	3	25	17	5	5	43	36	6	53
	2	1	40	14	166	4	2	16	1	10	6	61	63	1	78
Frecuencia de mutación ⁴	1	2/3	2/3	2/3	2/3	3	3/3	1/3	3/3	2/3	5	16/16	15/16	4/6	16/16
	2	0/1	3/3	3/3	3/3	4	2/3	2/3	1/1	3/3	6	16/16	16/16	1/1	16/16

¹Los oligonucleótidos de longitud predefinidos siguen el diseño n+3+n (en el centro el codón mutado; 45-mer, 21+3+21; 29-mer, 13+3+13). Los oligonucleótidos según el programa QCM fueron: Q97H, 13+3+16; D107A, 19+3+19.

²Tm se calculó de acuerdo con el manual *QuikChange*.

³Número de colonias de bacterias después de la transformación del producto de PCR digerido con DpnI (1 a 6 son experimentos independientes).

⁴Número de colonias con mutación/número de colonias analizadas.

Tabla 6. Mutagénesis dirigida estandarizada para mutaciones en PTEN con oligonucleótidos de 29 nucleótidos de longitud con diferente contenido en GC y Tm.

PTEN	%GC	Tm	Colonias	Frecuencia de mutación
K147R*	52	76	59	3/3
K6R*	48	74	73	3/3
K164R*	45	73	80	2/3
K263R**	41	71	7	2/3
K144R*	41	71	70	3/3
K313R*	38	70	86	3/3
K183R	38	70	63	3/3
K62R*	34	68,5	111	3/3
K60R*	31	67	87	3/3
K322R	28	66	25	1/3
K66R	24	64,5	71	3/3

*Uno de los oligonucleótidos mutagénicos posee una G o C en la posición 3'.

**Ambos oligonucleótidos mutagénicos poseen una G o C en la posición 3'.

Pudimos observar que la reducción de la longitud del oligonucleótido a 29 nucleótidos (13+3+13) sin tener en cuenta el contenido en GC ni la Tm, no afectaba a la eficiencia de la mutagénesis, reflejada por la cantidad de producto de PCR, el número

de colonias bacterianas obtenidas o la frecuencia de mutación. La presencia de una G o C en los extremos del oligonucleótido tampoco afectó a la eficiencia de la mutagénesis. La cantidad de producto de PCR se correlacionó con el número de colonias, pero no se encontró relación entre la longitud del oligonucleótido, T_m, o contenido en GC, y la cantidad de producto de PCR, el número de colonias, o la frecuencia de mutación (Tablas 5, 6 y 7, figura 13). Para el resto de los experimentos, utilizamos oligonucleótidos mutagénicos de longitud estándar (29 nucleótidos).

Tabla 7. Mutagénesis dirigida estandarizada para mutaciones en PTPRZ-B con oligonucleótidos de 29 nucleótidos de longitud con diferente contenido en GC y T_m.

PTPRZ-B	%GC	T _m	Colonias	Frecuencia de mutación
C1328A	52	76	34	3/3
E1213K	48	74	36	2/3
V848A**	41	71	108	1/3
I1133M	41	71	8	0/3
L1291V**	41	71	77	2/3
S1453A*	41	71	99	3/3
G917D	38	70	66	2/3
A1220D*	38	70	74	3/3
Y922H	34	68,5	90	3/3
F1246L	34	68,5	124	3/3
V1389M*	34	68,5	170	3/3
P1281L	24	64,5	135	3/3

*Uno de los oligonucleótidos mutagénicos posee una G o C en la posición 3'.

**Ambos oligonucleótidos mutagénicos poseen una G o C en la posición 3'.

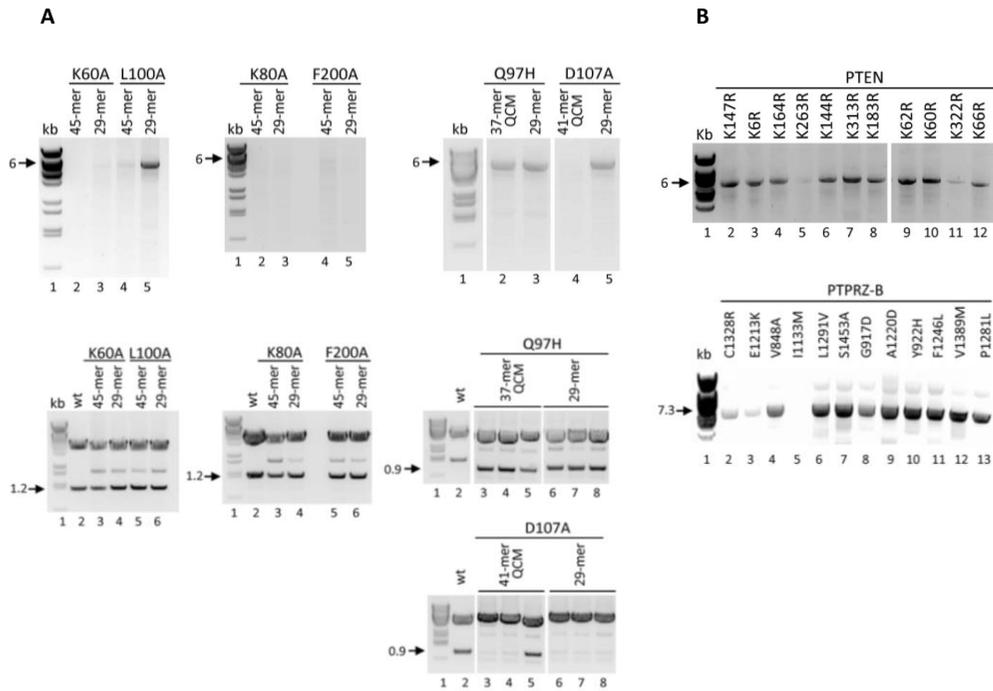


Figura 13. Mutagénesis para la sustitución de aminoácidos utilizando oligonucleótidos mutagénicos de diferente longitud, Tm y contenido en GC. A) Se usaron pares de oligonucleótidos de longitud predefinida (45-mer o 29-mer), o según lo sugerido por el programa QCM, para crear diversas mutaciones en PTEN (plásmido pRK5 PTEN). Las imágenes superiores muestran 10 μ l del producto de PCR y las inferiores muestran resultados de las digestiones mediante enzimas de restricción (XbaI/SalI) de ADN del plásmido purificado (\sim 3 μ g) quedando el inserto de PTEN a 1,2 kbp. Para verificar la eficacia de la mutagénesis (en las mutaciones Q97H y D107A) usamos las enzimas XbaI/SalI o BglII/SalI, respectivamente, ya que la mutagénesis Q97H introduce un sitio XbaI y la D107A elimina un sitio BglII. Se usó pRK5-PTEN digerido (wt) como control. Los geles corresponden a los experimentos 1, 3 y 5 enumerados en la Tabla 5. **B)** Productos de PCR usando oligonucleótidos de 29 nucleótidos. En la figura superior se generaron 11 diferentes sustituciones de Lys a Arg en diferentes regiones de PTEN; en la figura inferior se generaron 12 sustituciones de aminoácidos diferentes en la región intracelular de PTPRZ-B (plásmido pENTR-PTPRZ-B). Los experimentos correspondientes se enumeran en la Tabla 6 y 7.

1.2. Mutagénesis dirigida en un solo tubo usando combinaciones de plásmidos de ADNc

Muchas veces se requiere la introducción de mutaciones en los ADNc de interés en diferentes plásmidos, con objetivos experimentales específicos. Por ello, probamos a combinar en un solo tubo diferentes moldes con un inserto de ADNc

común (Figura 14A). Usamos los plásmidos pRK5-PTEN y pYES2-PTEN como moldes, solos o combinados, y diferentes oligonucleótidos de 29 bases (Tabla 8). Las eficiencias de PCR y mutagénesis no se vieron afectadas por esta combinación, obteniéndose mutantes en ambos plásmidos, generalmente con una distribución estocástica.

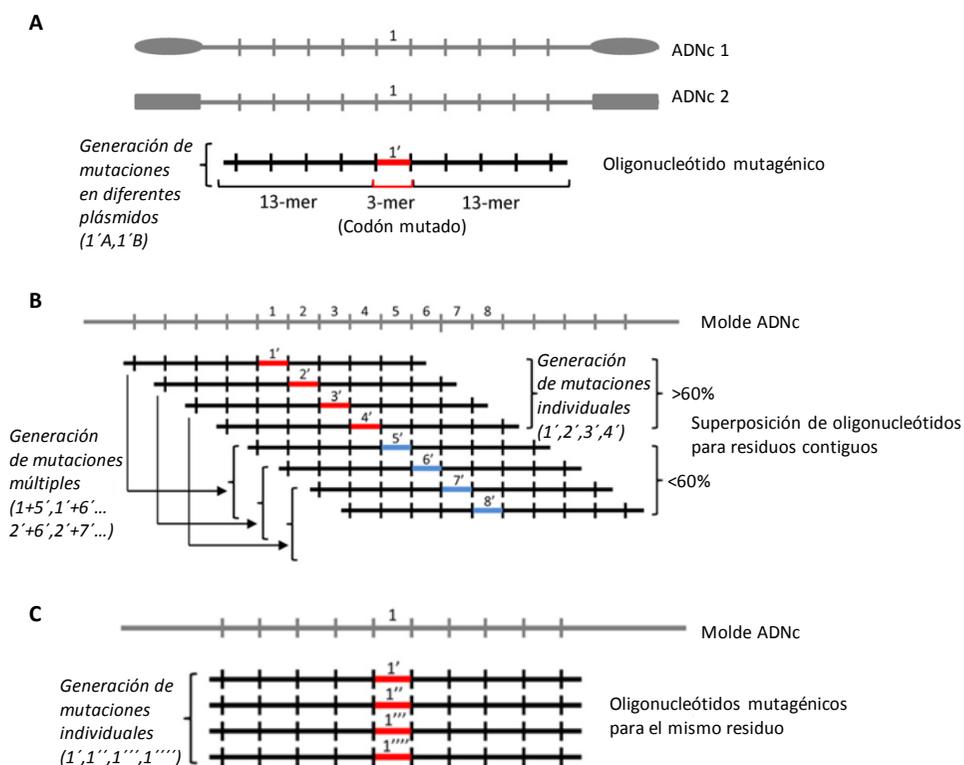


Figura 14. Representación esquemática de los diferentes enfoques de mutagénesis utilizados en este estudio. A) Introducción simultánea de una mutación (en rojo) en los plásmidos A y B. El residuo no mutado se indica como 1 y el residuo mutado como 1'. **B)** Sustitución paralela de aminoácidos secuenciales mediante la combinación de oligonucleótidos superpuestos dirigidos a residuos adyacentes. Los residuos mutados (en rojo y azul) se indican de 1' a 8'. Las mutaciones individuales se obtienen cuando la superposición de los pares de oligonucleótidos es más de cinco codones, mientras que se obtienen mutaciones múltiples cuando la superposición es menor. **C)** Sustitución simultánea de un residuo a diferentes residuos mediante la mezcla de oligonucleótidos distintos dirigidos al mismo residuo. Los residuos mutados se indican en rojo como 1' a 1''''.

Tabla 8. Mutagénesis dirigida en un solo tubo utilizando combinaciones de plásmidos.

Plásmido	Mutación	Colonias	Colonias analizadas	Plásmidos obtenidos	Frecuencia de mutación
pRK5	N63A	61	2	pRK5 (2/2)	0/2
pYES2	N63A	95	2	pYES2 (2/2)	2/2
pRK5+pYES2	N63A	58	4	pRK5 (2/4)	2/2
				pYES2 (2/4)	2/2
pRK5	N69A	21	2	pRK5 (2/2)	2/2
pYES2	N69A	5	2	pYES2 (2/2)	1/2
pRK5+pYES2	N69A	35	4	pRK5 (2/4)	2/2
				pYES2 (2/4)	2/2
pRK5+pYES2	D22E	8	4	pRK5 (2/4)	2/2
				pYES2 (2/4)	2/2
pRK5+pYES2	Y27C	16	4	pRK5 (2/4)	2/2
				pYES2 (2/4)	2/2
pRK5+pYES2	P38H	13	4	pRK5 (2/4)	2/2
				pYES2 (2/4)	2/2
pRK5+pYES2	Y88H	61	4	pRK5 (2/4)	1/1
				pYES2 (2/4)	1/1
pRK5+pYES2	C105Y	110	4	pRK5 (3/4)	1/1
				pYES2 (1/4)	1/1
pRK5+pYES2	R173C	70	4	pRK5 (3/4)	1/1
				pYES2 (1/4)	1/1

1.3. Mutagénesis en un solo tubo que usa combinaciones de oligonucleótidos estandarizados para mutar aminoácidos consecutivos: implicaciones en la mutagénesis por barrido

Para realizar la mutagénesis por barrido de alanina (alanina *scanning*), nuestros oligonucleótidos mutagénicos fueron diseñados con un programa creado por nosotros, fácil de usar y de gran ayuda, denominado *AlaChainRep*. Este programa presenta una lista de oligonucleótidos homogéneos con la misma longitud predefinida y siguiendo nuestra regla $n+3+n$. Se debe definir la posición inicial del oligonucleótido en la secuencia de ADNc y su longitud, de esta forma el programa crea una lista de pares de oligonucleótidos (directo e inverso) que cubre la secuencia de ADNc restante y que contiene el codón de alanina deseado (con cambios mínimos de nucleótidos) en el centro de cada oligonucleótido. El programa está disponible en

http://erramuzpe.github.io/LAB_TOOLS/. Pese a que existen otros programas que crean iniciadores mutagénicos de barrido de aminoácidos, nuestra plataforma es de fácil ejecución, pudiendo crear rápidamente una lista muy útil de oligonucleótidos mutagénicos de longitud fija.

Para maximizar la eficiencia, se realizaron reacciones de mutagénesis usando diferentes combinaciones (2, 3, 4, 6 u 8) de pares de oligonucleótidos mutagénicos dirigidos a aminoácidos consecutivos en la proteína PTEN. Los pares de oligonucleótidos se desplazan tres nucleótidos uno con respecto al otro en la secuencia de PTEN (Figura 14B, tabla 9). Los oligonucleótidos se mezclaron usando concentraciones equimolares para dar una concentración final de 0,8 μ M en la reacción de PCR.

Para evaluar si en nuestro estudio la obtención de mutantes se distribuye estocásticamente, simulamos una selección aleatoria de las mutaciones individuales de la mezcla mutagénica (Figura 15). Las gráficas obtenidas dan una estimación de la aleatoriedad para obtener las diferentes mutaciones con respecto al número de oligonucleótidos utilizados. Por ejemplo, combinando cuatro pares de oligonucleótidos diferentes en la reacción de mutagénesis y suponiendo una eficiencia de mutagénesis del 100%, se deben analizar al menos 13 colonias bacterianas para obtener las cuatro mutaciones deseadas con un 90% de probabilidad.

Los resultados muestran cómo el rendimiento de las diferentes mutaciones individuales no parece seguir una tendencia estocástica, incluso para combinaciones de pocos pares de oligonucleótidos, obteniendo un 23% de éxito (porcentaje de experimentos en el que se obtienen todas las mutaciones) (Tabla 9), frente a un 88% esperado (Figura 15). Sin embargo, utilizando de 2 a 4 pares de oligonucleótidos consecutivos, en algunos casos fue posible obtener todas las mutaciones individuales. Es importante destacar que, cuando la superposición entre los diferentes pares de oligonucleótidos utilizados en la reacción es de menos del 60% (una distancia de cinco codones), también se generaron dobles mutantes en la misma reacción (Figura 14B, tabla 9).

Tabla 9. Mutagénesis dirigida con combinaciones de oligonucleótidos dirigidos a residuos consecutivos.

Mutaciones diana	Colonias	Colonias analizadas	Mutaciones obtenidas
I50-D51	63	4	<u>0-3-1</u>
V54-R55	30	4	<u>4-0-0</u>
D58-S59	38	4	<u>1-1-2</u>
K60-H61	39	4	<u>3-1-0</u>
H64-Y65	166	4	<u>0-4-0</u>
Y68-N69	120	4	<u>4-0-0</u>
I50-D51-D52	41	10	<u>3-7-0-0</u>
K60-H61-K62	86	10	<u>8-0-0-2</u>
N63-H64-Y65	82	10	<u>0-3-5-2</u>
I50-D51-D52-V53	28	14	<u>0-7-2-4-1</u>
V54-R55-F56-L57	35	14	<u>4-4-3-1-2</u>
K60-H61-K62-N63	52	14	<u>6-1-6-0-1</u>
H64-Y65-K66-I67	32	14	<u>2-4-3-2-3</u>
I50-D51-D52-V53-V54-R55	19	16	<u>0-0-1-1-0-0-0</u> I50A+V54A (2) I50A+R55A (12)
K60-H61-K62-N63-H64-Y65	98	16	<u>3-1-4-0-0-0-2</u> K60A+Y65A (6)
I50-D51-D52-V53-V54-R55-F56-L57	62	16	<u>0-0-0-0-0-0-0-3</u> I50A+R55A (1) D51A+L57A (9) D52A+L57A (3)
K60-H61-K62-N63-H64-Y65-K66-I67	33	16	<u>0-0-0-0-0-2-0-0-3</u> K60A+Y65A (1) K60A+K66A (3) K60A+I67A (2) H61A+K66A (1) H61A+I67A (3) K62A+I67A (1)

-El plásmido utilizado para estos experimentos fue pRK5-PTEN.

-Todas las mutaciones son sustituciones a Alanina (I50A, etc.).

-El número de muestras obtenidas para cada mutación está subrayado e indicado siguiendo el orden de las mutaciones seleccionadas, y el último número (no subrayado) corresponde a las muestras no mutadas PTEN silvestre (WT). Por ejemplo, en la primera fila: I50A, 0 muestras; D51A, 3 muestras; WT, 1 muestra.

-Se indican el número de mutaciones dobles. El número de muestras en cada caso está en paréntesis. Por ejemplo, en la fila 14: doble mutación I50A + V54A, 2 muestras.

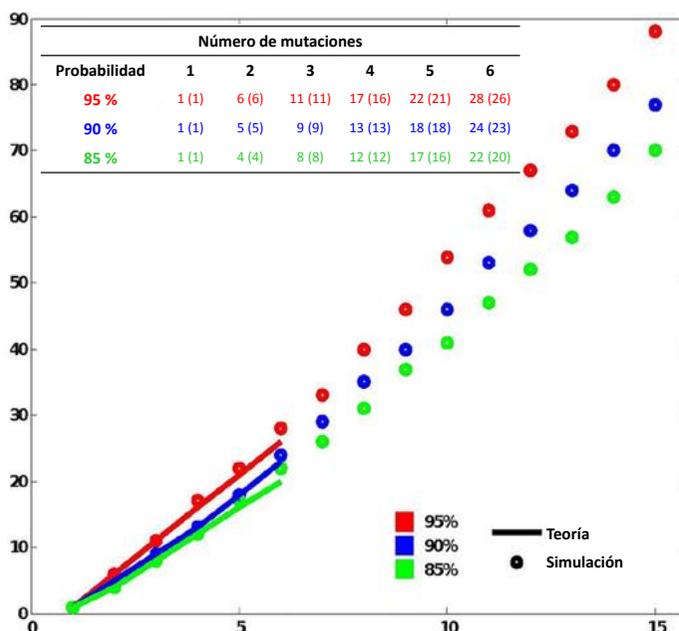


Figura 15. Diagrama de datos que representa la obtención de todas las diferentes mutaciones individuales de una determinada mezcla de mutaciones, suponiendo una distribución estocástica. El eje x indica el número de mutaciones diferentes incluídas en la reacción de mutagénesis y el eje y indica el número de muestras (colonias de bacterias) que se analizarán para obtener al menos una mutación de cada una con una cierta probabilidad (95%, en rojo, 90%, en azul, 85%, en verde). Los puntos indican datos obtenidos de una simulación, hasta una mezcla de 15 mutaciones diferentes. Las líneas continuas indican los diagramas de distribución de probabilidad (teoría) hasta una mezcla de 6 mutaciones diferentes. En la tabla superior se indican los valores numéricos (entre corchetes teoría, y no corchetes, simulación) hasta una combinación de 6 mutaciones diferentes.

1.4. Combinaciones de oligonucleótidos dirigidos al mismo aminoácido: mutagénesis de sitio único

Con el objetivo de optimizar el rendimiento de mutaciones múltiples de aminoácidos individuales, realizamos reacciones de mutagénesis dirigida usando combinaciones de pares de oligonucleótidos mutagénicos de 29 nucleótidos dirigidos a la misma posición del codón pero introduciendo diferentes mutaciones (Figura 14C). En la tabla 10 podemos observar los ejemplos para dos residuos diferentes de PTEN que se mutaron a 4 aminoácidos diferentes. Utilizamos combinaciones de 1 a 4 pares de oligonucleótidos en dos plásmidos diferentes (pRK5 y pYES2). Las eficiencias de PCR y

Resultados

de mutagénesis no se vieron afectadas por la combinación de diferentes pares de oligonucleótidos, siendo similares para ambos plásmidos. Asimismo, el uso de combinaciones de pares de oligonucleótidos dirigidos al mismo residuo produjo una distribución estocástica de las distintas mutaciones obtenidas (87% de éxito (Tabla 10) frente a 88% esperado (Figura 15)).

Tabla 10. Mutagénesis dirigida con combinaciones de oligonucleótidos dirigidos al mismo residuo.

Mutación diana	Colonias		Colonias analizadas		Mutaciones obtenidas	
	pRK5	pYES2	pRK5	pYES2	pRK5	pYES2
H61						
R	62	141	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
Y	102	60	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
L	57	89	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
P	56	111	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
R-Y	91	113	4	4	<u>1-2</u> -1	<u>4-0</u> -0
L-P	84	79	4	4	<u>2-2</u> -0	<u>2-2</u> -0
R-Y-L	76	117	10	10	<u>5-2-3</u> -0	<u>2-5-3</u> -0
R-Y-L-P	40	95	14	14	<u>4-4-3-1</u> -2	<u>5-1-3-2</u> -3
L70						
A	236	247	2	2	<u>1</u> -1	<u>2</u> -0
P	290	280	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
F	276	300	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
I	244	180	2	2	<u>2</u> -0	<u>2</u> -0
A-P	224	114	4	4	<u>1-3</u> -0	<u>1-3</u> -0
F-I	358	133	4	4	<u>2-1</u> -1	<u>1-3</u> -0
A-P-F	180	163	10	10	<u>1-7-1</u> -1	<u>1-4-4</u> -1
A-P-F-I	156	185	14	14	<u>1-4-5-1</u> -3	<u>0-6-1-3</u> -4

-Los plásmidos utilizados son pRK5-PTEN y pYES2-PTEN.

-Las mutaciones se indican con la letra del aminoácido correspondiente (por ejemplo, en la segunda fila: R, mutación H61R).

-El número de muestras obtenidas para cada mutación está subrayado e indicado siguiendo el orden de las mutaciones seleccionadas, y el último número (no subrayado) corresponde a las muestras de PTEN silvestre obtenidas (WT).

Por último, evaluamos la utilidad de nuestro método para la mutagénesis de sitio único múltiple, usando combinaciones de pares de oligonucleótidos mutagénicos para introducir mutaciones en el mismo residuo en PTEN o PTPRZ-B para más de 6

sustituciones diferentes (Tabla 11). Para combinaciones complejas de oligonucleótidos, es necesario analizar un gran número de muestras para obtener todas las mutaciones en una sola reacción de PCR (Figura 15), lo que podría comprometer la eficiencia del método. Esto puede ser parcialmente superado mediante la realización de reacciones mutagénicas repetidas (9). Usando nuestro procedimiento, una segunda ronda secuencial de la reacción de PCR fue suficiente para obtener una buena proporción de las mutaciones entre un pequeño número de muestras. Por ejemplo, se obtuvieron 15 y 12 sustituciones diferentes de los residuos de PTEN Ala126 y Gly129, respectivamente, cuando se analizaron 24 muestras resultantes de dos reacciones de PCR secuenciales. Del mismo modo, dos rondas de mutagénesis produjeron 16 sustituciones diferentes del residuo de PTPRZ-B Leu1454 tras el análisis de solo 27 colonias bacterianas (Tabla 11). Además, el uso combinatorio de oligonucleótidos para el mismo residuo parece que sigue una tendencia estocástica en la obtención de diferentes mutaciones.

Tabla 11. Mutagénesis dirigida utilizando grandes combinaciones de oligonucleótidos dirigidos al mismo residuo.

Mutaciones diana	Colonias	Colonias analizadas	Mutaciones obtenidas
PTEN A126 (1ª)			
C-E-F-H-I-K-L-N-P-Q R-T-W-Y	194	14	<u>0-0-0-4-0-1-0-1-0-1</u> <u>1-2-1-1-2</u>
PTEN A126 (2ª)			
D-E-F-G-I-L-M-P-S-V	106	10	<u>1-0-1-2-1-1-0-0-2-1-1</u>
PTEN G129 (1ª)			
C-F-H-I-K-L-M-N-P-Q S-T-W-Y	24	14	<u>0-0-1-5-0-0-0-0-0-0</u> <u>0-2-4-0-2</u>
PTEN G129 (2ª)			
A-D-E-F-K-L-M-N-P-Q R-S-V-Y	68	14	<u>2-1-3-0-0-0-1-0-0-2</u> <u>1-0-2-1-1</u>
PTPRZ-B L1454 (1ª)			
A-C-D-E-F-G-H-I-K-M N-P-Q-R-S-T-V-W-Y	264	20	<u>1-0-1-0-3-0-2-0-1-0</u> <u>0-1-3-1-2-1-1-1-1-1</u>
PTPRZ-B L1454 (2ª)			
C-E-G-I-M-N	11	7	<u>0-2-0-3-2-0-0</u>

-Los plásmidos utilizados son pRK5-PTEN y pCDNA3-PTPRZ-B.

-Se realizaron dos reacciones de mutagénesis (1ª y 2ª) secuencialmente para cada residuo (A126, G129 y L1454). Las mutaciones se indican con la letra del aminoácido correspondiente.

-El número de muestras obtenidas para cada mutación está subrayado e indicado siguiendo el orden de las mutaciones, el último número (no subrayado) corresponde a las muestras de PTEN silvestre.

2. Caracterización de epítomos de la región C-terminal de PTEN

Para que se pueda llevar a cabo una evaluación IHC precisa de la expresión de la proteína PTEN en tumores, hemos realizado una validación de la sensibilidad y la especificidad, así como un mapeo de precisión de epítomos, de seis anticuerpos monoclonales (AcM) comerciales anti-PTEN (6H2.1, SP218, 17.A, Y184, 138G6 y D4.3) potencialmente adecuados para técnicas de IHC (Tabla 12).

Tabla 12. Características de los AcM empleados en este estudio.

AcM	Isotipo	Hospedador	Inmunógeno	Referencias
6H2.1	IgG	Ratón	PTEN 304-403	(222)
SP218	IgG	Conejo	PTEN C-terminal	(223)
17.A (Ab-4)	IgM	Ratón	PTEN 2-403	(224)
Y184	IgG	Conejo	PTEN C-terminal	(212)
138G6	IgG	Conejo	PTEN C-terminal	(225)
D4.3		Conejo	PTEN C-terminal	(226)

2.1. Especificidad y sensibilidad de los AcM anti-PTEN

La especificidad fue evaluada mediante *Western blot* usando líneas celulares humanas positivas (Caki, MCF7) y negativas (LNCaP, U87MG) para PTEN. Como se observa, todos los AcM reconocieron específicamente PTEN endógeno (Figura 16A). Además, todos los AcM detectaron PTEN (residuos 1-403) y PTEN-L (residuos 1-L-576-L) recombinantes sobreexpresados en células COS-7 (Figura 16B). Sin embargo, ninguno de los AcM reaccionó con la forma recombinante de la variante de *splicing* alternativo PTEN- Δ (residuos 1-343), la cual carece del exón 9 (residuos 344-403) (122) (Figura 16B).

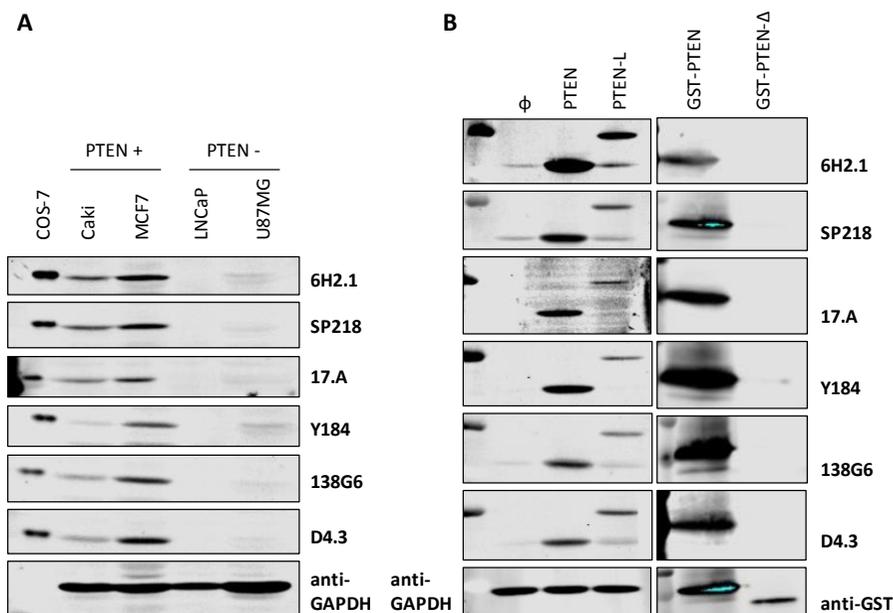


Figura 16. Especificidad y reactividad de los AcM anti-PTEN. A) Detección de la proteína PTEN endógena por los diferentes AcM mediante *Western blot*. Se usaron lisados celulares de líneas celulares PTEN positivas (Caki y MCF7) y PTEN negativas (LNCaP y U87MG). Las células COS-7 transfectadas para expresar ectópicamente PTEN (1-403) se usaron como control. La expresión de GAPDH se muestra como control de carga. **B)** Detección de isoformas de PTEN. Se usaron lisados celulares de células COS-7 transfectadas con los correspondientes plásmidos. Izquierda, detección de PTEN 1-403 y PTEN-L 1-576. Derecha, detección de GST-PTEN 1-403 y GST-PTEN-Δ 1-343-Ser. El anticuerpo anti-GST se usó como control. La expresión de GAPDH se muestra como control de carga.

La especificidad en IHC de los AcM se evaluó en un panel de 81 muestras de adenocarcinoma de próstata embebidas en parafina y fijadas con formalina, las cuales también fueron analizadas mediante FISH (Hibridación fluorescente *in situ*) con una sonda específica para *PTEN*. Los anticuerpos 6H2.1 y SP218 mostraron la mejor especificidad en IHC, sin falsos positivos al correlacionarlos con la ausencia del gen *PTEN* en el análisis de FISH (Tabla 13, figura 17). Se detectó inmunotinción negativa con todos los AcM anti-PTEN en un número variable de muestras positivas para el análisis de FISH, sugiriendo la pérdida frecuente de expresión de la proteína PTEN en cáncer de próstata sin delección del gen *PTEN*, de acuerdo con otras observaciones previas (227).

Tabla 13. Análisis comparativo de IHC con AcM anti-PTEN y FISH usando un panel de adenocarcinomas de próstata.

AcM	neg/pos ²	%neg	<u>FISH -</u>		<u>FISH +</u>		<u>FISH ++¹</u>	
			neg	pos	neg	pos	neg	pos
6H2.1	62/19	76.5	8	0	12	4	42	15
SP218	50/31	61.7	8	0	11	5	31	26
17.A	41/40	49.4	3	5	7	9	31	26
Y184	33/48	40.7	5	3	4	12	24	33
138G6	45/36	55.6	7	1	9	7	29	28
D4.3	42/39	51.8	6	2	8	8	27	30

¹ -, no señal de PTEN; +, 1 señal de PTEN; ++, 2 señales de PTEN.

² Número de muestras negativas/positivas en IHC.

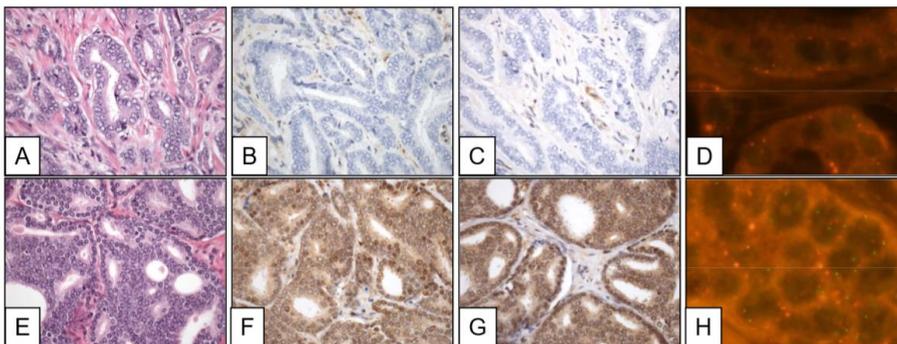


Figura 17. Tinción IHC con los AcM anti-PTEN 6H2.1 y SP218, y análisis de FISH de *PTEN* de muestras de tumores de próstata. A, B, C, D) Adenocarcinoma de próstata con pérdida bialélica del gen *PTEN* y pérdida de proteína PTEN, índice de Gleason 3+3. E, F, G, H) Adenocarcinoma de próstata con el gen *PTEN* y la preservación de la proteína PTEN, índice de Gleason 4+4. A y E, Tinción histológica de hematoxilina-eosina; B y F, IHC con el AcM 6H2.1; C y G, IHC con el AcM SP218; D y H, Análisis de FISH.

La sensibilidad de los AcM fue examinada mediante *Western blot* utilizando cantidades decrecientes de lisados celulares que contienen PTEN recombinante sobreexpresado en células COS-7. Los AcM SP218, 6H2.1 y Y184 mostraron una mayor sensibilidad para detectar PTEN (Figura 18).

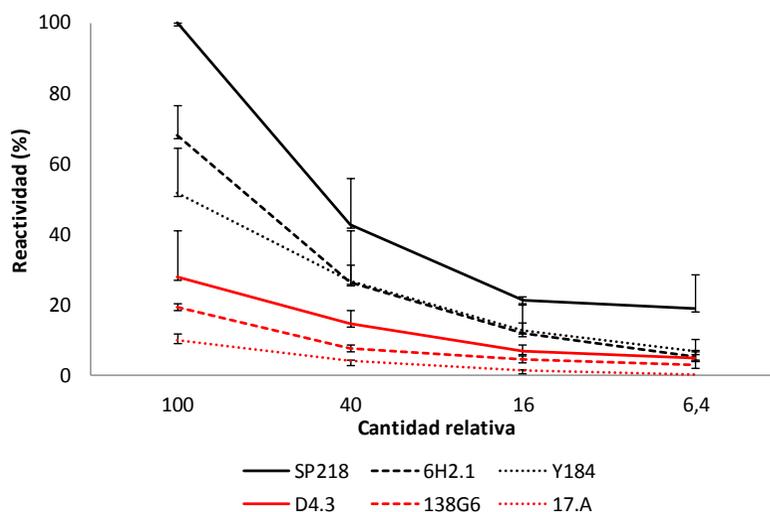


Figura 18. Sensibilidad de los AcM anti-PTEN. Reactividad de los diferentes AcM frente a cantidades decrecientes de PTEN recombinante procedente del lisado celular de las células COS-7 transfectadas. Los datos se muestran como reactividad relativa mediante *Western blot*, determinada por la cuantificación de la banda de la proteína PTEN. El porcentaje de reactividad se normalizó con el valor más alto obtenido por el anticuerpo SP218 (100% reactividad).

2.2. Definición de los epítomos reconocidos por los AcM anti-PTEN en la cola C-terminal de PTEN

La mayoría de los inmunógenos utilizados para obtener los AcM anti-PTEN de este estudio son fragmentos o péptidos PTEN C-terminales (Tabla 12), consistente con la falta de reconocimiento de la variante PTEN- Δ por parte de estos AcM (Figura 16B). Además, todos los AcM reconocieron la proteína recombinante GST-PTEN que abarca la cola C-terminal (351-403), pero no la que carece de esta región (1-350) (Figura 19). Estos resultados demuestran que los epítomos reconocidos por los AcM anti-PTEN residen en la región C-terminal de PTEN 350-403, siendo el resto de la proteína prescindible para el reconocimiento de los anticuerpos.

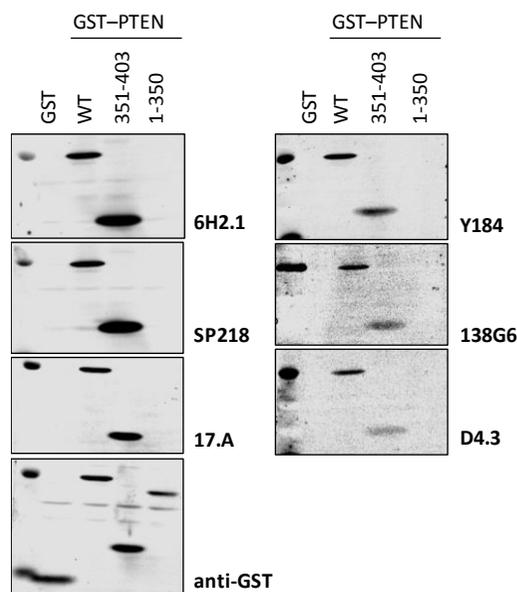


Figura 19. Reactividad de los AcM anti-PTEN frente a la cola C-terminal. Detección de la forma entera GST-PTEN 1-403, la forma truncada con la cola C-terminal GST-PTEN 351-403 y la forma sin la cola C-terminal GST-PTEN 1-350 por los diferentes AcM mediante *Western blot* de lisados celulares de células COS-7 transfectadas con los correspondientes plásmidos. La expresión de las proteínas recombinantes se observó usando el anticuerpo anti-GST como control.

Para determinar con mayor precisión la región mínima de PTEN reconocida por cada AcM, se eliminó de forma secuencial los residuos de PTEN C-terminales (Figura 20A). Los AcM mostraron patrones diferentes de reactividad, indicando que los AcM reconocen diferentes epítopos del extremo C-terminal de PTEN (Tabla 14). Mientras que el AcM SP218 fue el más sensible a la deleción C-terminal (reactividad disminuida con la deleción 1-401) (Figura 20B), los AcM 138G6 y D4.3 fueron los más resistentes (pérdida de reactividad con la deleción 1-391) (Figura 20C).

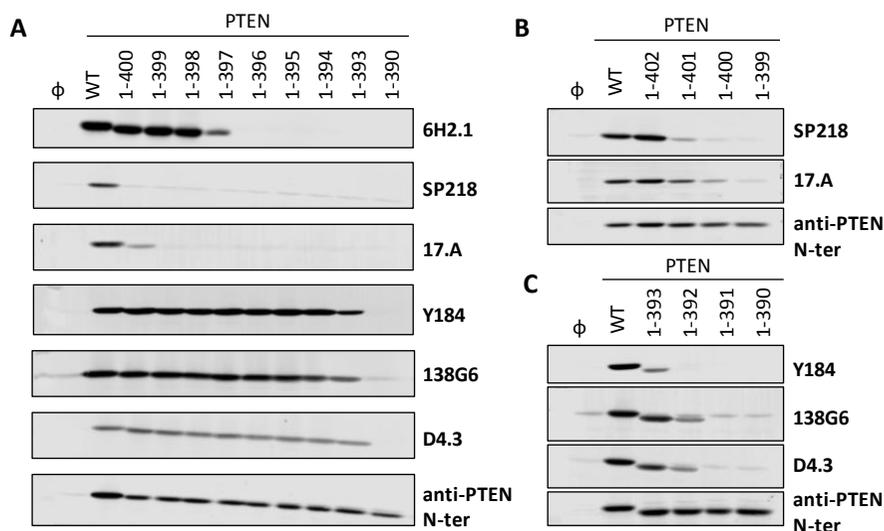


Figura 20. Reactividad de los AcM anti-PTEN frente a la cola C-terminal de PTEN. Detección de deleciones de la cola C-terminal de PTEN por los diferentes AcM. *Western blot* de lisados celulares de células COS-7 que expresan truncamientos ectópicos de PTEN C-terminal. **A)** *Western blot* frente a todos los AcM. **B)** Ajuste de epítomos de los AcM SP218 y 17.A. **C)** Ajuste de epítomos de los AcM Y184, 138G6 y D4.3. La expresión de las proteínas recombinantes se observó usando un anticuerpo policlonal contra la región N-terminal de PTEN (anti-PTEN N-ter) como control.

Tabla 14. Mapeo de epítomos de los AcM de PTEN.
Resumen de la pérdida de reactividad de los diferentes AcM anti-PTEN.

AcM	Reactividad disminuida
6H2.1	1-397
SP218	1-401
17.A	1-401
Y184	1-393
138G6	1-392
D4.3	1-392

Para delimitar la región mínima de PTEN reconocida por los AcM, probamos su reactividad con proteínas de fusión GST-PTEN con un extremo C-terminal intacto, pero con deleciones N-terminales progresivas. Como se muestra en la figura 21A y se resume en la tabla 15, todos los AcM reconocieron la proteína GST-PTEN 370-403, mientras que la proteína GST-PTEN 396-403 no fue reconocida por ninguno de los AcM. La eliminación de residuos de PTEN en la región 370-396 distinguió la reactividad de

dos grupos de AcM: 6H2.1, SP218 y 17.A, que reconocen un epítipo más C-terminal; y Y184, 138G6 y D4.3, que reconocen un epítipo más N-terminal. Finalmente, se realizó un análisis por separado en la región reconocida por estos dos grupos de AcM (Figura 21B, C y D), y se muestra un resumen de los resultados en la tabla 15.

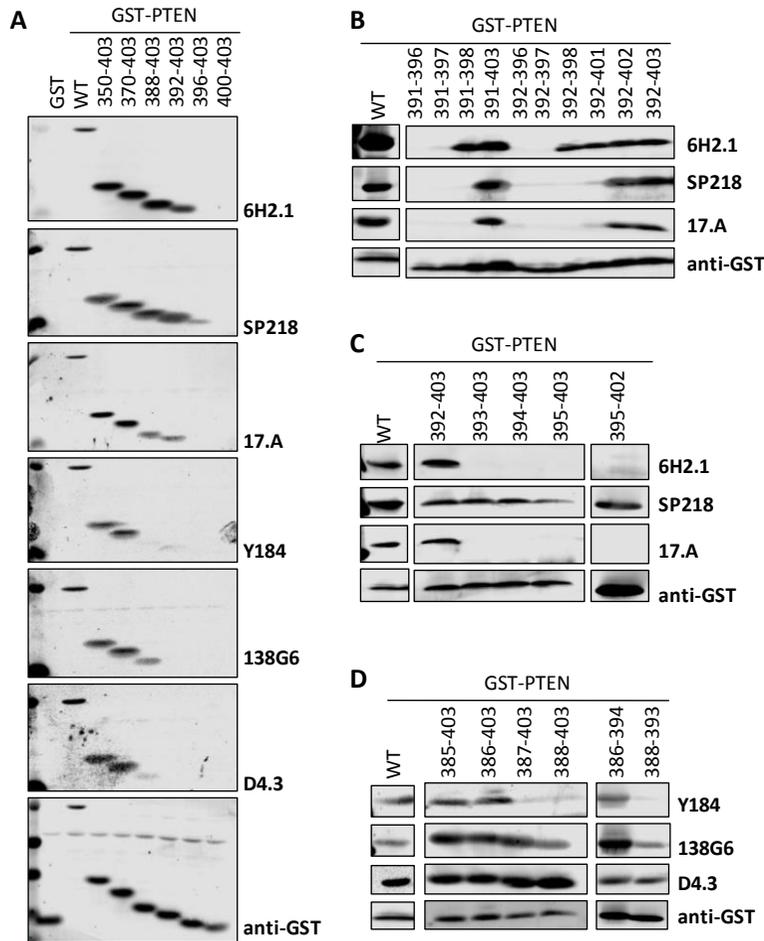


Figura 21. Reactividad de los AcM anti-PTEN frente a péptidos de la cola C-terminal. A, B, C y D) Detección mediante *Western blot* de proteínas de fusión GST recombinantes que contienen péptidos a partir de la cola C-terminal de PTEN. Se usaron lisados celulares de células COS-7. La detección con el anticuerpo anti-GST se usó como control.

Tabla 15. Resumen de la reactividad de los diferentes AcM anti-PTEN con las proteínas de fusión GST que contienen péptidos de la cola C-terminal de PTEN.

GST-PTEN	AcM					
	6H2.1	SP218	17.A	Y184	138G6	D4.3
WT	+	+	+	+	+	+
350-403	+	+	+	+	+	+
370-403	+	+	+	+	+	+
388-403	+	+	+	-	+	+
392-403	+	+	+	-	-	-
396-403	-	-	-	-	-	-
400-403	-	-	-	-	-	-
391-396	-	-	-			
391-397	-	-	-			
391-398	+	-	-			
391-403	+	+	+			
392-396	-	-	-			
392-397	-	-	-			
392-398	+	-	-			
392-401	+	-	-			
392-402	+	+	+			
393-403	-	+	-			
394-403	-	+	-			
395-403	-	+	-			
395-402	-	+	-			
385-403				+	+	+
386-403				+	+	+
387-403				-	+	+
388-403				-	+	+
386-394				+	+	+
388-393				-	+	+

A continuación, realizamos una búsqueda de potenciales antígenos humanos con reactividades cruzadas con los AcM anti-PTEN analizados. Las búsquedas de homologías de secuencias (BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)) usando las secuencias de aminoácidos de PTEN 385-395 y 391-402 correspondieron parcialmente con otras proteínas humanas (Figura 22). Las coincidencias más cercanas a los epítomos definidos por los AcM anti-PTEN incluyeron las secuencias de SERPINB9 (péptido (389)NEPFDE(394), la numeración corresponde a la secuencia de aminoácidos de

B). En este análisis se obtuvieron distintos patrones de reactividad para los AcM. Además, observamos que los residuos de PTEN muy C-terminales eran necesarios, pero no suficientes, para configurar los epítomos reconocidos por algunos de los AcM anti-PTEN.

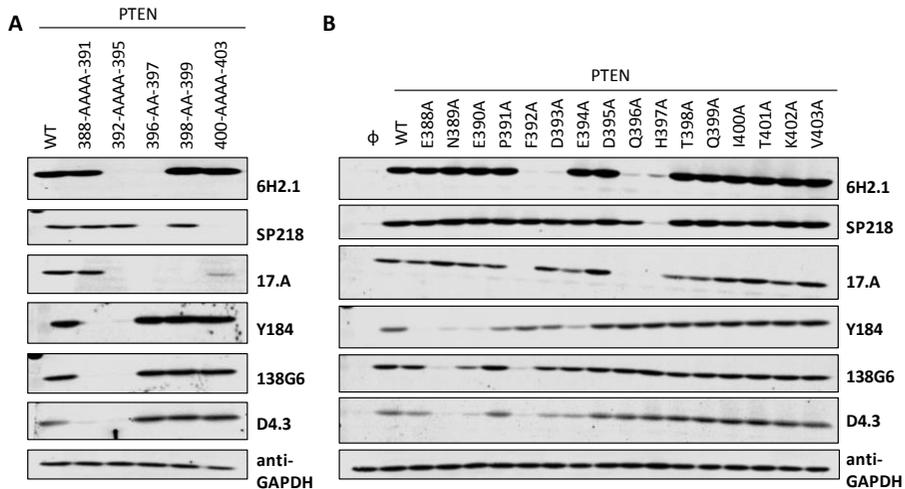


Figura 23. Reactividad de los AcM anti-PTEN de sustituciones a alanina múltiples (A) o individuales (B) en la cola C-terminal. *Western blot* de lisados celulares de células COS-7 que expresan ectópicamente mutaciones de PTEN. La detección de GAPDH con el anticuerpo anti-GAPDH se usó como control.

En siguiente lugar, nos planteamos explorar si la reactividad de los AcM podía verse afectada por modificaciones postraduccionales fisiológicas, así como por mutaciones asociadas a tumores que forman parte de los residuos de PTEN reconocidos específicamente por cada AcM. La Thr398 (T) es fosforilada por la quinasa ATM sensible al daño del ADN, teniendo gran importancia en la regulación y función de PTEN (89). Mutamos el residuo Thr398 a Asp (D) y Glu (E), (mutaciones T398D y T398E respectivamente), ambos con carga negativa, mimetizando la fosforilación del residuo, así como a Gln (Q) y Asn (N), (mutaciones T398Q y T398N respectivamente) y analizamos la reactividad de estas mutaciones con los AcM. En la figura 24A y B, podemos observar cómo dos de los AcM, el SP218 y el 17.A, no son capaces de

detectar las sustituciones que mimetizan la fosforilación del residuo PTEN Thr398. La reactividad del resto de AcM no se vio afectada por dichas sustituciones. Concluimos que la fosforilación de la Thr398 podría afectar negativamente a la reactividad de los AcM SP218 y 17.A. El residuo Lys402 de PTEN es acetilado por la acetiltransferasa CBP, que afecta a la unión de PTEN a dominios PDZ (50), pero la sustitución de Lys402 por Gln, que imita la acetilación (mutación K402Q), no afectó el reconocimiento de PTEN por ninguno de los AcM (Figura 24A y B).

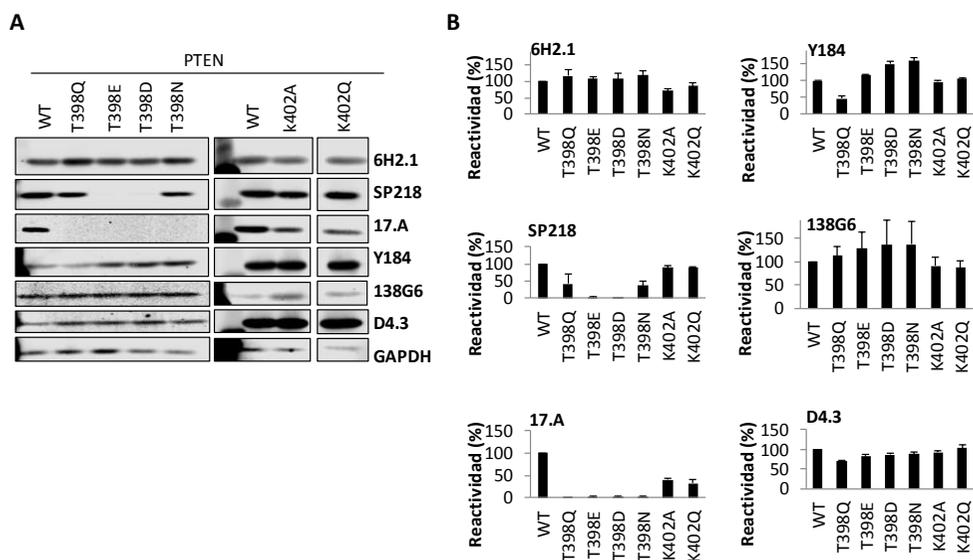
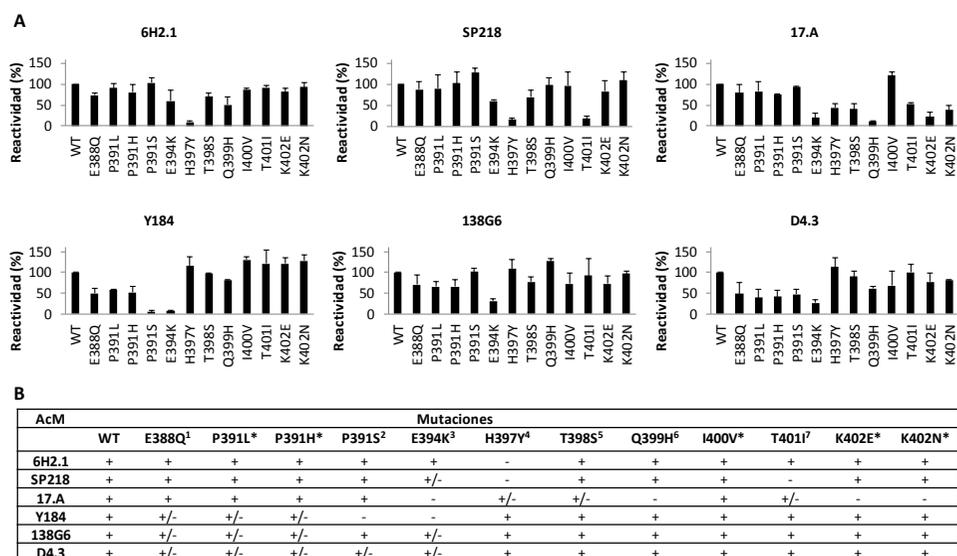


Figura 24. Reactividad de los AcM anti-PTEN con sustituciones de aminoácidos que mimetizan la fosforilación y acetilación en la cola C-terminal de PTEN. A) *Western blot* de lisados celulares de células COS-7 que expresan ectópicamente mutaciones de PTEN. Las mutaciones de la Thr (T) 398 que mimetizan la fosforilación son el Glu (E) y el Asp (D), usando como controles las mutaciones a Gln (Q) y Asn (N). La mutación de la Lys (K) 402 que mimetiza la acetilación es la Gln (Q), usando como control la mutación a Ala (A). **B)** Cuantificación de la reactividad relativa de los AcM frente a las mutaciones descritas para este estudio. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD.

A continuación, exploramos cómo mutaciones puntuales de esta región de PTEN (residuos 391-403), asociadas a tumores o enfermedades, afectaban al reconocimiento por los diferentes AcM. Algunas de estas mutaciones no fueron

reconocidas por algunos AcM (Figura 25A y B), coincidiendo con el mapeo de epítomos preciso asignado a cada AcM.



¹ Carcinoma renal (COSMIC); ² ASD (228); ³ Carcinoma urotelial de vejiga (cBioportal); ⁴ Carcinoma gástrico, Glioma (COSMIC); ⁵ Glioma (COSMIC); ⁶ Pulmón (COSMIC); ⁷ Glioma, Leiomyosarcoma (COSMIC); ^{*} PHTS (Clin Var, NCBI).

Figura 25. Reactividad de los AcM anti-PTEN con mutaciones asociadas a enfermedad. A) Cuantificación de la reactividad de los AcM. Resultados obtenidos de *Western blot* de lisados celulares de células COS-7 que expresan mutaciones de PTEN ectópicamente. Los resultados se muestran como la reactividad con respecto al control de PTEN WT (100% reactividad). Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. **B)** Resumen de la reactividad de los diferentes AcM anti-PTEN. +, cuando existe reactividad por parte del AcM frente a la mutación; +/-, cuando se da una reactividad parcial; -, cuando no hay reactividad.

Es importante destacar que el análisis funcional de estas variantes de PTEN reveló que todas las variantes mostraban actividad fosfatasa PIP_3 en células (*Western blot* analizando el contenido de fosfo-AKT) y una localización subcelular (análisis de inmunofluorescencia) equivalente a PTEN silvestre (Figura 26A y B).

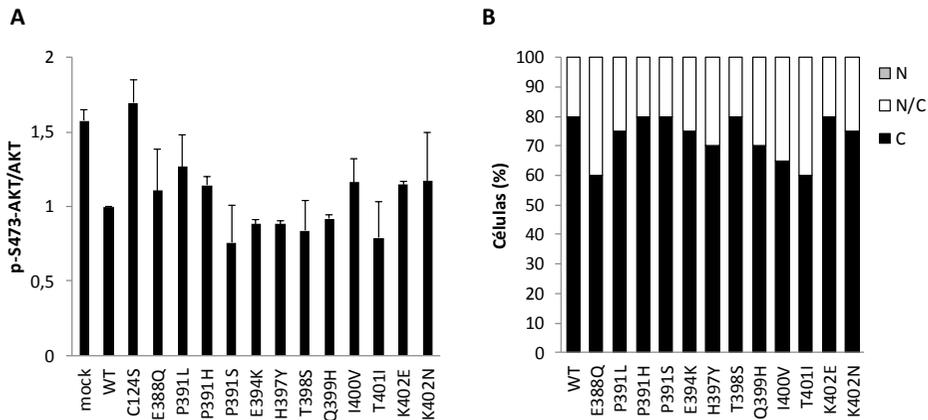


Figura 26. Actividad funcional y localización subcelular de las mutaciones asociadas a tumores C-terminales de PTEN. A) Representación del ratio p-Akt (S473)/Akt de los lisados de células COS-7, co-transfectadas con plásmidos que codifican las diferentes variantes y con Akt1. Como medida indirecta de la actividad catalítica de PTEN se usó la fosforilación de Akt. El mutante de PTEN C124S catalíticamente inactivo se usó como control. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. **B)** Localización subcelular observada mediante inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con las diferentes variantes de PTEN. Cuantificación de células con localización nuclear (N), citoplasmática (C), o en ambos compartimentos (N/C).

En conclusión, hemos definido con precisión los epítomos reconocidos por cada AcM anti-PTEN (Figura 27) y hemos ilustrado que el reconocimiento de proteínas PTEN funcionales por AcM anti-PTEN específicos puede verse afectado por modificaciones postraduccionales de la proteína PTEN o por mutaciones del gen *PTEN*.

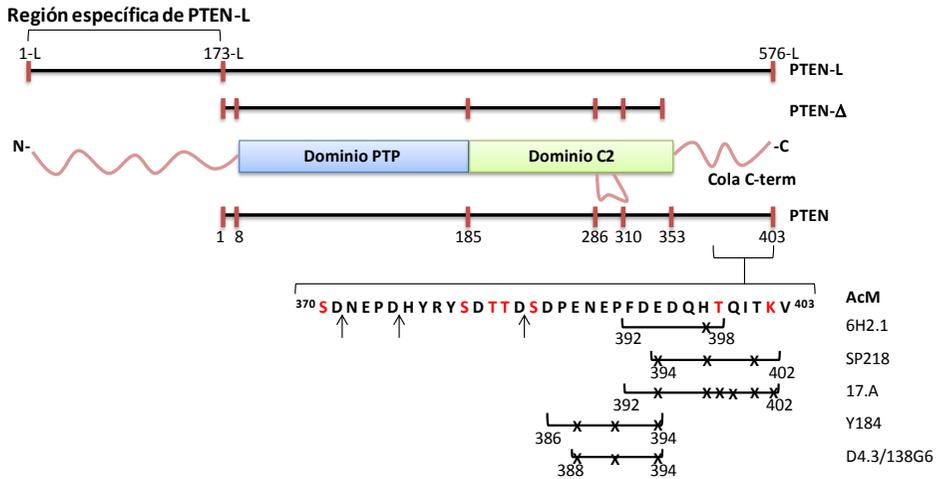


Figura 27. Representación esquemática de las isoformas de PTEN indicando las secuencias de aminoácidos de los epítomos lineales reconocidos por los diferentes AcM anti-PTEN. Los números indican la numeración de aminoácidos. Los aminoácidos están indicados con el código de una letra. Los residuos Ser y Thr en rojo son residuos fisiológicamente fosforilados. El residuo de Lys en rojo puede someterse a acetilación. Las flechas indican los residuos donde PTEN es cortado por caspasa-3. Las líneas debajo de la secuencia de aminoácidos delimitan los epítomos reconocidos por cada AcM. Las cruces indican residuos mutados en tumores o en pacientes cuya sustitución provoca la pérdida total o parcial de la reactividad de los AcM.

3. Estudio de variantes de PTEN de la región N-terminal

3.1. La variante de PTEN Q17E del dominio N-terminal

La variante Q17E (Gln17Glu) de PTEN, donde la glutamina 17 es sustituida por un glutámico, ha sido encontrada en pacientes con PHTS y ASD (229, 230). Este residuo se ubica dentro de los motivos de localización N-terminal de PTEN (NLMs). Al igual que otros aminoácidos de esta región, el Q17 está bien conservado entre especies (con la excepción de *Drosophila melanogaster* que presenta una lisina (K) en esta posición) (Figura 28). Los motivos NLMs están expuestos, lo que facilita su interacción con proteínas reguladoras. Además, muestran la misma orientación topológica que el *loop* TI cargado positivamente en el dominio PTP de PTEN, y los *loops* de unión a membrana CBR3 y Ca2 del dominio C2 (Figura 29). Estas observaciones sugieren que el Q17 es relevante para la función de la proteína.

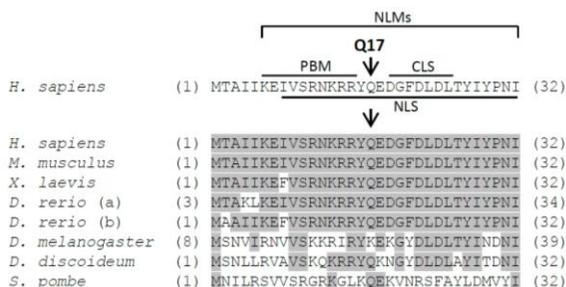


Figura 28. Localización del residuo Q17 de PTEN y su conservación entre diferentes especies. Comparación de la secuencia de PTEN entre los residuos 1-32 de diferentes especies con respecto a la humana (número NP_000305.3). Los residuos conservados aparecen sombreados. Los números entre paréntesis corresponden a la numeración de aminoácidos. Están indicados los motivos de localización N-terminal (NLMs): NLS, señal de localización nuclear; PBM, motivo de unión a PIP₂; CLS, señal de localización citoplásmica.

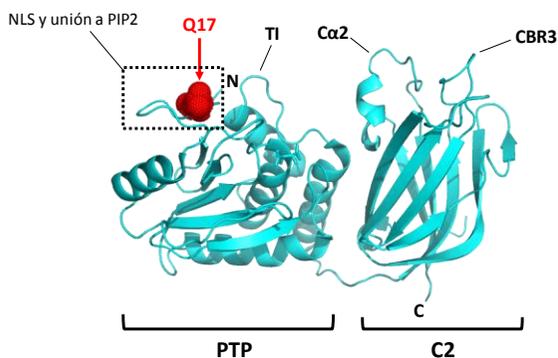


Figura 29. Localización del Q17 en la estructura 3D de PTEN. El residuo Q17 está indicado en rojo con una flecha. También se indica la ubicación de la señal de localización nuclear (NLS) y el motivo de unión a PIP_2 , así como la localización de los *loops* de unión a la membrana TI, Ca_2 y CBR3. PTP, dominio tirosina fosfatasa; C2, dominio C2 de unión a membrana.

3.2. La variante Q17E muestra una actividad fosfatasa ligeramente reducida y es estable en las células

Para comenzar, analizamos, tanto en un modelo experimental *in vivo* realizado sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como en células de mamíferos transfectadas con los correspondientes ADNc, la funcionalidad de la variante Q17E y la comparamos con las variantes Q17A (Gln17Ala) y Q17P (Gln17Pro). La variante Q17P ha sido asociada a gliomas (cancer.sanger.ac.uk/cosmic) y la variante experimental Q17A se ha visto en estudios previos que afecta ligeramente a la actividad fosfatasa PIP_3 de PTEN en levaduras, sin afectar a la localización de la proteína (47).

Observamos cómo la variante PTEN Q17E mostró menor actividad PIP_3 -fosfatasa cuando se comparó con PTEN WT, tanto en levadura (Figura 30) como en células de mamífero (Figura 31), aunque en este último caso la diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, comparamos dicho efecto en dos líneas celulares diferentes. En células COS-7, que expresan PTEN endógeno, y en células U87MG, que no expresan PTEN endógeno. En ambas líneas celulares observamos

efectos similares. La variante Q17P mostró pérdida total de función, al igual que la variante PTEN C124S catalíticamente inactiva (Cys124Ser) (Figura 31A).

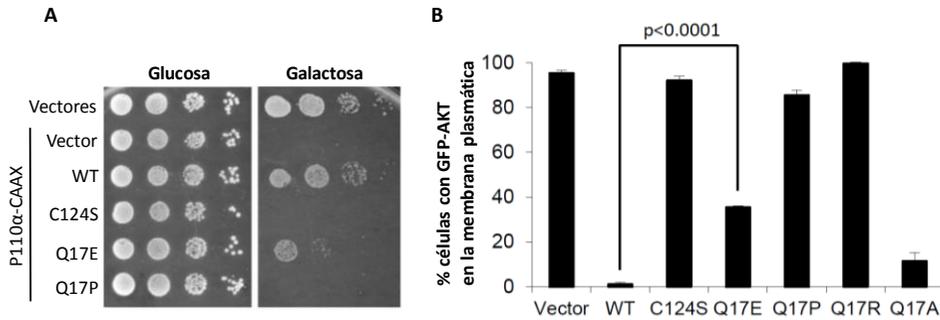


Figura 30. Actividad funcional de la variante PTEN Q17E en un sistema de levadura heterólogo de *S. cerevisiae*. **A)** Ensayo de crecimiento de levadura, mediante un sistema de gotas. Las levaduras están transformadas con diferentes plásmidos que codifican una forma hiperactiva de la subunidad catalítica p110 α de PI3K de mamíferos (p110 α -CAAX) y variantes de PTEN, bajo condiciones de crecimiento en glucosa (control, sin inducción de proteínas heterólogas) o en condiciones de crecimiento en galactosa (inducción de proteínas heterólogas). El crecimiento de células de levadura es inhibido por PI3K (p110 α -CAAX+vector). Esto puede evitarse mediante la expresión de PTEN activo (p110 α -CAAX+PTEN (tipo silvestre) WT) pero no con la mutación de PTEN catalíticamente inactiva (p110 α -CAAX+PTEN C124S) (218). PTEN Q17E rescató parcialmente el efecto de PI3K a diferencia de PTEN Q17P que es inactivo. **B)** Cuantificación de la actividad de las variantes de PTEN co-transformando las levaduras con plásmidos que codifican GFP-Akt1, que se une a PIP₃ en la membrana plasmática. Se monitorizó microscópicamente la eliminación de GFP-Akt1 de la membrana, relacionándose con la actividad de PTEN. Se usaron los controles Q17R (pérdida de actividad) y Q17A (activo). Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. Se muestran los valores P de la prueba t de Student.

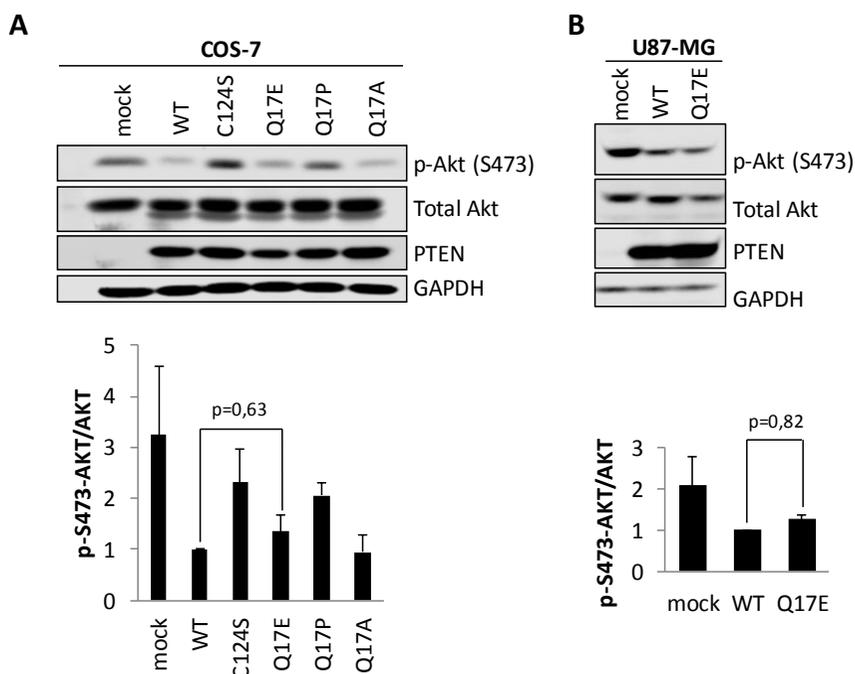


Figura 31. Actividad funcional de la variante PTEN Q17E en células de mamíferos. **A)** Las células COS-7 y **B)** U87MG se co-transfectaron con diferentes combinaciones de plásmidos que codifican Akt1 y las variantes de PTEN. La fosforilación de Akt (como medida indirecta de la actividad catalítica de PTEN) se observó mediante *Western blot* usando el anticuerpo anti-pAkt (Ser473). Se usaron anticuerpos específicos para ver la expresión de Akt total, PTEN y GAPDH (como control de carga). Tras la cuantificación de las bandas del *Western blot*, se determina la proporción pAkt/Akt de cada condición. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. Se muestran los valores P de la prueba t de Student.

A continuación, nos propusimos analizar la estabilidad de la variante Q17E en células de mamíferos, midiendo la degradación de la proteína en presencia del inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida. Se usó como control la variante de PTEN D252G (Asp252Gly) que es inestable (también presente en pacientes con ASD y PHTS) (231). La estabilidad de la proteína PTEN Q17E fue similar a la de PTEN WT y mayor que la de PTEN D252G (Figura 32).

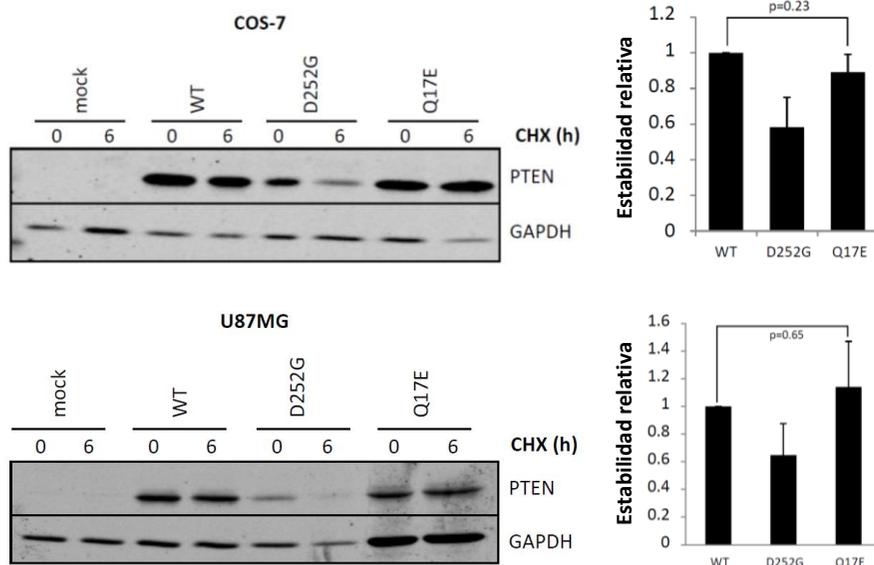


Figura 32. Estabilidad de PTEN Q17E en células. Las células COS-7 y U87MG se transfectaron con plásmidos que codifican las diferentes variantes de PTEN indicadas (WT, tipo silvestre). Las células se incubaron en presencia de cicloheximida (CHX) (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 6 h antes de su lisis, para controlar la degradación de la proteína. Los niveles de proteína se midieron mediante *Western blot* usando anticuerpo anti-PTEN (6H2.1). GAPDH se muestra como control de carga. Los niveles de proteína después del tratamiento con CHX se representan como la relación 6 h/0 h, después de la cuantificación de las bandas de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. Se muestran los valores P de la prueba t de Student.

3.3. La variante Q17E se acumula en el núcleo

Estudiamos la localización subcelular de la variante Q17E de PTEN, comparándola con PTEN WT (tipo silvestre) y las variantes Q17A y Q17P. Los resultados de inmunofluorescencia obtenidos muestran que en las células COS-7 transfectadas, PTEN Q17E se acumula en el núcleo, a diferencia de PTEN WT (principalmente citoplasmático) y la variante Q17A (Figura 33). Asimismo, la variante Q17P asociada a glioma también mostró un aumento de la acumulación nuclear, revelando un papel relevante para el residuo Q17 en el control de la distribución de PTEN entre el núcleo y el citoplasma. Además, utilizamos la variante experimental K13A, con una NLS N-

terminal no funcional (44, 47), la cual impidió la acumulación nuclear de la variante Q17E (Figura 33).

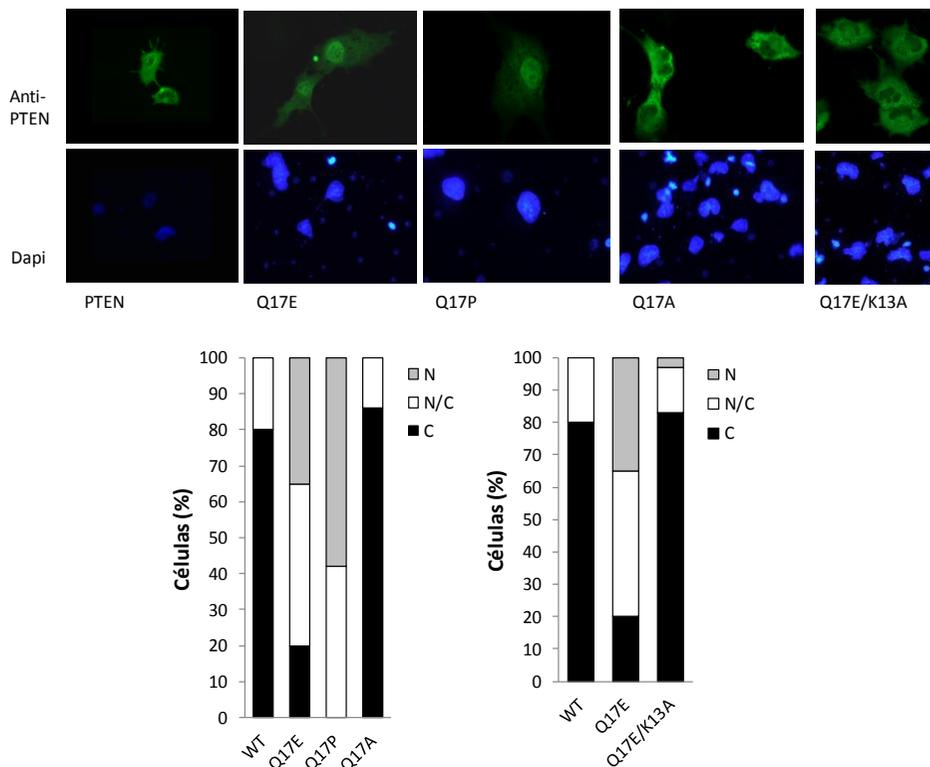


Figura 33. Inmunofluorescencia para el estudio de la localización subcelular de la variante Q17E. Células COS-7 transfectadas con plásmidos que codifican las diferentes variantes. Se usó el anticuerpo anti-PTEN 425.A para monitorizar la localización de las variantes, y Dapi para observar los núcleos. Debajo, se muestra la cuantificación de porcentajes de células con localización nuclear (N), citoplasmática (C), o ambas (N/C). PTEN silvestre (WT).

De forma paralela, monitorizamos la localización subcelular de PTEN usando una proteína PTEN-GFP en células COS-7 transfectadas. Los resultados obtenidos reflejan la misma acumulación nuclear de las variantes Q17E y Q17P (Figura 34). Además, cuando la variante PTEN K13E, que presenta una NLS no funcional, estaba presente junto a Q17P y Q17E, la localización subcelular cambió, dejando de ser nuclear. Por otro lado, la variante PTEN C124S no tuvo efecto sobre la distribución

subcelular de PTEN Q17E o Q17P, indicando que la acumulación nuclear de estas variantes de PTEN es independiente de su catálisis.

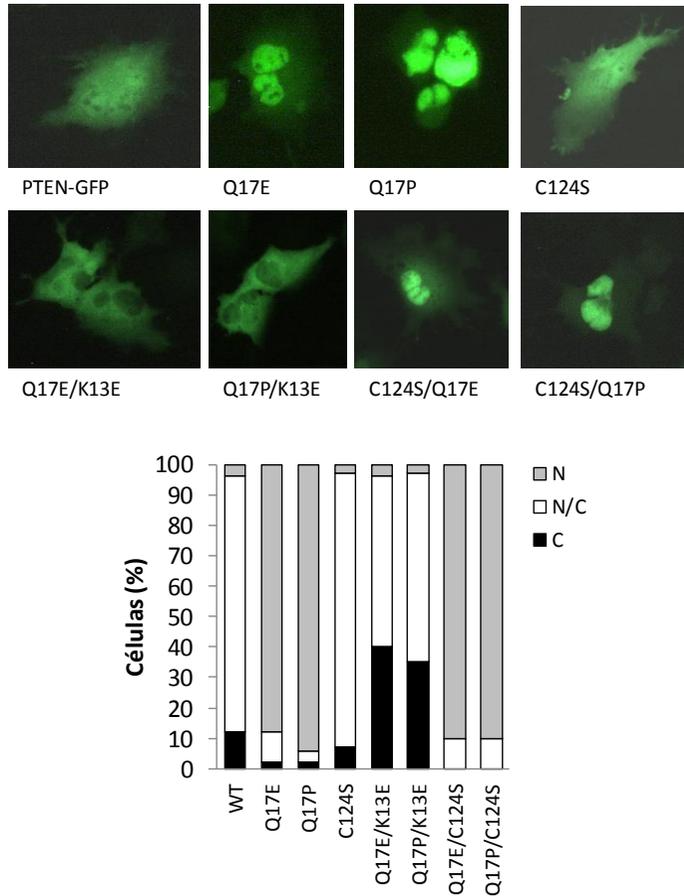


Figura 34. Microscopía de fluorescencia para el estudio de la localización subcelular de la variante Q17E. Células COS-7 transfectadas con plásmidos PTEN-GFP (GFP C-terminal) para las diferentes variantes. Debajo, la cuantificación de porcentajes de células con localización nuclear (N), citoplasmática (C), o ambas (N/C). PTEN silvestre (WT).

3.4. Variantes hereditarias y asociadas a tumores del extremo N-terminal de PTEN causan acumulación nuclear de PTEN

3.4.1. Estudio funcional *in vivo* de variantes N-terminales

Adicionalmente, hemos analizado un grupo de variantes N-terminales de PTEN (22 variantes, comprendidas entre los residuos 12-32) encontradas en la línea germinal de pacientes PHTS y ASD (Tabla 16). El análisis funcional *in vivo* de la actividad fosfatasa de PTEN en levadura puso de manifiesto la pérdida de función parcial o total para la mayoría de las variantes (Figura 35A).

3.4.2. Estudio de la localización celular de variantes N-terminales

A continuación, estudiamos la localización subcelular de las variantes N-terminales de PTEN, tanto las de línea germinal (Figura 35B panel superior), como las encontradas en tumores (comprendidas entre los residuos 7-36) (cancer.sanger.ac.uk/cosmic) (Figura 35B panel inferior). Los resultados revelaron una mayor acumulación nuclear de las variantes asociadas a enfermedad y portadoras de mutaciones entre los residuos 17-26 (Figura 35), se muestra un resumen en la tabla 16. Con estos resultados, podemos concluir que las mutaciones de la región N-terminal de PTEN asociadas a enfermedad a menudo favorecen la acumulación nuclear de PTEN, disminuyendo su actividad fosfatasa de PIP₃.

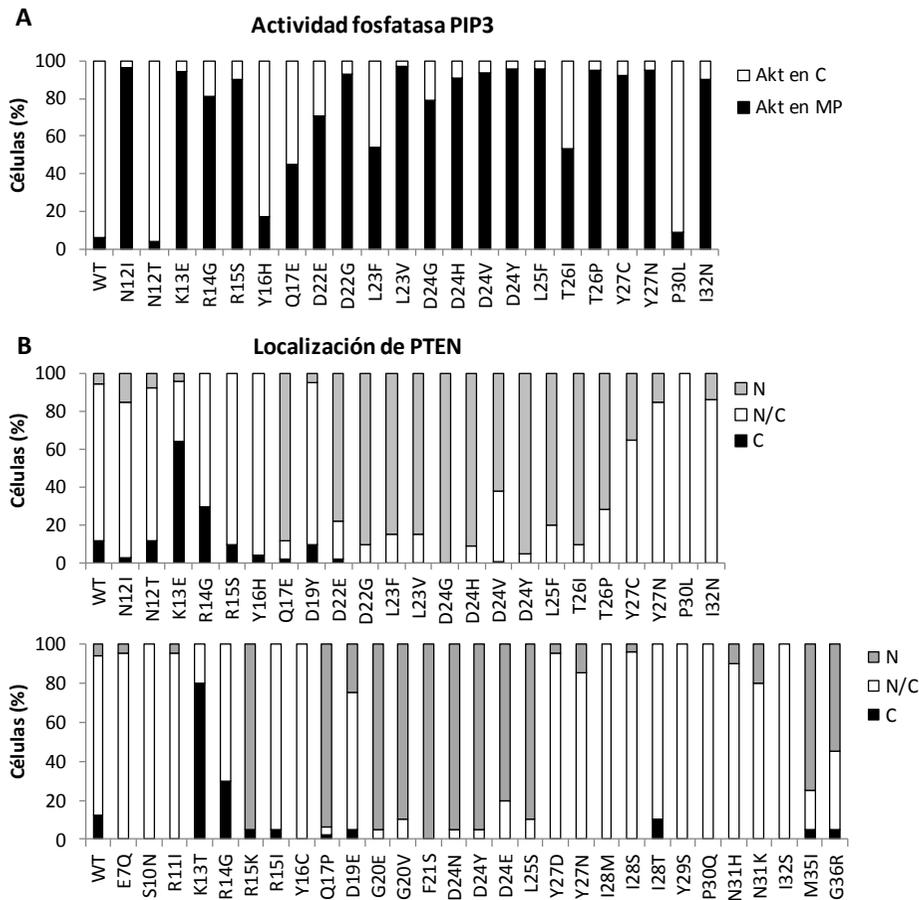


Figura 35. Análisis funcional y estudio de la localización subcelular de mutaciones N-terminales de PTEN. **A)** Estudio de la actividad *in vivo* de PTEN en el modelo de la levadura. Las células de levadura se co-transformaron con plásmidos que codifican p110 α -CAAX, GFP-Akt1, y las variantes de PTEN, evaluándose la actividad fosfatasa PIP₃. Se muestra el porcentaje de células con GFP-Akt1 en el citoplasma (C) (indicativo de actividad fosfatasa de PTEN) o en la membrana (MP). PTEN silvestre (WT). Los datos son el promedio de tres experimentos en tres clones diferentes ($n > 100$ células por clon). **B)** Microscopía de fluorescencia de células COS-7 transfectadas con plásmidos que codifican las diferentes mutaciones (en PTEN-GFP). Parte superior, mutaciones de línea germinal; parte inferior, mutaciones encontradas en tumores. Se muestra la cuantificación de porcentajes de células con localización nuclear (N), citoplasmática (C), o en ambos compartimentos (N/C). PTEN silvestre (WT).

Tabla 16. Análisis funcional de las variantes N-terminales de PTEN de línea germinal.

Mutación	Enfermedad ¹	Edad ²	HGMD ³	COSMIC ⁴	Clin Var ⁵	Localización subcelular ⁶	Act.PIP ₃ in vivo ⁷
PTEN silvestre						N/C	+
N12T	ASD	5,2 a	+	-	+	N/C	+
N12I	CS	-	+	-	-	N/C	-
K13E	CS	-	+	+	-	C	-
R14G	ASD	3,3 a	+	+	+	N/C	-
R15S	CS	-	+	+	+	N/C	-
	ASD	18 m					
Y16H	PHTS	-	+	-	+	N/C	+
Q17E	CS	-	+	-	+	N	+/-
	ASD	10 m					
D22G	CS; BRRS	-	+	+	+	N	-
D22E	ASD	-	-	+	-	N	+/-
L23V	CS	-	+	+	-	N	-
L23F	CS	-	+	+	-	N	+/-
D24H	CS	65,4 a	+	+	+	N	-
D24Y	BRRS:DD	4 a	+	+	+	N	-
D24G	PHTS	57,7 a 36,8 a 6,7 a	+	+	+	N	-
D24V	CS	39 a	+	+	-	N	-
L25F	CS	9,6 a	+	+	-	N	-
	ASD	7 a					
T26P	CS	25,7 a 9 a	+	+	-	N	-
T26I	DD; macroc	12 m	+	-	-	N	+/-
Y27C	ASD	10 m	+	+	+	N/C	-
Y27N	PHTS	-	+	+	-	N/C	-
P30L	CS	-	+	-	-	N/C	+
I32N	CS	56,4 a	+	-	-	N/C	-

¹ Enfermedades. ASD, desorden del espectro autista; BRRS, síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba; CS, síndrome Cowden; DD, retraso del desarrollo; macroc, macrocefalia; PHTS, síndrome tumoral hamartomatoso asociado a PTEN.

² Edad de diagnóstico. En algunos casos no hay información (-); a, años; m, meses.

³⁻⁴⁻⁵ Bases de datos. HGMD, *Human Gene Mutation Database*; COSMIC, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*; Clin Var (NCBI).

⁶ Localización subcelular determinada mediante microscopía de fluorescencia en células de mamíferos mediante PTEN-GFP. N, localización nuclear; N/C, localización nuclear y citoplasmática; C, localización citoplasmática.

⁷ Actividad de PIP₃ en ensayos de levaduras, determinada mediante GFP-Akt1. +, Actividad completa; +/-, actividad parcial; -, no actividad.

3.5. Sistema Genitourinario. Análisis de las variantes del extremo N-terminal en PTEN y PTEN-L

Hemos analizado comparativamente en las isoformas PTEN y PTEN-L las propiedades de algunas de las mutaciones puntuales N-terminales de PTEN con cambio de aminoácido encontradas en tumores genitourinarios (próstata, riñón y vejiga) (Tabla 17), (cancer.sanger.ac.uk/cosmic) (mayo 2016).

Tabla 17. Mutaciones con cambio de aminoácido N-terminales de PTEN en tumores del sistema genitourinario.

Mutación de PTEN	Tipo de tumor
E7Q	Próstata
D24N	Próstata
Y27N	Próstata
I28T	Próstata
G36R	Próstata
R14G	Riñón
D19E	Riñón
M35I	Riñón
D24Y	Vejiga

3.5.1. Abundancia relativa de proteína y localización subcelular

Comenzamos analizando la expresión relativa de las distintas variantes en PTEN y en PTEN-L mediante *Western blot*. Las mutaciones Y27N e I28T se expresaron menos que el resto de las mutaciones en el *background* de PTEN (Figura 36), probablemente por disminución de su estabilidad intrínseca. Para el estudio de estabilidad de las variantes de PTEN, incubamos las células en presencia de cicloheximida (CHX) durante 6 h antes de lisarlas, usando como referencia de inestabilidad la variante D252G (231). Como podemos observar, la estabilidad del mutante Y27N se vio comprometida (Figura 36).

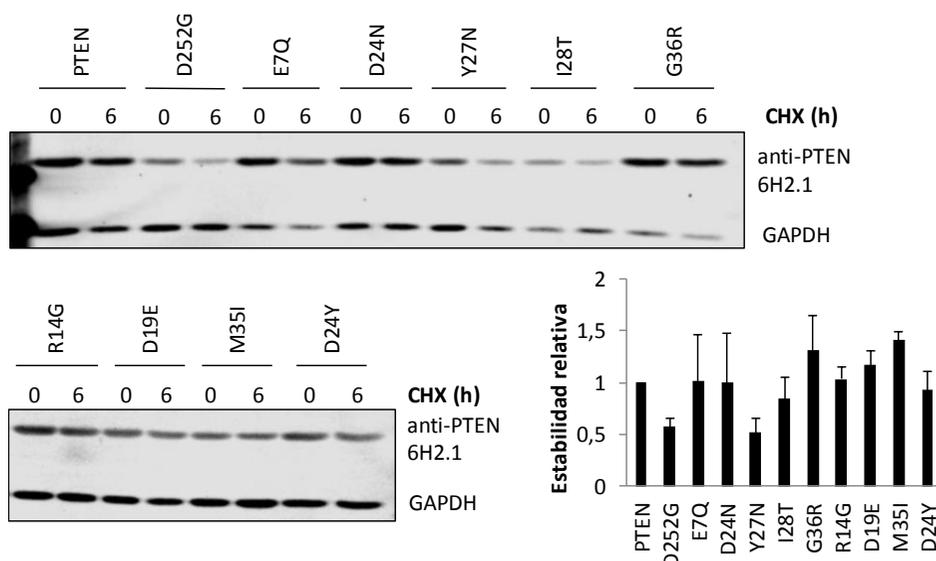


Figura 36. Expresión de las variantes de PTEN encontradas en tumores del sistema genitourinario. Estabilidad de las variantes de PTEN (como referencia se usó la variante inestable D252G). Las células se incubaron en presencia de CHX (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 6 h antes de su lisis, para monitorizar la degradación de la proteína. Los niveles de proteína se midieron mediante *Western blot* usando el anticuerpo anti-PTEN (6H2.1). GAPDH se muestra como control de carga. En el gráfico, los niveles de proteína después del tratamiento con CHX se representan como la relación 6 h/0 h. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD.

Como se observa en la figura 37A, la expresión relativa de PTEN-L y PTEN a partir del ADNc de PTEN-L depende del aminoácido de iniciación y de la secuencia Kozak. La variante PTEN-L.1 muestra expresión mayoritaria de PTEN-L, y fue empleada en los experimentos funcionales de PTEN-L. La localización subcelular también se vio afectada en función de la expresión relativa de PTEN-L y PTEN. La construcción PTEN-L.7, que es la que más PTEN y menos PTEN-L expresa, presenta una localización núcleo/citoplasma, mientras que las demás construcciones son mayoritariamente citoplásmicas (Figura 37B y C). Podemos concluir que en las células tiene lugar la coexpresión de las dos formas de PTEN (PTEN-L y PTEN), las cuales se expresan y localizan de manera diferente.

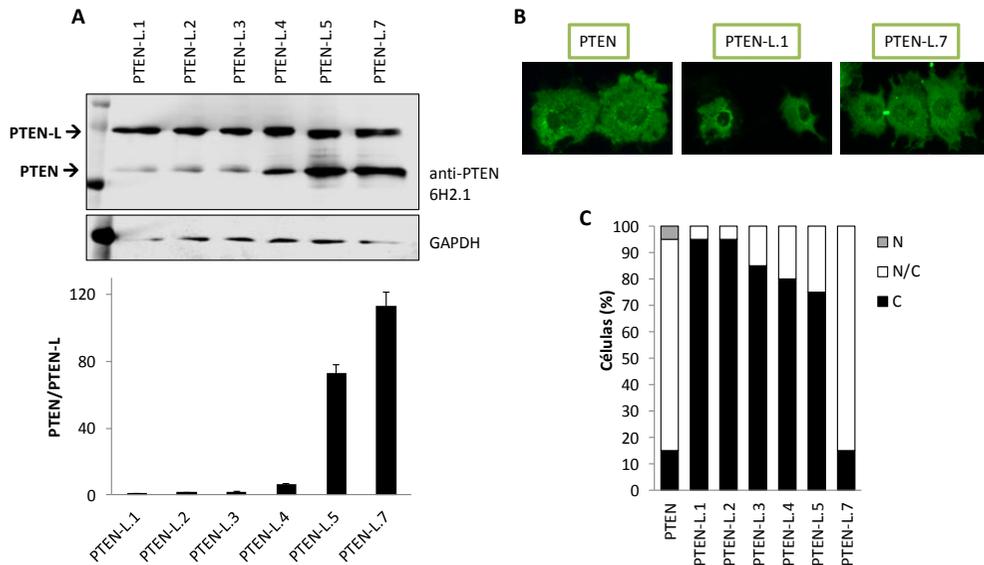


Figura 37. Comparación de las construcciones de PTEN-L. **A)** Expresión relativa de PTEN-L y PTEN a partir del *Western blot* de lisados de células COS-7 transfectadas con las construcciones de PTEN-L; en el gráfico inferior se representa PTEN/PTEN-L. PTEN-L.1=Met+1, Kozak artificial; PTEN-L.2=Met+1, Kozak natural; PTEN-L.3=Met+1, no Kozak; PTEN-L.4=Leu+1, Kozak artificial; PTEN-L.5=Leu+1, Kozak natural y PTEN-L.7=Leu+1, no Kozak. (Kozak natural: CTC CCG CTC; Kozak artificial: GAG GCC ACC; No Kozak: GAG AAG CTT). Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. **B)** Inmunofluorescencia para el estudio de la localización subcelular de PTEN, PTEN-L.1 y PTEN-L.7. **C)** Cuantificación de porcentajes de células con localización nuclear (N), citoplasmática (C), o en ambos compartimentos (N/C) de las construcciones PTEN-L.

A continuación, comparamos la expresión relativa de las variantes N-terminales del sistema genitourinario en PTEN y PTEN-L. En el *background* de PTEN-L.1, la cantidad de PTEN en los distintos mutantes fue variable, mientras que la cantidad de PTEN-L se mantuvo constante en todos los casos (Figura 38A). También realizamos estos experimentos con algunas variantes en el *background* de PTEN-L.5 que mimetiza las condiciones naturales de traducción de PTEN-L, y obtuvimos resultados similares (Figura 38B). Estos resultados indican que la abundancia relativa de algunas variantes de PTEN es menor en PTEN que en PTEN-L.

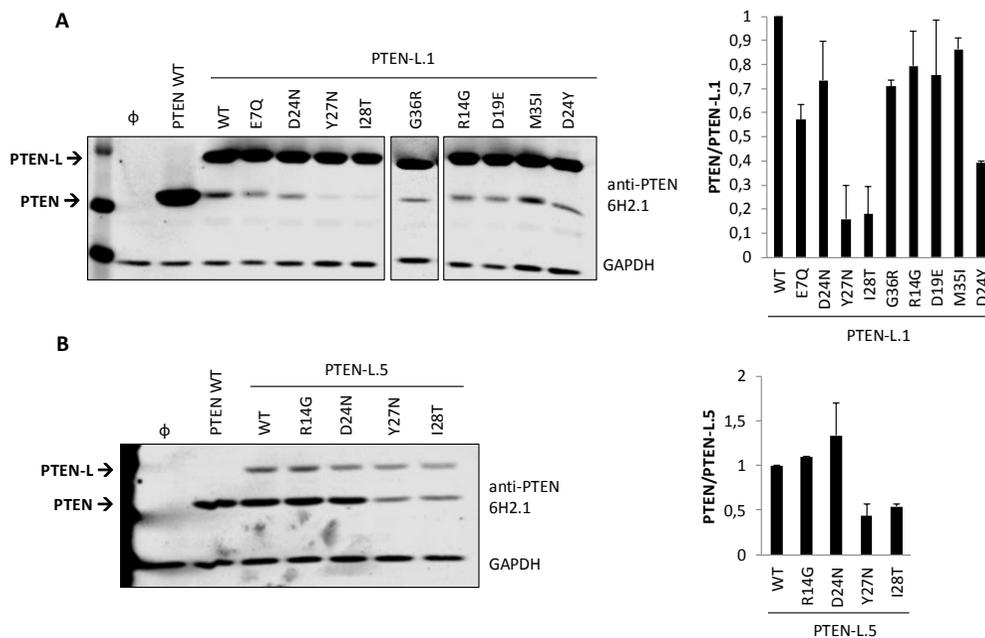


Figura 38. Comparación de la expresión relativa de las variantes de tumores del sistema genitourinario en las isoformas PTEN-L.1 y PTEN-L.5. Las células COS-7 se transfectaron con plásmidos **A)** PTEN-L.1 y **B)** PTEN-L.5 con las respectivas variantes. Las bandas de PTEN, PTEN-L.1 y PTEN-L.5 se cuantificaron, y en los gráficos se representa la proporción PTEN/PTEN-L.1 y PTEN/PTEN-L.5 respectivamente. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD.

Además, como las variantes con truncaciones C-terminales de PTEN causan inestabilidad de la proteína (58) comparamos la expresión de algunas variantes asociadas a tumores en PTEN y PTEN-L (Figura 39). La reactividad de las truncaciones se perdió antes en PTEN que en PTEN-L, indicando que en el *background* de PTEN-L la estabilidad de la proteína es mayor.

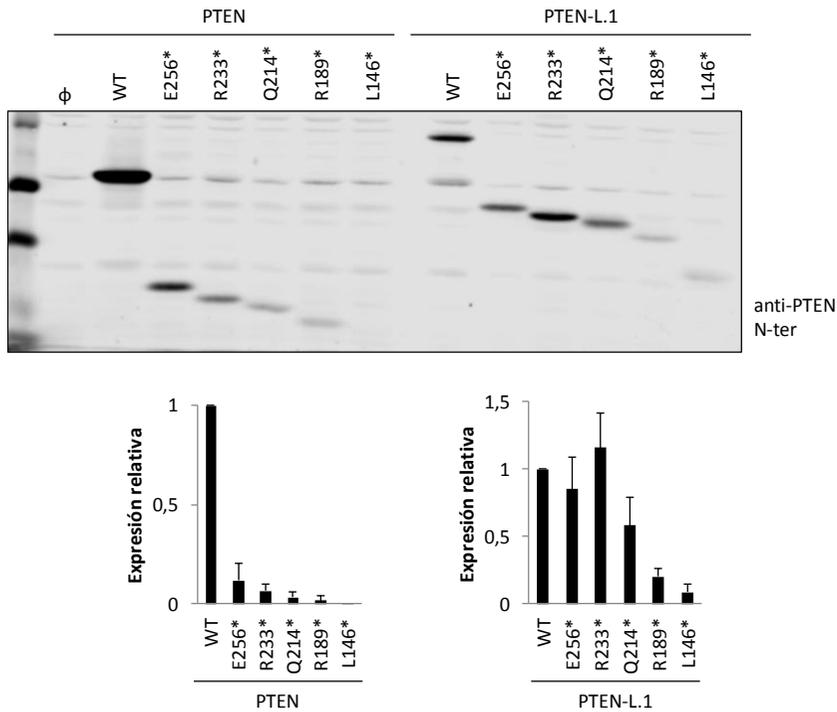


Figura 39. Comparación de la expresión relativa de las variantes con truncaciones C-terminales asociadas a tumores en PTEN y PTEN-L.1. Las células COS-7 se transfecaron con plásmidos con las respectivas variantes de PTEN y PTEN-L.1. El anticuerpo utilizado en el *Western blot* fue un anticuerpo anti-PTEN N-terminal. En los gráficos se representa la cuantificación de las bandas de PTEN y PTEN-L respectivamente. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD.

3.5.2. Actividad funcional

Comparamos la actividad de las variantes N-terminales de tumores del sistema genitourinario en PTEN y en PTEN-L. Pudimos observar que algunas variantes (R14G o M35I) que eran inactivas en PTEN, en PTEN-L recuperaban la actividad (Figura 40), lo cual sugiere una mayor tolerancia funcional a las mutaciones en el caso de PTEN-L.

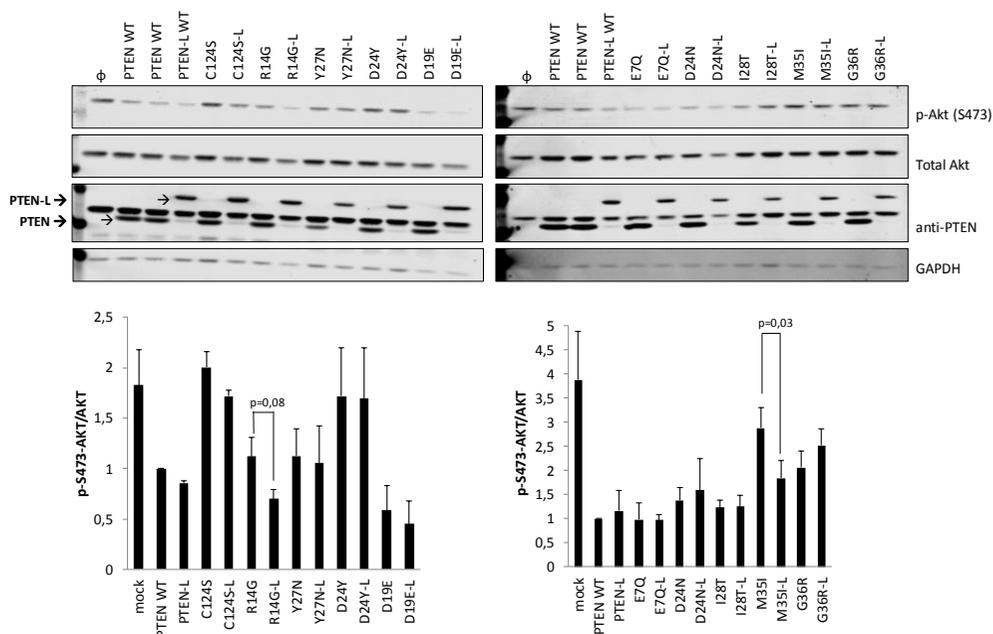


Figura 40. Actividad funcional de variantes de PTEN y PTEN-L en células de mamíferos. Las células COS-7 se co-transfectaron con diferentes combinaciones de plásmidos que codifican Akt1 y las variantes de PTEN y PTEN-L.1. La fosforilación de Akt (como medida indirecta de la actividad fosfatasa de lípidos de PTEN) se determinó mediante *Western blot* usando el anticuerpo anti-pAkt (S473). Se usaron anticuerpos específicos para ver la expresión de Akt total, PTEN (6H2.1) y GAPDH (como control de carga). Los gráficos representan la proporción pAkt/Akt de cada condición. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD. Se muestran los valores P de la prueba t de Student.

3.5.3. Localización subcelular

Por último, comparamos la localización subcelular de estas mutaciones en PTEN-GFP y en PTEN-L.1 GFP. En estos experimentos, mutamos la Met174 de PTEN-L a lle (M174I) (Met1 de PTEN) para minimizar la expresión de PTEN (Figura 41A). La localización subcelular de PTEN-L GFP y PTEN-L M174I-GFP fue similar, predominantemente citoplasmática, a diferencia de PTEN-GFP (Figura 41B).

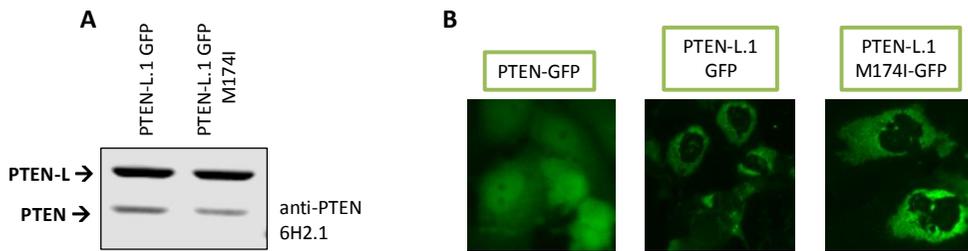


Figura 41. Comparación de la expresión y localización subcelular de PTEN-L.1 GFP y PTEN-L.1 M174I-GFP. A) Expresión relativa de PTEN-L.1 GFP y PTEN-L.1 M174I-GFP. *Western blot* de lisados de células COS-7 transfectadas con los plásmidos correspondientes. **B)** Microscopía de fluorescencia para el estudio de la localización subcelular de células COS-7 transfectadas con los plásmidos PTEN-GFP, PTEN-L.1 GFP y PTEN-L.1 M174I-GFP.

Todas las variantes en PTEN-L mostraron una localización citoplásmica excluyente del núcleo, a diferencia de las variantes en PTEN, que en algunos casos eran nucleares (Figura 42). Podemos concluir que la región adicional de PTEN-L en la región N-terminal afecta a la localización de la proteína, evitando que se acumule en el núcleo, incluso en variantes nucleares de PTEN.

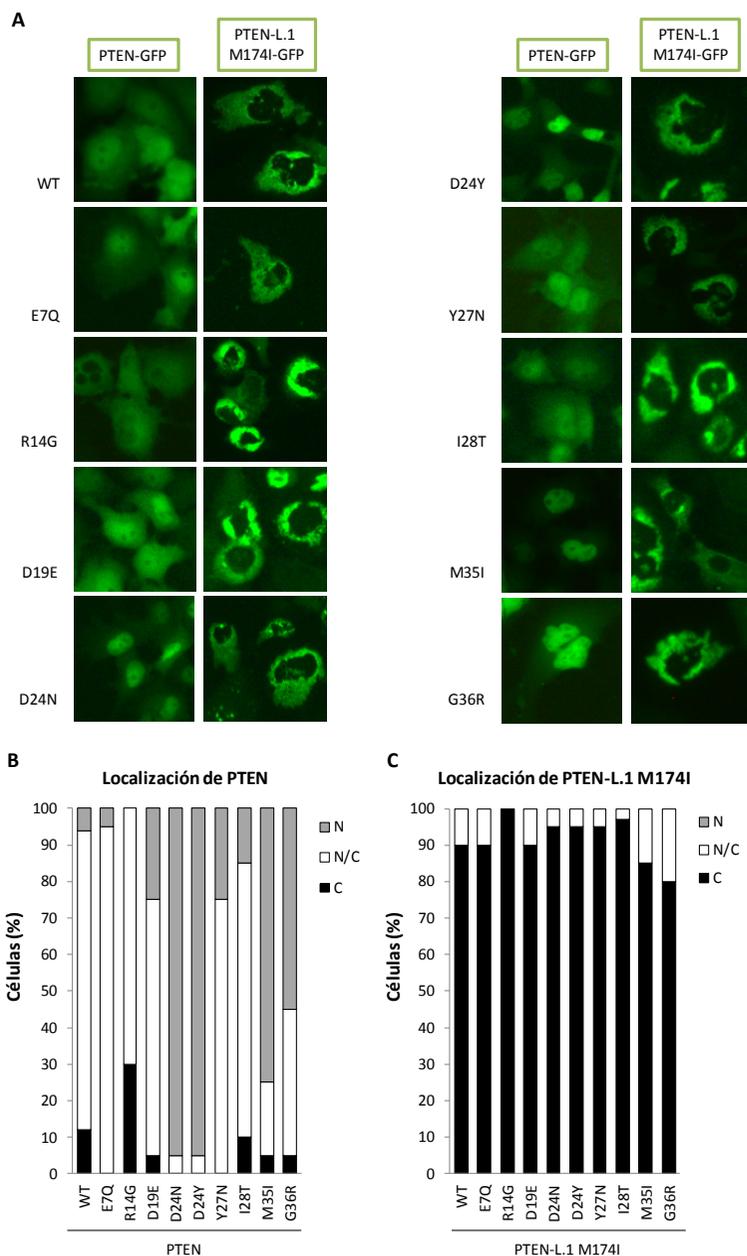


Figura 42. Estudio de la localización subcelular de variantes N-terminales en PTEN y PTEN-L.1. A) Microscopía de fluorescencia de células COS-7 transfectadas con plásmidos que codifican las diferentes mutaciones en PTEN-GFP y PTEN-L.1 M174I-GFP. **B y C)** Cuantificación de porcentajes de células con localización nuclear (N), citoplasmática (C), o en ambos compartimentos (N/C) de las mutaciones en PTEN-GFP y PTEN-L.1 M174I-GFP.

VI. DISCUSIÓN

1. El protocolo de mutagénesis dirigida optimizado para un mejor rendimiento y eficiencia

En esta tesis, hemos podido concluir que los oligonucleótidos mutagénicos de longitud fija predefinida proporcionan condiciones de amplificación de PCR eficientes y facilitan trabajos experimentales a gran escala para la sustitución de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida. Hemos estandarizado el uso de oligonucleótidos de 29 bases para todos nuestros experimentos, lo que disminuye la posible formación de estructuras secundarias por el uso de oligonucleótidos más largos. Sin embargo, para plásmidos difíciles de amplificar puede que siga siendo necesario optimizar el diseño de los oligonucleótidos y las condiciones de PCR. Además, hay que tener en consideración que, para una transformación exitosa, se recomienda el uso de células de *E. coli*. con alta competencia.

La cantidad de producto de PCR obtenida fue proporcional al número de colonias bacterianas obtenidas tras la transformación, y cuando se obtuvieron un bajo número de colonias, la banda del producto de PCR fue casi inexistente (Figura 13). Sin embargo, no hemos encontrado relación entre la eficiencia de la transformación y la longitud del oligonucleótido, T_m , o contenido en GC.

La combinación de plásmidos de tamaño similar (nuestros vectores pRK5 y pYES2 tienen un tamaño de 4,8 y 5,9 kbp, respectivamente) resulta efectiva para la obtención simultánea de mutaciones de ADNc en plásmidos diferentes. Dado que la amplificación de PCR depende del tamaño del producto final, las combinaciones de plásmidos de tamaños muy diferentes podrían resultar menos productivas.

La mutagénesis de alanina *scanning* es un procedimiento habitual para el estudio de la función de una proteína. Junto a ensayos funcionales o biofísicos permite investigar las relaciones estructura-función y evaluar la contribución de cada aminoácido de forma individual a la funcionalidad de todo el polipéptido. Se han realizado varios enfoques para estimar la diversidad e integridad en las bibliotecas

realizadas mediante mutagénesis dirigida aleatorizada utilizando oligonucleótidos degenerados (232, 233). Como hemos podido observar en nuestros experimentos, para obtener mutaciones individuales a alanina, se pueden usar combinaciones de hasta 4 pares de oligonucleótidos consecutivos, aunque la obtención de mutaciones no sigue necesariamente una tendencia estocástica (Tabla 9). Por otra parte, las combinaciones de más de 4 pares de oligonucleótidos consecutivos permiten la generación adicional de mutaciones multisitio en residuos cercanos, en una única reacción de mutagénesis. El programa desarrollado para el diseño de oligonucleótidos mutagénicos facilita la realización de estos experimentos.

La generación de mutantes múltiples en el mismo aminoácido es de gran ayuda para estudiar la relación entre la estructura, la función y la secuencia de regiones de proteínas de especial interés, sobre todo, en residuos funcionales de proteínas cuya ganancia o pérdida de función es causante de una enfermedad, como oncoproteínas o supresores tumorales. Dicho enfoque se ha explorado como una posible alternativa para el uso de mezclas de oligonucleótidos mutagénicos degenerados (234, 235). Nuestros procedimientos facilitan la obtención de un gran número de mutaciones diferentes para posiciones de residuos individuales, realizando varias rondas de mutagénesis en un solo tubo, usando mezclas de oligonucleótidos mutagénicos estandarizados. Esto es particularmente útil cuando se desean conjuntos definidos de sustituciones múltiples, como es el caso de mutaciones de residuos individuales asociadas a enfermedades (236). En conjunto, la combinación de pares de oligonucleótidos mutagénicos predefinidos dirigidos al mismo residuo y reacciones repetidas de PCR aumenta y simplifica la producción de una colección de mutaciones estocásticas.

Caracterizar experimentalmente millones de posibles variantes en miles de genes clínicamente importantes requiere ensayos generalizables. Recientemente, se han desarrollado métodos de mutagénesis de saturación para evaluar exhaustivamente el efecto de las mutaciones no sinónimas en PTEN (237). Además, se han llevado a cabo ensayos de abundancia de variantes de proteínas mediante secuenciación masiva,

mediendo los efectos de miles de variantes de una proteína sobre la abundancia intracelular de forma simultánea (238). Estos avances metodológicos mejoran la habilidad de interpretar los efectos funcionales de mutaciones de proteínas de gran interés clínico, como es el caso de PTEN.

2. Anticuerpos anti-PTEN reconocen diferentes epítomos de la cola C-terminal de PTEN

El mapeo preciso de epítomos de AcM que reconocen biomarcadores en cáncer es fundamental para la interpretación de sus patrones de inmunotinción, así como para proporcionar un diagnóstico de IHC preciso en oncología clínica. Por ejemplo, se han generado AcM anti-BRAF, anti-EGFR o anti-p53 que reconocen específicamente mutaciones *hotspot* en estas proteínas relevantes en cáncer. Esta información podría ser muy valiosa para diagnósticos de precisión basados en IHC y para nuevas terapias potenciales de precisión (199, 239, 240). Además, el uso de AcM para la cuantificación de biomarcadores por otros métodos también depende de su reconocimiento específico del epítomo. Sin embargo, muchos de los AcM usados en investigación, o aquellos estandarizados para su uso rutinario en la clínica, no se han obtenido contra epítomos diseñados racionalmente, siendo importante definir el epítomo reconocido en el contexto de la proteína diana completa. En la presente tesis, hemos realizado un mapeo de epítomos de precisión de seis AcM anti-PTEN adecuados para IHC, cuya reactividad hacia PTEN, a un nivel de alta precisión, era desconocida. Para todos los AcM hemos identificado epítomos lineales de 6-11 aminoácidos de longitud, comprendidos entre los aminoácidos 386-402 de la cola C-terminal desordenada de PTEN (Figura 27). En la obtención de los AcM analizados se usaron, en algunos casos, péptidos sintéticos C-terminales como inmunógenos, pero en otros se utilizaron regiones de PTEN más grandes (Tabla 12), lo cual resalta la inmunodominancia de la secuencia C-terminal de PTEN. Además, la mayoría de los AcM anti-PTEN disponibles, incluyendo AcM conjugados adecuados para técnicas como la citometría de flujo, se

han obtenido por inmunización con péptidos C-terminales de PTEN (241). Las regiones de proteína intrínsecamente desordenadas son propuestas como señales de secuencia adaptables, expuestas al disolvente, que dinámicamente regulan las interacciones y la función de las proteínas (242). Esto podría explicar el efecto inmunodominante de estas regiones C-terminales de PTEN. La proteína PTEN está muy conservada entre humanos y roedores, con una semejanza del 99-100% en la secuencia aminoacídica; la única diferencia reside en el aminoácido 398 (Thr en humanos; Ser en ratón). La variante PTEN humana T398S (imitando a PTEN del ratón) fue reconocida por todos los AcM analizados (Figura 25).

Nuestro mapeo de precisión de los epítomos lineales C-terminales de PTEN nos permitió comprobar la presencia de antígenos humanos con reactividad cruzada potencial con los AcM anti-PTEN analizados. No detectamos reactividad cruzada con SERPINB9 ni con CAMK2G, dos proteínas con importancia en cánceres humanos (Figura 22). Sin embargo, algunos de los AcM analizados en nuestro estudio proporcionaron resultados de tinción de IHC sugestivos de una tinción de falsos positivos, en comparación con los resultados de FISH de las mismas muestras (Tabla 13), aunque no podemos descartar por completo la existencia de falsos negativos mediante el análisis de FISH.

La regulación de la función de PTEN se da en múltiples niveles, incluyendo modificaciones postraduccionales como la fosforilación (42). Curiosamente, las variantes de PTEN T398E y T398D (pero no las variantes T398Q ni T398N), que pueden imitar la fosforilación de PTEN en la Thr398 por la quinasa ATM, en respuesta a daños de ADN (89), no fueron reconocidas por los AcM SP218 y 17.A (Figura 24). Asimismo, las variantes de PTEN encontradas en tumores o en la línea germinal de pacientes fueron reconocidas de forma diferente por cada AcM, pese a que estas variantes no mostraron alteraciones funcionales (Figuras 25 y 26). Esto es relevante a la hora de interpretar los resultados de IHC de muestras tumorales usando estos AcM, o para la cuantificación de PTEN de biopsias humanas, ya que sería indicativo de la pérdida de la proteína PTEN si las muestras llevan esas alteraciones.

Las mutaciones en el gen *PTEN* que generan codones de terminación prematura son relativamente abundantes en tumores y en pacientes, y dan lugar a proteínas de *PTEN* truncadas que son inestables (58). Además, se ha descrito una isoforma de *splicing* alternativo, *PTEN-Δ*, la cual carece de los aminoácidos 344-403 de *PTEN* codificados por el exón 9 como resultado de la incorporación del intrón 8 en el ARNm de *PTEN* (122, 124). Finalmente, *PTEN* puede ser cortado por la caspasa-3 en los residuos Asp371, Asp375 y Asp384, generando formas truncadas con estabilidad y localización subcelular alteradas y con una interacción defectuosa con otras proteínas (47, 52) (Figura 27). Nuestro mapeo de epítomos revela que, independientemente de las propiedades funcionales, los truncamientos C-terminales de *PTEN* patológicos o fisiológicos carecen de los epítomos reconocidos por los AcM anti-*PTEN* analizados. Sería relevante caracterizar y estandarizar otros AcM anti-*PTEN* que reconozcan epítomos en otras regiones definidas de *PTEN* (221), así como AcM que reconozcan específicamente las distintas isoformas de *PTEN* N-terminales, con el objetivo de poder analizar la expresión y función de estas formas de *PTEN* durante los procesos oncogénicos. En la actualidad, no existen anticuerpos anti-*PTEN* estandarizados que se estén utilizando en IHC clínica de diagnóstico, siendo ésta una técnica muy significativa y rutinaria. Por tanto, es necesario profundizar en el estudio de AcM anti-*PTEN* con utilidad clínica. En este sentido algunos abordajes computerizados están permitiendo mejorar la reproducibilidad y la homogeneidad en la detección de biomarcadores como *PTEN*, respaldando los resultados obtenidos por los patólogos (243).

3. Mutaciones de la zona N-terminal afectan a la localización, estabilidad y actividad de PTEN

Las variantes de PTEN asociadas a ASD frecuentemente causan desestabilización y degradación de la proteína PTEN (119, 231). A diferencia de otras variantes patológicas de PTEN (tales como Q17P o D252G), que afectan fuertemente la catálisis o la estabilidad de la proteína, la variante Q17E mostró una actividad fosfatasa ligeramente disminuida y una estabilidad proteica normal en las células (Figuras 30-32), lo cual concuerda con la ausencia de dicha variante (hasta la fecha actual) en bases de datos de mutaciones somáticas de cáncer. En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que la variante de PTEN Q17E solo se ve parcialmente afectada en su actividad catalítica *in vivo*. Estos resultados coinciden con otros que muestran una actividad fosfatasa de PIP₃ *in vitro* similar en PTEN Q17E y en PTEN WT (244). La reducción parcial de la actividad fosfatasa de PTEN podría ser una característica de algunas mutaciones de PTEN con manifestaciones fenotípicas variables en los pacientes.

La porción N-terminal de PTEN, junto con la región C-terminal fosforilable, es crucial para ejercer su actividad fosfatasa de PIP₃ en las células, participando en la regulación dinámica del estado conformacional de PTEN (abierto/cerrado), que regula su localización subcelular, estabilidad y función (134, 245, 246). La mayoría de las moléculas de PTEN se encuentran en el citoplasma en una conformación cerrada debido a interacciones entre la cola C-terminal y la región *core*. La desfosforilación de la cola abre la conformación, exponiendo su zona de unión a la membrana en la región *core*, reclutando PTEN a la membrana. Como hemos podido observar en nuestros experimentos, la variante Q17E mostró una mayor acumulación nuclear en comparación con PTEN WT (Figuras 33 y 34), de acuerdo con otros trabajos donde se ha visto que la variante Q17E se acumula ligeramente en el núcleo (244, 246). Los experimentos usando como controles mutaciones de la Lys13 (K13), la cual forma parte del motivo NLS de PTEN y es necesaria para la acumulación de PTEN en el núcleo,

demonstraron que la acumulación nuclear de PTEN Q17E dependen de la integridad de su NLS N-terminal.

En este trabajo, hemos observado cómo mutaciones de línea germinal y de tumores que comprenden los residuos 17-26 muestran una mayor acumulación nuclear (Figura 35B). Esto coincide con estudios previos que proponen la existencia de una señal de localización citoplásmica en esta región de PTEN (247). Alternativamente, la región 17-26 de PTEN podría comportarse como un motivo de exclusión nuclear, como se ha propuesto para las regiones en los *loops* TI, CBR3 y Ca2 (44, 53), que dificultaría la exposición del motivo atípico NLS de los residuos 8-32. El motivo de unión a PIP₂ de PTEN (PBM) se superpone con el motivo NLS (Figura 28) proponiéndose un papel cooperativo para el PBM y el *loop* TI del dominio PTP, y de los *loops* CBR3 y Ca2 en el dominio C2, para la unión y activación de PTEN a la membrana plasmática (61, 248). En conjunto, los resultados obtenidos indican que el *loop* expuesto en la región NLMs N-terminal de PTEN (Figura 29) podría funcionar como un sensor conformacional de PTEN que regula tanto su localización subcelular como su actividad de fosfatasa de lípidos.

Las mutaciones asociadas a tumores en el extremo N-terminal de PTEN muestran una capacidad reducida para unirse a la membrana plasmática (249). Nuestros resultados sugieren que la acumulación nuclear de PTEN podría ser un marcador indicativo de la pérdida de actividad fosfatasa PIP₃ de PTEN en pacientes que posean estas variantes en la región N-terminal (Figura 35). Es posible que la acumulación nuclear de PTEN mutado en su región N-terminal (como PTEN Q17E) le impida ejercer su actividad fosfatasa PIP₃ en la proximidad de la membrana plasmática. No obstante, no se puede eliminar la posibilidad de que las mutaciones afecten también a la activación de PTEN por PIP₂, independientemente de su transporte al núcleo. Conjuntamente, nuestros resultados demuestran que la localización subcelular de PTEN depende de la integridad de su extremo N-terminal. Por lo tanto, la posibilidad de interferir en la función de PTEN mediante el control de su localización sería un punto relevante de intervención en la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas a este supresor tumoral.

La región N-terminal mutada que da lugar a PTEN nuclear podría manifestar un papel disfuncional independientemente de su catálisis, relacionado con la retención nuclear de PTEN que se encuentra en algunos tumores o en células de algunos pacientes con PHTS (250, 251). La acumulación de PTEN en el núcleo se correlaciona inversamente con la proliferación y transformación celular, atribuyéndole una variedad de funciones biológicas que podrían cooperar para controlar el crecimiento celular y la apoptosis (252). Es probable que un cambio en la compartimentación celular afecte a la función de PTEN, dando como resultado la pérdida de la actividad supresora del crecimiento, pero preservando su actividad fosfatasa lipídica. Pese a todo, son necesarios más estudios para profundizar en los mecanismos por los cuales PTEN nuclear con mutaciones N-terminales puede ser causante de enfermedades como PHTS y ASD.

3.1. Las variantes N-terminales de tumores del Sistema Genitourinario afectan de diferente manera a PTEN y PTEN-L

Aunque la prevención (especialmente en PCa) ha mejorado las posibilidades de tratamiento temprano y la supervivencia de pacientes con cánceres urológicos, todavía no existen terapias específicas efectivas frente a las formas avanzadas de estos tipos de cáncer, siendo los tratamientos más habituales la cirugía, la terapia hormonal (en el caso del PCa), la radioterapia y la quimioterapia inespecífica. Exceptuando la cirugía, el resto de las modalidades terapéuticas ofrece resultados parciales. La mortalidad asociada a cánceres urológicos en la población española es, aproximadamente, de 1/6 casos en PCa y de 1/3 casos en BCa y RCC, por lo que es importante el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico y pronóstico, y de terapias dirigidas de mayor eficacia.

Se ha estudiado poco las diferencias funcionales entre las isoformas PTEN y PTEN-L. Nuestro trabajo ha desvelado que la expresión y localización subcelular de PTEN y PTEN-L es diferente y que en las células tiene lugar la coexpresión de ambas formas (Figura 37). Además, hemos descubierto que las variantes N-terminales de

tumores genitourinarios presentan diferencias en función de la isoforma PTEN o PTEN-L. Mientras que en PTEN la abundancia de la proteína dependió de la variante, en PTEN-L se mantuvo constante (Figura 38), en parte debido a una mayor estabilidad, como reflejan los experimentos con cicloheximida (Figura 36). Dicha observación también pudimos corroborarla con variantes de truncaciones de la región C-terminal de PTEN asociadas a tumores, las cuales son causantes de inestabilidad. En PTEN-L la estabilidad se perdió más tarde según avanzábamos hacia la región N-terminal (Figura 39). Estos resultados sugieren que la tolerancia en PTEN-L a la pérdida de estabilidad es mayor que en PTEN.

Sin embargo, variantes que son menos abundantes en PTEN, como Y27N (Figura 38), no recuperaron su actividad en PTEN-L, pese a aumentar la abundancia (Figura 40). Otras variantes analizadas, como R14G, sí recuperaron su actividad en la isoforma PTEN-L (Figura 40). Finalmente, en cuanto a la localización subcelular, PTEN-L siempre presentó una localización totalmente excluyente del núcleo independientemente del tipo de mutación, a diferencia de PTEN (Figura 42). Es evidente que la región N-terminal adicional de PTEN-L hace que la proteína se regule de diferente manera, localizándose exclusivamente en el citoplasma. A este respecto, se ha observado que PTEN-L se puede translocar al núcleo en respuesta al estrés celular e influir en la supervivencia celular (253). En resumen, los efectos de diferentes variantes en PTEN y PTEN-L pueden ser diversos: 1) la estabilidad de la proteína en PTEN-L puede ser mayor que en PTEN; 2) la catálisis de PTEN-L puede no verse afectada por la mutación, pero sí la catálisis de PTEN; y 3) la catálisis de ambas isoformas puede verse afectada por la mutación.

4. PTEN como biomarcador y como diana terapéutica

Actualmente, el papel de PTEN como biomarcador de pronóstico o predictivo sigue siendo un tema de debate. Existen dificultades para poder evaluar la funcionalidad de PTEN, no existiendo ninguna prueba validada para ello, por lo cual existen muchas discrepancias con respecto al valor pronóstico/predictivo que pueda tener PTEN en los tumores. No obstante, la pérdida de PTEN se ha identificado como un factor de pronóstico en muchos tipos de cáncer. En PCa está relacionada con un alto índice de agresividad y una mayor probabilidad de metástasis y riesgo de muerte (254, 255), así como en cáncer renal, donde la pérdida de PTEN se asocia con una peor supervivencia debido a su papel en el aumento de la agresividad y la progresión de este tipo de tumor (256). En otros tipos de cánceres, como el cáncer de endometrio, la pérdida de PTEN es un biomarcador para el diagnóstico temprano (257), y se ha propuesto la determinación de PTEN mediante IHC como un criterio válido para el diagnóstico diferencial temprano entre hiperplasia benigna y premaligna. Las mutaciones en el gen *PTEN* también se asocian con un mal pronóstico, como ocurre en el glioma, donde la incidencia de mutaciones es muy alta, en asociación con una disminución en el tiempo de supervivencia de los pacientes (258). En melanoma, el gen no está alterado frecuentemente, pero la pérdida de PTEN se produce juntamente con mutaciones activadoras de *BRAF* (259).

Además de su papel como un biomarcador de pronóstico, la pérdida de PTEN también podría usarse como un factor predictivo de respuesta farmacológica en varios tipos de cáncer, como cánceres de próstata, mama y endometrio, entre otros. Su posible papel en la respuesta a la radioterapia, la quimioterapia, así como en las terapias dirigidas y las combinaciones de estas, es de gran importancia, por lo que actualmente supone una importante vía de investigación. A pesar de que muchos estudios destacan la importancia de PTEN como un potencial biomarcador de pronóstico y predictivo en el cáncer, todavía no existen ensayos de detección de PTEN validados que permitan analizar su expresión y función (260).

La modulación de la actividad de PTEN y de los niveles de la proteína es considerada como una estrategia terapéutica potencial (261). Los cambios en la dosis funcional de PTEN pueden provocar grandes efectos biológicos (262). Por un lado, una reducción de la dosis funcional de PTEN puede promover el crecimiento y la proliferación celular, considerándose beneficioso en medicina regenerativa y en la enfermedad de Alzheimer afectando en este caso a la agregación β -amiloide (263, 264). Sin embargo, el diseño de inhibidores específicos de PTEN sigue siendo una ardua tarea, debido principalmente a la conservación evolutiva del centro activo de las diferentes fosfatasa de tirosina, así como a la alta polaridad del sitio activo de PTEN, lo cual dificulta el desarrollo de inhibidores permeables a las células (231, 265). Por otro lado, el aumento de la dosis funcional de PTEN y, por lo tanto, el fomento de su actividad supresora de tumores, se ha propuesto como una estrategia contra el cáncer. El aumento de su dosis funcional también puede aplicarse para el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con la inactivación de PTEN, como ciertas formas de autismo (266, 267) y síndromes con predisposición al cáncer.

El uso de estrategias farmacológicas para revertir las consecuencias de la pérdida de PTEN ha sido siempre objeto de estudio. Aun así, el aumento de la dosis funcional de PTEN sigue siendo un reto particularmente desafiante. Pequeños cambios en la actividad celular de PTEN pueden tener grandes repercusiones en la propagación del tumor (262), pero la posibilidad de incrementar directamente la actividad enzimática de PTEN es de difícil abordaje. Otra estrategia sería antagonizar la acción de la PI3K mediante el uso de inhibidores que están siendo utilizados en oncología clínica en la actualidad (268). Sin embargo, la mayoría presentan problemas de eficacia relacionados con toxicidad y resistencia terapéutica (269). Por otra parte, PTEN tiene funciones adicionales más allá de desfosforilar PIP₃ (89), por lo que estas funciones no se restablecerían mediante la inhibición de la PI3K.

Existen diferentes enfoques para una posible reactivación de PTEN en tumores asociados a una disfunción de la proteína. En tumores con pérdida completa de PTEN, la administración de proteínas terapéuticas de PTEN (270, 271) podría ser eficaz. En

tumores con delección monoalélica de PTEN o con fallos en los mecanismos de regulación, se podría restablecer o mejorar la función y los niveles de PTEN a través de la potenciación de la dimerización, transcripción y regulación postranscripcional. Por último, también se podría recurrir a la edición genética para corregir mutaciones somáticas de PTEN o diseñar variantes mejoradas de PTEN (42). También se están diseñando compuestos para localizar PTEN en la membrana plasmática (272), promoviendo así su actividad fosfatasa, o variantes de PTEN con una actividad fosfatasa optimizada, como ePTEN (244), pudiendo tener una importante aplicación terapéutica.

Pese a todos los estudios de posibles terapias con PTEN, el reemplazo directo de este supresor tumoral en células se ha considerado farmacológicamente complejo hasta que se describió la existencia de isoformas secretables de PTEN, como PTEN-L. Se ha visto que el tratamiento con PTEN-L exógeno, al penetrar en las células receptoras, regula negativamente la señalización de PI3K teniendo un importante efecto en el retroceso del tumor induciendo la apoptosis (112, 273). La posibilidad de que PTEN-L secretado entre en las células cancerosas y reprima la proliferación del cáncer tiene un potencial terapéutico significativo; sin embargo, un inconveniente vendría dado por la alta incidencia de mutaciones somáticas de PTEN en tumores, ya que estas mutaciones podrían propagar su señal aberrante al microambiente tumoral e interferir con la actividad endógena supresora tumoral de PTEN no mutado (274). No obstante, se cree que PTEN-L podría ser un nuevo modulador de la señalización intracelular de PTEN (275), y recientemente se ha desarrollado una versión optimizada de PTEN-L para mejorar su secreción e internalización en células receptoras (276). Además, se están empleando herramientas como la edición de genes CRISPR/Cas9 (277), así como fusiones de PTEN-L-p53 (278) como enfoques novedosos para el tratamiento del cáncer.

Por todo ello, PTEN-L podría tener importantes aplicaciones terapéuticas, siendo necesario realizar una profunda caracterización molecular y un análisis exhaustivo de su expresión tisular. También sigue siendo preciso indagar en los mecanismos que regulan el reconocimiento intercelular de PTEN-L, así como evaluar si

PTEN-L afecta a las células cercanas (a través de una señal paracrina) o puede actuar en distancias largas (acción endocrina) (274).

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas del trabajo presentado en esta tesis doctoral son las siguientes:

1. La optimización del protocolo de mutagénesis dirigida nos ha permitido obtener mutaciones a gran escala de nuestra proteína de interés, PTEN, con una mayor eficiencia.
2. Los AcM anti-PTEN disponibles eficientes en IHC presentan diferente sensibilidad y especificidad en el reconocimiento de epítomos específicos dentro de la región C-terminal de PTEN.
3. Nuestro mapeo de epítomos indica que, independientemente de sus propiedades funcionales, las variantes C-terminales de PTEN patológicas o fisiológicas, pueden mostrar un reconocimiento alterado por AcM anti-PTEN específicos, lo que podría tener implicaciones diagnósticas importantes.
4. La localización subcelular y la actividad fosfatasa de PTEN dependen de la integridad de su extremo N-terminal. La variante analizada Q17E presenta una actividad fosfatasa ligeramente reducida y es estable en las células, además de mostrar una localización predominantemente nuclear.
5. Las variantes N-terminales de PTEN encontradas en tumores genitourinarios se comportan de diferente manera en función de la isoforma PTEN o PTEN-L. Mostrando cambios en la abundancia, actividad y localización de la proteína.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. J. Alföldi, K. Lindblad-Toh, Comparative genomics as a tool to understand evolution and disease. *Genome Res* **23**, 1063-1068 (2013).
2. T. Shen, S. H. Pajaro-Van de Stadt, N. C. Yeat, J. C. Lin, Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. *Front Genet* **6**, 215 (2015).
3. S. A. Forbes *et al.*, COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* **43**, D805-811 (2015).
4. P. D. Stenson *et al.*, The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* **136**, 665-677 (2017).
5. R. Carapito, B. Gallet, A. Zapun, T. Vernet, Automated high-throughput process for site-directed mutagenesis, production, purification, and kinetic characterization of enzymes. *Anal Biochem* **355**, 110-116 (2006).
6. N. E. Labrou, Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr Protein Pept Sci* **11**, 91-100 (2010).
7. C. Neylon, Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res* **32**, 1448-1459 (2004).
8. E. A. Burks, G. Chen, G. Georgiou, B. L. Iverson, In vitro scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 412-417 (1997).
9. M. T. Reetz, J. D. Carballeira, Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat Protoc* **2**, 891-903 (2007).
10. I. Rodríguez-Escudero *et al.*, A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Hum Mol Genet* **20**, 4132-4142 (2011).
11. H. H. Hogrefe, J. Cline, G. L. Youngblood, R. M. Allen, Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. *Biotechniques* **33**, 1158-1160, 1162, 1164-1155 (2002).
12. D. L. Steffens, J. G. Williams, Efficient site-directed saturation mutagenesis using degenerate oligonucleotides. *J Biomol Tech* **18**, 147-149 (2007).
13. T. S. Wong, D. Roccatano, M. Zacharias, U. Schwaneberg, A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J Mol Biol* **355**, 858-871 (2006).
14. L. Zheng, U. Baumann, J. L. Reymond, An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* **32**, e115 (2004).
15. M. M. Ling, B. H. Robinson, Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem* **254**, 157-178 (1997).
16. M. P. Weiner *et al.*, Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**, 119-123 (1994).
17. Y. Xia, W. Chu, Q. Qi, L. Xun, New insights into the QuikChange™ process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **43**, e12 (2015).

18. A. R. Shenoy, S. S. Visweswariah, Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal Biochem* **319**, 335-336 (2003).
19. J. Chiu, P. E. March, R. Lee, D. Tillett, Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Res* **32**, e174 (2004).
20. H. Liu, J. H. Naismith, An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol* **8**, 91 (2008).
21. D. Qi, K. B. Scholthof, A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis. *J Virol Methods* **149**, 85-90 (2008).
22. H. Wang *et al.*, An efficient approach for site-directed mutagenesis using central overlapping primers. *Anal Biochem* **418**, 304-306 (2011).
23. W. Wu, Z. Jia, P. Liu, Z. Xie, Q. Wei, A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **33**, e110 (2005).
24. O. Edelheit, A. Hanukoglu, I. Hanukoglu, Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* **9**, 61 (2009).
25. L. A. Mitchell *et al.*, Multichange isothermal mutagenesis: a new strategy for multiple site-directed mutations in plasmid DNA. *ACS Synth Biol* **2**, 473-477 (2013).
26. W. C. Tseng, J. W. Lin, T. Y. Wei, T. Y. Fang, A novel megaprimered and ligase-free, PCR-based, site-directed mutagenesis method. *Anal Biochem* **375**, 376-378 (2008).
27. D. Wei, M. Li, X. Zhang, L. Xing, An improvement of the site-directed mutagenesis method by combination of megaprimer, one-side PCR and DpnI treatment. *Anal Biochem* **331**, 401-403 (2004).
28. B. C. Cunningham, J. A. Wells, High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**, 1081-1085 (1989).
29. R. A. Schomer, H. Park, J. J. Barkei, M. G. Thomas, Alanine Scanning of YbdZ, an MbtH-like Protein, Reveals Essential Residues for Functional Interactions with Its Nonribosomal Peptide Synthetase Partner EntF. *Biochemistry* **57**, 4125-4134 (2018).
30. D. Sun *et al.*, AAScan, PCRdesign and MutantChecker: a suite of programs for primer design and sequence analysis for high-throughput scanning mutagenesis. *PLoS One* **8**, e78878 (2013).
31. U. Krauss, T. Eggert, insilico.mutagenesis: a primer selection tool designed for sequence scanning applications used in directed evolution experiments. *Biotechniques* **39**, 679-682 (2005).
32. J. Li *et al.*, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947 (1997).
33. P. A. Steck *et al.*, Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-362 (1997).
34. D. M. Li, H. Sun, TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* **57**, 2124-2129 (1997).
35. A. Carnero, The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* **16**, 34-44 (2010).

36. E. Fayard, G. Xue, A. Parcellier, L. Bozulich, B. A. Hemmings, Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* **346**, 31-56 (2010).
37. T. Maehama, J. E. Dixon, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378 (1998).
38. Y. Yin, W. H. Shen, PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* **27**, 5443-5453 (2008).
39. S. Q. Hou, M. Ouyang, A. Brandmaier, H. Hao, W. H. Shen, PTEN in the maintenance of genome integrity: From DNA replication to chromosome segregation. *Bioessays* **39**, (2017).
40. M. Shimobayashi, M. N. Hall, Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 155-162 (2014).
41. C. Y. Chen, J. Chen, L. He, B. L. Stiles, PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 338 (2018).
42. Y. R. Lee, M. Chen, P. P. Pandolfi, The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, (2018).
43. J. O. Lee *et al.*, Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334 (1999).
44. A. Gil *et al.*, Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol Biol Cell* **17**, 4002-4013 (2006).
45. T. Maehama, G. S. Taylor, J. E. Dixon, PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* **70**, 247-279 (2001).
46. M. Iijima, Y. E. Huang, H. R. Luo, F. Vazquez, P. N. Devreotes, Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis. *J Biol Chem* **279**, 16606-16613 (2004).
47. A. Gil *et al.*, A functional dissection of PTEN N-terminus: implications in PTEN subcellular targeting and tumor suppressor activity. *PLoS One* **10**, e0119287 (2015).
48. M. Raftopoulou, S. Etienne-Manneville, A. Self, S. Nicholls, A. Hall, Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**, 1179-1181 (2004).
49. R. Fragoso, J. T. Barata, Kinases, tails and more: regulation of PTEN function by phosphorylation. *Methods* **77-78**, 75-81 (2015).
50. T. Ikenoue, K. Inoki, B. Zhao, K. L. Guan, PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res* **68**, 6908-6912 (2008).
51. J. Torres, R. Pulido, The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **276**, 993-998 (2001).
52. J. Torres *et al.*, Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* **278**, 30652-30660 (2003).
53. A. Gil, A. Andrés-Pons, R. Pulido, Nuclear PTEN: a tale of many tails. *Cell Death Differ* **14**, 395-399 (2007).

54. L. Odriozola, G. Singh, T. Hoang, A. M. Chan, Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem* **282**, 23306-23315 (2007).
55. M. Rahdar *et al.*, A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 480-485 (2009).
56. F. Vazquez, P. Devreotes, Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle* **5**, 1523-1527 (2006).
57. N. S. Sotelo, J. T. Schepens, M. Valiente, W. J. Hendriks, R. Pulido, PTEN-PDZ domain interactions: binding of PTEN to PDZ domains of PTPN13. *Methods* **77-78**, 147-156 (2015).
58. M. M. Georgescu, K. H. Kirsch, T. Akagi, T. Shishido, H. Hanafusa, The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10182-10187 (1999).
59. F. Vazquez *et al.*, Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* **276**, 48627-48630 (2001).
60. X. Wu *et al.*, Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4233-4238 (2000).
61. S. Das, J. E. Dixon, W. Cho, Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7491-7496 (2003).
62. M. Valiente *et al.*, Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem* **280**, 28936-28943 (2005).
63. R. H. Kim, T. W. Mak, Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. *Br J Cancer* **94**, 620-624 (2006).
64. V. Stambolic *et al.*, Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* **8**, 317-325 (2001).
65. T. Virolle *et al.*, The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* **3**, 1124-1128 (2001).
66. R. E. Teresi, S. M. Planchon, K. A. Waite, C. Eng, Regulation of the PTEN promoter by statins and SREBP. *Hum Mol Genet* **17**, 919-928 (2008).
67. Y. H. Shen *et al.*, Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *J Biol Chem* **281**, 7727-7736 (2006).
68. D. Xia *et al.*, Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**, 3507-3519 (2007).
69. L. B. Song *et al.*, The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest* **119**, 3626-3636 (2009).
70. K. Hettinger *et al.*, c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ* **14**, 218-229 (2007).
71. J. T. Whelan, S. L. Forbes, F. E. Bertrand, CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle* **6**, 80-84 (2007).

72. J. C. Soria *et al.*, Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* **8**, 1178-1184 (2002).
73. S. Khan *et al.*, PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* **112**, 407-410 (2004).
74. A. Mirmohammadsadegh *et al.*, Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* **66**, 6546-6552 (2006).
75. V. Olive, I. Jiang, L. He, mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1348-1354 (2010).
76. H. Y. Jin *et al.*, MicroRNA-17~92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways. *EMBO J* **32**, 2377-2391 (2013).
77. W. Li, T. Zhang, L. Guo, L. Huang, Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs. *J Exp Clin Cancer Res* **37**, 223 (2018).
78. Z. Liang, Y. Li, K. Huang, N. Wagar, H. Shim, Regulation of miR-19 to breast cancer chemoresistance through targeting PTEN. *Pharm Res* **28**, 3091-3100 (2011).
79. F. Meng *et al.*, MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**, 647-658 (2007).
80. J. G. Zhang *et al.*, MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* **411**, 846-852 (2010).
81. L. Ciuffreda *et al.*, The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade controls phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression through multiple mechanisms. *J Mol Med (Berl)* **90**, 667-679 (2012).
82. N. R. Leslie *et al.*, Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J* **22**, 5501-5510 (2003).
83. D. Bolduc *et al.*, Phosphorylation-mediated PTEN conformational closure and deactivation revealed with protein semisynthesis. *Elife* **2**, e00691 (2013).
84. G. R. Masson, O. Perisic, J. E. Burke, R. L. Williams, The intrinsically disordered tails of PTEN and PTEN-L have distinct roles in regulating substrate specificity and membrane activity. *Biochem J* **473**, 135-144 (2016).
85. A. Papa *et al.*, Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell* **157**, 595-610 (2014).
86. F. Heinrich *et al.*, The PTEN Tumor Suppressor Forms Homodimers in Solution. *Structure* **23**, 1952-1957 (2015).
87. J. E. Allende, C. C. Allende, Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J* **9**, 313-323 (1995).
88. A. M. Al-Khouri, Y. Ma, S. H. Togo, S. Williams, T. Mustelin, Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* **280**, 35195-35202 (2005).
89. C. Bassi *et al.*, Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* **341**, 395-399 (2013).
90. H. Mehenni *et al.*, LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. *Hum Mol Genet* **14**, 2209-2219 (2005).
91. Z. Li *et al.*, Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* **7**, 399-404 (2005).

92. Y. Lu *et al.*, Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem* **278**, 40057-40066 (2003).
93. T. R. Fenton *et al.*, Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 14164-14169 (2012).
94. B. H. Choi, M. Pagano, W. Dai, Plk1 protein phosphorylates phosphatase and tensin homolog (PTEN) and regulates its mitotic activity during the cell cycle. *J Biol Chem* **289**, 14066-14074 (2014).
95. D. Xu, Y. Yao, X. Jiang, L. Lu, W. Dai, Regulation of PTEN stability and activity by Plk3. *J Biol Chem* **285**, 39935-39942 (2010).
96. E. K. Yim *et al.*, Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell* **15**, 304-314 (2009).
97. H. Maccario, N. M. Perera, A. Gray, C. P. Downes, N. R. Leslie, Ubiquitination of PTEN (phosphatase and tensin homolog) inhibits phosphatase activity and is enhanced by membrane targeting and hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **285**, 12620-12628 (2010).
98. L. C. Trotman *et al.*, Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**, 141-156 (2007).
99. X. Wang *et al.*, NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* **128**, 129-139 (2007).
100. S. Maddika *et al.*, WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat Cell Biol* **13**, 728-733 (2011).
101. C. Van Themsche, V. Leblanc, S. Parent, E. Asselin, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J Biol Chem* **284**, 20462-20466 (2009).
102. S. F. Ahmed *et al.*, The chaperone-assisted E3 ligase C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) targets PTEN for proteasomal degradation. *J Biol Chem* **287**, 15996-16006 (2012).
103. Y. R. Lee *et al.*, Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science* **364**, (2019).
104. K. Okumura *et al.*, PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* **281**, 26562-26568 (2006).
105. J. Huang *et al.*, SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun* **3**, 911 (2012).
106. J. Ho, C. Bassi, V. Stambolic, Characterization of nuclear PTEN and its post translational modifications. *Methods* **77-78**, 104-111 (2015).
107. L. Zhu *et al.*, NOS1. *Cell Death Discov* **3**, 17011 (2017).
108. Y. D. Kwak *et al.*, NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **5**, 49 (2010).
109. T. M. Covey, K. Edes, G. S. Coombs, D. M. Virshup, F. A. Fitzpatrick, Alkylation of the tumor suppressor PTEN activates Akt and β -catenin signaling: a mechanism linking inflammation and oxidative stress with cancer. *PLoS One* **5**, e13545 (2010).
110. C. T. Shearn *et al.*, Increased carbonylation of the lipid phosphatase PTEN contributes to Akt2 activation in a murine model of early alcohol-induced steatosis. *Free Radic Biol Med* **65**, 680-692 (2013).

111. N. Li *et al.*, Poly-ADP ribosylation of PTEN by tankyrases promotes PTEN degradation and tumor growth. *Genes Dev* **29**, 157-170 (2015).
112. B. D. Hopkins *et al.*, A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science* **341**, 399-402 (2013).
113. D. S. Peabody, Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J Biol Chem* **264**, 5031-5035 (1989).
114. H. Liang *et al.*, PTEN α , a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism. *Cell Metab* **19**, 836-848 (2014).
115. R. Pulido *et al.*, A unified nomenclature and amino acid numbering for human PTEN. *Sci Signal* **7**, pe15 (2014).
116. P. Malaney, V. N. Uversky, V. Davé, PTEN proteoforms in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2783-2794 (2017).
117. L. Wang *et al.*, PTEN-L is a novel protein phosphatase for ubiquitin dephosphorylation to inhibit PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Cell Res*, (2018).
118. G. Li *et al.*, PTEN α regulates mitophagy and maintains mitochondrial quality control. *Autophagy* **14**, 1742-1760 (2018).
119. S. B. Johnston, R. T. Raines, Conformational stability and catalytic activity of PTEN variants linked to cancers and autism spectrum disorders. *Biochemistry* **54**, 1576-1582 (2015).
120. I. Tzani *et al.*, Systematic analysis of the PTEN 5' leader identifies a major AUU initiated proteoform. *Open Biol* **6**, (2016).
121. H. Liang *et al.*, PTEN β is an alternatively translated isoform of PTEN that regulates rDNA transcription. *Nat Commun* **8**, 14771 (2017).
122. R. M. Sharrard, N. J. Maitland, Alternative splicing of the human PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Biochim Biophys Acta* **1494**, 282-285 (2000).
123. S. Agrawal, C. Eng, Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet* **15**, 777-787 (2006).
124. I. Breuksch *et al.*, In renal cell carcinoma the PTEN splice variant PTEN- Δ shows similar function as the tumor suppressor PTEN itself. *Cell Commun Signal* **16**, 35 (2018).
125. S. M. Walker, N. R. Leslie, N. M. Perera, I. H. Batty, C. P. Downes, The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem J* **379**, 301-307 (2004).
126. R. E. Redfern *et al.*, PTEN phosphatase selectively binds phosphoinositides and undergoes structural changes. *Biochemistry* **47**, 2162-2171 (2008).
127. N. R. Leslie, I. H. Batty, H. Maccario, L. Davidson, C. P. Downes, Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene* **27**, 5464-5476 (2008).
128. J. Liliental *et al.*, Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol* **10**, 401-404 (2000).
129. S. Funamoto, R. Meili, S. Lee, L. Parry, R. A. Firtel, Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* **109**, 611-623 (2002).

130. M. Iijima, P. Devreotes, Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* **109**, 599-610 (2002).
131. M. S. Song, L. Salmena, P. P. Pandolfi, The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 283-296 (2012).
132. N. R. Leslie *et al.*, Targeting mutants of PTEN reveal distinct subsets of tumour suppressor functions. *Biochem J* **357**, 427-435 (2001).
133. S. Y. Han *et al.*, Functional evaluation of PTEN missense mutations using in vitro phosphoinositide phosphatase assay. *Cancer Res* **60**, 3147-3151 (2000).
134. F. Vazquez *et al.*, Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3633-3638 (2006).
135. M. Chen *et al.*, The nuclear transport receptor Importin-11 is a tumor suppressor that maintains PTEN protein. *J Cell Biol* **216**, 641-656 (2017).
136. J. H. Chung, M. E. Ginn-Pease, C. Eng, Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res* **65**, 4108-4116 (2005).
137. F. Liu *et al.*, PTEN enters the nucleus by diffusion. *J Cell Biochem* **96**, 221-234 (2005).
138. S. M. Planchon, K. A. Waite, C. Eng, The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* **121**, 249-253 (2008).
139. A. Perren *et al.*, Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol* **157**, 1097-1103 (2000).
140. W. H. Shen *et al.*, Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170 (2007).
141. Z. H. Chen *et al.*, PTEN interacts with histone H1 and controls chromatin condensation. *Cell Rep* **8**, 2003-2014 (2014).
142. M. E. Ginn-Pease, C. Eng, Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res* **63**, 282-286 (2003).
143. I. Garcia-Cao *et al.*, Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* **149**, 49-62 (2012).
144. M. S. Song *et al.*, Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* **144**, 187-199 (2011).
145. D. J. Freeman *et al.*, PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* **3**, 117-130 (2003).
146. E. Terrien *et al.*, Interference with the PTEN-MAST2 interaction by a viral protein leads to cellular relocalization of PTEN. *Sci Signal* **5**, ra58 (2012).
147. Z. Sun *et al.*, PTEN C-terminal deletion causes genomic instability and tumor development. *Cell Rep* **6**, 844-854 (2014).
148. J. H. Chung, C. Eng, Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* **65**, 8096-8100 (2005).
149. J. L. Liu *et al.*, Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. *Mol Cell Biol* **25**, 6211-6224 (2005).

150. A. Bononi *et al.*, Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca(2+) signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. *Cell Death Differ* **20**, 1631-1643 (2013).
151. U. Putz *et al.*, The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal* **5**, ra70 (2012).
152. U. Putz *et al.*, PTEN secretion in exosomes. *Methods* **77-78**, 157-163 (2015).
153. L. Salmena, A. Carracedo, P. P. Pandolfi, Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**, 403-414 (2008).
154. D. Liaw *et al.*, Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* **16**, 64-67 (1997).
155. M. R. Nelen *et al.*, Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* **6**, 1383-1387 (1997).
156. J. Mester, C. Eng, Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. *J Surg Oncol* **111**, 125-130 (2015).
157. X. P. Zhou *et al.*, Germline inactivation of PTEN and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway cause human Lhermitte-Duclos disease in adults. *Am J Hum Genet* **73**, 1191-1198 (2003).
158. C. W. Wong *et al.*, Identification of a PTEN mutation with reduced protein stability, phosphatase activity, and nuclear localization in Hong Kong patients with autistic features, neurodevelopmental delays, and macrocephaly. *Autism Res*, (2018).
159. K. Kato *et al.*, Distinctive facies, macrocephaly, and developmental delay are signs of a PTEN mutation in childhood. *Brain Dev*, (2018).
160. M. G. Butler *et al.*, Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* **42**, 318-321 (2005).
161. D. L. Christensen *et al.*, Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* **65**, 1-23 (2016).
162. K. T. Kleijer *et al.*, Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets. *Psychopharmacology (Berl)* **231**, 1037-1062 (2014).
163. M. Groszer *et al.*, Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**, 2186-2189 (2001).
164. C. H. Kwon *et al.*, Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* **50**, 377-388 (2006).
165. G. Attard *et al.*, Prostate cancer. *Lancet* **387**, 70-82 (2016).
166. R. Schrecengost, K. E. Knudsen, Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol* **40**, 244-258 (2013).
167. E. G. Bluemn, P. S. Nelson, The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* **24**, 251-257 (2012).
168. Z. Culig, F. R. Santer, Molecular aspects of androgenic signaling and possible targets for therapeutic intervention in prostate cancer. *Steroids* **78**, 851-859 (2013).
169. L. Spans *et al.*, The genomic landscape of prostate cancer. *Int J Mol Sci* **14**, 10822-10851 (2013).

170. J. Armenia *et al.*, The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet* **50**, 645-651 (2018).
171. Z. Chen *et al.*, Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730 (2005).
172. X. Ma *et al.*, Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res* **65**, 5730-5739 (2005).
173. S. Wang *et al.*, Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* **4**, 209-221 (2003).
174. C. K. Ratnacaram *et al.*, Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2521-2526 (2008).
175. M. Gerlinger *et al.*, Intratumour heterogeneity in urologic cancers: from molecular evidence to clinical implications. *Eur Urol* **67**, 729-737 (2015).
176. B. Shuch *et al.*, Germline PTEN mutation Cowden syndrome: an underappreciated form of hereditary kidney cancer. *J Urol* **190**, 1990-1998 (2013).
177. A. J. Adeniran, B. Shuch, P. A. Humphrey, Hereditary Renal Cell Carcinoma Syndromes: Clinical, Pathologic, and Genetic Features. *Am J Surg Pathol* **39**, e1-e18 (2015).
178. N. B. Haas, K. L. Nathanson, Hereditary kidney cancer syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis* **21**, 81-90 (2014).
179. M. Zhao, X. L. He, X. D. Teng, Understanding the molecular pathogenesis and prognostics of bladder cancer: an overview. *Chin J Cancer Res* **28**, 92-98 (2016).
180. L. I. Yoo *et al.*, Pten deficiency activates distinct downstream signaling pathways in a tissue-specific manner. *Cancer Res* **66**, 1929-1939 (2006).
181. B. S. Taylor *et al.*, Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* **18**, 11-22 (2010).
182. J. Cuzick *et al.*, Prognostic value of PTEN loss in men with conservatively managed localised prostate cancer. *Br J Cancer* **108**, 2582-2589 (2013).
183. S. Phin, M. W. Moore, P. D. Cotter, Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer. *Front Oncol* **3**, 240 (2013).
184. W. Brenner *et al.*, Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer* **99**, 53-57 (2002).
185. J. P. Sfakianos *et al.*, The role of PTEN tumor suppressor pathway staining in carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol* **32**, 657-662 (2014).
186. T. Abou Youssif *et al.*, The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases. *Cancer* **117**, 290-300 (2011).
187. J. L. Mester, M. Zhou, N. Prescott, C. Eng, Papillary renal cell carcinoma is associated with PTEN hamartoma tumor syndrome. *Urology* **79**, 1187.e1181-1187 (2012).
188. S. A. Forbes *et al.*, COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* **45**, D777-D783 (2017).
189. U. Djuric, G. Zadeh, K. Aldape, P. Diamandis, Precision histology: how deep learning is poised to revitalize histomorphology for personalized cancer care. *NPJ Precis Oncol* **1**, 22 (2017).

190. T. Y. Leong, K. Cooper, A. S. Leong, Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol* **17**, 404-418 (2010).
191. L. L. Matos, D. C. Trufelli, M. G. de Matos, M. A. da Silva Pinhal, Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* **5**, 9-20 (2010).
192. W. J. Howat *et al.*, Antibody validation of immunohistochemistry for biomarker discovery: recommendations of a consortium of academic and pharmaceutical based histopathology researchers. *Methods* **70**, 34-38 (2014).
193. G. O'Hurley *et al.*, Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol* **8**, 783-798 (2014).
194. F. Lin, Z. Chen, Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med* **138**, 1564-1577 (2014).
195. E. E. Torlakovic *et al.*, Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **23**, 1-18 (2015).
196. P. Sormanni, F. A. Aprile, M. Vendruscolo, Rational design of antibodies targeting specific epitopes within intrinsically disordered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 9902-9907 (2015).
197. J. Bodo, E. D. Hsi, Phosphoproteins and the dawn of functional phenotyping. *Pathobiology* **78**, 115-121 (2011).
198. A. L. Bondgaard, E. Høgdall, A. Mellemegaard, B. G. Skov, High specificity but low sensitivity of mutation-specific antibodies against EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol* **27**, 1590-1598 (2014).
199. L. A. Hwang *et al.*, Monoclonal Antibodies against Specific p53 Hotspot Mutants as Potential Tools for Precision Medicine. *Cell Rep* **22**, 299-312 (2018).
200. T. Jamaspishvili *et al.*, Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **15**, 222-234 (2018).
201. M. Milella *et al.*, PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol* **5**, 24 (2015).
202. R. Pulido, PTEN: a yin-yang master regulator protein in health and disease. *Methods* **77-78**, 3-10 (2015).
203. Z. Y. Yang *et al.*, The prognostic value of phosphatase and tensin homolog negativity in breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 32 studies with 4393 patients. *Crit Rev Oncol Hematol* **101**, 40-49 (2016).
204. L. H. Saal *et al.*, Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7564-7569 (2007).
205. N. Yanagawa *et al.*, Loss of phosphatase and tensin homolog protein expression is an independent poor prognostic marker in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* **7**, 1513-1521 (2012).
206. S. S. Kim, N. J. Yoo, E. G. Jeong, M. S. Kim, S. H. Lee, Expression of NEDD4-1, a PTEN regulator, in gastric and colorectal carcinomas. *APMIS* **116**, 779-784 (2008).
207. M. Chen *et al.*, Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. *Cancer Cell* **20**, 173-186 (2011).

208. E. I. Ágoston *et al.*, In depth evaluation of the prognostic and predictive utility of PTEN immunohistochemistry in colorectal carcinomas: performance of three antibodies with emphasis on intracellular and intratumoral heterogeneity. *Diagn Pathol* **11**, 61 (2016).
209. K. C. Carvalho *et al.*, Best practice for PTEN gene and protein assessment in anatomic pathology. *Acta Histochem* **116**, 25-31 (2014).
210. J. Pallares *et al.*, Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol* **18**, 719-727 (2005).
211. R. A. Sakr *et al.*, Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**, 371-374 (2010).
212. Z. Sangale *et al.*, A robust immunohistochemical assay for detecting PTEN expression in human tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**, 173-183 (2011).
213. O. Maiques *et al.*, Optimal protocol for PTEN immunostaining; role of analytical and preanalytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast, and prostatic tissues. *Hum Pathol* **45**, 522-532 (2014).
214. A. M. Lavorato-Rocha *et al.*, Immunohistochemical assessment of PTEN in vulvar cancer: best practices for tissue staining, evaluation, and clinical association. *Methods* **77-78**, 20-24 (2015).
215. A. Gil, J. I. López, R. Pulido, Assessing PTEN Subcellular Localization. *Methods Mol Biol* **1388**, 169-186 (2016).
216. R. Pulido *et al.*, Precise immunodetection of PTEN protein in human neoplasia. (2019).
217. A. M. Bourgonje *et al.*, Intracellular and extracellular domains of protein tyrosine phosphatase PTPRZ-B differentially regulate glioma cell growth and motility. *Oncotarget* **5**, 8690-8702 (2014).
218. A. Andrés-Pons *et al.*, In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN. *Cancer Res* **67**, 9731-9739 (2007).
219. I. Rodríguez-Escudero *et al.*, Yeast-based methods to assess PTEN phosphoinositide phosphatase activity in vivo. *Methods* **77-78**, 172-179 (2015).
220. J. Mingo *et al.*, A pathogenic role for germline PTEN variants which accumulate into the nucleus. *Eur J Hum Genet* **26**, 1180-1187 (2018).
221. A. Andrés-Pons *et al.*, Functional definition of relevant epitopes on the tumor suppressor PTEN protein. *Cancer Lett* **223**, 303-312 (2005).
222. A. Perren *et al.*, Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* **155**, 1253-1260 (1999).
223. M. Castillo-Martin, T. H. Thin, A. Collazo Lorduy, C. Cordon-Cardo, Immunopathologic Assessment of PTEN Expression. *Methods Mol Biol* **1388**, 23-37 (2016).
224. J. Torres *et al.*, Heterogeneous lack of expression of the tumour suppressor PTEN protein in human neoplastic tissues. *Eur J Cancer* **37**, 114-121 (2001).

225. R. Bedolla *et al.*, Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin Cancer Res* **13**, 3860-3867 (2007).
226. L. Schultz *et al.*, Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy. *Cancer* **116**, 5517-5526 (2010).
227. H. M. Wise, M. A. Hermida, N. R. Leslie, Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. *Clin Sci (Lond)* **131**, 197-210 (2017).
228. A. Saskin, V. Fulginiti, A. H. Birch, Y. Trakadis, Prevalence of four Mendelian disorders associated with autism in 2392 affected families. *J Hum Genet* **62**, 657-659 (2017).
229. A. Vanderver *et al.*, Characteristic brain magnetic resonance imaging pattern in patients with macrocephaly and PTEN mutations. *Am J Med Genet A* **164A**, 627-633 (2014).
230. E. A. Nizialek, J. L. Mester, V. K. Dhiman, D. J. Smiraglia, C. Eng, KLLN epigenotype-phenotype associations in Cowden syndrome. *Eur J Hum Genet* **23**, 1538-1543 (2015).
231. L. Spinelli, F. M. Black, J. N. Berg, B. J. Eickholt, N. R. Leslie, Functionally distinct groups of inherited PTEN mutations in autism and tumour syndromes. *J Med Genet* **52**, 128-134 (2015).
232. W. M. Patrick, A. E. Firth, Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries. *Biomol Eng* **22**, 105-112 (2005).
233. A. D. Bosley, M. Ostermeier, Mathematical expressions useful in the construction, description and evaluation of protein libraries. *Biomol Eng* **22**, 57-61 (2005).
234. M. D. Hughes, D. A. Nagel, A. F. Santos, A. J. Sutherland, A. V. Hine, Removing the redundancy from randomised gene libraries. *J Mol Biol* **331**, 973-979 (2003).
235. S. Kille *et al.*, Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth Biol* **2**, 83-92 (2013).
236. M. Ashraf *et al.*, ProxiMAX randomization: a new technology for non-degenerate saturation mutagenesis of contiguous codons. *Biochem Soc Trans* **41**, 1189-1194 (2013).
237. T. L. Mighell, S. Evans-Dutson, B. J. O'Roak, A Saturation Mutagenesis Approach to Understanding PTEN Lipid Phosphatase Activity and Genotype-Phenotype Relationships. *Am J Hum Genet* **102**, 943-955 (2018).
238. K. A. Matreyek *et al.*, Multiplex assessment of protein variant abundance by massively parallel sequencing. *Nat Genet* **50**, 874-882 (2018).
239. L. L. Ritterhouse, J. A. Barletta, BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol* **32**, 400-408 (2015).
240. J. Yu *et al.*, Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 3023-3028 (2009).
241. J. F. Woolley, L. Salmena, Measurement of PTEN by Flow Cytometry. *Methods Mol Biol* **1388**, 39-51 (2016).
242. V. N. Uversky, Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS J* **282**, 1182-1189 (2015).
243. U. Rulle *et al.*, Computer-Based Intensity Measurement Assists Pathologists in Scoring Phosphatase and Tensin Homolog Immunohistochemistry - Clinical

- Associations in NSCLC Patients of the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Cohort. *J Thorac Oncol* **13**, 1851-1863 (2018).
244. H. N. Nguyen *et al.*, Engineering ePTEN, an enhanced PTEN with increased tumor suppressor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E2684-2693 (2014).
245. A. Andrés-Pons, A. Gil, M. D. Oliver, N. S. Sotelo, R. Pulido, Cytoplasmic p27Kip1 counteracts the pro-apoptotic function of the open conformation of PTEN by retention and destabilization of PTEN outside of the nucleus. *Cell Signal* **24**, 577-587 (2012).
246. H. N. Nguyen *et al.*, Opening the conformation is a master switch for the dual localization and phosphatase activity of PTEN. *Sci Rep* **5**, 12600 (2015).
247. G. Denning, B. Jean-Joseph, C. Prince, D. L. Durden, P. K. Vogt, A short N-terminal sequence of PTEN controls cytoplasmic localization and is required for suppression of cell growth. *Oncogene* **26**, 3930-3940 (2007).
248. C. N. Lumb, M. S. Sansom, Defining the membrane-associated state of the PTEN tumor suppressor protein. *Biophys J* **104**, 613-621 (2013).
249. H. N. Nguyen *et al.*, A new class of cancer-associated PTEN mutations defined by membrane translocation defects. *Oncogene* **34**, 3737-3743 (2015).
250. P. Bakarakos *et al.*, Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas. *Histopathology* **56**, 876-882 (2010).
251. W. Yu, X. He, Y. Ni, J. Ngeow, C. Eng, Cowden syndrome-associated germline SDHD variants alter PTEN nuclear translocation through SRC-induced PTEN oxidation. *Hum Mol Genet* **24**, 142-153 (2015).
252. A. Gericke, M. Munson, A. H. Ross, Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* **374**, 1-9 (2006).
253. M. C. E. Jochner *et al.*, Unique properties of PTEN-L contribute to neuroprotection in response to ischemic-like stress. *Sci Rep* **9**, 3183 (2019).
254. Y. Wang, B. Dai, PTEN genomic deletion defines favorable prognostic biomarkers in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**, 5430-5437 (2015).
255. P. Mithal *et al.*, PTEN loss in biopsy tissue predicts poor clinical outcomes in prostate cancer. *Int J Urol* **21**, 1209-1214 (2014).
256. W. C. Que, H. Q. Qiu, Y. Cheng, M. B. Liu, C. Y. Wu, PTEN in kidney cancer: A review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* **480**, 92-98 (2018).
257. H. M. Zhang, T. T. Fan, W. Li, X. X. Li, Expressions and significances of TTF-1 and PTEN in early endometrial cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 20-26 (2017).
258. F. Han *et al.*, PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* **9**, 3485-3492 (2016).
259. E. Hodis *et al.*, A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251-263 (2012).
260. C. Bazzichetto *et al.*, PTEN as a Prognostic/Predictive Biomarker in Cancer: An Unfulfilled Promise? *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
261. N. M. McLoughlin, C. Mueller, T. N. Grossmann, The Therapeutic Potential of PTEN Modulation: Targeting Strategies from Gene to Protein. *Cell Chem Biol* **25**, 19-29 (2018).

262. A. Alimonti *et al.*, Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet* **42**, 454-458 (2010).
263. S. Knafo *et al.*, PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nat Neurosci* **19**, 443-453 (2016).
264. R. Pulido, PTEN Inhibition in Human Disease Therapy. *Molecules* **23**, (2018).
265. S. M. Stanford, N. Bottini, Targeting Tyrosine Phosphatases: Time to End the Stigma. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 524-540 (2017).
266. K. Takeuchi *et al.*, Dysregulation of synaptic plasticity precedes appearance of morphological defects in a Pten conditional knockout mouse model of autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4738-4743 (2013).
267. S. Knafo, J. A. Esteban, PTEN: Local and Global Modulation of Neuronal Function in Health and Disease. *Trends Neurosci* **40**, 83-91 (2017).
268. D. A. Fruman *et al.*, The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**, 605-635 (2017).
269. C. Porta, C. Paglino, A. Mosca, Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* **4**, 64 (2014).
270. S. Singh, R. Asal, S. Bhagat, Multifunctional antioxidant nanoliposome-mediated delivery of PTEN plasmids restore the expression of tumor suppressor protein and induce apoptosis in prostate cancer cells. *J Biomed Mater Res A* **106**, 3152-3164 (2018).
271. S. A. Altinoğlu, M. Wang, K. Q. Li, Y. Li, Q. Xu, Intracellular delivery of the PTEN protein using cationic lipidoids for cancer therapy. *Biomater Sci* **4**, 1773-1780 (2016).
272. C. Stiller *et al.*, Translocation of an Intracellular Protein via Peptide-Directed Ligation. *ACS Chem Biol* **12**, 504-509 (2017).
273. C. Hodakoski, B. Fine, B. Hopkins, R. Parsons, Analysis of intracellular PTEN signaling and secretion. *Methods* **77-78**, 164-171 (2015).
274. A. Papa, M. Chen, P. P. Pandolfi, Pills of PTEN? In and out for tumor suppression. *Cell Res* **23**, 1155-1156 (2013).
275. H. Wang *et al.*, Relevance and therapeutic possibility of PTEN-long in renal cell carcinoma. *PLoS One* **10**, e114250 (2015).
276. S. J. Lavictoire *et al.*, Engineering PTEN-L for Cell-Mediated Delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev* **9**, 12-22 (2018).
277. N. Fang *et al.*, Expression of PTEN-long mediated by CRISPR/Cas9 can repress U87 cell proliferation. *J Cell Mol Med* **21**, 3337-3346 (2017).
278. M. Xiao *et al.*, A chimeric protein PTEN-L-p53 enters U251 cells to repress proliferation and invasion. *Exp Cell Res* **369**, 234-242 (2018).

IX. ANEXOS

Publicaciones

Producto de este trabajo de tesis se han publicado los siguientes artículos:

-**Mingo, J.**, Luna, S., Gaafar, A., Nunes-Xavier, C. E., Torices, L., Mosteiro, L., Ruiz, R., Guerra, I., Llarena, R., Angulo, J.C., López, J.I., Pulido, R. (2019). Precise definition of PTEN C-terminal epitopes and its implications in clinical oncology. *NPJ precision oncology*, 3(1), 11.

-**Mingo, J.**, Rodríguez-Escudero, I., Luna, S., Fernández-Acero, T., Amo, L., Jonasson, A.R., Zori, R.T., López, J.I., Molina, M., Cid, V.J., Pulido, R. (2018). A pathogenic role for germline PTEN variants which accumulate into the nucleus. *Eur J Hum Genet*, 26(8), 1180-1187.

-**Mingo, J.**, Erramuzpe, A., Luna, S., Aurtenetxe, O., Amo, L., Diez, I., Schepens, J.T., Hendriks, W.J., Cortés, J.M., Pulido, R. (2016). One-tube-only standardized site-directed mutagenesis: an alternative approach to generate amino acid substitution collections. *PloS one*, 11(8), e0160972.

-Pulido, R., **Mingo, J.**, Gaafar, A., Nunes-Xavier, C. E., Luna, S., Torices, L., Angulo, J.C., López, J.I. (2019). Precise immunodetection of PTEN protein in human neoplasia. *CSH Perspectives in Medicine*. (En prensa).

Otras publicaciones relacionadas durante la tesis

-Nunes-Xavier, C. E., **Mingo, J.**, López, J. I., Pulido, R. (2018). The role of protein tyrosine phosphatases in prostate cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1866(1),102-113.

-Luna, S., **Mingo, J.**, Aurtenetxe, O., Blanco, L., Amo, L., Schepens, J., Hendriks, W.J., Pulido, R. (2016). Tailor-Made Protein Tyrosine Phosphatases: In Vitro Site-Directed Mutagenesis of PTEN and PTPRZ-B. *Methods Mol Biol*, 1447,79-93.

-Knafo, S., Sánchez-Puelles, C., Palomer, E., Delgado, I., Draffin, J. E., **Mingo, J.**, Wahle, T., Kaleka, K., Mou, L., Pereda-Perez, I., Klosi, E., Faber, EB., Chapman, HM., Lozano-Montes, L., Ortega-Molina, A., Ordóñez-Gutiérrez, L., Wandosell, F., Viña, J., Dotti, CG., Hall, RA., Pulido, R., Gerges, NZ., Chan, AM., Spaller, MR., Serrano, M., Venero, C., Esteban, JA. (2016). PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nature neuroscience*, 19(3), 443-453.

-Coronas-Serna, JM., Valenti, M., del Val, E., Fernández-Acero, T., Rodríguez-Escudero, I., **Mingo, J.**, Luna, S., Torices, L., Pulido, R., Molina, M., Cid, VJ. (2019). Modelling human disease in yeast: recreating the PI3K-PTEN-Akt pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Microbiology*. (En prensa).