

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Tesis doctoral:

Análisis funcional y de reconstitución traduccional de mutaciones hereditarias del gen PTEN en pacientes con síndromes tumorales y de autismo

Sandra Luna Blanco

Enero, 2022

Director: Dr. Rafael Pulido Murillo

Tutora: Dra. Ana Zubiaga

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más sincero agradecimiento a la Universidad del País Vasco y al Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, pero en especial a Rafael Pulido Murillo, director de este trabajo, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma. También al grupo de Victor J.Cid donde parte de los resultados han sido obtenidos gracias a la colaboración de su grupo (Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid).

A todas mis compañeras del Departamento de Biomarcadores de Cáncer por su amistad, colaboración, por el apoyo recibido y por hacer tan agradable mi estancia durante la realización de este proyecto. A Janire, Lorena, Olaia y Laura por acogerme en mi llegada y enseñarme el valor del compañerismo, a Leire, por esa alegría que transmites y por esos momentos vividos durante nuestra estancia en Madrid (sin ti no hubiera sido lo mismo). Por supuesto, a todos los demás compañeros de Biocruces. Gustavo y Ana, por la ayuda con todas las muestras de secuenciación que os llevaba. Patri, Edurne, Ane, Piedad, Iñigo, Marta, por todos los momentos vividos fuera y dentro del laboratorio. Echaré de menos los descansos de los viernes.

Quiero hacer extensiva mi gratitud, a toda mi familia que siempre me ha estado apoyando en los momentos más difíciles, en especial a Roberto, Mary Carmen, Carla, Jesús, Jose Luis, Isabel, Josu, Joseba, Cristina y Leia, por estar siempre ahí, por transmitirme todo el cariño y amor para conseguir que luche por lo que quiero y hacer que todo el esfuerzo dedicado den sus frutos. A mis abuelos, que sé que estarán orgullosos de mi. A mi abuela Manoli, un ejemplo de admiración y superación. A mis tíos y primos, Manoli, Patxo, Iñigo, Aitor, Jose Luis, Pili, Tania y Maikel. Muchos de mis logros se lo debo a vosotros.

Por supuesto, a la persona que desde el minuto uno ha estado conmigo, Iñigo mi marido, gracias a ti empecé este proyecto y lo he conseguido finalizar. Gracias por creer en mi, por escucharme, por saber que es lo que necesito en cada momento y por todos los momentos/viajes que hemos vivido (que no son pocos) y los que nos quedan por hacer. Gracias también por todos tus consejos, por enseñarme, sobre todo en los momentos no tan buenos, a ver la vida desde otra perspectiva, se que nos quedan muchos proyectos juntos y que todo nos irá bien porque ¡tengo a la mejor persona que podría tener a mi lado!

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
Abreviaturas.....	V
RESUMEN.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El gen supresor tumoral PTEN.....	1
1.1. Estructura de PTEN.....	1
1.2. Isoformas traduccionales de PTEN.....	4
1.2.1. PTEN-L.....	6
1.2.2. PTEN-M.....	8
1.3. Conformación de PTEN y relación con localización subcelular.....	9
1.3.1. PTEN extracelular.....	10
1.4. Función molecular de PTEN.....	11
1.4.1. Función de PTEN en la membrana plasmática. Actividad fosfatasa de PTEN.....	12
1.4.2. Función nuclear de PTEN.....	13
1.5. Regulación de PTEN.....	15
1.5.1. Regulación transcripcional de PTEN.....	15
1.5.2. Regulación post-transcripcional.....	15
1.5.3. Modificaciones post-traduccionales.....	16
1.6. Implicación de PTEN en enfermedades humanas.....	19
1.6.1. Función de PTEN en enfermedades hereditarias: PHTS y ASD.....	19
Síndrome hamartoma tumoral de PTEN (PHTS).....	19
Desórdenes del espectro autista asociados a PTEN (PTEN-ASD).....	21
1.6.2. Función de PTEN como regulador homeostático: relación con cáncer.....	22
1.6.3. Función de PTEN en el Sistema Nervioso Central (SNC): relación con ASD.....	25
1.7. Mutaciones en PTEN asociadas a enfermedades.....	29
1.7.1. Mutaciones somáticas.....	29
1.7.2. Mutaciones germinales.....	33
1.7.3. Mutaciones PTC.....	35
2. Lectura a través (<i>readthrough</i> , RT) como aproximación terapéutica en enfermedades causadas por PTCs.....	36
2.1. Mecanismo de acción.....	36
2.2. Eficiencia del <i>Readthrough</i>	39

2.3. Tipos de inductores de <i>readthrough</i>	40
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y METODOS.....	46
1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	48
1.1. Mutagénesis dirigida	48
1.2. Plásmidos	49
2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	49
2.1. TRANSFORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	49
2.1.1. Cepa de bacteria y medios de crecimiento	49
2.1.2. Preparación de bacterias competentes con cloruro cálcico	50
2.1.3. Transformación de bacterias.....	50
2.1.4. Purificación del DNA plasmídico	50
2.1.5. Secuenciación.....	51
2.2. TRANSFORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE LEVADURAS.....	52
2.2.1. Cepa de levadura y medios de crecimiento	52
2.2.2. Transformación de la levadura.....	52
2.2.3. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriada.....	53
3. CULTIVOS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	53
3.1. Líneas celulares	53
3.2. Método de transfección.....	53
3.3. Lisis de cultivos celulares.....	54
4. INMUNODETECCIÓN PROTÉICA	55
4.1. Electroforesis.....	55
4.2. Transferencia e hibridación.....	55
4.3. Revelado.....	56
4.4. Anticuerpos	56
5. Determinación de la actividad fosfatasa de PTEN	56
RESULTADOS	59
1. Optimización del protocolo de mutagénesis para análisis de alto rendimiento	61
2. Respuesta de <i>readthrough</i> de los codones de terminación prematura (PTC) en el gen PTEN	64
2.1. <i>PTCome</i> de PTEN asociado a enfermedades.....	64
2.2. Inducción de <i>readthrough</i> en mutaciones PTC de PTEN.....	65
2.3. Análisis global del <i>readthrough</i> del <i>PTCome</i> de la línea germinal de PTEN asociado a enfermedades	69

2.4.	Puntuación de eficiencia del <i>readthrough</i> de PTEN.....	73
2.5.	Reconstitución funcional de PTEN mediante el <i>readthrough</i> de los PTC	77
3.	Análisis global de mutaciones hereditarias de PTEN: implicaciones en síndromes tumorales y de autismo.....	80
3.1.	Patrón de distribución de mutaciones <i>missense</i> de PTEN en pacientes con ASD y PHTS.	80
3.2.	Patrón funcional de mutaciones <i>missense</i> de PTEN encontradas en la línea germinal de pacientes con ASD y/o PHTS.	83
3.3.	Análisis comparativo de las mutaciones de la línea germinal en PTEN y PTEN-L	85
	DISCUSIÓN.....	95
1.	Protocolo de mutagénesis dirigida estandarizado.....	97
2.	Respuesta al <i>readthrough</i> de los PTCs de PTEN.....	98
3.	Análisis global de mutaciones <i>missense</i> de la línea germinal de PTEN asociadas a ASD y PHTS	101
	CONCLUSIONES	105
	BIBLIOGRAFIA.....	109
	BIBLIOGRAFÍA SUPLEMENTARIA	127
	ANEXOS	137

Abreviaturas

Akt	Proteína quinasa B
ATP	trifosfato de adenosina
ASD	<i>Autism Spectrum Disorder</i> -Transtornos del espectro autista
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Pares de bases
BRRS	Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba
cDNA	DNA complementario
CHX	Cicloheximida
CLS	<i>Cytoplasmic Localization Signal</i>
CRCs	<i>sporadic colorectal cancers</i>
CS	Síndrome Cowden
DD	Developmental delay-Retraso en el desarrollo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
DO	Densidad óptica
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
DTT	Ditiotreitol
EC	endometrial carcinoma
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EJC	<i>exón junction complex</i>
FBS	Suero fetal bovino
G418	Geneticina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GF	factor de crecimiento
GSK3	glucógeno quinasa sintasa 3
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
ICC	<i>International Cowden Consortium</i>
LB	Medio de <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
mRNA	ARN mensajero
miRNAs	microRNAs
MMAC1	<i>Mutated in Multiple Advanced Cancers 1</i>
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> -Señal de localización nuclear
NPC	<i>nuclear pore complexes</i>
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
NMDAR	N-metil D- aspartato receptor
OBB	<i>Odyssey Blocking Buffer</i>
OFC	<i>Occipital-frontal circumference</i>
PBD	<i>PIP₂ Binding Domain</i> -Motivo de unión a PIP ₂

PBS	Tampón fosfato salino
PCa	Cáncer de próstata
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKD1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
PDVF	Polifluoruro de vinideno
PDZ	<i>PDZ-Binding Domain</i> Dominios de interacción proteína-proteína
PEG	Polietilenglicol
PHTS	<i>PTEN Hamartoma Tumor Syndrom</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol-3 Kinase</i>
PIP₃	<i>Phosphatidyl Inositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PIP₂	<i>Phosphatidyl Inositol (4,5)-bisphosphate</i>
PKC	proteína quinasa C
PLA2	fosfolipasa A2
PLC1	fosfolipasa C1
PMSF	para-metil-sultonil-fluoruro
PS	<i>Proteus Syndrome</i>
PSD	densidad post-sináptica
PTC	<i>Premature Termination Codon</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog delecte don chromosome 10</i>
PTM	<i>Post translational modification</i>
PTPs	Proteínas fosfatasas de tirosinas
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
Rpm	<i>Revolution per minute</i>
RT	<i>Readthrough</i>
RTK	receptor tirosin quinasa
SD	Medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa
SDM	<i>Side-Directed Mutagenesis</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SG	Medio sintético de crecimiento de levaduras con galactosa
SR	Medio sintético de crecimiento de levaduras con rafinosa
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TAE	Solución Tris-acetato EDTA
TE	Solución Tris EDTA
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
TEP-1	<i>Transforming growth factor regulated and Epitelial cell-enriched Phosphatase 1</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	RNA de transferencia
wt	<i>Wild-type</i> (tipo silvestre)
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> - Medio rico de crecimiento de levaduras

RESUMEN

El gen *PTEN* es uno de los supresores tumorales más importantes junto a p53. *PTEN* antagoniza directamente la ruta de señalización oncogénica de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), ruta involucrada en procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y el metabolismo celular. Se han encontrado mutaciones patogénicas a lo largo de todo el gen *PTEN*. Las mutaciones predominantes son las mutaciones *missense* y *nonsense*, representando un 40% y un 17 % de todas ellas, respectivamente. Las mutaciones *nonsense* están asociadas a enfermedades genéticas hereditarias, las cuales generan un codón de terminación prematura (PTC) provocando una truncación patogénica de la proteína. *PTEN* presenta mutaciones germinales de pacientes con síndromes de cáncer hereditario (también denominado síndrome de hamartoma tumoral de *PTEN*, PHTS), y en individuos que manifiestan fenotipos no cancerígenos, los cuales desarrollan macrocefalia, retardo en el desarrollo y desordenes del espectro autista (*Autism Spectrum Disorder*, ASD).

En esta tesis doctoral, primero se ha optimizado la metodología de mutagénesis dirigida para poder generar de forma eficaz y rápida mutaciones hereditarias del gen *PTEN* encontradas en pacientes con ASD y PHTS, así como de PTCs de *PTEN*. En segundo lugar, hemos caracterizado funcionalmente las variantes hereditarias asociada a ASD y PHTS, y hemos investigado el potencial terapéutico de estas mutaciones basadas en la función de *PTEN* y *PTEN-L*, una nueva isoforma de *PTEN* que posee una forma de traducción alternativa generando una proteína más estable. Se ha observado que casi todas las mutaciones de la región N-terminal de *PTEN* encontradas en pacientes con ASD son inactivas en *PTEN*, sin embargo, son capaces de recuperar la actividad en *PTEN-L*. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar terapias basadas en *PTEN* para este grupo de pacientes.

Por último, se ha determinado el patrón de respuesta del *readthrough* (RT o "lectura a través") de mutaciones PTCs de *PTEN* identificadas en tumores humanos. Se ha realizado un análisis para determinar aquellos PTCs capaces de hacer *readthrough* en presencia de geneticina (G418), un antibiótico capaz de inducir *readthrough* y generar proteínas completas de genes con PTCs, además de analizar *in vivo* la funcionalidad de la proteína generada. Los resultados obtenidos indican la existencia de un patrón heterogéneo de la respuesta del *readthrough* de los diferentes PTCs de *PTEN*. Nuestro análisis puede contribuir a la determinación de qué pacientes poseen una mayor probabilidad de beneficiarse de un posible tratamiento de precisión.

INTRODUCCIÓN

1. El gen supresor tumoral PTEN

El gen PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog deleted on chromosome 10*) fue descubierto en 1996, cuando dos grupos independientes lo hallaron en una región del cromosoma 10q23, comúnmente delecionada en cánceres humanos [1, 2]. Inicialmente, PTEN, se identificó como una proteína fosfatasa de tirosina (*Protein Tyrosine Phosphatase*; PTP) debido a su homología con la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de la familia de las PTPs, aunque también fue denominado MMAC1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancers*) o TEP-1 (*Transforming growth factor (TGF) regulated and Epithelial cell-enriched Phosphatase 1*) [3-5].

PTEN es considerado uno de los genes supresores tumorales más importantes, junto a p53, ya que se encuentra mutado con relativa alta frecuencia en tumores humanos [6, 7]. Además, PTEN se encuentra mutado en la línea germinal de pacientes con síndromes de cáncer hereditario caracterizados por trastornos en el desarrollo, deficiencias neurológicas, desarrollo de hamartomas y una mayor predisposición a desarrollar ciertos cánceres [8, 9].

1.1. Estructura de PTEN

El gen PTEN está localizado en la región q23 del cromosoma 10, y consta de 9 exones. La isoforma más abundante de la proteína PTEN muestra un peso molecular aparente de 47.2 kDa, y posee 403 aminoácidos distribuidos en 5 regiones con relevancia funcional: la región N-terminal de unión a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato = PIP₂ (*PIP₂ Binding Domain*; PBD), seguido de un dominio fosfatasa de tirosinas (PTP), un dominio C2 de unión a membranas, una cola C-terminal (*C-tail*) y un motivo de interacción con dominios PDZ (*PDZ-Binding Domain*; PDZ-BD) [10] (Figura 1).

PTEN

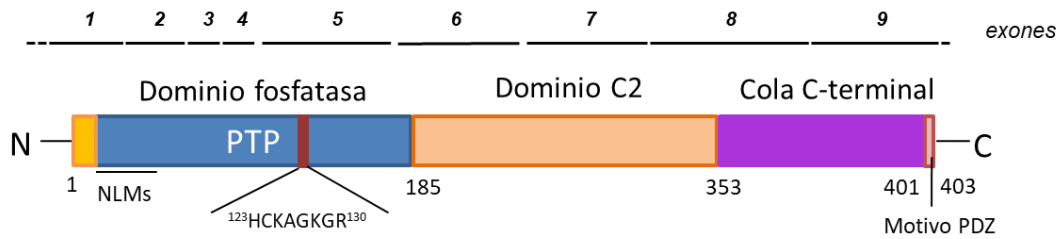


Figura 1. Dominios funcionales de la proteína PTEN. Regiones indicadas por colores. N-terminal de PTEN (aminoácidos 1-7, rectángulo amarillo). Motivos de localización N-terminal (NLMs). Dominio fosfatasa (PTP) (aminoácidos 8-185, rectángulo azul); dominio C2 (aminoácidos 185-353, rectángulo naranja); cola C-terminal (aminoácidos 353-403, rectángulo morado) que incluye un motivo de unión a dominios PDZ (PDZ-BD) (aminoácidos 401-403). En la parte de arriba se muestran las regiones codificadas por los diferentes exones de PTEN.

La **región amino terminal (N-terminal)** (aminoácidos 1-7) contiene varios motivos de localización subcelular (NLMs): un motivo de unión a PIP_2 (*PIP₂ Binding Domain*; PBD, aminoácidos 6-14) encargado de activar la enzima posicionando a PTEN en las membranas [11], una región de localización citoplasmática (*Cytoplasmic Localization Signal*; CLS, aminoácidos 19-25) [12, 13] y una región de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*; NLS, aminoácidos 8-32) [14, 15].

El **dominio fosfatasa (dominio PTP)** de PTEN (aminoácidos 8-185) contiene el centro activo de la enzima, con el motivo catalítico $\text{PTP } ^{123}\text{HCKAGKGR}^{130}$, que incluye la C124 y la R130 catalíticas. El dominio fosfatasa posee actividad frente a sustratos lipídicos y proteínicos [16], y pertenece al grupo de PTPs de doble especificidad (DUSPs) [3, 16, 17] (Figura 2).

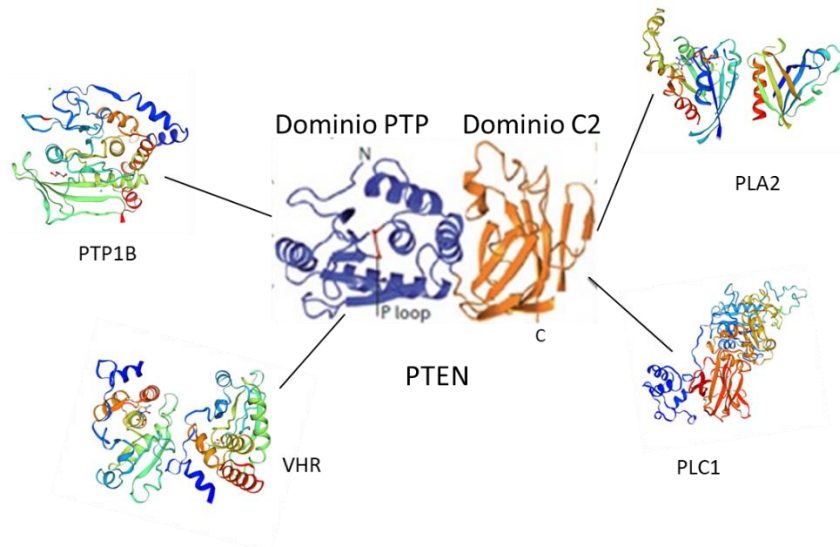


Figura 2. Comparación de la estructura tridimensional de PTEN con otras proteínas relacionadas. El dominio fosfatasa de PTEN (azul oscuro) está relacionado con el dominio fosfatasa de PTPs clásicas (representadas por PTP1B) y PTPs de especificidad dual (DUSPs, representadas por VHR). La estructura del dominio C2 (naranja) es similar a los que presentan las fosfolipasas A2 y C1 (PLA2 y PLC1).

El **dominio C2** de PTEN (aminoácidos 186-353) se une a vesículas fosfolipídicas y esta unión es importante para que PTEN realice su función, ya que asocia a PTEN con las membranas celulares y le ayuda a posicionar el dominio catalítico hacia su sustrato fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato, PIP₃ [10]. La estructura tridimensional del dominio C2, es similar a la de los dominios C2 de la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa A2 (PLA2) o la fosfolipasa C1 (PLC1; también conocida como PLCG1) (Figura 2).

La **región carboxi terminal (C-terminal)** de PTEN (aminoácidos 353-403) contiene una secuencia PEST y un motivo de interacción PDZ (*Post-synaptic density-95, Discs-large, Zonula occludens-1*) [10]. La secuencia PEST se denomina así por ser una secuencia rica en Prolina (P), ácido glutámico (E), Serina (S) y Treonina (T). Las proteínas que poseen esta secuencia exhiben una vida intracelular corta, por lo que se ha propuesto que esta secuencia actúa como un péptido señal para la degradación de la proteína [18]. El motivo PDZ consta de 80-90 aminoácidos en donde se encuentra el motivo de unión a los dominios PDZ (PDZ-BD) (T401-K402-V403; TKV), muy conservado en vertebrados. El motivo de unión a los dominios PDZ de PTEN se asocia con proteínas reguladoras con dominios PDZ [19]. PDZ-BD es importante para la interacción entre proteínas y la regulación de la actividad de PTEN [20]. Además, muchas de las proteínas que interaccionan con PTEN a

través de los dominios PDZ son proteínas de andamiaje con múltiples dominios PDZ que estabilizan PTEN y lo dirigen a compartimentos asociados con las membranas. Esta región es diana de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, la acetilación y la escisión por caspasa-3 [21, 22]. A diferencia del dominio catalítico y C2, la cola C-terminal y el extremo N-terminal no se han podido resolver mediante cristalización [10].

1.2. Isoformas traduccionales de PTEN

El RNA mensajero (mRNA) de PTEN codifica diferentes proteínas debido a la presencia de inicios de traducción alternativos no canónicos. Comúnmente, los ribosomas inician la traducción a partir del codón de iniciación AUG más cercano al extremo 5' del mRNA. Sin embargo, recientes estudios han identificado codones de iniciación alternativos al codón AUG de PTEN, que generan diferentes proteínas [23]. Se han identificado 4 nuevas isoformas que varían en el número de aminoácidos de la región N-terminal (Figura 3, Tabla 1). La primera isoforma que se descubrió fue PTEN-Long (PTEN-L), también llamada PTEN- α . A las posteriores isoformas de PTEN se propuso denominarlas siguiendo el orden alfabético a partir de la isoforma PTEN-L: PTEN-M, PTEN-N y PTEN-O [24-26]. PTEN-M (también llamada PTEN- β) es la isoforma predominante, sin embargo, la isoforma más estudiada ha sido PTEN-L [27].

PTEN-L, PTEN-M, PTEN-N y PTEN-O poseen 173, 146, 131 y 72 aminoácidos adicionales al PTEN canónico, respectivamente (Figura 3, Tabla 1). Las isoformas PTEN-L, PTEN-N y PTEN-O inician la traducción a partir del codón CUG, mientras que la isoforma PTEN-M lo hace a través del codón AUU [25].

Tabla 1. Isoformas de PTEN.

Isoformas de PTEN	Aminoácidos totales	Aminoácidos de extensión N-terminal	Peso molecular (kDa)
PTEN-L/ α	576	173	65
PTEN-M/ β	549	146	62,5
PTEN-N	534	131	61
PTEN-O	475	72	55
PTEN	403	-	47,2

Se indica los aminoácidos que posee la extensión N-terminal de cada isoforma de PTEN (PTEN-L/ α , PTEN-M/ β , PTEN-N y PTEN-O), así como los aminoácidos totales de cada isoforma y su peso molecular previsto.

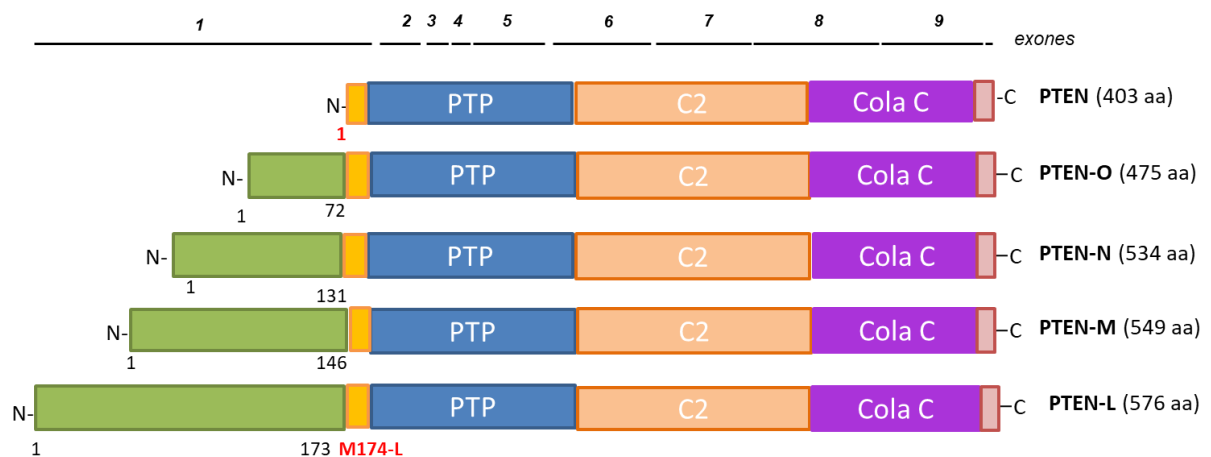


Figura 3. Isoformas traduccionales de PTEN. Se indican las diferentes isoformas de PTEN (con el número de aminoácidos). PTEN consta de 403 aminoácidos. PTEN-L/ α , PTEN-M/ β , PTEN-N y PTEN-O poseen 173, 146, 131 y 72 aminoácidos adicionales al PTEN canónico, respectivamente (rectángulo verde). El dominio PTP (rectángulo azul), C2 (rectángulo naranja) y la cola C-terminal (rectángulo morado) de las isoformas no varía respecto a la de PTEN. La Met1 de PTEN se corresponde con la Met174 (M174-L) de PTEN-L (marcada en rojo). En la parte de arriba se muestran las regiones codificadas por los diferentes exones de PTEN.

Todas las isoformas de PTEN se expresan y son activas [25], es decir, tienen actividad fosfatasa, ya que reducen los niveles de Akt fosforilado a niveles similares a los de PTEN y PTEN-L.

1.2.1. PTEN-L

La traducción de PTEN-L se inicia a partir de una Leucina (Leu), obteniendo una proteína con una extensión de 173 aminoácidos adicionales a la proteína canónica (Figura 4). Con el fin de evitar confusión a la hora de identificar y nombrar los residuos de PTEN y PTEN-L, se ha establecido una nomenclatura común. Los aminoácidos de PTEN-L serán calculados añadiendo 173 aminoácidos adicionales al residuo de PTEN, y se nombrarán seguidos de una L en mayúsculas (-L), de tal manera que la cisteína 124 (Cys124, C124) de PTEN es equivalente a la cisteína 297-L (Cys297-L, C297-L) de PTEN-L [26].

PTEN-L es 5 veces más efectiva en unirse al sustrato PIP₃ que PTEN wt y no requiere de PIP₂ para mantenerse en la conformación activa. Se ha propuesto que esta extensión de la región N-terminal de PTEN-L le proporciona una mayor estabilidad conformacional a PTEN [28].

PTEN-L

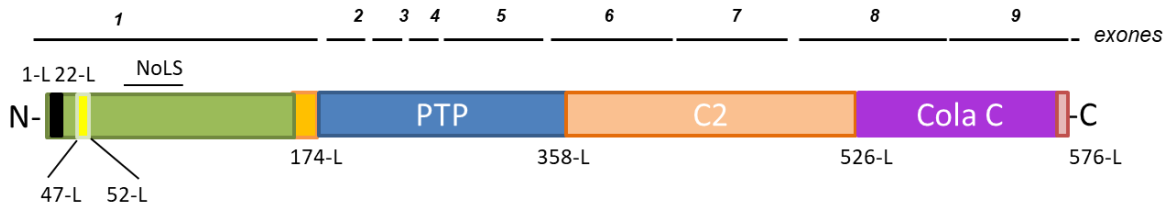


Figura 4. Dominios funcionales de PTEN-L. PTEN-L posee los mismos dominios estructurales que PTEN además de una extensión de 173 aminoácidos en la región N-terminal (rectángulo verde). En la región N-terminal de PTEN-L hay una señal de secreción/localización mitocondrial (aminoácidos 1-L-22-L, rectángulo negro), una secuencia de poli argininas (aminoácidos 47-L-52-L, rectángulo amarillo) y una secuencia de localización nucleolar (NLS). Dominio fosfatasa (PTP) (aminoácidos 174-L- 358-L, rectángulo azul); dominio C2 (aminoácidos 358-L-526-L, rectángulo naranja); cola C-terminal (aminoácidos 526-L-576-L, rectángulo morado). En la parte de arriba se muestran las regiones codificadas por los diferentes exones de PTEN.

La extensión N-terminal de las isoformas de PTEN juegan un papel importante en la regulación funcional y localización subcelular. Se ha propuesto un posible modelo de unión a la membrana de PTEN-L gracias a una hélice de unión a membrana (*Membrane-Binding Helix*, MBH) (aminoácidos 151-L-174-L) en la extensión N-terminal de PTEN-L, la cual podría operar como una hélice transmembranal o interactuar con la

superficie de la membrana celular [29]. En un estudio llevado a cabo en un modelo de levadura humanizada, previamente usado para analizar variantes patogénicas de PTEN [30, 31], se observó que dicha hélice es esencial para la acumulación de PTEN-L en la membrana plasmática y que prevenía la importación de PTEN-L al núcleo [32].

Por otro lado, originalmente se describió que la extensión N-terminal de PTEN-L contiene una señal secretora compuesta por una región de seis alaninas (A12-A17-L) que le permite salir de las células, un sitio de escisión (S22-L) que facilita la secreción de PTEN-L fuera de la célula, y un motivo de argininas (R47-R52-L) que actúa como una secuencia de internalización en células receptoras (Figura 4) [23, 33]. Sin embargo, el análisis en el modelo de levadura humanizada demostró que este motivo de argininas es importante para la localización nuclear [32], en concordancia con otro estudio independiente en el cual se mostró que dicho motivo de alaninas era responsable de la localización nucleolar de PTEN-M [34]. Además, mediante análisis bioinformáticos, se ha propuesto la existencia de secuencias de localización nucleolar (NoLS) y nuclear (NLS) en esta región N-terminal de PTEN-L y PTEN-M [27]. De hecho, se ha observado que PTEN-L se transloca al núcleo tras un estrés isquémico [35].

PTEN-L se ha localizado en la mitocondria [36], y el estudio en la levadura humanizada reveló la existencia de una señal de localización mitocondrial en los primeros 22 aminoácidos de PTEN-L [32]. Se ha demostrado que PTEN-L desempeña funciones importantes en el mantenimiento de la estructura mitocondrial y el metabolismo energético, regula negativamente la mitofagia mediante la desfosforilación de la S65 de la ubiquitina, y participa en el mantenimiento de la energía mitocondrial [36-38].

PTEN-L antagoniza la vía de señalización PI3K tanto en células productoras como en células aceptoras e induce la muerte celular en células cancerígenas, manteniendo así la función supresora tumoral. Se ha demostrado que PTEN-L induce apoptosis en células de cáncer colorrectal y, junto con GAS1 (proteína implicada en el arresto del ciclo celular), inhibe el crecimiento en gliomas [23, 39, 40]. Se ha propuesto que versiones secretadas de PTEN-L mutado podrían ejercer un efecto dominante negativo sobre PTEN silvestre en células aceptoras, en cuyo caso PTEN-L favorecería la creación de un ambiente tumorigénico [41, 42]. Además, se ha observado que PTEN-L y PTEN-

M promueven la tumorigénesis de células cancerígenas a través de la interacción con la proteína 5 con repeticiones WD (WDR5) y la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. Estos hallazgos sugieren la existencia de funciones pro-oncogénicas, independientes de actividad fosfatasa, para PTEN-L y PTEN-M [43].

Estudios recientes atribuyen a PTEN-L funciones no relacionadas directamente con la supresión tumoral. Se ha revelado que PTEN-L modula la potenciación a largo plazo (LTP) del hipocampo y los procesos de memoria y aprendizaje a través de la regulación de la señalización de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) y la subunidad 2B del receptor NMDA (NR2B) [44], y que PTEN-L se encuentra involucrada en la regulación tanto de la función olfativa como en la endocitosis de células del bulbo olfatorio (OB) [45]. Por otro lado, Li y sus colaboradores proponen a PTEN-L como un regulador positivo del reclutamiento de neutrófilos a lugares de infección, mediante la desfosforilación de la T558 de Moesin (una proteína que forma parte de la familia ERM, Ezrin-Radixin-Moesin, cuya función es el anclaje de microfilamentos) [46]. PTEN-L también mejora la respuesta del interferón de tipo I (IFN) y de citoquinas proinflamatorias, y promueve la inmunidad innata antiviral durante la infección viral de manera dependiente de su actividad fosfatasa [47].

1.2.2. PTEN-M

La isoforma PTEN-M (Figura 3), posee una extensión de 146 aminoácidos en la región N-terminal en comparación con PTEN canónico, y carece de la secuencia de secreción N-terminal de PTEN. PTEN-M se encuentra principalmente en el nucleolo desfosforilando la nucleolina y regulando negativamente la transcripción del DNA ribosomal y la proliferación celular [34].

1.3. Conformación de PTEN y relación con localización subcelular

La isoforma canónica de PTEN ejerce funciones esenciales tanto en asociación con membranas (principalmente la membrana plasmática) como en el núcleo. Diferentes regiones de PTEN (la región NLM, los motivos de exclusión nuclear, y la cola C-terminal, principalmente) median cambios conformacionales en la proteína y participan en la regulación de su función y distribución subcelular [15, 48].

Cuando el motivo de unión a PIP_2 y la NLS de la región N-terminal se encuentran enmascarados por los motivos de exclusión nuclear de la cola C-terminal, PTEN está en una **conformación cerrada**. Alteraciones en los motivos de exclusión nuclear o en la cola C-terminal de PTEN, como cambios en su estado de fosforilación, unión a proteínas reguladoras, o una proteólisis parcial, exponen el dominio NLS, promoviendo la **conformación abierta** de PTEN (Figura 5). La conformación cerrada de PTEN mayoritariamente se encuentra en el citoplasma de forma estable, aunque puede entrar en el núcleo por difusión o por mecanismos independientes de importinas. La conformación abierta podría estar favorecida por la asociación de PTEN a la membrana a través de interacciones con proteínas con dominios PDZ, o mediante interacciones electrostáticas entre la carga positiva de los motivos de unión a membrana y la carga negativa de la membrana plasmática. La interacción de PTEN con la membrana plasmática es esencial para la desfosforilación de PIP_3 , controlando la proliferación y el crecimiento celular [49-51]. Las mutaciones en la región N-terminal de PTEN asociadas a tumores reducen frecuentemente su actividad catalítica y la capacidad de unirse a la membrana plasmática, favoreciendo la acumulación en el núcleo [12, 52]. La conformación abierta de PTEN también puede ser transportada al núcleo por RAN GTPasas (*RAS-related nuclear protein*) dependientes de NLS y de mecanismos relacionados con importinas u otras proteínas transportadoras, y con la ubiquitinación o sumoilación de residuos de Lys específicos [14, 53, 54].

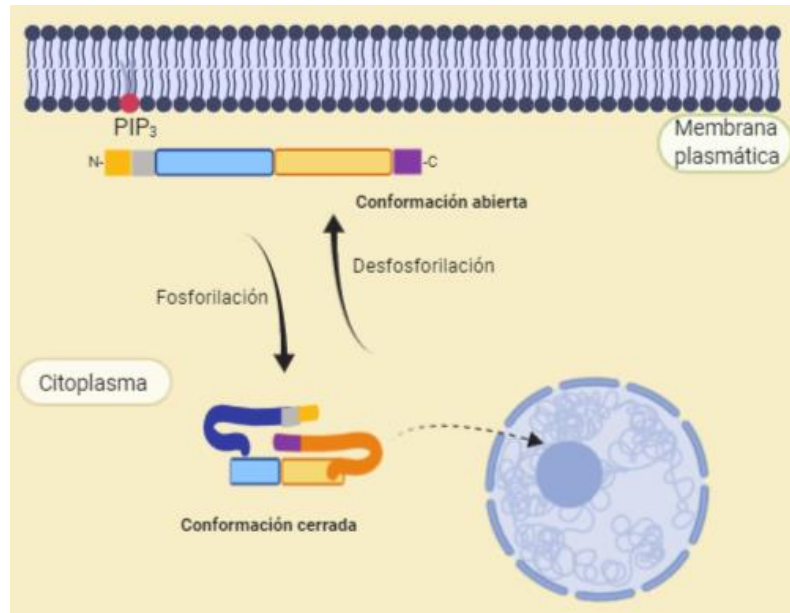


Figura 5. Modelo de la regulación de la conformación de PTEN. Distribución de PTEN entre el núcleo, membrana plasmática y citoplasma. En la conformación cerrada, la región N-terminal se encuentra enmascarada por la cola C-terminal. Fosforilaciones en la región C-terminal de PTEN promueven la conformación abierta de PTEN. La conformación abierta de PTEN se puede encontrar localizada en la membrana plasmática o transportada al núcleo por diferentes mecanismos.

Cuando ocurren procesos de fosforilación/desfosforilación o interacciones proteína-proteína, la transición de la conformación abierta a la cerrada puede ser reversible. Los procesos de ubiquitinación/deubiquitinación también son reversibles, lo que dota de gran plasticidad a la regulación de la función supresora tumoral de PTEN [55]. Por el contrario, la degradación proteolítica parcial, o la mutación en algún residuo clave, generan transiciones irreversibles [12, 22]. Un análisis en el modelo de la levadura reveló que mutaciones asociadas a tumores en dicha región reducen su actividad catalítica y la capacidad de unirse a la membrana plasmática acumulándose en el núcleo [52].

1.3.1. PTEN extracelular

PTEN y PTEN-L muestran localizaciones subcelulares diferentes, lo cual es relevante en la fisiología y patología asociada a estas proteínas. PTEN se distribuye principalmente entre el citoplasma, el núcleo y la membrana plasmática, aunque también puede ser empaquetado en exosomas y ser transferido a otras células. La secreción de PTEN en exosomas requiere la monoubiquitinación de la Lys13, llevada a cabo por la enzima E3 ligasa (NEDD4-1) [56]. PTEN-L, por su parte, puede ser secretado

y captado por otras células directamente [23] (Figura 6). PTEN-L, además, ha sido hallado en el citoplasma, en la membrana plasmática, en el núcleo y en las mitocondrias [32, 36, 37] (Figura 6).

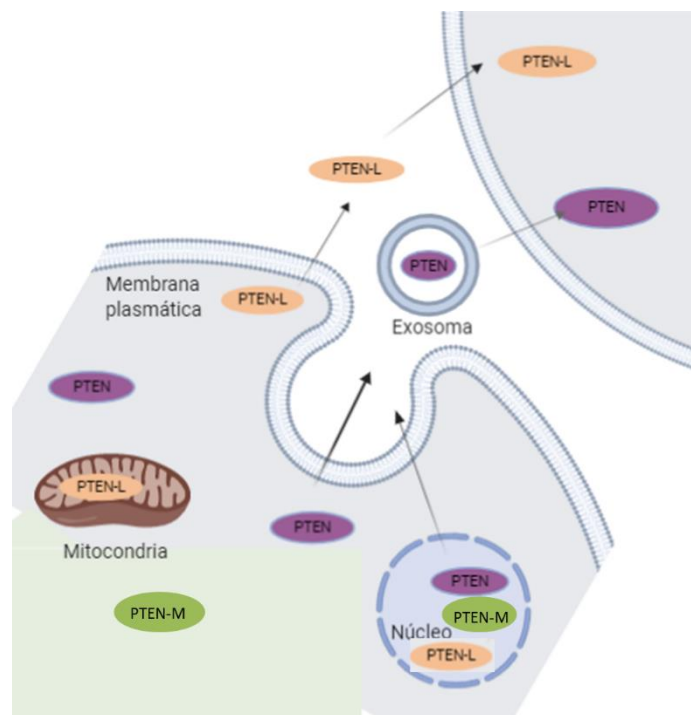


Figura 6. PTEN extracelular. PTEN se puede localizar en el citoplasma, núcleo, membrana plasmática o puede ser empaquetado en exosomas y ser transferido a otras células. PTEN-M ha sido hallado en el nucleolo. PTEN-L se localiza en las mitocondrias, en el núcleo, en la membrana plasmática y en el citoplasma, y puede ser secretado y captado por otras células directamente.

1.4. Función molecular de PTEN

La función primordial de PTEN está ligada a la supresión tumoral, principalmente mediante la desfosforilación de PIP_3 en la membrana plasmática. Sin embargo, PTEN pueden localizarse en otros compartimentos u orgánulos intracelulares, como citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria, microtúbulos, o endosomas [57-59] donde puede desarrollar funciones moleculares independientes de su actividad fosfatasa de PIP_3 . Las funciones de PTEN en asociación con membranas y en el núcleo son las más estudiadas [60].

1.4.1. Función de PTEN en la membrana plasmática. Actividad fosfatasa de PTEN

PTEN es una fosfatasa con doble especificidad y tiene la capacidad de desfosforilar tanto lípidos como proteínas. La actividad fosfatasa lipídica de PTEN es la más importante para su actividad supresora tumoral, que tiene lugar en asociación con membranas celulares y está relacionada, principalmente, con el control de la proliferación y la supervivencia celular. La actividad fosfatasa de proteínas ha sido descrita en distintos compartimentos subcelulares, y parece estar relacionada, principalmente, con el control de la migración, motilidad e invasión celular. Esta actividad fosfatasa de proteínas actúa sobre aminoácidos fosfo-tirosina, fosfo-serina y fosfo-treonina [61, 62].

En condiciones fisiológicas, factores de crecimiento (GF) y hormonas como la insulina, citoquinas y componentes de la matriz extracelular se unen al receptor tirosina quinasa (RTK) activando la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). El reclutamiento de la subunidad catalítica de PI3K (p110) por la subunidad reguladora (p85) es esencial para su activación [63]. Una vez activa, la enzima PI3K cataliza la fosforilación de PIP₂ transformándolo en PIP₃ [64] (Figura 7). Los compuestos PIP₃ son segundos mensajeros, encargados de reclutar proteínas como la proteína quinasa Akt (también conocida como PKB) y la PDK1 hacia la membrana [65] (Figura 7). En la membrana, la fosforilación de Akt por PDK1 activa el complejo quinasa mTORC1 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*), un regulador principal en la síntesis de proteínas. Para una completa activación, Akt requiere una segunda fosforilación llevada a cabo por el complejo mTORC2 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) [66] (Figura 7) [67, 68].

PTEN es la única enzima que antagoniza directamente la acción de PI3K, desfosforilando el fosfato de la posición 3 de PIP₃ dando lugar a PIP₂ (Figura 7) [7]. Esta desfosforilación limita la acumulación de este compuesto y previene la activación de Akt. De esta manera, PTEN adquiere una gran importancia como regulador negativo de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, inhibiendo la supervivencia, crecimiento, proliferación y migración celular [4, 6].

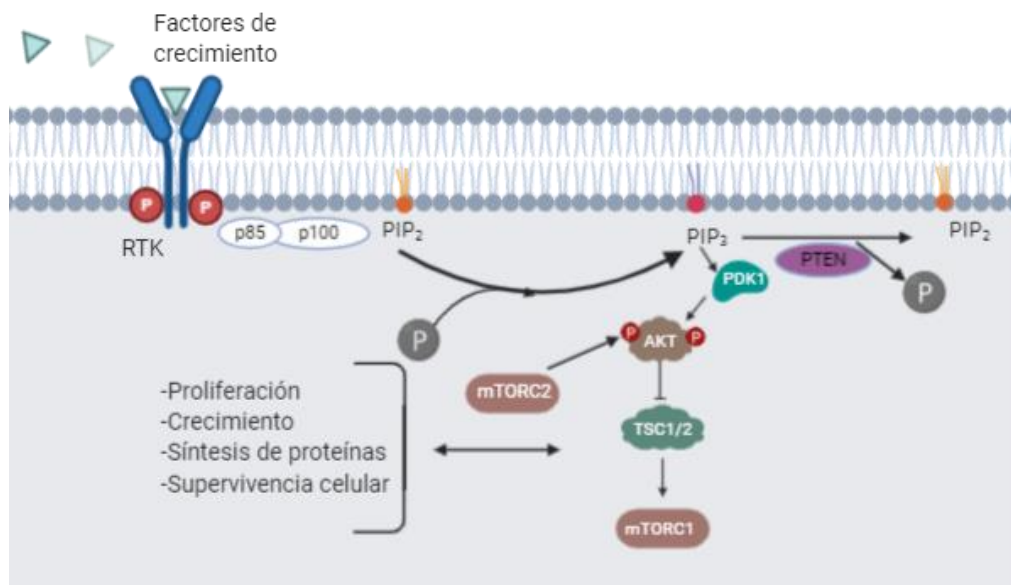


Figura 7. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. En respuesta a señales extracelulares (como factores de crecimiento), se activan las subunidades de PI3K fosforilando el PIP₂ y transformándolo en PIP₃ en la membrana plasmática, lo que desencadena la activación de vías de señalización corriente abajo. PTEN antagoniza negativamente esta vía desfosforilando PIP₃ y dando lugar a PIP₂.

1.4.2. Función nuclear de PTEN

La mayor parte de las funciones desempeñadas por PTEN en el núcleo son independientes de su actividad catalítica, y dependen principalmente de interacciones proteína-proteína [54, 69, 70].

PTEN en el núcleo lleva a cabo la función de control de la estabilidad genómica manteniendo la estabilidad de los centrómeros gracias a la interacción con proteínas centroméricas como CENP-C (*Centromere-specific binding protein C*) (Figura 8). Además, PTEN interacciona con la histona H1 y componentes de la cromatina no histónicos como la proteína heterocromatínica 1 (HP1 α) manteniendo la estructura de la cromatina condensada y reprimiendo la transcripción de los genes [69, 70]. El mantenimiento de la estabilidad genómica requiere mecanismos de reparación de DNA para protegerlo de agentes genotóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ROS), radiaciones ionizantes (IR) o la radiación ultravioleta (UV). PTEN está involucrado en la reparación del DNA a través de la regulación de RAD51, una proteína involucrada en reparar hebras dañadas de doble cadena (Figura 8) [70]. Asimismo, PTEN controla la proliferación celular induciendo el arresto del ciclo celular (G₀-G₁)

mediante la disminución de los niveles de ciclina D1 a través de la unión con la acetiltransferasa p300, una histona esencial para mediar el paro del ciclo celular por PTEN. La formación de este complejo mantiene una alta acetilación de p53, el cual regula la estabilidad y la actividad transcripcional (Figura 8). PTEN también regula el ciclo celular uniéndose directamente a la ubiquitin-ligasa E3 del complejo APC/C (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*) facilitando la asociación con su activador, CDH1, y aumentando la actividad supresora tumoral (Figura 8) [54]. Por otra parte, PTEN también podría afectar a la apoptosis. El equilibrio entre PTEN nuclear y citoplasmático parece ser importante en la regulación de la apoptosis [53].

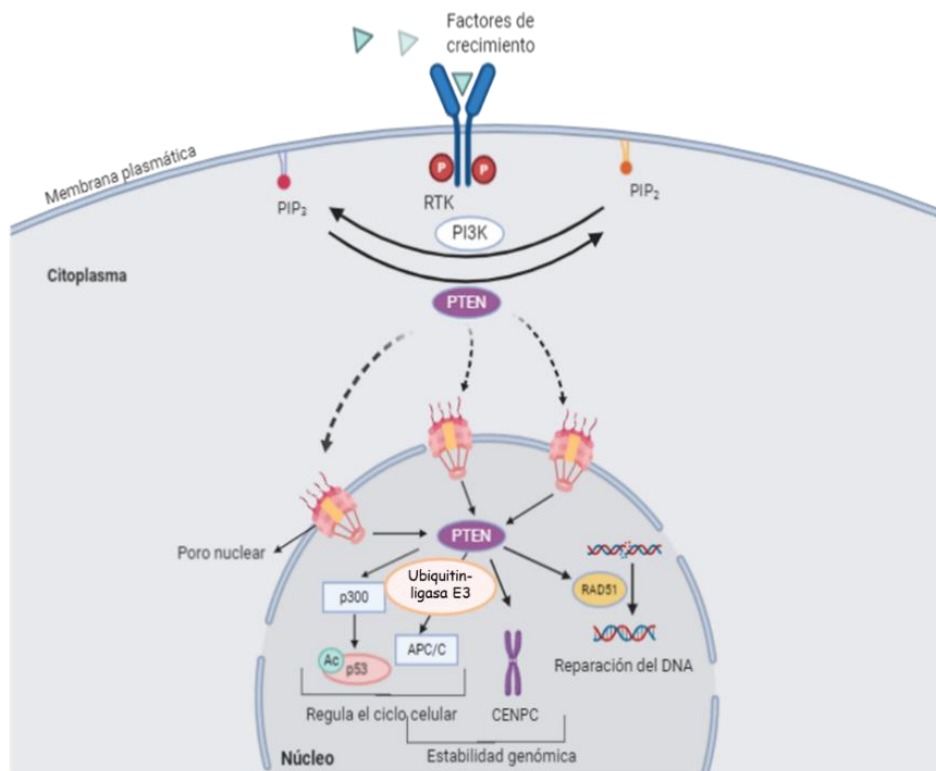


Figura 8. Función de PTEN en el núcleo. PTEN ejerce funciones supresoras tumorales en el núcleo, regula la estabilidad del genoma, la reparación del DNA, el ciclo celular y la expresión génica.

1.5. Regulación de PTEN

Se han descrito diferentes mecanismos capaces de regular la expresión y función de PTEN, entre los que se incluyen el silenciamiento epigenético (hipermetilación), modulación transcripcional, y modificaciones post-traduccionales [18, 71-74].

1.5.1. Regulación transcripcional de PTEN

Se han encontrado muchos factores de transcripción que se unen al promotor de PTEN y permiten activar o inhibir la expresión del mismo [75]. Entre los factores activadores de la transcripción de PTEN destacan el regulador metabólico PPAR γ (*peroxisome proliferation-activated receptor γ*), la proteína de respuesta a crecimiento EGR-1 (*early growth-response protein 1*), el gen supresor tumoral p53 y el factor de transcripción ATF2 (*activating transcription factor 2*) [76-79]. Por su parte, la proteína SNAIL, la proteína inhibidora de unión a DNA (ID1), la proteína EVI1 (*ecotropic virus integration site 1 protein homologue*), la proteína del grupo Polycomb BMI1 (*B lymphoma Mo-MLV*), el factor de transcripción AP1 (c-JUN) y el factor nuclear kappa-B (NF-Kb) inhiben la transcripción de PTEN [80-83].

La transcripción de PTEN también está controlada por la ruta de señalización de NOTCH1. Se ha demostrado que la activación de la ruta de NOTCH1 puede actuar como un regulador negativo y positivo de la transcripción de PTEN a través del factor HES-1 y CBF-1 (*C-repeat binding factor 1*, también conocido como RBP-J), respectivamente [84, 85]. Muchos de estos factores de transcripción están implicados en el desarrollo y progresión del cáncer, por lo que el control de su actividad es crucial para la regulación de la supresión y la progresión del tumor [86].

1.5.2. Regulación post-transcripcional

PTEN está regulado por microRNAs (miRNAs), moléculas de ARN que se unen a secuencias parcialmente complementarias del mRNA del gen e inhiben su traducción. Niveles elevados de estos miRNAs se correlacionan con una reducción del mRNA de PTEN, y por tanto, con una activación de la vía PI3K/Akt en muchos tumores [87, 88]. Los miRNAs de PTEN más importantes son miRNA-19 y el miRNA-21. Además, existen *long non-coding RNAs*, entre los que se encuentra el pseudogen de PTEN, PTENP1, que regulan positivamente los niveles de proteína de PTEN bloqueando el efecto de los miRNAs [89-91].

1.5.3. Modificaciones post-traduccionales

PTEN está altamente regulado por modificaciones post-traduccionales (Tabla 2) [20, 92].

Tabla 2. Principales modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad de PTEN.

Modificaciones post-traduccionales	Regiones de PTEN implicadas	Efectos en la función de PTEN
Ubiquitinación	Dominio N-terminal y C2 (K13, K66, K289, K327, K330, K342 y K344)	Poliubiquitinación dando lugar a la degradación de la proteína
		Monoubiquitinación para facilitar la importación al núcleo
Fosforilación	Fosforilación C-terminal (T366, S370, S380, T382, T383 y S385)	Promueve la conformación cerrada y estable
		Reduce la dimerización de PTEN
		Excluye a PTEN del núcleo y está involucrada en la reparación del DNA
Oxidación	Dominio fosfatasa (C124)	Inhibe la actividad fosfatasa
S-nitrosilación	Dominio N-terminal (C83 y C106)	Inhibe la actividad fosfatasa
		Disminuye la estabilidad de la proteína
Acetilación	Dominio fosfatasa (K125, K128)	Inhibe la actividad fosfatasa
	Dominio fosfatasa (K163)	Aumenta la asociación con la membrana plasmática
	Dominio C-terminal (K402)	Aumenta las interacciones con proteínas que contengan dominios PDZ
SUMOilación	Dominio C2 (K266)	Aumenta la asociación con la membrana plasmática
	Dominio C2 (K254)	Induce la importación nuclear

En la tabla se muestra las regiones de PTEN implicadas, así como los efectos que provocan dichas modificaciones post-traduccionales en la función de PTEN.

Regulación por fosforilación

La fosforilación es una de las modificaciones post-traduccionales más importantes para regular la actividad de PTEN, y afecta a residuos Ser, Thr y Tyr [93]. Existen varios sitios de fosforilación, predominantemente localizados en el dominio C2 y en la región C-terminal de PTEN, que pueden afectar a la estabilidad, a la actividad fosfatasa y a la localización celular de la proteína [21, 94-96]. La estabilización es el resultado de la asociación de residuos fosforilados de la región C-terminal con el dominio C2, promoviendo la disociación del dominio C2 de la membrana y formando la conformación cerrada, forma más estable de PTEN. Sin embargo, a pesar de ser la forma más estable, es la conformación menos activa. La fosforilación de la Thr366 juega un papel importante en la desestabilización de PTEN [97]. La autofosforilación de

La cola C-terminal libera la asociación con el dominio C2, favoreciendo la actividad funcional de PTEN [98]. La localización nuclear se ve afectada por alteraciones en la fosforilación de la cola C-terminal [14].

Regulación por ubiquitinación

PTEN puede ser regulado por monoubiquitinaciones y por poliubiquitinaciones. La monoubiquitinación de las Lys13 y Lys289, llevada a cabo por la enzima E3 ligasa (NEDD4-1), facilitan la translocación de PTEN al núcleo [99]. Por otra parte, la sobreexpresión de NEDD4-1 poliubiquitina PTEN y favorece su degradación por el proteosoma [99, 100]. La poliubiquitinación de PTEN en Lys66 también regula su expresión y la estabilidad promoviendo su degradación a través del proteosoma [101]. 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 el reclutamiento de PTEN a la membrana plasmática y su dimerización, inhibiendo así la supresión tumoral [102]. WWP2 (*WW Domain-containing ubiquitin E3 protein ligase 2*), CHIP (*Carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein*) y XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) son ubiquitin ligasas que también contribuyen a la ubiquitinación y degradación de PTEN [103-105].

Regulación por oxidación

Las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) regulan la actividad fosfatasa de PTEN al oxidar residuos de Cys (Cys124 y Cys71), lo que causa la inactivación reversible de la enzima, uno de los principales mecanismos que controlan la actividad fisiológica de PTEN [106-108]. Se han descrito varias proteínas reguladoras del estado redox intracelular, como la peroxirredoxina 1 (PRDX1), TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*), hidroperóxido de cumeno (CuHP) o la enzima glutatión peroxidasa (GPX) [109-112], capaces de contrarrestar la oxidación de PTEN.

Regulación por S-nitrosilación

El óxido nítrico (NO) desencadena la S-nitrosilación de PTEN en residuos de Cys. La S-nitrosilación del residuo Cys83 de PTEN da lugar a la supresión de la actividad fosfatasa de PTEN y promueve la señalización a través de Akt. Dependiendo de la concentración de NO se regula la señalización de Akt; a concentraciones bajas de NO se activa Akt y viceversa [113]. Por otro lado, la oxidación de PTEN a través de ROS da lugar a la formación de un puente disulfuro, mientras que la oxidación de PTEN por NO

parece formar un puente disulfuro mixto con cisteínas o con glutatión (GSH) [114]. Además, la regulación mediada por NO podría explicar la pérdida de actividad de PTEN observada en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer (AD) [115]. DJ-1 es una proteína protectora frente a la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. Dicha proteína parece regular la señalización de PI3K a través de la nitrosilación de la Cys106 de PTEN, inhibiendo la actividad fosfatasa [116].

Regulación por acetilación

La acetilación de PTEN se produce en respuesta a la estimulación de factores de crecimiento por la interacción entre la histona acetiltransferasa, PCAF, con lisinas (Lys125 y Lys128) de PTEN, inhibiendo su actividad [117]. Por otra parte, la inhibición de histonas deacetilasas (HDACs) producen la translocación de PTEN a la membrana a través de la acetilación de la Lys163, inhibiendo la proliferación, la migración y la invasión celular [118]. La Lys402 del motivo PDZ de PTEN también se acetila por CBP (*p300-CREB-binding protein*) aumentando su capacidad de interaccionar con otras proteínas con dominios PDZ como el dominio PDZ 2 de MAGI2 y DLG1 (PDZ2/MAGI2 y PDZ2/DLG1) [119, 120].

Regulación por SUMOilación.

La proteína de pequeño peso molecular (11kDa) SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*) regulan la actividad de PTEN. La proteína SUMO1 modifica covalentemente a PTEN en sus lisinas Lys254 y Lys266. La SUMOilación de PTEN en la Lys254 mejora la retención de PTEN en el núcleo y contribuye a reparar el DNA [121], mientras que la sumoilación en la Lys266 de PTEN promueve la unión de PTEN a la membrana plasmática, suprime la vía de señalización PI3K/Akt e inhibe la proliferación y el crecimiento del tumor [122].

La SUMOilación de PTEN, además, se ve incrementada por PIAS α , uno de los miembros de la familia de proteínas PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) con actividad ligasa SUMO E3, que regula positivamente el nivel de proteína PTEN, mejorando la estabilidad de la misma al reducir la ubiquitinación. Además, PIAS α inhibe la vía PI3K/Akt y detiene el ciclo celular [123]. Por otro lado, se ha observado que la infección por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) induce la SUMOilación de PTEN, pudiéndose considerar como un mecanismo para aumentar la respuesta antiviral celular [124].

1.6. Implicación de PTEN en enfermedades humanas.

1.6.1. Función de PTEN en enfermedades hereditarias: PHTS y ASD

El gen PTEN se encuentra mutado en la línea germinal de pacientes con síndromes de cáncer hereditario, caracterizados por trastornos en el desarrollo, deficiencias neurológicas, desarrollo de hamartomas múltiples, y por mayor predisposición a desarrollar cáncer de mama, tiroides y endometrio, entre otros. Desde el punto de vista del diagnóstico genético, estos síndromes se agrupan con la denominación de síndrome hamartoma tumoral de PTEN (*PTEN hamartoma tumor syndrome*, PHTS, OMIM *601728) [9, 125-129]. También se encuentran mutaciones en la línea germinal de PTEN en individuos con macrocefalia, retardo en el desarrollo y desordenes del espectro autista (*PTEN Autism Spectrum Disorder*, PTEN-ASD, OMIM #605309) [130-133].

Síndrome hamartoma tumoral de PTEN (PHTS)

Las manifestaciones clínicas de PHTS son heterogéneas, e incluyen, principalmente, el síndrome de Cowden (CS), síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS), la enfermedad de Lhermitte-Duclos (LD) y síndromes similares a Proteus (todos agrupados en OMIM #158350). La mayoría de estos síndromes siguen un patrón de herencia autosómica dominante.

- **Síndrome de Cowden (CS)**

El síndrome Cowden (CS) [134] es una enfermedad rara caracterizada por la presencia de múltiples hamartomas en diversos tejidos, comúnmente en la piel y en el tracto gastrointestinal (GI), y con una mayor predisposición al cáncer [135]. Los pólipos gastrointestinales en CS ocurren en el 60-90% de los pacientes, aunque estos, normalmente son asintomáticos. A pesar de que los hamartomas en la piel y en el GI son muy comunes en pacientes con CS, no hay evidencias de que estos pacientes posean un mayor riesgo de desarrollar tumores malignos en la piel o GI [126]. Por otro lado, los lipomas, fibromas, anomalías vasculares y la macrocefalia también son características de pacientes con CS [136]. El 85% de los casos de pacientes con CS están causados por mutaciones germinales en el gen *PTEN*, y aproximadamente un 40-60% de los casos se estima que es de origen familiar [137].

- **Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS)**

El síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS) es un desorden congénito caracterizado por macrocefalia en combinación con pólipos intestinales hamartomatosos, malformaciones vasculares, lipomas, hemangiomas y lentiginosis genital [138]. A pesar de que no existen unas reglas específicas para identificar BRRS, se pueden emplear varios criterios basados en la presencia o ausencia de macrocefalia, en características dermatológicas, malformaciones vasculares y/o poliposis gastrointestinal para diagnosticar este síndrome [139]. El síndrome BRRS se estima que posee una mayor predominancia en las mujeres y con una penetrancia más temprana, en relación a la edad, en comparación a pacientes con CS.

- **Enfermedad Lhermitte-Duclos (LD)**

La enfermedad Lhermitte-Duclos (LD) es un trastorno raro caracterizado por el crecimiento anómalo del cerebelo y está considerada una variante fenotípica del CS [140, 141]. Un estudio realizado por Zhou y sus colaboradores sugiere que LD asociado con mutaciones en PTEN en la línea germinal se manifiesta principalmente en adultos, ya que no encontraron mutaciones en PTEN en pacientes pediátricos con LD [142].

- **Síndrome similares a Proteus (*PS-like*)**

El síndrome Proteus (PS) un trastorno complejo de sobrecrecimiento hamartomatoso muy poco frecuente (solo existen 120 casos), que se caracteriza por un sobrecrecimiento progresivo a nivel de esqueleto, piel, grasa y sistema nervioso central [143, 144]. El síndrome similar a Proteus (*PS-like*) describe a aquellos pacientes que no cumplen los criterios diagnósticos para el síndrome de Proteus, pero que comparten una multitud de rasgos clínicos característicos de la enfermedad. Se han identificado mutaciones en el gen *PTEN* en un 50% de casos del síndrome similar a Proteus [145].

Desórdenes del espectro autista asociados a PTEN (PTEN-ASD)

Individuos con mutaciones en PTEN en la línea germinal manifiestan fenotipos relacionados con desórdenes neurológicos, tales como desórdenes del espectro autista (ASDs), retraso en el desarrollo (DD)/ retraso mental y macrocefalias [130, 131]. Los desórdenes del espectro autista son desórdenes complejos que se caracterizan por interacciones sociales anormales, déficits en la comunicación, comportamientos repetitivos y, problemas cognitivos con limitaciones a la hora de imaginar y entender las emociones y las intenciones de los demás [146]. Estudios familiares y de gemelos sugieren que los factores genéticos desempeñan un papel importante en la etiología del ASD. El riesgo de aparición de autismo en hermanos de niños con ASD es del 38% frente al 13.5% en aquellas familias que no tiene a un hijo afectado. Además, este riesgo se incrementa dependiendo del género del hijo afectado. Siendo la tasa de concordancia genética para gemelos dicigóticos femeninos de un 5.3% frente a un 50% en gemelos dicigóticos varones [147].

La macrocefalia observada en pacientes de ASD con mutaciones en la línea germinal de PTEN es más severa que en pacientes con ASD pero sin mutaciones en el gen PTEN, por lo que el perímetro de la cabeza es un fenotipo muy importante a tener en cuenta en pacientes con ASD [148].

La contribución genética al autismo es muy heterogénea. Se han propuesto varias redes biológicas como posibles mecanismos en ASD. A nivel molecular, se incluyen genes involucrados en la transcripción y traducción sináptica (FMR1, TSC1/2, PTEN, NF1 y CYF1P1); moléculas de adhesión a células neuronales (Familia de neurexinas y neuroliginas); proteínas de andamiaje en la sinapsis (Familia de genes SHANK); vía de ubiquitinación (PARK2 y TRIM33); genes relacionadas con el calcio o proteínas del canal iónico (CACNA1A, CACNA1H, KCNMA1, SCN1A y SCN2A); neurotransmisores (GRIN2, SLC6A3); y genes remodeladores de la cromatina (MECP2, CHD8 y BAF155); genes reguladores del crecimiento y la morfogénesis (HOX, PTEN y EIF4E), entre otros [149, 150].

1.6.2. Función de PTEN como regulador homeostático: relación con cáncer

PTEN es un supresor tumoral haploinsuficiente, es decir, un individuo con una sola copia del gen no es capaz de producir proteína suficiente para asegurar la función normal del gen, de tal manera que una reducción del 50% de los niveles de PTEN están asociados con una mayor aceleración de la progresión del cáncer [151].

El gen PTEN se encuentra mutado con relativa alta frecuencia en casi todos los cánceres humanos primarios: cáncer de endometrio (59%), glioblastoma (22%), melanoma (10%), colorrectal (5%) y mama (5%) (<http://cbioportal.org/>). Los tumores de endometrio y glioma son los tumores que presentan mayor porcentaje de mutaciones en PTEN, mientras que los tumores de próstata presentan una alta frecuencia de delección (Figura 9). Además, los niveles del mRNA de PTEN también se encuentran alterados en los distintos tipos de cáncer, siendo los cánceres de próstata, ovario y mama los que muestran una mayor disminución en el mRNA de PTEN [152].

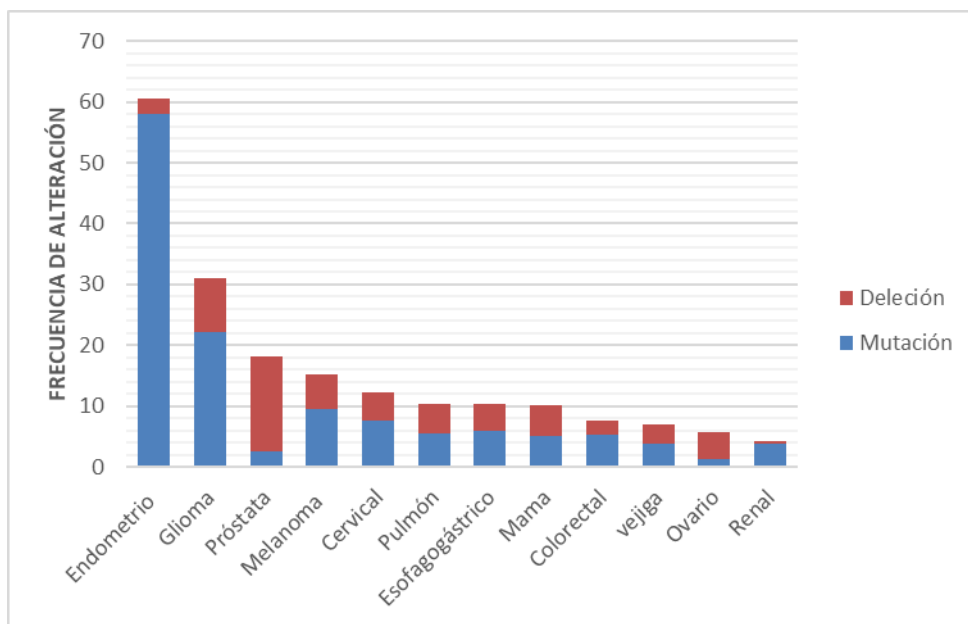


Figura 9. Frecuencia de mutaciones de PTEN en diferentes tipos de cánceres. Datos obtenidos de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) vía cBioPortal (<http://cbioportal.org/>). (Abril 2020).

El **carcinoma de endometrio** (*endometrial carcinoma*, EC) es el cáncer genital femenino más frecuente. Existen dos tipos de cáncer de endometrio según las manifestaciones clínico-patológicas; tumores de tipo I o endometrioides (EEC) y de tipo II o no endometrioides (NEEC). A nivel molecular, las alteraciones asociadas a cada tipo de tumor son diferentes. En el caso del EEC, las mutaciones más frecuentes son

mutaciones en el gen PTEN y en PI3K [153-155]. La inactivación de PTEN es el defecto genético más común en el EEC, con más del 80% debido a mutaciones somáticas [156]. Individuos con mutaciones en la línea germinal de PTEN tienen un 28% de probabilidad de desarrollar cáncer de endometrio, comparado con el 2.6% de la población general (Tabla 3) [157, 158].

El **glioblastoma** (GBM) es uno de los tumores cerebrales más frecuentes en el sistema nervioso central (SNC) (50-75%), y el 30% de los estudios han revelado un valor pronóstico positivo para la expresión del gen PTEN [152]. Se han detectado mutaciones en PTEN en un 15-40% de casos de GBM primarios [159]. La radiación ionizante y la quimioterapia son tratamientos estándares para pacientes con GBM, los cuales provocan daño en el DNA celular. Se ha identificado un mecanismo de resistencia a través de la fosforilación de la tirosina 240 de PTEN, lo que se promueve la reparación del DNA en respuesta a la radicación, prolongando la supervivencia de las células y la progresión del tumor [160].

El **cáncer de mama** es el cáncer más frecuente en mujeres, con más de un millón de casos nuevos diagnosticados cada año. El cáncer de mama es muy heterogéneo, con un importante papel en el desarrollo y progresión tumoral para la vía de señalización de PI3K. A pesar de que es raro encontrar mutaciones somáticas de PTEN en pacientes con cáncer de mama, la expresión de la proteína se encuentra ausente con mucha frecuencia en tumores de mama [152]. La deficiencia de PTEN representa un potencial factor de pronóstico para la resistencia a Trastuzumab (anti-HER2). Además, una pérdida de PTEN puede afectar a la regulación del punto de control inmunitario, al inducir la sobreexpresión de PD-L1 [161]. Por otra parte, mujeres con CS poseen un riesgo de vida de desarrollar cáncer de mama del 25-50% [162], mientras que en mujeres con CS y con mutaciones en la línea germinal de PTEN, este porcentaje se eleva hasta un 85%, frente al 12% de la población general de desarrollar cáncer de mama [157, 158] (Tabla 3). Otros estudio reveló datos parecidos en los que mujeres con mutaciones en el gen PTEN tienen un 77% de riesgo de tener cáncer de mama a los 70 años [163]. No solo el cáncer de mama está asociado a mujeres, también existen hombres con cáncer de mama asociado a CS y con mutaciones en la línea germinal de PTEN [164].

El **cáncer de tiroides** es el tipo de tumor endocrino con mayor prevalencia. El cáncer de tiroides presenta una gran variabilidad fenotípica, tanto en su manifestación como en el tratamiento. El carcinoma folicular de tiroides (*Follicular Thyroid Carcinoma*, FTC) es el más frecuente (90%) de los cánceres de tiroides diagnosticados. A nivel molecular, la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR juega un papel muy importante en este tipo de cáncer. Además de ser activada por mutaciones en el oncogén Ras, también se han descrito mutaciones activadoras en PIK3CA que afectan al 12-34% de tumores diferenciados [165]. PTEN también es objeto de mutaciones y deleciones en carcinomas foliculares. El carcinoma de tiroides folicular es frecuente en pacientes PHTS (75% de prevalencia) [166]. Mutaciones germinales de PTEN se han encontrado en el 38% de pacientes con cáncer de tiroides comparado con el 1% de pacientes sin este tipo de cáncer (Tabla 3) [158, 167].

El **cáncer de próstata** (PCa) es el tumor maligno diagnosticado con mayor frecuencia en la población masculina y es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, por detrás del cáncer de pulmón. A nivel molecular, la mayoría de los genes implicados en este tipo de cáncer están relacionados con el ciclo celular, respuesta al daño en el DNA y las vías de traducción de señales Ras/MAPK y PI3K/Akt. La inactivación de PTEN es una de las alteraciones más observadas en este tipo de cáncer, con un 50-80% de tumores de próstata que muestran una pérdida de PTEN (Figura 9) y un 10% con mutaciones puntuales en el gen PTEN [168, 169]. La pérdida de PTEN también se correlaciona con mayores niveles de inestabilidad cromosómica y un aumento de la aneuploidía en el cáncer de próstata [170].

Por otro lado, los individuos con PHTS poseen mayor riesgo de tener otros tipos de cánceres a los arriba mencionados, comparándolos con la población general, como el cáncer renal (34% vs. 1.6%), cáncer de colon (17% vs. 5%) y melanomas (6% vs. 2%) (Tabla 3) [157, 158]. Varios estudios han relacionado la pérdida de PTEN como un factor pronóstico para una peor supervivencia general en pacientes con cáncer renal debido a la agresividad del tumor [170]. Mutaciones en genes supresores tumorales corriente abajo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como BRAF, KRAS, PI3K y PTEN están asociadas con cáncer colorrectal. Más del 90% de pacientes con mutaciones en PTEN tienen pólipos colorrectales, entre los que se incluyen pólipos hamartomatosos, ganglioneuromas, pólipos juveniles y pólipos adenomatosos [171].

Además, existen estudios en los que se ha visto la existencia de melanomas en pacientes de CS [157]. La alteración del gen PTEN no se encuentra entre los eventos mutacionales más frecuentes en melanoma (10%); sin embargo, la pérdida de PTEN coexiste con mutaciones de BRAF en un 44% de pacientes [170].

Tabla 3. Incidencia de cáncer de la población en general y de pacientes con PHTS (en porcentaje)[158].

Tipo de cáncer	PHTS (%)	Población (%)
Mama	85	12
Tiroides	38	1
Renal	34	1,6
Endometrio	28	2,6
Colon	17	5
Melanoma	6	2

1.6.3. Función de PTEN en el Sistema Nervioso Central (SNC): relación con ASD

La actividad de los circuitos neuronales es la base neurobiológica de la conducta y la actividad mental (emociones, memoria y pensamientos). Los procesos de diferenciación de las células neurales y la formación de circuitos por contactos sinápticos entre neuronas (sinaptogénesis) ocurren en el sistema nervioso central (SNC) durante las últimas fases del desarrollo prenatal y los primeros meses después del nacimiento. Los pacientes con ASD manifiestan anomalías en la formación de circuitos y contactos sinápticos en regiones cerebrales implicadas en la conducta social, especialmente en la corteza cerebral prefrontal. Estas anomalías pueden ser causadas por mutaciones en genes involucrados en la formación de sinapsis y plasticidad sináptica, la regulación de la morfología de las espinas dendríticas, la organización del citoesqueleto y el control del equilibrio excitador e inhibitorio en la sinapsis [172].

PTEN está presente en la mayoría de las neuritas durante el crecimiento temprano de las mismas, y en los axones y dendritas en las neuronas maduras, por lo que también participa en la plasticidad sináptica en el cerebro adulto [173]. Además, PTEN se encuentra altamente expresado en las neuronas dopaminérgicas y

GABAérgicas [174, 175], así como en la glía [176], en donde regula la proliferación y la conectividad [177]. Una desregulación de PTEN afecta a funciones importantes de las neuronas del SNC, lo que se manifiesta con defectos en la neurogénesis, crecimiento de neuritas, sinaptogénesis y plasticidad sináptica [57, 178]. Dado el importante papel de PTEN en el desarrollo neuronal, no es sorprendente que las mutaciones en dicho gen estén asociadas con síndromes clínicos que cursan con trastornos neurológicos y cognitivos, como ASD [179]. Muchos de estos trastornos asociados con mutaciones patológicas de PTEN van acompañados de sobrecrecimiento celular, cuya manifestación más detectable en los pacientes es la macrocefalia [148]. En humanos y modelos en animales, la pérdida de función de PTEN conduce a un crecimiento cerebral excesivo e hiperconectividad, que probablemente sea responsable de la mayoría de las disfunciones cognitivas asociadas con esta afección [178].

Durante el desarrollo neuronal, PTEN se encuentra enriquecido en los axones y dendritas (Figura 10A), y una pequeña cantidad de PTEN se encuentra presente en el citosol, en la cabeza de las espinas y en la membrana plasmática alejada de la densidad post-sináptica (PSD). Sin embargo, en respuesta a la activación de los receptores de NMDA (NMDAR) durante los procesos de depresión a largo plazo (LTD), PTEN se recluta en la membrana post-sináptica de las espinas dendríticas a través de la molécula de andamiaje post-sináptica PSD-95 [175]. La presencia de PTEN en la membrana plasmática regula negativamente los niveles intracelulares de PIP₃ lo que facilita la endocitosis de los receptores AMPA (AMPA) y la eliminación de la sinapsis para la depresión sináptica [175], mientras que la activación de PI3K favorece la formación del PIP₃ requerido para la acumulación del AMPAR en las sinapsis [180]. En resumen, el reclutamiento de PTEN a la membrana post-sináptica durante la inducción de LTD se asocia con la regulación negativa de la señalización de PIP₃, mientras que la inducción de los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) se acompaña con la activación de esta vía [181] (Figura 10B).

Se han realizado estudios en los que se ha destacado la importancia de PTEN en el núcleo de las neuronas, particularmente en el contexto de la supervivencia neuronal (Figura 10C). Se ha observado que PTEN se transloca al núcleo durante la isquemia, el daño cerebral traumático (TBI) y la neurodegeneración [57]. La inhibición farmacológica de PTEN protege a las neuronas de la apoptosis, además de promover el

crecimiento y la regeneración axonal a través de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Estos resultados pueden proporcionar una nueva estrategia potencial para el tratamiento de la lesión de la medula espinal a través de la inhibición de PTEN [61, 182].

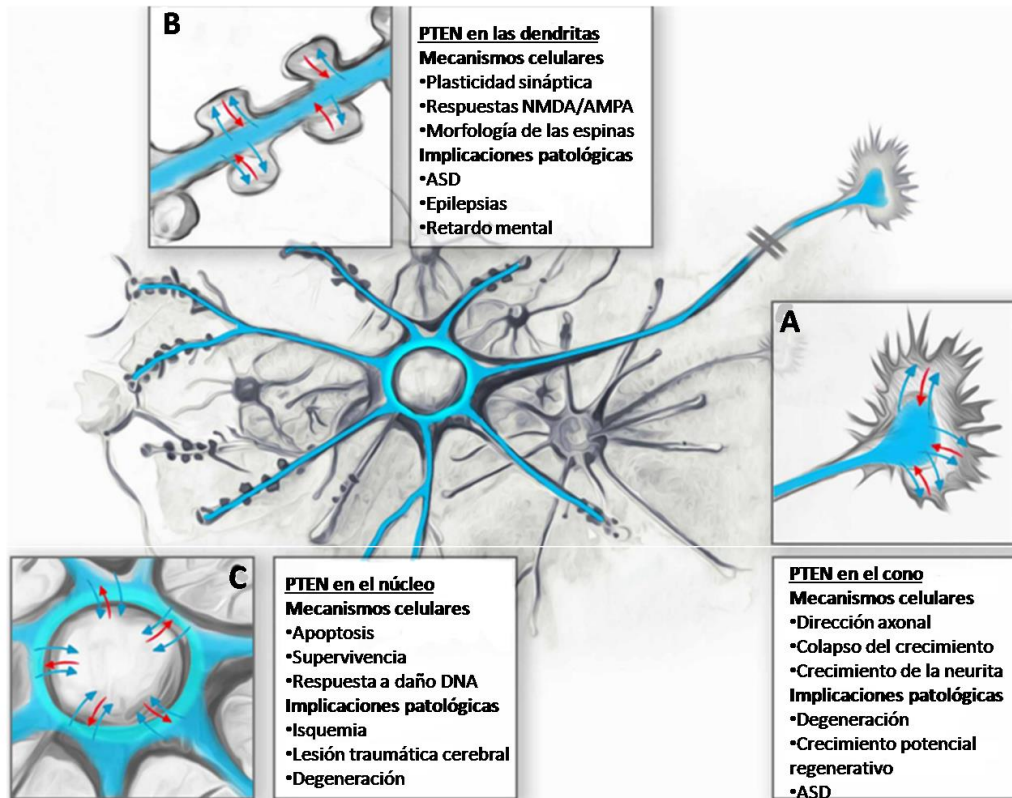


Figura 10: Ilustración esquemática de la distribución de PTEN en diferentes compartimentos neuronales. Mecanismos celulares y las implicaciones patológicas de PTEN en el crecimiento del cono (A), en las dendritas (B) y en el núcleo (C). Modificado de [57].

En el contexto de moléculas directamente reguladas por Akt en las neuronas, merece destacarse, por su implicación en la plasticidad neuronal, la enzima glucógeno quinasa sintasa 3 (GSK3) que controla la polaridad neuronal regulando proteínas de unión a microtúbulos, como Tau, CRMP2 y MAP1B [183, 184] (Figura 11). Otro componente molecular destacable es el complejo TSC1/TSC2. Akt inhibe directamente el complejo TSC1/TSC2, liberando el efecto inhibitorio sobre el complejo mTORC1 (Figura 11) [65]. En humanos, la pérdida de los genes TSC1 o TSC2 da lugar al desarrollo de la esclerosis tuberosa (TSC), en donde los pacientes sufren retraso mental, convulsiones, y autismo (25-50%) [185]. Una alteración en la función del complejo TSC1/TSC2 mimetiza los efectos celulares de la pérdida de PTEN, ya que la falta de

actividad TSC1 o TSC2 en las neuronas promueve la malformación axonal y la pérdida de la polaridad neuronal [186].

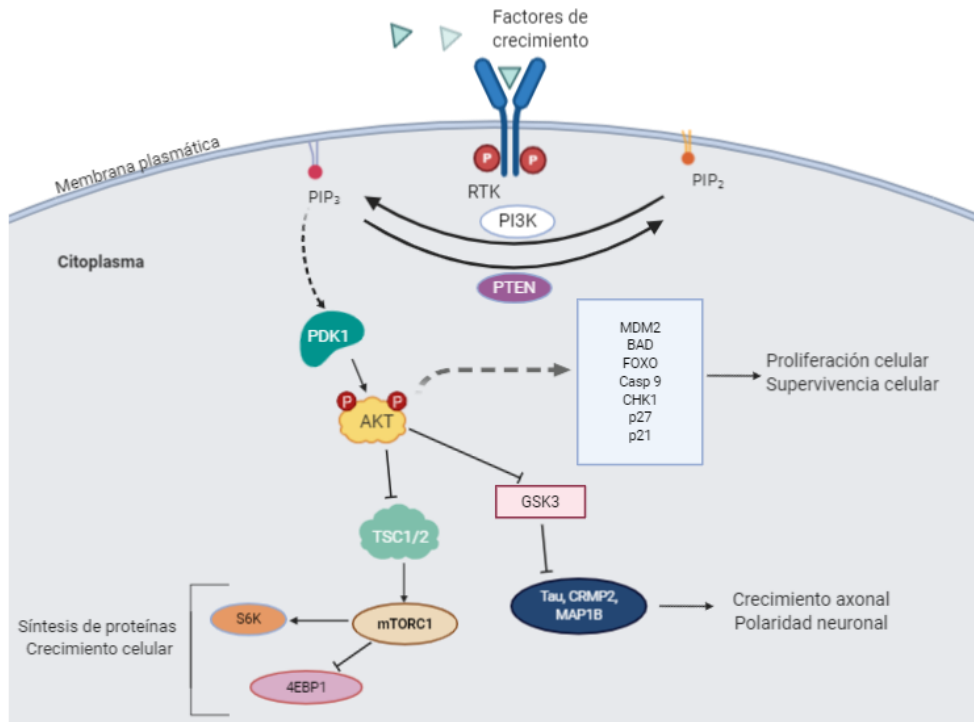


Figura 11. Vía de señalización PI3K/PTEN/Akt implicada en componentes del SNC. La inactivación de PTEN da lugar a la sobreactivación de Akt, afectando a múltiples procesos celulares en las neuronas (crecimiento, migración y supervivencia celular). Tanto GSK3 como el complejo TSC1/2 influyen en el crecimiento y la polaridad neuronal.

Existen evidencias que respaldan a los factores genéticos como causa predominante de ASD, y el gen PTEN se encuentra mutado en un subconjunto de pacientes con ASD y macrocefalia [173, 187]. El primer estudio realizado por Butler y sus colaboradores encontraron que aproximadamente un 20% de individuos con ASD y macrocefalia tenían mutaciones en la línea germinal de PTEN [130]. Existen varios estudios de modelos de ratones modificados genéticamente, los cuales presentan una pérdida o disfunción en el gen PTEN, que confirman el papel de PTEN en ASD y vinculan los cambios en la función neuronal con anomalías de comportamiento similares al autismo, como una disminución de la sociabilidad, conductas repetitivas y ansiedad [132, 188, 189]. Los ratones con deficiencia de PTEN desarrollaron neuronas más grandes con proyecciones axonales más abundantes y ectópicas, más vesículas pre-sinápticas y espinas dendríticas y densidades post-sinápticas más grandes [190-192]. El modelo KI (*knock-in*) de ratón *Pten*^{m3m4} ha sido estudiado en detalle como modelo establecido de ASD. Este modelo de ratón presenta déficits en la coordinación

motora, pero tanto su aprendizaje motor y espacial como su memoria de reconocimiento espacial y social permanecen intactos [193]. Estudios previos sobre el fenotipo $Pten^{m3m4}$ han demostrado que la mielinización, la maduración y la diferenciación de los oligodendritos son anómalas, y que estas células poseen una señal dopaminérgica elevada [194, 195]. Un estudio reciente ha demostrado que $Pten^{m3m4}$ disminuye la localización nuclear y la expresión de PTEN en las células progenitoras neuronales (NSC), las cuales poseen una mayor proliferación [196].

1.7. Mutaciones en PTEN asociadas a enfermedades

Las alteraciones en la expresión y función del gen PTEN en asociación con enfermedades humanas incluyen mutaciones de la línea germinal, mutaciones somáticas, deleción parcial o total del gen, silenciamiento epigenético y alteraciones en la regulación post-transcripcional.

1.7.1. Mutaciones somáticas

Las mutaciones de PTEN presentes en tumores se encuentran a lo largo de todo el gen (Figura 12), e incluyen sustituciones con cambio de aminoácido (*missense*), mutaciones sin sentido (*nonsense*; introducen un codón de terminación prematura, PTC), sustituciones sinónimas, inserciones y deleciones (Figura 13), siendo las mutaciones *missense* y *nonsense* las predominantes (55% del total) (Figura 13) [197].

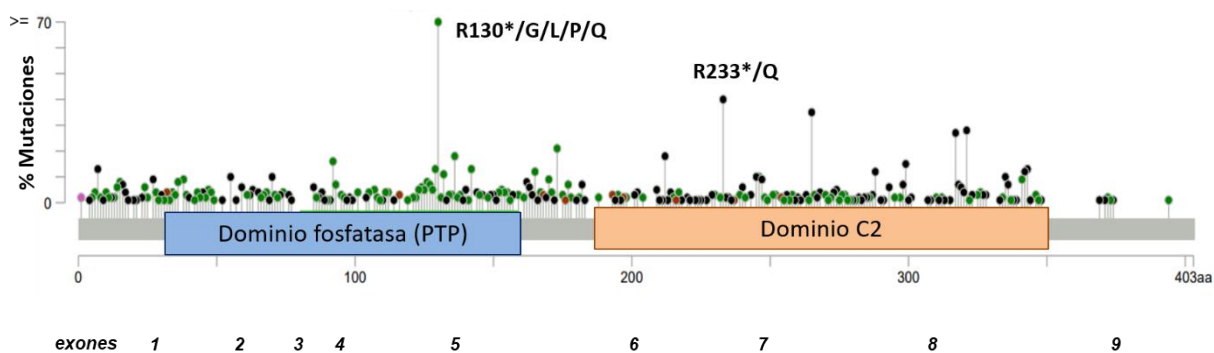


Figura 12. Distribución de la frecuencia de mutaciones de PTEN en tumores. Los puntos verdes representan mutaciones *missense*. Los puntos marrones representan mutaciones con un cambio en el marco de lectura. Los puntos negros representan mutaciones *nonsense* que causan codones de terminación prematura (PTCs). Los puntos morados son residuos con otras alteraciones. Datos obtenidos de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) vía cBioPortal (<http://cbioportal.org/>). En la parte de abajo se muestran las regiones codificadas por los diferentes exones de PTEN (Abril2020).

Mutaciones somáticas de PTEN

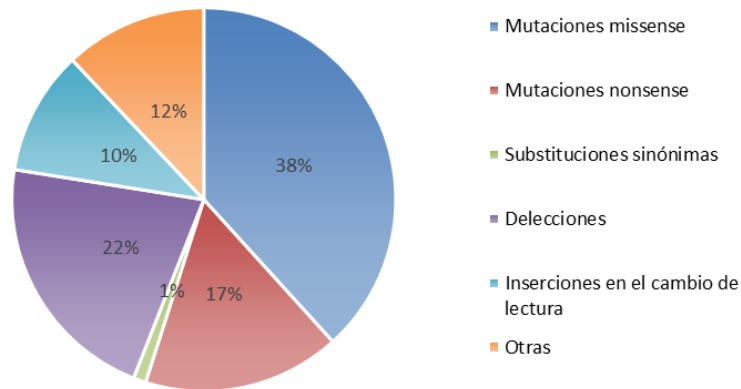


Figura 13. Porcentaje del número total de mutaciones somáticas en el gen PTEN. Datos generados a partir de la base de datos COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) (Abril 2020).

Toda la secuencia codificante del gen PTEN se ve afectada por mutaciones genéticas, sugiriendo que cada región estructural es importante para la función supresora tumoral de PTEN. No obstante, la región C-terminal es diana de mutaciones con baja frecuencia (Figura 14). Existen puntos calientes en el dominio catalítico y C2 de PTEN donde se acumulan un mayor número de mutaciones (Figura 12). El exón 5, que codifica el *loop* catalítico esencial de la enzima (aminoácidos 121-131), es uno de los puntos calientes donde se acumulan más mutaciones somáticas, aunque el alto número de mutaciones que afectan al codón 130 es debido, en parte, a transiciones de alta mutabilidad de CpG a TpG [198].

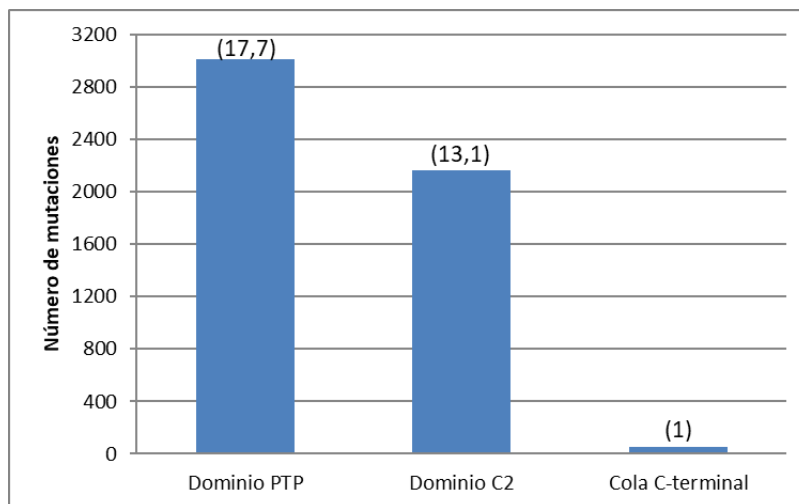


Figura 14. Distribución del número de mutaciones somáticas en muestras de tumores humanos en el gen PTEN. El número entre paréntesis encima de cada barra indica la media del número de mutaciones por aminoácido en cada dominio. Modificado de [6] (COSMIC, Febrero 2020).

El cáncer de endometrio es el tipo de cáncer con más porcentaje de mutaciones de PTEN (Figura 9 y 17). El residuo Arg130 (R130) está altamente mutado en este tipo de cánceres, probablemente debido a efectos hormonales (Figura 15A) [199, 200]. En glioblastomas, mutaciones en la posición R173 y R233 son altamente frecuentes, mientras que, en cáncer de mama, además de la R130, la T319 muestra una relativa alta frecuencia de mutación (Figura 15B, 15D). En el cáncer de próstata predominan las deleciones (Figura 9); sin embargo, entre las mutaciones más frecuentes se encuentran mutaciones en los residuos R130, R233, K267 y T319 (Figura 15C). En melanoma, la mutación P38S, representa alrededor del 10% de todas las mutaciones con cambio de aminoácido (Figura 15E) [201].

El cáncer de tiroides a pesar de ser muy predominante en pacientes con PHTS (38% de incidencia, Tabla 3), presenta muy pocas mutaciones.

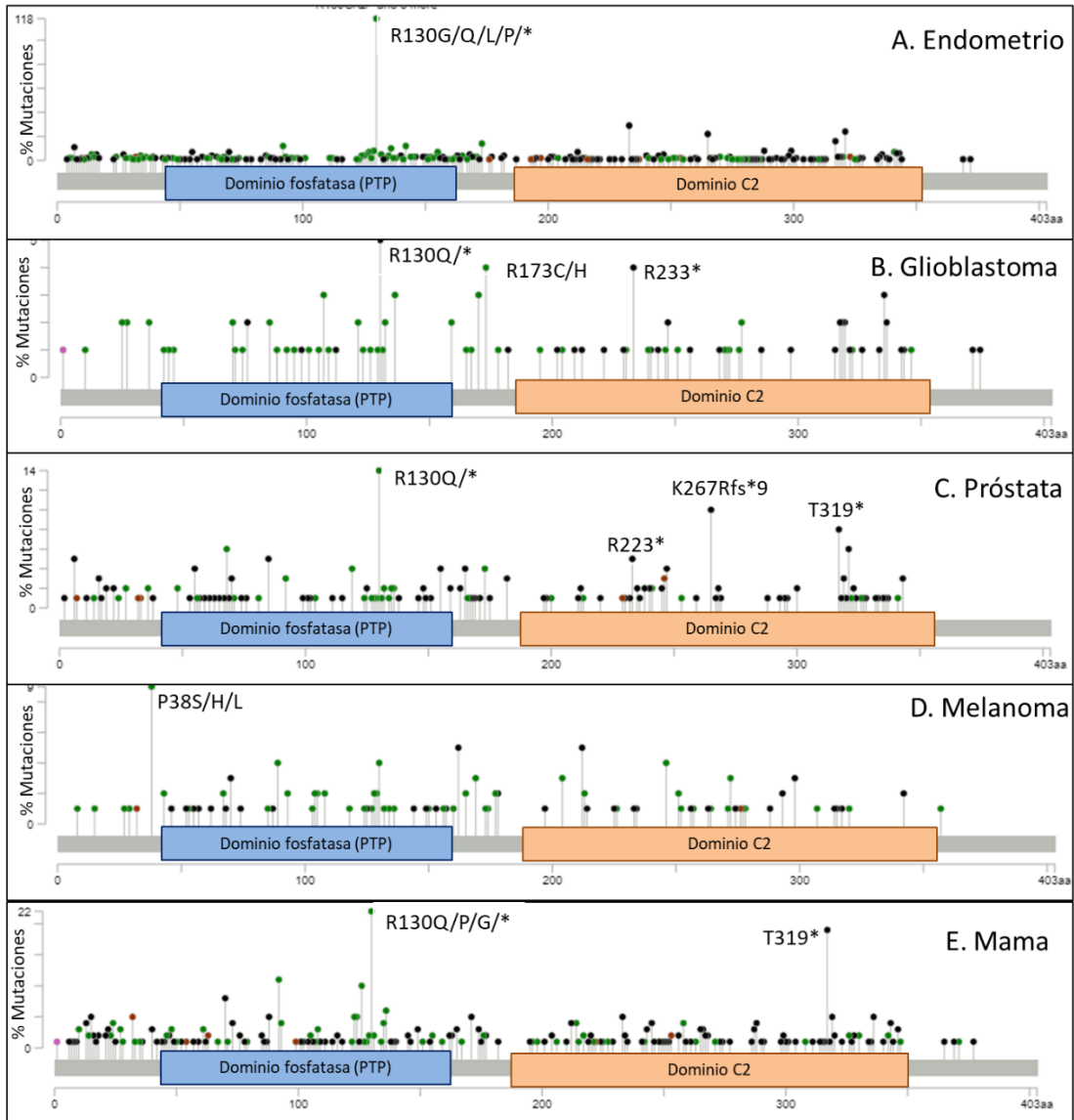


Figura 15. Distribución del porcentaje de mutaciones de PTEN en diferentes tipos de cánceres. Se muestra la distribución de las mutaciones en: A. cáncer de endometrio, B. Glioblastoma, C. cáncer de próstata, D. melanoma y, E. cáncer de mama. Los puntos verdes representan mutaciones *missense*. Los puntos marrones representan mutaciones con un cambio en el marco de lectura. Los puntos negros representan mutaciones *nonsense*. Los puntos morados son residuos con otras alteraciones. Datos obtenidos de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) vía cBioPortal (<http://cbioportal.org/>). (Abril2020).

1.7.2. Mutaciones germinales

Las mutaciones germinales que predominan en el gen PTEN son mutaciones *missense* y *nonsense*, representando un 44% de todas las mutaciones de PTEN (Figura 16).

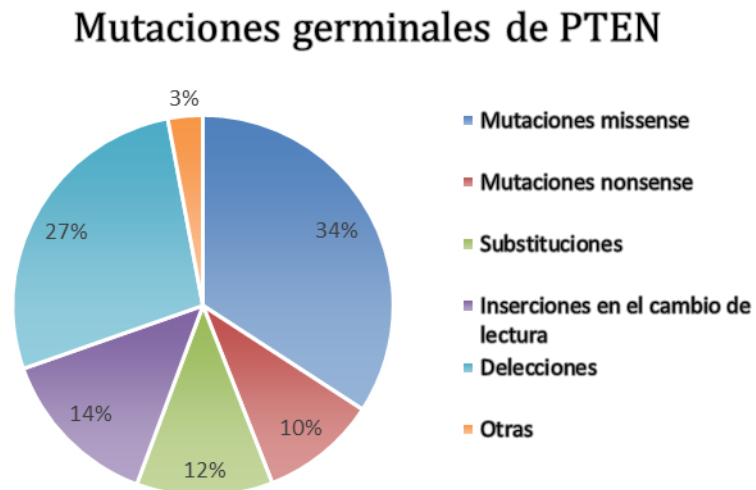


Figura 16. Porcentaje de la distribución de las mutaciones germinales del gen PTEN. Datos procedentes de la base de datos *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (Agosto 2020).

Dentro de las mutaciones *missense* y *nonsense* se observa que casi la mitad de todas ellas están asociadas a CS, seguido de cáncer de mama, otros tipos de cánceres, PHTS, macrocefalia y autismo (Figura 17).

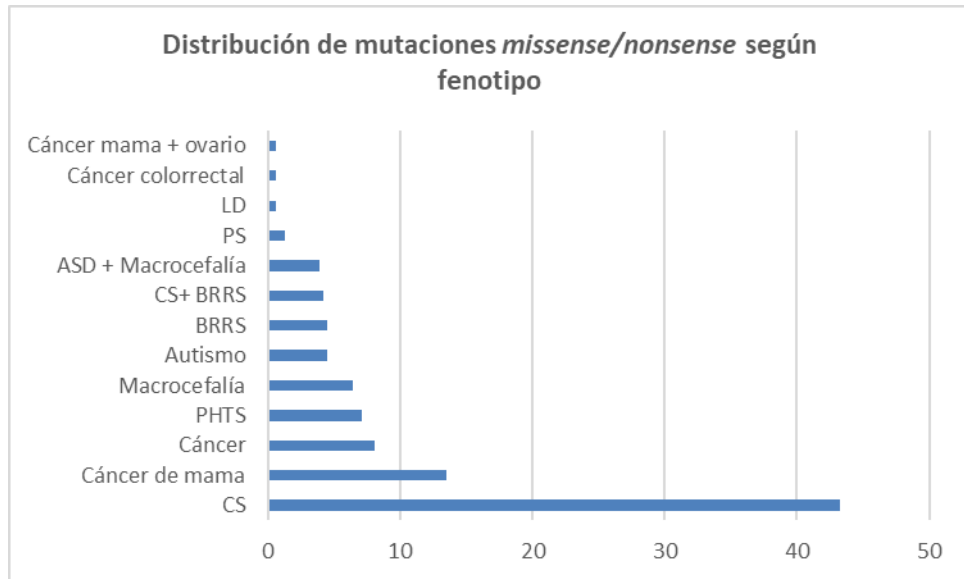


Figura 17. Distribución de mutaciones *missense* y *nonsense* según su fenotipo. Síndrome de Cowden (CS), Síndrome hamartoma tumoral de PTEN (PHTS), Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS), Síndrome del espectro autista (ASD), Síndromes similares a Proteus (PS), enfermedad de Lhermitte-Duclos (LD). Datos procedentes de la base de datos Human Gene Mutation Database (HGMD, Abril 2020).

La prevalencia de mutaciones germinales de PTEN en los síndromes PHTS es variable; familias con CS tienen un 85% de prevalencia [202, 203], individuos con BRRS presentan un 65% [137, 202], pacientes con diagnóstico clínico de PS presentan entre un 7-20% de predominio, y entre un 50-67% de pacientes con el síndrome similar a Proteus tienen mutaciones en la línea germinal de PTEN [8, 129, 145]. A pesar de que todos estos síndromes son heredados de forma autosómica dominante, las mutaciones *de novo* en PTEN ocurren entre un 10-40% de pacientes PHTS [204]. Algunas de las mutaciones de la línea germinal de PHTS también se han identificado en pacientes con ASD y macrocefalia, y en la mayoría de los casos (>80 %) dichas mutaciones son *de novo* [205].

1.7.3. Mutaciones PTC

Alrededor de un tercio de las enfermedades genéticas hereditarias están causadas por mutaciones *nonsense* que generan codones de terminación prematura (PTCs, *premature termination codons*), los cuales producen en la mayoría de los casos proteínas inestables y no funcionales [206]. Por su parte, los genes supresores tumorales son una diana frecuente de PTC. Por ejemplo, los genes p53, APC (*Adenomatous polyposis coli*) y PTEN, muestran un 10%, 30% y 17% de mutaciones somáticas *nonsense* asociadas a tumores, respectivamente [207, 208]. En el caso de PTEN, las mutaciones que introducen PTC son frecuentes, tanto en tumores como en pacientes PHTS, en los dominios PTP y C2 (Figura 18), por lo que las estrategias terapéuticas basadas en la reconstitución de la expresión de PTEN en pacientes afectados por estas mutaciones tienen especial relevancia.

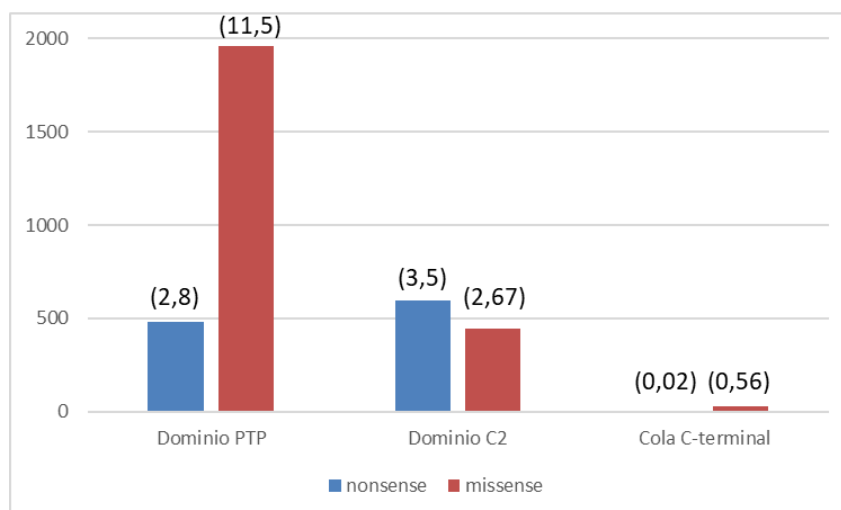


Figura 18. Distribución del número de mutaciones *nonsense* y *missense* en muestras de tumores humanos en el gen PTEN. El número entre paréntesis encima de cada barra indica la media del número de mutaciones por aminoácido en cada dominio. Modificado de [6] (COSMIC, Julio 2020).

2. Lectura a través (*readthrough*, RT) como aproximación terapéutica en enfermedades causadas por PTCs.

Las mutaciones *nonsense* que generan PTCs son frecuentes en enfermedades genéticas tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD, *Duchenne muscular dystrophy*) (10-20% de los pacientes) [209] y la fibrosis quística (CF, *Cystic fibrosis*) (2-5% de los pacientes) [210]. Por ello, se han propuesto intervenciones clínicas en pacientes con este tipo de mutaciones para restaurar la biosíntesis de las proteínas afectadas, entre las que destaca la “lectura a través” traduccional (*readthrough*, RT). El *readthrough* traduccional consiste en la incorporación de un aminoácido en la posición correspondiente a un PTC, facilitada por compuestos que se unen al ribosoma y disminuyen la fidelidad de la terminación de la traducción [211-214]. El primer estudio en el que se demostró la eficacia de compuestos inductores de *readthrough* (antibióticos aminoglucósidos) fue en un modelo de fibrosis quística [210, 215]. Posteriormente, se han descrito inductores de *readthrough* no-aminoglucósidos con menor toxicidad y aplicación potencial en otras enfermedades [207, 216-220].

2.1. Mecanismo de acción

En las células eucariotas, la biosíntesis de proteínas consiste en dos procesos compartimentados: transcripción génica y procesamiento del mRNA en el núcleo y traducción del mRNA maduro en el citoplasma. En el citoplasma, el proceso de traducción del mRNA se describe en tres fases: iniciación, elongación y terminación (Figura 19). La fase de iniciación de la traducción comienza cuando la subunidad pequeña (40S) del ribosoma, junto con los factores de iniciación, se une al extremo 5' del mRNA y escanea el mismo hasta encontrar el primer codón de iniciación AUG (Metionina) en un contexto de secuencia apropiado [221, 222]. Durante la elongación, los tRNA incorporan aminoácidos en la cadena polipeptídica por complementariedad de bases. En condiciones normales, la terminación de la traducción ocurre cuando uno de los tres codones de parada (UAA, UGA o UAG) entra en el sitio A del ribosoma y los factores de liberación (*eukaryotic release factors*) facilitan la liberación de la cadena polipeptídica (Figura 19B; Figura 20A) [223, 224].

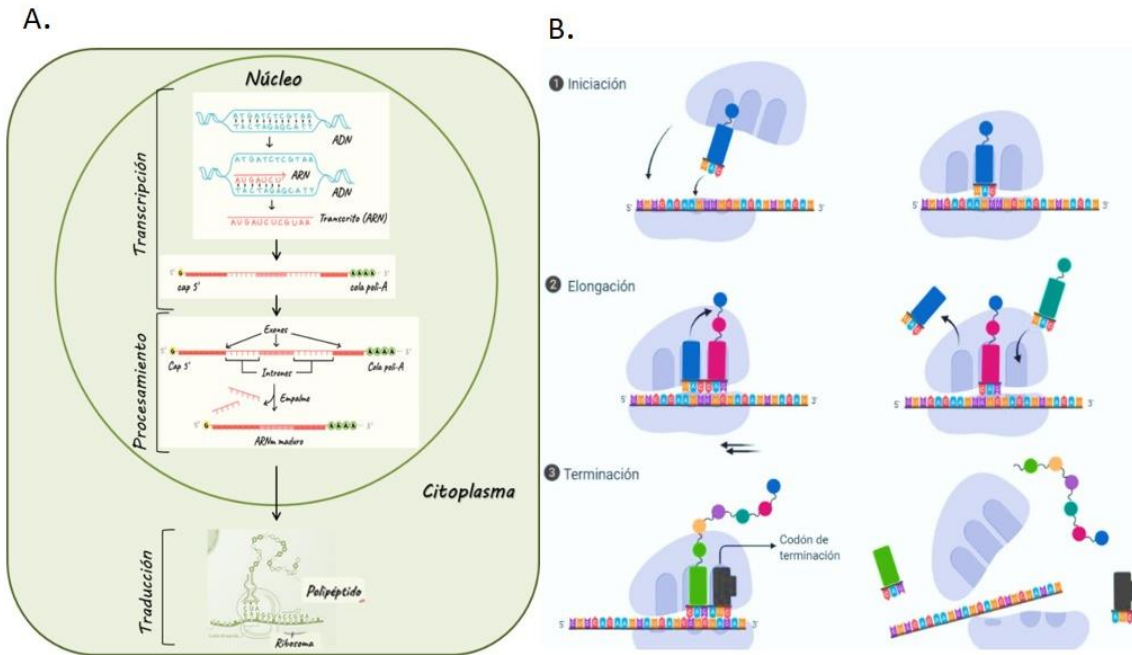


Figura 19. Representación esquemática del proceso de la biosíntesis de una proteína. A. El gen es transcrito y procesado a un mRNA maduro en el núcleo, y en el citoplasma es traducido a proteína. B. 1. El proceso de la traducción tiene lugar tras el reconocimiento del codón de iniciación en el extremo 5' del mRNA. 2. Durante la elongación, se van incorporando aminoácidos a la cadena polipeptídica. 3. La terminación de la traducción ocurre con el reconocimiento de un codón de terminación en el extremo 3' del mRNA.

En presencia de mutaciones *nonsense* que generen PTC en el mRNA, el ribosoma reconoce el PTC como si fuera un codón de parada canónico, liberando una cadena polipeptídica truncada (Figura 20B). Estudios de cristalografía han demostrado que los aminoglucósidos inductores de *readthrough* se unen al sitio A del ribosoma reduciendo la fidelidad del proceso de terminación de la traducción y permitiendo el *readthrough* del PTC (Figura 20C) [225].

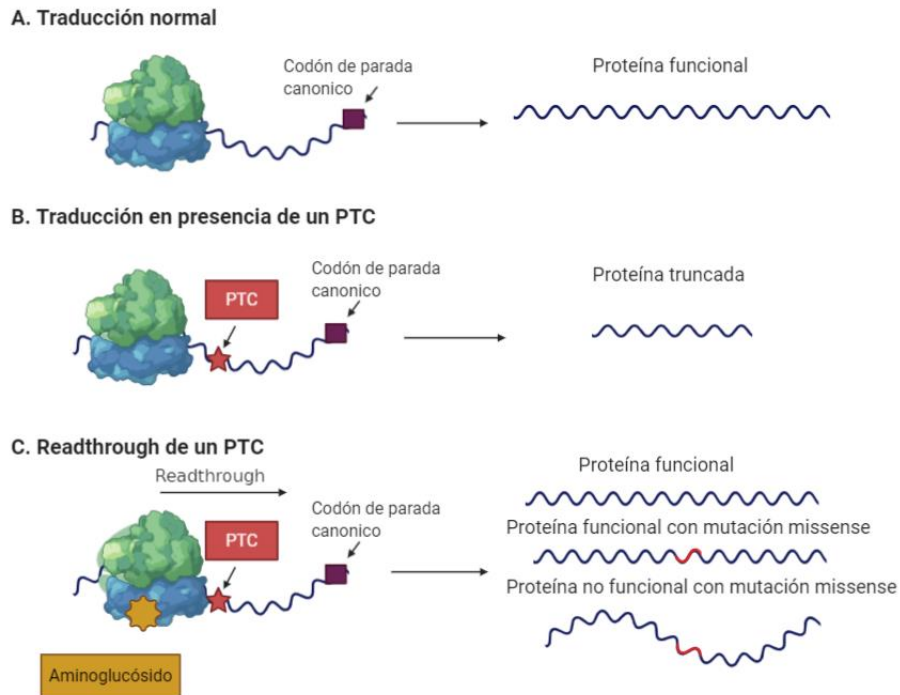


Figura 20. Representación esquemática del efecto del *readthrough* en la traducción de una proteína. **A.** Traducción normal de una proteína. **B.** En presencia de un PTC el ribosoma no es capaz de sintetizar la proteína entera, generándose una proteína truncada. **C.** En presencia de inductores de *readthrough*, el ribosoma es capaz de “leer a través” del PTC, generando una proteína entera. Nótese que el aminoácido incorporado en la posición del PTC no coincide necesariamente con el aminoácido silvestre, lo que puede producir proteínas enteras no funcionales.

El mRNA está sujeto a varios sistemas de vigilancia o controles de calidad, tanto en el núcleo como en el citoplasma [226]. Uno de los sistemas de vigilancia que tiene lugar en el citoplasma es el llamado *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), el cual es capaz de distinguir y degradar aquellos mRNAs que contienen PTCs para prevenir la síntesis de proteínas truncadas no funcionales [227]. Dependiendo de la posición en la que se encuentre el PTC, el mRNA es susceptible a la degradación por la vía NMD. En resumen, si un mRNA maduro presenta algún PTC a más de 50-55 nucleótidos corriente arriba de la última unión exón-exón, el ribosoma se detendrá en el PTC en la primera ronda de traducción y reclutará proteínas para la degradación del mRNA [228-230]. Los agentes inductores de *readthrough*, al mantener la traducción de proteínas a pesar de la presencia de un PTC, impiden el NMD y estabilizan el mRNA [231].

La frecuencia con la que se incorpora un aminoácido en el proceso de *readthrough* depende del PTC, ya que el ribosoma añade aminoácidos a partir de tRNAs con anticodones “parecidos” por complementariedad al PTC [232-234]. En síntesis, la frecuencia descrita de aminoácidos incorporados con el inductor de RT G418, en células de mamífero, es como sigue: UGA: 64% Arginina (R), 18% Cisteína (C) y 18% triptófano (W); UAG: 86% Glutamina (Q), 10% Tirosina (Y) y 2% Lisina (K); UAA: 52% Glutamina (Q) y 48% Tirosina (Y) [234].

2.2. Eficiencia del *Readthrough*

La eficiencia del *readthrough* no es igual para los tres codones de terminación. Experimentos en líneas celulares de mamífero han demostrado que el codón de parada UGA tiene el potencial de *readthrough* más alto y, por tanto, la fidelidad más baja, seguido del codón UAG y UAA (UGA>UAG>UAA) [213, 217, 235].

Estudios experimentales en varios organismos han demostrado que tanto el contexto de la secuencia corriente arriba como la secuencia corriente abajo del codón de parada también desempeña un papel esencial en la eficiencia de la terminación de la traducción. El nucleótido inmediatamente después del codón de parada (denominado +4 o la cuarta base) ejerce la mayor influencia en la fidelidad de la terminación [236], lo que sugiere que la señal de terminación de la traducción consiste en un tetranucleótido y no solo en el codón de parada en sí [237]. La presencia de cisteína (C) en la cuarta base se ha relacionado con mayores niveles de *readthrough*, tanto en presencia como en ausencia de aminoglucósidos inductores [238, 239] y el efecto de la cuarta base también se ve alterado en función del codón de parada [235, 240, 241].

Además, la secuencia corriente arriba del codón de parada (posiciones -1 a -3) también juega un papel importante en la eficiencia de la terminación de la traducción. Experimentos en levaduras [240], así como en células de mamífero [241, 242], han demostrado que una adenina en la posición -1 o -2 respecto al codón de parada estimula el *readthrough* modificando la estructura del mRNA en el sitio-P del ribosoma [242]. Por otra parte, la combinación de UGA-C con un uracilo en la posición -1 (U-

UGA-C) presenta el mayor potencial de *readthrough* estimulado por aminoglucósidos [243].

Se estima que el *readthrough* basal de los codones de terminación naturales se produce entre un 0.001-0.1% de todas las rondas de traducción. En el caso de los PTCs, se estima que los niveles de RT basal son más altos y pueden variar entre 0.01% al 0.1%. Los inductores de *readthrough* son más eficaces con los PTCs que con los codones de terminación naturales, por lo que incrementan la síntesis de la proteína entera sin afectar su correcta terminación [243, 244].

2.3. Tipos de inductores de *readthrough*

Los antibióticos aminoglucósidos son los compuestos más estudiados como inductores de *readthrough* de PTCs, con estudios que se remontan a la década de 1960, en donde se publicó el primer estudio mostrando el potencial de estos antibióticos en bacterias [245]. 25 años después, se demostró la eficacia inductora de *readthrough* de los aminoglucósidos en células de mamífero, donde la paromomicina y G418 podían restaurar casi el 20% de la actividad proteica [246]. Los aminoglucósidos son comúnmente usados para tratar infecciones bacterianas en la práctica clínica, y se han desarrollado y estudiado un gran número de compuestos sintéticos y naturales, que se pueden clasificar como aminoglucósidos y no aminoglucósidos (Tabla 4).

El potencial terapéutico de los aminoglucósidos como compuestos estimulantes de la lectura de un PTC ha sido testado en muchos modelos, desde sistemas de transcripción y traducción *in vitro* [235, 247], en líneas celulares [248-253], en células derivadas de pacientes [254], en modelos animales [250, 255-257] y en ensayos clínicos [258-260]. También existen moléculas que no son aminoglucósidos con capacidad de inducir *readthrough* en modelos animales y celulares. Estos compuestos son los antibióticos macrólidos (como la tilosina, espiramicina y josamicina) [261], la negamicina [255, 262], PTC124 (también conocido como Ataluren o Translarna) [220, 263-267], clitocina [268] y Amlexanox [269], entre otros.

Tabla 4: Tipos de inductores de *readthrough*

AMINOGLUCOSIDOS		NO AMINOGLUCOSIDOS	
Nombre	Referencia	Nombre	Referencia
Paromomicina	[246] [248]	Macrólidos	[261]
Gentamicina	[257] [243] [253]	PTC124	[234] [264] [263]
Geneticina (G418)	[235] [235, 251] [252]	Clitocina	[268]
Tobramicina	[247]		
Amikacina	[250] [247]		
Eritromicina	<i>Diop 2007</i>		
Kanamicina	[260]		

Se muestra los aminoglucósidos más importantes, así como la referencia en la que se usaron para hacer *readthrough* en células de mamífero.

Los aminoglucósidos presentan varios efectos adversos, tales como toxicidad renal y ótica y, con menor frecuencia, bloqueo neuromuscular [270, 271]. A pesar de ello, algunos estudios han demostrado que la administración de gentamicina a pacientes con DMD o con CF es relativamente segura y puede ser beneficiosa [258, 259]. En la actualidad, solo está aprobado el uso clínico de inductores de RT en el caso del PTC124 (en Europa, para pacientes con DMD) [272]. El uso de inductores de *readthrough* como agentes terapéuticos en el futuro requiere la identificación y caracterización de compuestos de alta eficacia y baja toxicidad, lo que constituye el área de investigación muy activa en los últimos años, que incluye estudios sobre la potencialidad de estos compuestos como nuevas terapias anti-cáncer.

OBJETIVOS

Los objetivos principales de la presente tesis doctoral son los siguientes:

- Optimizar el protocolo de mutagénesis dirigida para la creación del panel de mutaciones hereditarias del gen PTEN asociadas a pacientes con autismo y síndromes tumorales.
- Determinar el patrón de respuesta de *readthrough* del panel de mutaciones PTC identificadas en tumores humanos en el gen PTEN
- Establecer un conjunto de datos funcionales de las variantes de PTEN asociadas a ASD y PHTS
- Investigar el potencial de terapias basadas en la función de PTEN y PTEN-L

MATERIALES Y METODOS

1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1.1. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis realizada en este trabajo está basada en la optimización de la metodología del Kit comercial *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) para hacer mutagénesis dirigida sobre secuencias de DNA. En el procedimiento se utiliza un vector de doble cadena de DNA (dsDNA) con el inserto de interés y dos oligonucleótidos sintéticos solapantes, diseñados individualmente a partir de la secuencia de cDNA que se desea mutar. Las condiciones estándar que hemos optimizado para la mutagénesis de PTEN utilizan oligonucleótidos con una longitud de 29 bases, quedando el codón que contiene la mutación deseada en medio del oligonucleótido y flanqueado por el mismo número de nucleótidos (13+3+13) [273, 274].

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la DNA polimerasa termoestable *Pwo* (Tabla 5) (5 U/ μ L; Roche, Switzerland) con actividad correctora exonucleasa 3' \rightarrow 5'.

Tabla 5: Condiciones de la PCR para crear mutaciones sobre la secuencia del gen PTEN.

PCR			
Fases	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	95 °C	1 min
2	18	95 °C	50 seg
		60 °C	50 seg
		68 °C	5 (7*) min
3	1	68 °C	7 min

*Para la mutagénesis de PTEN-L, se aumentó en 2 minutos la fase de elongación.

El producto de PCR obtenido es tratado durante 2 horas a 37°C con 0.1 μ l DpnI (20 U/ μ l; New England Biolabs) (Figura xx), una endonucleasa específica (5'-Gm6 ATC-3') que digiere el DNA parental metilado, quedando así las cadenas no metiladas de DNA de nueva síntesis con la mutación deseada (Figura 21).

1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 6.

Tabla 6: Plásmidos utilizados en esta tesis doctoral.

Plásmido	Características	Fuente
pRK5	Vector de expresión en mamíferos.	<i>Pharmlinger</i>
pRK5 PTEN	Contiene el cDNA codificante de PTEN (secuencia humana, NM_000314; aminoácidos 1-403) clonado en el vector pRK5.	[21]
pRK5 PTEN-L	Contiene el cDNA codificante de PTEN-L (secuencia humana, NM_001304717; aminoácidos 1-576) clonado en el vector pRK5.	[275]
pYES2	Vector de expresión en levaduras. Contiene el promotor inducible por galactosa <i>GAL1</i> y el marcador auxotrófico <i>URA3</i> .	<i>Invitrogen</i>
pYES2 PTEN	Contiene el cDNA codificante de PTEN (aminoácidos 1-403) clonado en el vector pRK5.	[276]
pYES2 PTEN-L	Contiene el cDNA codificante de PTEN-L (aminoácidos 22-576) clonado en el vector pRK5.	[31]
YCpLG	Vector de expresión centromérico en levaduras. Contiene el promotor inducible por galactosa <i>GAL1</i> y el marcador auxotrófico <i>LEU2</i> .	L. Bardwell y J. Thorner (Univ. de California)[276]
YCpLG-p100α - CAAX	Contiene el cDNA codificante de la subunidad catalítica p110 α (secuencia bovina, NM_006218) fusionada en 3' con la secuencia de la señal de prenilación de RAS	[276]

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

2.1. TRANSFORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS

2.1.1. Cepa de bacteria y medios de crecimiento

Se utiliza medio líquido LB (Luria-Bertani) (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl) y placas de agar (1.5% agar y 0.01% NaOH) con/sin ampicilina como medio selectivo de crecimiento para la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. El fenotipo de dicha cepa es *F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk, mk+) phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -*.

2.1.2. Preparación de bacterias competentes con cloruro cálcico

Las células competentes de *E. coli* se han obtenido mediante el método de transformación de cloruro de calcio (CaCl_2). Se crece una colonia DH5 α en 5 ml de medio LB sin penicilina durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se incubó 1 ml del inóculo en 50 ml de medio LB hasta llegar a una densidad óptica ($D.O_{600\text{nm}}$) de 0.6. Después, se realizaron dos procesos de centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C) en los que se resuspendió el *pellet* en CaCl_2 0.1M. Por último, se resuspendió en 2 ml de CaCl_2 0.1M con 20% de glicerol, y se hicieron alícuotas que se congelaron con hielo seco y se almacenaron a -80°C.

2.1.3. Transformación de bacterias

En tubos de polipropileno de 15 ml se añaden 2-10 μl del producto de PCR mutagénica obtenido tras el tratamiento con DpnI, 10 μl de tampón TNE (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) y 10 μl de TCM 10X (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM CaCl_2 , 100 mM MgCl_2), y se dejó hielo durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo, se añadieron 25 μl de células competentes DH5 α . Tras 30 minutos en hielo, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 90 segundos. Posteriormente se añadieron 500 μl de medio LB y se dejaron a 37°C en agitación durante 90 minutos. Las células bacterianas transformadas se transfirieron a placas LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se dejaron creciendo durante 24 horas a 37°C (Figura 21). Al día siguiente, se picaron colonias en 5 ml de LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se dejaron creciendo a 37°C durante toda la noche.

2.1.4. Purificación del DNA plasmídico

El DNA plasmídico se puede extraer por dos métodos:

- Purificación a pequeña escala: se extrajo el DNA plasmídico mediante el kit comercial *NucleoSpin Plasmid Easy Pure (Macherey-Nagel)* de las colonias transformadas en 5 ml de LB con ampicilina a 37°C en agitación durante 24 horas.
- Purificación a gran escala: se utilizó el kit *NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel)* de las colonias bacterianas transformadas en 100 ml de LB con ampicilina a 37°C en agitación durante 24 horas.

Los plásmidos obtenidos tras la mutagénesis se digirieron con enzimas de restricción y se comprobaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) con *Gel-Red™ Nucleo Acid Stain (Biotium)* a voltaje continuo. El gel se visualiza en el sistema G:BOX con su programa de análisis *Gene Snap (Syngene, Cambridge)* (Figura 21).

2.1.5. Secuenciación

Las muestras seleccionadas se secuenciaron (*ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies)*) para confirmar la mutación deseada y para verificar que no se hayan introducido mutaciones adicionales durante el proceso de PCR. La secuenciación se realizó en la Plataforma de Genética y Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia. Las secuencias de DNA se analizan utilizando el programa *BioEdit* (Figura 21).

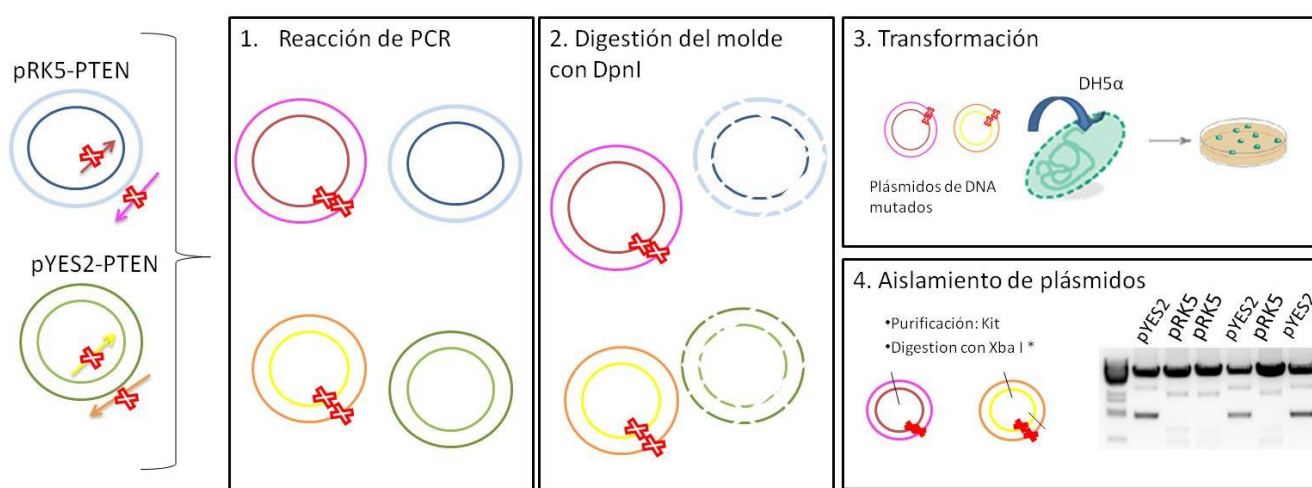


Figura 21: Representación esquemática del método de mutagénesis dirigida Quikchange. Se lleva a cabo la mutagénesis sobre el vector de mamíferos pRK5-PTEN y el vector de levaduras pYES2-PTEN. **1. Reacción de PCR.** Reacción de amplificación del DNA mediante PCR usando oligonucleótidos complementarios con la mutación deseada. **2. Digestión.** Digestión del DNA molde parental con DpnI. **3. Transformación** del producto obtenido en células *E. coli* competentes en placas de LB con ampicilina. **4. Obtención y aislamiento del DNA plasmídico.** Digestión con la enzima de restricción (XbaI) y comprobación de la secuencia del DNA mediante análisis de datos.

2.2. TRANSFORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE LEVADURAS

2.2.1. Cepa de levadura y medios de crecimiento

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada fue YPH499, cuyo fenotipo es MATa ade2-101 trp1-63 leu2-1 ura3-52 his3Δ200 lys2-801. Se utiliza como medio general de crecimiento no selectivo el medio líquido YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa), o sólido con agar (2%). El medio sintético completo (SD) contiene 0.17% base nitrogenada sin aminoácidos, 0.5% sulfato amónico y 2% de glucosa (Dextrosa), suplementándose con los aminoácidos apropiados en función de los plásmidos correspondientes. Los medios SG y SR contienen 2% de galactosa y rafinosa, respectivamente.

2.2.2. Transformación de la levadura

En aquellos casos en los que se transforman dos plásmidos, las transformaciones de levadura se llevaron a cabo directamente desde placas YPD. Para ello, se preparó en un tubo eppendorf 100 μ l de la mezcla de transformación (80 μ l de polietilenglicol (PEG) al 50 % y 20 μ l de acetato de litio (AcLi) 1M), se agitó con el vortex. Después, con un palillo estéril se cogió una pequeña cantidad de la cepa de levadura crecida en la placa YPD y se añadió a la mezcla junto con 2 μ l (1 μ g/ μ l) de DNA plasmídico.

Para aquellas transformaciones de más de 2 plásmidos, la cepa de *S. cerevisiae* se creció en 10 ml de medio líquido YPD a 30°C durante 24 horas en agitación. Se diluyó 1 ml del inóculo en medio YPD y cuando el medio obtuvo una D.O_{600 nm} de 0.4, se dejó incubando durante 4 horas más. Después se centrifugó en frío durante 5 min a 2500 rpm y el pellet obtenido se resuspendió con la mezcla previamente preparada de PEG al 50% con AcLi 1M, DTT, conteniendo 3 μ l de DNA plasmídico (1,5 μ g/ μ l) y 5 μ l de DNA de esperma de salmón (Sigma, 10 mg/ml) por muestra. El DNA de esperma de salmón se calienta durante 5 minutos a 95°C y es enfriado en hielo antes de ser añadido a la mezcla.

En ambos casos, los tubos de transformación se incubaron en agitación durante 45 min a 45°C. Las levaduras transformadas se sembraron en placas de agar con medio sintético completo (sin uracilo (SD-U), sin leucina (SD-L), sin uracilo ni leucina (SD-UL) o sin uracilo ni leucina ni triptófano (SD –UTL)) y se dejó incubando a 30°C durante 3 días.

2.2.3. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriada

Las colonias transformadas se incubaron en medio SD durante 18 horas, y dichos cultivos se diluyeron en agua estéril hasta una densidad óptica de 0.15, a partir de los cuales se prepararon 3 diluciones seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000). Con una pipeta multicanal se depositaron 5 µl de cada dilución en paralelo tanto en placas SD, como control del crecimiento, como en placas SG para inducir la expresión de los genes regulados por el promotor GAL1. Se incubaron a 30°C y el crecimiento de las gotas en las placas se monitorizó tras 72 horas. Todos los experimentos se realizaron, al menos, tres veces.

3. CULTIVOS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

3.1. Líneas celulares

La línea celular COS-7 es una línea celular de riñón de mono que expresa de forma endógena PTEN. Esta línea se cultivó en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Lonza, USA) complementado con 5% FBS (suero fetal bovino), 1mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina₇ y 0,1 mg/ml estreptomina.

La línea celular U87-MG es una línea celular humana de glioblastoma, no expresa PTEN de forma endógena. Esta línea celular se cultivó en DMEM complementado con 10% FBS, 1mM L-Glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina y 1mM piruvato sódico.

3.2. Método de transfección

La línea celular COS-7 se transfectó utilizando el protocolo de transfección DEAE-dextrano y el método de transfección GenJet™. En ambos casos, días antes de la transfección se plaquearon alrededor de $1,5 \cdot 10^4$ células/cm² en placas Petri.

En el método de transfección DEAE-dextrano, tras un lavado con PBS (Tampón fosfato salino (1,85 mM Na₂HPO₄, 8,4 mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl)), las células se incubaron durante 4 horas en una solución con DMEM al 2%, 10Mm de cloroquina, 10 mg/ml de dextrano y 1 µg de DNA plasmídico. Transcurrido ese tiempo, las células

transfectadas se incubaron 2 minutos con una solución de PBS con 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) y se lavaron con PBS. Finalmente, las células se cultivaron durante 48 horas antes de ser procesadas.

En el método de transfección *GenJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent* (SignaGen Laboratories), las células se dejan en placas de seis pocillos con medio completo 1 hora antes de ser transfectadas. Mientras tanto, se preparan dos soluciones; la primera se añade 1 µg de DNA en medio DMEM sin suero y en la segunda, se prepara medio DMEM sin suero junto con *GenJet Reagent* para cada transfección. Se añade la solución del reactivo de GenJet sobre la solución de DNA, se vortexea y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los 15 minutos la mezcla se añade a las células. Las células se cultivaron en un incubador saturado de humedad a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Pasadas 24 horas se añade medio nuevo y las células se procesaron 24-48 horas post-transfección.

La línea celular U87-MG se transfectó con Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA). En esta transfección se realizan dos incubaciones. Primero, en un tubo se mezcla la solución OptiMEM con 1 µg de DNA y la solución Plus Reagent; en otro tubo se incuba la solución Lipofectamine con medio OptiMEM. Transcurridos 10 minutos, se juntan las dos incubaciones y se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la mezcla de la transfección a las placas con medio nuevo sin antibióticos. Ambas líneas se cultivaron de forma rutinaria en placas de 6 pocillos en un incubador saturado de humedad a 37°C y 5% de CO₂, y se procesaron 48-72 horas post-transfección.

En los experimentos de estabilidad de proteínas, las células se trataron con 800 µg/ml de cicloheximida (CHX, Sigma-Aldrich) durante 6 horas antes de lisarlas. En los experimentos de *readthrough*, las células se incubaron durante 24 horas en presencia de G418 (geneticina) a una concentración de 200 µg/ml (o a la dosis indicada).

3.3. Lisis de cultivos celulares

Se realizaron lavados con PBS frío (4°C). Después las células se incubaron a 4°C con 150-200 µl tampón de lisis *Mammalian Protein Extration Reagent* (M-PER, Thermo Fisher Scientific) suplementado con un inhibidor de fosfatasa *PhosSTOP* y con un cocktail de inhibidor de proteasas *cOMplete EDTA-free* (Roche, Switzerland) durante 10 min. Después, el lisado celular resultante se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Dicha centrifugación permite obtener un sobrenadante postnuclear con el lisado celular. La concentración proteica de cada muestra se cuantificó empleando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher). Con concentraciones conocidas de la seroalbúmina bovina (BSA) se estableció la recta de calibrado que permite calcular la absorbancia correspondiente a la concentración proteica de nuestra muestra. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf).

4. INMUNODETECCIÓN PROTÉICA

4.1. Electroforesis

Para la separación electroforética, se añadió tampón de carga Nu-PAGE 4X a los extractos proteicos procedentes de células de mamífero (125 mM de Tris HCl pH=6,8, 5% de SDS, 25% de glicerol y β -mercaptoetanol (Merck) por cada ml de tampón de carga) y se hirvieron a 95°C durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo una electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE), en condiciones desnaturizantes y reductoras, a un voltaje continuo de 20 V durante toda la noche. Se incluyó *Precision Plus Protein* (Bio-Rad) como marcador de peso molecular.

4.2. Transferencia e hibridación

Tras la separación de proteínas en el gel de poliacrilamida, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-FL, Millipore), activadas previamente con metanol, a través de una transferencia semiseca (Thermo Scientific Owl serie HEP) durante 1 hora a 200 mA y 30 min a 100 mA. Una vez realizada la transferencia de proteínas y para evitar la posibilidad de uniones inespecíficas, la membrana se bloqueó con OBB (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR) (Dilución 1:1 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubó con un anticuerpo primario monoclonal (diluido en tampón de bloqueo 1/1.000 con 2% de azida sódica, la cual previene de contaminaciones bacterianas y permite reutilizar el anticuerpo) (Tabla 7) durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 6 lavados de 10 minutos con tampón NET-gelatina (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.05% Tritón X-100, 0.25% gelatina). A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (Tabla 7) (diluido en tampón de bloqueo 1/20.000) durante una hora a temperatura ambiente.

4.3. Revelado

Tras sucesivos lavados con el tampón NET-gelatina, la detección de los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromo se visualizaron con el sistema de imagen Odyssey CLx (LI-COR, USA) y las bandas de los *Western blots* se cuantificaron utilizando el programa Image Studio™. Como control de carga proteica, se analizó la expresión de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) en todos los experimentos.

4.4. Anticuerpos

Tabla 7: Anticuerpos primarios y secundarios

Anticuerpos primarios	Compañía
Anti-AKT (9272)	Cell Signaling Technologies
Anti-fosfo-AKT (Ser473) (4058)	
Anti-GAPDH* (sc-32233)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PTEN (6H2.1)*	Merck Millipore
Anti-PTEN-L	
Anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos	Compañía
Anti-ratón IgG-IRDyeR 800 CW	LI-COR Biosciences
Anti-conejo IgG-Alexa Fluor 680CW	LI-COR Biosciences

*En la mayoría de los experimentos se han utilizado una mezcla de anti-PTEN y anti-GAPDH.

5. Determinación de la actividad fosfatasa de PTEN

Se han llevado a cabo dos aproximaciones para determinar la actividad biológica de PTEN; cuantificación de la actividad fosfatasa en células de mamífero y reconstitución la ruta PI3K/PTEN/Akt en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La cuantificación de la actividad fosfatasa en células de mamífero se llevó a cabo mediante *Western Blot* de lisados celulares de células COS-7 co-transfectadas con plásmidos que codifican AKT1 y variantes de PTEN. La fosforilación de AKT1, detectada con anticuerpos específicos, se utilizó como medida indirecta de la actividad de PTEN. La reconstitución de la ruta PI3K/PTEN/Akt de mamíferos en la levadura *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante la monitorización del crecimiento de gotas y mediante la localización en la membrana de GFP-AKT1. La expresión de la subunidad catalítica de la PI3K de clase IA, p110 α -CAAX, detiene el crecimiento de la levadura [276, 277]; sin embargo, el crecimiento de la

levadura es recuperado mediante la co-expresión con PTEN silvestre (wt), pero no si se expresa un mutante de PTEN catalíticamente inactivo [31, 276, 278]. Para la localización en la membrana de AKT1, se usó un gen reporter (GFP). La co-expresión de la forma hiperactiva de PI3K (p100 α -CAAX) y GFP-AKT1 da como resultado un reclutamiento en la membrana como consecuencia de la alta producción de PIP₃. La expresión de PTEN activo contrarresta dicho efecto, desplazando la localización de GFP-AKT1 al citoplasma.

RESULTADOS

1. Optimización del protocolo de mutagénesis para análisis de alto rendimiento

Para poder analizar mutaciones presentes en cualquier gen de interés, el primer paso es generar colecciones de mutaciones de cDNA en plásmidos de expresión apropiados [279]. El método *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) es el método más empleado para realizar mutagénesis dirigida sobre secuencias de DNA. El método está basado en la técnica de PCR inversa seguida de un tratamiento con la enzima de restricción DpnI (digiere el DNA molde metilado) y una transformación directa en células competentes *E. coli*.

La Figura 22 muestra experimentos de optimización del protocolo de mutagénesis dirigida empleado, usando cDNAs de PTEN y oligonucleótidos solapantes de 29 nucleótidos de longitud, con el codón que mutamos situado en el centro y con el mismo número de nucleótidos a ambos lados (13+3+13) (Figura 22A) [273]. En ausencia de la DNA polimerasa (Pwo) pero en presencia de DpnI no se obtuvieron colonias ni DNA linearizado, lo que indica el buen desarrollo de la mutagénesis (Figura 22B-D). Se analizaron 3 colonias de cada condición mediante digestión con enzimas de restricción (Figura 22C), y la eficiencia de mutagénesis (determinada mediante secuenciación de DNA) se indica en la Figura 22D.

Resultados

A. PTEN D24G: GAC → GGC

(+) 5' -TGGATTTCGACTTAGGC TTGACCTATATTT-3'
 (-) 5' -AAATATAGGTCAAGCCTAAGTCGAATCCA-3'

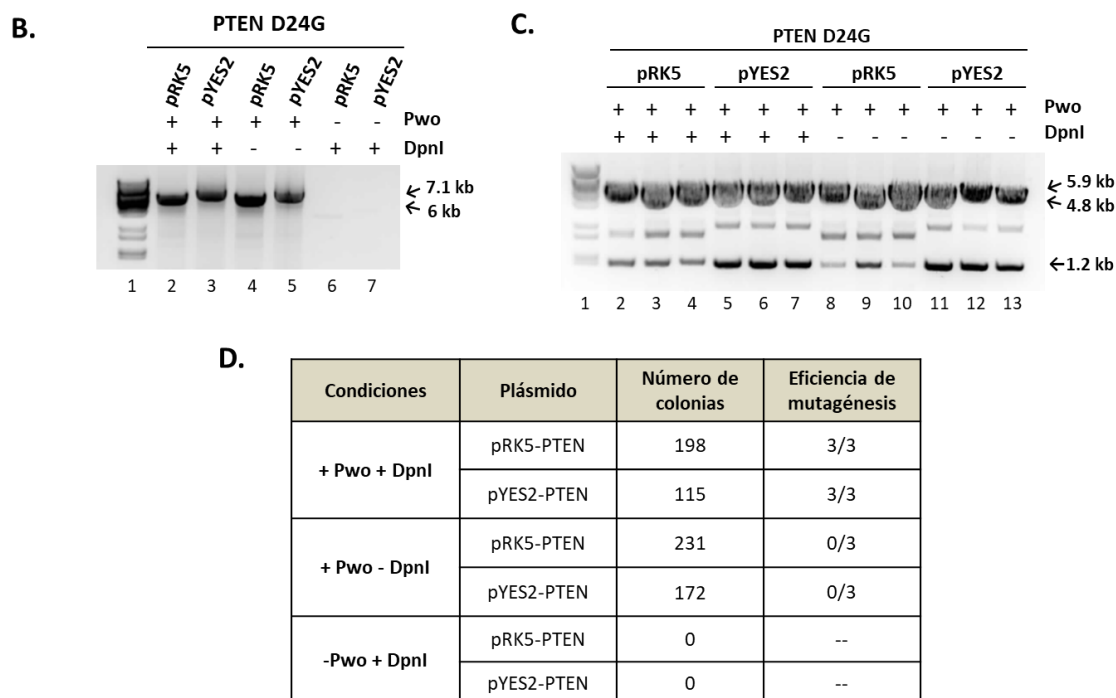


Figura 22. Monitorización de la mutagénesis dirigida usando una sustitución de aminoácido de PTEN como ejemplo. **A.** Ejemplo de par de oligonucleótidos de 29 nucleótidos de longitud (+, *primer forward*; -, *primer reverse*) (13+3+13, subrayado el codón que se sustituye), para la mutación D24G de PTEN, en donde el aspartato de la posición 24 (GAC) es sustituido por una glicina (GGC). **B.** Gel de agarosa al 1%. Se muestra el DNA obtenido de la PCR tratado con/sin Pwo y/o con/sin DpnI. El plásmido pRK5-PTEN tiene un tamaño aproximado de 6 kb, mientras que el plásmido pYES2-PTEN tiene un tamaño de 7.1 kb. **C.** Control de digestión con enzimas de restricción (XbaI + Sall, cortan el inserto PTEN de 1,2 kb) de DNA plasmídico obtenido de bacterias transformadas con el producto de PCR mutagénico. **D.** Eficiencia de la transformación bacteriana del producto de PCR (se muestra el número de colonias después del tratamiento con DpnI) y eficiencia de mutagénesis (número de muestras mutadas con respecto al número de muestras secuenciadas).

La Tabla 8 muestra ejemplos de mutagénesis de PTEN con oligonucleótidos de la misma longitud (13+3+13) pero distinta T_m (*melting temperature*) y contenido de G/C. Como se observa, ni la T_m , ni la presencia de una G o una C en los extremos 3' de los oligonucleótidos, ni el contenido de G/C afectó a la eficiencia de la mutagénesis. Por ello, para el resto de experimentos de esta tesis, hemos utilizado oligonucleótidos mutagénicos de 29 nucleótidos de longitud, independientemente de su T_m y contenido en G/C.

Tabla 8. Mutagénesis dirigida estandarizada para mutaciones de PTEN¹

Mutación ²	Contenido de GC (%)	Tm ³	Número de colonias	Eficiencia de mutagénesis
M1I (ATG→ATA)	48	75	22	1/1
K6E* (AAA→GAA)	52	76.5	12	1/1
K6I* (AAA→ATA)	52	76.5	8	1/1
N12T** (AAC→ACC)	41	72	12	1/1
R14G* (AGG→GGG)	41	72	20	1/2
D24G (GAC→GGC)	38	71	58	1/1
E43G (GAA→GGA)	48	75	11	1/1
I50T (ATT→ACT)	31	68	19	1/1
Y65C** (TAC→TGC)	34	69.5	8	1/1
Y68N** (TAC→AAC)	34	69.5	9	2/3
Y68H** (TAC→CAC)	38	71	15	1/1
Y68C** (TAC→TGC)	38	71	32	1/1
L70P** (CTT→CCT)	38	71	14	1/1
K80E* (AAA→GAA)	41	72	5	1/1
I101T* (ATC→ACC)	41	72	20	1/1
D107G* (GAT→GGT)	48	75	10	1/1
L112P (CTA→CCA)	45	74	10	1/1
H123R (CAC→CGC)	45	74	25	1/1
R130L (CGA→CTA)	45	74	38	1/1
G132D* (GGT→GAT)	38	71	32	1/2
R142P (CGG→CCG)	24	65	44	1/1
R159G* (AGG→GGG)	48	75	39	1/1
Q171E (CAG→GAG)	48	75	15	1/2
M205V (ATG→GTG)	45	74	19	1/1
D252V (GAT→GTT)	41	72	55	1/1
K254T** (AAA→ACA)	45	74	26	1/1
V255A (GTA→GCA)	41	72	100	1/1

¹La mutagénesis se ha llevado a cabo usando el plásmido pYES2-PTEN con oligonucleótidos de 29 nucleótidos de longitud.

²Se indica la sustitución del nucleótido y el cambio de aminoácido.

³La Tm se calculó de acuerdo con el manual *QuikChange*.

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

** Los dos oligonucleótidos mutagénicos tiene una G o C en la posición 3'.

2. Respuesta de *readthrough* de los codones de terminación prematura (PTC) en el gen PTEN

2.1. *PTCome* de PTEN asociado a enfermedades

En la Figura 23 se muestra el *PTCome* potencial de PTEN, es decir, todos los diferentes PTC que se pueden generar, cambiando un nucleótido, a partir de la secuencia de DNA codificante del gen PTEN. El *PTCome* potencial de PTEN incluye 183 PTC, generados a partir de 146 codones, que incluyen 17 de los 18 codones que pueden producir codones *nonsense* mediante el cambio de un nucleótido (el codón TCG no está presente en el gen PTEN). A día de hoy, se han identificado 141 PTC en PTEN asociados a enfermedades, de los cuales 15 se han encontrado solo en la línea germinal de pacientes PHTS, 71 son PTC resultado de mutaciones somáticas en tumores y, 55 están presentes en la línea germinal de pacientes en tumores. Estos PTC se distribuyen a lo largo del dominio PTP y el dominio C2 de PTEN, mientras que en la cola C-terminal no se ha encontrado ningún PTC asociado a enfermedad.

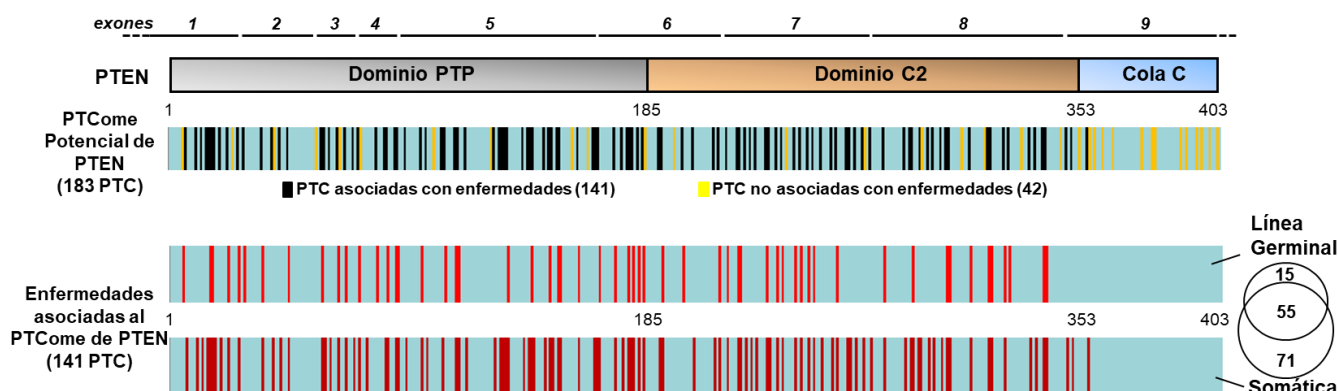


Figura 23: *PTCome* de PTEN. Representación de los dominios de la proteína PTEN y la distribución de los PTC. En la parte superior se muestran los exones de PTEN y los dominios de la proteína (los números se corresponde con la numeración de aminoácidos de PTEN: dominio PTP, aminoácidos 1-185; dominio C2, aminoácidos 186-353; cola C-terminal, aminoácidos 354-403). En el diagrama de barras superior se muestra el *PTCome* potencial de PTEN con los 141 PTC asociados a enfermedades (marcados en negro) y 42 PTC no relacionados con enfermedades (marcado en amarillo). En los diagramas de barras inferiores, se muestra la distribución de los PTC somáticos y los PTC de línea germinal (marcados en rojo) del gen PTEN asociados a enfermedades (enfermedades asociadas al *PTCome* de PTEN).

Tanto en pacientes con PHTS como en muestras de tumores, existen tres mutaciones halladas frecuentemente (R130X, R233X y R335X, situadas en los exones 5, 7 y 8, respectivamente). Estas mutaciones constituyen el 15%, 18%, y 4%, respectivamente,

del total de mutaciones PTC de PTEN encontradas en tumores humanos, y el 22%, 13%, y 17%, respectivamente, de las mutaciones PTC de PTEN encontradas en pacientes con PHTS (Figura 24).

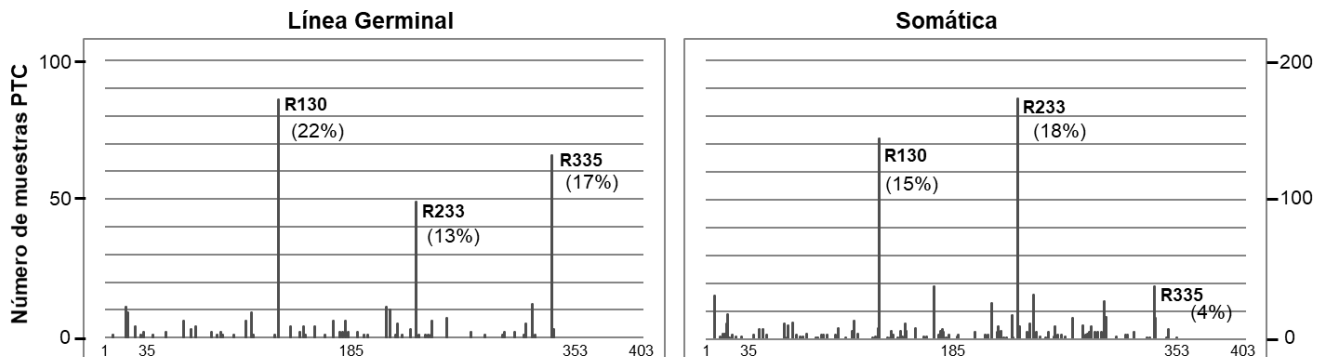


Figura 24. Representación de los PTC somáticos y germinales encontrados en el gen PTEN. En el gráfico de la izquierda, se muestra el número de veces que un PTC ha sido encontrado en la línea germinal de pacientes (datos procedentes de la literatura (ver Bibliografía suplementaria) y de la base de datos HGMD). En el gráfico de la derecha se muestra el número de veces que un PTC ha sido encontrado en muestras de tumores. Datos procedentes de la base de datos COSMIC. Los números en el eje de abscisas corresponden a la numeración de los aminoácidos de PTEN.

2.2. Inducción de *readthrough* en mutaciones PTC de PTEN

En la Figura 25 se muestran varios experimentos sobre la lectura traduccional inducible por *readthrough* de diferentes mutaciones PTC de PTEN. En primer lugar, analizamos la eficacia de G418 (geneticina), un antibiótico aminoglucósido, para inducir *readthrough* en el gen PTEN. Se usó líneas celulares humanas positivas (COS-7) y negativas (U87MG) para PTEN, transfectadas transitoriamente con plásmidos de cDNA que codifican las mutaciones PTC de PTEN más abundantes en tumores, R130X (TGA) y R233X (TGA). En ambas líneas celulares observamos la inducción de *readthrough* en presencia de G418 (Figura 25A). Para evaluar la especificidad del PTC-*readthrough* inducido por G418, se co-transfectó el plásmido pRK5-PTEN (el vector pRK5 carece del gen de resistencia a neomicina, cuyo producto proteico inactiva G418) con el plásmido pRC/CMV (plásmido que contiene el gen de resistencia a neomicina) o el plásmido vacío pSG5 (plásmido que carece de dicho gen de resistencia). La co-transfección con el plásmido pRC/CMV bloqueó la inducción con G418 del *readthrough* del PTC R233X (Figura 25B). A continuación, se evaluó el *readthrough* inducido por G418 y gentamicina (otro antibiótico aminoglucósido) en algunas variantes representativas de PTEN que contienen PTC, usando dos anticuerpos anti-PTEN diferentes (anti-C-terminal o anti-N-terminal). Ambos antibióticos activaron el

Resultados

readthrough de estos PTC de PTEN, generando proteínas completas de PTEN con una eficiencia variable dependiendo del PTC. Se puede observar como la inducción del *readthrough* es mayor con G418 en todos los PTC, aunque también se puede apreciar con gentamicina. En algunas variantes de PTC de PTEN, como R335X, se detectó la proteína PTEN truncada mediante el anticuerpo anti-N-terminal (Figura 25C). El análisis detallado de la expresión de diferentes PTC de PTEN muestra una disminución gradual en los niveles de expresión de las proteínas truncadas C-terminales de PTEN, siendo indetectable las truncaciones anteriores al aminoácido 219 (Figura 25D). Esto concuerda con la falta de estabilidad en las células de las proteínas truncadas C-terminales de PTEN. La cantidad de proteína truncada C-terminal R335X disminuyó proporcionalmente a la cantidad de proteína completa de PTEN generada por el *readthrough* (Figura 25C).

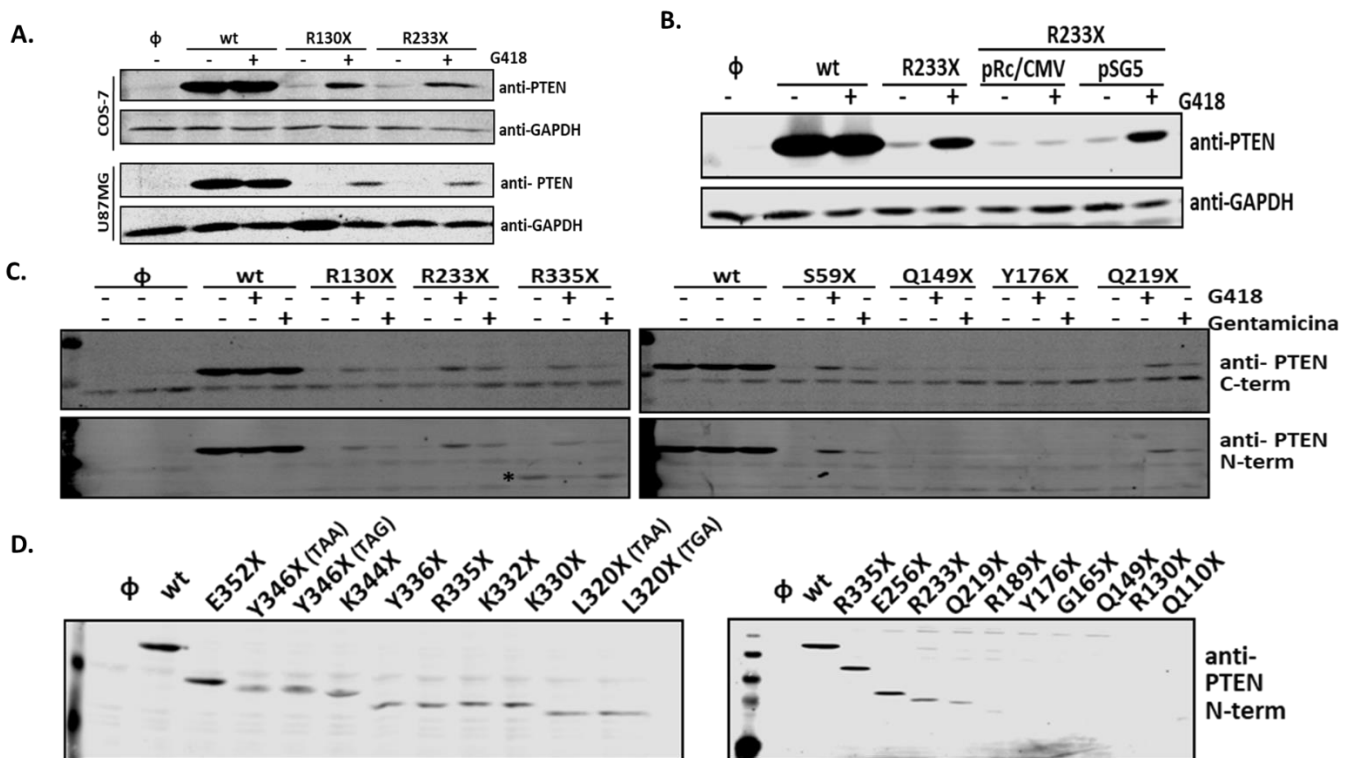


Figura 25. Inducción de *readthrough* en diferentes mutaciones PTC de PTEN. Las células COS-7 se transfectoron con plásmidos pRK5 que codifican diferentes PTC de PTEN (ϕ , vector vacío; wt, tipo silvestre). Tras 24h de incubación las células se dejan sin tratar o se incuban con G418 (200 μ g/ml) o gentamicina (800 μ g/ml) durante 24h más. La expresión de proteína se detectó mediante *Western Blot* usando por separado el anticuerpo anti-PTEN C-terminal (6H2.1), anticuerpo PTEN N-terminal y anti-GAPDH como control de carga. **A.** Las células COS-7 y U87MG se transfectoron con plásmidos pRK5 que codifican diferentes variantes de PTEN (R130X y R233X). **B.** Las células COS-7 se co-transfectoron con el plásmido pRK5 y el vector vacío pRc/CMV y pSG5. **C.** Activación del *readthrough* en células COS-7 con ambos antibióticos. El asterisco (*) indica la migración de la proteína truncada R335X C-terminal de PTEN. **D.** Expresión de las proteínas truncadas C-terminales de PTEN en células COS-7 a partir de las correspondientes variantes PTC.

Las variantes de PTEN cuyo PTC se encuentra localizado en la región N-terminal antes de la metionina 35 (Met35), como R11X (TGA) y R15X (TGA), produjeron una proteína truncada N-terminal de PTEN en condiciones no inductoras de *readthrough*; dicha proteína se detecta con el anticuerpo anti-C-terminal de PTEN, pero no con el anticuerpo anti-N-terminal (Figura 26A). A continuación, analizamos comparativamente, en distintas mutaciones PTC de PTEN, la respuesta de *readthrough* frente a varios inductores, entre los que se incluyen compuestos aminoglucósidos (G418, gentamicina, Amicacina y Tobramicina) y no aminoglucósidos (Eritromicina). El compuesto que más *readthrough* induce es el G418, seguido de la gentamicina. Se incluyó la mutación Y176X como ejemplo de mutación PTC que no sufre *readthrough* (Figura 26B). Para saber la concentración de inductor y el tiempo necesario para inducir *readthrough*, se realizaron los siguientes experimentos. En primer lugar, se realizó un experimento con concentraciones crecientes de G418 y de gentamicina (Figura 26C) en las variantes R130X y R233X de PTEN. Observamos que al añadir G418 a una concentración de 200 µg/ml o gentamicina a una concentración de 800 µg/ml, tanto a la variante R130X como a R233X, se conseguía mayores niveles de *readthrough* (consiguiendo niveles óptimos con G418). En segundo lugar, se realizó un experimento para determinar el tiempo necesario para inducir *readthrough* en las células. Se observa que 24 horas es suficiente para obtener expresión de proteínas mediante la inducción con G418 y dicho efecto se mantiene en las células hasta 48 horas después (Figura 26D).

Resultados

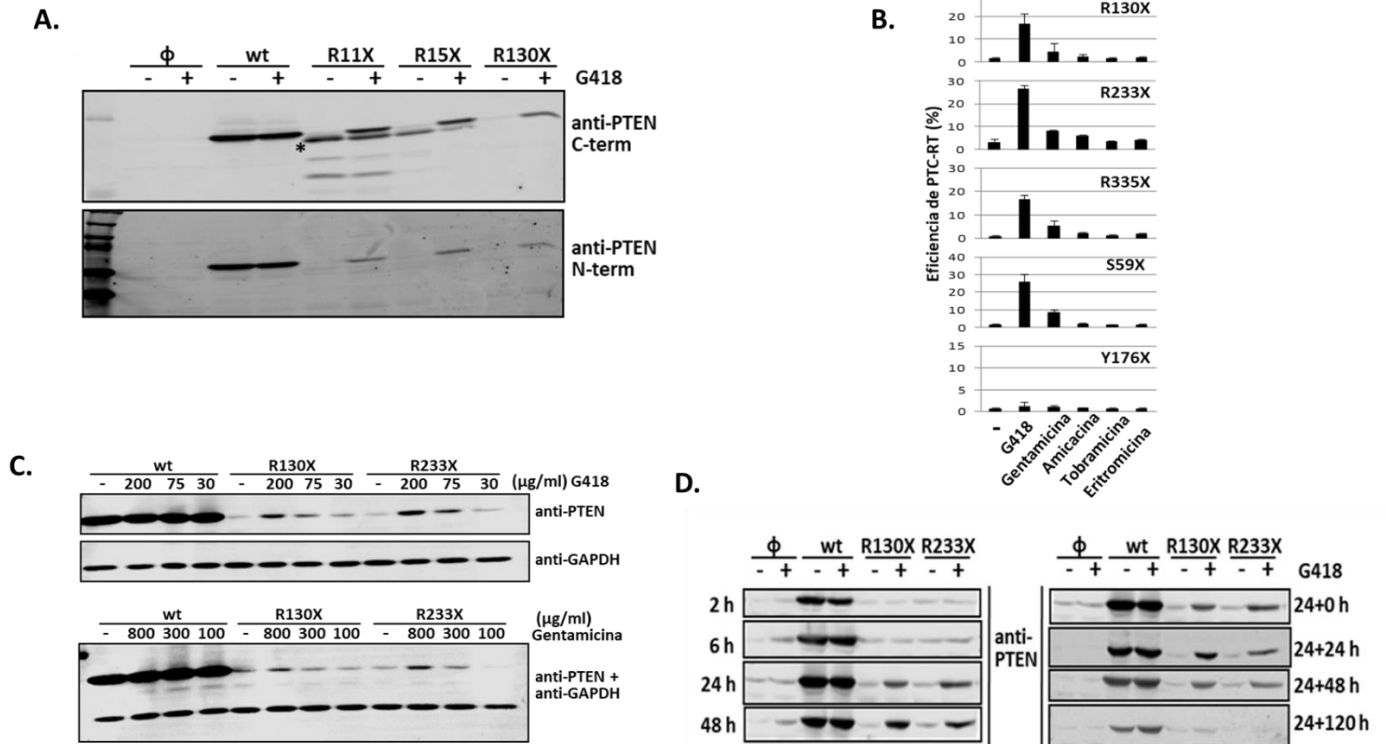


Figura 26. Inducción de *readthrough* en diferentes mutaciones de PTEN. **A.** Las células COS-7 se transfecaron con diferentes variantes con PTC de PTEN (R11X, R15X, y R130X). El asterisco (*) indica la migración de la proteína truncada N-terminal de PTEN. **B.** Cuantificación de los niveles de expresión de *readthrough* de diferentes mutaciones PTC de PTEN en presencia de diferentes inductores. Se mide la expresión de los diferentes PTC en presencia de G418 (200 μ g/ml), Gentamicina (800 μ g/ml), Amicacina (2 mg/ml), Tobramicina (800 μ g/ml) y Eritromicina (175 μ g/ml). Las barras corresponden a la media \pm SD. **C.** Respuesta a la dosis del inductor de *readthrough* de diferentes mutaciones PTC de PTEN. Las células COS-7 se incuban con G418 (200, 75, o 30 μ g/ml) y gentamicina (800, 300, o 100 μ g/ml) durante 24h. **D.** Panel izquierdo: las células COS-7 son tratadas con o sin G418 (200 μ g/ml) durante el tiempo indicado. Panel derecho: las células COS-7 se incubaron durante 24h en presencia de G418 (200 μ g/ml), seguido de otra incubación en ausencia de G418, como se indica. En ambos casos, se muestra un experimento representativo de al menos dos experimentos independientes.

2.3. Análisis global del *readthrough* del PTCome de la línea germinal de PTEN asociado a enfermedades

La eficiencia del *readthrough* está influenciada por la identidad de cada PTC, así como por la secuencia de nucleótidos próxima en el mRNA. Para hacer una estimación global del potencial de *readthrough* realizamos un análisis global de la inducción de *readthrough* con G418, como inductor óptimo de *readthrough*, de 70 PTC hallados en la línea germinal de PTEN en asociación con enfermedades (15 PTC se han encontrado en la línea germinal de pacientes PHTS y 55 PTC se han encontrado en la línea germinal de pacientes y en muestras de tumores esporádicos).

La Figura 27 muestra un patrón heterogéneo de los niveles de expresión de proteína obtenidos (entre un 0-30% de inducción de *readthrough*) de las variantes de PTC germinales de PTEN. La tabla 9 presenta una clasificación de PTC según su eficacia de *readthrough*. Aproximadamente el 6% de los PTC mostró una eficiencia óptima de *readthrough* (>20% de expresión respecto a PTEN silvestre), el 11.5 % mostró una eficiencia subóptima de *readthrough* (10-20% de expresión), el 18% mostró una eficiencia baja de *readthrough* (5-9% de expresión), y el 65% mostró una eficiencia muy baja de *readthrough* (0-4% de expresión).

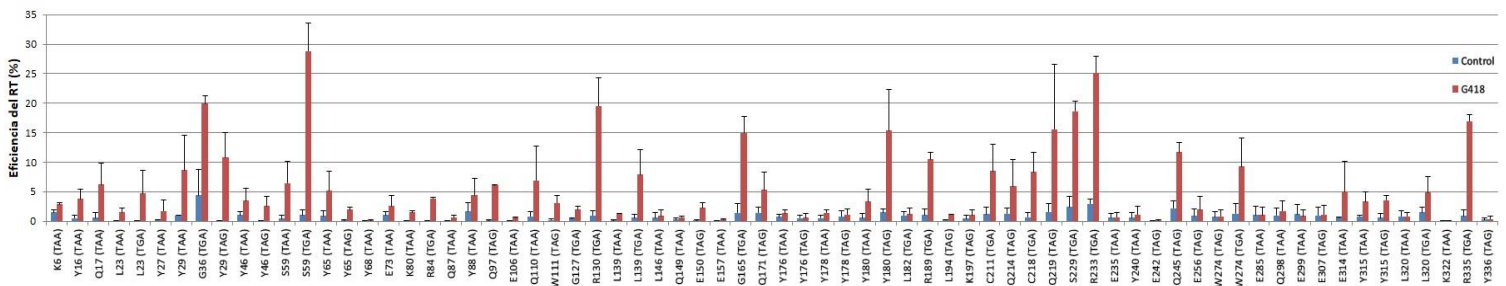


Figura 27. Análisis global de la inducción de *readthrough* de mutaciones PTC germinales de PTEN. Los niveles de *readthrough* se determinaron mediante *Western Blot* en células COS-7 en presencia (barras rojas) /ausencia (barras azules) de G418 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24h. Los datos están normalizados frente a la expresión de PTEN tipo salvaje. Se muestra la media de al menos dos experimentos independientes.

Tabla 9. Eficiencia de *readthrough* del PTCome asociado a enfermedades según el tipo de PTC

PTC	n ¹	Eficiencia de <i>readthrough</i> ²			
		Óptima 4 (5,7%)	Subóptima 8 (11.4%)	Baja 13 (18.6%)	Muy baja 45 (64.28%)
TGA	16 (22.85%)	3 (75%)	4 (50%)	4 (30,8%)	5 (11.1%)
TAG	22 (31.45%)	1 (25%)	4 (50%)	3 (23.1%)	14 (31.1%)
TAA	32 (45.7%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (46.1%)	26 (57.8%)

¹ Número y porcentaje de cada tipo de PTC de la línea germinal de PTEN asociadas a enfermedades.

² La eficiencia de *readthrough* se define como el porcentaje de expresión respecto a PTEN wt (100%): óptima (>20% de expresión), subóptima (10%-20% de expresión), baja (5%-9% de expresión) y muy baja (0%-4% de expresión). Se indica el número y el porcentaje de cada tipo de PTC.

Nuestro análisis global nos permitió realizar algunos análisis comparativos en términos de secuencias de mRNA óptimas para el *readthrough* de PTEN. La media de las eficiencias de *readthrough* para cada tipo de PTC fueron: TGA, eficacia de *readthrough* del 11% (rango 1-25%); TAG, eficacia de *readthrough* del 4.8% (rango 0-29%); TAA, eficacia de *readthrough* del 2.52% (rango 0-9%). La mayoría de los PTC que mostraron una eficiencia óptima o subóptima de *readthrough* fueron TGA PTC (77,5%), seguidos de TAG (37,5%) y TAA (0%). Por otro lado, los PTC que mostraron una eficiencia de *readthrough* muy baja fueron en su mayoría TAA (57.8%), seguido de TAG (31.1%) y TGA (11.1%) (Tabla 9). Estos resultados, al igual que otros estudios de *readthrough* comparativos utilizando diferentes mRNA, refuerzan la idea de que los codones de terminación TGA presentan una mayor eficiencia de *readthrough* seguido de los codones TAG y TAA [251, 253].

Las mutaciones PTC prevalentes de PTEN R130X, R233X y R335X mostraron un *readthrough* óptimo o subóptimo (>17% de expresión) (Tabla 10). Esto refuerza el potencial de las terapias basadas en *readthrough* de PTEN para grupos específicos de pacientes.

Tabla 10. Eficiencia de *readthrough* de las mutaciones PTC germinales de PTEN

Amino-ácido ¹	Variante ²	Sustitución de aminoácido ^{2*}	PTC ³	Eficiencia de <i>readthrough</i> ⁴	Puntuación funcional (FS) ⁵	Puntuación de eficiencia funcional del <i>readthrough</i> ⁶
K6	c.16A>T	p. (Lys6Ter)/K16X	ATC TAA GAG	2.9 _± 0.3	1/0	1.5
Y16	c.48T>A	p. (Tyr16Ter)/Y16X	AGA TAA CAA	3.8 _± 1.6	0.5/0	2.8
Q17	c.49C>T	p. (Glu17Ter)/Q17X	TAT TAA GAG	6,2 _± 3.6	0.5/1/1	6,2
L23	c.68T>A	p. (Leu23Ter)/L23X	GAC TAA GAC	1.5 _± 0.8	0/0	0
	c.68T>G		GAC TGA GAC	4.7 _± 3.9	0/0/0	0
Y27	c.84T>A	p. (Tyr27Ter)/Y27X	ACC TAA ATT	1.7 _± 1.8	0/1	0.8
Y29	c.87T>A	p. (Tyr29Ter)/Y29X	ATT TAA CCA	8.7 _± 6.0	1/1	8.7
	c.87T>G		ATT TAG CCA	10.8 _± 4.3	1/1/1	10.8
G36	c.106G>T	p.(Gly36Ter)/G36X	ATG TGA TTT	19.9 _± 1.4	0/0/1	3.5
Y46	c.138C>A	p. (Tyr46Ter)/Y46X	GTA TAA AGG	3.4 _± 2.1	0/1	1.6
	c.138C>G		GTA TAG AGG	2.5 _± 1.7	0/1/0	0.3
S59	c.176C>A	p. (Ser59Ter)/S59X	GAT TAA AAG	6.5 _± 3.7	1/1	6.5
	c.176C>G		GAT TAG AAG	28.9 _± 4.8	1/1/1	28.9
Y65	c.195C>A	p. (Tyr65Ter)/Y65X	CAT TAA AAG	5.2 _± 3.4	0.5/1	3.8
	c.195C>G		CAT TAG AAG	1.9 _± 0.4	0.5/1/0.5	1
Y68	c.204C>A	p. (Tyr68Ter)/Y68X	ATA TAA AAT	0.1 _± 0.1	0/1	0
E73	c.217G>T	p.(Glu73Ter)/E73X	GCT TAA AGA	2.5 _± 1.8	1/1	2.5
K80	c.238A>T	p.(Lys80Ter)/K80X	GCC TAA TTT	1.5 _± 0.2	1/1	1.5
R84	c.250A>T	p.(Arg84Ter)/R84X	TGC TGA GTT	3.9 _± 0.2	1/1/1	3.9
Q87	c.259C>T	p.(Gln87Ter)/Q87X	GCA TAA TAT	0.6 _± 0.3	1/1	0.6
Y88	c.264T>A	p.(Tyr88Ter)/Y88X	CAA TAA CCT	4.4 _± 2.9	0.5/1	2.1
Q97	c.289C>T	p.(Gln97Ter)/Q97X	CCA TAG CTA	6.1 _± 0.1	1/1/1	6.1
E106	c.316G>T	p.(Glu106Ter)/E106X	TGT TAA GAT	0.6 _± 0.1	1/0	0.3
Q110	c.328C>T	p.(Gln110Ter)/Q110X	GAC TAA TGG	6.9 _± 5.8	1/1	6.9
W111	c.332G>A	p.(Trp111Ter)/W111X	CAA TAG CTA	3.1 _± 1.2	0/1/0	0.3
G127	c.379G>T	p.(Gly127Ter)/G127X	GCT TGA AAG	1.9 _± 0.6	0/0/0	0
R130	c.388C>T	p. (Arg130Ter)/R130X	GGA TGA ACT	19,6 _± 4,8	1/0/0	12,6
L139	c.416T>A	p.(Leu139Ter)/L139X	TAT TAA TTA	1.2 _± 0.1	1/0	0.6
	c.416T>G		TAT TGA TTA	7.9 _± 4.2	1/0/1	20.6

Resultados

L146	c.437T>A	p.(Leu146Ter)/L146X	TTT TAA AAG	0.8 _± 1.0	1/1	0.8
Q149	c.445C>T	p.(Gln149Ter)/Q149X	GCA TAA GAG	0.6 _± 0.3	1/1	0.6
E150	c.448G>T	p.(Glu150Ter)/E150X	CAA TAG GCC	2.2 _± 0.9	1/1/1	2.2
E157	c.469G>T	p.(Glu157Ter)/E157X	GGG TAA GTA	0.3 _± 0.1	1/1	0.3
G165	c.493G>T	p.(Gly165Ter)/G165X	AAG TGA GTA	15.0 _± 2.7	0/0/1	2.6
Q171	c.511C>T	p.(Gln171Ter)/Q171X	AGT TAG AGG	5.3 _± 3.0	1/0/0	4.6
Y176	c.528T>A	p.(Tyr176Ter)/Y176X	GTG TAA TAT	1.3 _± 0.6	1/1	1.3
	c.528T>G		GTG TAG TAT	0.6 _± 0.7	1/1/1	0.6
Y178	c.534T>A	p.(Tyr178Ter)/Y178X	TAT TAA AGC	1.4 _± 0.4	1/1	1.4
	c.534T>G		TAT TAG AGC	1.1 _± 0.9	1/1/0.5	1.1
Y180	c.540C>A	p.(Tyr180Ter)/Y180X	AGC TAA CTG	3.3 _± 2.1	1/1	3.3
	c.540C>G		AGC TAG CTG	15.4 _± 6.9	1/1/0.5	15.1
L182	c.545T>G	p.(Leu182Ter)/L182X	CTG TGA AAG	1.2 _± 1.1	1/1/1	1.2
R189	c.565A>T	p.(Arg189Ter)/R189X	TAT TGA CCA	10.5 _± 1.2	1/0/1	8.6
L194	c.581T>A	p.(Leu194Ter)/L194X	CTG TAG TTT	1.1 _± 0.1	1/1/1	1.1
K197	c.589A>T	p.(Lys197Ter)/K197X	CAC TAG ATG	1.1 _± 0.9	1/1/1	1.1
C211	c.633C>A	p.(Cys211Ter)/C211X	ACT TGA AAT	8.5 _± 4.5	1/1/1	8.5
Q214	c.640C>T	p.(Gln214Ter)/Q214X	CCT TAG TTT	5.9 _± 4.6	1/1/1	5.9
C218	c.654C>A	p.(Cys218Ter)/C218X	GTC TGA CAG	8.3 _± 3.3	1/1/1	8.3
Q219	c.655C>T	p.(Gln219Ter)/Q219X	TGC TAG CTA	15.6 _± 11.0	1/1/1	15.6
S229	c.686C>G	p.(Ser229Ter)/S229X	AAT TGA GGA	18.8 _± 1.4	1/1/1	18.8
R233	c.687C>T	p.(Arg233Ter)/R233X	ACA TGA CGG	25,2 _± 2,7	1/1/1	25,2
E235	c.703G>A	p.(Glu235Ter)/E235X	CGG TAA GAC	0.6 _± 0.8	1/1	0.6
Y240	c.720C>A	p.(Tyr240Ter)/Y240X	ATG TAA TTT	1.1 _± 1.4	1/1	1.1
E242	c.724GT	p.(Glu242Ter)/E242X	TTT TAG TTC	0.1 _± 0.1	1/1/0.5	0.1
Q245	c.733C>T	p.(Gln245Ter)/Q245X	CCT TAG CCG	11.7 _± 1.7	1/1/1	11.7
E256	c.766G>T	p.(Glu256Ter)/E256X	GTA TAG TTC	1.9 _± 2.3	1/1/1	1.9
W274	c.821G>A	p.(Trp274Ter)/W274X	TTT TAG GTA	0.8 _± 1.1	1/1/1	0.8
	c.822G>A		TTT TGA GTA	9.2 _± 4.8	1/1/1	9.2
E285	c.853G>T	p.(Glu285Ter)/E285X	GAG TAA ACC	1.0 _± 1.4	1/0.5	0.7
Q298	c.892C>T	p.(Gln298Ter)/Q298X	GAT TAA GAA	1.7 _± 1.7	1/1	1.7
E299	c.895G>T	p.(Glu299Ter)/E299X	CAA TAA ATC	0.8 _± 1.0	1/1	0.8
E307	c.919G>T	p.(Glu307Ter)/E307X	ATA TAG CGT	1.1 _± 1.5	1/0/1	1

E314	c.940GT	p.(Glu314Ter)/E314X	AAG <u>TAA</u> TAT	5.0 _± 5.1	1/1	5
Y315	c.945T>A	p.(Tyr315Ter)/Y315X	GAA <u>TAA</u> CTA	3.3 _± 1.6	1/1	3.3
	c.945T>G		GAA <u>TAG</u> CTA	3.5 _± 0.8	1/1/1	3.5
L320	c.959T>A	p.(Leu320Ter)/L320X	ACT <u>TAA</u> ACA	0.8 _± 0.7	0.5/1	0.6
	c.959T>G		ACT <u>TGA</u> ACA	4.8 _± 2.7	0.5/1/1	2.7
K322	c.964A>T	p.(Lys322Ter)/K322X	ACA <u>TAA</u> AAT	0.1 _± 0.1	1/1	0.1
R335	c.1003C>T	p. (Arg335Ter)/ R335X	AAC <u>TGA</u> TAC	17,0 _± 1,1	1/0,5/1	15,5
Y336	c.1008C>G	p.(Tyr336Ter)/Y336X	CGA <u>TAG</u> TTT	0.3 _± 0.5	1/1/1	0.3

¹Se indican los aminoácidos cuyos codones codificantes se han hallado sustituidos por PTC en la línea germinal de pacientes, utilizando el código de una letra de aminoácido. La numeración de aminoácido es según NP_000305.

²Las variantes de DNA y las sustituciones de aminoácidos se indican siguiendo la nomenclatura de HGVS, así como la nomenclatura de aminoácidos de código de una letra (^{2*}). La secuencia de nucleótidos es según NM_000314.

³Los PTC están subrayados y flanqueados por los codones adyacentes.

⁴Se muestra la eficiencia de *readthrough* en respuesta a G418, como el porcentaje de expresión con respecto al PTEN tipo salvaje.

⁵Puntuación funcional para cada variante de PTEN generada por *readthrough*. Las puntuaciones funcionales se indican en el siguiente orden: R/W/C. 1, a la actividad funcional similar a PTEN de tipo salvaje; 0,5, actividad funcional reducida; 0, actividad funcional muy baja o ausente. Consultar la Figura 28 para ver ejemplos de puntuaciones funcionales.

⁶La puntuación de la eficiencia de *readthrough* completa resulta de combinar la eficiencia de *readthrough* con las puntuaciones funcionales de las variantes (ver Materiales y Métodos).

2.4. Puntuación de eficiencia del *readthrough* de PTEN

Durante el proceso de *readthrough* se incorporan aminoácidos codificados por codones afines respecto al codón con la mutación PTC [212, 214, 280]. La frecuencia de incorporación, para cada tipo de PTC, de aminoácido durante la inducción de *readthrough* en células de mamífero (Tabla 11) [234]. Esto puede afectar a la función de la proteína resultante, sobre todo en el caso de proteínas como PTEN, que muestran funciones deterioradas como consecuencia de una gran variedad de sustituciones de un solo aminoácido a lo largo de su secuencia peptídica.

Resultados

Se realizaron experimentos utilizando un sistema heterólogo de la levadura *S. cerevisiae*, previamente validado [31], para analizar la función *in vivo* de diferentes mutaciones de PTEN generadas por *readthrough*. La Figura 28 muestra los dos tipos de ensayos funcionales realizados en la levadura con las variantes de PTEN más probables obtenidas por *readthrough* de algunas de las mutaciones PTC de PTEN más frecuentes. Por un lado, se realizaron experimentos funcionales mediante el ensayo de crecimiento de gotas con sustituciones de aminoácido de PTEN que imitan los productos de *readthrough* de dichas mutaciones (Figura 28A). Por otro lado, se cuantificó *in vivo* la función catalítica de las variantes de PTEN monitorizando la actividad fosfatasa PIP₃ de PTEN en las células de levadura (Figura 28B). En la Figura 28A se muestran ejemplos sobre el estado funcional de las posibles variantes de PTEN generadas por *readthrough* de las mutaciones PTC R130X (TGA), R233X (TGA), R335X (TGA), S59X (TGA) y S59X (TAA). Como se observa, todas las variantes R233, R335 y S59 muestran una actividad funcional parecida a PTEN tipo salvaje, excepto la mutación R335W que muestra una actividad funcional reducida. Las variantes R130, al igual que las mutaciones PTC R130X, R233X, y R335X, o la mutación catalíticamente inactiva PTEN C124S no mostraron actividad funcional. Definimos la actividad funcional de cada sustitución de aminoácidos como su puntuación funcional o *Functional Score* (FS), tomando valores de FS=1 (actividad funcional similar a PTEN tipo salvaje; por ejemplo, la variante R223C), FS=0.5 (actividad funcional reducida; R335W), o FS=0 (muy baja actividad funcional o ausencia de actividad; R130C) (Figura 28B). Posteriormente, ampliamos este análisis funcional a todas las variantes potenciales de PTEN generadas por *readthrough*. Por un lado, utilizamos los datos obtenidos por Mighell y colaboradores a través de un análisis de alto rendimiento con el sistema de la levadura [281], y por otro lado realizamos experimentos funcionales adicionales con variantes de PTEN de las cuales no había datos funcionales. El resultado de la puntuación funcional de cada variante de PTEN proveniente de *readthrough* se resume en la Tabla 10.

Tabla 11: Frecuencia de incorporación de aminoácidos durante la inducción de *readthrough*

TGA	TAG	TAA
Arg (R): 64.5%	Gln (Q): 86.5%	Gln (Q): 52%
Trp (W): 17.9%	Tyr (Y): 10.8%	Tyr (Y): 47.9%
Cys (C): 17.7%	Lys (K): 2%	

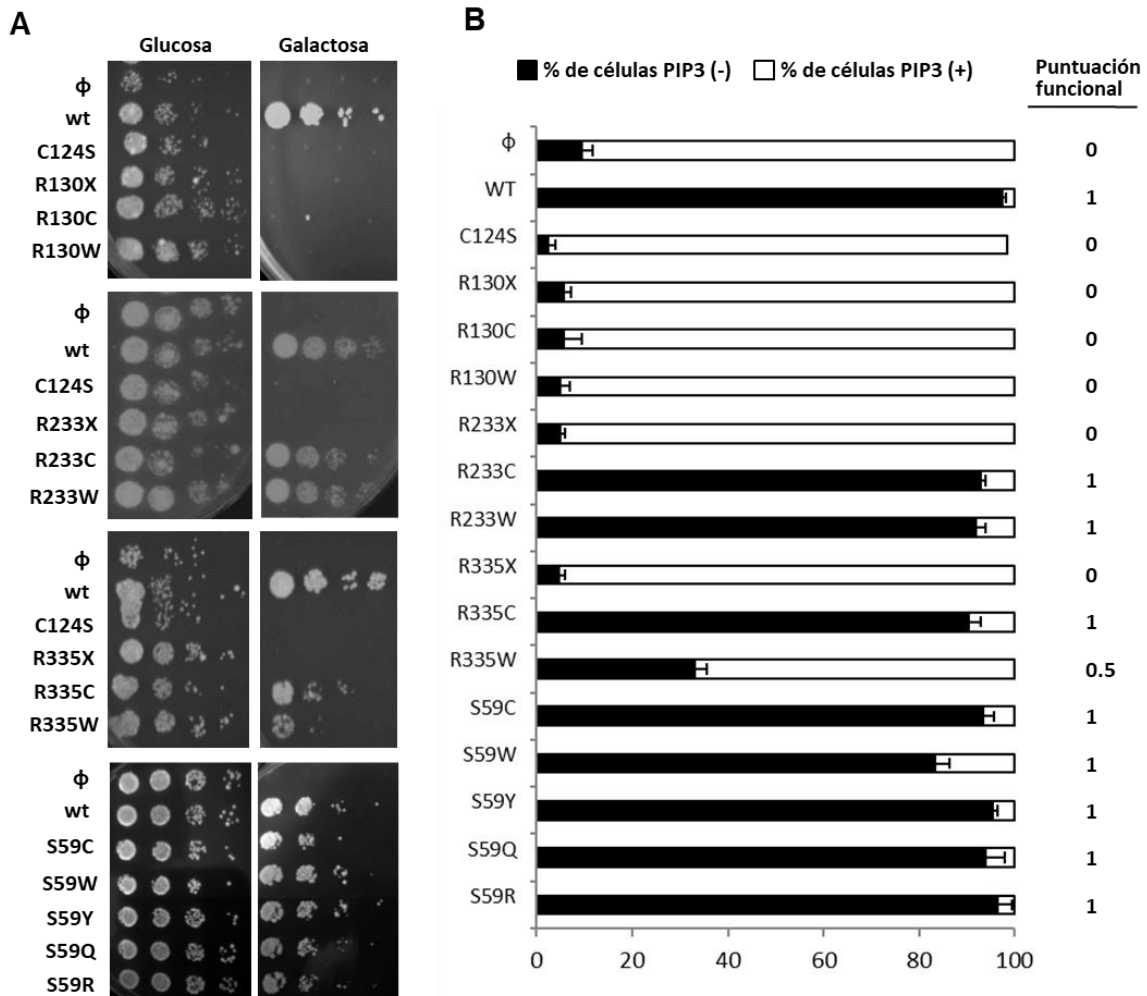


Figura 28. Análisis funcional de variantes de PTEN producidas por *readthrough* utilizando el sistema heterólogo de la levadura. A. Valoración *in vivo* de la función catalítica de las variantes de PTEN mediante el ensayo de crecimiento de gotas. Las levaduras están co-transformadas con diferentes plásmidos que codifican la forma hiperactiva de la subunidad catalítica (p100 α) de PI3K de mamíferos (p100 α -CAAX) y variantes de PTEN, bajo condiciones de crecimiento en glucosa (control, no se inducen las proteínas heterólogas) y bajo condiciones de crecimiento en galactosa (inducción de las proteínas heterólogas). El crecimiento de la levadura se inhibe con la expresión de PI3K (p100 α -CAAX + ϕ , y PTEN (p100 α -CAAX + PTEN-wt) puede revertir esta inhibición, pero no la forma catalíticamente inactiva de PTEN (p100 α -CAAX + PTEN-C124S). Se muestran experimentos con variantes de PTEN que imitan los residuos más probables incorporados por el *readthrough* en las posiciones de PTC de los residuos R130X (TGA), R233X (TGA), R335X (TGA), y S59X (TGA, TAA). En todos los casos, se muestra un experimento representativo de, al menos, dos experimentos independientes. **B. Cuantificación *in vivo* de la función catalítica de las variantes de PTEN.** La actividad de las variantes de PTEN fue cuantificada co-transformando la levadura con plásmidos que codifican GFP-AKT1, el cual se une al PIP₃ de la membrana plasmática. Se monitorizó microscópicamente la eliminación de GFP-AKT1 de la membrana plasmática, siendo un indicativo de la actividad fosfatasa de PTEN. Los resultados son la media de tres experimentos con tres clones diferentes (n>100 células por clon). Las barras se corresponden a la media de la desviación estándar, y se muestra la puntuación funcional (1, actividad funcional similar a PTEN wt; 0.5, actividad funcional reducida; 0, muy poca o ausencia de actividad funcional).

Resultados

Se definió una **puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough*** para cada PTC, la cual proporciona información predictiva sobre el potencial terapéutico de la inducción del *readthrough* del PTCome de PTEN. Esta puntuación tiene en consideración la eficiencia del *readthrough* para cada PTC y el FS de las variantes de PTEN generadas por *readthrough* (FS1, FS2 y FS3), ajustado por la frecuencia de incorporación de aminoácido (AIF1, AIF2 y AIF3) (Tabla 11) asociado a cada variante [234]. La puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* de PTC de PTEN se calculó siguiendo la siguiente formula:

$$\text{Puntuación de la eficiencia funcional del } \textit{readthrough} = \text{Eficiencia de } \textit{readthrough} \times [(\text{FS1} \times \text{AIF1}) + (\text{FS2} \times \text{AIF2}) + (\text{FS3} \times \text{AIF3})]$$

La puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* de PTEN varía de 0 (FS = 0 o sin *readthrough*) a 1 (FS = 1 y máximo *readthrough*). Como se muestra, esta puntuación corrige el potencial de reconstitución funcional de PTEN de algunos PTC, cuyos valores de *readthrough* son óptimos o subóptimos (Figura 29, Tabla 10). Por ejemplo, el PTC G36X (TGA) muestra un *readthrough* subóptimo, con una eficiencia del 19.9%, pero tiene un FS = 0.177, lo que da lugar a una puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* = 3.52. Por otro lado, PTC como S59X (TGA) o R233X (TGA) muestran *readthrough* óptimos y un FS = 1, haciendo que sus puntuaciones de la eficiencia funcional del *readthrough* sean igual a sus eficiencias del *readthrough* (28.9% y 25.2%, respectivamente). Los PTC más frecuentes, R130X, R233X y R335X muestran una puntuación de 12.6, 25.2 y 15.5, respectivamente, lo que indica que son PTC favorables para terapias basadas en *readthrough*.

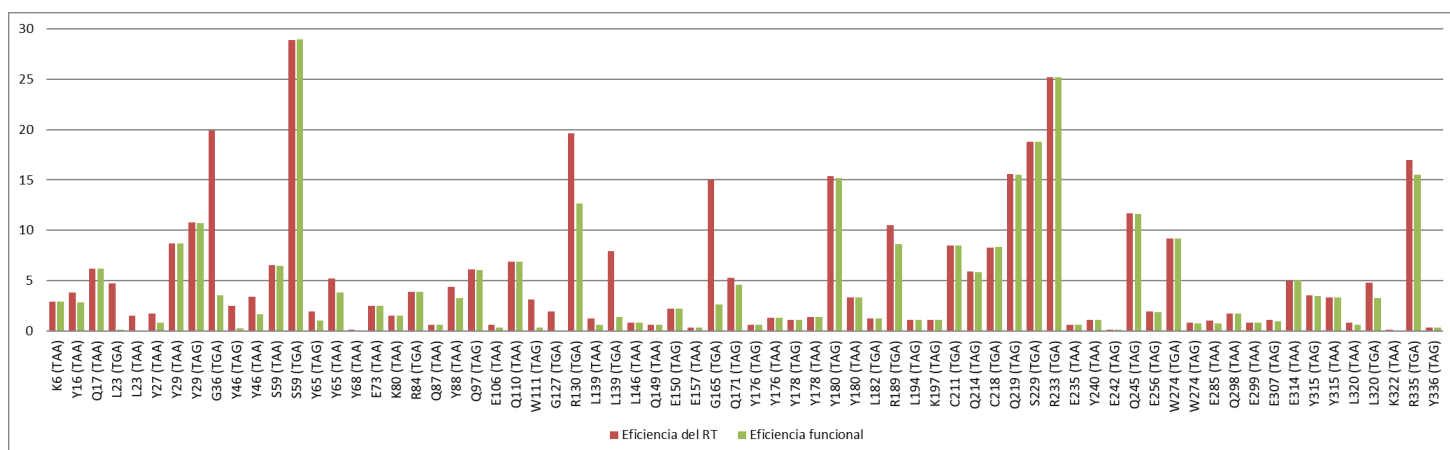


Figura 29. Análisis global de la eficiencia funcional de mutaciones PTC germinales. Eficiencia del *readthrough* (marcado en rojo); puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* (marcado en verde). La puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* ajusta la eficiencia de *readthrough* según la puntuación funcional de las variantes generadas por *readthrough*. La puntuación funcional, así como la eficiencia funcional, se muestra en la Tabla 10.

2.5. Reconstitución funcional de PTEN mediante el *readthrough* de los PTC

Hemos validado nuestro sistema de puntuación evaluando si la inducción de *readthrough* en algunas mutaciones PTC de PTEN reconstituían funcionalmente la proteína PTEN. Para ello se analizó su efecto sobre el estado de fosforilación de Akt co-expresado en células de mamífero y su capacidad para traslocarse al núcleo.

Se seleccionaron aquellas variantes PTC de PTEN con una eficiencia optima o subóptima de *readthrough* y con una puntuación de la eficiencia del *readthrough* por encima de 10, incluyendo aquellos PTC con mayor frecuencia asociados a enfermedades (S59X, R130X, R233X y R335X). Todos los PTC mostraron actividad funcional tras la inducción del *readthrough* con G418 comparable a la actividad funcional de PTEN tipo salvaje (Figura 30A-B), según lo monitorizado a través del estado de p-Akt. La mutación Y176X (TAA), la cual posee una puntuación de la eficiencia del *readthrough* de 1.3 y no responde a la inducción por *readthrough* (1.3% de eficiencia), no mostró actividad funcional significativa (Figura 30A-B).

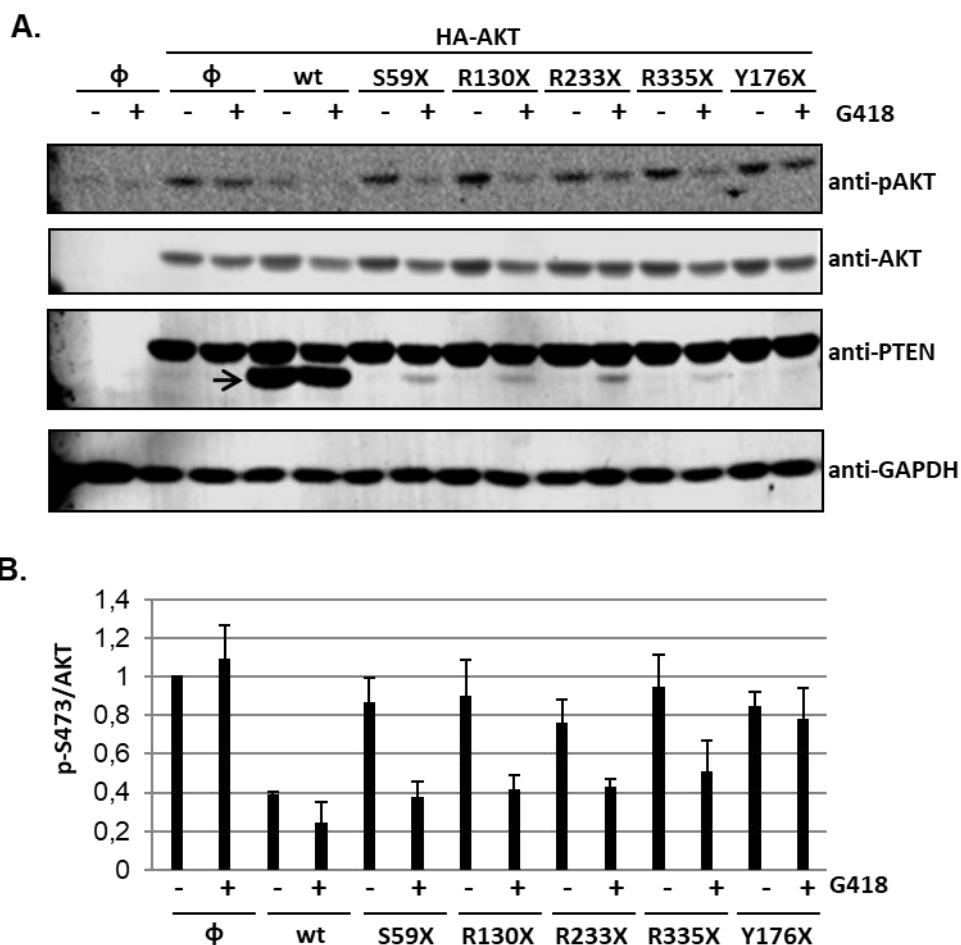


Figura 30. Reconstitución de la actividad funcional PTEN en células. A. Las células COS-7 se co-transfectaron con plásmidos pRK5 que codifican diferentes variantes de PTEN (ϕ , vector vacío; wt, tipo silvestre, S59X, R130X, R233X, R335X y Y176X), solos o en combinación con el plásmido pSG5 HA-AKT. Se incluye la mutación Y176X como ejemplo de PTC que no induce *readthrough*. Tras 24h de incubación, las células se incuban en presencia o ausencia de G418 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24h más. Los niveles de proteína HA-pAKT, HA-AKT y PTEN se midieron mediante Western Blot usando por separado el anticuerpo anti-pAKT (S473), anti-AKT y anti-PTEN (6H2.1). También se usa el anti-GAPDH como control de carga. Las flechas indican la migración de PTEN. **B. Cuantificación del *ratio* pAKT/AKT de cada condición.** La fosforilación de AKT se usa como medida indirecta de la actividad catalítica de PTEN. Los datos son la media de, al menos, dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la media \pm SD.

Además, investigamos la acumulación nuclear de mutaciones PTC de PTEN tras la inducción del *readthrough*. Para estos experimentos, se utilizó una variante Q17P PTEN-GFP que se acumula en el núcleo [52]. Como se observa, en el *background* de Q17P, las mutaciones R130X y R233X se detectaron dentro del núcleo tras la inducción de *readthrough*, pero no la mutación Y176X (Figura 31A). Estos datos concuerdan con la detección de dichas variantes tras la inducción del *readthrough* (Figura 31B).

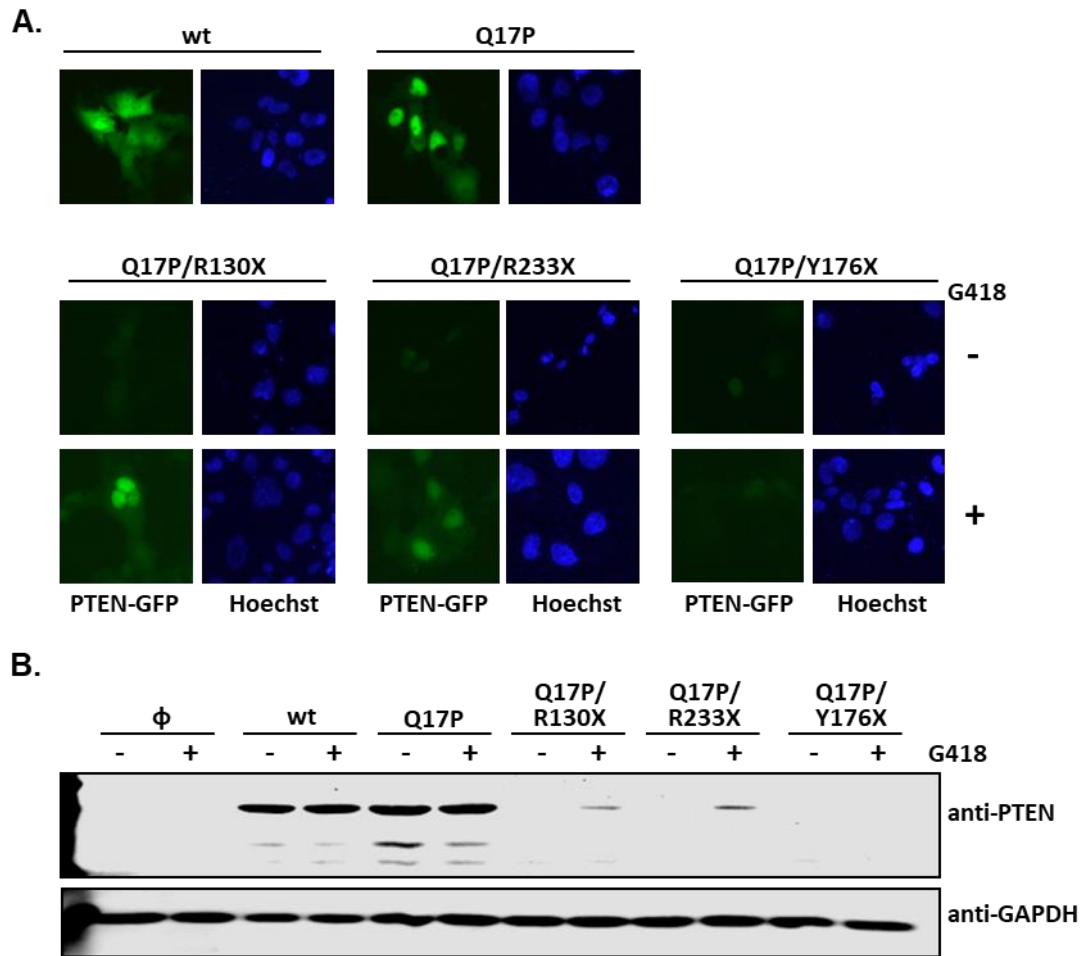


Figura 31. Reconstitución de la acumulación nuclear de PTEN. Las células COS-7 son transfectadas con diferentes variantes PTEN-GFP (etiqueta de GFP en la región C-terminal). Tras 24h de incubación las células se incuban en presencia o ausencia de G418 (200 µg/ml) durante 24h más. **A.** Las células se visualizan directamente con microscopía de fluorescencia. Las imágenes de arriba muestran la localización de PTEN-GFP wt y Q17P en células sin tratar. Las imágenes de abajo muestran la localización de las diferentes mutaciones en células tratadas y sin tratar con G418. Para cada variante de PTEN-GFP, las imágenes de la izquierda muestran la localización de PTEN-GFP (verde), y las imágenes de la derecha muestra la localización nuclear (azul, Hoechst). **B. Monitorización de la reconstitución inducida por *readthrough* de las variantes PTEN-GFP.** Western Blot de lisados de células COS-7 transfectadas con los plásmidos correspondientes. Los niveles de proteínas se analizaron usando el anticuerpo anti-PTEN (6H2.1) y anti-GAPDH como control de carga. En todos los casos, se muestra la imagen de un experimento representativo de, al menos, dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que la inducción del *readthrough* de algunos PTC tiene competencia para reconstituir proteínas funcionales de longitud completa de PTEN, tanto en términos de actividad fosfatasa PIP₃ en células como en el transporte entre el citoplasma y el núcleo.

3. Análisis global de mutaciones hereditarias de PTEN: implicaciones en síndromes tumorales y de autismo.

3.1. Patrón de distribución de mutaciones *missense* de PTEN en pacientes con ASD y PHTS.

Se han identificado 208 mutaciones *missense* en la línea germinal de PTEN vinculadas a enfermedades, asociadas principalmente con PHTS y variantes relacionadas (agrupado como PHTS) y, en menor medida, con ASD y síndromes de retraso del desarrollo (agrupado como ASD) (Figura 32A; Tabla 12). Alrededor del 14% de mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN se han encontrado tanto en pacientes con PHTS como con ASD (Figura 32A; Tabla 12). Esto indica una penetrancia variable para las mutaciones de PTEN en muchos casos [8, 282, 283].

El número de mutaciones germinales *missense*, comparado con los otros tipos de mutaciones de PTEN (mutaciones *nonsense*, deleciones, inserciones), es mayor en pacientes con ASD que en pacientes con PHTS [9, 284]. Las mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN identificadas se distribuyen a lo largo de los dominios PTP y C2, siendo la distribución de mutaciones *missense* predominante en el dominio PTP tanto en pacientes con PHTS como en ASD (Figura 32B). Esta observación concuerda con la importancia de la actividad catalítica de PTEN para ejercer sus funciones biológicas. Al comparar los tres *loops* catalíticos del dominio PTP de PTEN (*loop* WPD, aminoácidos 88-98; *loop* P, aminoácidos 121-131; *loop* TI, aminoácidos 160-171), el número de sustituciones de aminoácidos en el *loop* P es 5 veces mayor en mutaciones asociadas a PHTS que a ASD. Sin embargo, al comparar los motivos de localización subcelular (NLM, aminoácidos 6-32), se observa un aumento de sustituciones de aminoácidos en ASD respecto a PHTS (Figura 32C).

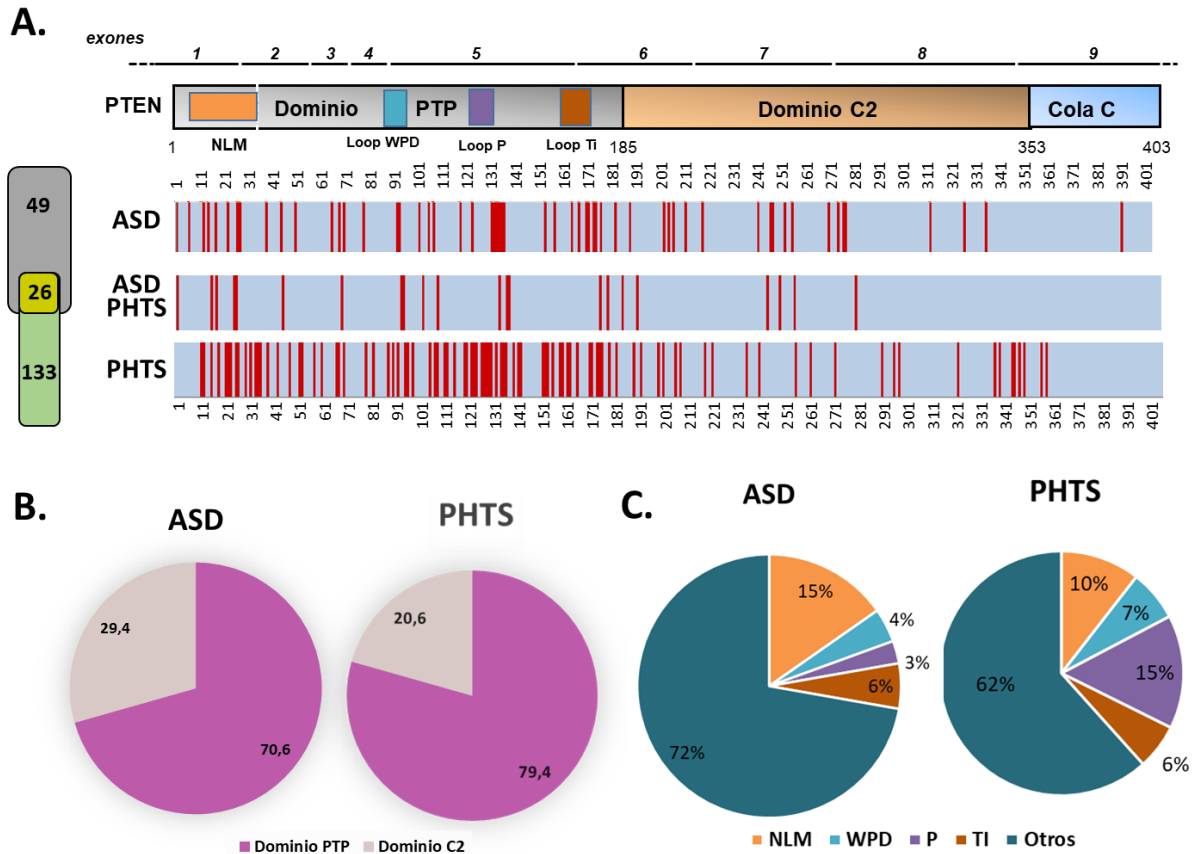


Figura 32: A. Representación de los dominios de la proteína PTEN y la distribución de mutaciones *missense* de línea germinal de PTEN detectada en pacientes con ASD y PHTS. En la parte superior se muestran los exones de PTEN, los dominios de la proteína (los números se corresponde con la numeración de aminoácidos de PTEN: dominio PTP, aminoácidos 1-185; dominio C2, aminoácidos 186-353; cola C-terminal, aminoácidos 354-403), NLM (aminoácidos 6-32) y los loops catalíticos (loop WPD, aminoácidos 88-98; loop P, aminoácidos 121-131; loop TI, aminoácidos 160-171). En los diagramas de barras (color rojo), se muestra la distribución de mutaciones *missense* de línea germinal de PTEN detectada en; pacientes con ASD (diagrama superior), pacientes con ASD y PHTS (diagrama de en medio) y en pacientes con PHTS (diagrama inferior). Las áreas azules indican los residuos que no son objeto de mutaciones. **B. Distribución de mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN asociadas a ASD, ASD-PHTS y PHTS en los dominios PTP y C2.** El porcentaje ha sido calculado respecto a los residuos 1-353. **C. Distribución de mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN en los loops catalíticos del dominio PTP (loop WPD, aminoácidos 88-98; loop P, aminoácidos 121-131; loop TI, aminoácidos 160-171) y en la región NLM (aminoácidos 6-32).**

Se ha denominado frecuencia relativa aproximada al número de veces que cada sustitución de aminoácidos ha sido encontrada en pacientes. En general, el patrón de frecuencia relativa aproximada de mutaciones individuales es distinto en pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS, aunque las frecuencias agrupadas de mutaciones en el dominio PTP y C2 son similares (Figura 33). En la cola C-terminal solo se han encontrado tres mutaciones en pacientes con PHTS o ASD (PHTS: P354Q y N356D; ASD: P391S).

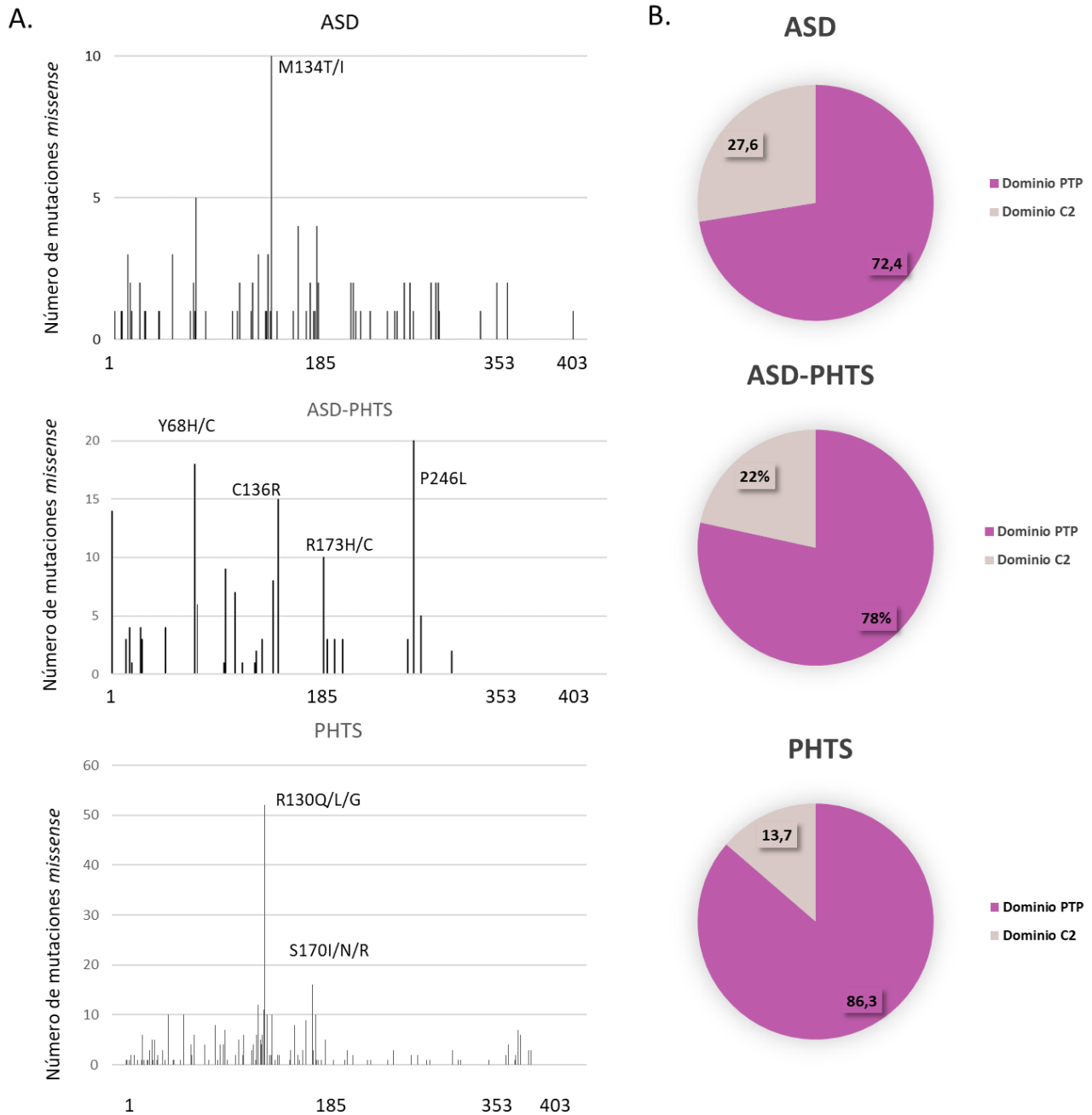


Figura 33. A. Frecuencia de las mutaciones *missense* de línea germinal de PTEN detectada en pacientes. Se muestra la frecuencia relativa aproximada de mutaciones a lo largo de la secuencia de aminoácidos de PTEN (número de veces que cada sustitución de aminoácidos ha sido encontrada en pacientes). En los gráficos de la izquierda, se muestra el número de veces que una mutación *missense* de PTEN ha sido encontrado en pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS. Los números en el eje de abscisas corresponden a la numeración de los aminoácidos de PTEN. **B. Frecuencia relativa aproximada de mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN asociadas a ASD, ASD-PHTS y PHTS en los dominios PTP y C2.** El porcentaje ha sido calculado respecto a los residuos 1-353. Datos procedentes de la base de datos HGMD, COSMIC y literatura (ver referencias suplementarias).

3.2. Patrón funcional de mutaciones *missense* de PTEN encontradas en la línea germinal de pacientes con ASD y/o PHTS.

Utilizando un sistema heterólogo de la levadura como una plataforma de alto rendimiento para evaluar *in vivo* la actividad fosfatasa PIP₃ de PTEN (apartado de Materiales y Métodos), hemos realizado un análisis funcional de las mutaciones *missense* de PTEN asociadas a la línea germinal, incluyendo mutaciones encontradas en ASD (49 mutaciones), en ASD-PHTS (26 mutaciones) y en PHTS (133 mutaciones). En nuestro modelo de la levadura, la expresión de una forma hiperactiva de la subunidad catalítica de PI3K (p110 α -CAAX) impide el crecimiento celular. La co-expresión de PTEN silvestre contrarresta este efecto, mientras que mutantes de PTEN catalíticamente inactivos o con pérdida de función no son capaces de rescatar el crecimiento de la levadura en presencia de p110 α -CAAX (Tabla 12). Se ha monitorizado la actividad funcional de PTEN mediante el crecimiento de la levadura (Tabla 12; ver ejemplos en Figura 35) y mediante la ubicación en la membrana plasmática de un gen *reporter* GFP-Akt (Figura 34; Tabla 12) que se une a PIP₃ [31, 278], y hemos comparado el impacto funcional de las mutaciones en PTEN y PTEN-L. Hemos establecido tres categorías funcionales para las mutaciones de PTEN: actividad completa = rescate de crecimiento total (+++, ++), 0-20% GFP-Akt en la membrana; actividad reducida = rescate de crecimiento parcial (+, +/-), 21-70% GFP-Akt en la membrana; y sin actividad = sin rescate de crecimiento (--), 71-100% GFP-Akt en la membrana.

Analizando los datos de forma global, se observa una mayor pérdida de actividad funcional de PTEN en pacientes PHTS y ASD-PHTS que en ASD, tanto con los datos obtenidos por la localización de GFP-Akt en la membrana plasmática (Figura 34A) como con los datos obtenidos mediante la monitorización del ensayo de crecimiento de la levadura (Figura 34B). Casi un 60% y un 50% de las mutaciones de la línea germinal de PTEN de pacientes PHTS y ASD-PHTS, respectivamente, no presentan actividad funcional, frente a un 31% de mutaciones de pacientes ASD. Por otra parte, el 57% de las mutaciones ASD presentan actividad funcional, frente a un 25% y un 23% de mutaciones de pacientes PHTS y ASD-PHTS, respectivamente.

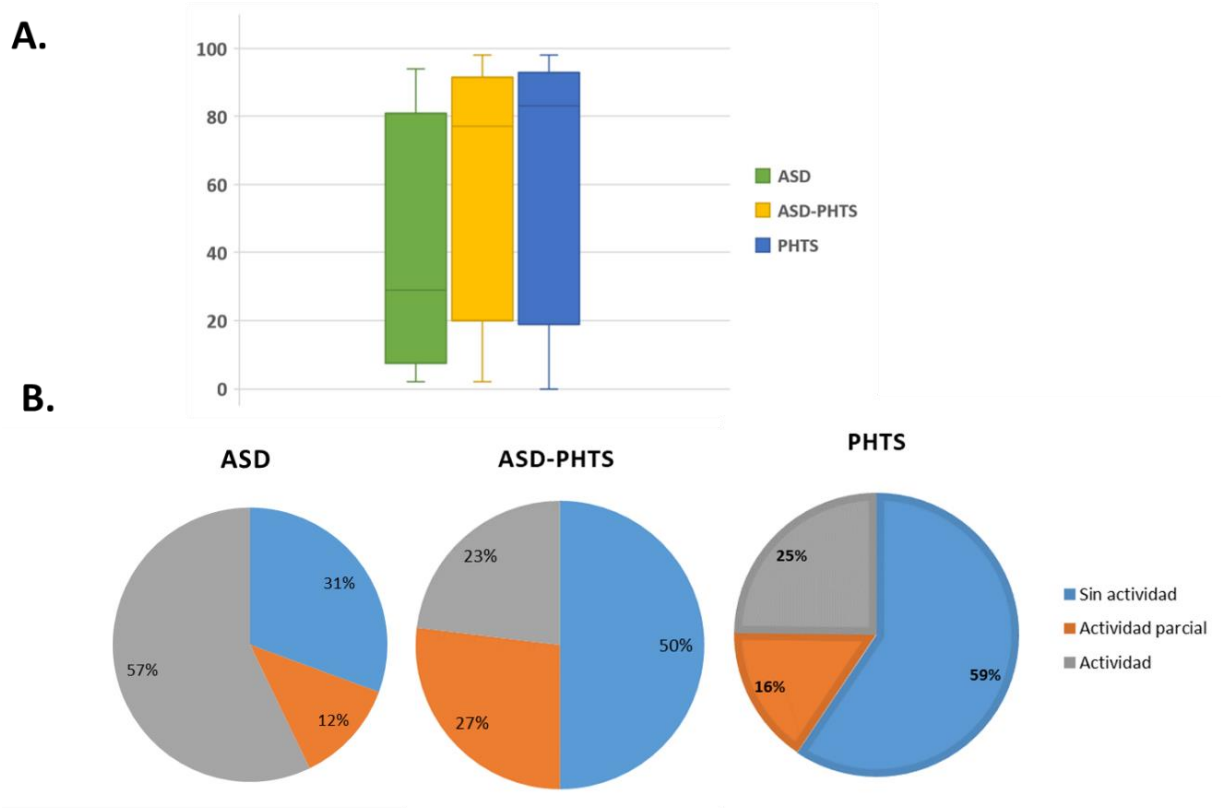


Figura 34. Análisis comparativo de las mutaciones de la línea germinal de PTEN en pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS. A. Diagrama de cajas de la actividad funcional de mutaciones de la línea germinal de PTEN en pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS, según la ubicación del gen reportero GFP-Akt en la membrana plasmática. Los bigotes representan el mínimo y máximo de todos los datos; las cajas representan los valores entre el cuartil 1 y 3, y la línea dentro de las cajas representa la mediana. Los datos se corresponden con los datos de la columna 4 de la Tabla 12. Actividad total, 0-24% de células PIP₃ (+); actividad parcial, 25-74% de células PIP₃ (+); no actividad, 75-100% de células PIP₃ (+). B. Porcentaje de la actividad funcional de mutaciones de la línea germinal de PTEN en pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS, monitorizada mediante el crecimiento de la levadura. Las categorías funcionales se han establecido de la siguiente manera: actividad completa= rescate de crecimiento total (+++, ++), 0-20% GFP-Akt en la membrana; actividad reducida = rescate de crecimiento parcial (+, +/-), 21-70% GFP-Akt en la membrana; y sin actividad= sin rescate de crecimiento (--), 71-100% GFP-Akt en la membrana.

3.3. Análisis comparativo de las mutaciones de la línea germinal en PTEN y PTEN-L

La expresión de la isoforma larga de PTEN (PTEN-L) revierte la toxicidad causada por PI3K de forma similar a PTEN silvestre (Figura 35; Tabla 12).

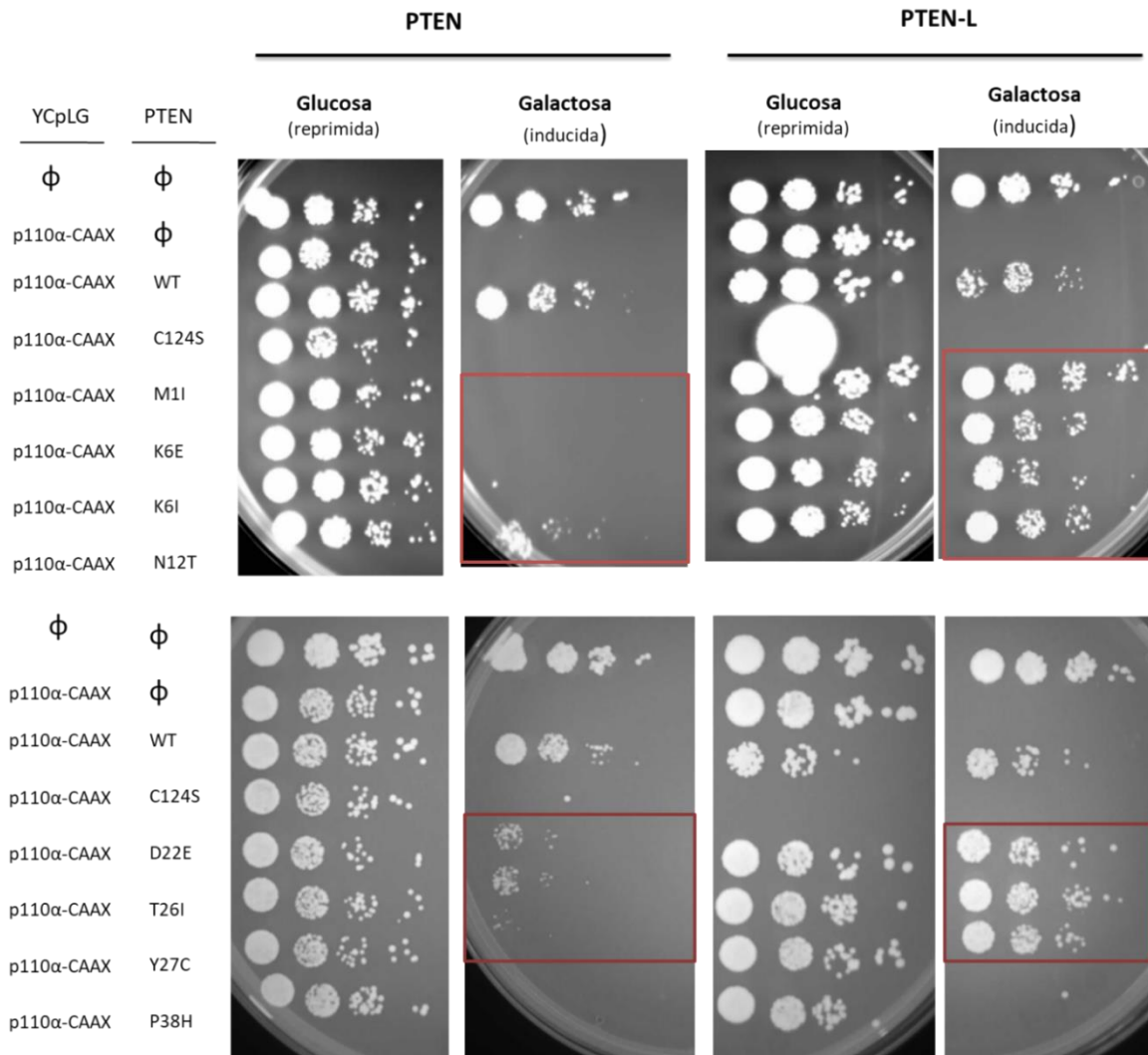


Figura 35. Ejemplo de análisis funcional comparativo en la levadura de mutaciones de pacientes asociadas a ASD en PTEN y PTEN-L. Se induce la toxicidad en la levadura mediante la expresión inducible de la subunidad catalítica de PI3K (p100) en galactosa, y dicha toxicidad es revertida mediante la co-expresión de PTEN tipo silvestre (wt). Las mutaciones en los recuadros en rojo son catalíticamente inactivas (M1I, K6E, K6I, P38H) o parcialmente inactivas en PTEN (N12T, D22E, T26I, Y27C), pero son totalmente activas en PTEN-L, excepto P38H. En condiciones de no expresión (glucosa), las proteínas no se expresan y sirve para monitorizar que en todos los casos se plaquean la misma cantidad de células.

Analizando los datos obtenidos sobre la actividad funcional en PTEN y PTEN-L, se observa una mayor actividad funcional de PTEN-L respecto a PTEN (Figura 36 superior). Hemos descubierto que mutaciones de pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS, que confieren a PTEN

Resultados

pérdida de actividad fosfatasa PIP₃ en células, no afectan a la actividad catalítica de PTEN-L (ASD, 57% de mutaciones con actividad funcional en PTEN frente a un 85% de mutaciones con actividad funcional en PTEN-L; ASD-PHTS, 28% de mutaciones con actividad funcional en PTEN frente a un 65% de mutaciones con actividad funcional en PTEN-L; PHTS, 8% de mutaciones con actividad funcional en PTEN frente a un 33% de mutaciones con actividad funcional en PTEN-L) (Figura 36; Tabla 12). Esto sugiere una mayor tolerancia a la mutación en PTEN-L que en PTEN.

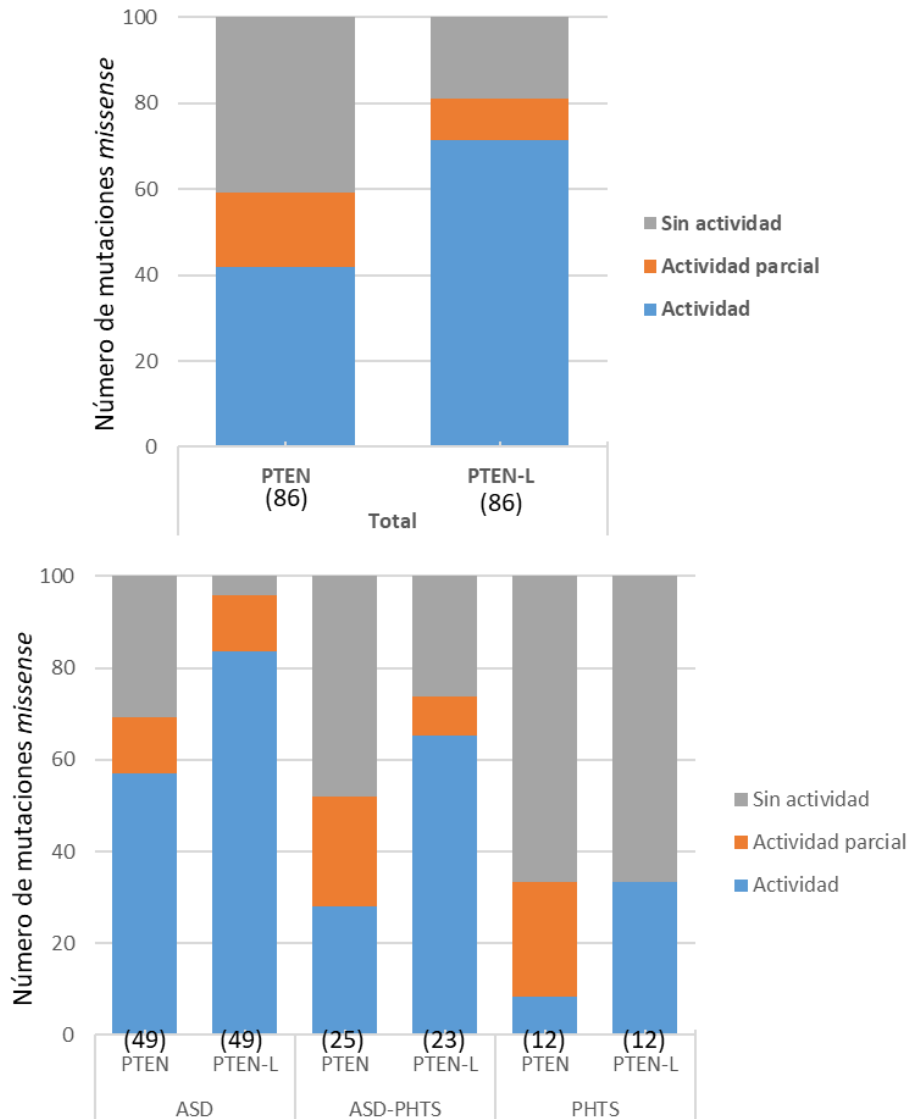


Figura 36. Comparativa de la actividad funcional de mutaciones *missense* de la línea germinal en PTEN y PTEN-L, monitorizada mediante el crecimiento de la levadura. El gráfico superior, indica la actividad funcional de todas las mutaciones analizadas en PTEN y PTEN-L; en el grafico inferior, se indica la actividad funcional de mutaciones missense en PTEN y PTEN-L en pacientes ASD, ASD-PHTS y PHTS. El número entre parentesis representa el número total de mutaciones analizadas.

Tabla 12: Listado de las mutaciones en PTEN y PTEN-L de ASD y PHTS analizadas *in vivo*.

Mutación ¹	Enfermedad ²	Actividad de PTEN ³	Gotas/Ojimetr ⁴	Actividad de PTEN-L ³
PTEN silvestre		+++	++++/6	+++
M1I (*)	ASD, CS	--	----/93	+++
M1V	ASD	--	----/90	++
M1L (*)	ASD, Cáncer de mama y/o ovarios	--	---/98	
K6E	ASD	--	+---/89	++
K6I	ASD	--	+---/93	++
N12T	ASD	++	++++/7	++
N12I	CS	-	----/96	--
K13E	CS	-	----/95	++
R14G	ASD	--	++--/90	++
R15S (*)	ASD,CS	--	----/90	+-
Y16H	PHTS	-	+++--/17	++
Q17E(*)	ASD,CS	+/-	+---/45	--
D19Y	Cáncer de mama	+/-	10	++
D22G	CS/BRRS	-	----/93	--
D22E	ASD	+-	+++--/89	++
L23F	CS	+/-	++--/55	--
L23V	CS	-	----/97	--
D24G	PHTS	-	----/79	
D24H	CS	-	----/90	--
D24V	CS	-	----/94	--
D24Y(*)	DD;BRRS	--	----/96	--
L25F(*)	ASD,CS	--	----/94	--
T26I	DD,macro	+-	++--/70	++
T26P	CS	-	95,92	
Y27N	PHTS	-	----/95	--
Y27C	ASD	--	----/92	++
P30L	CS	+	+++--/9	+
I32N	CS	-	----/90	--
A34D	BRRS	-	----/95	
M35R	JPS	-	----/93	
M35T	PLS	+/-	----/66	
M35V	CS	-	----/93	

Resultados

G36R	CS	-	----/96	
P38H	ASD	--	----/92	--
A39P	CS	-	----/91	
A39T	CS		----/97	
E43K	CS	+	+++/-24	
G44D(*)	ASD,DD/MR	--	----/85	++
N48K	CS	-	----/95	
I50T	DD	++	+++/-44	++
D52G	PHTS	+	++++/-20	
V53I	CS	-	+----/11	
D58G	Cáncer de mama	+	/2	
H61D	Vh	-	----/92	
H61R	PHTS	-	----/82	
H61Y	PHTS	+	++++/4	
Y65C	ASD	++	++++/7	++
I67R	CS	+/-	----/55	
Y68C(*)	ASD,CS	+/-	89	++
Y68H(*)	ASD,CS	+/-	+----/86	++
Y68N	ASD	--	----/94	+/-
Y68D	PS	-	----/78	
L70P	CS	+	----/76	
L70V	ASD	+	+++/-6	++
T78A	ASD	++	+++/-5	++
A79T	Cáncer de mama/ Cáncer	+	/7	
N82T	Cáncer de mama	-	----/93	
Y88C	PHTS	+	+++/-8	
Y88H	LDD,PHTS	+/-	+++/-53	
F90S	Neuropatía motora		----/83	
D92A	PHTS	-	----/91	
D92E	CS	-	----/94	
D92N(*)	ASD,CS	+	30	++
H93R(*)	ASD,CS	+/-	+++/-46	++
H93Y(*)	ASD,CS	--	----/91	++
P95L	CS	-	----/95	
P96Q	CS	-	+----/82	
P96R	CS	-	----/93	

L98R	<i>PHTS</i>	-	89	
I101T(*)	<i>DD,PHTS</i>	--	++++/6	+++
I101F	<i>Anomalías congenitales múltiples, con ASD</i>	++	++++/4	++
C105F	<i>ASD</i>	--	----/93	++
C105Y	<i>BRRS</i>	+/-	----/94	
D107N	<i>Cáncer de mama</i>	+	+++/-0	
D107G	<i>DD</i>	++	+++--/27	++
D107Y	<i>DD,macro</i>	--	----/86	++
D107V(*)	<i>ASD, CS</i>	+/-		
L108P	<i>PHTS</i>	+/-	----/90	
W111R	<i>PS</i>	-	----/89	
L112P	<i>CS,PHTS</i>	-	----/92	
L112V	<i>CS</i>	+	+++--/9	
D115N	<i>Cáncer de mama</i>	+	+++/-1	
H118P	<i>ASD</i>	++	+++--/52	++
V119L	<i>Múltiples cánceres</i>	+/-	+++--/36	
A120E	<i>PHTS</i>	-	----/89,83	
I122S	<i>CS</i>	-	----/90	
H123Q	<i>ASD</i>	--	----/89	--
H123D	<i>CS</i>	-	----/89	
H123R	<i>CS</i>	-	----/94	
H123Y	<i>Cáncer de mama</i>		79	
C124G	<i>Cáncer</i>		----/87	
C124R	<i>CS</i>	-	----/95	
C124S	<i>CS</i>	-	----/93	
C124W	<i>CS</i>	-	----/93	
C124Y	<i>CS</i>	-	----/93	
A126P	<i>CS</i>	+/-	----/ 46,96	
G127R	<i>CS</i>	-	/94	
K128E	<i>PHTS</i>	-	----/94	
K128N	<i>Poliposis Gastrointestinal</i>	-	----/81	
G129E	<i>CS</i>	-	/95	
G129R	<i>CS</i>	+/-	----/72	
G129V	<i>CS,BRRS</i>	-	----/89	

Resultados

R130G	CS	-	----/82	
R130L	CS	-	91	
R130P	<i>Cáncer</i>		----/88	
R130Q (Prostata)	CS	+/-	----/92	
T131I	ASD	--	----/94	++
G132D(*)	ASD,CS	--	/77	--
G132A	PHTS	+/-	----/ 47,95	
G132V (Prostata)	PHTS	-	----/98	
V133I	ASD	++	/3	++
M134I	<i>Incapacidad de aprendizaje</i>	-+	+++--/56	+-
M134T	DD/MR	+++	+++--/54	++
M134R (Prostata)	BRRS	+/-	----/ 55,97	
I135K	CS	+/-	----/ 61,94	
I135R(*)	ASD/BRRS	--	----/92	--
I135V(*)	MR/ASD, BRRS	++	++++/4	++
C136R(*)	MR/ASD,CS	--	----/91 ; 87	--
C136Y	CS	-	----/95	
L139F	CS	+/-	----/ 64,92	
H141R	CS	+	+++--/18	
R142P	CS	-	----/94	
R142W	CS	+	+++--/4	
A151D	PHTS	-	/92	
L152P	CS	-	/98	
D153N	<i>Cáncer de mama</i>	+	+++--/14	
D153G	ASD	+++	+++--/6	+++
Y155H	CS	-	----/95	
Y155N (Prostata)	PHTS	+	/98	
Y155C	CS	-	----/96	
E157G	ASD	++	+++--/13	+++
V158L	<i>Múltiples cánceres</i>	+/-	+++--/7	

R159G	CS	-	----/81	
R159T	CS	-	----/96	
R161K	<i>Cáncer de mama</i>	+	+++/-8	
D162E	CS	-	----/84	
K164N	ASD	++	++++/7	+++
G165E	CS	-	----/84	
G165R	CS	-	----/97	
G165V	CS	-	----/84	
T167N	ASD	+++	/17	+++
S170T	ASD	++	+++/-18	++
S170I	CS	-	62	
S170R	CS	-	----/90	
Q171R	CS	-	----/97	
Q171E	ASD	--	+---/48	-+
R173C	ASD	+/-	+++/-25; 3	+/-
R173H(*)	<i>ASD,DD/MR,CS /BRRS</i>	+++	+++/-54	++
R173C	<i>BRRS</i>	+/-	+++/-25; 3	
R173P	<i>LDD</i>	-	/96	
Y174N (Prostata)	<i>Cáncer</i>		89,95	
Y174H	<i>ID</i>	++-	+++/-29	++
V175G	<i>Cáncer de mama</i>	-	/85	
Y176C(*)	<i>ASD,PHTS</i>	++	++++/2	++
Y178C	<i>Anormalidades del sistema nervioso</i>		++++/7	
L181P	CS	-	----/88	
L182S(*)	<i>DD,macro,CS</i>	++	6	++
Y188H(*)	<i>ASD,CS</i>	++	6	++
Y188C	<i>Síndrome Mielodisplásico</i>		/1	
Y188H	CS	+/-	+++/-37; 6	
V191G	<i>Cáncer de mama</i>		48	
M198K	<i>PHTS</i>	-	+---/84	
F200S	<i>CS/BRRS</i>	+/-	+++/-71	
F200V	<i>Cáncer de</i>	+/-	/37	

Resultados

	<i>mama/ovario</i>			
T202I	<i>DD/MR</i>	++	++++/8	++
P204S	<i>ID/Parkinson</i>	++	++++-/12	+++
M205V	<i>CS</i>	+	++++-/18	
F206L	<i>ASD</i>	++	/2	++
S207R	<i>Cáncer de mama</i>	+++	++++-/6	
C211W	<i>ASD</i>	++	++++/7	++
V217D	<i>CS</i>	+	+++-/74	
C218G	<i>ASD</i>	++	/17	++
L220V	<i>CS</i>	+	/11	
R234Q	<i>Glioma and meningioma</i>	+/-	++++/ 6,9	
M239R	<i>Anormalidades del sistema cardiovascular</i>		++++/10	
M239T	<i>CS</i>	+	/5	
F241L	<i>ASD</i>	++	++++/3	++
F241S(*)	<i>ASD,PHTS</i>	--	----/93	+/-
P246L(*)	<i>ASD,BBRS</i>	++	++++/64	++
L247S	<i>DD</i>	+/-	+++-/46	++
D252G(*)	<i>ASD,CS</i>	++	++++-/10	++
D252V	<i>ASD</i>	--	+---/67	+/-
K254T	<i>CS</i>	+	++++/10	
V255A	<i>ASD</i>	++	++++/11	+++
K260R	<i>CS/BRRS</i>	+	++++-/22	
M270T	<i>Leucoence/DD</i>	++	+---/41	++
W274L	<i>DD/MR</i>	++	76; 42	++
N276S	<i>ASD</i>	+++	++++/12	++
T277I	<i>MacroC</i>	-+	++++/18	++
T277R(*)	<i>MR/ASD,CS</i>	--	+---/67	--
K289E	<i>CS</i>	+	++++/	
S294R	<i>Susceptible a CC</i>		++++/20	
C296R	<i>Anomalias vascular</i>		++++-/7	
D312G	<i>ASD</i>	+	/9	++
L320S	<i>CS</i>	-	/88	
D326N	<i>ASD</i>	+/-	+---/70	
R335Q	<i>ASD</i>	++	64	++
R335L	<i>CS</i>	+/-	++++-/37	

F337S	CS	+	+++/-5	
P391S	ASD	++	/2	++
K342N	CS	+/-	+++/-16	
V343E	CS	-	----/70	
L345P	CS/BRRS	-	----/91	
L345V	CS	+	++++/9	
F347L	CS	+	++++/6	
P354Q	CS	-	+---/9	
N356D	CS	-	+---/8	

¹Mutaciones encontradas en pacientes con ASD y PHTS (marcado en gris); (*) mutaciones asociadas a pacientes con ASD y PHTS

²ASD, trastorno del espectro autista; BRRS, síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba; CS, síndrome de Cowden; DD/MR, retraso en el desarrollo/mental; ID, discapacidad de inteligencia; JPS, síndrome de poliposis juvenil; LDD, enfermedad de Lhermitte-Duclos; Leucoence, leucoencefalopatía; Macro, macrocefalia; PHTS, síndrome hamartoma tumoral de PTEN; PS, síndrome de Proteus; PLS, síndrome similar al Proteus.

³Determinado por el ensayo de crecimiento de gotas. +++, rescate de crecimiento total; +/-, rescate de crecimiento parcial; --, sin rescate de crecimiento.

⁴Determinado por el ensayo de GFP-PH Akt; +, actividad total (0-24% de células PIP₃ (+)); +/-, actividad parcial (25-74% de células PIP₃ (+)) o discrepancia entre las gotas y el ensayo GFP; -, no actividad (75-100% de células PIP₃ (+)).

Vh,

DISCUSIÓN

1. Protocolo de mutagénesis dirigida estandarizado

El estudio funcional de las proteínas afectadas por las alteraciones genéticas presentes en pacientes con cáncer o enfermedades hereditarias es esencial para el desarrollo de terapias eficaces [285, 286]. Sin embargo, todavía existe una gran brecha entre la recopilación de información genética a partir de muestras biológicas de pacientes y las posibilidades experimentales para estudiar y analizar las propiedades de las proteínas mutadas. Para poder analizar dichas mutaciones, un paso importante es generar colecciones de mutaciones de cDNA en plásmidos de expresión apropiados [279], y la mutagénesis dirigida se ha convertido en el método ideal para realizar este abordaje. El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha supuesto un gran avance en el desarrollo de procedimientos experimentales de mutagénesis dirigida [287, 288]. La mutagénesis de saturación es una metodología poderosa para crear colecciones definidas de variantes de proteínas para la experimentación clínica, y existen numerosos métodos de mutagénesis basados en la PCR [289, 290]. Sin embargo, la efectividad se ve comprometida cuando se requiere un gran número de mutaciones diferentes.

El método de mutagénesis dirigida basada en PCR más utilizado en la actualidad es el método *Quikchange*. Según este método, los oligonucleótidos mutagénicos tienen que tener determinadas características: longitud entre 25-45 bases, temperatura de fusión igual o mayor a 78°C (según la fórmula: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - (675/N) - \% Mismatch$; siendo N el número de bases del oligonucleótido), contenido en GC mínimo de 40%, y presencia de una o más bases de C o G en sus extremos. Los oligonucleótidos resultantes suelen ser largos, lo que aumenta la posibilidad de creación de estructuras secundarias que dificultan la reacción de PCR y el coste de cada mutagénesis.

Se han desarrollado métodos alternativos para aumentar la eficacia de la mutagénesis mediante PCR [291-293], pero el diseño es bastante complejo, los oligonucleótidos siguen siendo largos y presentan unos elevados costes y una metodología compleja. Estas limitaciones son importantes cuando se necesita generar un número elevado de mutaciones. En esta tesis, proporcionamos una breve visión de la utilidad de mutaciones específicas en el análisis experimental de las funciones de PTEN, una proteína relevante en enfermedad. Describimos un método estandarizado, rápido y simple de mutagénesis para realizar sustituciones de aminoácidos únicas y múltiples, basado en el método *Quikchange* (PCR inversa de un solo paso y tratamiento con la

enzima de restricción DpnI) (Figura 22; Tabla 8) [273, 274]. Nuestros resultados, validados con varios tipos de plásmidos y con cDNAs que codifican dos proteínas diferentes, indican que la utilización de oligonucleótidos mutagénicos estándar de 29 nucleótidos de longitud, independientemente de su T_m y contenido en G/C, proporcionan unas condiciones de amplificación y mutagénesis eficientes. Creemos que este método de mutagénesis dirigida estandarizada es ventajoso para obtener un gran número de mutaciones diferentes, y aplicable a cualquier proteína de interés, aunque la amplificación de cada cDNA puede tener distintos requerimientos y necesitar optimización.

2. Respuesta al *readthrough* de los PTCs de PTEN

El gen *PTEN* es uno de los supresores tumorales más importantes, con una incidencia global de mutaciones asociadas a cáncer sólo superada por TP53. Como ocurre con otros supresores tumorales, existe un gran número de mutaciones somáticas y de línea germinal en *PTEN* asociadas a enfermedad que introducen en la proteína PTC, produciendo proteínas truncadas e inestables que no son capaces de inhibir la proliferación celular o promover la apoptosis (Figura 15 y 17). La terapia supresora de mutaciones *nonsense* generadoras de PTC es capaz de suprimir la terminación de la traducción causada por dichas mutaciones mediante el uso de agentes farmacológicos, como algunos antibióticos aminoglucósidos, permitiendo el *readthrough* del PTC. Se han llevado a cabo una gran variedad de estudios donde se demuestra la eficacia de los compuestos inductores de *readthrough* en modelos experimentales de diversas enfermedades genéticas, como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la fibrosis quística (CF), entre otras [207, 210, 215, 217, 219]. En el caso del cáncer, se ha evaluado el potencial del *readthrough* de varios PTC que afectan a los genes supresores tumorales *TP53* y *APC*, con resultados prometedores en la restauración funcional de ambos genes [208, 218, 249, 261]. Sin embargo, hasta la realización de nuestro trabajo, no se habían llevado a cabo estudios de *readthrough* en *PTEN*.

En este trabajo hemos definido la colección de mutaciones PTC (*PTCome*) de PTEN asociadas a enfermedad, y hemos realizado un análisis del *readthrough* traduccional y funcional del conjunto de PTC hallados en la línea germinal de pacientes PHTS (15 PTC se han encontrado en la línea germinal de pacientes PHTS, y 55 PTC se han encontrado en la línea germinal de pacientes y en muestras de tumores esporádicos) (Figura 23).

Utilizando la geneticina (G418) como un inductor óptimo de *readthrough*, los resultados obtenidos indican un patrón heterogéneo de la respuesta del *readthrough* para los diferentes PTC de PTEN, obteniendo un rango de inducción de *readthrough* entre 0% y 30% con respecto a la expresión de PTEN tipo salvaje. De todos los PTC analizados, 12 PTC (17%) mostraron una eficiencia óptima-subóptima de *readthrough* (>10% de expresión), 13 PTC (18,6%) mostraron una eficiencia de *readthrough* baja (5%-9% de expresión), y 45 PTC (64,3%) una eficiencia del *readthrough* muy baja (0%-4% de expresión) (Tabla 9). A pesar de la gran variabilidad a la respuesta a G418, hemos observado que los tres codones de terminación no son igualmente susceptibles a *readthrough*: en general, los PTC de TGA producen niveles de *readthrough* más altos, seguidos de TAG y TAA (Figura 27). La mayoría de los PTC con una eficiencia de *readthrough* óptima-subóptima fueron PTC TGA (62,5%), seguido de TAG (37,5%) y TAA (0%) (Tabla 9). Esto está en línea con otros estudios comparativos de *readthrough* en los cuales el orden de eficacia de lectura de los PTC era: TGA>TAG>TAA [235, 251, 253]. La presencia de Cisteína (C) en la posición +4 (nucleótido +1 después del PCT) y una Adenina (A) en la posición -1 se ha propuesto como otros factores a tener en cuenta a la hora de mejorar la eficiencia del *readthrough* [242, 294]. Nuestros resultados indican que el nucleótido +4 C favorece el *readthrough*, pero sólo con una secuencia contexto de nucleótidos apropiada y con algunos aminoglucósidos inductores de *readthrough*.

La incorporación durante la lectura traduccional de aminoácidos codificados por codones afines con respecto al codón con la mutación PTC puede afectar a la funcionalidad de la proteína resultante [212, 214, 280]. Esto es crucial en el caso de proteínas como PTEN, que muestran funciones deterioradas a causa de una gran variedad de sustituciones de un solo aminoácido a lo largo de la secuencia. Para analizar funcionalmente las variantes de PTEN producidas por *readthrough*, hemos tenido en cuenta la frecuencia de incorporación de aminoácidos para cada tipo de PTC [TGA: Arg (R), 64.5%; Cys (C), 17.7%; Trp (W), 17.9%. TAG: Gln (Q), 86.5%; Tyr (Y), 10.8%; Lys (K), 2%.

TAA: Gln (Q), 52%; Tyr (Y), 47.9%] (Roy 2016), y hemos realizado experimentos funcionales con las posibles variantes de PTEN generadas, asignando a cada una un *Functional Score* (FS) relativo. De todas las mutaciones PTC de la línea germinal de PTEN, un 57% (40 PTC) mostraron actividad funcional similar a PTEN tipo salvaje para cualquier aminoácido que se incorpore durante la lectura traduccional (FS=1); 39% (27 PTC) mostró actividad funcional reducida (FS=0.5) o nula (FS=0) para alguno de los aminoácidos que se incorporan, y 4% (3 PTC) muy poca o ausencia de actividad funcional (FS=0) (Tabla 10). Todas las variantes R233 y R335 mostraron una actividad funcional parecida a PTEN tipo salvaje, a excepción de la mutación R335W que mostró una actividad funcional reducida. Las variantes R130 y los PTC R130X, R233X y R335X no mostraron actividad funcional (FS=0) (Figura 28). Hemos definido una puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough*, que tiene en consideración tanto la respuesta traduccional del *readthrough*, como la actividad funcional de las proteínas generadas por *readthrough* de dichas mutaciones. Esta puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* corrige el potencial de reconstitución funcional de PTEN de algunos PTC, cuyos valores de *readthrough* son óptimos o subóptimos (Figura 29, Tabla 10). El 86% (60 PTC) mostraron una puntuación de la eficiencia funcional del *readthrough* menor de 10; un 10% (7 PTC) mostraron una puntuación entre 10 y 20; y 4% (3 PTC) obtuvieron una puntuación funcional entre 20 y 30. Los PTC más frecuentes, R130X, R233X y R335X, muestran una puntuación la eficiencia funcional del *readthrough* de 12.6, 25.2 y 15.5, respectivamente, lo que indica que podrían ser PTC favorables para terapias basadas en *readthrough*. La reconstitución funcional de PTEN incluso se logró en el caso de PTC dirigida a residuos esenciales, como el residuo catalítico R130 que es altamente sensible a la pérdida de función por la sustitución de aminoácidos. Esto puede explicarse por la incorporación relativa de alta frecuencia, durante el *readthrough* de algunos PTC, del aminoácido de tipo salvaje (Tabla 11, [234]).

En general, estos hallazgos sugieren que el tratamiento con inductores de *readthrough* es una alternativa prometedora a la terapia génica para pacientes portadores de mutaciones *nonsense* en genes relevantes. Nuestro análisis puede contribuir a la determinación de qué pacientes poseen una mayor probabilidad de beneficiarse de un posible tratamiento de precisión. Sin embargo, la aplicabilidad del *readthrough* dependerá del tipo de mutación, la ubicación del PTC, el contexto celular y la naturaleza del gen. Además, hay que tener en cuenta que nuestro análisis se ha llevado a cabo usando, principalmente, G418, un compuesto inductor de *readthrough* tóxico. El uso

prolongado de otros inductores, como la gentamicina, también produce importantes efectos secundarios [270, 271, 295], por lo que es necesaria la identificación y validación de fármacos inductores de *readthrough* con menor toxicidad. A este respecto, han sido descubiertos otros compuestos inductores de la lectura traduccional para trastornos genéticos causados por mutaciones *nonsense* [219]. Amlexanox, un agente antiinflamatorio que se administra por vía oral o tópica para tratar el asma, fue descubierto para inhibir la vía NMD e inducir la lectura de PTC [269]. Este compuesto es menos tóxico y activo a concentraciones más bajas que las requeridas para la gentamicina. También se ha descubierto que la clitocina puede inducir la lectura traduccional dos o tres veces más que la gentamicina y geneticina [220, 268]. También se ha identificado la fenilpirazolanilida (Y-320), un compuesto que cuando se combina con G418 aumenta la eficiencia del *readthrough* [296], y la 2,6-diaminopurina (DAP), un compuesto con una alta eficiencia de corrección para mutaciones *nonsense* [297].

Otro obstáculo en el desarrollo de terapias supresoras de mutaciones *nonsense* es el nivel mínimo de proteína funcional necesaria para alcanzar niveles terapéuticos. Diferentes enfermedades poseen un umbral terapéutico distinto. Se han descrito diferentes inhibidores de la vía NMD, como la cafeína, el inhibidor SMG1 quinasa o NMD1, que aumentan la cantidad de mRNA portador del PTC. Junto con los inductores de *readthrough* pueden aumentar la cantidad de proteína funcional [219, 269, 298, 299]. Sin embargo, en muchos casos esta estrategia no restaura la funcionalidad de las proteínas ya que carecen de dominios cruciales.

3. Análisis global de mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN asociadas a ASD y PHTS

El gen PTEN se encuentra mutado en la línea germinal de pacientes con síndromes de cáncer hereditario, caracterizados por trastornos en el desarrollo, deficiencias neurológicas, desarrollo de hamartomas múltiples, y con una mayor predisposición a desarrollar cáncer de mama y tiroides, entre otros. Estos síndromes se agrupan bajo el término síndrome hamartoma tumoral de PTEN (PHTS). También se han encontrado mutaciones en la línea germinal de PTEN en individuos con macrocefalia, retardo en el desarrollo y desordenes del espectro autista (ASD) [9, 130, 148].

En este trabajo hemos creado y analizado funcionalmente 208 mutaciones *missense* de la línea germinal de PTEN. Se han analizado dichas mutaciones agrupándolas en dos grupos: mutaciones de la línea germinal de pacientes con PHTS (133 mutaciones) y mutaciones de la línea germinal de pacientes con ASD y pacientes con ASD-PHTS (75 mutaciones) (Figura 32). Alrededor de un 14% de mutaciones *missense* se han encontrado tanto en la línea germinal de pacientes con PHTS como de pacientes con ASD. Las mutaciones *missense* se distribuyen a lo largo de los dominios PTP y C2, siendo dominantes en el dominio PTP tanto en pacientes PHTS como ASD (Figura 32B). La frecuencia relativa aproximada de mutaciones individuales a lo largo de la secuencia de aminoácidos de PTEN es distinta en pacientes PHTS y ASD; sin embargo, las frecuencias agrupadas en el dominio PTP y C2 son similares en pacientes PHTS y ASD (Figura 33).

PTEN está codificado por un único gen, pero la traducción alternativa de su mRNA produce varias isoformas proteicas: PTEN (isoforma predominante) y otras proteínas con extensiones N-terminales (PTEN-L, principalmente), las cuales difieren en la localización subcelular y propiedades funcionales [6]. Aunque todavía se desconoce la penetrancia de las mutaciones de PTEN en pacientes ASD y PHTS, en términos de predisposición tumoral, se pueden hacer predicciones basadas en las propiedades funcionales de las variantes de PTEN. Sin embargo, no hay estudios globales de cómo mutaciones asociadas a PHTS y ASD pueden afectar a la función de PTEN-L.

En este trabajo hemos analizado funcionalmente las mutaciones *missense* de PTEN asociadas a la línea germinal, utilizando el sistema heterólogo de la levadura como una plataforma de alto rendimiento para evaluar la actividad fosfatasa PIP₃ de PTEN y PTEN-L (Tabla 12). El análisis realizado en PTEN, refleja una mayor pérdida de actividad funcional en pacientes PHTS que en ASD-PHTS, tanto con los datos obtenidos por la localización GFP-Akt en la membrana plasmática como con los datos obtenidos por la monitorización del ensayo de crecimiento de levadura. Casi un 60% de las mutaciones de la línea germinal de PTEN de pacientes PHTS y un 50% de las mutaciones de la línea germinal de PTEN de pacientes ASD-PHTS no presentan actividad funcional, frente a un 31% de mutaciones de pacientes ASD (Figura 34). Estos datos corroboran nuestros estudios previos, y los datos de otros laboratorios, con un número más reducido de mutaciones, y que sugieren que, en general, las mutaciones en PTEN que afectan al neurodesarrollo podrían tener impacto patogénico menos grave relacionado con el cáncer.

Por otra parte, la comparación del impacto funcional de un grupo de mutaciones en PTEN y en PTEN-L indica una mayor tolerancia de PTEN-L a la pérdida de función. En el grupo de mutaciones de pacientes ASD, el 30% de mutaciones presentaban actividad funcional en PTEN frente a un 43% de actividad funcional en PTEN-L, y en el grupo de mutaciones de pacientes ASD-PHTS, el 7% de mutaciones presentaban actividad en PTEN frente a un 16% de mutaciones con actividad funcional en PTEN-L (Figura 36; Tabla 12). Estos resultados se podrían explicar, al menos en parte, por la mayor estabilidad intrínseca atribuida a PTEN-L, en comparación con PTEN [28], ya que muchas mutaciones patogénicas afectan a la estabilidad proteica de PTEN [28] (nuestros resultados no publicados). Además, también se ha atribuido una mayor actividad catalítica constitutiva a PTEN-L, en comparación con PTEN. En resumen, hemos observado que PTEN-L es menos susceptible a ser alterado por mutaciones potencialmente patogénicas que PTEN, lo que podría tener repercusiones importantes en estos grupos de pacientes [28] [300].

CONCLUSIONES

Las conclusiones del trabajo presentado en esta tesis doctoral se enumeran a continuación:

1. En el método de mutagénesis dirigida, la utilización de oligonucleótidos mutagénicos de 29 nucleótidos de longitud, independientemente de su Tm y contenido en G/C, proporciona unas condiciones de amplificación y mutagénesis eficientes.
2. Utilizando la geneticina (G418) como un inductor óptimo de *readthrough*, se observa un patrón heterogéneo de la respuesta del *readthrough* para las mutaciones PTC (*PTCome*) de la línea germinal de PTEN, obteniendo un rango de inducción de *readthrough* entre 0% y 30% con respecto a la expresión de PTEN tipo silvestre.
3. Los tres codones de terminación no son igualmente susceptibles a *readthrough*. En general, los codones TGA producen niveles de *readthrough* más altos, seguidos de TAG y TAA.
4. Los PTC más frecuentes, R130X, R233X y R335X muestran unos valores de *readthrough* de 19.6, 25.2 y 17, y una puntuación de eficiencia funcional del *readthrough* de 12.6, 25.2 y 15.5, respectivamente, lo que indica que son PTC favorables para terapias basadas en *readthrough*.
5. El análisis funcional de mutaciones *missense* de PTEN asociadas a la línea germinal refleja una mayor pérdida de actividad catalítica de PTEN en mutaciones presentes en pacientes PHTS que en ASD.
6. PTEN-L es menos susceptible que PTEN a ser alterado por mutaciones *missense* potencialmente patogénicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
2. Steck, P.A., et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers*. Nature Genetics, 1997. **15**: p. 356.
3. Alonso, A. and R. Pulido, *The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family*. FEBS J, 2016. **283**(8): p. 1404-29.
4. Worby, C.A. and J.E. Dixon, *PTEN*. Annu Rev Biochem, 2014. **83**: p. 641-69.
5. Li, D.M. and H. Sun, *TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2124-9.
6. Pulido, R., *PTEN: a yin-yang master regulator protein in health and disease*. Methods, 2015. **77-78**: p. 3-10.
7. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
8. Eng, C., *PTEN: one gene, many syndromes*. Hum Mutat, 2003. **22**(3): p. 183-98.
9. Spinelli, L., et al., *Functionally distinct groups of inherited PTEN mutations in autism and tumour syndromes*. J Med Genet, 2015. **52**(2): p. 128-34.
10. Lee, J.O., et al., *Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association*. Cell, 1999. **99**(3): p. 323-34.
11. Maehama, T., G.S. Taylor, and J.E. Dixon, *PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 247-79.
12. Gil, A., et al., *A functional dissection of PTEN N-terminus: implications in PTEN subcellular targeting and tumor suppressor activity*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0119287.
13. Denning, G., et al., *A short N-terminal sequence of PTEN controls cytoplasmic localization and is required for suppression of cell growth*. Oncogene, 2007. **26**(27): p. 3930-40.
14. Gil, A., 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, 2006. **17**(9): p. 4002-13.
15. Gil, A., A. Andrés-Pons, and R. Pulido, *Nuclear PTEN: a tale of many tails*. Cell Death Differ, 2007. **14**(3): p. 395-9.
16. Myers, M.P., et al., *P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9052-7.
17. Pulido, R. and R. Hooft van Huijsduijnen, *Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease*. FEBS J, 2008. **275**(5): p. 848-66.
18. Lee, Y.R., M. Chen, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(9): p. 547-562.
19. Sotelo, N.S., et al., *PTEN-PDZ domain interactions: binding of PTEN to PDZ domains of PTPN13*. Methods, 2015. **77-78**: p. 147-56.
20. Naderali, E., et al., *Regulation and modulation of PTEN activity*. Mol Biol Rep, 2018. **45**(6): p. 2869-2881.
21. Torres, J. and 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, 2001. **276**(2): p. 993-8.
22. Torres, J., 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, 2003. **278**(33): p. 30652-60.

23. Hopkins, B.D., et al., *A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival*. *Science*, 2013. **341**(6144): p. 399-402.
24. Zhang, X., et al., *A PTEN translational isoform has PTEN-like activity*. *Chin J Cancer Res*, 2015. **27**(5): p. 524-32.
25. Tzani, I., et al., *Systematic analysis of the PTEN 5' leader identifies a major AUU initiated proteoform*. *Open Biol*, 2016. **6**(5).
26. Pulido, R., et al., *A unified nomenclature and amino acid numbering for human PTEN*. *Sci Signal*, 2014. **7**(332): p. pe15.
27. Malaney, P., V.N. Uversky, and V. Davé, *PTEN proteoforms in biology and disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2017. **74**(15): p. 2783-2794.
28. Johnston, S.B. and R.T. Raines, *Conformational stability and catalytic activity of PTEN variants linked to cancers and autism spectrum disorders*. *Biochemistry*, 2015. **54**(7): p. 1576-82.
29. Masson, G.R., et al., *The intrinsically disordered tails of PTEN and PTEN-L have distinct roles in regulating substrate specificity and membrane activity*. *Biochem J*, 2016. **473**(2): p. 135-44.
30. Rodríguez-Escudero, I., et al., *A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(21): p. 4132-42.
31. Rodríguez-Escudero, I., et al., *Yeast-based methods to assess PTEN phosphoinositide phosphatase activity in vivo*. *Methods*, 2015. **77-78**: p. 172-9.
32. Fernández-Acero, T., et al., *Expression of Human PTEN-L in a Yeast Heterologous Model Unveils Specific N-Terminal Motifs Controlling PTEN-L Subcellular Localization and Function*. *Cells*, 2019. **8**(12).
33. Hopkins, B.D., et al., *PTEN function: the long and the short of it*. *Trends Biochem Sci*, 2014. **39**(4): p. 183-90.
34. Liang, H., et al., *PTEN β is an alternatively translated isoform of PTEN that regulates rDNA transcription*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14771.
35. Jochner, M.C.E., et al., *Unique properties of PTEN-L contribute to neuroprotection in response to ischemic-like stress*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 3183.
36. Liang, H., et al., *PTEN α , a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism*. *Cell Metab*, 2014. **19**(5): p. 836-48.
37. Wang, L., et al., *PTEN-L is a novel protein phosphatase for ubiquitin dephosphorylation to inhibit PINK1-Parkin-mediated mitophagy*. *Cell Res*, 2018.
38. Li, G., et al., *PTEN α regulates mitophagy and maintains mitochondrial quality control*. *Autophagy*, 2018. **14**(10): p. 1742-1760.
39. Wang, H., et al., *Relevance and therapeutic possibility of PTEN-long in renal cell carcinoma*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e114250.
40. Sánchez-Hernández, L., et al., *Additive effects of the combined expression of soluble forms of GAS1 and PTEN inhibiting glioblastoma growth*. *Gene Ther*, 2018. **25**(6): p. 439-449.
41. Putz, U., et al., *PTEN secretion in exosomes*. *Methods*, 2015. **77-78**: p. 157-63.
42. Zhang, L., et al., *Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth*. *Nature*, 2015. **527**(7576): p. 100-4.
43. Shen, S.M., et al., *PTEN α and PTEN β promote carcinogenesis through WDR5 and H3K4 trimethylation*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(11): p. 1436-1448.
44. Wang, P., et al., *PTEN α Modulates CaMKII Signaling and Controls Contextual Fear Memory and Spatial Learning*. *Cell Rep*, 2017. **19**(12): p. 2627-2641.
45. Yuan, Y., et al., *PTEN α regulates endocytosis and modulates olfactory function*. *FASEB J*, 2019. **33**(10): p. 11148-11162.

46. Li, Y., et al., *PTEN α promotes neutrophil chemotaxis through regulation of cell deformability*. *Blood*, 2019. **133**(19): p. 2079-2089.
47. Cao, Y., et al., *PTEN-L promotes type I interferon responses and antiviral immunity*. *Cell Mol Immunol*, 2018. **15**(1): p. 48-57.
48. Bononi, A. and P. Pinton, *Study of PTEN subcellular localization*. *Methods*, 2015. **77-78**: p. 92-103.
49. Walker, S.M., et al., *The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif*. *Biochem J*, 2004. **379**(Pt 2): p. 301-7.
50. Iijima, M., et al., *Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(16): p. 16606-13.
51. Vazquez, F., et al., *Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(10): p. 3633-8.
52. Mingo, J., et al., *A pathogenic role for germline PTEN variants which accumulate into the nucleus*. *Eur J Hum Genet*, 2018.
53. Planchon, S.M., K.A. Waite, and C. Eng, *The nuclear affairs of PTEN*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 3): p. 249-53.
54. Ho, J., et al., *PTEN Nuclear Functions*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019.
55. Naguib, A. and L.C. Trotman, *PTEN plasticity: how the taming of a lethal gene can go too far*. *Trends Cell Biol*, 2013. **23**(8): p. 374-9.
56. Putz, U., et al., *The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells*. *Sci Signal*, 2012. **5**(243): p. ra70.
57. Kreis, P., et al., *Subcellular targeting and dynamic regulation of PTEN: implications for neuronal cells and neurological disorders*. *Front Mol Neurosci*, 2014. **7**: p. 23.
58. Bassi, C. and V. Stambolic, *PTEN, here, there, everywhere*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(12): p. 1595-6.
59. Lee, M.F. and L.C. Trotman, *PTEN: Bridging Endocytosis and Signaling*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019.
60. Milella, M., et al., *PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 24.
61. Pulido, R., *PTEN Inhibition in Human Disease Therapy*. *Molecules*, 2018. **23**(2).
62. Leslie, N.R., et al., *The significance of PTEN's protein phosphatase activity*. *Adv Enzyme Regul*, 2009. **49**(1): p. 190-6.
63. Jimenez, C., et al., *Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase*. *EMBO J*, 1998. **17**(3): p. 743-53.
64. Vanhaesebroeck, B., et al., *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(5): p. 329-41.
65. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. *Cell*, 2017. **169**(3): p. 381-405.
66. Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(1): p. 9-22.
67. Song, M.S., L. Salmena, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(5): p. 283-96.
68. Papa, A. and P.P. Pandolfi, *The PTEN-PI3K Axis in Cancer*. *Biomolecules*, 2019. **9**(4).
69. Yang, J. and Y. Yin, *PTEN in Chromatin Remodeling*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020. **10**(2).
70. Hou, S.Q., et al., *PTEN in the maintenance of genome integrity: From DNA replication to chromosome segregation*. *Bioessays*, 2017. **39**(10).
71. Correia, N.C., et al., *The multiple layers of non-genetic regulation of PTEN tumour suppressor activity*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(1): p. 216-25.

72. Leslie, N.R., et al., *The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(1): p. 273-8.
73. Chang, H., Z. Cai, and T.M. Roberts, *The Mechanisms Underlying PTEN Loss in Human Tumors Suggest Potential Therapeutic Opportunities*. *Biomolecules*, 2019. **9**(11).
74. Liu, T., Y. Wang, and A.M. Chan, *Multifaceted Regulation of PTEN Subcellular Distributions and Biological Functions*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(9).
75. Boosani, C.S. and D.K. Agrawal, *PTEN modulators: a patent review*. *Expert Opin Ther Pat*, 2013. **23**(5): p. 569-80.
76. Patel, L., et al., *Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN*. *Curr Biol*, 2001. **11**(10): p. 764-8.
77. Virolle, T., et al., *The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(12): p. 1124-8.
78. Stambolic, V., et al., *Regulation of PTEN transcription by p53*. *Mol Cell*, 2001. **8**(2): p. 317-25.
79. Shen, Y.H., 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*, 2006. **281**(12): p. 7727-36.
80. Hettinger, K., et al., *c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(2): p. 218-29.
81. Xia, D., 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*, 2007. **282**(6): p. 3507-19.
82. Song, L.B., 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*, 2009. **119**(12): p. 3626-36.
83. Yoshimi, A., et al., *Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins*. *Blood*, 2011. **117**(13): p. 3617-28.
84. Whelan, J.T., S.L. Forbes, and F.E. Bertrand, *CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(1): p. 80-4.
85. Palomero, T., et al., *Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia*. *Nat Med*, 2007. **13**(10): p. 1203-10.
86. Lee, Y.R., M. Chen, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018.
87. Leslie, N.R. and M. Foti, *Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes*. *Trends Pharmacol Sci*, 2011. **32**(3): p. 131-40.
88. Li, W., et al., *Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018. **37**(1): p. 223.
89. Poliseno, L., et al., *A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology*. *Nature*, 2010. **465**(7301): p. 1033-8.
90. Haddadi, N., et al., *PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy*. *Mol Cancer*, 2018. **17**(1): p. 37.
91. Poliseno, L. and P.P. Pandolfi, *PTEN ceRNA networks in human cancer*. *Methods*, 2015. **77-78**: p. 41-50.
92. Xu, W., et al., *Posttranslational regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and its functional impact on cancer behaviors*. *Drug Des Devel Ther*, 2014. **8**: p. 1745-51.
93. Fragoso, R. and J.T. Barata, *Kinases, tails and more: regulation of PTEN function by phosphorylation*. *Methods*, 2015. **77-78**: p. 75-81.
94. Vazquez, F., et al., *Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(14): p. 5010-8.

95. Miller, S.J., et al., *Direct identification of PTEN phosphorylation sites*. FEBS Lett, 2002. **528**(1-3): p. 145-53.
96. Al-Khouri, A.M., et al., *Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35195-202.
97. Maccario, H., et al., *PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 439-44.
98. Zhang, X.C., et al., *Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN*. Biochem J, 2012. **444**(3): p. 457-64.
99. Trotman, L.C., et al., *Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression*. Cell, 2007. **128**(1): p. 141-56.
100. Wang, X., et al., *NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN*. Cell, 2007. **128**(1): p. 129-39.
101. Gupta, A. and N.R. Leslie, *Controlling PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) Stability: A DOMINANT ROLE FOR LYSINE 66*. J Biol Chem, 2016. **291**(35): p. 18465-73.
102. Lee, Y.R., et al., *Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway*. Science, 2019. **364**(6441).
103. Maddika, S., et al., *WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(6): p. 728-33.
104. Ahmed, S.F., et al., *The chaperone-assisted E3 ligase C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) targets PTEN for proteasomal degradation*. J Biol Chem, 2012. **287**(19): p. 15996-6006.
105. Van Themsche, C., et al., *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20462-6.
106. Lee, S.R., et al., *Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20336-42.
107. Leslie, N.R., et al., *Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN*. EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5501-10.
108. Kwon, J., et al., *Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16419-24.
109. Cao, J., et al., *Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity*. EMBO J, 2009. **28**(10): p. 1505-17.
110. Schwertassek, U., et al., *Reactivation of oxidized PTP1B and PTEN by thioredoxin 1*. FEBS J, 2014. **281**(16): p. 3545-58.
111. Han, S.J., et al., *Redox regulation of the tumor suppressor PTEN by the thioredoxin system and cumene hydroperoxide*. Free Radic Biol Med, 2017. **112**: p. 277-286.
112. Kim, Y., et al., *Redox regulation of the tumor suppressor PTEN by glutathione*. FEBS Lett, 2010. **584**(16): p. 3550-6.
113. Numajiri, N., et al., *On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(25): p. 10349-54.
114. Yu, C.X., S. Li, and A.R. Whorton, *Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(3): p. 847-54.
115. Kwak, Y.D., et al., *NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration*. Mol Neurodegener, 2010. **5**: p. 49.
116. Choi, M.S., et al., *Transnitrosylation from DJ-1 to PTEN attenuates neuronal cell death in parkinson's disease models*. J Neurosci, 2014. **34**(45): p. 15123-31.
117. Okumura, K., et al., *PCAF modulates PTEN activity*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26562-8.

118. Meng, Z., L.F. Jia, and Y.H. Gan, *PTEN activation through K163 acetylation by inhibiting HDAC6 contributes to tumour inhibition*. *Oncogene*, 2016. **35**(18): p. 2333-44.
119. Ikenoue, T., et al., *PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain*. *Cancer Res*, 2008. **68**(17): p. 6908-12.
120. Sotelo, N.S., et al., *A functional network of the tumor suppressors APC, hDlg, and PTEN, that relies on recognition of specific PDZ-domains*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(8): p. 2661-70.
121. Bassi, C., et al., *Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress*. *Science*, 2013. **341**(6144): p. 395-9.
122. Huang, J., et al., *SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 911.
123. Wang, W., et al., *PIASxα ligase enhances SUMO1 modification of PTEN protein as a SUMO E3 ligase*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(6): p. 3217-30.
124. González-Santamaría, J., et al., *Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO*. *Cell Death Dis*, 2012. **3**: p. e393.
125. Yehia, L. and C. Eng, *One gene - many endocrine and metabolic syndromes: PTEN-opathies and precision medicine*. *Endocr Relat Cancer*, 2018.
126. Blumenthal, G.M. and P.A. Dennis, *PTEN hamartoma tumor syndromes*. *Eur J Hum Genet*, 2008. **16**(11): p. 1289-300.
127. Mester, J. and E. Charis, *PTEN hamartoma tumor syndrome*. *Handb Clin Neurol*, 2015. **132**: p. 129-37.
128. Pilarski, R., *Hamartoma Tumor Syndrome: A Clinical Overview*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(6).
129. Orloff, M.S. and C. Eng, *Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome*. *Oncogene*, 2008. **27**(41): p. 5387-97.
130. Butler, M.G., et al., *Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations*. *J Med Genet*, 2005. **42**(4): p. 318-21.
131. Hansen-Kiss, E., et al., *A retrospective chart review of the features of PTEN hamartoma tumour syndrome in children*. *J Med Genet*, 2017. **54**(7): p. 471-478.
132. Tilot, A.K., T.W. Frazier, and C. Eng, *Balancing Proliferation and Connectivity in PTEN-associated Autism Spectrum Disorder*. *Neurotherapeutics*, 2015. **12**(3): p. 609-19.
133. Frazier, T.W., *Autism Spectrum Disorder Associated with Germline Heterozygous*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019. **9**(10).
134. LLOYD, K.M. and M. DENNIS, *Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement*. *Ann Intern Med*, 1963. **58**: p. 136-42.
135. Mester, J. and C. Eng, *Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome*. *J Surg Oncol*, 2015. **111**(1): p. 125-30.
136. Lachlan, K.L., et al., *Cowden syndrome and Bannayan Riley Rualcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers*. *J Med Genet*, 2007. **44**(9): p. 579-85.
137. Marsh, D.J., et al., *PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(8): p. 1461-72.
138. Bannayan, G.A., *Lipomatosis, angiomatosis, and macrencephalia. A previously undescribed congenital syndrome*. *Arch Pathol*, 1971. **92**(1): p. 1-5.
139. Gorlin, R.J., et al., *Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome*. *Am J Med Genet*, 1992. **44**(3): p. 307-14.
140. Nowak, D.A. and H.A. Trost, *Lhermitte-Duclos disease (dysplastic cerebellar gangliocytoma): a malformation, hamartoma or neoplasm?* *Acta Neurol Scand*, 2002. **105**(3): p. 137-45.

141. Abel, T.W., et al., *Lhermitte-Duclos disease: a report of 31 cases with immunohistochemical analysis of the PTEN/AKT/mTOR pathway*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(4): p. 341-9.
142. Zhou, X.P., 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, 2003. **73**(5): p. 1191-8.
143. Cohen, M.M. and P.W. Hayden, *A newly recognized hamartomatous syndrome*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1979. **15**(5B): p. 291-6.
144. Adam, M.P., et al., *GeneReviews*. 1993.
145. Zhou, X., et al., *Association of germline mutation in the PTEN tumour suppressor gene and Proteus and Proteus-like syndromes*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 210-1.
146. Kim, S.K., *Recent update of autism spectrum disorders*. Korean J Pediatr, 2015. **58**(1): p. 8-14.
147. Hallmayer, J., et al., *Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism*. Arch Gen Psychiatry, 2011. **68**(11): p. 1095-102.
148. Mester, J.L., et al., *Analysis of prevalence and degree of macrocephaly in patients with germline PTEN mutations and of brain weight in Pten knock-in murine model*. Eur J Hum Genet, 2011. **19**(7): p. 763-8.
149. Persico, A.M. and V. Napolioni, *Autism genetics*. Behav Brain Res, 2013. **251**: p. 95-112.
150. Liu, X. and T. Takumi, *Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **452**(2): p. 244-53.
151. Alimonti, A., et al., *Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility*. Nat Genet, 2010. **42**(5): p. 454-8.
152. Pulido, R., et al., *Precise Immunodetection of PTEN Protein in Human Neoplasia*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019. **9**(12).
153. Cheung, L.W., et al., *High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability*. Cancer Discov, 2011. **1**(2): p. 170-85.
154. Urick, M.E. and D.W. Bell, *Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(9): p. 510-521.
155. Bell, D.W. and L.H. Ellenson, *Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma*. Annu Rev Pathol, 2019. **14**: p. 339-367.
156. Samarathai, N., K. Hall, and I.T. Yeh, *Molecular profiling of endometrial malignancies*. Obstet Gynecol Int, 2010. **2010**: p. 162363.
157. Tan, M.H., et al., *Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(2): p. 400-7.
158. Yehia, L., J. Ngeow, and C. Eng, *PTEN-opathies: from biological insights to evidence-based precision medicine*. J Clin Invest, 2019. **129**(2): p. 452-464.
159. Montano, N., et al., *Biomarkers for glioblastoma multiforme: status quo*. J Clin Transl Res, 2016. **2**(1): p. 3-10.
160. Ma, J., et al., *Inhibition of Nuclear PTEN Tyrosine Phosphorylation Enhances Glioma Radiation Sensitivity through Attenuated DNA Repair*. Cancer Cell, 2019. **36**(6): p. 690-691.
161. Carbognin, L., et al., *Prognostic and Predictive Implications of PTEN in Breast Cancer: Unfulfilled Promises but Intriguing Perspectives*. Cancers (Basel), 2019. **11**(9).
162. Starink, T.M., et al., *The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients*. Clin Genet, 1986. **29**(3): p. 222-33.
163. Bubien, V., et al., *High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome*. J Med Genet, 2013. **50**(4): p. 255-63.
164. Fackenthal, J.D., et al., *Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations*. J Med Genet, 2001. **38**(3): p. 159-64.

165. Xing, M., *Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer*. *Thyroid*, 2010. **20**(7): p. 697-706.
166. Harach, H.R., et al., *Thyroid pathologic findings in patients with Cowden disease*. *Ann Diagn Pathol*, 1999. **3**(6): p. 331-40.
167. Ngeow, J., et al., *Incidence and clinical characteristics of thyroid cancer in prospective series of individuals with Cowden and Cowden-like syndrome characterized by germline PTEN, SDH, or KLLN alterations*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(12): p. E2063-71.
168. Suzuki, H., et al., *Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues*. *Cancer Res*, 1998. **58**(2): p. 204-9.
169. Jamaspishvili, T., et al., *Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer*. *Nat Rev Urol*, 2018. **15**(4): p. 222-234.
170. Bazzichetto, C., et al., *PTEN as a Prognostic/Predictive Biomarker in Cancer: An Unfulfilled Promise?* *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(4).
171. Heald, B., et al., *Frequent gastrointestinal polyps and colorectal adenocarcinomas in a prospective series of PTEN mutation carriers*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(6): p. 1927-33.
172. Martinez-Morga, M., et al., *[Neurobiological bases of autistic spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder: neural differentiation and synaptogenesis]*. *Rev Neurol*, 2018. **66**(S01): p. S97-S102.
173. Lugo, J.N., et al., *Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins*. *Front Mol Neurosci*, 2014. **7**: p. 27.
174. Chao, H.T., et al., *Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 263-9.
175. Jurado, S., et al., *PTEN is recruited to the postsynaptic terminal for NMDA receptor-dependent long-term depression*. *EMBO J*, 2010. **29**(16): p. 2827-40.
176. González-Fernández, E., et al., *PTEN negatively regulates the cell lineage progression from NG2*. *Elife*, 2018. **7**.
177. Veleva-Rotse, B.O. and A.P. Barnes, *Brain patterning perturbations following PTEN loss*. *Front Mol Neurosci*, 2014. **7**: p. 35.
178. Zhou, J. and L.F. Parada, *PTEN signaling in autism spectrum disorders*. *Curr Opin Neurobiol*, 2012. **22**(5): p. 873-9.
179. Mester, J. and C. Eng, *When overgrowth bumps into cancer: the PTEN-opathies*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2013. **163C**(2): p. 114-21.
180. Arendt, K.L., et al., *PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(1): p. 36-44.
181. Peineau, S., et al., *LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta*. *Neuron*, 2007. **53**(5): p. 703-17.
182. Liu, S., et al., *PTEN modulates neurites outgrowth and neuron apoptosis involving the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway*. *Mol Med Rep*, 2019. **20**(5): p. 4059-4066.
183. Jiang, H., et al., *Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators*. *Cell*, 2005. **120**(1): p. 123-35.
184. Hur, E.M. and F.Q. Zhou, *GSK3 signalling in neural development*. *Nat Rev Neurosci*, 2010. **11**(8): p. 539-51.
185. Wiznitzer, M., *Autism and tuberous sclerosis*. *J Child Neurol*, 2004. **19**(9): p. 675-9.
186. Winden, K.D., D. Ebrahimi-Fakhari, and M. Sahin, *Abnormal mTOR Activation in Autism*. *Annu Rev Neurosci*, 2018. **41**: p. 1-23.
187. Clipperton-Allen, A.E. and D.T. Page, *Pten haploinsufficient mice show broad brain overgrowth but selective impairments in autism-relevant behavioral tests*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(13): p. 3490-505.

188. Tilot, A.K., et al., *Neural transcriptome of constitutional Pten dysfunction in mice and its relevance to human idiopathic autism spectrum disorder*. *Mol Psychiatry*, 2016. **21**(1): p. 118-25.
189. Kwon, C.H., et al., *Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice*. *Neuron*, 2006. **50**(3): p. 377-88.
190. Luikart, B.W., et al., *Pten knockdown in vivo increases excitatory drive onto dentate granule cells*. *J Neurosci*, 2011. **31**(11): p. 4345-54.
191. Williams, M.R., et al., *Hyperactivity of newborn Pten knock-out neurons results from increased excitatory synaptic drive*. *J Neurosci*, 2015. **35**(3): p. 943-59.
192. Pun, R.Y., et al., *Excessive activation of mTOR in postnatally generated granule cells is sufficient to cause epilepsy*. *Neuron*, 2012. **75**(6): p. 1022-34.
193. Tilot, A.K., et al., *Germline disruption of Pten localization causes enhanced sex-dependent social motivation and increased glial production*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(12): p. 3212-27.
194. Lee, H., et al., *Constitutional mislocalization of Pten drives precocious maturation in oligodendrocytes and aberrant myelination in model of autism spectrum disorder*. *Transl Psychiatry*, 2019. **9**(1): p. 13.
195. He, X., et al., *Cytoplasm-predominant Pten associates with increased region-specific brain tyrosine hydroxylase and dopamine D2 receptors in mouse model with autistic traits*. *Mol Autism*, 2015. **6**: p. 63.
196. Kang, S.C., et al., *Decreased nuclear Pten in neural stem cells contributes to deficits in neuronal maturation*. *Mol Autism*, 2020. **11**(1): p. 43.
197. Tan, M.H., et al., *A clinical scoring system for selection of patients for PTEN mutation testing is proposed on the basis of a prospective study of 3042 probands*. *Am J Hum Genet*, 2011. **88**(1): p. 42-56.
198. Ying, H. and G. Huttley, *Exploiting CpG hypermutability to identify phenotypically significant variation within human protein-coding genes*. *Genome Biol Evol*, 2011. **3**: p. 938-49.
199. Smith, I.N. and J.M. Briggs, *Structural mutation analysis of PTEN and its genotype-phenotype correlations in endometriosis and cancer*. *Proteins*, 2016. **84**(11): p. 1625-1643.
200. Ke, H., et al., *4-hydroxy estrogen induces DNA damage on codon 130/131 of PTEN in endometrial carcinoma cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015. **400**: p. 71-7.
201. Matreyek, K.A., et al., *Multiplex assessment of protein variant abundance by massively parallel sequencing*. *Nat Genet*, 2018. **50**(6): p. 874-882.
202. Zhou, X.P., et al., *Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in aberrant PTEN protein and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway*. *Am J Hum Genet*, 2003. **73**(2): p. 404-11.
203. Marsh, D.J., et al., *Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families*. *J Med Genet*, 1998. **35**(11): p. 881-5.
204. Mester, J. and C. Eng, *Estimate of de novo mutation frequency in probands with PTEN hamartoma tumor syndrome*. *Genet Med*, 2012. **14**(9): p. 819-22.
205. De Rubeis, S. and J.D. Buxbaum, *Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(R1): p. R24-31.
206. Mort, M., et al., *A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease*. *Hum Mutat*, 2008. **29**(8): p. 1037-47.
207. Bidou, L., et al., *Characterization of new-generation aminoglycoside promoting premature termination codon readthrough in cancer cells*. *RNA Biol*, 2017. **14**(3): p. 378-388.

208. Floquet, C., et al., *Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(8): p. 3350-62.
209. Bladen, C.L., et al., *The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations*. *Hum Mutat*, 2015. **36**(4): p. 395-402.
210. Bedwell, D.M., et al., *Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line*. *Nat Med*, 1997. **3**(11): p. 1280-4.
211. Bidou, L., et al., *Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases*. *Trends Mol Med*, 2012. **18**(11): p. 679-88.
212. Keeling, K.M., et al., *Therapeutics based on stop codon readthrough*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2014. **15**: p. 371-94.
213. Dabrowski, M., Z. Bukowy-Bieryllo, and E. Zietkiewicz, *Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes--The impact of RNA sequence*. *RNA Biol*, 2015. **12**(9): p. 950-8.
214. Morais, P., H. Adachi, and Y.T. Yu, *Suppression of Nonsense Mutations by New Emerging Technologies*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(12).
215. Howard, M., R.A. Frizzell, and D.M. Bedwell, *Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations*. *Nat Med*, 1996. **2**(4): p. 467-9.
216. Nagel-Wolfrum, K., et al., *Targeting Nonsense Mutations in Diseases with Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs)*. *BioDrugs*, 2016. **30**(2): p. 49-74.
217. Dabrowski, M., Z. Bukowy-Bieryllo, and E. Zietkiewicz, *Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons*. *Mol Med*, 2018. **24**(1): p. 25.
218. Baradaran-Heravi, A., et al., *Novel small molecules potentiate premature termination codon readthrough by aminoglycosides*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(14): p. 6583-98.
219. Campofelice, A., et al., *Strategies against Nonsense: Oxadiazoles as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs)*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(13).
220. Peltz, S.W., et al., *Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression*. *Annu Rev Med*, 2013. **64**: p. 407-25.
221. Hinnebusch, A.G., *The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation*. *Annu Rev Biochem*, 2014. **83**: p. 779-812.
222. Shirokikh, N.E. and T. Preiss, *Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. **9**(4): p. e1473.
223. Petry, S., A. Weixlbaumer, and V. Ramakrishnan, *The termination of translation*. *Curr Opin Struct Biol*, 2008. **18**(1): p. 70-7.
224. Dever, T.E. and R. Green, *The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(7): p. a013706.
225. François, B., et al., *Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(17): p. 5677-90.
226. Garneau, N.L., J. Wilusz, and C.J. Wilusz, *The highways and byways of mRNA decay*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(2): p. 113-26.
227. Chang, Y.F., J.S. Imam, and M.F. Wilkinson, *The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 51-74.
228. Huang, L. and M.F. Wilkinson, *Regulation of nonsense-mediated mRNA decay*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012. **3**(6): p. 807-28.
229. Hug, N., D. Longman, and J.F. Cáceres, *Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(4): p. 1483-95.
230. Kishor, A., S.E. Fritz, and J.R. Hogg, *Nonsense-mediated mRNA decay: The challenge of telling right from wrong in a complex transcriptome*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019. **10**(6): p. e1548.

231. Baker, S.L. and J.R. Hogg, *A system for coordinated analysis of translational readthrough and nonsense-mediated mRNA decay*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173980.
232. Blanchet, S., et al., *New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(15): p. 10061-72.
233. Roy, B., et al., *Nonsense suppression by near-cognate tRNAs employs alternative base pairing at codon positions 1 and 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(10): p. 3038-43.
234. Roy, B., et al., *Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(44): p. 12508-12513.
235. Manuvakhova, M., K. Keeling, and D.M. Bedwell, *Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system*. RNA, 2000. **6**(7): p. 1044-55.
236. McCaughan, K.K., et al., *Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5431-5.
237. Brown, C.M., et al., *Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(21): p. 6339-45.
238. Beznosková, P., S. Gunišová, and L.S. Valášek, *Rules of UGA-N decoding by near-cognate tRNAs and analysis of readthrough on short uORFs in yeast*. RNA, 2016. **22**(3): p. 456-66.
239. Jungreis, I., et al., *Evidence of abundant stop codon readthrough in Drosophila and other metazoa*. Genome Res, 2011. **21**(12): p. 2096-113.
240. Namy, O., I. Hatin, and J.P. Rousset, *Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination*. EMBO Rep, 2001. **2**(9): p. 787-93.
241. Bonetti, B., et al., *The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Biol, 1995. **251**(3): p. 334-45.
242. Tork, S., et al., *The major 5' determinant in stop codon read-through involves two adjacent adenines*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(2): p. 415-21.
243. Floquet, C., et al., *Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002608.
244. Keeling, K.M., et al., *Suppression of premature termination codons as a therapeutic approach*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(5): p. 444-63.
245. DAVIES, J., W. GILBERT, and L. GORINI, *STREPTOMYCIN, SUPPRESSION, AND THE CODE*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 883-90.
246. Burke, J.F. and A.E. Mogg, *Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(17): p. 6265-72.
247. Keeling, K.M. and D.M. Bedwell, *Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system*. J Mol Med (Berl), 2002. **80**(6): p. 367-76.
248. Bukowy-Bieryllo, Z., et al., *Aminoglycoside-stimulated readthrough of premature termination codons in selected genes involved in primary ciliary dyskinesia*. RNA Biol, 2016. **13**(10): p. 1041-1050.
249. Floquet, C., J.P. Rousset, and L. Bidou, *Readthrough of premature termination codons in the adenomatous polyposis coli gene restores its biological activity in human cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24125.

250. Du, M., et al., *Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model.* J Mol Med (Berl), 2006. **84**(7): p. 573-82.
251. Howard, M.T., et al., *Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy.* Ann Neurol, 2000. **48**(2): p. 164-9.
252. Nudelman, I., et al., *Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations.* Bioorg Med Chem, 2010. **18**(11): p. 3735-46.
253. Bidou, L., et al., *Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment.* Gene Ther, 2004. **11**(7): p. 619-27.
254. Nakamura, K., et al., *Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia.* Hum Mutat, 2012. **33**(1): p. 198-208.
255. Arakawa, M., et al., *Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice.* J Biochem, 2003. **134**(5): p. 751-8.
256. Gunn, G., et al., *Long-term nonsense suppression therapy moderates MPS I-H disease progression.* Mol Genet Metab, 2014. **111**(3): p. 374-381.
257. Barton-Davis, E.R., et al., *Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice.* J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 375-81.
258. Malik, V., et al., *Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy.* Ann Neurol, 2010. **67**(6): p. 771-80.
259. Sermet-Gaudelus, I., et al., *In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study.* BMC Med, 2007. **5**: p. 5.
260. Chernikov, V.G., et al., *Comparison of cytotoxicity of aminoglycoside antibiotics using a panel cellular biotest system.* Bull Exp Biol Med, 2003. **135**(1): p. 103-5.
261. Zilberberg, A., L. Lahav, and R. Rosin-Arbesfeld, *Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons.* Gut, 2010. **59**(4): p. 496-507.
262. Hamada, M., et al., *A new antibiotic, negamycin.* J Antibiot (Tokyo), 1970. **23**(3): p. 170-1.
263. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.* Nature, 2007. **447**(7140): p. 87-91.
264. Goldmann, T., et al., *PTC124-mediated translational readthrough of a nonsense mutation causing Usher syndrome type 1C.* Hum Gene Ther, 2011. **22**(5): p. 537-47.
265. Du, M., et al., *PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2064-9.
266. Lee, H.L. and J.P. Dougherty, *Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases.* Pharmacol Ther, 2012. **136**(2): p. 227-66.
267. Lentini, L., et al., *Toward a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay.* Mol Pharm, 2014. **11**(3): p. 653-64.
268. Friesen, W.J., et al., *The nucleoside analog cliticine is a potent and efficacious readthrough agent.* RNA, 2017. **23**(4): p. 567-577.
269. Gonzalez-Hilarion, S., et al., *Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells.* Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 58.
270. Ali, B.H., et al., *Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011. **109**(4): p. 225-32.

271. Huth, M.E., A.J. Ricci, and A.G. Cheng, *Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection*. Int J Otolaryngol, 2011. **2011**: p. 937861.
272. McDonald, C.M., et al., *Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2017. **390**(10101): p. 1489-1498.
273. Mingo, J., et al., *One-Tube-Only Standardized Site-Directed Mutagenesis: An Alternative Approach to Generate Amino Acid Substitution Collections*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160972.
274. Luna, S., et al., *Tailor-Made Protein Tyrosine Phosphatases: In Vitro Site-Directed Mutagenesis of PTEN and PTPRZ-B*. Methods Mol Biol, 2016. **1447**: p. 79-93.
275. Mingo, J., et al., *Precise definition of PTEN C-terminal epitopes and its implications in clinical oncology*. NPJ Precis Oncol, 2019. **3**: p. 11.
276. Rodríguez-Escudero, I., et al., *Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 2): p. 613-23.
277. Andrés-Pons, A., et al., *In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9731-9.
278. Cid, V.J., et al., *Assessment of PTEN tumor suppressor activity in nonmammalian models: the year of the yeast*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5431-42.
279. Carapito, R., et al., *Automated high-throughput process for site-directed mutagenesis, production, purification, and kinetic characterization of enzymes*. Anal Biochem, 2006. **355**(1): p. 110-6.
280. Asiful Islam, M., et al., *Therapeutic Suppression of Nonsense Mutation: An Emerging Target in Multiple Diseases and Thrombotic Disorders*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(11): p. 1598-1609.
281. Mighell, T.L., S. Evans-Dutson, and B.J. O'Roak, *A Saturation Mutagenesis Approach to Understanding PTEN Lipid Phosphatase Activity and Genotype-Phenotype Relationships*. Am J Hum Genet, 2018. **102**(5): p. 943-955.
282. Zori, R.T., et al., *Germline PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome*. Am J Med Genet, 1998. **80**(4): p. 399-402.
283. Celebi, J.T., et al., *Phenotypic findings of Cowden syndrome and Bannayan-Zonana syndrome in a family associated with a single germline mutation in PTEN*. J Med Genet, 1999. **36**(5): p. 360-4.
284. Frazier, T.W., et al., *Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism*. Mol Psychiatry, 2015. **20**(9): p. 1132-8.
285. Forbes, S.A., et al., *COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D805-11.
286. Stenson, P.D., 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, 2017. **136**(6): p. 665-677.
287. Hemsley, A., et al., *A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(16): p. 6545-51.
288. Ido, E., *[A simple and rapid method for site-directed mutagenesis by using the PCR]*. Seikagaku, 1991. **63**(10): p. 1214-7.
289. McCullum, E.O., et al., *Random mutagenesis by error-prone PCR*. Methods Mol Biol, 2010. **634**: p. 103-9.
290. Labrou, N.E., *Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution*. Curr Protein Pept Sci, 2010. **11**(1): p. 91-100.
291. Wu, W., et al., *A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(13): p. e110.

Bibliografia

292. Kammann, M., et al., *Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)*. *Nucleic Acids Res*, 1989. **17**(13): p. 5404.
293. Sarkar, G. and S.S. Sommer, *The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis*. *Biotechniques*, 1990. **8**(4): p. 404-7.
294. Schilff, M., et al., *Stop Codon Context-Specific Induction of Translational Readthrough*. *Biomolecules*, 2021. **11**(7).
295. Lopez-Novoa, J.M., et al., *New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view*. *Kidney Int*, 2011. **79**(1): p. 33-45.
296. Hosseini-Farahabadi, S., et al., *Small molecule Y-320 stimulates ribosome biogenesis, protein synthesis, and aminoglycoside-induced premature termination codon readthrough*. *PLoS Biol*, 2021. **19**(5): p. e3001221.
297. Trzaska, C., et al., *2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 1509.
298. Du, L., et al., *Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations*. *J Exp Med*, 2009. **206**(10): p. 2285-97.
299. Correa-Cerro, L.S., et al., *DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *J Med Genet*, 2005. **42**(4): p. 350-7.
300. Johnston, S.B. and R.T. Raines, *Catalysis by the tumor-suppressor enzymes PTEN and PTEN-L*. *PLoS One*, 2015. **10**(1): p. e0116898.

**BIBLIOGRAFÍA
SUPLEMENTARIA**

Las siguientes referencias se utilizaron para cuantificar las mutaciones de PTEN encontradas en la línea germinal de los pacientes (Figura 24 y 37).

- Arch em et al., 1997. Deletion of PTEN in a patient with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggests allelism with Cowden disease
- Balci et al., 2017. Broad spectrum of neuropsychiatric phenotypes associated with white matter disease in PTEN hamartoma tumor syndrome
- Bansagi et al., 2017. Genetic heterogeneity of motor neuropathies
- Banneau et al., 2010. Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations
- Boccone et al., 2006. Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome with reactive nodular lymphoid hyperplasia and autism and a PTEN Mutation
- Bubien et al., 2013. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome
- Busa et al. 2015, Clinical presentation of PTEN mutations in childhood in the absence of family history of Cowden syndrome
- Busa et al., 2013. Novel PTEN germline mutation in a family with mild phenotype: difficulties in genetic counseling
- Busch et al., 2019. Neurobehavioral phenotype of autism spectrum disorder associated with germline heterozygous mutations in PTEN
- Bussaglia et al., 2002. PTEN mutations in eight Spanish families and one Brazilian family with Cowden syndrome
- Butler et al., 2005. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations
- Buxbaum et al., 2007. Mutation screening of the PTEN gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly
- Celebi et al., 1999, Identification of PTEN mutations in five families with Bannayan-Zonana syndrome
- Celebi et al., 2000. Germline PTEN mutations in three families with Cowden syndrome
- Chi et al., 1998. Mutational abrogation of the PTEN/MMAC1 gene in gastrointestinal polyps in patients with Cowden disease
- Chen et al., 2017. Immune dysregulation in patients with PTEN hamartoma tumor syndrome: Analysis of FOXP3 regulatory T cells
- Ciaccio et al., 2019. Clinical spectrum of PTEN mutation in pediatric patients. A bicenter experience
- Cooman et al., 2019. Genetic analysis in the bariatric clinic; impact of a PTEN gene Mutation
- Couch et al., 2015. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer
- DeParis et al., 2017. Uveal Ganglioneuroma due to Germline PTEN Mutation (Cowden Syndrome) Presenting as Unilateral Infantile Glaucoma.
- Derrey et al., 2004. Association between Cowden syndrome and Lhermitte-Duclos disease: report of two cases and review of the literatura

- Desmond et al., 2015. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment
- De lima et al., 2012. New mutation in the PTEN gene in a Brazilian patient with Cowden's syndrome
- De Vivo et al., 2000. Novel germline mutations in the PTEN tumour suppressor gene found in women with multiple cancers
- Du et al., 2018. Genetic Diagnostic Evaluation of Trio-Based Whole Exome Sequencing Among Children With Diagnosed or Suspected Autism Spectrum Disorder
- Elia et al., 2012. An atypical patient with Cowden syndrome and PTEN gene mutation presenting with cortical malformation and focal epilepsy
- Eng et al. 2003. PTEN: one gene, many syndromes
- Figer et al., 2002. Germline mutations in the PTEN gene in Israeli patients with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome and women with familial breast cancer
- Frazier et al., 2015. Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism
- Frazier et al., 2021. Cross-level analysis of molecular and neurobehavioral function in a prospective series of patients with germline heterozygous PTEN mutations with and without autism
- Gandhi et al., 2016. Novel PTEN mutation with leukoencephalopathy, basal ganglia calcification and action tremor
- Ghusayni et al., 2018. Hemimegalencephaly with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome
- Gicquel et al., 2003. Retinal angioma in a patient with Cowden disease
- Granados et al. 2013. Brothers with germline PTEN mutations and persistent hypoglycemia, macrocephaly, developmental delay, short stature, and coagulopathy
- Grozeba et al., 2015. Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability.
- Gruhl et al., 2018. A family with PTEN mutations with malignancy and an unusually high number of offspring with autism spectrum disorder: a case report.
- Ha et al., 2012. A case of Cowden syndrome diagnosed from multiple gastric polyposis.
- Habesian et al., 2018. Segmental storiiform collagenomas: Expanding the spectrum of PTEN hamartoma tumor syndrome in children
- Hady-cohen et al., 2019. Familial Intracranial Hypertension in 2 Brothers With PTEN Mutation: Expansion of the Phenotypic Spectrum
- Hansen-Kiss et al. 2017. Use of multigene-panel identifies pathogenic variants in several CRC-predisposing genes in patients previously tested for Lynch Syndrome
- Hansen-Kiss et al., 2017. A retrospective chart review of the features of PTEN hamartoma tumour syndrome in children.
- Heindl et al., 2012. Autoimmunity, intestinal lymphoid hyperplasia, and defects in mucosal B-cell homeostasis in patients with PTEN hamartoma tumor syndrome
- Herman et al., 2007. Increasing knowledge of PTEN germline mutations: Two additional patients with autism and macrocephaly.
- Hobert et al., 2014. Biochemical screening and PTEN mutation analysis in individuals with autism spectrum disorders and macrocephaly
- Isik et al., 2020. Clinical and molecular aspects of PTEN mutations in 10 pediatric patients. *Annals of human genetics*

- Kato et al., 2018. Distinctive facies, macrocephaly, and developmental delay are signs of a PTEN mutation in childhood
- Kawase et al., 2020. A case of Cowden syndrome with a novel mutation in the PTEN gene
- Kim et al., 2005. Analysis of PTEN gene mutations in Korean patients with Cowden syndrome and polyposis syndrome
- Kirches et al., 2010. Lhermitte-Duclos disease caused by a novel germline PTEN mutation R173P in a patient presenting with psychosis
- Klein et al., 2013. Macrocephaly as a clinical indicator of genetic subtypes in autism
- Kohno T 1998. Germline mutations of the PTEN/MMAC1 gene in Japanese patients with Cowden disease
- Kubo et al., 2000. A novel PTEN mutation in a Japanese patient with Cowden disease
- Kun-rodrigues et al., 2015. A systematic screening to identify de novo mutations causing sporadic early-onset Parkinson's disease
- Kurata et al., 2018. Neurodevelopmental disorders in children with macrocephaly: A prevalence study and PTEN gene analysis.
- Kurek et al., 2012. PTEN Hamartoma of Soft Tissue: A Distinctive Lesion in PTEN Syndromes
- Kurose et al., 1999. Variant manifestation of Cowden disease in Japan: hamartomatous polyposis of the digestive tract with mutation of the PTEN gene
- Kwon et al., 2018. Synchronous Bilateral Breast Carcinoma in a Patient with Cowden Syndrome with PTEN Mutation: A Case Report.
- Kwong et al., 2016. Detection of Germline Mutation in Hereditary Breast and/or Ovarian Cancers by Next-Generation Sequencing on a Four-Gene Panel
- Lachlan et al., 2007. Cowden syndrome and Bannayan Riley Ruvalcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers
- LaDuca et al., 2014. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients
- LaDuca et al., 2017. Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels
- Liaw et al., 1997. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome
- Lionel et al., 2018. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test
- Loffeld et al., 2006. Epidermal naevus in Proteus syndrome showing loss of heterozygosity for an inherited PTEN Mutation
- Longy et al., 1998. Mutations of PTEN in patients with Bannayan-Riley-Ruvalcaba phenotype.
- Liu et al., 2017. Identification of recurrent BRCA1 mutation and its clinical relevance in Chinese Triple-negative breast cancer cohort
- Lobo et al., 2009. Germline and somatic cancer-associated mutations in the ATP-binding motifs of PTEN influence its subcellular localization and tumor suppressive function
- Lynch et al., 1997. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile poliposis

- Manuel et al., 2016. phenotypical description of a subset of individuals with pten germline mutations, autism spectrum disorder and macrocephaly
- Mattasi et al., 2017. Variant discovery in patients with Mendelian vascular anomalies by next-generation sequencing and their use in patient clinical management
- Marsh et al., 1999, PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden síndrome
- Marsh et al, 1998. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN Mutation
- Marsh et al., 1997. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana síndrome
- Mauro et al.2017. De Novo PTEN Mutation in a Young Boy with Cutaneous Vasculiti
- Mayouf et al., 2020. Systemic lupus erythematosus in a girl with PTEN variant and transaldolase deficiency: a novel phenotype
- Masood et al., 2017. A novel PTEN mutation associated with colonic ganglioneuromatous polyps
- McBride et al., 2010. Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly
- Melbarde et al., 2012. Challenges in the management of a patient with Cowden syndrome: case report and literature review
- Mester & Eng et al., 2012. Estimate of de novo mutation frequency in probands with PTEN hamartoma tumor síndrome
- Monies et al., 2017. The landscape of genetic diseases in Saudi Arabia based on the first 1000 diagnostic panels and exomes
- Nagy et al., 2011. Frequency of Germline PTEN Mutations in Differentiated Thyroid Cancer
- Nasr et al., 2019. Sclerosing Pneumocytoma of the Lungs Arising in a Child With PTEN Mutation
- Nelen et al. 1999, Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations
- Nelen et al., 1997. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease
- Negishi et al., 2017. A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly
- Neychev et al., 2016. Neuroendocrine Tumor of the Pancreas as a Manifestation of Cowden Syndrome: A Case Report.
- Ng et al., 2016. Identification of germline alterations in breast cancer predisposition genes among Malaysian breast cancer patients using panel testing
- Nizialek et al., 2015. KLLN epigenotype-phenotype associations in Cowden síndrome
- Ngeow et al., 2014, Second malignant neoplasms in patients with Cowden syndrome with underlying germline PTEN mutations
- Ngeow et al., 2013. Prevalence of germline PTEN, BMPR1A, SMAD4, STK11, and ENG mutations in patients with moderate-load colorectal polyps
- Olschwang et al., 1998. PTEN germ-line mutations in juvenile polyposis coli

- Orrico et al., 2009. Novel PTEN mutations in neurodevelopmental disorders and macrocephaly
- O’Roak et al., 2012. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders
- Pal et al., 2012. PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity
- Parisi et al., 2001. The spectrum and evolution of phenotypic findings in PTEN mutation positive cases of Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome.
- Pastor et al., 2016. Mutational landscape in children with myelodysplastic syndromes is distinct from adults: specific somatic drivers and novel germline variants
- Piccione et al., 2013. PTEN hamartoma tumor syndromes in childhood: description of two cases and a proposal for follow-up protocol.
- Pilarski et al., 2011. Predicting PTEN mutations: an evaluation of Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome clinical features
- Plamper et al., 2019. Phenotype-Driven Diagnostic of PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Macrocephaly, But Neither Height nor Weight Development, Is the Important Trait in Children
- Plamper et al., 2018. Thyroid disease in children and adolescents with PTEN hamartoma tumor syndrome (PHTS)
- Pradella et al., 2014. A novel deleterious PTEN mutation in a patient with early-onset bilateral breast cancer
- Reardon et al., 2001. A novel germline mutation of the PTEN gene in a patient with macrocephaly, ventricular dilatation, and features of VATER association
- Retterer et al., 2016. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications
- Rustad et al., 2006. Germline PTEN mutations are rare and highly penetrant
- Saskin et al., 2017. Prevalence of four Mendelian disorders associated with autism in 2392 affected families
- Sarquis et al., 2006. Distinct expression profiles for PTEN transcript and its splice variants in Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome
- Sawada et al., 2000. Mutation analysis of the PTEN / MMAC1 gene in Japanese patients with Cowden disease
- Sawada et al., 2004. Two novel mutations of PTEN gene in Japanese patients with Cowden syndrome
- Scala et al., 1998. Novel mutation of the PTEN gene in an Italian Cowden's disease kindred
- Schaaf et al., 2011. Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders
- Schwerd et al., 2015. A recessive form of extreme macrocephaly and mild intellectual disability complements the spectrum of PTEN hamartoma tumour syndrome
- Shao et al., 2020. Polymicrogyria is associated with pathogenic variants in PTEN
- Smith et al., 2011. Thyroid Nodules and Cancer in Children with PTEN Hamartoma Tumor Syndrome
- Spinelli et al. 2014. Functionally distinct groups of inherited PTEN mutations in autism and tumour syndromes

- Staal et al., 2002. A novel germline mutation of PTEN associated with brain tumours of multiple lineages
- Stein et al 2010. Autistic spectrum disorder in a 9-year-old girl with macrocephaly
- Susswein et al., 2016. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing
- Sutphen et al., 1999. Severe Lhermitte-Duclos disease with unique germline mutation of PTEN
- Tan et al., 2011, A clinical scoring system for selection of patients for PTEN mutation testing is proposed on the basis of a prospective study of 3042 probands
- Tan et al., 2007. The spectrum of vascular anomalies in patients with PTEN mutations: implications for diagnosis and management
- Tate et al., 2008. A novel mutation of the PTEN gene in a Japanese patient with Cowden syndrome and bilateral breast cancer
- Tatton-Brown et al., 2017. Mutations in Epigenetic Regulation Genes Are a Major Cause of Overgrowth with Intellectual Disability
- Tekin et al., 2006. A germline PTEN mutation with manifestations of prenatal onset and verrucous epidermal nevus
- Thiffault et al., 2004. Mutation analysis of the tumor suppressor PTEN and the glypican 3 (GPC3) gene in patients diagnosed with Proteus syndrome
- Ticha et al., 2019. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants.
- Tosur et al., 2018. Considerations for total thyroidectomy in an adolescent with PTEN Mutation
- Tsou et al., 1998. The genetic basis of Cowden's syndrome: three novel mutations in PTEN/MMAC1/TEP1
- Uemura et al., 2017. Pancreatic adenocarcinoma with a germline PTEN p.Arg234Gln Mutation
- Ueno et al., 2019. A novel missense PTEN mutation identified in a patient with macrocephaly and developmental delay
- Vanderber et al., 2014. Characteristic brain magnetic resonance imaging pattern in patients with macrocephaly and PTEN mutations
- Varga et al., 2009. The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly
- Vega et al., 2003. A novel loss-of-function mutation (N48K) in the PTEN gene in a Spanish patient with Cowden disease
- Wong et al., 2018. 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
- Wu et al., 2020. Phenotype-to-genotype approach reveals head-circumference-associated genes in an autism spectrum disorder cohort
- Yehia et al., 2020. Copy Number Variation and Clinical Outcomes in Patients With Germline PTEN Mutations
- Yeung et al., 2017. Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism

- Yotsumoto et al.2020. Infantile macrocephaly and multiple subcutaneous lipomas diagnosed with PTEN hamartoma tumor syndrome: A case report.
- Yuen et al., 2017. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder
- Yurgelun et al., 2017. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer
- Zhou et al., 2001, Association of germline mutation in the PTEN tumour suppressor gene and Proteus and Proteus-like síndromes
- Zhou et al., 2003. Germline inactivation of PTEN and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway cause human Lhermitte-Duclos disease in adults

ANEXOS

Publicaciones

Luna, S., Torices, L., Mingo, J., Amo, L., Rodríguez-Escudero, I., Ruiz-Ibarlucea, P., Erramuzpe, A., Cortés, J. M., Tejada, M. I., Molina, M., Nunes-Xavier, C. E., López, J. I., Cid, V. J., & Pulido, R. (2021). A global analysis of the reconstitution of PTEN function by translational readthrough of PTEN pathogenic premature termination codons. *Human Mutation*, 1–16.

<https://doi.org/10.1002/humu.24186>

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

Otras publicaciones relacionadas durante la tesis

Coronas-Serna, J. M., M. Valenti, E. Del Val, T. Fernández-Acero, I. Rodríguez-Escudero, J. Mingo, S. Luna, L. Torices, R. Pulido, M. Molina and V. J. Cid. (2020), 'Modeling Human Disease in Yeast: Recreating the Pi3k-Pten-Akt Signaling Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Int Microbiol* Vol. 23, No. 1, pp. 75-87.

Fernández-Acero, T., E. Bertalmio, S. Luna, J. Mingo, I. Bravo-Plaza, I. Rodríguez-Escudero, M. Molina, R. Pulido and V. J. Cid. (2019), 'Expression of Human Pten-L in a Yeast Heterologous Model Unveils Specific N-Terminal Motifs Controlling Pten-L Subcellular Localization and Function', *Cells* Vol. 8, No. 12.

Mingo, J., S. Luna, A. Gaafar, C. E. Nunes-Xavier, L. Torices, L. Mosteiro, R. Ruiz, I. Guerra, R. Llarena, J. C. Angulo, J. I. López and R. Pulido. (2019), 'Precise Definition of Pten C-Terminal Epitopes and Its Implications in Clinical Oncology', *NPJ Precis Oncol* Vol. 3, pp. 11.

Pulido, R., J. Mingo, A. Gaafar, C. E. Nunes-Xavier, S. Luna, L. Torices, J. C. Angulo and J. I. López. (2019), 'Precise Immunodetection of Pten Protein in Human Neoplasia', *Cold Spring Harb Perspect Med* Vol. 9, No. 12

Mingo, J., I. Rodríguez-Escudero, S. Luna, T. Fernández-Acero, L. Amo, A. R. Jonasson, R. T. Zori, J. I. López, M. Molina, V. J. Cid and R. Pulido. (2018), 'A Pathogenic Role for Germline Pten Variants Which Accumulate into the Nucleus', *Eur J Hum Genet* Vol. 26, No. 8, pp. 1180-1187.

Oliver, M. D., T. Fernández-Acero, S. Luna, I. Rodríguez-Escudero, M. Molina, R. Pulido and V. J. Cid. (2017), 'Insights into the Pathological Mechanisms of P85 α Mutations Using a Yeast-Based Phosphatidylinositol 3-Kinase Model', *Biosci Rep* Vol. 37, No. 2.

Mingo, J., A. Erramuzpe, S. Luna, O. Aurtenetxe, L. Amo, I. Diez, J. T. Schepens, W. J. Hendriks, J. M. Cortés and R. Pulido. (2016), 'One-Tube-Only Standardized Site-Directed Mutagenesis: An Alternative Approach to Generate Amino Acid Substitution Collections', PLoS One Vol. 11, No. 8, pp. e0160972.

