

RESULTADOS

I. BANDAS DIFERENCIALES SELECCIONADAS

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a la búsqueda, identificación y caracterización de genes posiblemente implicados en el desarrollo tumoral del cáncer de próstata. La hipótesis inicial del trabajo consideró que los genes que de una manera u otra participan o se ven afectados durante la progresión del cáncer de próstata podrían ser detectados mediante el análisis de su expresión ya que las alteraciones génicas iniciales, responsables del fenómeno de la transformación se traducen, en último término, en una variación en los niveles transcripcionales de dichos genes. Estos cambios pueden ser detectados comparando los niveles de expresión entre las zonas de tejido normal y las zonas afectadas por el carcinoma del mismo individuo.

Por este motivo, y basándonos en las posibilidades de aquel momento, se decidió utilizar la técnica del RNA arbitrarily primed PCR o RAP. Para llevar a cabo esta búsqueda, a través de dicha técnica se compararon las muestras correspondientes a áreas de tumor y áreas aparentemente normales de la misma próstata tumoral (obtenida por prostatectomía radical). Debido a su heterogeneidad, incluso entre las áreas prostáticas del mismo paciente, se decidió realizar el análisis comparativo considerando cada próstata como individual. El resultado ya se extrapolaría posteriormente a un número superior de casos.

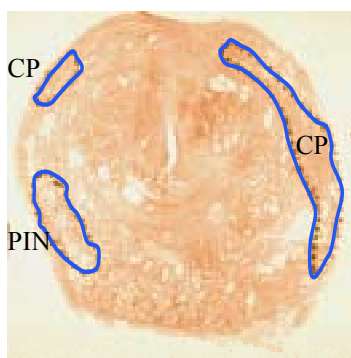


Figura 23. Tinción con hematoxilina/eosina de una sección transversal de la próstata en la que están marcadas varias regiones afectadas por CP y PIN. Con ayuda de la patóloga determinamos las regiones que queremos analizar y las acotamos para la extracción posterior del RNA mensajero.

Para este análisis se utilizó una muestra prostática procedente de prostatectomía radical. Esta muestra fue examinada por un patólogo para acotar las diferentes regiones, normales o afectadas por PIN o CP, de las cuales posteriormente se extraería el RNAm para la realización de la técnica de RAP. Para este estudio comparativo fueron consideradas dos regiones afectadas de PIN, tres regiones correspondientes a la zona benigna periférica, aunque posiblemente con contaminación de la zona de transición, y una región tumoral.

En la siguiente tabla, cada columna corresponde a una población distinta de cDNAs, todos ellos procedentes de la misma próstata pero de distintas áreas. Así, se acotaron regiones afectadas por PIN (PIN A y PIN B), afectadas por carcinoma (CP) y áreas morfológicamente normales (ZBP 1 y ZBP 2). Como resultado de la comparación de estas áreas se obtuvieron 9 bandas con un patrón de expresión diferencial. En la tabla se indica con una X, en qué población aparece la banda seleccionada por su patrón diferencial. También se señala su identidad

Número de bandas con igual patrón de expresión	PIN A	PIN B	ZBP 1	ZBP 2	CP	Identificación
2				X↓	X	Gen desconocido
2				X		Similar a la subunidad C de la citocromo oxidasa ¿?
2			X			Gen desconocido
1					X	Extraneuronal monoamine transporter
1	X↓				X	Gen desconocido: PTOV1
1			X		X	Gen desconocido

Tabla 8. Bandas obtenidas por la técnica de RAP que presentan un patrón diferencial. En la primera columna se indica el número de bandas obtenidas con el mismo patrón de expresión. En la última columna, la identificación del cDNA que finalmente fue secuenciado. Cada columna representa el origen de la muestra analizada. Todas estas muestras proceden de la misma próstata y corresponden a regiones afectadas por PIN (PIN A y PIN B), regiones adyacentes al tumor aparentemente normales (ZBP1, ZBP2) y región afectada por cáncer de próstata (CP). En color gris se indican las bandas que posteriormente estudiamos y que se presentan en este trabajo. Las flechas indican la menor (↓) o mayor (↑) expresión en una región dada con respecto al resto de regiones analizadas.

Las bandas seleccionadas, sobre las que se ha realizado un estudio más exhaustivo, corresponden al gen del transportador de monoaminas extraneuronal (*EMT*, *extraneuronal monoamine transporter*) y a un gen nuevo, hasta ahora no descrito al que hemos denominado *PTOVI* (*prostate tumor over expressed 1*). Se continuó el estudio del gen *EMT* por ser la única banda detectada exclusivamente en el foco tumoral. Respecto al gen nuevo al que hemos denominado *PTOVI*, se decidió proseguir con su estudio por el patrón de expresión que presentaba. El hecho de encontrarse expresado en PIN y carcinoma y no en la zona normal, era indicativo de que tal vez se tratara de un gen asociado a etapas iniciales de la progresión tumoral y por lo tanto, un posible marcador tumoral. También fue decisiva la cantidad de ESTs que avalaban su existencia.

II. PTOV 1 (Prostate Tumor Overexpressed 1)

A) PTOV1, un transcrito sobreexpresado en tumores de próstata

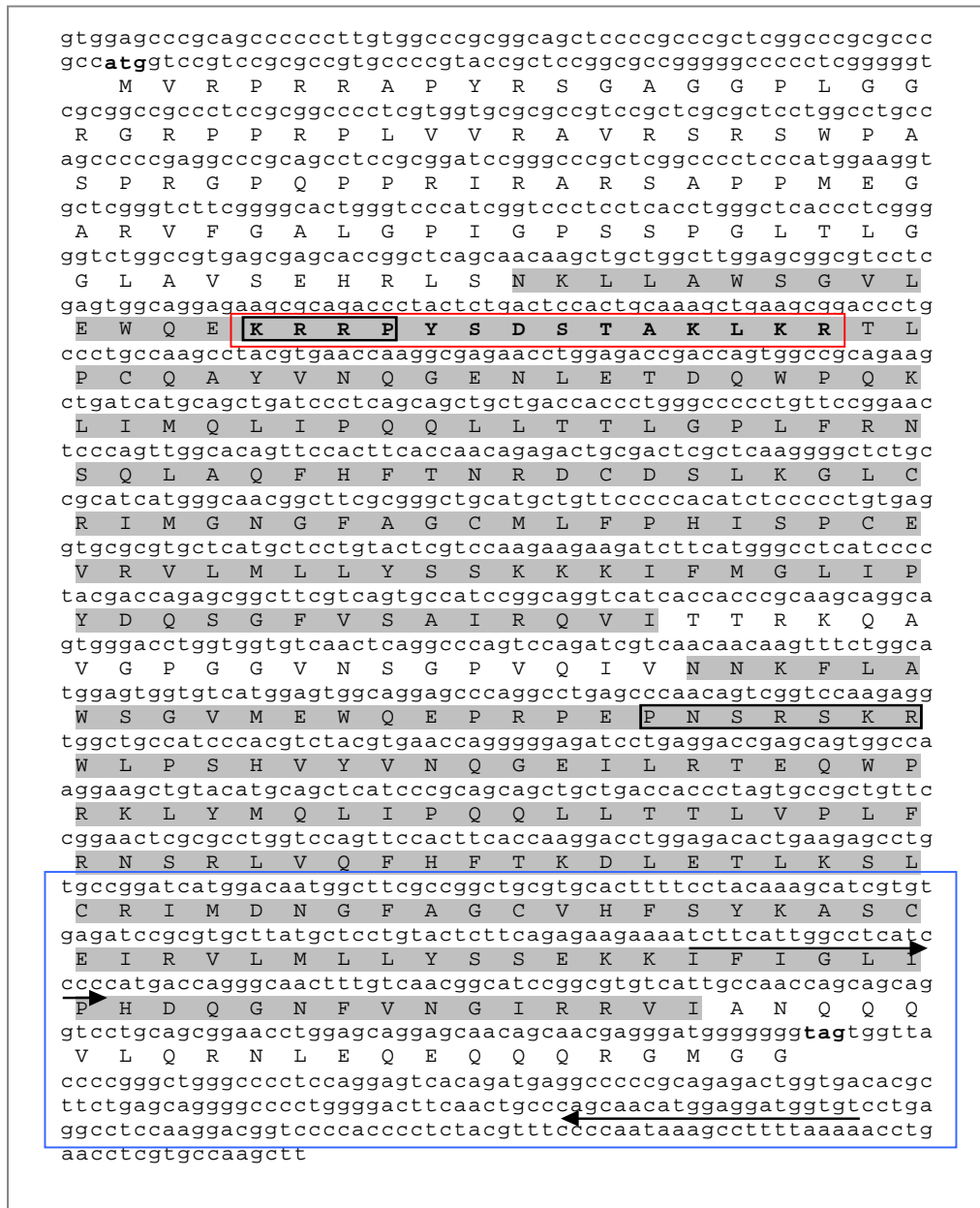


Figura 24. Secuencia de cDNA de PTOV1 en la cual se señala el codón de inicio y de finalización de la traducción (en negrita) y la deducción teórica de la secuencia proteica resultante. Los dos bloques proteicos repetidos en tándem están subrallados en gris. Las dos secuencias de aminoácidos encuadradas corresponden a secuencias teóricas de localización nuclear. Los cebadores utilizados en la RT-PCR semicuantitativa están indicados con una flecha. En azul se indica la secuencia de cDNA obtenida por la técnica de RAP y en rojo, la secuencia peptídica que posteriormente se utilizó para generar anticuerpos específicos contra PTOV1.

Mediante el algoritmo BLAST se analizó la secuencia de cDNA aislada del RAP con las bases de datos de nucleótidos, disponibles públicamente, incluidas en GenBank, EMBL, Swissprot y PIR. No se obtuvo ninguna homología con genes o proteínas conocidos. Por el contrario, se encontraron similitudes significativas con numerosos ESTs de la base de datos de humanos, ratón y rata. Todos los ESTs con identidades significativas a la banda seleccionada se asociaban al clon de cDNA humano M23867 (n° acceso U79287) (Figura 24). Por tanto concluimos que esta banda corresponde a un transcrito no descrito previamente, que decidimos designar como "*Prostate Tumor Overexpressed 1*" o PTOV1.

A continuación, se diseñaron cebadores específicos para el análisis de la expresión de PTOV1 en tumores de próstata y tejido prostático normal mediante RT-PCR semicuantitativa. El fragmento amplificado se muestra en la figura 24 (las flechas corresponden a los cebadores utilizados). Tal como muestra la figura 25, el análisis semicuantitativo se realizó sobre cuatro poblaciones de muestras distintas.

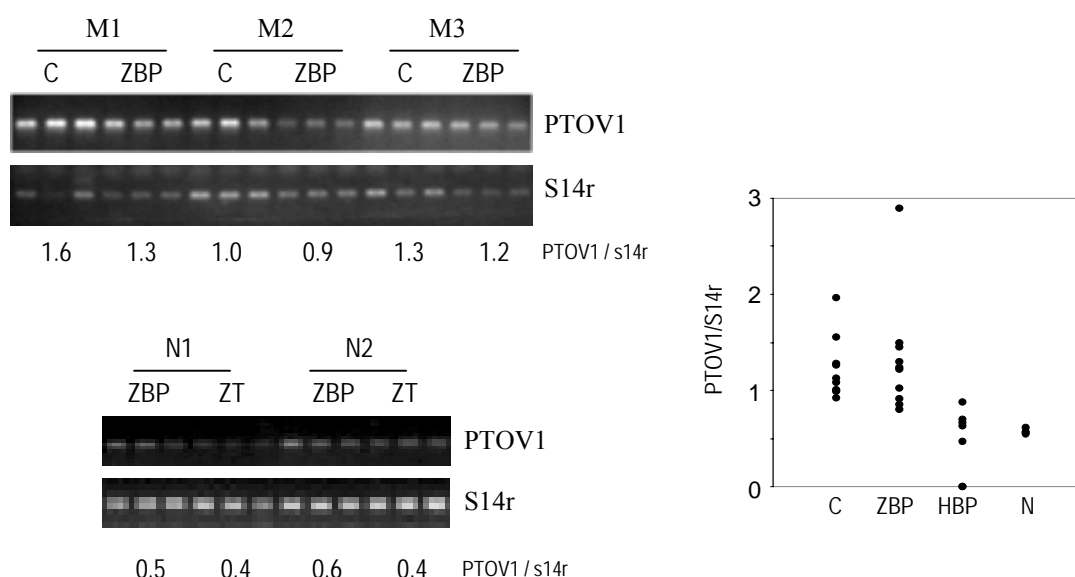


Figura 25. Detalle del resultado de la RT-PCR semicuantitativa y gráfico ilustrativo de los distintos valores obtenidos por densitometría óptica. A) M1, M2 y M3 corresponden a distintas próstatas afectadas por cáncer de próstata en las que se han analizado la región afectada por el tumor (C) y la región adyacente aparentemente normal (ZBP). N1 y N2 corresponden a próstatas normales en las que se han analizado la zona benigna periférica (ZBP) que es donde se origina mayoritariamente el CP, y la zona de transición (ZT) que es donde se origina la hiperplasia benigna de próstata. B) La RT-PCR semicuantitativa se ha realizado a partir de 4 poblaciones de muestras de cDNA: C (foco de carcinoma de próstata) y ZBP (zona benigna periférica anexa al foco tumoral) provienen de la misma próstata (prostatectomía radical). La población de cDNAs HBP (hiperplasia benigna de próstata) proviene de próstatas no afectadas por la patología tumoral y la población N proviene de próstatas normales sin ningún tipo de afectación prostática. Los valores indicados provienen del ratio entre los valores densitométricos correspondientes al gen PTOV1 y a un gen control de expresión constitutiva, s14r.

Las dos primeras poblaciones proceden de próstatas tumorales obtenidas mediante prostatectomía radical, C corresponde al área tumoral y ZBP corresponde a la zona benigna periférica, aparentemente normal, anexa al área tumoral. Las dos poblaciones restantes provienen de próstatas no tumorales ya sea por hiperplasia benigna de próstata (HBP) o donantes de órganos (N). Los niveles de expresión de PTOV1 en las muestras de las áreas tumorales y anexas al tumor son significativamente superiores cuando se comparan con los niveles obtenidos en HBP ($P < 0.0005$ y $P < 0.005$, respectivamente) o cuando se comparan con el tejido prostático normal ($P < 0.01$ y $P < 0.04$, respectivamente).

Mediante el programa ClustalW se realizó un múltiple alineamiento de una selección de ESTs de distintos tejidos (músculo, riñón, útero, placenta, ovario, pulmón, próstata...) junto a la secuencia parcial del cDNA de PTOV1. De esta manera se consiguió una secuencia continua formada por el solapamiento de estos fragmentos de cDNA. La secuencia resultante se comparó de nuevo con las secuencias contenidas en la base de datos y resultó corresponder a la totalidad del clon contenido en la base de datos (# U79287) identificado como clon M23867. A raíz de este resultado, se diseñaron primers que amplificaran la máxima longitud de la secuencia para así comprobar que verdaderamente existía y que éramos capaces de aislarla. Paralelamente nos pusimos en contacto con los autores del clon M23867 para ver si podrían facilitárnoslo. Con el fin de comprobar que el ATG de la secuencia era verdaderamente el inicio de traducción o si, por el contrario, la secuencia de cDNA que conocíamos era parcial y se extendía hacia 5' incluyendo otro ATG, se diseñaron cebadores que amplificaran la secuencia hacia el extremo 5' mediante la técnica de RACE sobre cDNA de próstata. Tras varios intentos fallidos, llegamos a la conclusión de que el cDNA conocido era, posiblemente, completo y que el ATG localizado en la base 111 era el inicio de traducción.

La traducción del cDNA resultante da lugar a una proteína de 416 aminoácidos altamente conservada entre *H. sapiens*, *M. musculus* y *D. melanogaster* (acc. AC013074) (Figura 26).

B) PTOV1 define una nueva familia de proteínas

Una vez comprobada la existencia del cDNA y su potencial implicación en la progresión tumoral, es necesario un estudio exhaustivo del gen que lo sitúe en un contexto determinado ya sea por su pertenencia a alguna familia de proteínas ya establecida o la presencia de alguna secuencia de interacción con otras proteínas o dominios proteicos, etc. Esta observación es de gran importancia ya que facilita la comprensión de la posible función y por lo tanto grado de implicación del gen en el fenotipo tumoral.

El estudio parte del análisis de la estructura proteica primaria y de la comparación de la secuencia con el resto de proteínas de distintas especies contenidas en las bases de datos públicas. En el caso de PTOV1, no hemos encontrado ninguna similitud con proteínas o dominios previamente

descritos y, como se presenta a continuación, la estructura primaria de la proteína de PTOV1 presenta características peculiares, conservadas entre distintas especies y que sugiere que nos encontramos ante un nuevo tipo de proteína y probablemente, familia de proteínas.

La proteína PTOV1 está constituida por dos módulos de secuencias de 151 y 147 aminoácidos situados en tándem que comparten entre sí una identidad del 66 % y una similitud del 79 %. Dichos bloques se encuentran separados por una pequeña secuencia de 16 aminoácidos. La predicción de la estructura secundaria de esta proteína nos muestra una secuencia alternada de hélices alfa y beta (Figura 26).

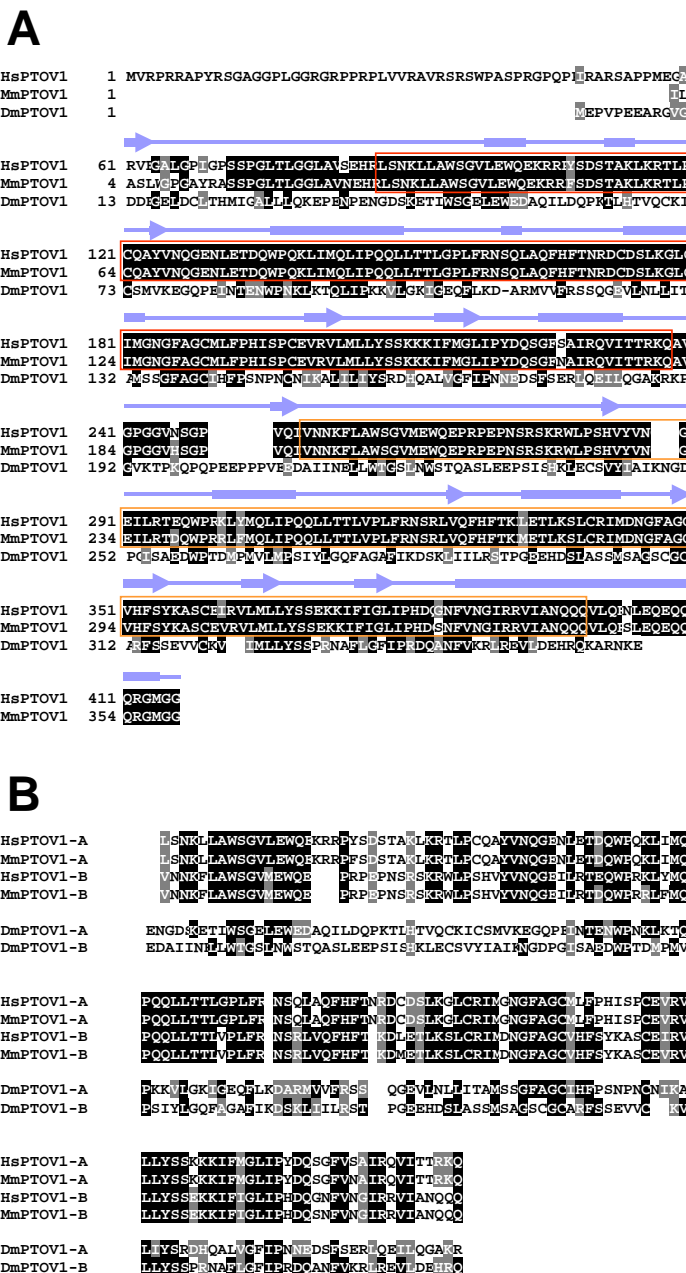


Figura 26. A) Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de PTOV1 en *D. melanogaster* (DmPTOV1), *M. musculus* (MmPTOV1) y *H. sapiens* (HmPTOV1). En negro están señaladas las identidades entre las tres secuencias y en gris los cambios conservados. Los tramos de secuencia enmarcada, corresponden a los dos módulos de aminoácidos dispuestos en tandem. En rojo el módulo A y en naranja el módulo B. Sobre la secuencia está representada en azul la estructura secundaria de la proteína. Las flechas corresponderían a las hélices alfa y las barras más gruesas a las hélices beta. En B) está representado el múltiple alineamiento entre los módulos proteicos A y B que se encuentran en estas 3 especies (humanos, mosca y ratón).

Al realizar el análisis del homólogo de PTOV1 en *D. melanogaster* (#AC013074) hemos encontrado que ambas comparten la misma disposición en tándem así como la estructura secundaria predicha de hélices alfa y beta (Figura 26). Sin embargo, la identidad encontrada entre los dos módulos de *D. melanogaster* es menor, 33 % de identidad y un 57 % de similitud.

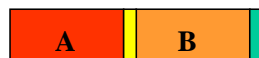
A *H. sapiens*

```

PTOV A  SNNKLLAWSGVLEWQEKRRRFYSSTALTKRRLPCQAYVNOGENEETDQWFOKLLIMQLIPO
PTOV B  VNNRPLAWSGVLEWQEKRRRFYSSTALTKRRLPCQAYVNOGENEETDQWFOKLLIMQLIPO

PTOV A  QLLTTLQPLFRNSQLAOFHFTNEDDSLKGLCRIMNGFAGCMLFFPHISPCEIRVLMMLLY
PTOV B  QLLTTLVPLFRNSRLVQFHFTKDLKGLKSLCRIMNGFAGCMLFFPHISPCEIRVLMMLLY

PTOV A  SSKKKIFMGLIPDQSGGFVSIIRQVITTRKQ
PTOV B  SSKKKIFMGLIPDQSGGFVSIIRQVITTRKQ
    
```



D. melanogaster

```

AC013074 A  ENDSKELTWECEPEDEDAQIEFQPKTLHTVQSKICSMYRPSQPEENTENENKIKTQLE
AC013074 B  EDIITINELWEGELNWTQASLSEPPSISIKLECSYIALINQDGGISADDPITDPMVLLI

AC013074 A  EKKVLGKIIEQFQKPARMVVFRSQQGEVLNLTITANSSQPAQCHFFSNPNENIKALTLI
AC013074 B  BSIYLQDFGAPFKDSKILILRSFQGEHDSLASSMSACSCCAESESSEVVCQKVINLLI

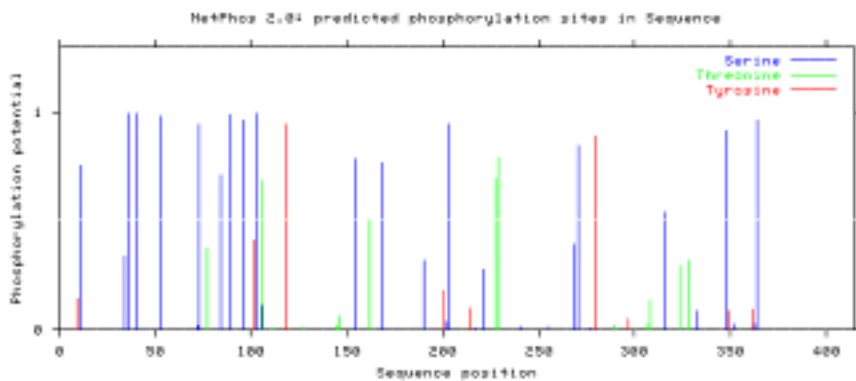
AC013074 A  YSRDHCALWGFIFNNEDSISERLQELTQGAQR
AC013074 B  YSQRNAPWGFIFRDOANFVKRLREVLDEHQ
    
```



Figura 27. A) Alineamiento de los módulos A y B en *H. sapiens* y en *D. melanogaster*. En ambas especies, estos módulos están separados por una pequeña secuencia de aminoácidos representada en color amarillo en la figura. El extremo C-terminal de PTOV1 de ambas especies (en verde) no está incluido en el módulo B.

B) Predicción teórica de los sitios de fosforilación de PTOV1 así como de las posibles secuencias de reconocimiento por otras moléculas que pudieran regular su función. La figura muestra la posición de las posibles

B



fosforilaciones en serinas (azul), threoninas (verde) y tirosinas (rojo). También se indica la posición de la región de posible interacción con la subunidad p85 de la proteína PI3K, 14-3-3 y Grb2.

p85_SH3_m1

P 23

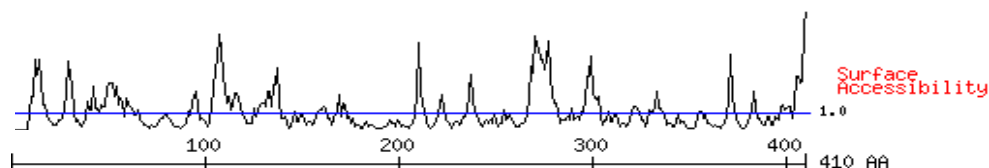
S 53

1433_m1

S 36

Grb2_SH2

Y280



Este estudio define un nuevo tipo de módulo de secuencia proteica conservada en proteínas de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Drosophila melanogaster*. No hemos encontrado ninguna homología significativa con proteínas o dominios proteicos hasta el momento descritos. Sin embargo, al realizar un análisis teórico de la proteína de PTOV1 mediante programas bioinformáticos (Figura 27), hemos encontrado secuencias de reconocimiento de quinasas al igual que de factores asociados a vías de transducción de señal (Grb2, 14-3-3 y la subunidad p85 de la proteína fosfoinositol 3 quinasa (PI3K)) que podrían estar implicados en la regulación de su función. La predicción teórica indica una posible fosforilación en serina en las posiciones 11, 36, 40, 53, 73, 84, 89, 96, 103, 154, 168, 203, 271, 316, 348 y 364 de la secuencia de aminoácidos; fosforilación en treoninas en las posiciones 106, 162, 228 y 229 y fosforilación en tirosinas en las posiciones 118 y 280. En posición 23 existiría una posible región de reconocimiento por la subunidad p85 de la proteína fosfoinositol 3 quinasa (PI3K); en posición 36 y 53 dos posibles regiones de reconocimiento por las proteínas 14-3-3 (implicadas en la regulación de la mitogénesis, progresión del ciclo celular y apoptosis); y por último, en posición 280 existiría una región de reconocimiento por la proteína adaptadora Grb2 (asociada a la vía de señalización de EGF, Ras y las quinasa ERK1 y 2).

C) El gen PTOV1

El interés suscitado por este nuevo gen del cual nada se sabía, hizo que decidiéramos estudiarlo mejor, conocer su estructura exónica y su localización cromosómica.

El experimento presentado a continuación se realizó en colaboración con el *Institut de Recerca Oncològica* (M. Nadal, X. Estivill) quienes amablemente nos ayudaron con el aislamiento del clon BAC y con la localización cromosómica mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia. Usando como sonda un fragmento de PTOV1 de tamaño correspondiente a 1.2 Kb se aisló un clon BAC (173J1) que posteriormente fue utilizado como sonda para detectar la localización cromosómica de PTOV1 mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre cromosomas metafásicos (Figura 28). PTOV1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.3-13.4).



Figura 28. Localización cromosómica del gen PTOV1 en el brazo largo del cromosoma 19 mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia sobre cromosomas metafásicos.

Con el fin de determinar inicialmente que este clon BAC contenía el gen PTOV1 y no otra secuencia (pseudogen, etc) se realizó un southern blot a partir del DNA digerido de este clon, utilizando como sonda prácticamente la totalidad (1 Kb) del cDNA de PTOV1. A continuación se procedió a la caracterización de la estructura exón-intrón de dicho gen.

La predicción teórica de las regiones de “corte y empalme” y de la estructura génica de PTOV1 se realizó mediante el programa GenScanW. En esta predicción se utilizan datos de secuencia genómica con aplicación de algoritmos de predicción *ab-initio*, así como la conformación de la estructura mediante exhaustivas comparaciones con los transcritos existentes en las bases de datos públicas. Paralelamente se realizó un alineamiento del cDNA de PTOV1 con una secuencia de cDNA parcialmente procesado contenida en la base de datos (# AL050131) y que correspondía a la secuencia comprendida entre las bases 501- 878 de PTOV1. Considerando que los módulos A y B eran uno espejo del otro y apoyándonos en la información obtenida del GenScan, se pudo predecir los supuestos puntos de *splicing* y diseñar primers que los flanquearan. Mediante este abordaje basado en la técnica de PCR, secuenciamos la totalidad del gen PTOV1. La secuencia génica (esquema en la Figura 29), tiene un total de 9013 pares de bases. Las regiones codificantes corresponden a los intervalos de secuencia incluidos entre las bases: 64..234, 3141..3260, 3386..3468, 3565..3622, 3704..3811, 5709..5864, 6427..6516, 6638..6711, 6791..6848, 7283..7387, 8720..8917, 9002..9013. La secuencia fue introducida en la base de datos del GenBank. Su número de acceso es AF238381.

La conclusión de estos análisis es que el gen PTOV1 está compuesto por 12 exones. El primero de los bloques homólogos de PTOV1 está codificado por los exones 3 al 6 y el segundo bloque por la región codificante correspondiente a los exones 7 al 11 (Figura 29).

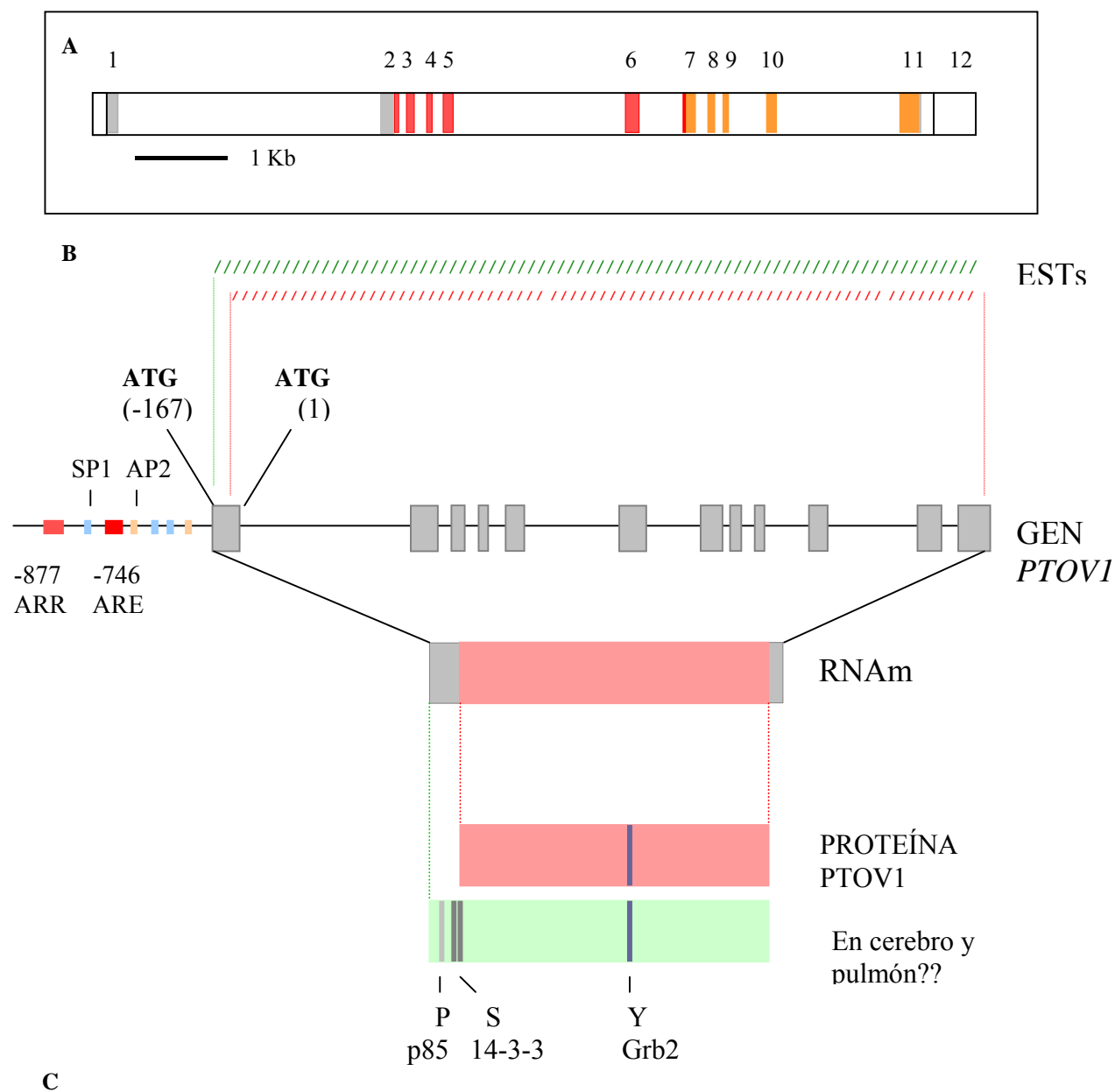


Figura 29. A) Arquitectura del gen. PTOV1 está compuesto de 12 exones, en rojo se señalan los exones correspondientes al módulo A y en naranja los correspondientes al módulo B. El último exón (12), no es codificante. B) esquema del gen, RNAm y proteína/s de PTOV1. C) Alineamiento entre las secuencias ARE y ARR de PTOV1 y PSA.

Posteriormente a nuestro análisis, fue depositada en la base de datos del GenBank la secuencia de la región cromosómica donde previamente habíamos localizado el gen PTOV1 (#AC018766). El análisis de esta región confirma por un lado nuestro resultado experimental y por otro, la localización de PTOV1 en la región cromosómica 19q13.3-13.4.

Del análisis de secuencia correspondiente a AC018766 puede deducirse que existe otro potencial inicio de traducción (ATG) en posición -168 del que hasta este momento habíamos considerado como inicio de traducción (posición 1). Pese a que los intentos por obtener un cDNA de tejido prostático que comprendiera esta región mediante la técnica de RACE en sentido 5' o amplificarlo usando primers específicos fueron negativos, el análisis teórico de la secuencia así como el hecho de encontrar una posible región promotora a 5' del ATG (-168) nos hizo suponer que tal vez no se expresaba como tal en próstata pero podría ser que se expresara en otros tejidos. Tras realizar un estudio exhaustivo de todos los ESTs de la base de datos relacionados con nuestro gen observamos dos clases de transcritos que difieren en sus extremos 5'. Únicamente encontramos el ATG (-168) en un bajo número de ESTs los cuales provenían de cerebro o pulmón (pulmón: # BE791340; cerebro: # A1929709). En los transcritos procedentes del resto de tejidos, el cDNA se inicia más hacia 3', lo que implica que el primer codón corresponda al que inicialmente habíamos asignado como tal. Basándonos en el alineamiento de la secuencia de PTOV1 con los ESTs de la base de datos, la transcripción del gen de *PTOV1* se daría a partir de la base -111 dando lugar a un extremo UTR 5' (*untranslated region* 5') de 111 pb aproximadamente.

Estos resultados nos permite concluir que PTOV1 se expresa utilizando al menos dos clases de transcritos que difieren en su extremo 5', siendo el más largo específico de tejido de origen neuronal y pulmonar y el transcrito corto sería el más abundante ya que está representado por la mayoría de ESTs de la base de datos.

La región 5' del gen *PTOV1* es una secuencia rica en cajas GC que podría corresponder a la región promotora. En esta región hemos encontrado potenciales secuencias de regulación de factores de transcripción (Sp1, AP2). En esta misma región hemos encontrado también un potencial elemento de respuesta a andrógenos (ARE) en posición - 746 y una posible región de respuesta a andrógenos (ARR) que comparte un 50 % de identidades con la región ARR del gen del PSA (*Prostate specific antigen*) (Figura 29B,C).

D) El gen PTOV2

Un análisis detallado de los clones genómicos nos ha permitido encontrar otro gen localizado a 14.5 Kb en posición 5' con respecto al primer exón de *PTOV1* (*Homo sapiens* chromosome 19, cosmid F23669, complete sequence. #AC018766.2). La predicción proteica muestra que dicho gen

contiene un módulo similar a los correspondientes a *PTOV1*. En la figura 30 puede observarse como la secuencia proteica restante no se asemeja a *PTOV1* y se extiende 308 aminoácidos desde el extremo N terminal y 184 aminoácidos desde el C terminal de dicho módulo. Hemos denominado a este gen *PTOV 2*.

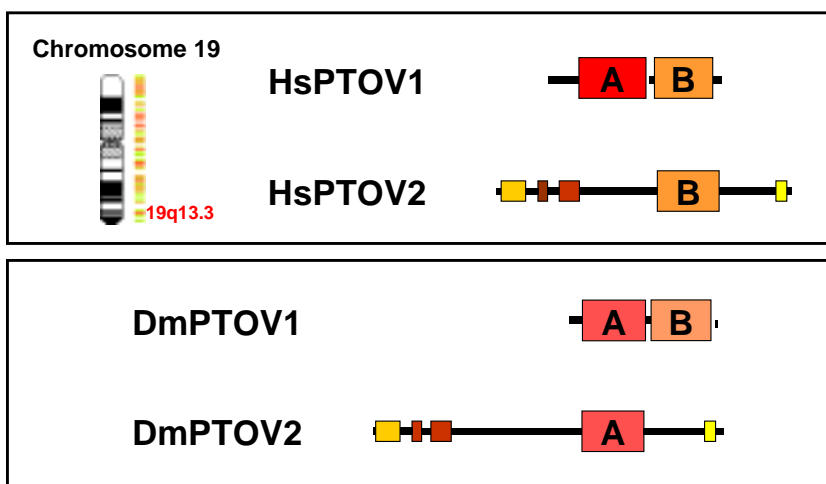


Figura 30. Esquema comparativo de los módulos presentes en las proteínas PTOV1 y PTOV2 en humanos y *D. melanogaster*.

Hemos encontrado un gen homólogo a *PTOV2* también lo hemos encontrado en *D. melanogaster*, localizado en el cromosoma 3R, aproximadamente a 3 Mb de distancia del gen *PTOV1*. La proteína predicha corresponde a una secuencia de 863 aminoácidos que contiene un único bloque similar a los localizados en *PTOV1*. Estas evidencias sugieren que ambas proteínas, *PTOV2* humana y *PTOV2* de *D. melanogaster*, son ortólogas. La proteína *PTOV2* humana y *PTOV2* de *la mosca* comparten, en su extremo N terminal, tres cajas de secuencias conservadas, así como regiones ricas en prolina y glutámico que dan lugar a una estructura secundaria en *coiled-coil*. El segmento C terminal de *PTOV2* humano contiene una región rica en glicina y prolina. En el extremo N-terminal de *D. melanogaster* existe una región significativamente homóloga a la proteína beta-tubulina y a la proteína procariótica FtsZ (tubulin-related protein) (Figura 31).

```

DmPTOV2      1 MEVDQIPLADVVFVIEGSAINGAYINELKNTNYILPTLEHFTTGSIDEREYLIAERFATLY
HsPTOV2      1
DmPTOV2      61 GIVVYRTAANLLEFVCSTYGPFLQPKVMEETIERLELVGGGMESECAHMAEGFAAAHGCFD
HsPTOV2      24 DFKKMQMASVAAGSMSSLFPGSGQTFRVCLLICNSPPVLEFAVESTTYSCCTTENLVQ
DmPTOV2      121 DISERRQ LLDQTSVORHCILICNSPPVQETTESWKYPCKSCQIATA
HsPTOV2      84 QIGERGIHFSIVSPRKIPALRLLLEKTAAPPALLEPLOPPTDVSQDERHMVLRGLVLPGA
DmPTOV2      168 LFNERRKINLSIIAPRKMPVLFKLEMKADGDQPIITSKN YAKNIRHIVLRLKGYSLKER
HsPTOV2      144 TLSAAPQQLPPVPPQYQVPG NLSAAQVAAQNAVEAA
DmPTOV2      224 APSNSMAAQMAAENAAQATVQQQQQQQQNQAGQQQQQGGMPMDTTPAQQQQQQQQQQQ
HsPTOV2      181 KQCKAGLGRFSPITPLQQAAPGVGPPFSQAPAFQ
DmPTOV2      284 QQQQCNPQQQVMNNTMQQQQPGPNPPAGLLNPOQQQQLLQQQQQNQFVSNQMNQNFQQ
HsPTOV2      216 LPPGPPGAPKPPPASQPSIVSTVAPGSGIAP
DmPTOV2      344 NVGFGQNRWYYPNQPCQARPPFMQAGNVGGVQCQGGMQQNPNSALISRINAPPNQTVT
HsPTOV2      247
DmPTOV2      404 SIQQQQQQQAQQQQQQQQQAQQQQQORMQMLSQQQMLNHQQLQQQQQLAQQQQQQQQGGQ
HsPTOV2      260 EDESFAFQCDVALVVLGLWGIVAGTVAPGGVSGPSPAQLG APALGGQQSIVSNKL
DmPTOV2      464 QQVNPNAENNMYPASNAGNINPQQQQQQVGGQSNPQQQGNPQQQQQNSQCEQASLRE
HsPTOV1-A     1
HsPTOV1-B     1
HsPTOV2      314 LAWSGVLEWQEKPKFASVDANTKILTRSLPCQVYVNHGENLKTQWPQKILIMQLIPQQLLT
DmPTOV2      524 KILWIGVLEWSEKPKSDQOKIPTHLOCTVCTNIRKDCPEE IKAENWPKLLIMQLMEKELVG
HsPTOV1-A     6 LAWSGVLEWQEKRRFYSDSI AKLKRILECCAYVNOGENLETDQWPQKILIMQLIPQQLLT
HsPTOV1-B     6 LAWSGVLEWQEPREPNRSR KRWLESVYVNOGEILRTEQWPQKILIMQLIPQQLLT
HsPTOV2      374 TLG PLFRNSRMVQFHFTNKDLESKGLYRIMGNGFAGCVHSP HTAPCEVRVIMLLLY
DmPTOV2      583 NIGGQFLKDSKMMVFRFT PGEALDSLAKMMTSCYAGCVHSSSIPNSPACDLRVLILLY
HsPTOV1-A     65 TLG PLFRNSQLAQFHFTNRDCSLKGLCRIMGNGFAGCVHSP HTISECEVRVIMLLLY
HsPTOV1-B     62 TLV PLFRNSRLVQFHFT-KDLETLKS LCRIMGNGFAGCVHSS YKASCEVRVIMLLLY
HsPTOV2      430 SSKKKIFMGLIPYDQSGFVNGIROVITNEKOVQCKLEQQQRMGGQAPPPGLPILEDQ
DmPTOV2      641 PDENAFIGFIPNNOAMFVERLRKVIQQRQHGMMQQQQQQQQMMQQQGKSEPMELQQQQQQ
HsPTOV1-A     121 SSKKKIFMGLIPYDQSGFVSAIROVITNEK
HsPTOV1-B     117 SSEKKIFIGLIPHDQGNFVNGIIRVIAN
HsPTOV2      490 ARPSQNLILQLRPPQPPQGTVGASGATGQPPQPGT QPPPCAQGGPPGAASGPPPPGPIIL
DmPTOV2      701 QQQQQQQQDQNSQQQHYNQFQLNMQMGGGGPGGPGGGMEMQQNQMMNMMQQQRMP
HsPTOV2      550 RPQNPGA NPOLRSLILNPPPPPCAPALLPPPHQGLQPQLGPPLLHPPAQS
DmPTOV2      761 LGVGVGVGVGPGGVFNPNLQQQLQOVAENVAAMQQQQAQQQQRMRVRFMMSNNNEGLRQL
HsPTOV2      602 WPAQLPFRAPLPGQMLLSGGPRGFVPOEGTQPSVMEDDIILMDII
DmPTOV2      821 LQHQTTEGNQFRPQMGQGNPNQMGAGGEMVGNRNFDGNYEEM-

```

Figura 31. Múltiple alineamiento de las secuencias aminoácidas de la proteína PTOV2 en humanos y en *D. melanogaster*. En negro se indican las identidades y en gris los cambios de aminoácidos conservados. En rojo se ha enmarcado el fragmento de secuencia correspondiente al módulo de PTOV que también se encuentra presente en esta nueva proteína.

Mediante la búsqueda en la base de datos de los ESTs correspondientes a PTOV2, pudimos comprobar que PTOV2 se expresa en humanos. Con el fin de corroborar su expresión en tejido prostático se diseñaron cebadores que amplificaran el cDNA entero y una región interna de este (concretamente, un fragmento de 725 pb). Para ello, se realizó previamente mediante el programa GenScan, una predicción de los exones e intrones teóricos con el fin de diseñar cebadores que reconocieran secuencias exónicas. La amplificación se realizó a partir de 40 ng de una librería de cDNA de cerebro y otra de próstata. Como se muestra en la figura 32, podemos amplificar un fragmento de 725 pb y este está presente tanto en cerebro como en próstata. A continuación se secuenciaron los productos de PCR de 725 pb. El resultado de la secuenciación muestra que verdaderamente corresponden a PTOV2. No se ha encontrado ninguna diferencia entre las secuencias procedentes de cerebro y próstata. A raíz de estos resultados podemos conjeturar que nos encontramos ante una nueva familia de proteínas caracterizada por la presencia de los módulos PTOV y que está conservada a lo largo de la evolución.

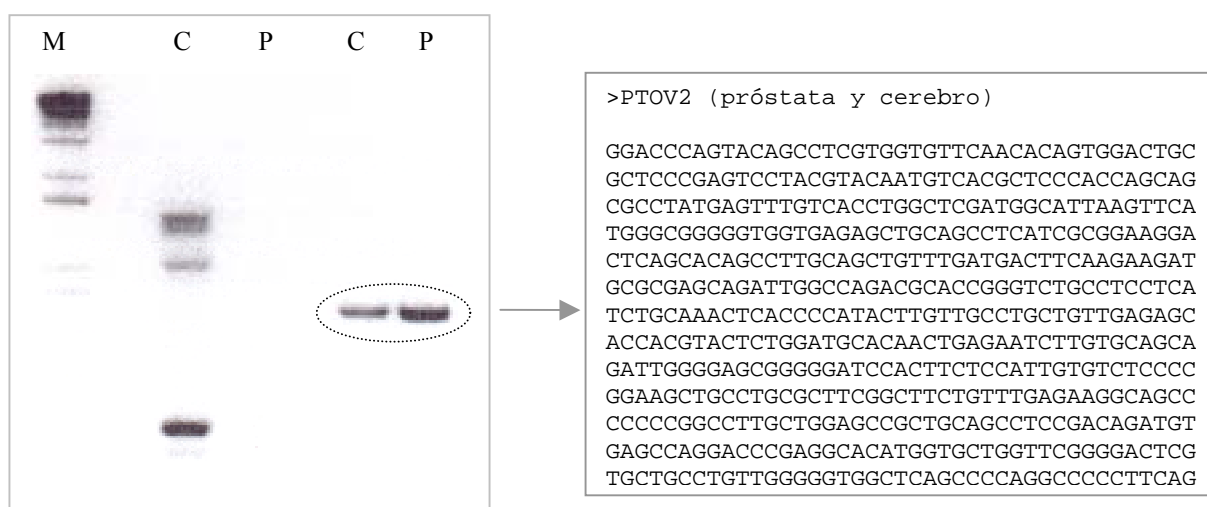


Figura 32. A) Detalle de la amplificación de PTOV2 en cerebro y próstata. C, cerebro; P, Próstata. Los dos primeros carriles corresponden a la amplificación de la secuencia completa deducida de PTOV2. Los dos últimos carriles corresponden a la amplificación con cebadores internos. El resultado de esta última es positivo. Amplificamos un fragmento de cDNA de 725 pares de bases. B) Secuencia de cDNA de la banda de 725 pb.

E) Distribución de la expresión de PTOV1 en tejidos normales.

El análisis de la expresión de PTOV1 se realizó por Northern blot sobre RNAs procedentes de una batería de tejidos humanos normales. Los resultados revelan un único transcrito de 1.8 Kb expresado abundantemente en cerebro, corazón, músculo esquelético, riñón e hígado. Los niveles de expresión de PTOV1 en tejido prostático normal son bajos.

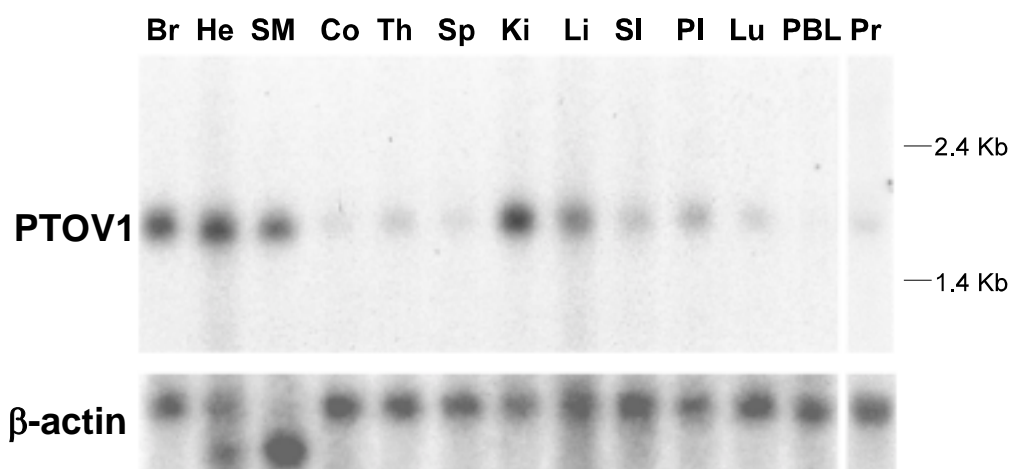


Figura 33. Expresión de PTOV1 en diferentes tejidos normales. Cerebro (Br), corazón (He), músculo esquelético (SM), colon (Co), timus (Th), bazo (Sp), riñón (Ki), hígado (Li), intestino delgado (SI), placenta (PI), pulmón (Lu), sangre periférica (PBL) y próstata (Pr).

F) Regulación androgénica de los niveles de expresión de PTOV1.

Debido a que frecuentemente los genes implicados en la patología tumoral prostática están regulados por andrógenos, se realizó un ensayo de inducción con andrógenos sobre la línea celular dependiente de andrógenos LNCaP para ver si la expresión de PTOV1 también está modulada por andrógenos. Las células LNCaP cultivadas en medio libre de esteroides expresan unos niveles de RNA mensajero de PTOV1 prácticamente indetectables. Cuando el medio libre de esteroides es suplementado con 50 nM de DHT (5- α -dihidrotestosterona), los niveles de expresión de PTOV1 aumentan sensiblemente a las 48 horas.

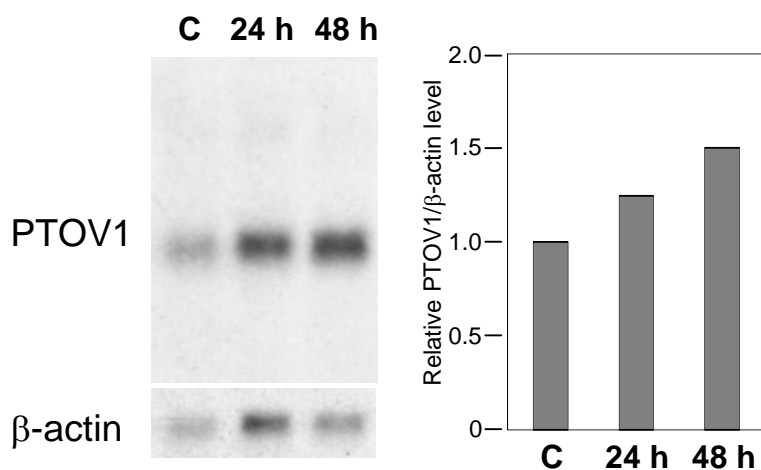


Figura 34. Inducción de la expresión de PTOV1 con DHT (50 nM) en la línea celular tumoral de próstata LNCaP. Los valores representados en el gráfico se han obtenido del ratio entre los valores densitométricos de PTOV1 y el correspondiente al RNA mensajero de referencia (beta-actina).

G) Proteína PTOV1

En la siguiente etapa del estudio de PTOV1 se ha pretendido profundizar en el comportamiento de su proteína, es decir, en sus características de localización celular y variación de sus niveles dependiendo del fenotipo del tejido prostático. Puesto que es la proteína la que desarrolla finalmente la función biológica del gen, nuestro interés se ha centrado en establecer su localización subcelular y determinar si esta varía dependiendo del estado benigno o maligno, del tejido prostático.

El primer paso consiste en la generación de anticuerpos policlonales. Para ello, se analizó la estructura secundaria de la proteína para seleccionar la región de aminoácidos que por sus características de accesibilidad (hidrofilicidad) fuera potencialmente la región antigénica más óptima (Figura 35).

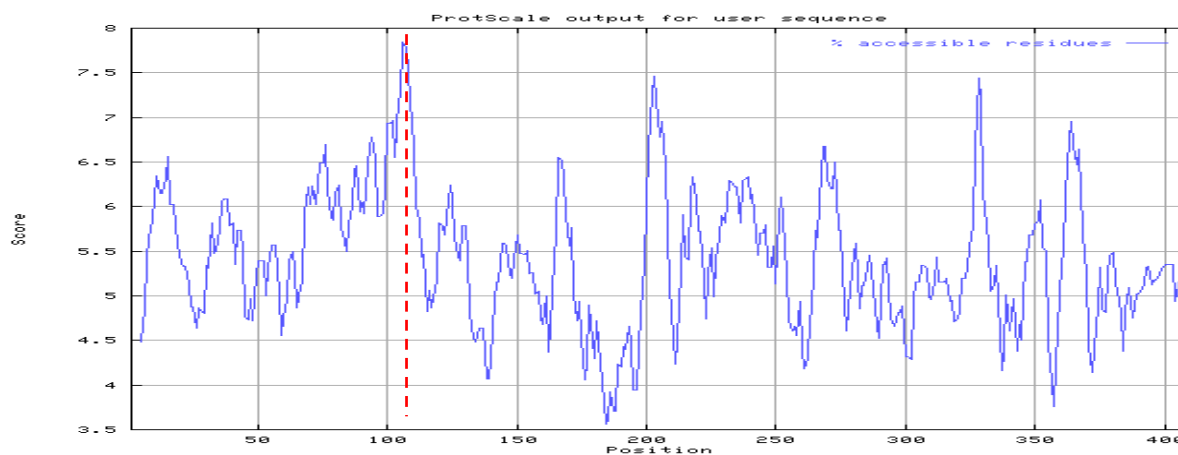


Figura 35. Análisis de las regiones de aminoácidos con características antigénicas.

La secuencia peptídica seleccionada como antígeno para el anticuerpo que reconocerá PTOV1 corresponde al pico que se encuentra próximo al aminoácido 100. Programa ProtScale (Janin, 1979).

Se generaron anticuerpos policlonales mediante la inyección en conejos de una secuencia peptídica correspondiente a una región del módulo A de PTOV1 (Figura 35). La especificidad del anticuerpo obtenido fue comprobada mediante ELISA, Western blot e inmunocitoquímica.

Se realizó una transfección transitoria de la proteína de fusión PTOV1/GFP (*green fluorescent protein*) sobre la línea tumoral prostática PC3. A partir de las células transfectadas se realizaron Western blots diferentes que se incubaron paralelamente con el anticuerpo anti-GFP y anti-PTOV1. Como control se utilizó la misma línea celular transfectada únicamente con GFP. El anticuerpo anti PTOV1 como el anticuerpo anti-GFP reconocen una proteína de 85 KDa en el lisado de las células PC3 transfectadas con PTOV1/GFP. En cambio, en las células parentales el tamaño de la proteína reconocida es inferior y se aproxima al peso molecular estimado de 58 KDa. La diferencia de tamaños que se observa al incubarse con anti-PTOV1 la línea PC3 transfectada o no transfectada con la proteína de fusión, corresponde al tamaño esperado de la proteína fluorescente GFP. La especificidad del anticuerpo anti PTOV1 se demuestra por la ausencia de señal cuando se incuban membranas paralelas con el suero pre-inmune a la misma dilución.

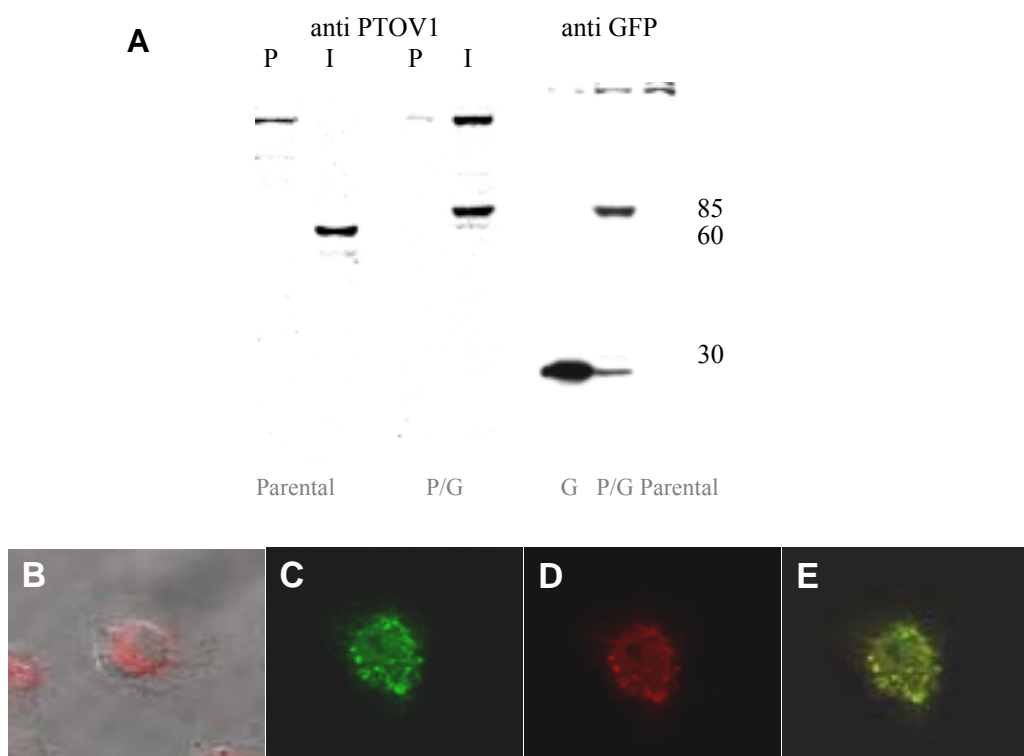


Figura 36. A) Western blot de la transfección transitoria de la proteína de fusión PTOV1/GFP (P/G). (P: incubado con suero pre-inmune; I: incubado con suero inmune del anticuerpo policlonal anti PTOV1). La proteína PTOV1 es aproximadamente de 58 Kda (parental). La proteína de fusión (P/G) transfectada tiene un tamaño de 85 KDa y es detectada tanto con el anticuerpo anti PTOV1 como con el anticuerpo anti GFP. Como control se ha realizado una transfección únicamente con el plásmido portador de GFP (G), en la que sólo se detecta el tamaño de aproximadamente 30 kDa de GFP. **B)** Inmunocitoquímica de la célula parental con el anticuerpo anti PTOV1. **C-E)** Análisis inmunocitoquímico de la línea celular PC3 transfectada con la proteína de fusión PTOV1/GFP. Detectada por la emisión de fluorescencia de GFP (C); detectada con el anticuerpo anti PTOV1 (D). Solapamiento de ambas señales que corrobora la especificidad del anticuerpo anti PTOV1 generado (E).

Se realizó un análisis inmunocitoquímico sobre la misma línea celular transfectada. Independientemente de la situación de GFP en el extremo amino o carboxilo, la proteína exógena fue localizada predominantemente en la región perinuclear. Se observaron también algunos casos en los que la proteína quimérica presentaba una localización intranuclear. Estos resultados son coherentes con los obtenidos tras realizar el análisis inmunocitoquímico de la proteína endógena: PTOV1 se localiza en la región citoplasmática, mayoritariamente en la región perinuclear y en algunos casos en núcleo.

H) Expresión de la proteína de PTOV1 en tumores prostáticos.

Con el ánimo de conocer si existía algún tipo de correlación entre los niveles de expresión de PTOV1 y el fenotipo tumoral, nos propusimos realizar un estudio inmunohistoquímico de la proteína PTOV1 sobre una batería de muestras procedentes de próstatas tumorales de distintos individuos. El estudio que se presenta a continuación se realizó en dos. En una primera etapa, para realizar el análisis inmunohistoquímico se utilizó el suero inmune. Una vez comprobados los resultados de esta primera serie y en colaboración con el servicio de anatomía patológica del Hospital Clínico (Dr. P. Fernández), se decidió extender el análisis a un número superior de muestras, usando, esta vez, el anticuerpo purificado por afinidad.

La primera serie se realizó con el antisuero policlonal sin purificar (a una dilución 1/1000). Como control se utilizó el suero preinmune del mismo conejo. Se analizaron un total de 11 adenocarcinomas procedentes de prostatectomía radical, 9 hiperplasias benignas procedentes de adenomectomías y dos próstatas, aparentemente normales, de donantes postmortem. En las muestras de próstata normal los niveles de PTOV1 son prácticamente indetectables al igual que en las muestras de hiperplasia benigna donde, sólo en dos casos encontramos señal débil en el borde apical de las células epiteliales glandulares. Por el contrario, al analizar las muestras de adenocarcinoma encontramos una marcada expresión de PTOV1 en 9 de las 11 próstatas tumorales con una distribución focal en las zonas de tumor y PIN. En estas muestras, la localización de PTOV1 es sobretodo citoplasmática y yuxtannuclear, tal como habíamos observado previamente en la inmunocitoquímica (Figura 37). Tras estos resultados se realizó un Western blot a partir de las mismas muestras para poder así cuantificar de manera aproximada la sobreexpresión proteica de PTOV1 en las próstatas tumorales. En estos análisis la expresión de PTOV1 en la próstata tumoral es de 5 a 10 veces superior a la detectada en la próstata normal, como resulta del análisis densitométrico de la señal correspondiente a las bandas específicas de aproximadamente 60 KDa.

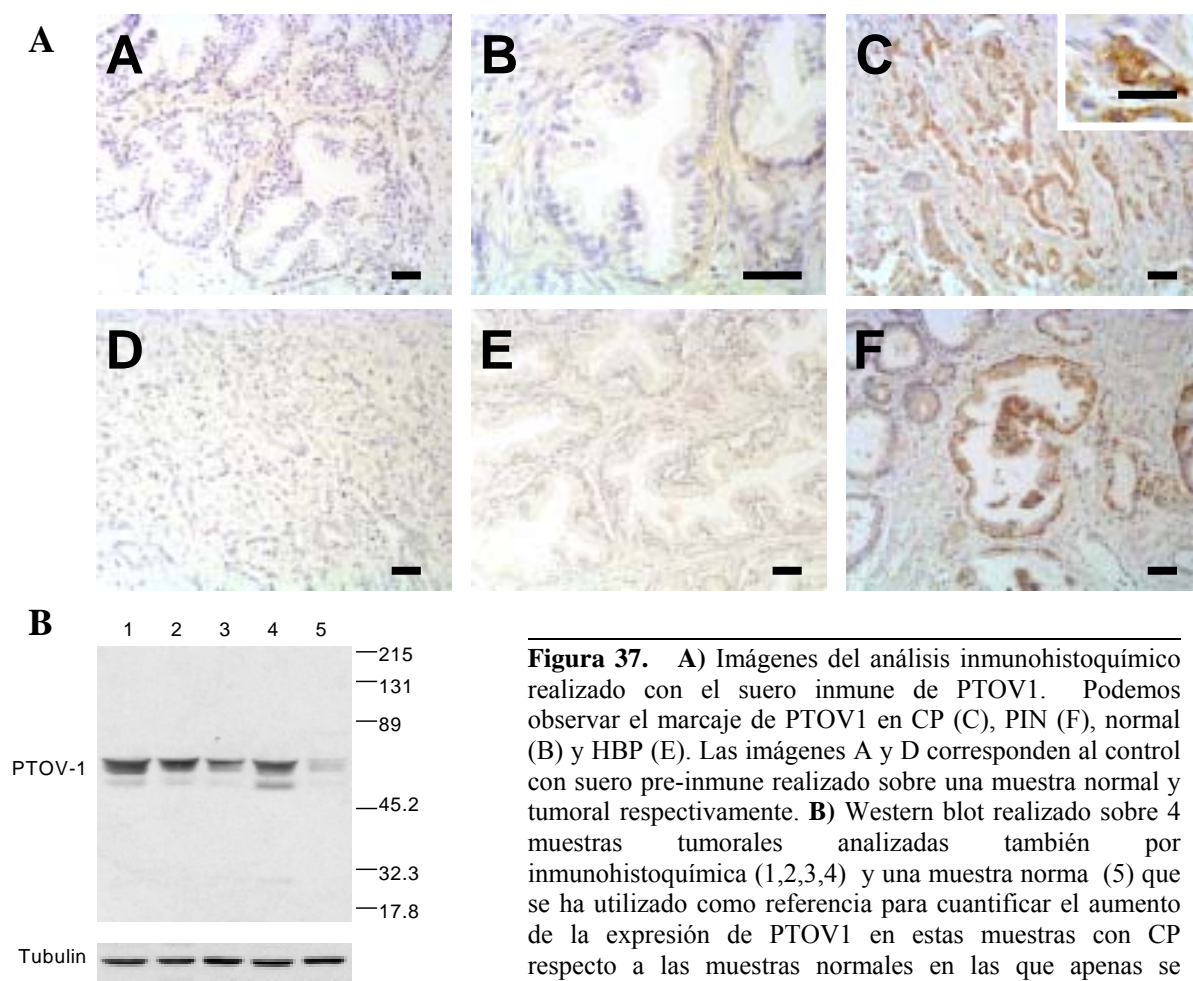


Figura 37. A) Imágenes del análisis inmunohistoquímico realizado con el suero inmune de PTOV1. Podemos observar el marcaje de PTOV1 en CP (C), PIN (F), normal (B) y HBP (E). Las imágenes A y D corresponden al control con suero pre-inmune realizado sobre una muestra normal y tumoral respectivamente. B) Western blot realizado sobre 4 muestras tumorales analizadas también por inmunohistoquímica (1,2,3,4) y una muestra normal (5) que se ha utilizado como referencia para cuantificar el aumento de la expresión de PTOV1 en estas muestras con CP respecto a las muestras normales en las que apenas se detecta expresión por inmunohistoquímica. Como control se ha utilizado la proteína α -tubulina

Por otra parte, en el Western blot realizado con lisados derivados de tejido tumoral, pueden apreciarse múltiples bandas reconocidas por el anticuerpo anti PTOV1 que podrían corresponder a modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación y /o a diferentes isoformas de la proteína PTOV1. En la Tabla 9 se resumen los resultados de este primer análisis inmunohistoquímico realizado con el suero inmune de PTOV1. No se ha observado ninguna correlación entre los niveles de PTOV1 y otros parámetros como el grado histológico, estadio clínico o niveles de PSA.

Table 1A. Immunohistochemical analysis of expression of PTOV1 in prostate adenocarcinomas

Sample	Relative immunoreactivity			Histological PSA (Gleason) grade	PSA levels (ng/mL)	Clinical stage
	BPZ	PIN	Carcinoma			
9T	++	++	++ ^a	7 (4-3)	19	T2bN0M0
15T	+ / ++ ^a	NF	+++	9 (4-5)	55	T1cN0M0
18T	- / + ^a	+++	+++	10 (5-5)	40	T3bN1M0
20T	+ / ++ ^a	+++ ^a	+++ ^a	8 (3-5)	16	T3aN0MX
21T	+	++	++	8 (3-5)	48.5	T3aN0M0
23T	++	+++	+++	8 (3-5)	6	T2bN0MX
24T	-	++	++	6 (3-3)	6.5	T2cN0M0
28T	+ / ++ ^a	++ / +++ ^a	++ / +++ ^a	6 (3-3)	11.6	T2cN0M0
31T	-	+++ ^a	++ ^a	7 (3-4)	5.4	T2cN0M0
35T	+++	+++	++++	8 (4-4)	25	T3aN0M0
36T	-	+ / +++ ^a	+	8 (3-5)	23.8	T3cN0M0
39T	+ / ++ ^a	+++	+++	7 (3-4)	19.4	T2aN0M0
41T	-	-	- / +	6 (3-3)	5.3	T2cN0M0

^a Heterogeneous/focal pattern

Table 1B. Immunohistochemical analysis of expression of PTOV1 in benign prostate hyperplasia

Sample	Relative immunoreactivity	PSA levels (ng/ml)
A1	+	5.5
A2	++ / +++	5.4
A3	+	n.d.
A4	-	3.7
A5	+ / ++	6
A6	- / +	2.6
A7	+	7.9
A8	-	7.3
A9	-	9.2

n.d., Not determined

Tabla 9. Niveles de inmunoreactividad para PTOV1 y parámetros clínicos de las muestras analizadas (Gleason, estadio, PSA). Los valores detectados se han expresado como +--++++, donde + ha sido considerado como los niveles basales de PTOV1 y ++++ es la máxima expresión detectada.

Tras estos resultados, el análisis se extendió a 38 casos nuevos. El análisis inmunohistoquímico fue realizado por el Dr. Pedro Fernández del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico. Para ello, se utilizó el anticuerpo purificado por afinidad. Los resultados del estudio que aquí

se describe, han confirmado nuestros resultados previos y han extendido el análisis a otros marcadores. En particular, hemos podido comprobar que la variación en los niveles de expresión detectados en las distintas muestras tumorales así como la variación en la localización intercelular de PTOV1 está directamente relacionada con el índice de proliferación celular.

El grado de proliferación celular se ha analizado determinando el número de células positivas para Ki67 (marcador de proliferación). El conteo se ha realizado partiendo de la selección de focos tumorales de igual tamaño y contando posteriormente las células positivas para Ki67 de cada uno de ellos. (Bacchi y Gown, 1993; Tenderenda y cols, 2001; Mellon y cols, 1990; Barnard y cols, 1987). El estudio se realizó a partir de 38 próstatas tumorales en las cuales se pudieron detectar y analizar 38 focos de adenocarcinoma, 10 focos de PIN y 28 regiones de zona benigna periférica aparentemente normales. Paralelamente, fueron analizadas un total de 6 muestras normales de próstata provenientes de cistoprostatectomía por cáncer de vejiga. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 10. Los niveles de expresión de PTOV1 se han identificado como no expresión, grado 1 y grado 2-3 en las distintas áreas analizadas (PIN, CP, ZBP).

Porcentaje de expresión de PTOV1 en muestras de próstata normal y tumoral (%)				
Nivel de expresión de PTOV1		No expresión (%)	Bajo (grado 1) (%)	Alto (grado 2-3) (%)
Próstatas tumorales	<i>CP</i>	0	11/38 (28.9)	27/38 (71.1)
	<i>PIN</i>	0	2/10 (20)	8/10 (80)
	<i>ZBP</i>	6/29 (20.7)	22/29 (75.8)	1/29 (3.4)
Cistoprostatectomía	<i>ZBP</i>	3/6 (50)	3/6 ^a (50)	0

ZBP, zona benigna periférica
 PTOV1 en carcinoma y ZBP $P= 0.0001$
 PTOV1 en PIN y ZBP $P= 0.0001$
 PTOV1 en PIN y carcinoma $P= 0.697$

Tabla 10. Análisis de la expresión de PTOV1 en focos de cáncer de próstata (CP), Neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y zona benigna periférica de morfología normal (ZBP). Los valores del nivel de expresión de PTOV1 se ha definido como porcentaje de muestras con nivel bajo (grado 1) o alto (grado 2-3).

Tal y como puede observarse, en los focos tumorales y en los afectados por la lesión de PIN prevalecen los niveles altos (grado 2-3) de expresión de PTOV1, sin embargo, en la zona benigna periférica, el nivel de expresión de PTOV1 es bajo. En las muestras normales que provienen de cistoprostatectomía por cáncer de vejiga no se encuentra expresión y si la hay, es a modo de pequeños

focos de grado 1. También hemos podido determinar que en una cierta proporción de próstatas tumorales con expresión alta de PTOV1 (grado 2-3), la localización de la proteína es más intensa en núcleo. En la Figura 38 está representada la distribución de los niveles de expresión de PTOV1 (no expresión / grado 1 / grado 2-3) en las distintas áreas analizadas (PIN, CP, ZBP y ZBP normal).

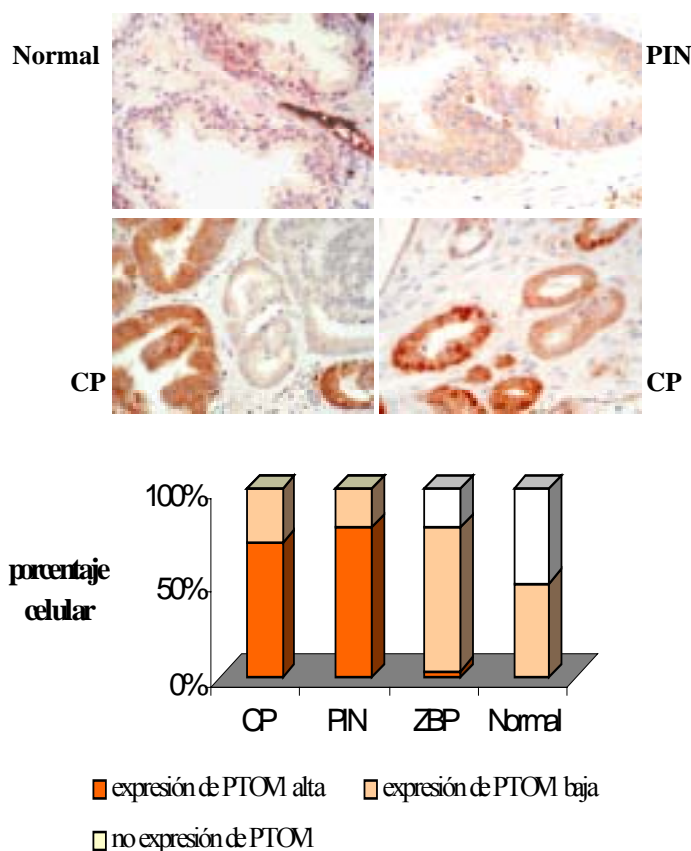


Figura 38. En el gráfico están representados los valores correspondientes a la tabla 10. El porcentaje de expresión de PTOV1 se ha representado en color naranja (oscuro, grado 2-3; pálido, grado 1). El porcentaje de muestras en las que no se detecta expresión de PTOV1 se ha representado en color blanco. En la imagen de la derecha se muestran un caso de próstata normal, un caso de PIN y dos casos de carcinoma. Las dos imágenes superiores corresponderían a un grado 1 de expresión de PTOV1 y las dos inferiores a un grado 3 (en la imagen inferior de la derecha también se observan dos glándulas con un grado 2 de expresión de PTOV1).

Paralelamente, se decidió estudiar también si los niveles de expresión de PTOV1 estaban relacionados con el grado de proliferación. Por este motivo, se realizó un estudio comparativo entre los niveles de expresión de PTOV1 y el índice de proliferación de Ki67 (Tabla 11). Se observó que la localización de PTOV1 variaba entre citoplasma y/o núcleo en aquellas muestras en las que su expresión era alta. A raíz de este resultado se decidió comprobar si existía algún tipo de asociación entre la variación de localización de PTOV1 y el grado de proliferación celular (Figura 39).

Número de células positivas para Ki67 en tumores con diferentes niveles de expresión de PTOV1			
<i>PTOV1</i>	<i>PTOV1 Bajo</i>	<i>PTOV1 Alto</i>	<i>P</i>
Ki67 total	42.5	74.5	0.013
Ki67 (PTOV1 en citoplasma)	42	77	0.015
Ki67 (PTOV1 en núcleo y citoplasma)	0^a	83.6	
<i>p27</i>	26	27	0.714
<i>Gleason</i>	3.17	3.15	0.866

Tabla 11. Correlación del Índice de proliferación celular con el nivel de expresión de PTOV1 (Bajo, grado 1 y alto, grado 2-3). En la tabla se muestra el índice total de proliferación independientemente de la localización celular de PTOV1 (Ki67 total) y también se distingue dependiendo de si la localización de PTOV1 en las células prostáticas es únicamente citoplasmática [Ki67 (PTOV1 en citoplasma)] o incluye también el compartimento nuclear. ^a dos muestras tumorales presentaban un grado 1 de expresión en citoplasma y niveles altos en núcleo. En ambas muestras no se detectaron células positivas para Ki67. En la tabla también se muestran los valores obtenidos para la proteína del ciclo celular p27 y también se indica la media gleason de las muestras analizadas que, como se observa en la tabla, es similar en ambos casos.

El aumento de los niveles de PTOV1 en carcinoma y PIN se correlaciona con el aumento del índice de proliferación dado por Ki67. En las muestras en las que la localización de PTOV1 es citoplasmática, el índice de proliferación de Ki67 aumenta de 42, cuando los niveles de expresión de PTOV1 son de grado 1, a 77 cuando los niveles de PTOV1 son de grado 2-3. La presencia de PTOV1 en núcleo se asocia siempre a niveles de expresión de PTOV1 altos y a un aumento en el índice de proliferación. El hecho de que la localización en núcleo de PTOV1 esté asociado a un aumento de proliferación y a unos mayores niveles de expresión de PTOV1 podría ser indicativo de una asociación entre la translocación de PTOV1 a núcleo y la regulación del ciclo celular.

Por el contrario, no hemos encontrado ninguna asociación entre los niveles y localización de PTOV1 y los niveles detectados de p27. Tampoco parece existir ninguna correlación con el grado de diferenciación del tumor.

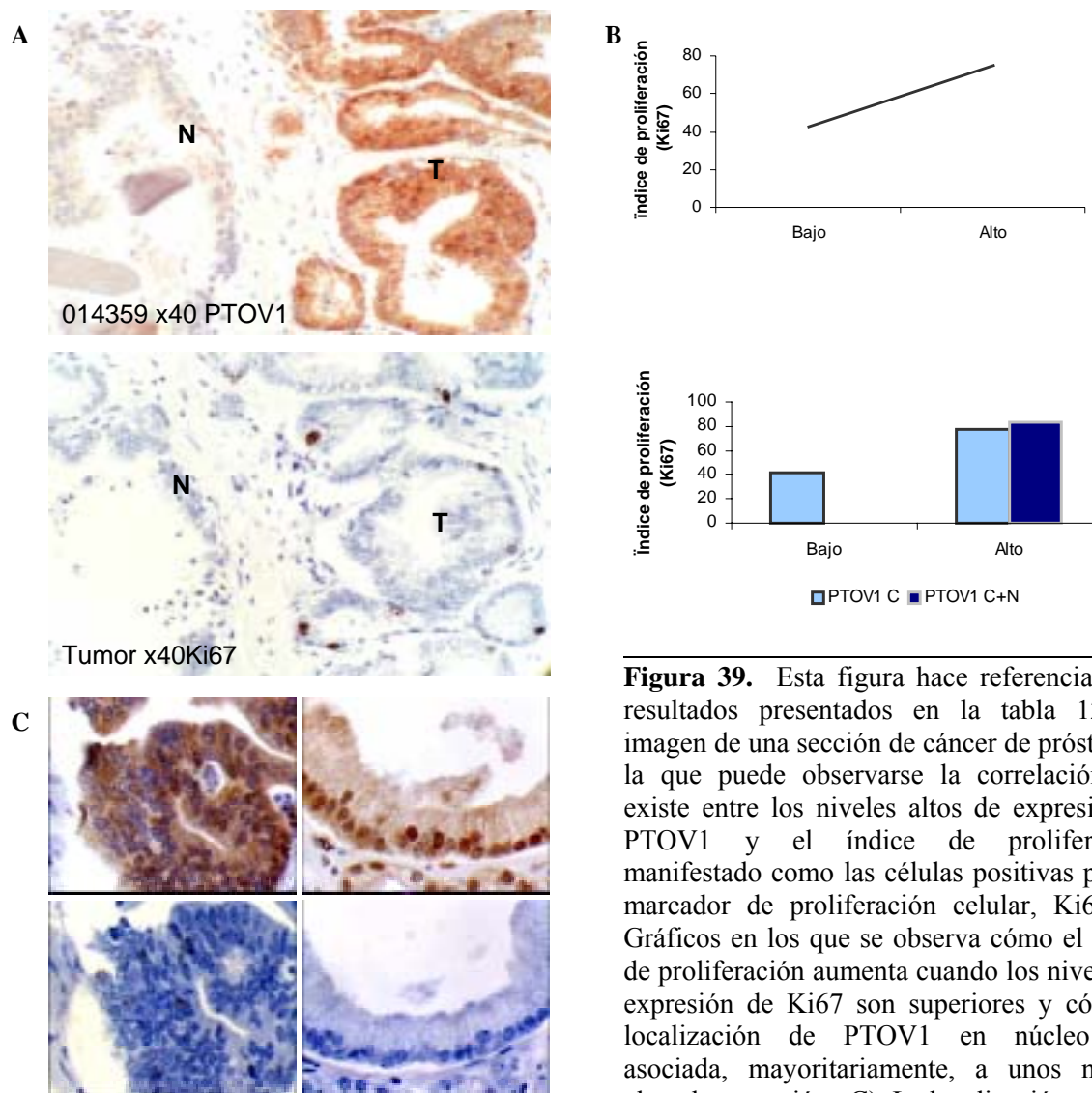


Figura 39. Esta figura hace referencia a los resultados presentados en la tabla 12. A) imagen de una sección de cáncer de próstata en la que puede observarse la correlación que existe entre los niveles altos de expresión de PTOV1 y el índice de proliferación, manifestado como las células positivas para el marcador de proliferación celular, Ki67. B) Gráficos en los que se observa cómo el índice de proliferación aumenta cuando los niveles de expresión de Ki67 son superiores y cómo la localización de PTOV1 en núcleo está asociada, mayoritariamente, a unos niveles altos de expresión. C) La localización nuclear

de PTOV1 está asociada a niveles altos de expresión tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, sin embargo, también se han encontrado dos casos en los que, aunque el nivel de expresión en núcleo era alto, en citoplasma era de grado 1.

La conclusión de estos estudios es que PTOV1 es una proteína cuya expresión se correlaciona con un aumento del índice de proliferación celular, que los niveles detectados son significativamente superiores en los focos afectados por carcinoma y en la neoplasia intraepitelial prostática respecto a las áreas normales y que el cambio de localización intracelular hacia el núcleo sugiere algún tipo de implicación en los mecanismos de proliferación implicados en la progresión que realiza el tumor a partir de la lesión inicial de PIN. Podríamos por lo tanto conjeturar que la presencia de PTOV1 en el compartimento nuclear sería un factor de peor pronóstico.

1) Cambio de localización de PTOV1 en las diferentes etapas del ciclo celular.

Con el fin de comprobar si la variación en la localización celular núcleo/citoplasma de PTOV1 estaba relacionada con algún aspecto del estado proliferativo celular, nos propusimos realizar experimentos de análisis de expresión de PTOV1 en función de la fase del ciclo celular. La línea celular tumoral utilizada fue PC3. Tras 48 horas de crecimiento en medio normal sin suero se les añadió suero al 10% y se incubaron 24 horas más. Se analizó la localización de PTOV1 mediante inmunocitoquímica a las 3, 6, 9, 12 y 24 horas tras haberles añadido suero y se comparó con la localización de PTOV1 en las células deprivadas de suero. Como marcador para monitorizar el ciclo celular se utilizó Ki67. Pese al desconocimiento de su función (MacCallum y Hall, 2000a), la utilización de Ki67 como marcador de proliferación celular se debe a su presencia en el núcleo de las células que están en ciclo celular. Ki67 únicamente es detectado en las fases proliferativas del ciclo celular, estando ausente en las fase G0 y el inicio de la fase G1 (Yu y cols, 1992; Scott y Hall, 1991; Vielh y cols, 1990; Lawry y cols, 1990; Cibull y cols, 1989; Rijzewijk y cols, 1989). Una vez la célula entra en fase S, los niveles de Ki67 aumentan considerablemente de manera que es fácilmente detectable en el compartimento nuclear. Incluso puede llegar a detectarse con mayor intensidad en la zona perinucleolar. Este hecho hace pensar en una posible función de Ki67 como factor en la biogénesis ribosomal durante el ciclo de división celular. (MacCallum y Hall, 2000b; Lorz y cols, 1994; Sullivan y Mortimer, 1993). Como respuesta a la deprivación de suero, las células PC3 dejan de proliferar y Ki67 no se expresa (Figura 40). En este punto la localización de PTOV1 es fundamentalmente citoplasmática, PTOV1 queda excluido del compartimento nuclear (Figura 40). Cuando el ciclo celular se reanuda mediante la incorporación de suero al medio, hacia las 3 horas aproximadamente la célula entra en fase S, como indica la tinción para Ki67. En este punto PTOV1 se desplaza hacia el núcleo concentrándose también en su periferia e incluso en el interior del mismo (Figura 40). A partir de las 6 horas de inducción con suero, es frecuente encontrar células con una morfología "en forma de abanico", probablemente sean células en movimiento (Figura 41). En estos casos, la localización de PTOV1 parece polarizarse hacia dos compartimentos, membrana (sobre todo en lo que podría corresponder al frente migratorio) y lo que podría ser, aparato de Golgi.

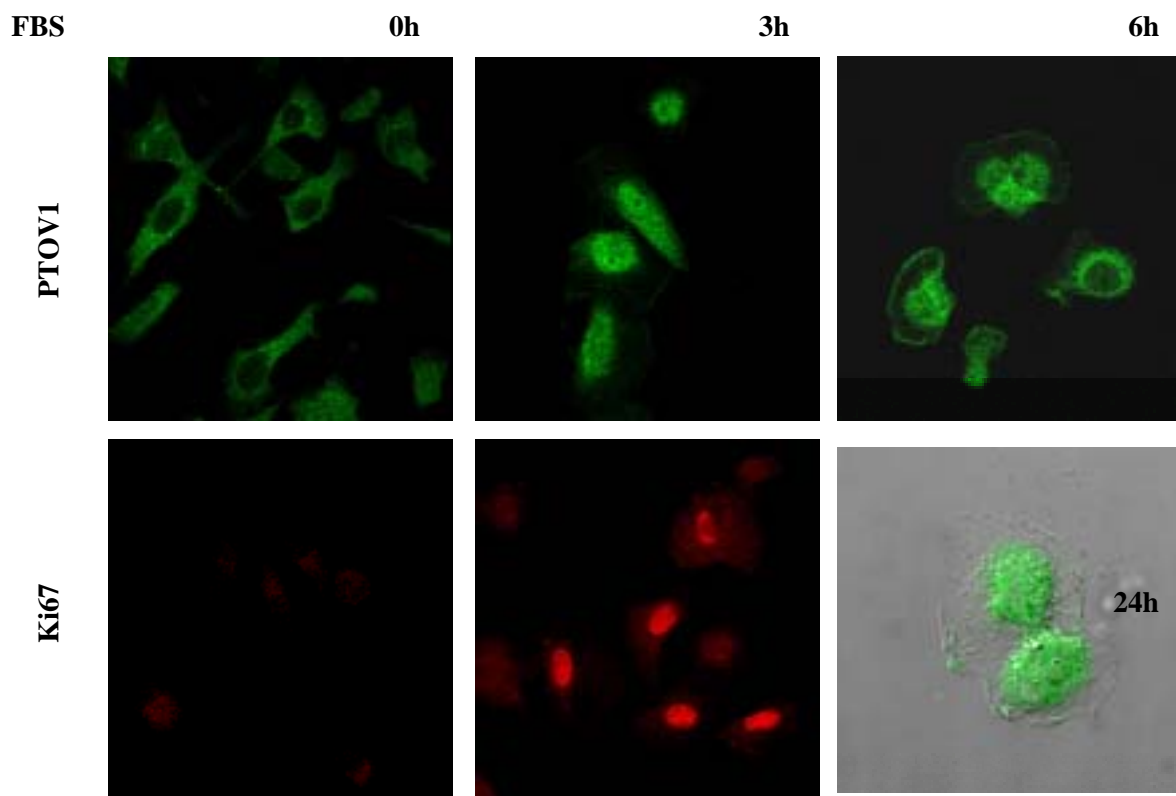


Figura 40. Cambio de localización de PTOV1 en respuesta a estímulos inductores del ciclo celular. FBS (suero bobino fetal). Imágenes captadas tras un periodo de incubación con FBS de 3-6 y 24 horas. Tras 3 horas de incubación las células ya entran en división (Ki67, señal en rojo). En respuesta a suero, PTOV1 se desplaza hacia el compartimento nuclear, siendo también evidente su localización en membrana citoplasmática. Durante el proceso de división celular, la localización de PTOV1 es nuclear.

Las figuras mitóticas que se muestran en la Figura 40 corresponden a anafases/telofases y presentan una localización de PTOV1 exclusivamente nuclear. Paralelamente a estos análisis se realizó un Western blot para comprobar si este cambio de localización se correlacionaba también con una variación en los niveles de expresión de PTOV1. Para ello se utilizó la misma línea celular PC3 y se siguió el mismo proceso de privación de suero al igual que en el análisis por inmunocitoquímica. Los resultados indican que los niveles de PTOV1 no varían significativamente en presencia o ausencia de suero (Figura 40). Concluimos por tanto, que PTOV1 cambia su localización subcelular, siendo citoplasmática en quiescencia, mientras que se distribuye entre núcleo y citoplasma en células proliferantes, con una mayor concentración nuclear durante la mitosis.

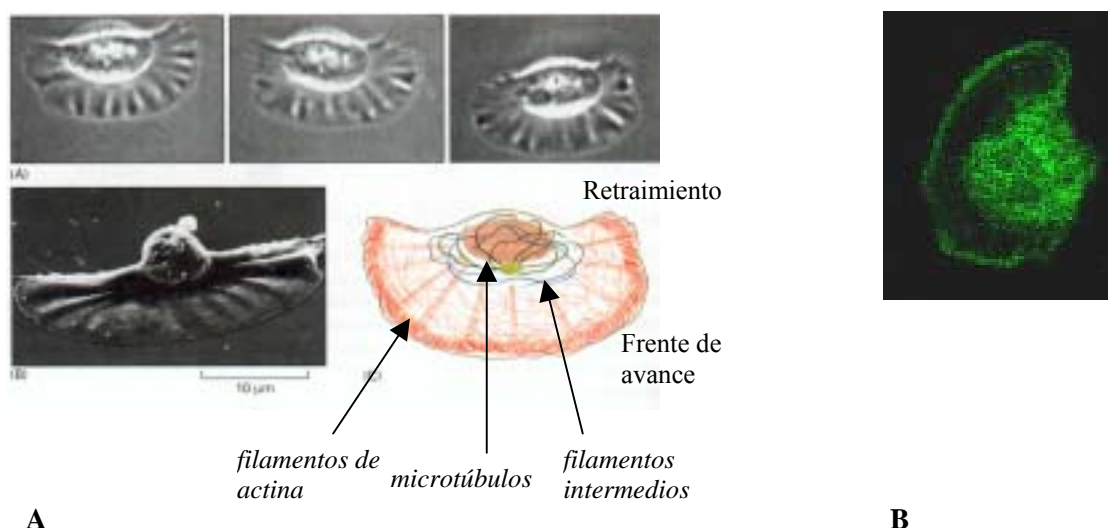


Figura 41. A) Detalle de una célula en migración (T. Mitchinson. The Cytoskeleton. Chapter 16 pg. 724, Molecular Biology of The Cell, third edition. B. Alberts et al, 1994). B) localización de PTOV1 en una célula prostática tumoral (PC3) de fenotipo similar al de una célula en movimiento.

También se realizaron experimentos semejantes en la línea celular de próstata PZHPV7. En estas células, en medio completo PTOV1 se concentra principalmente en el contorno perinuclear, aunque también se observa en el resto del compartimento citoplasmático (Figura 42). La adición de los factores EGF Y BPE a las células PZHPV7 crecidas en KSFM sin dichos factores, induce proliferación, observada como un incremento del número de figuras mitóticas. En este caso utilizamos también como control la tinción para Ki67.

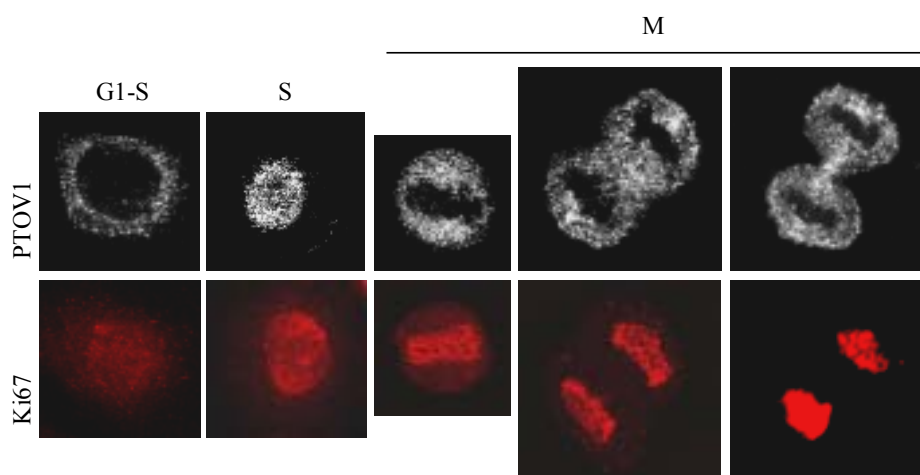


Figura 42. Imágenes representativas de los resultados obtenidos tras tratar la línea celular prostática PZHPV7 con los factores EGF y BPE cuyo efecto se traduce en un aumento del número de figuras mitóticas. Durante el proceso de mitosis, PTOV1 (gris) queda excluido totalmente del compartimento cromosómico. Ki67 (rojo).

Tal como se muestra en la Figura 42, en mitosis la localización de PTOV1 es fundamentalmente nuclear, excluyendo los cromosomas condensados, ya sea la placa metafásica como los dos frentes cromosómicos que se crean en la anafase/telofase. Aunque en metafase y anafase no podemos saber si la localización de PTOV1 es estrictamente nuclear debido a la desaparición de la membrana nuclear, en telofase PTOV1 parece localizarse en el núcleo ya que la membrana nuclear se regenera en esta fase (Figura 42).

Sabiendo que la expresión de PTOV1 está regulada por andrógenos, o al menos inducida por estos en la línea celular LNCaP, analizamos si existía un cambio de localización celular en respuesta a andrógenos. Para ello, se procedió a privar a las células LNCaP de esteroides estimulándolas a continuación con DHT (50 nM) durante 48 horas. En coherencia con los resultados presentados previamente, en respuesta a DHT se observa un aumento en la intensidad de la señal de PTOV1 pero no se acompaña de ningún cambio en cuanto a localización se refiere (Figura 43).

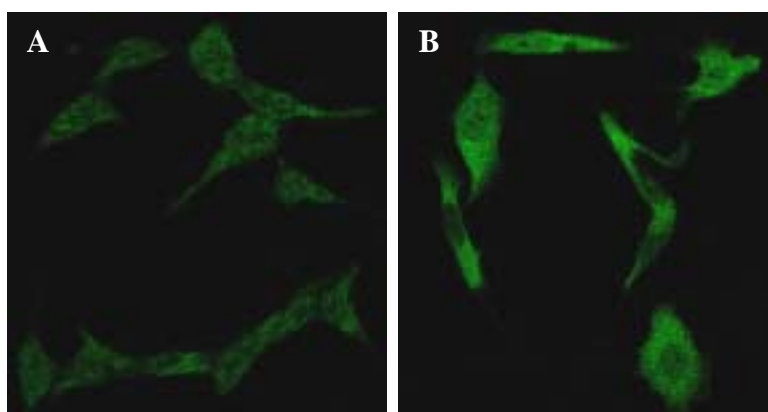


Figura 43. Inmunocitoquímica de PTOV1 en la línea celular LNCaP. **A)** Células crecidas en medio libre de esteroides. **B)** Células incubadas con DHT (50 nM) durante 3 horas

De estos estudios podemos concluir que el incremento de los niveles de expresión de PTOV1 está asociado a un aumento del índice proliferativo de la lesión prostática. Existe un cambio de localización intracelular de citoplasma a núcleo en respuesta a suero que podría hacernos pensar que PTOV1, de alguna manera, puede estar formando parte de alguno de los mecanismos implicados en la progresión del ciclo celular.

Actualmente en nuestro laboratorio se está realizando un estudio que complementa el resultado presentado anteriormente sobre la asociación de PTOV1 con el aumento del índice de proliferación. El experimento que se presenta a continuación ha sido realizado por mi compañera de proyecto A. Santamaria y es importante mencionarlo en esta tesis para entender la posible función de PTOV1 en la patología tumoral prostática.

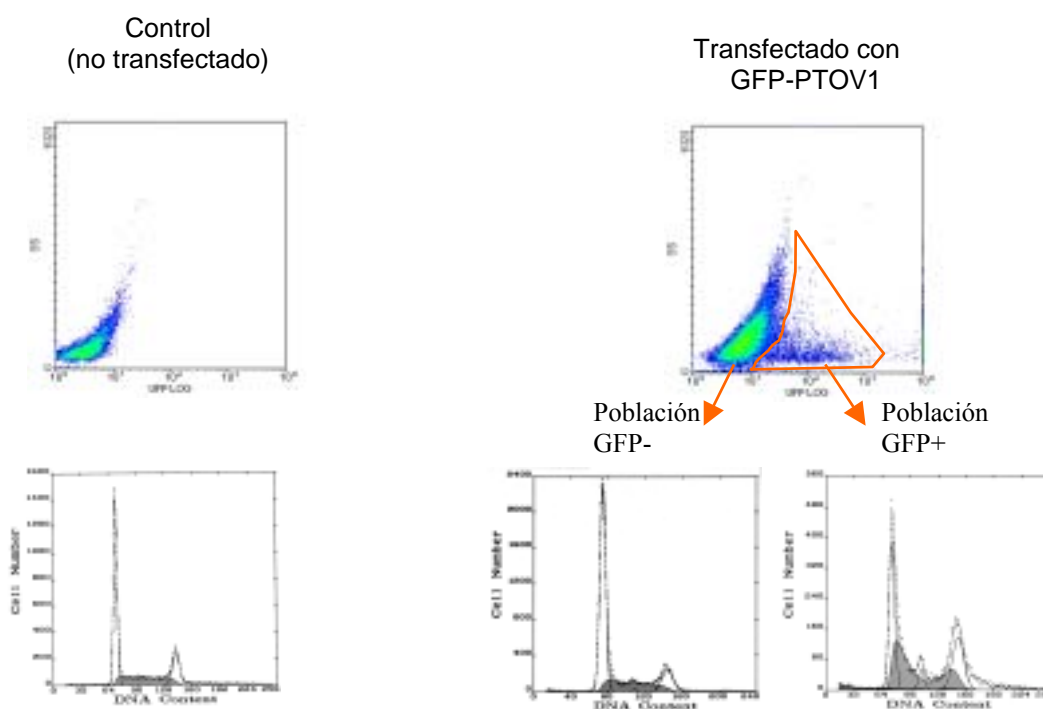


Figura 44. Aumento del número de células en fase S como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína PTOV1 en las líneas celulares PC3 y PZHPV7.

Si la localización subcelular de PTOV1 varía dependiendo de la fase del ciclo celular tal vez sea porque la proteína PTOV1 está implicada en alguna función reguladora de la transición del ciclo celular. Nuestra hipótesis fue que tal vez el aumento de expresión de PTOV1 en células en cultivo, se traduciría en un aumento de su función. Por este motivo, se realizaron transfecciones transitorias con la proteína de fusión PTOV1/GFP en las líneas celulares de próstata PC3 y PZHPV7. Como control se utilizaron células sin transfectar y células transfectadas con la proteína fluorescente GFP, sin PTOV1. A continuación se analizó el contenido de DNA de las poblaciones GFP+ y GFP – de la misma transfección. Tal y como se muestra en la Figura 44, en la población de células transfectadas con GFP-PTOV1 existe un incremento significativo del número de células en fase S. Este experimento confirma que PTOV1 ejerce un papel activo en la regulación del estado proliferativo de las células epiteliales prostáticas.

Un último experimento que refuerza los resultados obtenidos de localización nuclear de PTOV1, asociación con el aumento de proliferación e incremento del número de células en fase S es un ensayo de colocalización realizado mediante la técnica de inmunocitoquímica entre la proteína

PTOV1 y dos proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular (Figura 45). La proteína ciclina D1, abundante en fase G1, promueve la progresión del ciclo celular hacia la fase S. La proteína p27, un regulador negativo del ciclo celular abundante en fase G0, inhibe las quinasas dependientes de ciclinas. Como se observa en la Figura 45, la localización nuclear de PTOV1 coincide con la de ciclina D1. Por el contrario, PTOV1 no colocaliza con p27. A raíz de este resultado podemos decir que PTOV1 está presente en núcleo durante la fase G1/S y su participación en la progresión del ciclo celular podría llevarse a cabo durante esta etapa.

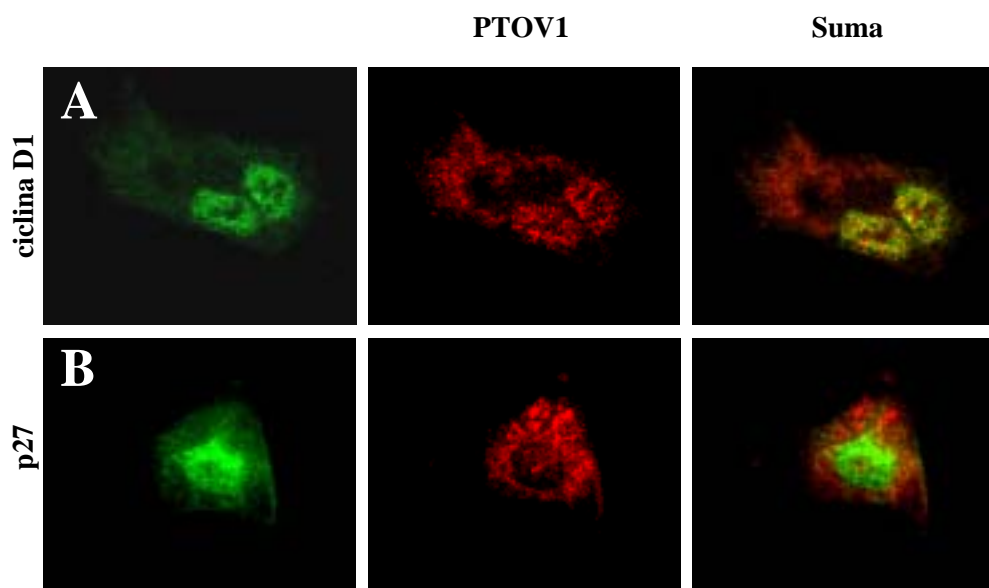


Figura 45. Mediante inmunocitoquímica se ha analizado la localización de PTOV1 y se ha comparado con la localización de dos proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. En **A)** se muestra la inmunocitoquímica de PTOV1 (rojo) y ciclina D1 (verde). En **B)** se muestra la inmunocitoquímica de PTOV1 (rojo) y de p27 (verde). PTOV1 únicamente colocaliza en núcleo con la ciclina D1. Este experimento se realizó en la línea celular Cos7.

J) Otros aspectos de la expresión de PTOV1 en el tejido prostático

La localización histológica de una proteína puede ayudarnos a comprender o al menos dirigir los resultados que se van obteniendo. Además del análisis inmunohistoquímico comparativo de PTOV1 entre muestras normales y afectadas por carcinoma, existen dos aspectos particulares de esta proteína a destacar.

- *PTOV1 en células neuroendocrinas*

Un aspecto interesante del patrón de localización de PTOV1 es la detección inmunohistoquímica de elevados niveles de expresión en un determinado número de células individuales del epitelio glandular prostático que se encuentran dispuestas de forma aleatoria y en número variable (Figura 46). Este aspecto de PTOV1 se ha detectado únicamente en dos de las muestras analizadas. La morfología de estas células, con capacidad de formar prolongaciones dendríticas que se extienden hacia los lados y/o hacia la luz de la glándula, recuerda a las células neuroendocrinas prostáticas. Estas dos muestras en las que hemos encontrado este determinado patrón de marcaje presentaban un elevado número de células neuroendocrinas (positivas para el marcador de células neuroendocrinas Cromogranina A) por lo que podrían corresponder a este tipo celular.

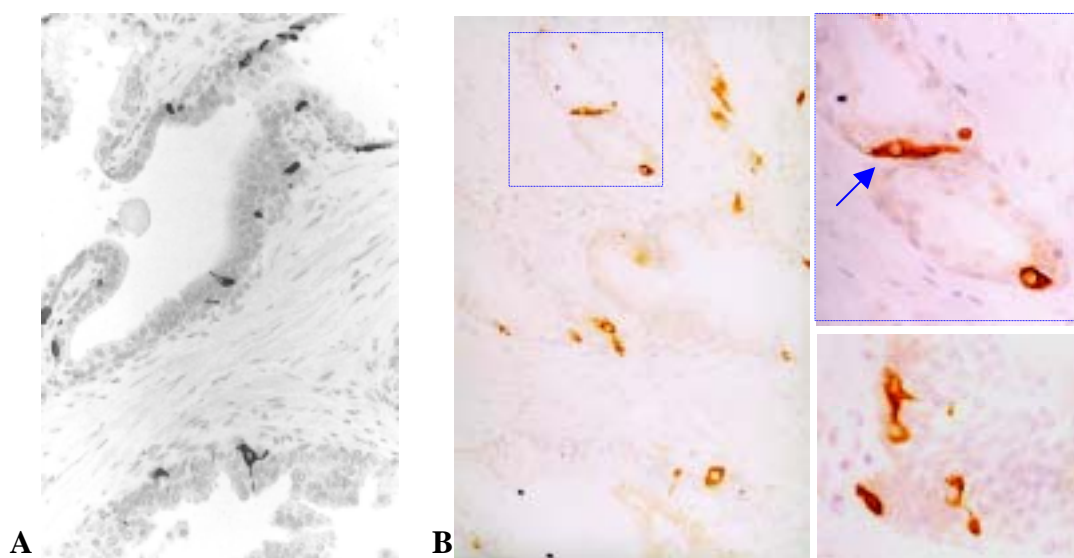


Figura 46. **A)** Glándula prostática normal en la que se detectan células neuroendocrinas (serotonina positivas). **B)** Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-PTOV1. En el detalle superior (flecha) puede apreciarse la forma piramidal de esta célula positiva para PTOV1. En el detalle inferior podemos observar los procesos dendríticos que emiten estas células positivas para PTOV1 y que recuerdan a las células neuroendocrinas.

- *PTOV1 en endotelio y eritrocitos.*

Otro aspecto muy interesante del patrón de localización de PTOV1 es que este, ya sea en tejido normal o tumoral, es positivo en las células endoteliales de los vasos e incluso en los eritrocitos del interior de este (Figura 47).

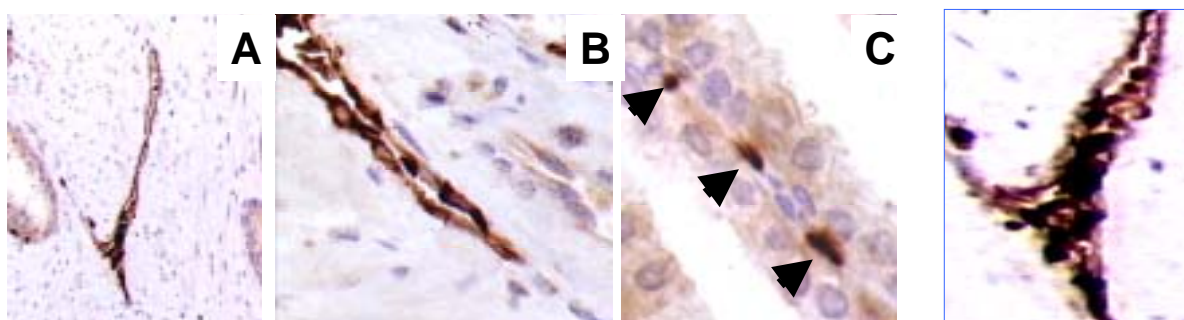


Figura 47. En las imágenes A y B se muestran dos vasos con una fuerte tinción de PTOV1. En estos aparecen marcados tanto las células endoteliales como los eritrocitos que se aprecian mejor en el detalle de la imagen A (enmarcado en azul). En C, puede apreciarse el marcaje de unos pequeños capilares localizados entre dos glándulas epiteliales prostáticas.

K) Búsqueda de interacciones específicas de PTOV1 con otras proteínas celulares.

Lo que hasta ahora hemos descrito contempla la identificación y caracterización de un gen previamente desconocido: el análisis de sus características estructurales y de secuencia predichas para la correspondiente proteína, su expresión en tejidos normales y en tumores prostáticos, algunos aspectos de sus cambios de localización subcelular, y asociación de su expresión a las diferentes etapas del ciclo celular. No obstante, la ausencia de similitudes significativas entre la secuencia de PTOV1 y otras proteínas o motivos proteicos dificulta la asignación de funciones bioquímicas para esta proteína y el diseño de experimentos para demostrar tales funciones. En estas circunstancias y dada la importancia de PTOV1 en la biología del cáncer de próstata, deducida de nuestras observaciones, decidimos utilizar métodos dirigidos a determinar directamente algunas de las funciones bioquímicas de esta proteína. Toda proteína ejerce su función a través de interacciones con otras moléculas. La interacción específica de una proteína de función desconocida con otra de función conocida proporciona una evidencia inequívoca de la participación de la primera en la ruta conocida, aunque inicialmente no se deduzca en qué sentido se ejerce esta participación. Una de las técnicas más idóneas para determinar interacciones en casos como éste es la técnica del doble híbrido en levadura (Fields y Song , 1989; Daniel y Reynolds, 1995; Wilson y cols, 2001).

Hemos aplicado el sistema del doble híbrido en el estudio de la función de PTOV1. Para ello, como cebo se utilizó el cDNA completo de PTOV1 en pauta con el dominio de reconocimiento de DNA del regulador transcripcional de levadura GAL4 (pBD-PTOV1; pBD = *binding domain*). Para buscar las correspondientes interacciones se utilizó una librería de cDNA generada a partir de 20 próstatas humanas procedentes de individuos con edades comprendidas entre los 20 y 58 años (MATCHMAKER GAL4 Libraries, # HL4037AH, Clontech). Uno de cada tres transcritos de esta librería se inserta en pauta con el dominio de activación de Gal4 (pACT2 es portador del *activation domain*). Esta librería contiene un total de 3.5×10^6 clones independientes (título de la librería = $1.5 \cdot 10^8$ cfu / ml). La cepa de levadura utilizada en este experimento es AH109 que, como ya se ha detallado en el apartado de Material y Métodos, contiene tres marcadores de selección que reducen la posibilidad de falsos positivos.

De 3.6×10^6 clones rastreados se obtuvieron 200 colonias que fueron seleccionadas y resembradas en placas de selección con α -Xgal. Este proceso se repitió dos veces más de manera que finalmente sólo fueron seleccionadas aquellas colonias que continuaban manteniendo el color azul (debido a la activación del operón lactosa). Únicamente se continuó con 22 colonias, las que presentaban un color azul bien definido e intenso (este simplemente fue un parámetro subjetivo para seleccionar aquellas colonias con una mayor cantidad de plásmido y de paso reducir el número de colonias analizadas). Se extrajo el DNA plasmídico de estas y se realizó una PCR con cebadores específicos del plásmido portador del dominio de activación pACT2 utilizado para saber el tamaño aproximado de los insertos de cDNA de las proteínas que potencialmente interaccionan con PTOV1. A continuación, se procedió a realizar la transformación en bacterias con el fin de aislar los plásmidos portadores de los cDNAs que codifican para proteínas que interaccionan en este ensayo con PTOV1. De las 22 colonias, se logró aislar el DNA plasmídico de 11 de ellas (el resto de colonias dieron problemas en el proceso de aislamiento del plásmido). Los tamaños obtenidos para los insertos oscilaron entre 600 pb y 2 Kb.

Con el fin de comprobar la interacción entre los plásmidos aislados y PTOV1, estos 11 clones seleccionados fueron co-transfectados individualmente junto a pBD-PTOV1 en la cepa de levadura AH109, y se determinó tanto su crecimiento en medio selectivo como la expresión de actividad β -galactosidasa (aparición de color azul en presencia de α -Xgal). De los 11 clones, la interacción se confirmó en 9 de ellos (Figura 48). La cotransformación de los dos restantes con PTOV1 fue negativa. Durante el proceso de transformación de la levadura, puede suceder que dos o más plásmidos se transformen de manera que sólo uno de ellos interaccione con PTOV1 y los restantes plásmidos se aprovechen de la situación o que varios de ellos interaccionen con PTOV1. Uno de los negativos procedía de una levadura que había sido transformada por dos plásmidos, de los cuales, sólo uno de ellos, el que finalmente ha dado positivo, interaccionaba con PTOV1.

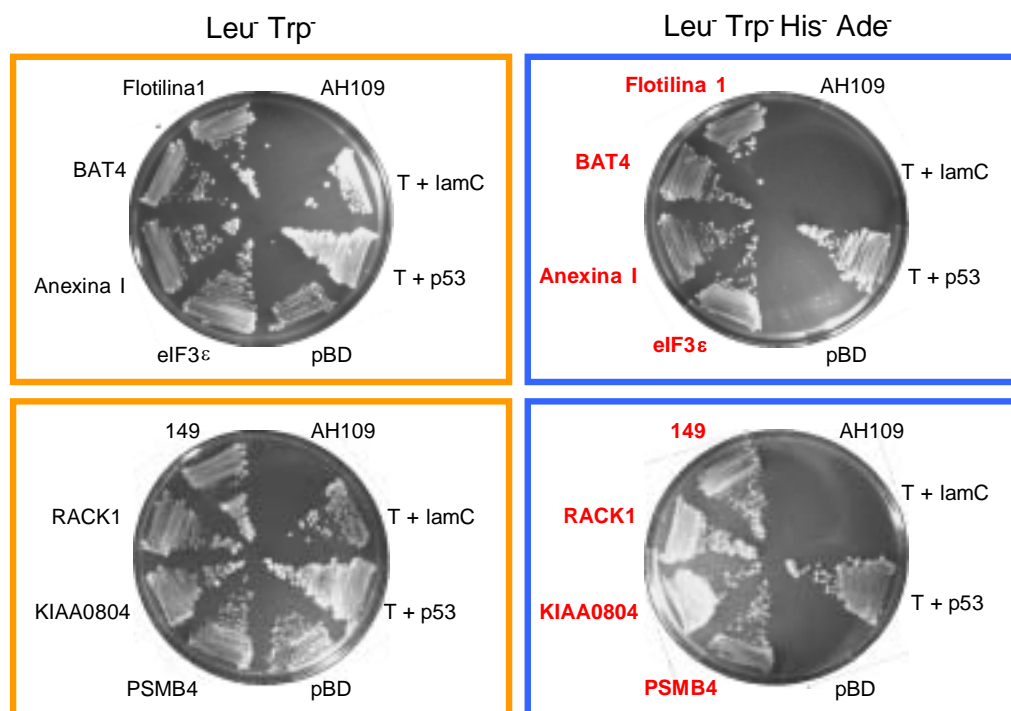


Figura 48. Imagen de los positivos resultantes tras la cotransformación en la cepa de levadura AH109. Para comprobar la interacción, la levadura cotransformada con cada uno de los supuestos positivos y PTOV1 fue sembrada en paralelo en placas de cultivo que carecían de leucina y triptófano (únicamente crecen las levaduras cotransformadas con los dos plásmidos) y en placas que además carecían de histidina y adenina (marcadores de selección de interacción). En estas últimas placas, únicamente son capaces de crecer aquellas células en las que ambas proteínas interaccionan. La cepa AH109 no es capaz de crecer en estos medios (Leu- Trp-; Leu-, Trp-, His-, Ade-) y requiere de una cotransformación con ambos plásmidos (pBD-PTOV1 portador de Trp y pAD portador de Leu). Si el medio carece de histidina y adenina, AH109 requiere de la interacción de ambos plásmidos para que puedan ser activados, por GAL4, los promotores de estos marcadores. Para comprobar que el crecimiento positivo no se debía a una interacción del dominio de unión (BD) con la proteína de la librería de próstata, por cada interacción a comprobar se realizó en paralelo otra cotransformación con el pBD sin PTOV1. En las placas de la imagen sólo se muestra, como detalle (pBD), una de las cotransformaciones control. T+Lam (control negativo: no interacción entre SV40T y laminaC); T+P53 (control positivo: interacción entre SV40T y p53). Aunque no se muestra en la imagen, también se realizó el control pBDPTOV1 + SV40T para comprobar que PTOV1 no interaccionaba con el dominio de activación. Todos los positivos mostrados en esta figura, en presencia de α -Xgal crecen de color azul debido a la activación del operón lactosa.

Tras secuenciar los correspondientes insertos y cotejarlos con los bancos de datos de secuencias, las identidades que obtuvimos fueron las siguientes:

(falta la identidad de uno de ellos que, pese a haber dado positivo, hemos tenido problemas a la hora de secuenciarlo y por este motivo no podemos incluirlo en estos resultados)

- Clon 149.3: ORF (metalotioneína II)
- Clon 10.3: Flotilina 1 (Flot1)
- Clon 87.2 : Anexina 1 (Annx1)
- Clon 170.3: RACK 1
- Clon 113.2: eIF3ε
- Clon 37.6: BAT 4
- Clon 189.2: Kiaa0804 (*ring finger*)
- Clon 185.2: PSMB4, Subunidad beta del proteasoma

A continuación se presentan las características más destacables de los clones positivos para interacción con PTOV1, así como un breve resumen de algunos de los aspectos conocidos sobre la estructura y la función de estas proteínas. La secuencia en **negrita** corresponde al fragmento de cDNA obtenido por la técnica del doble híbrido respecto al cDNA total. Los aminoácidos señalados en otros colores corresponden a características ya establecidas de la proteína.

- Clon 149.

En este clon, el inserto presente en el vector pACT2 contiene la secuencia del cDNA completo correspondiente a la metalotioneína (#X97260), una pequeña proteína reguladora que contribuye, entre otras funciones a la regulación de la transcripción dependiente de metales pesados como Co, Zn o Cd (Karin, 1985). De la secuencia de este inserto se concluye que, a pesar de su identidad con la secuencia de metalotioneína, la secuencia de aminoácidos deducida en pauta de lectura con el dominio de activación transcripcional de Gal 4 (constituída por 460 pb del inserto), no tiene relación alguna con la proteína metalotioneína. De hecho, esta pauta no tiene ninguna similitud significativa con ninguna otra secuencia de proteínas humanas conocidas o deducidas (Figura 49). De ello concluimos que el clon 149 corresponde a una interacción entre PTOV1 y un polipéptido artefactual, resultante de la inserción accidental en el vector pACT2 del cDNA completo de la metalotioneína. Este polipéptido artefactual presenta una secuencia rica en prolinas, con un patrón o cadencia peculiar. Ante este hecho, nuestro planteamiento fue que si verdaderamente se trataba de un positivo, la interacción con PTOV1 tendría que ser debida a una secuencia de reconocimiento que explicara esta unión. Por este motivo, se realizó un estudio comparativo de esta secuencia con el resto de cDNAs que interaccionan con PTOV1 con el fin de deducir alguna posible pauta de aminoácidos común a estas. Los resultados de este estudio se detallan más adelante.

>Clon 149. Secuencia de cDNA y proteína resultante.

```

                                C C C G A C T C T A G C C G C C T C T T C A G C T C G C C A
                                P D S S R L F S S P
T G G A T C C C A A C T G C T C C T G C G C C G C C G G T G A C T C C T G C A C C T G C G C C G G C T C C T G C A A A T G C A A A G A G T G
W I P T A P A P P V T P A P A P A P A N A K S
C A A A T G C A C C T C C T G C A A G A A A A G C T G C T G C T C C T G C C C T G T G G G C T G T G C C A A G T G T G C C C A G G G C
A N A P P A R K A A A P A A L W A V P S V P R A
T T G C A T C T G C A A A G G G G C G T C G G A C A A G T G C A G C T G C T G C G C C T G A T G C T G G G A C A G C C C C G C T C C C A G A
C I C K G A S D K C S C C A *
T G T A A A G A A C G C G A C T T C C A C A A A C C T G G A T T T T T A T G T A C A A C C C T G A C C G T G A C C G T T T G C T A T A T T C T T T
T T C T A T G A A A T A A T G T G A A T G A T A A T A A A C A G C T T T G A C T T G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A C T C G A G
A G A T C T A T G A A T C G T A G A T A C T G A A A A C C C C G C A A G T T C A C T T C A A C T G T G C A T C G T G C A C C A T C T C A A T T T C T
T T A T T T A T A C A T C G T T T T G C T T C T T A T G T A A C T A T A C T C C T C T A A G T T T N A A T C T T G C C A T G T A A C C T C T G A T C
T A T A N A A T T T T T A A T G A C T A G A A T A A T G C C A T C T T T T T T T T G G A C T A A A T C T T A T G A A A A T A T A C N A G G G C T A
T T N N A A C T T G G

```

Figura 49. Secuencia de cDNA del clon 149. La secuencia corresponde al cDNA de la proteína Metalotioneina II sin embargo, al no conservar su pauta de lectura, la secuencia de aminoácidos resultante (amarillo) no corresponde a ninguna proteína conocida. Debido al cambio de pauta de lectura, aparece un codón STOP (*).

- Clon 10.3.

El inserto de este clon contiene el cDNA casi completo de la proteína flotilina 1 (# AF089750, XM 004556) (Figura 50). La continuación de la pauta de lectura del dominio de activación transcripcional de Gal4 hacia el inserto se corresponde con la secuencia de aminoácidos de flotilina 1 por lo que concluimos que PTOV1 interacciona con esta última proteína. En la figura 50 se muestra la secuencia de cDNA obtenida. El inserto está señalado en letra negrita.

La flotilina1 es uno de los componentes principales de unos microdominios lipídicos de membrana conocidos también como *lipid rafts* o “balsas lipídicas” y cuya característica principal es que a 4°C son insolubles en Tritón X-100. Por este motivo, estos microdominios también son conocidos por el nombre de DIGs (*detergent-insoluble glycosphingolipid rich domain*) (Edgar y Polak, 2001).

>Clon 10.3. Secuencia de cDNA y proteína.

Identidad = flotilina1 (# XM041737; XM 004556)

```

AGCAACGGGGTGC GGCAGGGTGGGGAACGCGGGAGCGGGGCCAGCTCCCAGGAA
AGCTGGTCTGCGAGCGGCCCTGCCCGGCTCCCAGGTCCCTGCGCGACCCCGCCCTTCCCGAGACCCAG
CCGGGCTGCCGCCCGCTCCCGGAAGCTCCAGCCTGAACCATGTTTTTCACTTGTGGCCCAAATGAGGCC
ATGGTGGTCTCCGGTTCTGCCGAAGCCCCCAGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCT
V A G G R V F V L P
GCATCCAACAGATCCAGAGGATCTCTCTCAACACACTGACCCCTCAATGTCAAGAGTGAAGGTTTACAC
C I Q Q I Q R I S L N T L T L N V K S E K V Y T
TCGCCATGGGGTCCCATCTCAGTCACTGGCATTGCCCAGGTAAAAATCCAGGGGCAGAACAAGGAGATG
R H G V P I S V T G I A Q V K I Q G Q N K E M
TTGGCGGCCCTGTCAGATGTTCTGGGGAAGACGGAGGCTGAGATTGCCACATTGCCCTGGAGACGT
L A A A C Q M F L G K T E A E I A H I A L E T
TAGAGGGCCACCAGAGGGCCATCATGGCCACATGACTGTGGAGGAGATCTATAAGGACAGGCAGAAATT
L E G H Q R A I M A H M T V E E I Y K D R Q K F
CTCAGAACAGGTTTTCAAAGTGGCCTCCTCAGACCTGGTCAACATGGGCATCAGTGTGGTTAGCTACACT
S E Q V F K V A S S D L V N M G I S V V S Y T
CTGAAGGACATTCAGATGACCAGGACTATTTGCACTCTTTGGGGAAGGCTCGAACAGCTCAAGTCCAAA
L K D I H D D Q D Y L H S L G K A R T A Q V Q
AAGATGCACGGATTGGAGAAGCAGAGGCCAAGAGAGATGCTGGGATCCGGGAAGCTAAAGCCAAGCAGGA
K D A R I G E A E A K R D A G I R E A K A K Q E
AAAGGTGTCTGCTCAGTACCTGAGTGAGATCGAGATGGCCAGGCACAGAGAGATTACAACCTGAAGAAGGC
K V S A Q Y L S E I E M A K A Q R D
CGCTATGACATCGANGGCAACACCCGCCAGACAGGCTGACTGGCTATAGCTTAAGTGGCNAGACNAGCAG
AAG

```

Figura 50. Secuencia de cDNA y proteína de la flotilina 1. En negrita se muestra el fragmento de cDNA correspondiente al inserto obtenido. En amarillo, la secuencia de aminoácidos.

La proteína flotilina 1 fue aislada a partir de la fracción proteica insoluble en Tritón X-100. Junto con la Flotilina 2 y la estomatin, son los componentes mayoritarios de los eritrocitos (Salzer y Prohaska, 2001). Asimismo, en los últimos dos años se ha puesto de manifiesto el papel central de los microdominios lipídicos en la regulación de múltiples señales generadas en la membrana plasmática (Simons y Toomre, 2000).

- Clon 87.2.

Este clon positivo contiene el cDNA completo de la proteína anexina I en pauta con el dominio de activación de Gal4.

La anexina 1, llamada también lipocortina-I o calpactina II, es una proteína de 38 Kda que forma parte una familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependiente de calcio.

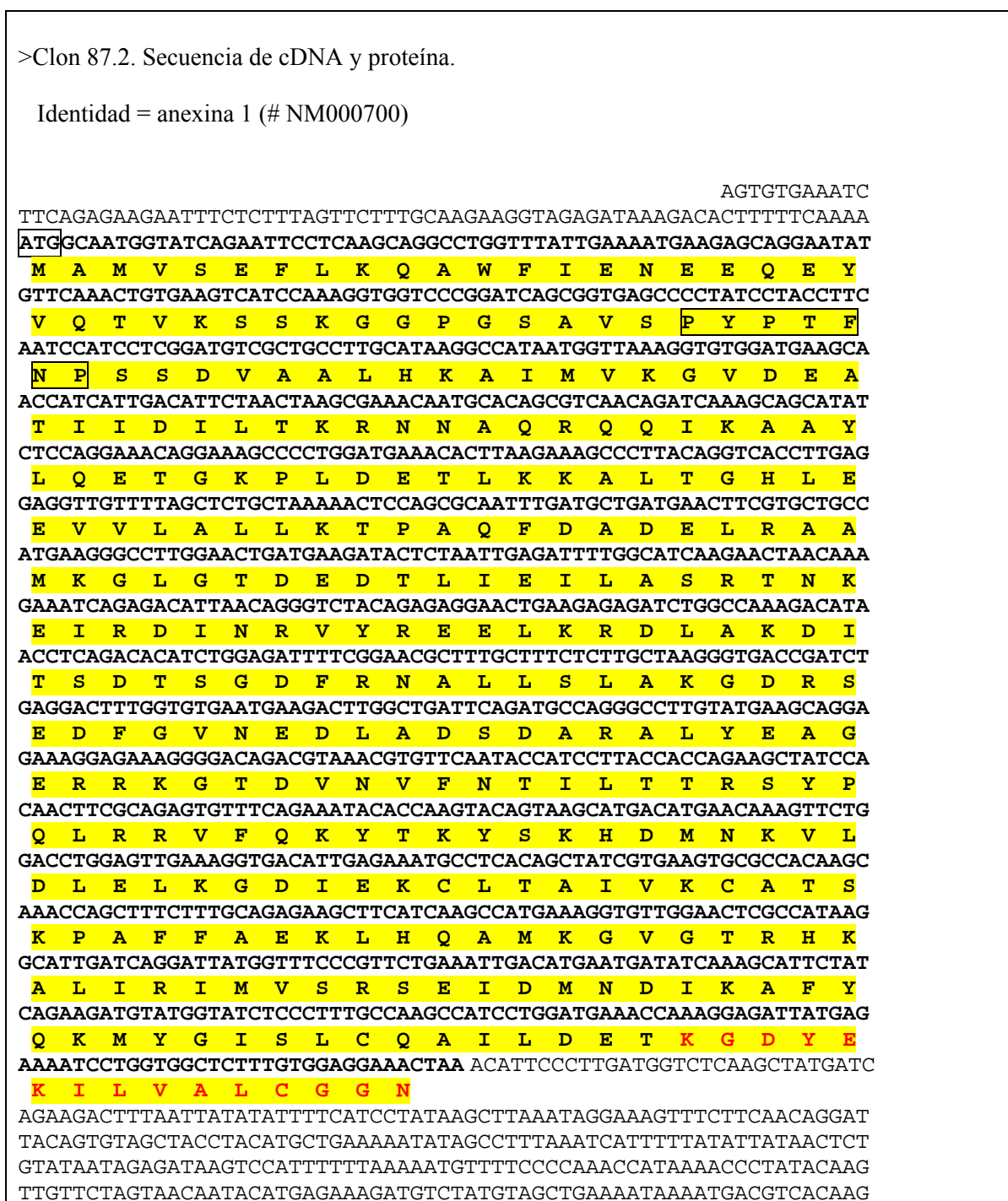


Figura 51. Secuencia de cDNA y proteína de la Anexina 1. El inserto corresponde a la totalidad de la proteína Anexina. En rojo se señala la secuencia de reconocimiento de la proteína quinasa c (PKC). Encuadrado en negro se muestra la secuencia que contiene un patrón característico de prolinas común a otras de las proteínas que probablemente interactúan con PTOV1. Esta secuencia se describe más adelante.

Esta proteína ha sido implicada en la regulación de la agregación de las vesículas fosfolipídicas durante la respuesta inflamatoria y se ha demostrado su papel como inhibidor de la activación de la fosfolipasa A2 citosólica (Kim y cols, 2001a, b; Oh y cols, 2000). Otras funciones conocidas o postuladas para la Anexina 1 son su participación en la interacción entre células epiteliales y endotelio (Solito y cols, 2000).

- Clon 170.3.

El fragmento de cDNA de este clon, en pauta con el dominio de activación transcripcional de Gal4, corresponde a la mayor parte de la proteína RACK1 (Figura 52). La secuencia del inserto se inicia a partir del aminoácido 112 de RACK1. La proteína RACK1, cuyo nombre es acrónimo de *Receptor of Activated C-Kinase*, es una proteína con siete repeticiones WD que interacciona con la isoforma $\beta 1$ de la proteína quinasa C (PKC) en presencia de fosfatidilserina, diacilglicerol y calcio (Ron y cols, 1994a, b). RACK1 se asocia a PKC $\beta 1$ activada, y parece contribuir de forma importante a la localización en la membrana celular de esta última cuando es activada (Mochly-Rosen y cols, 1995). La unión de RACK1 a PKC $\beta 1$ es dosis dependiente y se produce fuera de la región catalítica indicando así que RACK1 no es un sustrato de PKC. La función de RACK1 va probablemente más allá de su asociación a PKC, y podría jugar un papel de proteína adaptadora en otros procesos de señalización, ya que interacciona también con el proto oncogen c-Src (Chang y cols, 2001; Chang y cols, 1998).

Mediante un análisis de la homología de su secuencia se concluyó que RACK1 pertenece a la familia que incluye la subunidad beta de las proteínas G. Todas estas proteínas contienen de 5 a 8 elementos de repetición internos conocidos como motivos WD40 (señalados en rojo en la figura) que parecen tener un papel en la interacción entre proteínas (Usacheva y cols, 2001; Chang y cols, 2001; Rietzler y cols, 1998). Además, RACK1 contiene dos secuencias cortas homólogas a las secuencias de unión a PKC (señaladas en azul en la figura 52) identificadas en Anexina 1 y en el inhibidor en cerebro de PKC, KCIP (Ron, 1994b).

>Clon 170.3. Secuencia de cDNA y proteína

Identidad = RACK1 (#BC017287)

```

GGCACGAGGGTGGTGCTAGTTTCTCTAAGCCAT
CCAGTGCCATCCTCGTCGCTGCAGCGACACACGCTCTCGCCGCCGATGACTGAGCAGATGACCCTTCG
TGGCACCTCAAGGGCCACAACGGCTGGGTAACCCAGATCGCTACTACCCCGCAGTTCCCGGACATGATC
CTCTCCGCCTCTCGAGATAAGACCATCATCATGTGGAACTGACCAGGGATGAGACCAACTATGGAATTC
CACAGCGTGCTCTGCGGGTCACTCCCACTTTGTTAGTGATGTGGTTATCTCCTCAGATGGCCAGTTTGC
CCTCTCAGGCTCCTGGGATGGAACCTGCGCCTCTGGGATCTCACAACGGGCACCACCACGAGGCGATTT
GTGGGCCATACCAAGGATGTGCTGAGTGTGGCCTTCTCTCTGACAACCGGCAGATTGTCTCTGGATCTC
F S S D N R Q I V S G S
GAGATAAAACCATCAAGCTATGGAATACCCCTGGGTGTGTGCAAATACACTGTCCAGGATGAGAGCCACTC
R D K T I K L W N T L G V C K Y T V Q D E S H S
AGAGTGGGTGTCTTGTGTCCGTTCTCGCCAAACAGCAGCAACNCTTATCATCGTCTCCTGTGGCTGGGA
E W V S C V R F S P N S S N P I I V S C G W D
CAAGCTGGTCAAGGTATGGAACCTGGCTAACTGCAAGCTGAAGACCAACCACATTGGCCACACAGGCTAT
K L V K V W N L A N C K L K T N H I G H T G Y
CTGAACACGGTGACTGTCTCTCAGATGGATCCCTCTGTGCTTCTGGAGGCAAGGATGGCCAGGCCATGT
L N T V T V S P D G S L C A S G G K D G Q A M L
TATGGGATCTCAACGAAGGCAAACACCTTTACACGCTAGATGGTGGGGACATCATCAACGCCCTGTGCTT
W D L N E G K H L Y T L D G G D I I N A L C F
CAGCCCTAACCGCTACTGGCTGTGTGCTGCCACAGGCCCCAGCATCAAGATCTGGGATTTAGAGGGAAAG
S P N R Y W L C A A T G P S I K I W D L E G K
ATCATTGTAGATGAACTGAAGCAAGAAGTTATCAGTACCAGCAGCAAGGCAGAACCACCCAGTGCACCT
I I V D E L K Q E V I S T S S K A E P P Q C T S
CCCTGGCCTGGTCTGCTGATGGCCAGACTCTGTTGCTGCTACACGGACAACCTGGTGGCAGTGTGGCAGG
L A W S A D G Q T L F A G Y T D N L V R V W Q V
TGACCATTGGCACACGCTAGAAGTTTATGGCAGAGCTTTACAAATAAAAAAAAAAACTGGCAAAAAAAAAA
T I G T R

```

```

MTEQMTRLRGTCLKGHNGWVTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIMWKLTRDETNYGIPQRALRGHSHFVSDVVISSDG
QFALSGSWDGTLRLWDLTTGTTTTRRFVGHGTKDVLVSAFSSDNRQIVSGSRDKTIKLNTLGVCKYTVQDESHSEW
VSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVWNLANCKLKTNHIGHTGYLNTVTVSPDGS LCASGGKDGQAMLWDLNEGK
HLYTLDGGDIINALCFSPNRYWLCAATGPSIKIWDLEGGKIIIVDELKQEVISTSSKAEPPOCTSLWSADGQTLFA
GYTDNLVVRWQVTIGTR

```

Figura 52. Secuencia de cDNA de RACK1. En negrita se señala la secuencia correspondiente al inserto obtenido y en amarillo la secuencia proteica resultante. En azul se señala la secuencia de reconocimiento de la proteína quinasa c (PKC). En rojo se señalan las sepeticiones WD.

- Clon 113.2.

Este clon contiene gran parte del cDNA para el factor de elongación de traducción eIF3ε, en pauta con el dominio de activación transcripcional Gal4 del vector pACT2. El inserto de cDNA se inicia a partir del aminoácido 30 de eIF3ε (Figura 53). Dicha proteína, llamada también p47 o

subunidad 5 de eIF3, forma parte de un complejo multiproteico que regula la elongación de la síntesis de proteínas de novo en los ribosomas (Phan y cols, 2001). La subunidad eIF3ε contiene un dominio de homología significativa con MOV34, una proteína que forma parte de la subunidad reguladora del proteasoma (Aravind y Ponting, 1998) por lo que se ha postulado una posible doble función de eIF3ε en la traducción de proteínas y en el procesamiento proteolítico por el proteasoma (Glickman y cols, 1998; Shalev y cols, 2001).

> Clon 113.2 Secuencia de cDNA y proteína

Identidad = eIF3ε (# BC000490)

```

GACAAGATGGCCACACCCGGCGGTACCAGTAAGTGCTCCTCCGGCCACGCCAACCCAGTC
CCGGCGGGCCCGCCAGCCTCAGTTCCAGCGCCAAACGGCCAGCACCGGCTGCGGCTCCGGTTCCCGCTGCGG
P A P A A A P V P A A
CTCCAGCCTCATCCTCAGACCCTGCGGCAGCAGCGGCTGCAACTGCGGCTCCTGGCCAGACCCCGGCCTC
A P A S S S D P A A A A A A T A A P G Q T P A S
AGCGCAAGCTCCAGCGCAGACCCAGCGCCCGCTCTGCCTGGTCTCTTCCAGGGCCCTTCCCGGGC
A Q A P A Q T P A P A L P G P A L P G P F P G
GGCCGCGTGGTCAGGCTGCACCCAGTCATTTTGGCCTCCATTGTGGACAGCTACGAGAGACGCAACGAGG
G R V V R L H P V I L A S I V D S Y E R R N E
GTGCTGCCCGAGTTATCGGGACCTGTTGGGAAGTGTGACAAAACACTCAGTGGAGGTCACCAATTGCTT
G A A R V I G T L L G T V D K H S V E V T N C F
TTCAGTGCCGCACAATGAGTCAGAAGATGAAAGTGGCTGTTGACATGGAATTTGCTAAGAATATGTATGAA
S V P H N E S E D E V A V D M E F A K N M Y E
CTGCATAAAAAAGTTTCTCCAAATGAGCTCATCTGGGCTGGTACGCTACGGGCCATGACATCACAGAGC
L H K K V S P N E L I L G W Y A T G H D I T E
ACTCTGTGCTGATCCATGAGTACTACAGCCGAGAGGCCCCCAACCCCATCCACCTCACTGTGGACACAAG
H S V L I H E Y Y S R E A P N P I H L T V D T S
TCTCCAGAACCGCCGATGAGCATCAAAGCTACGTCAGCACTTTAATGGGAGTCCCTGGGAGGACCATG
L Q N G R M S I K A Y V S T L M G V P G R T M
GGAGTGATGTTACGCCTCTGACAGTGAATACGCGTACTACGACACTGAACGCATCGGAGTTGACCTGA
G V M F T P L T V K Y A Y Y D T E R I G V D L
TCATGAAGACCTGCTTTAGCCCCAACAGAGTGATTGGACTCTCAAGTGACTTGCAGCAAGTAGGAGGGGC
I M K T C F S P N R V I G L S S D L Q Q V G G A
ATCAGCTCGCATCCAGGATGCCCTGAGTACAGTGTGCAATATGCAGAGGATGTACTGTCTGGAAAGGTG
S A R I Q D A L S T V L Q Y A E D V L S G K V
TCAGCTGACAATACTGTGGGCGCTTCTGATGAGCCTGGTTAACCAAGTACCGAAAATAGTTCCCGATG
S A D N T V G R F L M S L V N Q V P K I V P D
ACTTTGAGACCATGCTCAACAGCAACATCAATGACCTTTTGTGATGGTGACCTACCTGGCCAACCTCACACA
D F E T M L N S N I N D L L M V T Y L A N L T Q
GTCACAGATTGCACTCAATGAAAACTTGTAACCTGTGA
S Q I A L N E K L V N L *

```

Figura 53. Secuencia de cDNA del factor de elongación eIF3ε. La secuencia del inserto corresponde prácticamente a la totalidad de la proteína eIF3ε. Encuadrado se señala una secuencia con un patrón característico de prolinas que se analizará más adelante.

- Clon 37.6.

El inserto de este clon se encuentra en pauta con el dominio de activación de Gal4. La secuencia de aminoácidos resultante corresponde prácticamente a la totalidad de la proteína BAT4 (Figura 54).

El inicio del inserto corresponde al aminoácido 41 de la proteína BAT4.

> Clon 37.6. Secuencia de cDNA y proteína.

Identidad = BAT4 (# XM 041871; AF129756)

```

ATG TCCCGGCCCTTGCTCATCACCTTCACCCAGCCACTGACCCAGCGACCTCTGGAAGGATGGGCAGC
AGCAGCCACAGCCCGAGAAGCCAGAGTCCACCCTGGATGGGGCTGCAGCCCGAGCTTTCTATGAGGCCCT
R A F Y E A L
GATTGGGGATGAGAGCAGCGCTCCTGACTCCCAGAGATCTCAGACTGAACTGCCAGAGAAAGAAAGAGA
I G D E S S A P D S Q R S Q T E P A R E R K R
AAGAAAAGAAGAATAATGAAGGCACCAGCAGCAGAAGCAGTGGCAGAAGGAGCATCAGGAAGACATGGAC
K K R R I M K A P A A E A V A E G A S G R H G
AAGGGAGATCCCTTGAGGCTGAGGATAAGATGACTCACCGGATACTGAGGGCAGCCAGGAGGGGGACCT
Q G R S L E A E D K M T H R I L R A A Q E G D L
GCCAGAACTTAGGAGACTGCTGGAACCGCATGAGGCAGGAGAGCTGGGGGAATATCAACGCCCGGGAT
P E L R R L L E P H E A G G A G G N I N A R D
GCCTTCTGGTGGACCCACTGATGTGTGCTGCTCGAGCGGGCCAGGGGCAGCTGTGAGCTATCTCCTGG
A F W W T P L M C A A R A G Q G A A V S Y L L
GCCGTGGGGCTGCCTGGGTGGGGGTCTGTGAGCTGAGTGGCAGGGATGCGGCTCAGCTCGCTGAAGAAGC
G R G A A W V G V1 C E L S G R D A A Q L A E E A
TGGCTTCCCTGAGGTAGCCCGCATGGTCAGGGAGAGCCATGGAGAGACAAGGAGCCCGAAAACCGGTCT
G F P E V A R M V R E S H G E T R S P E N R S
CCTACTCCCTCCCTCCAGTACTGCGAGAACTGTGACACCCACTTCCAAGATTCCAACCACCGCACATCCA
P T P S L Q Y C E N C D T H F Q D S N H R T S
CTGCTCACCTGCTGCTCACTGTGCGAGGGTCTCAGCCTCCCAACCTTCCACTTGGGGTGCCCATCTCCAG
T A H L L S L S Q G P Q P P N L P L G V P I S S
CCCGGGCTTCAAAGTGTGCTGAGGGGGGGCTGGGAGCCAGGAATGGGGCTGGGACCCCGGGGTGAGGGC
P G F K L L L R G G W E P G M G L G P R G E G
CGTGCCAATCCCATCCCCTGCTCCTCAAGAGAGACCAGGAAGGACTAGGCTACAGATCAGCACCCACG
R A N P I P T V L K R D Q E G L G Y R S A P Q
CCCGAGTGACACATTTCCAGCTTGGGATACCCGAGCTGTGGCTGGGAGGGAGAGACCCCTCGGGTGGC
P R V T H F P A W D T R A V A G R E R P P R V A
CACACTGAGCTGGAGGGAGGAGAGAAGGAGGGAGGAGAAAGACAGGGCTTGGGAGCGGGATCTAAGGACT
T L S W R E E2 R R R E E K D R A W E R D L R T
TACATGAACCTCGAGTTCTGA
Y M N L E F *

```

1: dominio anquirina; 2: G-patch

Figura 54. Secuencia de cDNA del gen BAT4. En negrita se muestra la secuencia del inserto obtenida y pa proteína resultante. Esta proteína tiene un único dominio anquirina (en azul) y otro dominio G-patch (en rojo). Encuadrado se muestra una secuencia de aminoácidos con un patrón característico de prolinas que se estudia más adelante.

La función de esta proteína así como la existencia de otras posibles interacciones con otras proteínas se desconoce. Del gen sabemos que pertenece al conjunto de genes de MHCI (Lafuse y cols, 1992; Banerji y cols, 1990). Respecto al análisis de su secuencia, observamos dos tipos de dominios, el primero de ellos es semejante al dominio anquirina y el segundo corresponde a un dominio descrito recientemente y que se caracteriza por la disposición y conservación de 7 glicinas (G-patch). El dominio anquirina es característico de la proteína estructural de membrana anquirina. Esta proteína es un monómero de 215 kDa que se asocia a la espectrina y a la banda 3 del canal iónico de los eritrocitos. Junto con la espectrina forma una red que a su vez está asociada a la actina y a la membrana plasmática. La proteína anquirina madura consta de 1880 residuos que comprenden tres dominios estructurales (según se define por la rotura con la quimotripsina) y cuyo dominio N terminal consta exclusivamente de 22 repeticiones en tándem de aproximadamente 30 aminoácidos que reciben el nombre de dominios de anquirina. BAT 4 únicamente contiene un dominio anquirina (Figura 54).

Las repeticiones de G-patch (o parches de Glicina), forman un dominio conservado que se ha hallado en proteínas de eucariotas implicadas en el procesamiento del RNA (Aravind, 1999).

- Clon 189.2.

El inserto de este clon es un cDNA parcial que corresponde a una proteína de función no conocida, KIAA0804. El inserto se inicia a partir del aminoácido 461 de KIAA0804, coincidiendo con el dominio RING finger de esta proteína. Esta proteína contiene, en su extremo amino, una secuencia de similitud a proteínas de unión a GTP (los primeros 140 aminoácidos de la secuencia) y en su extremo carboxilo un dominio *RING finger* (Figura 55). El inserto de dicho clon contiene este último motivo. Los dominios *RING finger* son una variante de *Zn finger*, con la particularidad de presentar dos bucles contiguos de cisteínas y/o histidinas coordinados por dos átomos de Zn (Barlow y cols, 1994). Los residuos que coordinan este metal suelen ser cisteína o histidina, y se han descrito dos tipos principales de *RING finger* convencionales, con las secuencias consenso C3HC4 y C3H2C4, respectivamente (Barlow y cols, 1994). En los últimos dos años se ha demostrado que las proteínas portadoras de estos dominios son ligasas de ubiquitina, conocidas también como E3 que, a través de los dominios *RING finger*, interaccionan con enzimas de conjugación de ubiquitina o E2 (Ito y cols, 2001; Lorick y cols, 1999).

>clon 189.2. Secuencia de cDNA y proteína. Identidad = KIAA0804 (#AK022945)

CCAAAGGAGTATTTTTGGAGTGCCTTGAGCCATATATTTTAAAGTGATAAATTGGTGGGAATCACACCCCA
 AGTAATGAAAGACTTGATTGTTTCATTTCCAAGATAAAAAATTAATGGAAAATGTGGAAGCGCTCATTGTA
 CATATGGATATCACCAGCCTAGATATTCAGCAGGTAGTTCTCATGTGTTGGGAAAATCGTTTATATGATG
 CTATGATCTATGTCTACAACAGAGGCATGAATGAATTTATTAGTCCAATGGAGAAAACTTTTCAGAGTCAT
 TGCTCCTCCTCTGAATGCAGGAAAAACTAACAGATGAACAAGTTGTTATGGGCAATAAGCTCCTTGTA
 TATATTAGCTGTTGTCTAGCAGGTCGTGCCTATCCCCTTGGTGACATCCCTGAAGATCTGGTTCCCTTGG
 -----780pb-----GAAGGTATTCATGTAAATCAAGAATTACTGCAAATATCTCCTTGTATCACAGAG
 CAGTTTCATTGAGCTGTTGTGTCAGTTCAACCCAGCCCAAGTTATAGAGACTCTGCAAGTCCTTGAGTGCT
 ACCGTCTGGAAGAACTATTCAGATTACTCAGAAGTATCAACTTCATGAAGTCACCGCTTATCTATTGGA
 AAAGAAAGGAGATATTCATGGTGCCTTCCTAATAATGTTAGAGAGACTACAAAGCAAAC'TTCAAGAGGTA
F L I M L E R L Q S K L Q E V
 ACACATCAAGGTGAAAATACCAAAGAGGATCCCTCATTGAAGGATGTTGAAGATACTATGGTGGAGACCA
T H Q G E N T K E D P S L K D V E D T M V E T
 TTGCTCTTTGCCAGAGAAAATTCACATAAATTTGAACCAGCAGCAACGTGAGGCCCTTTGGTCCCGTTATT
I A L C Q R N S H N L N Q Q Q R E A L W F P L L
 GGAGGCAATGATGGCCCTCAGAAGCTGTCCAGTTCAGCCATTCCCTCATCTACACTCTGGAGCTCTGAAG
E A M M A P Q K L S S S A I P H L H S G A L K
 TCTTTGACCATGCAAGTTTAAATAGCATGGCAGCATTATTTAGCCCTTCCATCAATCTGCAAAGAATCT
S L T M Q V L N S M A A F I A L P S I L Q R I
 TACAGGATCCAGTTTATGGAAAAGGAAAAC'TTGGAGAAATCCAGGGACTTATCTTGGGAATGTTAGATA
L Q D P V Y G K G K L G E I Q G L I L G M L D T
 CTTTAACTATGAACAAAACCTGCTGGAAAACAACAACCCAGCCTTCTAAACCAAGATCTCCATTGGTCATTG
F N Y E Q T L L E T T T S L L N Q D L H W S L
 TGTAACCTGAGAGCTTCGGTCAACAGAGGACTGAATCCCAAACAAGATTACTGCTCTATATGTTTGCAGC
C N L R A S V T R G L N P K Q D Y C S I C L Q
 AGTACAAGAGACGCCAAGAAATGGCTGATGAAATAATGTCTTTAGCTGTGGCCATTTGTATCACTCATT
Q Y K R R Q E M A D E I I V F S C G H L Y H S F
 CTGCCTACAAAACAAGAAATGCACTGTGGAATTTGAGGGCCAAACAAGATGGACATGCTACAAATGCAGT
C L Q N K E C T V E F E G Q T R W T C Y K C S*
 TCAAGTAAACAAAGTAGGAAAAC'TCAGTGAAAATTCATCTGAAATTA AAAAGGGAAGGATAACCCCATCAC
S S N K V G K L S E N S S E I K K G R I T P S
 AGGTAAAAATGTCTCCATCGTATCATCAGTCCAAAGGGGATCCCACTGCTAAAAAGGGAACCTCAGAACC
Q V K M S P S Y H Q S K G D P T A K K G T S E P
 TGTTCTGGATCCACAGCAAATCCAAGCATTGATCAGCTTTGCCGTCTCTACCGAGGAAGCTCCAGGCTG
V L D P Q Q I Q A F D Q L C R L Y R G S S R L
 GCTCTCCTCACGGAAC'TCTCCAGAATCGCAGCAGCGAGAGCTATAGGCCATTGAGTGGCTCGCAGAGTG
A L L T E L S Q N R S S E S Y R P F S G S Q S
 CTCCTGCTTTCAACAGCATCTTCCAGAATGAGAACTTCCAGCTGCAGCTCATTCTCCACCTGTGACTGA
A P A F N S I F Q N E N F Q L Q L I P P P V T E
 GGATTGA
D

* RING Finger tipo C4HC3

Figura 55. Secuencia de cDNA de la proteína Kiaa0804. La secuencia del inserto corresponde a la parte de la proteína que coatiene un RING finger tipo C4HC3

Las proteínas portadoras de *RING fingers*, por tanto, atraen los enzimas E2 por medio de estos dominios, y el sustrato a ubiquitinar mediante interacciones con otros dominios presentes en la misma proteína. Por tanto, KIAA0804 podría corresponder a una E3, que reclutaría una E2 a través de su *RING finger*, y un sustrato para ubiquitinar a través de otro dominio, por ejemplo el dominio situado en su extremo amino, mencionado más arriba. En este caso, la interacción del dominio RING finger de KIAA0804 con PTOV1, podría regular la interacción de esta proteína con un enzima E2.

- Clon 185.2

El cDNA de este inserto corresponde, en su totalidad a la subunidad beta 4 del proteasoma (PSMB4). Esta subunidad fue localizada en el cromosoma 1q21 por McCuster y col, en 1997.

>Secuencia de cDNA del inserto y proteína.

Identidad = subunidad beta 4 del proteasoma (PSMB4) (# B017307; NP_002787).

```

atggaagcgtttttgggggtcgcgggtccggactttggggcgggggccggccccaggacagttttaccgca
M E A F L G S R S G L W A G G P A P G Q F Y R
ttccatccactcccgattccttcatggatccggcgtctgcactttacagaggccaatcacgcgaccga
I P S T P D S F M D P A S A L Y R G P I T R T Q
gaaccccatggtgaccgggacctcagtcctcggcggttaagttcgagggcggagtggtgattgccgcagac
N P M V T G T S V L G V K F E G G V V I A A D
atgctgggatcctacggctccttggctcgtttccgcaacatctctcgcattatgcgagtcaacaacagta
M L G S Y G S L A R F R N I S R I M R V N N S
ccatgctgggtgcctctggcgactacgctgatttccagatatttgaagcaagttctcggccagatggatg
T M L G A S G D Y A D F Q Y L K Q V L G Q M V I
tgatgaggagcttctgggagatggacacagctatagtcctagagctattcattcatggctgaccagggcc
D E E L L G D G H S Y S P R A I H S W L T R A
atgtacagccggcgctcgaagatgaacccttgtggaacaccatggatcatcggaggctatgctgatggag
M Y S R R S K M N P L W N T M V I G G Y A D G
agagcttctcggttatgtggacatgcttgggtgtagcctatgaagccccttcgctggccactgggtatgg
E S F L G Y V D M L G V A Y E A P S L A T G Y G
tgcatacttgctcagcctctgctgcgagaagttctggagaagcagccagtgctaagcagcagggcc
A Y L A Q P L L R E V L E K Q P V L S Q T E A
cgcgacttagtagaacgctgcatgcgagtgctgtactaccgagatgcccgttcttacaaccggtttcaa
R D L V E R C M R V L Y Y R D A R S Y N R F Q
tcgccactgtcaccgaaaaagggtgttgaaatagagggaccattgtctacagagaccaactgggatattgc
I A T V T E K G V E I E G P L S T E T N W D I A
ccacatgatcagtggtttgaatga
H M I S G F E

```

Figura 56. La secuencia de cDNA del clon 185.2 corresponde prácticamente a la totalidad de la subunidad beta 4 del proteasoma.

Tras haber presentado el conjunto de posibles proteínas que interaccionan con PTOV1, a continuación se muestra un alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos de algunos

idóneo para que estos microdominios faciliten la interacción entre una gran variedad de moléculas. En los *rafts* lipídicos, la existencia de un número elevado de proteínas de unión a GPI potenciarían estas interacciones. En estos microdominios lipídicos han sido localizadas entre otras, las proteínas PKC α , quinasas Src-like, proteína G heterotrimérica (G $\alpha\beta\gamma$) y las anexinas 5 y 6. Por lo tanto, existen ciertas evidencias de la posible localización en estos microdominios de RACK 1 (por pertenecer a la misma familia que la subunidad beta de la proteína G, por ser receptor de PKC y por interactuar con Src), y tal vez también de anexina 1 (por contener una secuencia de reconocimiento de PKC al igual que RACK y por haberse descrito otras proteínas de la familia de las anexinas en estos microdominios lipídicos).

El interés generado por estas posibles coincidencias y debido a la existencia de anticuerpos comerciales anti-flotilina 1, anexina 1 y RACK1, se decidió iniciar los estudios de comprobación de la interacción por estas tres proteínas.

L) Comprobación de las interacciones de los clones obtenidos por YTH.

Nuestro objetivo es comprobar que la interacción obtenida entre los supuestos positivos y PTOV1 es real mediante interacción *in vitro* y coimmunoprecipitación, así como por análisis de colocalización o copurificación.

Previamente se ha pretendido evidenciar que dichas interacciones son posibles ya sea porque las proteínas en cuestión colocalizan en el mismo compartimento subcelular y/o por encontrarse en la misma fracción proteica.

- Distribución de RACK1, flotilina 1 y anexina 1 en las líneas celulares PC3, LNCaP, PZHPV7 y Cos-7.

Antes del inicio de los experimentos de colocalización, se analizó la distribución de RACK1, anexina 1 y flotilina 1 en lisados totales de las líneas celulares de próstata PC3, LNCaP y PZHPV7 mediante Western blot. Tal y como se observa en la Figura 58, todas las líneas celulares expresan niveles fácilmente detectables de flotilina 1, RACK1 y caveolina, sin embargo, la expresión de anexina 1 no se detecta en LNCaP y presenta niveles bajos en PC3 y Cos 7.

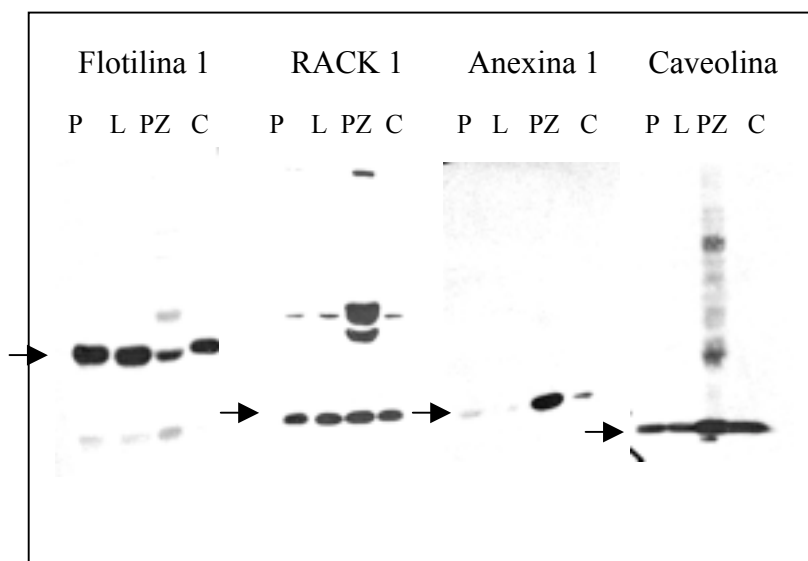


Figura 58. Western blot a partir de 50 μ g de proteína total de las líneas celulares PC3 (P), LNCaP (L), PZHPV7 (PZ) y Cos-7 (C) con el anticuerpo anti-Flotilina 1, anti-RACK1 y anti-anexina 1. Como control se ha utilizado caveolina. Las bandas obtenidas son del tamaño esperado. Respecto a RACK1, en el lisado proteico de la línea celular PZHPV7 detectamos dos bandas adicionales de mayor tamaño. El significado de ellas, por el momento, se desconoce.

- Coinmunolocalización en las líneas celulares PC3 y/o PZHPV7.

La localización subcelular de estas proteínas con respecto a PTOV1 se ha analizado por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-PTOV1 y contra cada una de las proteínas a estudiar. En la línea celular PC3, la localización de PTOV1 y flotilina 1 es similar. Si bien existen algunas áreas citoplasmáticas en las que no coinciden, podríamos decir que el porcentaje de colocalización de ambas proteínas es prácticamente del 80-90 %. Los resultados se ilustran en la Figura 59.

Sin embargo, entre RACK1 y PTOV1 el nivel de colocalización es menor, tal vez de un 5-10 % pero cuando sucede, corresponde a puntos concretos de la membrana plasmática y región perinuclear (Figura 60 A).

Previamente, se ha descrito que los ésteres de forbol, como el PMA, inducen la activación y desplazamiento de la proteína quinasa C (PKC) a la membrana, donde supuestamente interacciona con

RACK1 (RACK1 también se desplaza a membrana). Por este motivo quisimos comprobar si el nivel de colocalización en la membrana plasmática se veía incrementado al estimular las células con PMA.

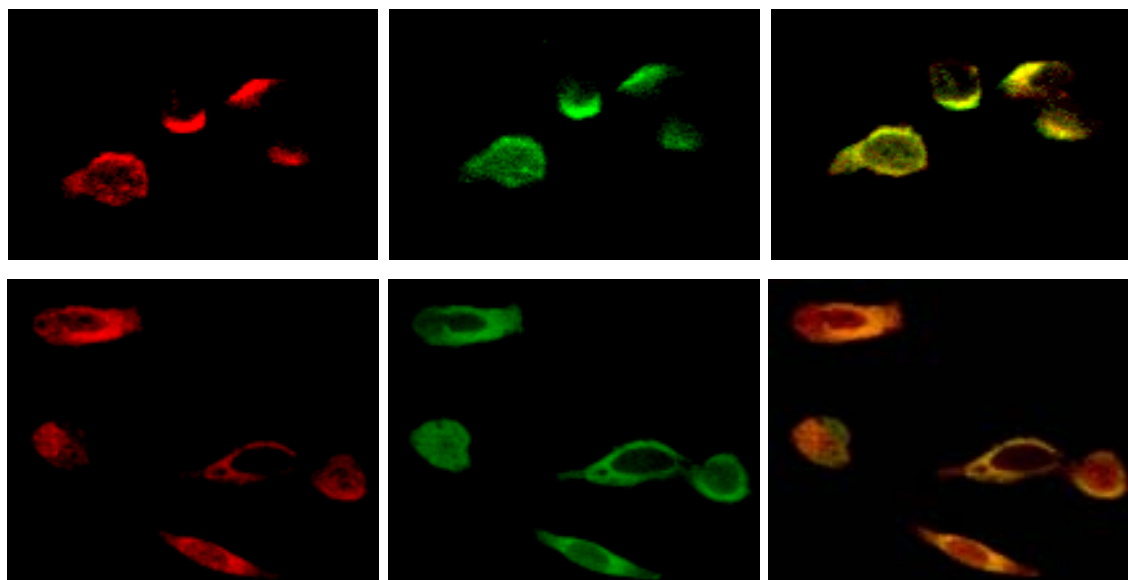


Figura 59. Detalle de la colocalización de las proteínas Flotilina 1 y PTOV1 en la línea celular de próstata PC3. En la imagen puede observarse como la señal de PTOV1 (rojo) y Flotilina 1 (verde) coinciden (amarillo o naranja), localizándose mayoritariamente en la región citoplasmática perinuclear.

El resultado muestra que tras tratar las células PC3 con PMA, la proteína PTOV1 se concentra preferentemente en dos compartimentos, el nuclear y algunos puntos de la membrana plasmática donde coincide, exactamente, con los puntos de localización de RACK1. En la figura 60C se muestra un detalle de un corte transversal en el eje de las Z (obtenido mediante microscopía confocal) en el que se puede apreciar cómo esta colocalización se da principalmente en uno de los puntos de la membrana plasmática que corresponde a una región no anclada a la superficie de la placa sino que se encuentra sobre esta y recuerda a los filipodios retráctiles que se forman durante el proceso de migración celular. Esta imagen podría corresponder a una célula que está iniciando el movimiento migratorio mediante la formación de estas pequeñas prolongaciones de membrana o, tal vez, que ha finalizado el desplazamiento y la retracción de la prolongación. Sin embargo, en la Figura 60B se observa claramente la protusión "filopódica" que deriva de esta célula en movimiento. En esta imagen RACK1 y PTOV1 claramente colocalizan en el punto de anclaje a la superficie de la placa hacia donde la célula está dirigiendo su migración.

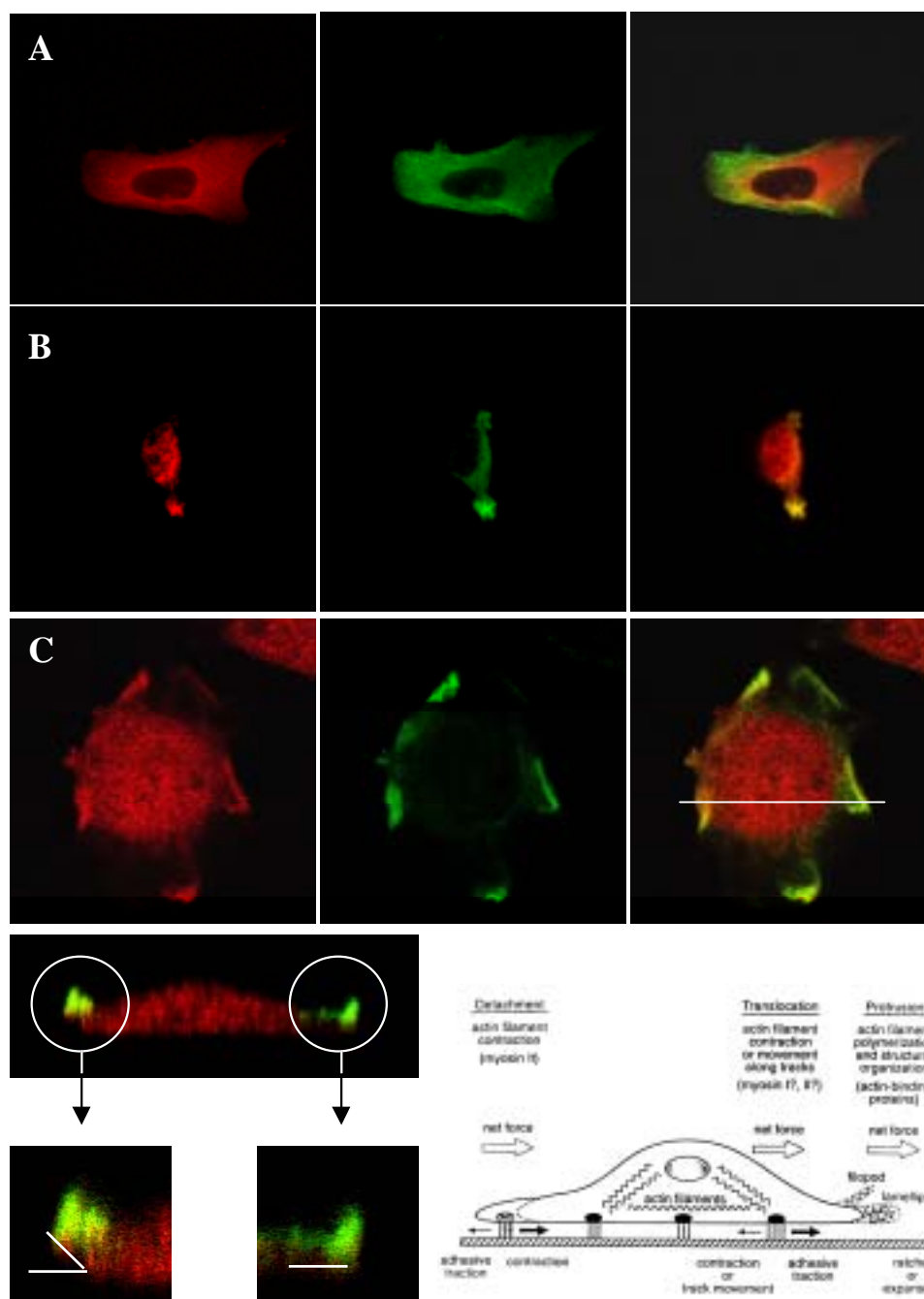


Figura 60. A) Tinción de células PC3 con anti PTOV1 (rojo) y anti RACK1 (verde). Aunque el marcaje de PTOV1 y RACK1 es citoplasmático, la señal de ambos apenas colocaliza a excepción de algunos puntos de la región perinuclear. B) Corresponde a una célula que probablemente se encuentre en movimiento. En la línea celular PC3 en medio completo, podemos observar este fenotipo en muchas de sus células y el número de células con este fenotipo incrementa tras tratar con PMA. En esta célula, existe una colocalización clara de RACK1 y PTOV1 en el extremo de la célula que probablemente corresponda al punto de anclaje a la superficie de la placa. C) Tras tratar con PMA observamos también un gran número de células con un fenotipo similar al mostrado en esta figura. La localización de RACK1 es exclusivamente de membrana plasmática. PTOV1 también se localiza en estos puntos, sin embargo, la intensidad de señal varía. Al realizar un corte transversal de dos de estos puntos vemos que la colocalización se observa principalmente en la prolongación de membrana que no está anclada a la superficie de la placa.

El estudio de la colocalización por inmunocitoquímica de anexina 1 y PTOV1 únicamente se ha podido analizar en PZHPV7 ya que los niveles de anexina 1 en PC3 no son detectables por esta técnica. En la Figura 61 se observa que la colocalización entre ambas proteínas se restringe a la membrana plasmática.

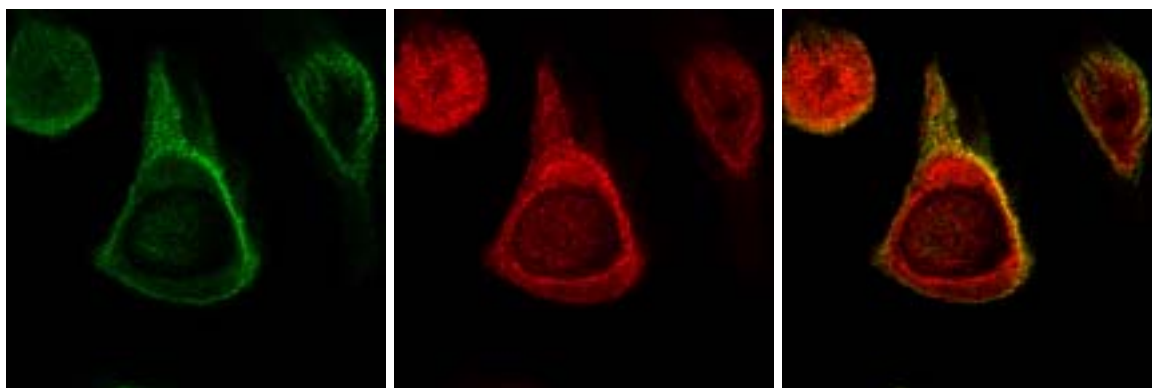


Figura 61. Inmunocolocalización de las proteínas PTOV1 (rojo) y Anexina 1.(verde) La señal de ambas únicamente coincide en la membrana plasmática (amarillo).

- Coimmunopurificación en la fracción insoluble en Tritón X-100

Con el fin de complementar los resultados de inmunocolocalización por inmunocitoquímica referentes a la proteína PTOV1 y a flotilina 1, anexina 1 y RACK1 se decidió llevar a cabo un análisis bioquímico de co-purificación mediante gradiente de densidad que permitiera aislar la fracción proteica insoluble en Tritón X-100. De todas estas proteínas, flotilina 1 es la única que hasta el momento, ha sido aislada en la fracción insoluble en Tritón X-100. En los dos experimentos que se explican a continuación se ha intentado, por un lado inducir el cambio de localización hacia membrana plasmática mediante el tratamiento con PMA y por otro lado, se ha inducido el proceso de polarización celular en el que se sabe que los *lipid rafts* están implicados. Tras ambos tratamientos, se ha realizado el gradiente de densidad para ver si podíamos detectar en la misma fracción insoluble en Tritón X-100 las proteínas en cuestión. Según información obtenida de la literatura, estos microdominios de membrana (Brown, 1992) realizando un gradiente de sacarosa, pueden aislarse aproximadamente entre la fracción del 20% y 10% de sacarosa.

La línea tumoral utilizada fue PC3. Se partió de más de 6×10^7 células con el fin de enriquecer dicha fracción y así poder visualizar fácilmente las proteínas que se localizan de una manera estable, en esta (sobre todo anexina 1 ya que sus niveles no son muy elevados en la línea PC3).

El experimento se realizó por duplicado, a partir de células crecidas en medio normal y células tratadas 6 horas previas a la extracción, con PMA. Está descrito que PMA induce el cambio de localización celular de RACK1, de encontrarse de manera dispersa en toda la célula, pasa a concentrarse en puntos específicos de la membrana citoplasmática. Los resultados (Figura 61) muestran co-localización de PTOV1, flotilina 1, anexina 1 y caveolina 1 (que se utilizó como control) pero no de RACK1 en la fracción del 20% de sacarosa.

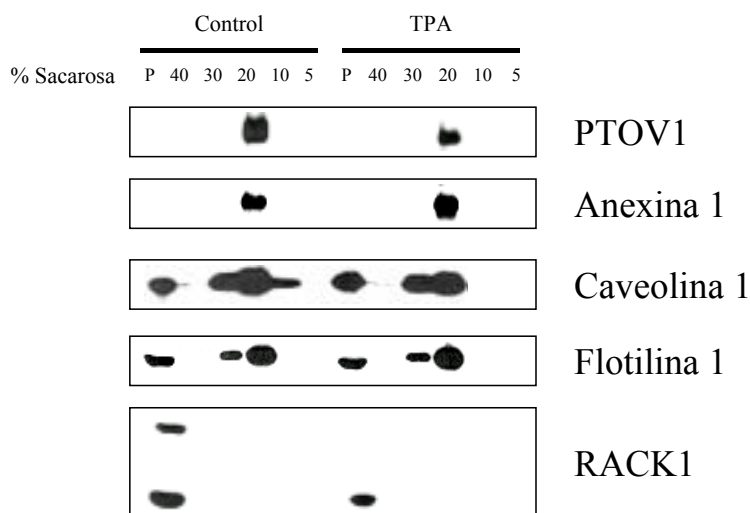


Figura 61. Western blot del gradiente de sacarosa realizado a partir del lisado proteico de la línea celular PC3. PTOV1, flotilina 1 y anexina 1 colocalizan en la fracción del 20% de sacarosa. RACK1 únicamente se detecta en el pellet celular.

Una manera de inducir la polarización de células tumorales es el tratamiento con IGF-1. El efecto quimiotáctico de IGF-1 implica la adhesión celular mediada por integrinas y la activación del receptor de IGF-1 (Mañes y col 1999, Mira y col 1999). En las células MCF-7, este tratamiento induce la polarización de CCR5 (receptor de quimioquinas) y GM1 (gangliosido asociado a los *rafts*) en los *rafts* del *leading edge* de la célula. Al igual que la línea celular MCF-7, las células PC3 también responden al estímulo de IGF 1 y se polarizan. Esta vez, para generar el gradiente de densidad se utilizó Optiprep (Iodixanol) (Smart y cols, 1995). Este estudio se realizó en paralelo para corroborar los resultados anteriores y ver si esta vez podíamos detectar RACK1 en la fracción soluble. En este ensayo únicamente se analizó RACK1, flotilina 1 y PTOV1. La anexina 1 no fue analizada porque se partía de un bajo número de células. En la Figura 62 se muestra el resultado obtenido.

De nuevo volvemos a encontrar colocalización de PTOV1 y flotilina 1 en la misma fracción proteica del gradiente. En este experimento observamos variaciones en la intensidad y localización de ambas proteínas dependiendo del tiempo de incubación con IGF-1. Así, encontramos que en el tiempo 0, 5 min y 30 min, flotilina 1 y PTOV1 colocalizan en la fracción proteica insoluble en tritón X-100.

Sin embargo, a los 15 minutos colocalizan en la fracción del pellet celular. En este punto, flotilina 1 no se detecta en la fracción 1 (*lipid rafts*). El significado de este resultado lo desconocemos.

El hecho de que no hayamos detectado RACK 1 en esta fracción no quiere decir que no se encuentre en estos dominios lipídicos. En este caso el gradiente nos proporciona una información adicional, ya que muchas de las proteínas que se localizan (aunque sea transitoriamente) en los *rafts* lipídicos también interaccionan con proteínas del citoesqueleto. El hecho de no poder capturar estas proteínas en la fracción insoluble en tritón y sí en el pellet celular, puede querer decir que su unión al citoesqueleto y/o matriz nuclear es más fuerte que su unión a la membrana plasmática. En estos casos únicamente podrá comprobarse su localización subcelular mediante inmunocitoquímica.

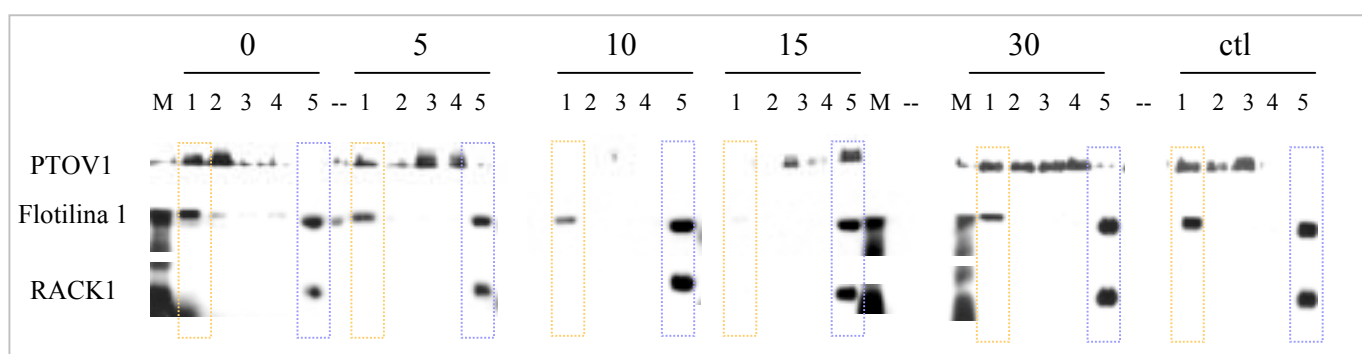


Figura 62. Western blot del gradiente de densidad realizado tras tratar la línea celular PC3 con IGF-1 durante 5 min, 10 min, 15 min y 30 min. El tiempo 0 corresponde a las células incubadas en medio normal sin suero. El ctl corresponde a células incubadas con medio completo (sin IGF-1, durante 3 horas). Los carriles 1-5 corresponden a las distintas fracciones del gradiente de densidad. El punto 1 es la fracción insoluble en tritón que contiene los *rafts* lipídicos y el punto 5 corresponde al pellet celular en el que se encontrarían proteínas del citoesqueleto y nucleares. Como puede observarse, PTOV1 colocaliza con Flotilina 1 en la fracción 1 en los tiempos 0, 5 y 30 y en la fracción del pellet celular a los 15 minutos de incubación con IGF-1. Curiosamente en este punto la Flotilina 1 desaparece de la fracción 1. Por lo tanto, la estimulación con IGF-1 está alterando la localización celular y posiblemente la función de estas dos proteínas. En cuanto a RACK1, sigue detectándose únicamente en la fracción del pellet celular.

M) Inmunoprecipitación de la proteína PTOV1

Con el fin de determinar si el anticuerpo generado anti PTOV1 es capaz de inmunoprecipitar su proteína diana, se realizó una transfección transitoria de la proteína de fusión GFP-PTOV1 y se inmunoprecipitó con el anticuerpo policlonal anti- PTOV1. Como control, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-EMT (anticuerpo policlonal contra la proteína transportadora de monoaminas extraneuronal). En la figura 59 se muestra el Western blot de la inmunoprecipitación, incubado con anticuerpo anti-GFP. Se puede observar que el anticuerpo anti-PTOV1 ha sido capaz de capturar la proteína de fusión GFP-PTOV1 exógena.

En esta primera prueba y bajo estas condiciones se intentó ver si al mismo tiempo podía detectarse la co-inmunoprecipitación de flotilina 1, anexina 1 y RACK 1. El resultado fue negativo. La razón por la que no se han podido inmunoprecipitar estas tres proteínas podría ser debido a:

- el extracto proteico contiene proteínas solubles en Tritón X-100. Las proteínas que queremos detectar probablemente estén enriquecidas en la fracción insoluble en Tritón X-100.
- La transfección con la proteína de fusión GFP-PTOV1 podría interferir en el proceso ya que por un lado, el fragmento proteico de GFP podría de alguna manera dificultar o disminuir la unión de estas 3 proteínas con PTOV1 y al mismo tiempo se establecería una relación de competencia entre la proteína de PTOV1 endógena (con una afinidad normal con sus proteínas de interacción) y la proteína de fusión GFP-PTOV1 (con una afinidad, tal vez, disminuída).
- Los niveles de anexina 1 en la línea celular PC3 son prácticamente indetectables.

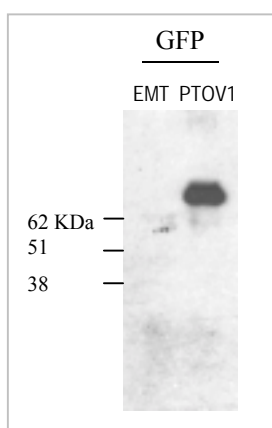


Figura 63. El lisado proteico proviene de la línea celular PC3 transfectada con la proteína de fusión PTOV1/GFP. El primer carril corresponde a la fracción de lisado proteico que se ha inmunoprecipitado con el anticuerpo policlonal anti-EMT (control del experimento). El segundo carril corresponde a la fracción proteica inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-PTOV1. El Western blot se ha incubado con el anticuerpo anti-GFP que reconoce la proteína de fusión PTOV1/GFP.

II. EMT (*Extraneuronal Monoamine Transporter*)

Mediante el algoritmo BLAST se llevó a cabo un análisis comparativo de la secuencia obtenida mediante *differential display* contra la base de datos disponibles públicamente. En un principio la única información que se consiguió fue un listado de los ESTs que avalaban la existencia de lo que parecía corresponder a un nuevo gen.

Varios meses después de aislar y secuenciar esta banda del RAP, en 1998 apareció publicada en la base de datos un nuevo cDNA (# AJ001417) que compartía 100% de identidades con nuestra secuencia. El cDNA corresponde al transportador de monoaminas extraneuronal (EMT) (Gründemann y cols, 1998). *EMT* fue aislado de la línea celular tumoral de riñón Caki-1, mediante una PCR realizada con oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos ya conocida de los dominios característicos de las ASF (*amphiphilic solute facilitators*). El gen está localizado en el cromosoma 6, concretamente en la región del brazo largo, 6q27. El cDNA mide 3.4 Kb y se expresaba en hígado, cerebro y corazón. *EMT* es un miembro nuevo de la familia de transportadores ASF, consiste en 556 aminoácidos con 12 segmentos transmembrana. Es similar a los transportadores renales OCT (*organic cation transporter*) y OAT (*organic anion transporter*).

Existe un importante número de trabajos publicados sobre la función transportadora de EMT, también llamada OCT3 (*transportador orgánico catiónico 3*). Entre sus numerosos sustratos han sido descritos las moléculas de dopamina, noradrenalina, adrenalina, tiramina, histamina, 5-hidroxitriptamina, la neurotoxina 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)) y agentes neuroactivos catiónicos como las anfetaminas y la cocaína. Los esteroides, principalmente el beta-estradiol, son potentes inhibidores de EMT, este hecho junto a sus características de transporte, evidencian la identidad de EMT con uptake 2 (Fleckenstein y cols, 2000; Wu y col 1998).

Uno de los sustratos de EMT descritos recientemente, SarCNU (2-chloroethyl-3-sarcosin-amide-1-nitrosourea), que es un análogo de la cloroetilnitrosourea, es una citotoxina selectiva que se internaliza en la célula específicamente a través de EMT. Actualmente este compuesto se encuentra en fase I de análisis clínico (Chen y cols, 1999b; Marcantonio y cols, 1997).

Al igual que nosotros, existen otros grupos que han comprobado la presencia de EMT en una batería de tumores. EMT se expresa en una gran variedad de tumores humanos y en células gliales del sistema nervioso central. Por este motivo se ha planteado la posibilidad de utilizar SarCNU como agente quimioterapéutico alternativo (Chen y cols, 1999a; Russ y cols, 1996).


```

1 CTGCGGGCGGGCGGGCGGGCGCACCATGCCCTCCCTTCGACGAGGCGCTGCAGCGGGTG 60
61 GGCGAGTTTCGGGCGCTTCCAGAGGCGCGTGTMTTGTGCTGTGCCTGACGGGCGTCAACC 120
  G E F G R F Q R R V F L L L C L T G V T
121 TTCGCCTTCTTCGTCGGCGTGGTCTTCCCTGGGCACGCAGCCCGACCACTACTGGTGC 180
  F A F L F V G V V F L G T Q P D H Y W C
181 CGCGGGCCAAGTGCCGCGGGCGCTGGCCGAGCGCTGCGGGCTGGAGCCCGGAGGAGGAGTGG 240
  R G P S A A A L A E R C G W S P E E W
241 AACCGCACGGCGCCCGCTCCCGCGGGCCAGAGCCCGGAGCGCCCGGGCGCTGCCAG 300
  N R T A P A S R G P E P P E R R G R C Q
301 CGCTACCTCCTGGAGCGGCCAACGACAGCGCCTCCGCCACTAGCGCTCTCAGCTGCGCG 360
  R Y L L E A A N D S A S A T S A L S C A
361 GACCCACTCGCGCTTCCCAACCGTTCGGCTCCCTTGTGCCGTGCCGCGGGCGCTGG 420
  D P L A A F P N R S A P L V P C R G G W
-----
781 CTTGGAATCATAATTCTCCCTGGAATTGCCTACTTTCATCCCAACTGGCAAGGAATCCAG 840
  L G I I I I L P G I A Y F I P N W O G I Q
841 TTAGCCATCAGCTGCCAGCTTCTCTTCCCTTTTATTACTGGGTGGTCCCTGAGTCT 900
  L A I T L P S F L F L L Y Y W V V P E S
901 CCCGTTGGCTGATTACTCGGAAGAAAGAGATAAAGCATTACAGATCCTGAGACGCATT 960
  P R W L I T R K K G D K A L Q I L R R I
961 GCTAAGTGCAATGGGAAATACCTTCTCATCAAATTACTCAGAGATCAGTGTACAGATGAG 1020
  A K C N G K Y L S S N Y S E I T V D E
1021 GAAGTTAGTAATCCATCCTTTTTAGACTTGGTGAGAATCCCAAAATGAGGAAATGCACA 1080
  E V S S N P S F L D L V R T P Q M R K C T
1081 CTTATCTTATGTTTGTCTGGTTCACAAGCGCAGTGGTGTATCAAGGACTTGTTCATGCC 1140
  L I L M F A W F T S A V V Y Q G L V M R
1141 CTGGGAATTATAGGGGCAACCTCTATATAGACTTTTTTCATCTCGGGCGTGGTGGAAGT 1200
  L G I I G G N L Y I D F F I S G V V E L
1201 CCAGGAGTCTCTTACTTACTAACCATTGAGCGCCTTGGACGACGCCTCCCTTTTGGC 1260
  P G A L L I L L T I E R L G R R L P F A
-----
1661 GGCCTTGTGATGCTTTTTGCCTGAAACCAAGGGTATTGCCTTGCCAGAGACAGTGGATGAT 1620
  G L V M L L P E T K G I A L P E T V D D
1621 GTAGAAAACTTGGCAGTCCACATTCCTGTAAATGTGGCAGGAATAAGAAAACCCAGTT 1680
  V E K L G S P H S C K C G R N K K T P V
1681 TCCCGTCTCACCTTTGAGGCCCGGACAAAGACAGAAAGAAGGAGCTATCCAGGAGCTG 1740
  S R S H L
1741 ATCCTCCTTGCAAAAGCTGTGCCTTGCAGAGATGCACGTGTGCATTTTCAGCTACATCATGC 1800
1801 CGCGCTGTGTAAATACTGTATAAAGACCTCAATCTATCCAGAGTATTTTTATATAATGTT 1860
1861 GGATGAGTTAGGATTTGTAATGCTGTTGAAGTTTCTGGGAACACATAATATGTAGCCAGT 1920
1921 TTAACAAAAGAAGCTGTCAGGTGCACAGCCCTTCCCTGGGTTTTTTTCTGTGTCCCTGTG 1980
1981 GTCTCTGACCCATTAGGCTAAAGAGAGACAAGAGAAGCCCGCAACCTGATTCATGACA 2040
2041 GCTCCATCAAGATGTGGATGTGCCGACCAAGAGATTTGAGAAAGTTGTACAGAAATGTG 2100
2101 TTCATCAAATCTGGTCAAGGGACTAAGCTCCCTAGCTGACCATTCACTCTGAAGATTGCAT 2160
2161 GGAGGATGAACATCTGGGAATCCTGTTAATGAGAAGGCTGAATCACAGGCACCTGGGCCA 2220
2221 AAGGGTGTGAGCATTCACTGCTCTGCTCACCTTGGTTCGTTTCGGCACCCTTCCGCAATGTGA 2280
2281 ACAGGTCAGGAGTCCCTCCCGTCCACCTCCTCTGTAACAGCTGGGGTTCCAGGCATGGTT 2340
2341 TAGGCCCTGTTCCAGCAATAAGAACCAATCTGCTGTACAATCTGAGGACTTGGCTGTGTT 2400
2401 ATTTACAAAATGATGCTGTGTTCTGAGATTATTTGGGACATTTTTGGCTCTCCTTTAGT 2460
2461 GGACACCTAGAGCCACAGATTCCCTTCTTTACTAAACAAATCCCATGGATTCTGATTTCT 2520
2521 GGGTCTTAGGATTTTAAAAGTGAAGGATATTTTTCTTATATTTGTGAGTTTCAGTTCCGA 2580
2581 TGGTCCCTGTGTTCAAAGCGAAAACATGGACAATTCCTATTTCATTCTTAGCACTTTGA 2640
2641 CATGTCTTGGGAAAAGCTTTACATTTTAAATTTAAAAGAAAAGATCAATTATATCCATGCT 2700
2701 TAACAGGATCAGCAGGAGCTTTATAAATGACTTTTACAGAGACTAATAAGGGATTGATCTT 2760
2761 TCTTTTTTGTATCGAGGCTTTTGAAGTGTGAACTTGTGTGTTCTGCTTTTATATGTTA 2820
2821 TATTCAATATCTTTTTCAGATGCAGTCTATATTTTATGCTGAGTTTTTAAAATGAAATACT 2880
2881 TTATGCAAAACAGGCAAAATTTGGTACCAAAAGGAAAACATTAACCATGAGGAAGACATTTT 2940
2941 TCTAAGGAGAACAGTGAACAATATACACATGTCGCGTAATCGTAAAATGAGCATCTTAGT 3000
3001 CTTTAAAAACACATCAGAATTGAATACGAATAATCTATTTGTCGATGAAATAAACACAAC 3060
3061 CTTTGGAGGATTTGAGACTACATTCACCTTTTATTACAGTCACTTGCAGTTTTGCTTTTC 3120
3121 TCTCCATTTCTGTGCTGTAAAGTACTGTTGCATTGTTGAATTGTATTTTGGATGGATAT 3180
3181 TTTTGTGTTGGTAACAATTTAAATTTTAAATCGT 3213

```

Figura 64. Secuencia del cDNA de EMT en el que se indique la posición del fragmento obtenido por RAP (gris), así como los cebadores utilizados en la RT-PCR semicuantitativa (en negro). En rojo se señala el péptido utilizado para generar el anticuerpo policlonal anti-EMT.

El interés de nuestro trabajo se ha centrado en la distribución de EMT en las células del tejido prostático ya sea en situación normal (diferencia entre las distintas zonas prostáticas) como en presencia de hiperplasia benigna de próstata o cáncer de próstata. Dentro del análisis de las próstatas con carcinoma, se ha examinado si la expresión de EMT se da por igual en todos los focos tumorales

de un mismo individuo, si es dependiente de gleason o si existe alguna evidencia de correlación con otros parámetros clínicos como el estadio clínico o niveles de PSA. En una primera etapa se comprobó la expresión del transcrito de EMT en las distintas zonas de próstatas normales y que realmente los niveles de expresión de EMT eran superiores en próstatas afectadas por carcinoma. Por otro lado se analizó la distribución de EMT en una batería de líneas tumorales y en otra batería de tejidos normales. En una segunda etapa se generó un anticuerpo anti- EMT en conejos. Sin embargo, como se muestra más adelante, no hemos podido continuar con los experimentos previstos debido a que el anticuerpo podría estar reconociendo, además de EMT, alguna otra proteína inespecífica.

A) Comparación semicuantitativa de los niveles de expresión del gen EMT entre tejido prostático normal y tumoral.

Se realizó un análisis de RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA mensajero de cuatro poblaciones: focos tumorales (CP); regiones confinadas a los focos tumorales pero de aspecto aparentemente normal (ZBP); zona hiperplásica de próstatas no afectadas por tumor (HBP); y tejido prostático periférico aparentemente normal de donantes postmortem. Los primers utilizados fueron diseñados para que reconocieran específicamente el fragmento de cDNA obtenido por la técnica de RAP.

La cuantificación de los niveles de expresión de EMT se ha realizado por densitometría, tomando como referencia los valores obtenidos del gen de expresión constitutiva s14r. Tal y como muestra el gráfico, los niveles de expresión tienden a ser más elevados en las próstatas afectadas por tumor respecto a las afectadas por hiperplasia benigna o las normales de donantes postmortem

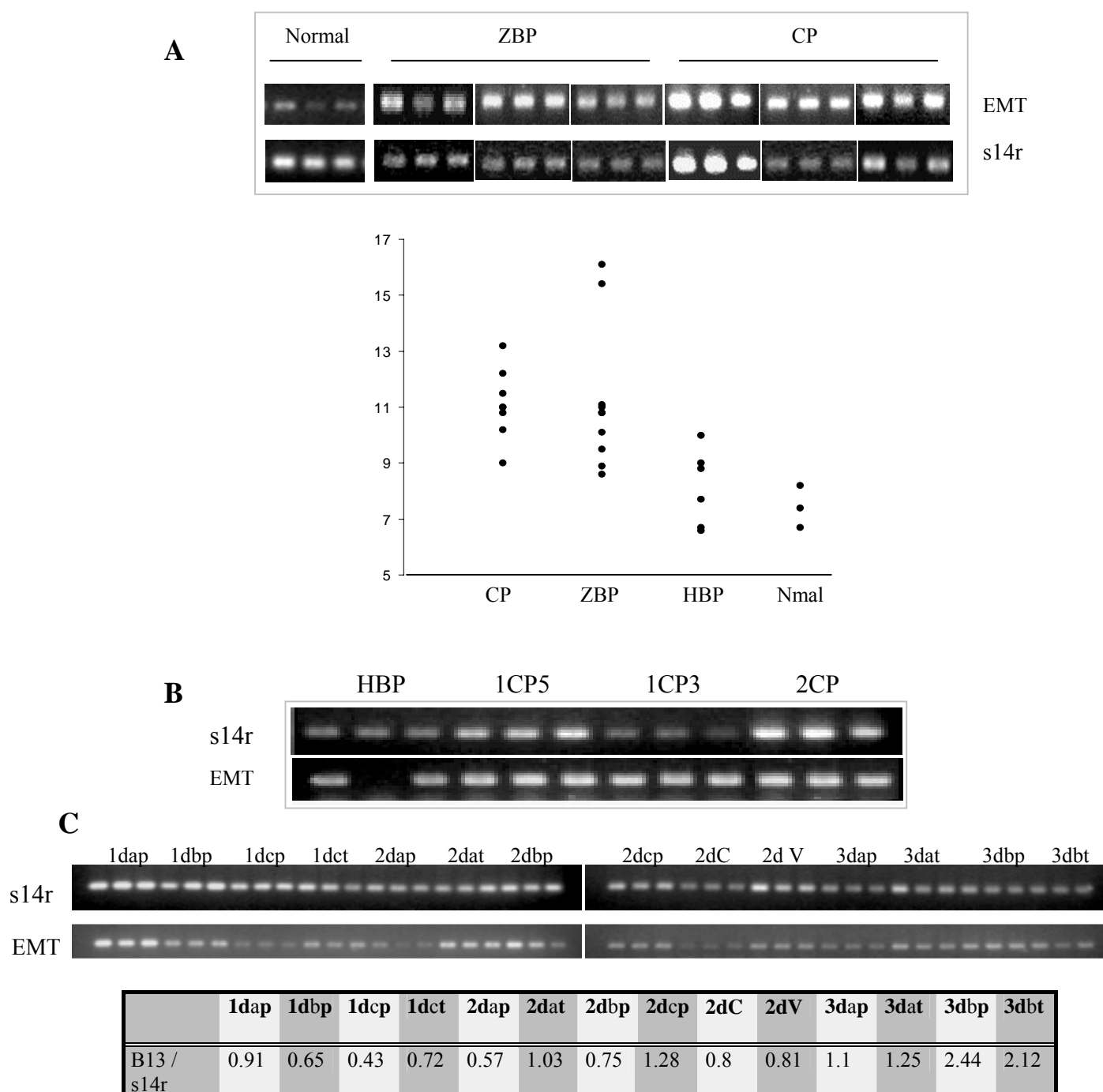


Figura 65. **A)** Detalle de la RT-PCR semicuantitativa sobre muestras aparentemente normales (ZBP) y carcinomatosas (CP). En el gráfico se representan los valores correspondientes al ratio entre EMT / s14r, obtenidos por densitometría óptica. Las poblaciones de muestras analizadas son: cáncer de próstata (CP); zona adyacente al tumor aparentemente normal (ZBP); hiperplasia benigna (HBP) y muestra normal de donante (Nmal). **B)** RT-PCR semicuantitativa en la que se han analizado dos focos tumorales de un mismo paciente de gleason 3 (1CP3) y de gleason 5 (1CP5). Las muestras HBP y 2CP corresponden a una hiperplasia benigna de próstata y a un tumor de otro paciente respectivamente. **C)** RT-PCR semicuantitativa de la zona benigna periférica (p) y de transición (t) de 3 donantes distintos (1d, 2d y 3d). Las letras a, b, c indican la posición más cercana a las vesículas seminales (c) o más alejada de las vesículas seminales (a), de la muestra. Cápsula (C); Vesícula seminal (V).

Nos llamó la atención que en dos de las muestras tumorales, no detectamos expresión del gen ni en la zona tumoral ni en la zona benigna periférica aparentemente normal. Debido a ello, se analizó la muestra de origen y se observó que esta tenía varios focos tumorales con distinto grado de diferenciación. Se procedió a diseccionar lo más precisamente posible dos de los focos tumorales (Gleason 5 y Gleason 3) para volver a extraer el RNA mensajero y así comprobar, mediante RT-PCR semicuantitativa, si los niveles de expresión variaban entre ambos. En la figura 65B puede visualizarse la diferencia obtenida entre ambos focos. Prácticamente existe el doble de expresión en el foco tumoral de grado de diferenciación 3 respecto al de gleason 5. Este aumento de expresión no parece ser debido a una amplificación en el número de copias del gen, según el resultado obtenido de la amplificación del DNA de estas muestras (imagen no mostrada).

B) Comparación semicuantitativa de los niveles de expresión del gen EMT entre la zona benigna periférica y de transición. de próstatas normales

Los niveles de expresión de EMT varían también dependiendo de las distintas zonas de la próstata. Según se puede observar en la figura 65C, los niveles de expresión en la zona de transición son superiores a los detectados en la zona benigna periférica. También varían dependiendo de la posición, más cercana a las vesículas seminales o más caudal, de la región de la que se ha extraído la muestra. Así, encontramos que el nivel de expresión disminuye a medida que nos acercamos a las vesículas seminales (por ejemplo, el donante 1d: región caudal → 0.91 - 0.65 - 0.43 → vesículas seminales). Los niveles hallados en el donante 3 son superiores. En este caso en particular se trataba de un cocainómano, razón que podría explicar los niveles más elevados ya que la inducción de la expresión de EMT podría ser una respuesta a la presencia de moléculas monoaminas como es el caso de los agentes neuroactivos catiónicos (cocaína).

C) Distribución de EMT en una batería de tejidos normales

El análisis de la expresión de EMT en tejido normal se realizó utilizando como sonda un fragmento del cDNA del gen (650 pb). En situación normal, la expresión de EMT se detecta mayoritariamente en hígado, placenta, pulmón, músculo liso, corazón y riñón. En cuanto a las muestras de próstata normal procedentes de biopsias prostáticas, en algunas de ellas, encontramos niveles de EMT superiores (Pr1). Este resultado podría estar relacionado con la región de la próstata de la que se ha obtenido la biopsia ya que hemos visto que la expresión de EMT varía dependiendo de la zona de la próstata que se esté considerando.

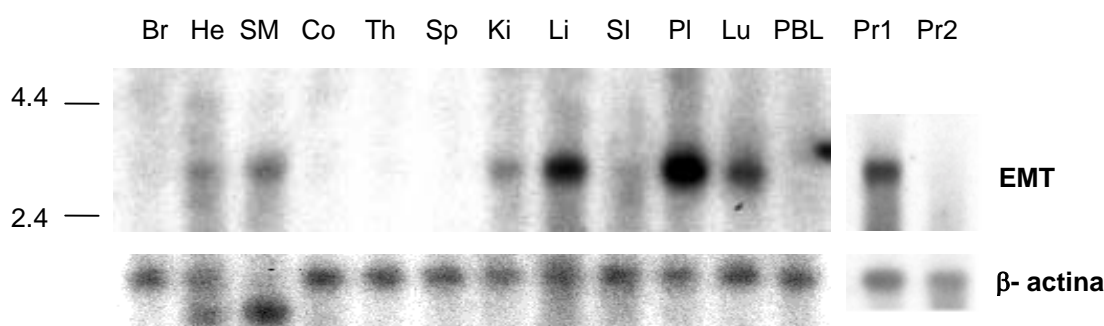


Figura 66. Expresión de EMT en diferentes tejidos normales. Cerebro (Br), corazón (He), músculo esquelético (SM), colon (Co), timus (Th), bazo (Sp), riñón (Ki), hígado (Li), intestino delgado (SI), placenta (PI), pulmón (Lu), sangre periférica (PBL) y próstata (Pr 1 y Pr 2). Las muestras de tejido normal de próstata proceden de biopsias prostáticas de individuos que resultaron ser sanos.

D) Expresión de EMT en líneas tumorales

Para estudiar la expresión de EMT en líneas celulares tumorales se realizó una PCR a partir del cDNA de una batería de líneas celulares. Mediante esta técnica, no detectamos expresión en las líneas tumorales SKMEL 28 y HeLa.

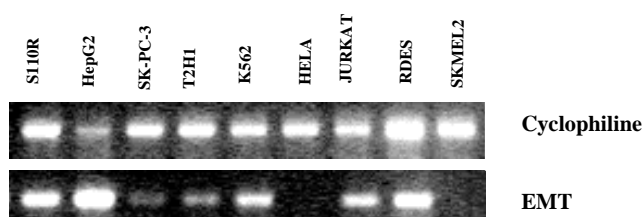


Figura 67. RT-PCR sobre una batería de líneas tumorales. S110R (carcinoma de colon); HepG2 (hepatocarcinoma); SK-PC-3 (carcinoma de pancreas); T24 (vejiga); K562 (leucemia megacarioblástica); HeLa (cérvix); JURKAT (leucemia tiroidea); RDES (sarcoma de Ewin); SKMEL28 (melanoma).

E) Detección de la proteína EMT

Debido a que no existía ningún anticuerpo disponible para esta proteína, nos propusimos, al igual que con PTOV1, generar anticuerpos policlonales con el fin de profundizar en el estudio de la proteína EMT.

Según la predicción teórica de la proteína de EMT (556 aminoácidos), el tamaño sería aproximadamente de 65 kDa. Una vez generado el anticuerpo, este fue testado en una serie de líneas celulares (CAHPV18, PZHPV7, LNCaP, PC3, SKNSH) y una muestra de tejido prostático (Figura 68A). La banda esperada aparece en todas las muestras excepto en las líneas LNCaP y SKNSH, donde bajo estas condiciones no se detecta. En la muestra de tejido prostático humano aparece una segunda banda de mayor tamaño, de unos 125 kDa y en las muestras prostáticas procedentes de las líneas CAHPV18 (CA) y PZHPV7 (PZ) aparece una banda de aproximadamente 45 kDa. Pensando que estas últimas podría tratarse de bandas inespecíficas, se procedió a purificar el anticuerpo por afinidad. Tras purificarlo, la banda de 45 kDa desaparece y sin embargo, seguimos observando la de 125 kDa.

Dependiendo del origen o procesamiento de la muestra observamos 1 o 2 bandas (de 65 y 125 kDa). En la tabla siguiente se resume el resultado (Figura 68 B, C):

Origen de la muestra	65 kDa	125 kDa
Proteína total de tejido (Laemli buffer)	X	X
Fracción soluble en tritón de tejido	X	
Fracción insoluble de tejido		X
Línea tumoral de próstata (Laemli buffer)	X ^a	

(X^a): EMT no se detecta en todas las líneas celulares. En la línea tumoral LNCaP de próstata, y N2A (neuroblastoma de ratón) no se detecta expresión. En SKNSH los niveles son tan bajos que únicamente detectamos algo de expresión en cantidades superiores a 100 µg de proteína.

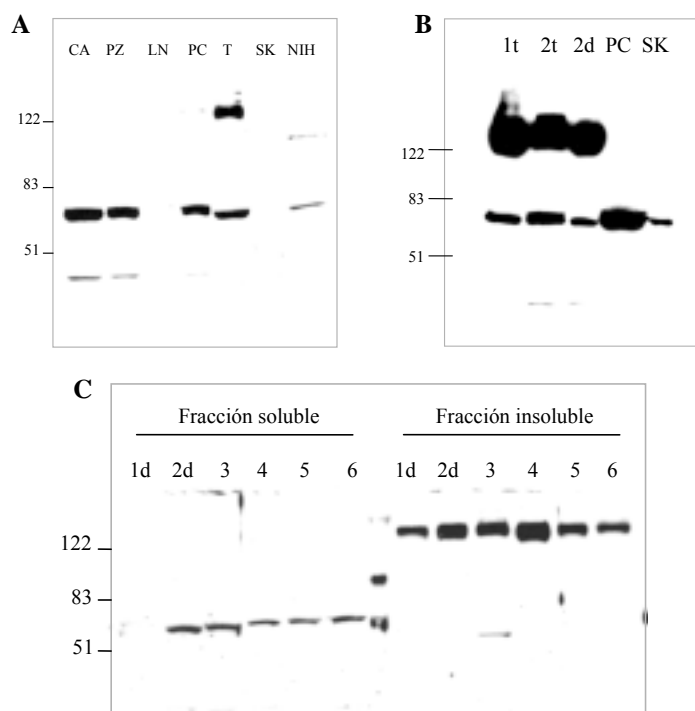


Figura 68. A) Western blot realizado con el suero inmune, de lisados totales que provienen de las líneas de próstata CAHPV18 (CA), PZHPV7 (PZ), LNCaP (LN) y PC3 (PC), de la línea SKNSH (SK), de la línea de fibroblastos de ratón NIH3T3 (NIH) y de una muestra de tejido normal de próstata (T). B) Western blot de lisados que provienen de extracto proteico total de tres muestras de tejido (1t y 2t proceden de una próstata afectada por tumor y 2d de una próstata normal) y dos líneas celulares PC3 (PC) y SKNSH (SK).

C) Western blot sobre la fracción proteica soluble e insoluble de 6 muestras de tejido prostático. normal (1d, 2d); cáncer (3-6).

Los Western blots de las figuras B y C se han realizado con el anticuerpo de EMT purificado.

Nuestra primera hipótesis fue que el anticuerpo creado reconocía algo inespecífico, sin embargo, tras analizar la secuencia peptídica utilizada y realizar un análisis comparativo con el resto de secuencias contenidas en la base de datos, no se encontró ninguna proteína que pudiera corresponder a la reconocida por el anticuerpo anti EMT. Es posible que esta proteína de mayor peso molecular corresponda a alguna isoforma de EMT o a una modificación postraducciona. Por este motivo, aunque carezcamos de evidencias de esta inespecificidad, hasta que no conozcamos el significado de esta banda de mayor tamaño, no podemos proseguir con los estudios planteados de análisis inmunohistoquímicos de muestras prostáticas. Pese a ello, se realizaron una serie de pruebas que se presentan a continuación.

F) Localización celular por inmunohistoquímica. Distribución en tejido prostático.

Antes de purificar el anticuerpo por afinidad, se realizó un análisis sobre una batería de cortes histológicos de pacientes sometidos a prostatectomía radical y a adenomectomía. Pese al ruido de fondo que obtuvimos, se pudo comprobar claramente como la expresión aumentaba en algunos focos tumorales respecto a la zona aparentemente normal adyacente (Figura 69 B y C).

Encontramos marcaje de EMT en la mayoría de las glándulas tumorales y también en algunas glándulas aparentemente normales. Al igual que con PTOV1, el marcaje varía incluso dentro del mismo paciente y una vez más se vuelve a manifestar el carácter multifocal y heterogéneo del cáncer de próstata.

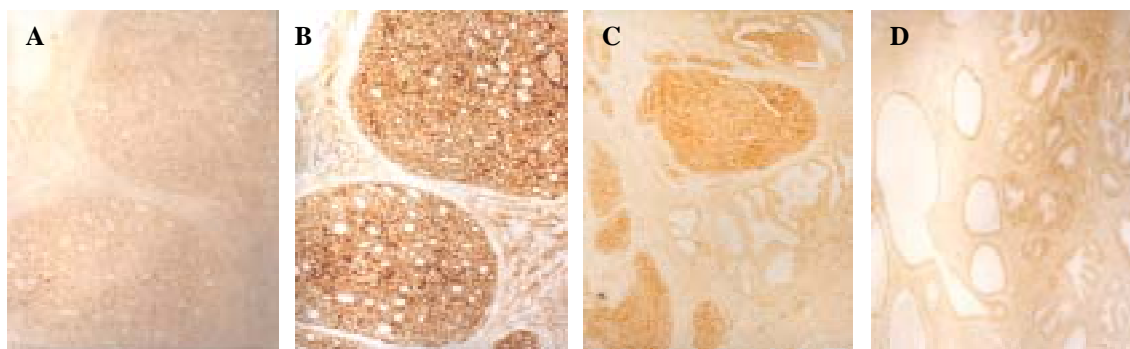


Figura 69. Estas imágenes corresponden a la técnica de inmunohistoquímica realizada con el suero inmune de EMT en muestras de cáncer de próstata (B y C) y de hiperplasia benigna de próstata (D). La figura A corresponde al control negativo realizado con el suero preinmune de EMT.

DISCUSIÓN

El cáncer de próstata es una de las neoplasias más ampliamente extendida en la población masculina. En esta última década es obvio el esfuerzo que se ha realizado en el conocimiento de la etiología y en la mejora de la detección precoz de esta patología. Sin embargo, también se ha hecho evidente la necesidad de profundizar en los aspectos genéticos y moleculares asociados a la transformación y progresión neoplásica de este órgano. Nuestro grupo también ha querido contribuir al conocimiento de estos eventos moleculares y, por este motivo, el objetivo de la tesis presentada es la búsqueda de nuevos genes asociados al fenotipo carcinomatoso prostático. Con este propósito, se analizó el patrón de expresión génica diferencial entre muestras prostáticas con fenotipo normal y tumoral mediante la técnica de *differential display*. El trabajo de esta tesis se ha centrado principalmente en el estudio de uno de los genes identificados por este método, PTOV1. PTOV1 corresponde a un gen nuevo que probablemente forme parte de una nueva familia de proteínas y que está sobreexpresado en la lesión de PIN y cáncer de próstata.

El gen PTOV1

Mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia, el gen PTOV1 ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 19. Este, pese a su corto tamaño, es uno de los cromosomas del cariotipo humano de mayor densidad génica. En él se han mapado un elevado número de genes que codifican para proteínas implicadas en la patogénesis de enfermedades humanas. Un ejemplo de estos genes cuyas mutaciones se han asociado directamente con enfermedades serían: LDL-R (Low density lipoprotein receptor) hipercolesterolemia familiar; INSR (Insulin receptor) diabetes méltus; EPOR (erythropoietin receptor) policitemia congénita familiar; DMPK (Myotonic dystrophy protein kinase) distrofia miotónica; Apolipoprotein E Alzheimer; HLF (factor de leucemia hepática) (Gilbert, 1997).

En estos dos últimos años han sido identificados y mapados en 19q, diversos genes implicados en la oncogénesis prostática. Algunos de ellos son genes nuevos como es el caso del gen PTOV1, hallado en nuestro laboratorio, que hemos encontrado sobreexpresado en muestras tumorales, tanto en regiones de PIN como de carcinoma y que probablemente esté implicado en algún mecanismo temprano de este desarrollo tumoral (Benedict y cols, 2001). PTOV1 se localiza concretamente en la región cromosómica 19q13.3-13.4, entre los marcadores de microsatélites D19S425 y D19S418. En esta región se localiza también la familia de las kallikreinas a la que pertenece el antígeno específico de próstata (PSA) (Yousef y cols, 2001b; Yousef y cols, 2000; Yousef y cols, 1999a, b; Stephenson y cols, 1999; Wei y cols, 1998; Riegman y cols, 1992; Schonk y cols, 1990; Riegman y cols, 1989; Sutherland y cols, 1988) (GeneMap, Unigene, NCBI). Al igual que PTOV1, la expresión de muchos

de estos genes está regulada por andrógenos (Yousef y cols, 2001a; Yousef y cols, 2001b; Schonk y cols, 1990). Al igual que el gen PSA, la región 5' de PTOV1 también contiene elementos de respuesta a hormonas, AREs (secuencia conservada de respuesta a glucocorticoides, progesterona y andrógenos). En posición -578 existe uno de estos elementos y en posición -709 una región de 35 bases, similar a las encontradas en la región 5' de PSA, que podría cooperar con la región ARE en el proceso de inducción por andrógenos (Cleutjens y cols, 1996). Ambas secuencias podrían explicar el aumento de la expresión génica de PTOV1 al tratar la línea celular LNCaP con andrógenos.

Según el análisis bioinformático de la secuencia del promotor de PTOV1, no parece existir ninguna región TATA ni CCAT características de las regiones de los promotores clásicos. La región 5' del gen PTOV1 presenta características comunes a los promotores de muchos genes *house keeping* y genes reguladores del crecimiento. Es una región rica en G+C que contiene potenciales secuencias de unión de los factores de transcripción Sp1 y AP-2. De hecho, al realizar un alineamiento entre las regiones promotoras del receptor del factor epidérmico (EGFR) y del oncogen c-K-ras, (ambos carecen de región *TATA box*) puede observarse la gran similitud que comparten (Yamamoto y Perucho, 1988).

La proteína PTOV1 consiste casi en su totalidad, en una duplicación en tándem de dos módulos de secuencias homólogas entre sí que se han conservado a lo largo de la evolución y que por tanto podría significar que PTOV1 es un gen de función importante para la célula.

Es interesante remarcar la presencia de un gen a 14.5 Kb de PTOV1 que codifica para otra putativa proteína que contiene una única copia del mismo módulo descrito previamente en PTOV1. La existencia de este gen se ha determinado por análisis de secuencias en el genoma, confirmada por comparación de ESTs y por RT-PCR. Por este motivo se le ha denominado PTOV2. No se ha realizado ningún estudio de sus niveles de expresión en cáncer de próstata. Por el momento, hemos comprobado que se expresa en próstata y en cerebro.

hemos observados que existe una muy lejana similitud entre el primer módulo de PTOV1 en *Drosophila melanogaster* con beta-tubulina. No obstante, tanto PTOV1 como sus homólogos en la mosca y ratón, carecen de las características esenciales para la función de las tubulinas.

Concluyendo, la naturaleza modular de los motivos de PTOV1 ha sido deducida por: (1) su presencia como un dominio duplicado dispuesto en tándem en humanos, ratón y mosca; (2) la presencia de un único bloque PTOV como parte de otra proteína predicha en humanos y en *Drosophila*, PTOV2. Por tanto, a pesar de la falta de información estructural y funcional del módulo PTOV, las características de su promotor podrían sugerir que se trata de un gen implicado en la regulación del crecimiento y conservado a lo largo de la evolución. La presencia del módulo PTOV como un elemento modular en distintas proteínas podría indicar su posible implicación en nuevas formas de interacción entre proteínas.

Significación patológica de la sobreexpresión de PTOV1

En tejido normal, la expresión de PTOV1 se detecta por Northern blotting mayoritariamente en cerebro, corazón, músculo esquelético y riñón. Los niveles de expresión en el tejido prostático normal son prácticamente indetectables. Esta distribución variable dependiente de tejido sugiere que PTOV1 podría tener un papel específico de tejido y de tipo celular. Los niveles de expresión de PTOV1 en muestras prostáticas tumorales son significativamente superiores a los detectados en muestras prostáticas normales. Este patrón de expresión génica diferencial ha sido comprobado mediante RT-PCR semicuantitativa, inmunohistoquímica y Western blot.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica se ha observado un aumento en los niveles de expresión de PTOV1 también en las zonas de PIN. Este hecho sugiere que tal vez la función de PTOV1 esté asociada a las primeras etapas de inicio y desarrollo del carcinoma prostático. Aunque existe una cierta variabilidad de expresión de PTOV1 en los diferentes focos tumorales de una misma muestra, la sobreexpresión de PTOV1 se observa en la mayoría de las glándulas transformadas y, según la cuantificación densitométrica realizada a partir de experimentos de Western blotting, este incremento en la expresión de PTOV1 sería del orden de 5 a 10 veces superior al detectado en las glándulas prostáticas normales. Por el momento no sabemos si este aumento en la expresión de PTOV1 tiene una relación causal con la biología tumoral de próstata o es simplemente un fenómeno paralelo no relacionado con el proceso de transformación neoplásica. Tampoco se ha podido establecer ninguna relación entre los niveles de expresión de PTOV1 y el grado de diferenciación del tumor, estadiaje clínico y/o los niveles de PSA.

Sin embargo, sí que hemos aportado una serie de evidencias sugestivas de un papel activo de PTOV1 en relación con la entrada de las células prostáticas en proliferación. Las muestras en las que se detecta una expresión mayor de PTOV1 coinciden con las muestras que presentan un mayor número de células positivas para Ki67 y que de hecho corresponden a las glándulas prostáticas afectadas por CP. Este resultado sugiere la existencia de algún factor o mecanismo activado durante el proceso de transformación celular que está induciendo la sobreexpresión de PTOV1.

Una observación adicional es la variación en la localización subcelular de PTOV1 en los casos en los que se encuentra sobreexpresado. Durante el proceso de progresión tumoral, desde la lesión inicial de PIN hasta el carcinoma prostático, no sólo existe una inducción de los niveles de expresión de PTOV1 asociados a un aumento del índice de proliferación sino que también se puede observar un cambio de localización de PTOV1 hacia el compartimento nuclear. Esta asociación entre los niveles de expresión, el índice de proliferación y la localización nuclear recuerda el comportamiento durante el desarrollo tumoral, de otras proteínas ampliamente estudiadas, como es el caso de la proteína beta-catenina.

La proteína beta-catenina ha sido implicada en varias funciones celulares, como son la adhesión celular, mediando la unión de las proteínas E-cadherina y α -catenina al citoesqueleto de actina, y la

vía de señalización Wingless/Wnt durante el desarrollo embrionario. La activación de esta vía da lugar a la acumulación de beta-catenina en el núcleo, donde esta activa la transcripción de otros genes. En ausencia de señal Wnt, la proteína beta-catenina es fosforilada en los residuos de serina y threonina de su extremo N-terminal por las proteínas quinasa glicógeno sintasa (GSK-3 β), axina y por la proteína APC y consecuentemente es degradada por el sistema proteasómico de ubiquitinización. La acumulación anormal de la beta-catenina es característica de varios tipos de cáncer y puede ser debida a mutaciones en la proteína APC, que regula la degradación de beta-catenina, o a mutaciones en beta-catenina. Estas se traducen en un aumento de la estabilidad de la proteína beta-catenina y en consecuencia, en una activación anormal de la vía Wnt que se traduce en la activación de la transcripción de una serie de genes diana como la ciclina D1 (Morin PJ, 1999; Tetsu O, 1999). Se ha observado que existe una correlación entre la localización nuclear de beta-catenina y el índice de proliferación Ki67 (Nhieu y cols, 1999; Garcia-Rostan y cols, 1999).

Esta similitud entre el comportamiento de beta-catenina y PTOV1 en el proceso tumoral podría servirnos de orientación a la hora de estudiar los posibles mecanismos que inducen su aumento de expresión génica y translocación hacia núcleo. La correlación que existe entre la translocación a núcleo de PTOV1 y el aumento de la proliferación celular podría sugerir que PTOV1 participa en algunos de los mecanismos reguladores del ciclo celular. La posible implicación de PTOV1 en la regulación del ciclo celular se apoya en el resultado del experimento de transfección de la proteína de fusión GFP / PTOV1 en las líneas celulares de próstata. Como consecuencia del aumento de PTOV1 debido a la transfección de la proteína de fusión, aumenta la población celular en fase S. Complementario a este resultado, existe una clara translocación de PTOV1 desde el compartimento citoplasmático hacia el nuclear como respuesta a la inducción de la proliferación celular de la línea celular PC3.

Además de en las glándulas epiteliales transformadas, también hemos detectados niveles bastante altos de expresión de PTOV1 en otros tres tipos celulares, las células endoteliales y eritrocitos de los vasos sanguíneos y probablemente (por su patrón de frecuencia y localización) células neuroendocrinas. Desconocemos el significado y la posible función de PTOV1 en las células endoteliales y eritrocitos. No hemos encontrado ninguna diferencia entre los niveles detectados en los vasos localizados en las muestras tumorales y en las muestras normales. El hecho de que PTOV1 esté presente en ambos tipos celulares quiere decir que juega un papel en determinados mecanismos celulares fisiológicos. Casi todos los tejidos dependen del suministro de sangre y el aporte sanguíneo depende de las células endoteliales. Estas células crean un sistema de sostén vital adaptable, ramificándose hasta llegar a las más recónditas regiones del cuerpo, manteniendo siempre la capacidad de división celular y de movimiento, que son requisitos indispensables a la hora de reemplazar las zonas de los vasos dañadas. Cuando existe una lesión en la pared vascular, las células endoteliales más próximas proliferan y migran hacia la zona dañada para recubrirla de nuevo. Esta misma propiedad es

la responsable del proceso de angiogénesis durante el desarrollo embrionario y durante la progresión tumoral.

En una de las muestras analizadas por inmunohistoquímica, hemos encontrado niveles altos de expresión de PTOV1 en una serie de células individuales cuya morfología celular así como el patrón de frecuencia y localización que presentan, sugieren que podría tratarse de células neuroendocrinas. En esta muestra, el tumor era moderadamente diferenciado (Gleason 7) y presentaba invasión capsular y márgenes quirúrgicos positivos. Las glándulas de esta muestra, en las que hemos detectado PTOV1, también contienen un importante número de células positivas para el marcador de células neuroendocrinas cromogranina A. Sin embargo, no podemos asegurar esta identidad ya que no hemos realizado ningún ensayo de colocalización entre cromogranina A y PTOV1 que lo corrobore.

Además de las células basales y epiteliales con actividad exocrina, en las glándulas epiteliales prostáticas existe otra variedad de célula epitelial conocida como células endocrino-paracrinas o células neuroendocrinas. Corresponden a la fracción minoritaria de la población epitelial. La base de la célula neuroendocrina se apoya sobre la capa de células basales y tiene la capacidad de contactar con varias células a la vez e incluso de expandirse hacia la luz de la glándula gracias a unas prolongaciones a modo de dendritas. Tienen un aspecto piramidal y su número varía dependiendo de la glándula (di Sant'Agnese, 1992b).

Un hecho bastante interesante es la capacidad que tienen las células epiteliales prostáticas de diferenciarse, bajo determinadas condiciones, en células neuroendocrinas. Existe una serie de trabajos realizados en los que se ha observado que un aumento de las concentraciones intracelulares de AMPc, a través del tratamiento con agentes fisiológicos (epinefrina, forskolina, isoproterenol, AMPc dibutirilo) puede modular la diferenciación neuroendocrina de las células prostáticas epiteliales LNCaP, sugiriendo así, que en etapas avanzadas del cáncer de próstata, las células epiteliales son todavía capaces de diferenciarse (Cox y cols, 1999). De hecho, existe diferenciación neuroendocrina en etapas avanzadas del cáncer de próstata y es un indicador de que el tumor ha adquirido un fenotipo más agresivo, resistente a andrógenos (di Sant'Agnese, 1992a).

Cambio de localización subcelular de PTOV1

Es evidente la correlación que existe entre el aumento del índice de proliferación del tumor, el incremento de los niveles de expresión génica de PTOV1 y su cambio de localización subcelular. Sin embargo, en la línea celular PC3, esta translocación hacia núcleo no se ha visto acompañada por un aumento en los niveles de expresión de PTOV1. Tal vez la explicación sea que los niveles de expresión de PTOV1 en esta línea tumoral ya son altos o por otro lado, que esta línea carezca del/os mecanismo/s implicados en la activación transcripcional de genes como por ejemplo, PTOV1, cuya activación depende del receptor de andrógenos. Independientemente de los niveles de expresión, es obvia la translocación hacia núcleo de PTOV1 durante la transición desde la quiescencia hacia el ciclo

celular. Desde que obtuvimos los resultados de inducción de proliferación mediante la transfección de PTOV1 en las líneas de próstata PC3 y PZHPV7, sabemos que esta translocación de PTOV1 no es sólo una respuesta al tratamiento con suero sino que PTOV1 está realizando alguna función en este compartimento celular que viene acompañada por la entrada en fase S de las células prostáticas. PTOV1 podría estar realizando una función similar a la de otras proteínas descritas previamente. Por ejemplo, el proto-oncogen ras estimula la entrada en fase S del ciclo celular mediante la regulación de las ciclinas. Su expresión se ha asociado sobretodo con un aumento de la ciclina D1 (Winston y cols, 1996). También, la translocación a núcleo de la proteína beta-catenina ha sido asociada con un aumento del índice de proliferación y se postula que estaría actuando como factor de transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular como la ciclina D1 (Saito y col , 2001).

Tras estimular las células PC3 con suero, PTOV1 puede detectarse también en otros dos compartimentos celulares: en estructuras que recuerdan al aparato de Golgi y en algunos puntos de la membrana plasmática, cuya morfología sugiere que se trata de células en movimiento. Este resultado podría indicar que PTOV1 también está asociado o relacionado con algunos de los mecanismos que promueven la migración celular. Concretamente en esta última línea (PC-3) es donde hemos observado la localización de PTOV1 en membrana de células probablemente en movimiento y por este motivo, PTOV1 podría estar asociado al proceso de invasión de las células tumorales prostáticas. La línea celular PC3, a diferencia de PZHPV7, no expresa la proteína E-cadherina y esta podría ser una de las razones por las que el fenotipo invasivo de PC3 es mucho más agresivo (Davies y cols, 2000). A raíz de esto, podríamos elucubrar que la asociación de PTOV1 a proliferación y migración celular, podría guardar relación con la localización de PTOV1 en las células endoteliales y sugerir la participación de PTOV1 en la invasión y proliferación llevada a cabo por estas células.

En la línea tumoral PZHPV7, apenas detectamos expresión de PTOV1 en el compartimento citoplasmático. El cambio sucede únicamente entre dos compartimentos, el nuclear y la zona perinuclear. Durante la mitosis, PTOV1 entra en el compartimento nuclear, con exclusión de los cromosomas. Según se detalla en el apartado de resultados, el marcaje de PTOV1 puede visualizarse con mayor intensidad en los dos polos organizadores de microtúbulos. Durante la metafase-anafase, PTOV1 se detecta en toda la superficie de la célula debido a la desintegración de la membrana nuclear. Sin embargo, cuando la membrana nuclear empieza a formarse de nuevo durante la telofase, PTOV1 queda excluido del citoplasma, concentrándose en núcleo. Estas diferencias de localización entre ambas líneas celulares prostáticas podrían deberse al fenotipo que presentan. La línea celular PZHPV7 presenta un fenotipo mínimamente invasivo, a diferencia de la línea celular PC3, que es altamente invasiva.

Interacciones de PTOV1 con proteínas conocidas

Con el fin de conocer más detalladamente la función o funciones celulares y bioquímicas de PTOV1, se usó la técnica del doble híbrido en levadura. Se utilizó la secuencia entera de PTOV1 como cebo para rastrear interacciones con proteínas de una librería de cDNA de próstata. De las interacciones confirmadas podemos agrupar tres tipos de proteínas que interactúan con PTOV1: por un lado, proteínas cuyas funciones están directamente asociadas a transmisión de señales desde la membrana plasmática (RACK1, flotilina1, anexina 1); en segundo lugar, proteínas implicadas en el procesamiento de proteínas (subunidad $\beta 4$ del proteasoma, subunidad 5 del complejo de elongación proteico EIF3 y la proteína KIAA0804 que es una potencial ubiquitina ligasa) y finalmente, existe una proteína de función desconocida, BAT4.

Hemos centrado nuestros análisis en proteínas con alguna función bioquímica o celular conocida y para las que, al mismo tiempo, existan reactivos fácilmente accesibles. En este caso nuestros análisis se han extendido a tres proteínas: flotilina1, RACK1 y anexina 1. Antes de continuar con el análisis de los resultados obtenidos, se presenta un breve resumen de la información que por el momento conocemos sobre estas tres proteínas.

Flotilina1. Microdominios lipídicos ricos en esfingolípidos y colesterol.

La proteína flotilina1 (homólogo del antígeno de superficie celular ESA/flotilina2), fue aislada de los microdominios lipídicos de la membrana de los eritrocitos, conocidos por el nombre de *lipid rafts* (Salzer y Prohaska, 2001) que son ensanchamientos laterales de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos (Kasahara y Sanai, 1999; Kabouridis y cols, 2000). Estos microdominios lipídicos actúan como plataformas para receptores y componentes de las cascadas de transducción de señales, ya que su composición característica sirve para aumentar la estabilidad de los complejos proteicos y, de esta manera, incrementar el efecto de los niveles de señalización (Simons y Toomre, 2000). En los eritrocitos humanos, sus principales componentes son las proteínas estomatina, flotilina1 y flotilina2 y están parcialmente asociados a las proteínas del citoesqueleto espectrina, actina, banda 4.1 y banda 4.2 (Salzer y Prohaska, 2001). En estos dominios lipídicos se encuentran proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la superficie celular y miembros de la familia src-quinasa en la parte citoplasmática. Son resistentes a la solubilización por detergentes no iónicos y por tanto pueden ser aislados como DIGs (*detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains*). Pueden asociarse entre sí, formando estructuras más complejas y estables o también pueden formar parte de unas invaginaciones de membrana llamadas caveolas (Couet y cols, 2001). Las caveolas están presentes en todas las células, mayoritariamente en endotelio, células musculares y adipocitos (Smart y cols, 1999). De hecho, se ha postulado que para que se formen caveolas, serían necesarios dos requisitos previos, la existencia de microdominios lipídicos (*lipid rafts*) y la presencia de caveolina 1 (Harder y Simons, 1997). La estructura particular de los *lipid rafts* se mantiene gracias a

los GPI (glicosilfosfatidilinositol), que serían reguladores de la homeostasis del colesterol y de la proporción entre flotilina1 y caveolina. Cuando los niveles de GPI son bajos, las caveolinas podrían migrar hacia estos microdominios y constituir de esta manera las llamadas caveolas (invaginaciones de membrana) (Abrami y cols, 2001).

Aunque la distribución tisular de la expresión de caveolina 1 y flotilina1 es muy similar, los niveles de esta última son mucho más abundantes en cerebro. Se ha sugerido que en tejidos neuronales la flotilina1 estaría supliendo la acción de la caveolina (Bickel y cols, 1997).

Además de las proteínas unidas a GPI (Abrami y cols, 2001), en estos microdominios lipídicos podemos encontrar también otras proteínas implicadas en la transducción de señales como son PKC α , H-Ras (Prior y cols, 2001), Rap Src-like kinases (Liang y cols, 2001), G $\alpha\beta\gamma$ (Moffett y cols, 2000), y proteínas del citoesqueleto como anexina II, anexina XIII y actina (Oliferenko y cols, 1999; Lafont y cols, 1998). La anexina II parece ser la responsable del ensamblaje de los *rafts* lipídicos (Babiychuk, 2000).

La función de flotilina1 es desconocida. Se sabe que es una proteína de membrana asociada a los *rafts* lipídicos y que, pese a presentar una distribución tisular distinta a las caveolinas y flotilina-2, flotilinas y caveolinas pueden interactuar entre si y formar complejos hetero-oligoméricos más estables (Volonte y cols, 1999). La flotilina 1 ha sido implicada en procesos de transducción de la señal, tráfico de membrana y polarización celular (Lou y cols, 2000). Conjuntamente con la actina, las subunidades alfa y beta de las proteínas heterotriméricas y la bomba de protones V-ATPasa, las flotilinas son los principales constituyentes de estos microdominios lipídicos en la membrana de los fagosomas (Dermine y cols, 2001) y endosomas (Gagescu y cols, 2000). También se ha localizado en la fracción insoluble en Tritón X-100 del aparato de Golgi (Gkantiragas y cols, 2001), donde es el principal componente de estos microdominios junto a las subunidades α y β de la proteína G heterotrimérica, la proteína vacuolar ATPasa y la caveolina 1.

La importancia de flotilina1 en la modulación de señales originadas en la membrana ha sido demostrada recientemente con la observación de la interacción entre flotilina1 y la proteína llamada CAP, *cbl adaptor protein* o *c-Cbl-associated protein* (Baumann y cols, 2000; Bickel y cols, 1997; Czech, 2000). La molécula de insulina inicia su acción mediante la unión a su receptor tirosina quinasa y esto se traduce en la fosforilación de sus substratos intracelulares. Uno de estos substratos es la proteína del proto-oncogen Cbl. La interacción de Cbl con el receptor de Insulina requiere de su unión previa con la proteína adaptadora CAP. Tras la fosforilación de Cbl, el complejo CAP-Cbl se disocia del receptor de insulina y migra hacia la fracción insoluble en tritón donde CAP interactúa con flotilina1 a través de su dominio SoHo (*sorbin homology domain*). Por tanto flotilina1 podría estar regulando la función de Cbl a través del “secuestro” de CAP (Czech, 2000; Baumann y cols, 2000; Kimura y cols, 2001). Nos encontramos ante una nueva vía de señalización que regularía la acción de la insulina. Se ha observado que la interacción de CAP con flotilina1 es necesaria para la estimulación por insulina del transporte de glucosa. Flotilina1 interactuaría con aquellas proteínas portadoras del

dominio SoHo, y las dirigiría hacia los *lipid rafts*. Otra proteína portadora de este dominio de interacción es la vinexina α . Esta proteína participa en el proceso de polarización celular mediante la inducción de la formación de las fibras de actina (Kimura y cols, 2001).

Resumiendo, la flotilina1, uno de los componentes mayoritarios de los *lipid rafts*, estaría asociada a procesos de transporte proteico en aparato de Golgi y membrana plasmática, a polarización celular y a transducción de la señal. Por otro lado, su interacción con la proteína CAP sugiere una función reguladora de la actividad de algunas proteínas (por el momento lo único que se sabe es que podría estar regulando aquellas proteínas que contengan un dominio SoHo) impidiendo que actúen sobre sus proteínas diana y al mismo tiempo las dirigiría hacia estos dominios lipídicos. En este contexto, es posible que la interacción de flotilina1 con PTOV1 la dirija hacia estos microdominios lipídicos donde PTOV1 podría estar realizando alguna función relacionada con la polarización celular o por otro lado, flotilina1 podría estar regulando la actividad de PTOV1 sobre sus proteínas diana ya sea secuestrándola y manteniéndola lejos de sus proteínas diana o bloqueando el sitio de interacción de PTOV1 con otras proteínas.

Los últimos datos obtenidos en el laboratorio indican que la sobreexpresión de PTOV1 induce proliferación y está correlacionada con la localización nuclear de PTOV1. Si la función de flotilina1 está asociada al proceso de polarización celular y formación del citoesqueleto de actina podríamos pensar que su interacción con PTOV1 impediría su localización en núcleo y podría estar favoreciendo otras funciones celulares como por ejemplo, el proceso de migración celular versus al de proliferación.

RACK1

RACK1 (*guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1; receptor of activated protein kinase C*) pertenece a la familia de receptores de la proteína kinasa C activada, identificada y caracterizada por el grupo de Mochly-Rosen y col. (Ron y cols, 1994a; Mochly-Rosen y cols, 1995). Su secuencia es homóloga a la subunidad beta de las proteínas G heterotriméricas. Tanto *RACK1* como la subunidad $G\beta$ son miembros de una familia de proteínas reguladoras que comparten entre sí unidades repetitivas altamente conservadas que normalmente finalizan en Trp-Asp (repeticiones WD40). La mayoría de proteínas WD40, pese a realizar funciones diversas parecen ser proteínas reguladoras. A través de los dominios WD40 estas proteínas interactúan con proteínas portadoras de otros dominios como es el caso de la interacción con los dominios de pleckstrina presentes en proteínas de la familia Src (Tec-Src) o los dominios SH2 presentes en un amplio número de proteínas (Rodríguez y cols, 1999; Wang y cols, 1995; Usacheva y cols, 2001; Chang y cols, 2001; Rietzler y cols, 1998).

Las PKC son una familia de serina / threonina quinasas cuya actividad depende del fosfolípido diacilglicerol y en algunos casos del calcio. La activación de las PKCs está asociada a su translocación desde el citosol hacia la membrana o citoesqueleto (dependiendo de la PKC). Tras estimular con

ésteres de forbol o con hormonas, que incrementan la concentración intracelular de diacilglicerol, las PK clásicas se activan y, en consecuencia, se translocan hacia nuevos compartimentos celulares donde reconocen sustratos y realizan su función de fosforilación (Cloud-Heflin y cols, 1996). RACK1 interacciona con PKC β II una vez ésta ha sido activada (fosforilada). Según algunos investigadores, RACK1 no actúa como sustrato de PKC sino que lo haría a modo de proteína de anclaje o adaptador que facilitaría la acción de PKC sobre sus sustratos (Ron y cols, 1999). Sin embargo, otros autores han encontrado que la fosforilación de RACK1, mediada por PKC, es necesaria para su unión a c-src (Chang y cols, 2001).

Por el momento, las proteínas que interactúan con RACK 1 y que podrían indicarnos el tipo de función realizada por esta proteína, corresponden mayoritariamente a proteínas implicadas en la transducción de señal. RACK1 interacciona con proteínas portadoras de dominios SH2 y/o dominios de pleckstrina (Rodríguez y cols, 1999) como por ejemplo los dominios SH2 de PKC β II y Src quinasas (Chang y cols, 2001); la fosfodiesterasa específica de AMPc, PDE4D5 (Steele y cols, 2001; Yarwood y cols, 1999); la subunidad β 2 de las integrinas (Liliental y Chang, 1998; Schechtman y Mochly-Rosen, 2001); las GTPasas Ras y GAP (Koehler y Moran, 2001), la proteína STAT1 (*signal transducer and activator of transcription*) (Rietzler y cols, 1998; Usacheva y cols, 2001) y la subunidad beta de los receptores para GM-CSF, IL3 y IL5 (Geijsen y cols, 1999).

Por otro lado, RACK1 podría también estar implicado en la regulación del ciclo celular. El homólogo de RACK1 en levaduras es Cpc2. Cpc2 interacciona con Ran1 y actúa como antagonista de la función Ran1/Pat1 en la regulación del ciclo celular (una disminución de los niveles de Ran origina la entrada en meiosis de la célula). La regulación de la función de Ran1 en el ciclo celular no vendría mediada por una alteración de su actividad quinasa sino que RACK1 (cpc2) lo que haría sería influir en su localización subcelular (McLeod y cols, 2000). RACK1 podría estar también implicado en el transporte por exocitosis de vesículas sinápticas mediante la interacción con la proteína sinaptotagmina p65, implicada en la exocitosis sináptica. La función de esta proteína se regula mediante fosforilación llevada a cabo por la proteína casein quinasa (Bennett y cols, 1993).

Por lo tanto, RACK1 podría funcionar como una proteína de anclaje que participaría en la transducción de señales facilitando la interacción entre sustratos y receptores y modificando la función de estos a través del cambio de localización entre los compartimentos subcelulares o mediante el bloqueo de las regiones de unión de estos, a sus proteínas diana. La interacción de RACK1 con otras proteínas descritas sugieren también su participación en procesos como la adhesión celular, el transporte de vesículas y la regulación de la meiosis.

Ante este abanico de posibilidades, el papel de la asociación de PTOV1 en este contexto no es clara. Tal vez RACK1 está actuando como una proteína adaptadora cuya función es facilitar la interacción de PTOV1 con otras proteínas como podría ser el caso de PKC ya que por predicción teórica hemos visto que PTOV1 es una proteína fosforilada mayoritariamente en serinas. Por otro lado

RACK1 podría también estar dirigiendo a PTOV1 hacia determinados compartimentos celulares como podría ser el caso de membrana plasmática donde tal vez PTOV1 podría interactuar con proteínas portadoras del dominio SH3 (ya que PTOV1 presenta una secuencia de prolinas PXXP que podría estar interactuando con estos dominios).

Anexina 1

La anexina 1 (lipocortina I, calpactina II) es una proteína de 38 kDa que forma parte de la familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio (Raynal y Pollard, 1994). Los miembros de esta familia comparten un mismo dominio central pero cada uno de ellos tiene una cola N-terminal diferente que le confiere su especificidad. La fosforilación de esta región tanto por serina como por tirosina quinasas (Varticovsky y cols, 1988), regularía la función de anexina 1 (Mollenhauer y cols, 1997; Pepinsky y cols, 1988). Dicha proteína es fosforilada en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y se postula que está implicada en la transducción de señales mitogénicas (Schlaepfer y Haigler, 1990; Raynal y cols, 1992). La anexina 1 ha sido implicada en la regulación de la agregación de las vesículas fosfolipídicas durante la respuesta inflamatoria y en la inhibición de la respuesta de la fosfolipasa A2 (Kim y cols, 2001a; Kim y cols, 2001b; Kim y cols, 1994). También se ha observado que la proteína de 10 kDa S100C modula su actividad mediante su unión a los 13 residuos del extremo N-terminal, al igual que sucede con el complejo anexina2/p11 (Naka y cols, 1994; Seemann y cols, 1996; Mailliard y cols, 1996).

A diferencia de las anexinas 2 y 4, los niveles de las anexinas 1 y 5 varían dependiendo del estado proliferativo de la célula. Los niveles de anexina 1 se correlacionan positivamente con la proliferación celular (Skouteris GG, 1996) y con la agregación de vesículas (de la Fuente M, 1995; Lambert O, 1997). Esta última función de la anexina 1 puede ser inhibida mediante fosforilación por la PKC. Se ha observado que la proteína anexina 5 actuaría como regulador de la fosforilación de la anexina 1 por PKC bien, interactuando con anexina 1 y reteniéndola en membrana (Raynal y cols, 1993) o bien interactuando directamente con la proteína PKC impidiendo así la interacción física y consiguiente fosforilación de anexina 1 (Dubois y cols, 1998; Haigler y cols, 1987; Schlaepfer y Haigler, 1987; Ando y cols, 1989). Actualmente existen evidencias de la implicación de anexina 1 en muchas de las acciones de los glucocorticoides, inhibición del crecimiento celular, respuesta anti-inflamatoria, diferenciación celular y regulación del eje hipotálamo-pituitario (Flower, 1988; Flower y Rothwell, 1994; Buckingham, 1996). Su unión a fosfolípidos de manera calcio dependiente puede darse tanto en el interior como en el exterior de la célula (Raynal y Pollard, 1994; Christian y cols, 1996) y parece ser que su secreción se da como respuesta a los glucocorticoides (Croxtall y Flower, 1992; Solito y cols, 1991; Taylor y cols, 1993). Sin embargo, anexina 1 carece de una secuencia señal hidrofóbica (Wallner y cols, 1986) y no ha sido asociada a ningún tipo de vía de secreción vesicular clásica. En 1990, Haigler y col. observaron que los niveles de anexina 1, 4 y 5 en la próstata eran bastante elevados y que sin embargo, de estas tres únicamente la anexina 1 y 5 eran secretadas al

exterior celular. Debido a esta diferencia de secreción, proponen la próstata como tejido para el estudio de las vías implicadas en la exocitosis de la anexina 1, y sugieren que debe tratarse de un mecanismo de transporte específico para estas proteínas (Haigler y Christmas, 1991). Es más, el intervalo de tiempo entre la síntesis de anexina 1 y su secreción es inferior al esperado en condiciones normales. Todo esto apunta a la existencia de un mecanismo específico de transporte que por el momento es desconocido. Recientemente a partir de un estudio realizado por Paweletz y col (2000) se ha evidenciado la estrecha correlación que existe entre la pérdida de expresión de anexina 1 y la incidencia de carcinoma temprano en esófago y próstata. Traverso y col. (1998) realizaron un estudio metódico de la localización celular de anexina 1 y de su asociación a membrana plasmática. Lo que deducen es que anexina 1, además de unirse a los fosfolípidos de membrana también se encontraría unida a proteínas del citoesqueleto que han quedado atrapadas en la fracción proteica del pellet de membrana, las cuales pueden posteriormente solubilizarse con Tritón X-100 (tubulina y citoqueratina 8).

Resumiendo, anexina 1 puede realizar diversas funciones dependiendo de su estado de fosforilación. La anexina 5 se une a la anexina 1 y de esta manera impide su fosforilación por PKC. La forma no fosforilada de anexina 1 está implicada en la agregación de vesículas. La anexina 5 también participa en esta agregación de vesículas, por lo tanto tal vez estén formando un complejo que, por un lado impide la fosforilación por PKC y por otro está asociado a la agregación de vesículas. La anexina 1 fosforilada participa en la regulación de la vía de señalización ERK (Alldridge, 1999). Esta última función viene determinada por su interacción con la proteína adaptadora Grb2 y es en este punto donde tal vez PTOV1 esté interviniendo. PTOV1 también tiene una potencial secuencia de interacción con Grb2 y al mismo tiempo podría ser que reconociera también a anexina 1 a través de su región rica en prolinas (PxxxPxP). Podríamos entonces pensar en una posible función reguladora de PTOV1 sobre la interacción de anexina 1 con Grb2. PTOV1 podría estar facilitando o impidiendo la interacción entre anexina 1 y Grb2. Referente a este aspecto, es importante recordar que PTOV1 es un inductor de la proliferación mientras que anexina 1 un inhibidor de la misma.

De todas maneras, poco podemos decir sobre estas interacciones ya que, por el momento, sólo han sido comprobadas mediante la técnica del doble híbrido y para demostrar definitivamente que interaccionan sería necesario algún ensayo de co-inmunoprecipitación, transcripción-traducción in vitro y colocalización. Hemos realizado estos últimos ensayos mediante las técnicas de inmunocitoquímica y gradiente de densidad.

En el caso de la proteína RACK1, es interesante resaltar que su distribución celular cambia tras tratar la línea celular tumoral de próstata PC3 con PMA. El tratamiento con ésteres de forbol aumenta los niveles intracelulares del mensajero secundario diacilglicerol (DAG) y este desencadena una serie

de vías que conllevan al cambio de localización de moléculas, entre ellas RACK1, hacia membrana plasmática. Debido a que en experimentos previos observamos que PTOV1 se localizaba también en membrana plasmática, decidimos comprobar si este cambio estaba asociado también al cambio de localización subcelular de RACK1 tras tratar las células con PMA. Este experimento se realizó tras comprobar que en las células quiescentes, la localización citoplasmática de PTOV1 no coincidía con la de RACK1. Entonces se pensó que tal vez la colocalización entre RACK1 y PTOV1 se daba bajo determinadas condiciones como es el caso del tratamiento con PMA. En este experimento se ha observado que PTOV1 también estaría asociado a alguna de estas vías activadas por DAG, ya que también migra a membrana (y a núcleo) y concretamente se concentra en aquellos puntos donde lo hace RACK1. Lo que no sabemos es si esta migración a membrana de PTOV1 se debe a su interacción con RACK1 (entonces RACK1 actuaría como proteína adaptadora que dirigiría a PTOV1 hacia el compartimento de membrana) o se debe a otro motivo y que ya en membrana, ambas proteínas interaccionaran entre sí.

Se sabe que el tratamiento de las células con PMA promueve la adhesión celular dependiente de integrinas. Durante este proceso, RACK1 interacciona con la subunidad beta del dominio citoplasmático de las integrinas (Liliental y Chang, 1998) y su presencia se ha asociado a un aumento del número de fibras de actina y de contactos focales (Buensuceso y cols, 2001). En uno de nuestros experimentos (Figura 60), PTOV1 y RACK1 colocalizan en la única protusión presente en una célula. Esta protusión recuerda a los filipodios que se forman en el proceso de polarización durante la migración celular. La célula, durante el proceso de migración, emite un filipodio principal mediante el cual se ancla a la superficie y una vez anclado, se mueve hacia este punto de anclaje. Los microdominios lipídicos son esenciales a la hora de promover la polarización celular necesaria en el proceso de migración y han sido propuestos como las plataformas lipídicas en las que se concentrarían una selección de proteínas de superficie celular responsables de esta polarización. (Gomez-Mouton y cols, 2001; Manes y cols, 2001; Manes y cols, 2000). Podríamos especular sobre este resultado y pensar que tal vez este filipodio corresponde al frente de avance o *leading edge*.

Una prueba indirecta de la interacción entre PTOV1 y flotilina1 es la copurificación en la fracción proteica insoluble en tritón, en los llamados DIGs (detergent- insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains). La obtención de esta fracción se realizó por gradiente de sacarosa según el protocolo modificado de Brown and Rose (1992). Según este protocolo, los rafts lipídicos migran hacia la fracción del 10-20% de sacarosa. Efectivamente, en esta fracción encontramos PTOV1, anexina 1, flotilina1 y caveolina 1. El hecho de que caveolina 1, a diferencia del resto de proteínas, se localice también en otras fracciones, sugiere que probablemente PTOV1 interaccione con flotilina1 y podríamos suponer que la localización de PTOV1 en esta fracción lipídica depende de la existencia previa de flotilina1 y no de caveolina. Este mismo ensayo de gradiente de densidad se realizó sobre células tratadas con PMA. Se realizó este experimento con el fin de ver si RACK1 migraba a la región

de membrana correspondiente a los *rafts* lipídicos. Sin embargo, no hemos podido detectar RACK1 en esta fracción proteica y tampoco hemos observado diferencias en el resto de proteínas analizadas. A pesar de estas observaciones, existen evidencias en la literatura de la localización de RACK1 en esta fracción como es el caso de la localización de RACK1 en la fracción insoluble en tritón X-100 del corazón de rata neonatal (Mochly-Rosen y cols, 1991; Robles-Flores y Garcia-Sainz, 1993) y en hepatocitos de rata (Robles-Flores y cols, 1997; Robles-Flores y Garcia-Sainz, 1993). Otras evidencias que sugieren la localización transitoria de RACK1 en estos microdominios lipídicos son su interacción con proteínas que sí que se encuentran en estos como PKC, Src, así como otras proteínas portadoras del dominio PH (pleckstrina) (Chamorro y cols, 2001; Rodriguez y cols, 1999).

En cuanto a la proteína anexina 1, sus niveles de expresión en la línea celular PC3 son muy bajos sin embargo, al realizar el gradiente de densidad detectamos anexina 1 en la misma fracción proteica que flotilina1 y PTOV1. La diferencia en los niveles detectados de anexina 1 entre el lisado proteico total y la fracción proteica insoluble en tritón X-100 indica que su localización se concentra en esta fracción y que por lo tanto su función en la línea celular PC3 también estaría vinculada a estos microdominios lipídicos. Aunque no existe ningún trabajo publicado sobre la localización de anexina 1 en los *rafts* lipídicos, el resultado obtenido podía esperarse ya que existe un gran número de anexinas que se localizan en estos microdominios, de hecho sabemos que la anexina 5, que interacciona con los glicerofosfolípidos de los *lipid rafts*, interacciona con anexina 1 y de esta manera inhibe su fosforilación por PKC.

Una observación adicional es la detección de flotilina1 (con un tamaño ligeramente menor) en la fracción proteica insoluble del botón celular. Volonté D y col (1999) fueron los primeros en generar y probar el anticuerpo anti flotilina1 sobre una batería de tejidos. Observaron que en la muestra de corazón se detectaba una banda de menor tamaño. Ellos sugieren que podría tratarse de alguna forma originada por un *splicing* alternativo de la flotilina1. Otra posible explicación sería que la forma de mayor tamaño es la detectada en la fracción insoluble en tritón X-100 y que por tanto corresponde a la forma localizada en los *lipid rafts*. Flotilina1 podría estar siendo fosforilada por alguna de las quinasas localizadas también en esta fracción proteica celular y esta fosforilación sería la responsable del tamaño ligeramente superior.

En los experimentos adicionales de copurificación de proteínas por gradiente de densidad se realizó una cinética de inducción con IGF-1. RACK1 sigue detectándose únicamente en la fracción correspondiente al botón insoluble. En cambio, flotilina1 sí que parece variar en su asociación con los DIGs, a lo largo de los distintos tiempos de incubación con IGF-1. Flotilina1 es detectada tanto en la fracción del botón celular insoluble como en la fracción flotante insoluble en tritón. De nuevo, puede observarse la diferencia de tamaño de flotilina1 que existe entre ambas fracciones. Los niveles de flotilina1 en el botón insoluble celular se mantienen constantes a lo largo del tratamiento. Por el contrario, los niveles de flotilina1 en la fracción flotante insoluble en tritón tienden a disminuir llegando a niveles apenas detectar a los 10 minutos de incubación con IGF-1 para subir de nuevo,

hasta alcanzar niveles similares al tiempo 0, a la media hora de incubación. Por su parte, PTOV1 también varía en su asociación con las distintas fracciones. PTOV1 es detectado en el botón insoluble celular únicamente a los 10 minutos de incubación que, curiosamente, coincide con la desaparición de flotilina1 de la fracción flotante insoluble en tritón. Esta observación sería coherente con la hipótesis formulada anteriormente. Flotilina1 podría estar reteniendo a PTOV1 en el compartimento de membrana y de esta manera podría estar regulando la función de PTOV1 en la proliferación celular.

Otro aspecto importante de los resultados obtenidos mediante la técnica del doble híbrido es la interacción de PTOV1 con una secuencia rica en prolinas. Nuestra observación inicial se basa en una interacción artefactual. No obstante, esta interacción es bastante interesante porque nos proporciona información adicional sobre alguna de las propiedades de las proteínas que potencialmente interaccionan con PTOV1. Comparando esta interacción proteica con el resto de positivos se ha deducido una secuencia de prolinas (PXXXXPXXXXPXP) como supuesta región de reconocimiento que se encuentra también en BAT4, EIF3 y anexina 1. Podríamos elucubrar que PTOV1 reconocería e interaccionaría con proteínas portadoras de esta región y al mismo tiempo sería reconocida por otras proteínas como RACK1 o flotilina1. Si esto fuera cierto, sería interesante conocer si existen otras proteínas portadoras de esta secuencia de prolinas. Por este motivo realizamos una búsqueda en la base de datos de proteínas y el resultado fue bastante interesante porque, además de otras proteínas de la familia de las anexinas (anexina 6, 11...), de la familia de los factores de iniciación de la traducción EIF y de la familia de los BAT, encontramos: ciclina P57, FAK, c-cbl, secuencias de unión a los dominios SH3 de Src, todos ellos portadores de secuencias de prolina con la mencionada pauta. Será importante comprobar la existencia de interacciones entre PTOV1 y estas proteínas, así como con péptidos sintéticos adecuados.

El gen EMT (Transportador Extraneuronal de Monoaminas)

El segundo gen encontrado en nuestro análisis por *differential display*, *EMT*, a diferencia de PTOV1, a pesar de su novedad inicial, ya ha sido ampliamente estudiado por otros. Fue descrito en 1998 por Gründemann y cols, que obtuvieron la secuencia de cDNA entera de EMT a partir de una PCR con primers degenerados específicos de motivos de la familia ASF (*amphiphilic solute facilitators*). El gen fue aislado de la línea celular tumoral de riñón Caki-1 de la que ya se sabía que presentaba el transporte extraneuronal de noradrenalina. El cDNA mide 3.4 Kb y mediante la técnica de RT-PCR han detectado expresión en hígado, cerebro y corazón. *EMT* se encuentra en el cromosoma 6q27 (Gründemann y cols, 1998). EMT es un miembro nuevo de la familia de transportadores ASF, consiste en 556 aminoácidos con 12 segmentos transmembrana. Es similar a los

transportadores renales OCT y OAT. Transporta principalmente adrenalina y noradrenalina. En 1994 se iniciaron una serie de experimentos que definieron una nueva función de EMT como transportador del análogo de la cloroetilnitrosourea, 2-cloroetil-3-sarcosil-1-nitrosourea (SarCNU). Las nitrosoureas (BCNU y CCNU) son ampliamente utilizadas en el tratamiento de tumores cerebrales (gliomas), no son ionizadas y son relativamente solubles, de manera que pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, su elevada toxicidad, sobretodo en combinación con radioterapia, presenta problemas relacionados con la supervivencia de la mayoría de pacientes. Como resultado de la búsqueda de nuevos agentes que presentaran una elevada actividad antitumoral pero al mismo tiempo, baja toxicidad, se propuso el análogo de CNU, SarCNU (contiene en el interior de su estructura, el aminoácido amida, sarcosinamida).

Todos los CNUs clínicamente testados entran en las células tumorales mediante difusión pasiva. SarCNU es el único que, gracias a la presencia del residuo de sarcosinamida, entra en la célula a través del transportador extraneuronal de monoaminas (Nöe y cols, 1996; Marcantonio y cols, 1997; Chen y cols, 1999a, b). Actualmente, todos los ensayos clínicos que se están llevando a cabo se encuentran en fase I y contemplan únicamente neoplasias cerebrales (Chen y cols, 2001a, b; Chen y cols, 1999a, b). Todos estos datos confieren un gran interés a la detección de la expresión de EMT, así como a la generación de anticuerpos específicos.

La expresión de EMT en cáncer de próstata es bastante heterogénea, como se puede observar en el caso del análisis de tres focos tumorales del mismo. Según nuestros resultados, mediante la técnica de Northern blot en situación normal la expresión de EMT se detecta mayoritariamente en hígado, placenta, pulmón, músculo liso, corazón y riñón. Es bastante interesante el haber encontrado también expresión de EMT en próstata y más aún que esta expresión aumente en la patología prostática tumoral. Por este motivo, se decidió comparar los niveles de EMT entre la zona periférica y de transición de las próstatas normales con el fin de profundizar un poco más en la distribución de EMT entre las principales áreas que originan los dos fenotipos patológicos más relevantes del órgano prostático, el cáncer de próstata y la hiperplasia benigna. De los tres donantes analizados, dos de ellos presentaban niveles similares, más bajos en la zona periférica (0.5) y el doble en la de transición (1.0). El tercer donante, un consumidor asiduo de cocaína, presentó niveles de EMT tres veces superiores en la zona periférica y dos veces superiores en la de transición en comparación con los otros dos donantes. Se ha observado que existen drogas como las anfetaminas y la cocaína que afectan a la expresión de EMT (Fleckenstein y cols, 2000) y este hecho podría explicar los niveles altos observados en el tercer donante.

Con el anticuerpo policlonal purificado se realizaron una serie de Western blots sobre muestras de tejido. Detectamos dos bandas, una de unos 65 kDa (que por tamaño podría corresponder a EMT) y otra de unos 120 kDa. La banda de mayor tamaño únicamente la detectamos en proteína total de tejido prostático. Uno de los problemas que pueden surgir utilizando anticuerpos policlonales en tejidos es la posible reactividad contra proteínas muy abundantes en cáncer de próstata como, por ejemplo, las

citoqueratinas. Una prueba para determinar la especificidad de nuestro anticuerpo anti EMT es el Western blot que realizamos a partir de las fracciones proteicas soluble e insoluble en Triton X-100 procedentes de tejido prostático para intentar separar las proteínas del citoesqueleto o asociadas con este. Efectivamente, observamos que en la fracción de proteínas solubles únicamente detectábamos la banda de 65 kDa que correspondería a EMT; la banda de 125 kDa es exclusiva de la fracción proteica correspondiente a proteínas asociadas al citoesqueleto, a grandes complejos moleculares y/o núcleo. La banda de 125 kDa es exclusiva de la fracción insoluble de muestra de tejido ya que, cuando el Western blot se realizó sobre proteína total de líneas celulares, sólo detectamos la de menor tamaño que en principio es la que correspondería al tamaño esperado de EMT. El hecho de que únicamente detectemos la banda de mayor tamaño en tejido prostático y no en líneas celulares podría indicar que la proteína correspondiente, se expresaría en otro tipo celular diferente al epitelial como por ejemplo los fibroblastos. En la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3I3 encontramos también dos bandas, una de unos 65 kDa (que correspondería a EMT), y otra de aproximadamente 110 kDa que podría equivaler a la banda de 125 kDa que observamos en tejido prostático.

El anticuerpo anti EMT purificado por afinidad únicamente funciona correctamente mediante Western blot. Las pruebas realizadas por inmunohistoquímica no dan señal alguna. La falta de reactividad del anticuerpo anti EMT purificado podría ser debida a un problema en la técnica de inmunohistoquímica ya que el anticuerpo sigue detectando por Western blot, la banda de 65 kDa.

Resumiendo, pese a los problemas generados por el anticuerpo policlonal de EMT, sabemos que EMT se expresa en próstata y que sus niveles aumenta en un determinado número de tumores. Por este motivo, los estudios que se estan llevando a cabo sobre la capacidad antitumoral del análogo de la cloroetilnitrosourea (SarCNU), podrían ser aplicados también a pacientes con cáncer de próstata positivo para EMT.

Estudio del patrón de expresión diferencial entre dos muestras de próstata.

Existen varios factores a discutir en referencia al proceso experimental seguido. En primer lugar, el escaso número de genes para los que se ha encontrado expresión diferencial entre tejido tumoral y tejido normal probablemente sea debido al limitado repertorio transcripcional obtenido a partir de la metodología que se ha utilizado. La técnica de DD que hemos utilizado requiere la utilización de un único primer aleatorio y una temperatura de *annealing* inferior a la óptima para conseguir el patrón de bandas que se comparará. Sin embargo, por mucho que bajemos la temperatura de unión del primer, la secuencia de RNA que este reconoce será preferentemente su complementaria, con algún cambio de bases que normalmente sucede en el extremo 5'. De esta manera lo que hemos conseguido es restringir la población de cDNAs que queremos comparar. Actualmente existen kits comerciales que utilizan una combinación de primers aleatorios que difieren en su última base y que,

utilizándolos en paralelo, proporcionan una buena representación del patrón de expresión de un tejido dado.

En segundo lugar, otro factor que posiblemente haya influido notablemente en el limitado resultado del análisis de expresión diferencial es la propia naturaleza del cáncer de próstata. El cáncer de próstata se manifiesta de manera focal y el número y dimensión de estos focos varía dependiendo de cada caso. Existen evidencias que indican que el origen del cáncer de próstata es clonal (Ruijter y cols, 1999) y que las alteraciones moleculares pueden variar entre los distintos focos. La mayoría de focos carcinomatosos dentro de un mismo paciente podrían tener distinto origen pero también pueden existir focos que, pese a partir de una misma alteración, hayan divergido debido a alteraciones posteriores distintas (Bostwick y cols, 1998; Micale y cols, 1992; Catherine, 1998; Cheng y cols, 1998). El hecho de que los tumores de próstata se manifiesten de manera focal dificulta la obtención de muestras homogéneas y esta es la razón por la que de un total de 50 muestras procesadas, únicamente hayamos podido utilizar 11. Actualmente, el problema se vería paliado en gran parte gracias a la microdissección guiada por láser. Un ejemplo bastante claro de esta heterogeneidad la encontramos en el análisis de expresión diferencial del gen del EMT (*extraneuronal monoamine transporter*) que se realizó entre los tres focos tumorales de una misma próstata. En este caso, los valores de EMT varían desde la no detección hasta niveles de expresión considerables.

En tercer lugar, hay que considerar que el hecho de utilizar muestras congeladas (para preservar el RNAm) dificulta la interpretación anatomo-patológica de la muestra. Las muestras obtenidas pertenecen a pacientes con una media de 65 años, por tanto, prácticamente la totalidad de los tumores analizados se han desarrollado en presencia de una hiperplasia benigna en la zona de transición. Cuando la zona de transición aumenta de volumen debido a la presencia de hiperplasia, esta lo hace en varias direcciones, hacia la uretra y vejiga (causando los problemas de micción) y hacia la zona benigna periférica de manera que cuando aparece el tumor, éste puede incluso invadir la zona de transición. En estos casos, la muestra obtenida de la zona periférica probablemente esté contaminada de zona de transición. También tenemos que considerar que las muestras de RNAm derivan de una mezcla de poblaciones celulares incluyendo células epiteliales glandulares (epiteliales, basales, neuroendocrinas), células estromales (fibroblastos, musculares, endoteliales...) y células inflamatorias, si se da el caso de prostatitis. Seguramente no podríamos detectar correctamente mediante *differential display* genes expresados diferencialmente, por ejemplo, en el caso de factores de secreción paracrina que en situación tumoral se convierte en autocrina, pero sí que podríamos detectar un cambio claro de niveles totales de proteína.

En consonancia con estas consideraciones, queremos resaltar que la mayoría de estudios publicados (aproximadamente un 70%) mediante la técnica del *differential display* en próstata, buscan genes resistentes a andrógenos y parten de tratamientos de líneas celulares y de xenoinjertos en ratones de tales líneas, que son modelos más fáciles de analizar por esta técnica, ya que las muestras de partida

son más homogéneas (Glynne-Jones y cols, 2001; Chang y cols, 2001b; Ulrix y cols, 1999a, b; Chang y cols, 1999; Jacob y cols, 1999; An y cols, 2000; Srikantan y cols, 2000; Bussemakers y cols, 1999b).

Más recientemente, la técnica de análisis global de transcriptomas mediante hibridación sobre microarrays de cDNA o de oligonucleótidos ha abierto numerosas expectativas en el campo de la patología prostática (Luo y cols, 2001; Paweletz y cols, 2001; Grouse y cols, 2001; Williams y Brooks, 2001; Nelson y cols, 2000; Howell, 1999; Mucci y cols, 2000; Elek y cols, 2000; Lin y cols, 2000; Bubendorf y cols, 1999a, b; Cole y cols, 1999). La utilización de esta tecnología, junto con la microdissección por láser podría solucionar los problemas que plantea, por ejemplo, la técnica de “differential display”.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado en esta tesis podemos concluir que hemos encontrado dos genes de identidad inicialmente desconocida cuya expresión está aumentada en cáncer de próstata: al primer gen lo hemos llamado PTOV1 (*prostate tumor overexpressed 1*) y el segundo gen fue identificado posteriormente por otros como EMT (*extraneuronal momonamine transporter*).

Las conclusiones de los resultados obtenidos sobre PTOV1 son las siguientes:

- *PTOV1* es un gen nuevo conservado a lo largo de la evolución. Presente en *D. melanogaster*, *M. musculus* y *H. sapiens*.
- PTOV1 está constituido por un nuevo tipo de módulo proteico repetido en tándem al que hemos denominad PTOV.
- Hemos estudiado la estructura y determinado la localización cromosomica del gen *PTOV1*. Este está compuesto por 12 exones y se localiza en la región cromosómica 19q 13.3-13.
- Hemos identificado un segundo gen, al que hemos denominado PTOV2, previamente no descrito, que se localiza a 15 Kb de *PTOV1*, que contiene en su secuencia el módulo PTOV y que también se conserva en *D. Melanogaster*.
- La presencia del módulo PTOV en ambas proteínas (PTOV1 y PTOV2) define una nueva estructura proteica, no hallada en las proteínas conocidas hasta el momento.
- Los análisis de los niveles de expresión de PTOV1 en cáncer de próstata mediante RT-PCR semicuantitativas, Western blots e inmunohistoquímica demuestran que los niveles de expresión de PTOV1 son significativamente superiores en carcinoma de próstata con respecto al tejido prostático normal.
- La sobreexpresión de PTOV1 también se detecta, mediante inmunohistoquímica, en la lesión preneoplásica PIN, sugiriendo que el aumento de expresión está asociado a etapas tempranas del desarrollo tumoral del cáncer de próstata.
- La expresión de PTOV1 está regulada por andrógenos en la línea celular de próstata LNCaP.

- Hemos estudiado la localización subcelular de proteína PTOV1 en células tumorales de próstata que se encontraban en diferentes fases del ciclo celular. La localización de PTOV1 es citoplasmática en células en fase G₀/G₁, y nuclear/peri-nuclear en células estimuladas, mediante tratamiento con suero, a entrar en la fase S del ciclo celular.
- La expresión de PTOV1 y su translocación a núcleo están asociadas a la entrada de las células en proliferación, determinada por el antígeno marcador de proliferación Ki67.
- PTOV1 se expresa también en niveles muy altos en las células endoteliales y eritrocitos de las muestras de tejido prostático.
- Mediante el sistema del doble híbrido hemos encontrado que PTOV1 probablemente interacciona con las proteínas Flotilina 1, Anexina 1 y RACK1 ya que la colocalización de estos, en el mismo compartimento celular y fracción proteica, así lo sugiere

Del estudio realizado sobre EMT extraemos las siguientes conclusiones:

- Hemos identificado, mediante *differential display*, el transportador extraneuronal de monoaminas (EMT) como un gen sobreexpresado en cáncer de próstata y hemos confirmado este hallazgo por RT-PCR semicuantitativa.
- Existe variación de la expresión de EMT entre la zona de transición y la zona benigna periférica de la misma próstata normal.