

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 550**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04806854 .8**

96 Fecha de presentación: **10.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1699460**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **Uso de inhibidores enzimáticos de h-PRUNE para la prevención y tratamiento de las metástasis de tumores que sobreexpresan h-PRUNE**

30 Prioridad:
11.12.2003 IT RM20030572

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
ZOLLO, MASSIMO (100.0%)
CEINGE BIOTECNOLOGIE AVANZATE SCARL
VIE COMUNALE MARGHERITA 482
80145 NAPOLI, IT

72 Inventor/es:
ZOLLO, MASSIMO

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 389 550 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores enzimáticos de h-PRUNE para la prevención y tratamiento de las metástasis de tumores que sobreexpresan h-PRUNE.

5 La presente invención se refiere al uso de inhibidores enzimáticos de h-PRUNE para la prevención y tratamiento de las metástasis de tumores que sobreexpresan h-PRUNE, a un método de cribado para dichos inhibidores y un kit de diagnóstico para la detección de las metástasis de éstos.

10 Más particularmente, la invención se refiere al uso de inhibidores enzimáticos de h-PRUNE para la prevención y tratamiento de las metástasis de tumores de mama, sarcomas, melanomas, neuroblastomas y a un método de cribado para dichos inhibidores de éstos. Además, la invención se refiere a un kit de diagnóstico para las metástasis de dichos tumores.

La proteína PRUNE humana (h-PRUNE) pertenece a la superfamilia DHH, que incluye varias fosfoesterasas, tales como RecJ nuclear de bacterias y las pirofosfatasa de levaduras y bacterias (Aravind et al., 1998).

15 La superfamilia DHH puede dividirse en dos grupos principales tomando como base un resto -C-terminal que está muy conservado en cada grupo pero no en los diferentes grupos. Todos los miembros de esta superfamilia poseen cuatro restos adicionales que contienen residuos de aminoácidos cargados altamente conservados que se prevé que son responsables de enlaces iónicos y que catalizan la fosfoesterificación. La característica principal de éstos es el tercer resto, concretamente DHH (Asp-His-His), debido al cual se denomina esta familia.

20 La proteína RecJ es una proteína de reparación del ADN y, junto con otras nucleasas y proteínas bacterianas poco caracterizadas, pertenece al primer grupo; mientras que PRUNE y las polifosfatasa pertenecen al segundo grupo.

25 El gen PRUNE de *Drosophila* se caracterizó originalmente tomando como base su fenotipo mutante que muestra un color marrónáceo-morado de los ojos debido a la reducción de drospterinas, a diferencia del ojo rojo brillante de la mosca de tipo salvaje (Timmons et al., 1996). Aunque los mutantes de PRUNE homocigotos son viables y fértiles, son letales por el desarrollo de tumores pseudo-melanóticos en presencia de al menos una única copia de la mutación que interfiere con la formación correcta del disco imaginal que resultará en el ala (awd/K-pn; también denominado Killer de PRUNE).

Los seres humanos codifican hasta ocho ortólogos del gen *awd* (nm23), al menos cuatro de los cuales codifican nucleósido difosfato quinasas (NDKP) activas que catalizan la transferencia del grupo fosforilo de un nucleósido trifosfato a un nucleósido difosfato (Lombardi et al., 2000).

30 Varios tumores y células altamente proliferativas sobreexpresan el ARNm de nm23-H1 y la proteína de éste y en la mayor parte de los casos esta sobreexpresión está ligada a estadios tempranos de cáncer. El cáncer de mama es una enfermedad compleja que presenta una gestión clínica difícil debido a su heterogeneidad biológica y a su amplio espectro de capacidad de respuesta al tratamiento (Keen et al., 2003). Un conocimiento mejorado de los mecanismos moleculares subyacentes a la tumorigénesis han permitido la identificación de un número creciente de biomarcadores que se han correlacionado con varios pronósticos de cáncer en diferentes etapas del desarrollo de la patología, resultando así en la elección del tratamiento terapéutico más adecuado (Keen et al., Domchek et al., 2002).

40 Entre los factores de pronóstico bien establecidos usados actualmente en casos de cáncer de mama primario están la implicación de los ganglios linfáticos, examen histológico, tamaño del tumor, estado del receptor de estrógeno y progesterona, índice de proliferación, grado nuclear o histológico (Kuru et al., 2003, Morabito et al., 2003). Sería útil proporcionar nuevas moléculas implicadas en los procesos posteriores de transformación, invasión y metástasis para usarse como marcadores para el pronóstico de las etapas posteriores en el desarrollo de la patología tumoral.

45 En el cáncer de mama y los melanomas, la alta expresión de nm23-H1 humana está asociada con un potencial metastásico disminuido (Florenes et al., 1992). Para el caso específico del cáncer de mama, la diseminación de las metástasis es responsable virtualmente de todas las muertes por cáncer.

50 Para volverse invasivas, las células tumorales necesitan cambiar sus propiedades adhesivas, perder el contacto con otras células en el tumor primario y establecer nuevos contactos con la matriz extracelular de las células anfitrionas de los tejidos que invaden. En este contexto, la modulación de la actividad proteasa que rodea a las células tumorales juega un papel crítico. Para migrar desde el tumor primario y salir del sistema circulatorio para colonizar órganos secundarios, las células tumorales también necesitan obtener funciones de motilidad.

55 Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado varios genes supresores de metástasis (Steeg et al., 2003). En este grupo, se sabe que nm23 induce una disminución de la motilidad celular cuando se sobreexpresa en células de tumor de mama (Freije et al., 1997, Hartsough et al., 2001, Freije et al., 1997), influye en la colonización independiente de anclaje e induce la diferenciación (Kantor et al., 1993; Leone et al., 1993; Howlett

et al., 1994; Hartsough et al., 1998; Lombardi et al., 2000). Además, se ha demostrado que una sobreexpresión de nm23-H1 en el clon de línea celular de cáncer de mama agresivo MDA-C100 reduce significativamente su fenotipo metastásico tanto *in vitro* como *in vivo* (Hartsough et al., 2000, Mao et al., 2001, Tseng et al., 2001).

El inventor en un estudio previo ha demostrado la interacción entre h-PRUNE y nm23-H1 y la disrupción de esta interacción por la mutación nm23H1-S120G (Reymond et al., 1999). Además, se ha descrito que la amplificación de varias copias de h-PRUNE resulta en la inducción de la proliferación celular y los altos niveles de expresión de h-PRUNE, comparado con los niveles moderados o bajos de nm23-H1, se correlacionan con una agresividad incrementada de sarcoma y tumores de carcinoma de mama (Forus et al., 2001).

De acuerdo con esto, es evidente la necesidad de proporcionar compuestos adecuados para inhibir la actividad enzimática de h-PRUNE para usarse ventajosamente para el tratamiento y prevención de tumores y metástasis de éstos caracterizados por la sobreexpresión de h-PRUNE.

Ahora el autor de la presente invención ha identificado una nueva actividad enzimática de h-PRUNE particularmente correlacionada con metástasis, particularmente de cáncer de mama, y susceptible a inhibición enzimática terapéutica. De hecho, el autor ha descubierto ahora que h-PRUNE posee una actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos con una afinidad preferente por AMPc sobre GMPc como sustratos, que puede suprimirse eficazmente por algunos inhibidores de fosfodiesterasa.

Además, mediante el estudio realizado por el autor de la presente invención, se encontró que la enzima h-PRUNE resulta que está sobreexpresada con una disminución simultánea de la expresión de nm-23 en tumores metastásicos en varios tejidos. Además, se encontró una correlación directa entre la actividad incrementada de PDE de AMPc de h-PRUNE y la motilidad celular, debido a una interacción física proteína-proteína con nm23H1 en un modelo de tumor de mama. Este descubrimiento subraya la interacción entre h-PRUNE y nm23-H1 que resulta en la modificación de la función protectora de nm23-H1 en la proliferación celular y la supresión de los procesos de metástasis tumoral.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, el papel posible de h-PRUNE como marcador potencial independiente para el pronóstico del desarrollo clínico de cáncer de mama se evaluó estudiando la distribución de la expresión de la proteína h-PRUNE y de nm23-H1 en un grupo de pacientes con carcinoma de mama. Particularmente, la sobreexpresión de h-PRUNE, distribuida homogéneamente entre los diferentes casos clínicos analizados, ofrece la posibilidad de un uso ventajoso de la proteína como un marcador de pronóstico independientemente de otros factores tales como, por ejemplo, tipo de tumor, tamaños histológicos, reactividad de los receptores de estrógeno y progesterona, implicación de los ganglios linfáticos. La identificación de un nuevo marcador es útil para identificar los tumores con potencial metastásico y hacer más eficaz la gestión de los pacientes que padecen cáncer de mama, en términos de elección de la terapia dirigida que se debe adoptar.

Entre los inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) que se ensayaron mediante un método de cribado adecuado para la evaluación de la inhibición de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de h-PRUNE, dipiridamol, un fármaco que ya se conoce por sus propiedades anticoagulantes, ha revelado la capacidad mayor para inhibir la actividad de h-PRUNE en términos de CI_{50} , tanto en *in vitro* como en modelo de cáncer de mama. También, vinpocetina y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) en el cribado mostraron valores prometedores de CI_{50} para la inhibición de h-PRUNE; los datos de esta selección sugieren abordar el cribado para análogos estructurales, derivados e isómeros de los tres compuestos mencionados anteriormente.

Finalmente, los análisis *in vivo* de muchos tumores de mama metastásicos confirmaron la existencia de una correlación directa entre niveles incrementados de la proteína h-PRUNE y la regulación negativa de la expresión de nm23-H1, lo que resulta en la formación de metástasis distantes como se indica en el estudio clínico de seguimiento.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: NIIHGSDSVESAEKEGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10) caracterizado porque es permeable debido a la secuencia GGGYGRKKRRQRRR.

Además, la presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: GGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10) y caracterizado porque es permeable y es un inhibidor de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de h-Prune, para uso en el campo médico.

Es un objeto adicional de la presente invención el uso del péptido anterior para la preparación de un medicamento para la prevención y tratamiento de metástasis de tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE. Por ejemplo, los tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE pueden ser carcinoma de mama, sarcoma, neuroblastoma, tumor de próstata, tumor pancreático, tumor de carcinoma de colon, tumor rectal, meduloblastoma, epiteloma, hepatocarcinoma, linfomas de células T o de células B, mieloma y melanoma y tumor pulmonar.

Además, la presente invención se refiere a un método de cribado para compuestos inhibidores de h-PRUNE, que comprende las fases siguientes:

a) selección de al menos un compuesto que inhibe fosfoesterasa (PDE), o derivado, análogo estructural o isómero de éste;

b) administración de dicho al menos un compuesto a una concentración entre 0,05 μM y 10 μM en una línea celular que sobreexpresa h-PRUNE, en el que dicha línea celular es MDA-C100 435 prune #4;

5 c) análisis cuantitativo de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de h-PRUNE y/o análisis de motilidad celular frente a la concentración de dicho al menos un compuesto y quimio-atrayente y selección del compuesto capaz de inhibir dicha actividad fosfodiesterasa entre los valores de 0,01 a 1 $\text{pmol}/\text{min}^{-1}/\mu\text{g}^{-1}$ y/o inhibir dicha motilidad hasta el logro de valores entre 200 y 1.200 células.

10 La inhibición de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de h-PRUNE por un compuesto ensayado como inhibidor de dicha actividad puede establecerse por la evaluación de la CI_{50} para el compuesto mencionado anteriormente.

El análisis cuantitativo de la etapa c) puede realizarse por ensayos de hidrólisis del sustrato AMPc y/o GMPc. Dicho sustrato se usa a una concentración entre 0,008 μM y 1 μM .

15 Es un objeto adicional de la presente invención un método para la detección in vitro de h-PRUNE en una muestra biológica, tal como una sección de tejido o fluido biológico, para el diagnóstico de metástasis de tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE por un ensayo inmunológico que comprende las etapas siguientes:

20 a) poner en contacto dicha muestra biológica con el anticuerpo monoclonal anti-h-PRUNE capaz de reconocer y unirse selectivamente a la proteína recombinante h-PRUNE, caracterizado porque pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM y porque es producido por el clon 4G3/4 (depositado en el CBA en Génova el 10/12/12004);

b) detección del complejo antígeno-anticuerpo;

c) análisis cuantitativo del complejo antígeno-anticuerpo.

25 Dicho anticuerpo anti-h-PRUNE puede marcarse con un radioisótopo, molécula fluorescente o enzima. La detección y análisis cuantitativo del complejo antígeno-anticuerpo puede realizarse por análisis de inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia.

30 Es un objeto adicional de la presente invención un kit de diagnóstico para la detección de h-PRUNE en una muestra biológica para el diagnóstico de metástasis de tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE que comprende el anticuerpo monoclonal anti-h-PRUNE que pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM y que es producido por el clon 4G3/4 (depositado en el CBA en Génova el 10/12/12004). Por ejemplo, los tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE son carcinoma de mama, sarcoma, neuroblastoma, melanoma. Dicho anticuerpo monoclonal anti-h-PRUNE puede marcarse con un radioisótopo, molécula fluorescente o enzima.

35 Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal murino capaz de reconocer y unirse selectivamente a la proteína recombinante h-PRUNE, caracterizado porque pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM y porque es producido por el clon 4G3/4 (depositado en el CBA en Génova el 10/12/12004). El clon se obtuvo mediante la inmunización de ratones con la proteína recombinante h-PRUNE completa en una construcción de fusión que contiene en el NH_2 terminal la proteína de unión a maltosa (construcción pMAL5). La proteína se purificó mediante cromatografía en columna de afinidad de maltosa y se inyectó en dos ratones, con 5 refuerzos, uno cualquiera con 100 μg de proteína purificada.

La presente invención se describirá ahora como ilustración, pero no limitación, según sus realizaciones preferidas, con referencia particular a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

45 la figura 1 muestra un alineamiento múltiple de secuencias de fosfoesterasas de la familia DHH, que muestra separadamente los cuatro restos genéricos (I-IV) y el diagnóstico de restos de las dos subfamilias distintas que se localizan en el segundo dominio; los números indican las posiciones del primer residuo alineado en cada secuencia proteica y las distancias entre los diferentes elementos (panel A). La estructura "en cinta" de la proteína h-PRUNE tomando como base la estructura de cristal de PPASA y la proteína RecJ (panel B) y la estructura "en cinta" de la proteína RecJ (panel C); las flechas indican los residuos ácidos aspárticos (D);

50 la figura 2 muestra la identificación de la actividad PDE de h-PRUNE sobre los sustratos AMPc y GMPc (panel A). Histograma del análisis de mutaciones únicas y múltiples que se localizan en el sitio catalítico potencial de la proteína h-PRUNE (panel B). Gráficos de Lineweaver para determinar K_m y V_{max} tanto para AMPc como GMPc como sustrato, respectivamente, (paneles C, D). Actividad PDE de AMPc medida en presencia de dos tampones diferentes a concentraciones crecientes de Mg^{2+} (panel E). Actividad PDE de AMPc medida en presencia de

concentraciones crecientes de Mg^{2+} (puntos negros) o Mn^{2+} (puntos blancos). Se muestran los gráficos de actividad de h-PRUNE (líneas sólidas) y h-PRUNE Δ (líneas discontinuas) (panel F);

la figura 3 muestra análisis de clones estables y ensayos de motilidad *in vitro*. Examen de la expresión de ARNm de los genes de h-PRUNE y nm23-H1 por análisis cuantitativo con PCR en Tiempo Real; se muestran los valores ΔCt relevantes (panel A). Detección de la expresión de ARNm por Tiempo Real; se indica el número de copias de ARNm (panel B). Los análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos h-PRUNE, nm23-H1 y etiqueta His, respectivamente (para PDE5A) indican la cantidad de proteínas expresadas en cada clon celular individual (panel C). Motilidad celular de las líneas celulares MDA C-100 (control), MDA H1-177, MDA-PRUNE y MDA-H1-177-PRUNE, que sobreexpresan respectivamente h-PRUNE (clon #3 y #4) solo o h-PRUNE y nm23-H1 (clon #7 y #8), (panel D). Motilidad celular de las líneas celulares MDA C-100 (control), MDA-PRUNE (clon #3 y #4), MDA-PRUNE Δ (clon #10 y #11), MDA-PRUNE4D Δ (clon #19 y #20), MDA-PDE5A (clon #14 y #16) y MDA-H1-177 (panel E). Motilidad celular de las líneas celulares MDA C-100 (control), MDA-nm23H1-S120G, MDA-nm23H1-S120G-PRUNE (clon #2 y #3), MDA-nm23H1-P96S, MDA-nm23H1-P96S-PRUNE (clon #4 y #5), que sobreexpresan mutantes nm23-H1 solo o con h-PRUNE (panel F);

la figura 4 muestra los análisis *in vitro* e *in vivo* de la actividad PDE de h-PRUNE; actividades PDE de AMPc de h-PRUNE y h-PRUNE Δ en presencia de proteínas nm23 (panel A). En la tabla del panel B, se indican los valores de la actividad PDE de h-PRUNE medidos como $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ en lisado celular de proteínas totales;

la figura 5 muestra el histograma de motilidad que representa el análisis de la actividad inhibidora sobre PDE y la motilidad de las líneas celulares MDA C-100 (control), MDA-PRUNE (clon #3 y #4) y MDA-PRUNE Δ (clon #10 y #11) (panel A). En la tabla del panel B se indican las actividades inhibidoras sobre diferentes PDE por 8 inhibidores ensayados, expresadas como valores de CI_{50} ; en la última columna se muestran los valores CI_{50} de h-PRUNE para algunos de los compuestos más sensibles.

la figura 6 muestra el análisis *in vivo* de metástasis asociadas con tumor de mama; análisis FISH en MTA (matriz de múltiples tejidos) que muestra la amplificación de h-PRUNE (izquierda) y nm23-H1 (derecha) (panel A). Magnificación 100X y 200X de análisis inmunohistoquímicos (IHC) de dos grupos de tumores que expresan mucho h-PRUNE (+++) (izquierda) comparado con un nivel de expresión de nm23-H1 moderado y bajo (0/+) (derecha) (paneles B, C); tabla de resultados de los análisis FISH e IHC realizados en 59 casos de cáncer de mama TNM₁ (panel D).

la figura 7 muestra un modelo que representa la función prometastásica de h-PRUNE en cáncer de mama

la figura 8 muestra análisis FISH y de inmunohistoquímica que comparan tejidos de mama normales y tumorales; en el panel A, se representan análisis FISH en MTA que permiten individualizar el número de copias de h-PRUNE tanto en tejidos normales como tumorales (izquierda) y en tejidos tumorales pero no metastásicos (derecha); en el panel B se indica la magnificación de los análisis de inmunohistoquímica realizados en dos grupos de tumores que expresan poco h-PRUNE (+);

la figura 9 muestra análisis de expresión y citogenéticos de h-PRUNE en carcinoma de mama. En el panel A, se muestra el análisis inmunohistoquímico para la expresión de h-PRUNE realizado en secciones TMA y magnificación 40X de inmunotinción para h-PRUNE positiva (a) y negativa (b). En el panel B, se indican los análisis FISH en las mismas muestras empleando h-PRUNE/PAC279-h19 como sondas y pUC177 como control;

la figura 10 muestra los análisis de supervivencia Kaplan-Meier en la expresión de h-PRUNE y nm23-H1. Todos los casos de carcinomas de mama se sometieron a inmunotinción de nm23-H1 (A) y h-PRUNE (B); carcinomas de mama h-PRUNE-positivos en presencia (C) o ausencia (D) de implicación de ganglios linfáticos axilares;

la figura 11, A, muestra la inmunoprecipitación *in vitro* de proteína h-PRUNE producida en baculovirus y fosforilada por Caseína Quinasa δ y no fosforilada *in vitro* nm23H1, se produjeron varias mutaciones únicas en la región S120-125 con el fin de mostrar la formación de complejo mediante inmunoprecipitación *in vitro*. Las proteínas son visibles por transferencias Western usando anticuerpos anti-HIS presentes en el NH2 terminal de las proteínas recombinantes sintetizadas en Baculovirus. El carril 1 y 2 muestran proteínas recombinantes como control. Las inmunoprecipitaciones se realizaron con anticuerpo policlonal anti-h-prune A-59 y la detección por W.B con anticuerpos policlonales anti-etiqueta His (prune-nm23); la figura 11 B muestra la secuencia proteica y MALDI-MS de la proteína, las serinas positivas en fosforilación están en negrita; la figura 11 C muestra nm23-H2 expresada en COS7 usando la construcción pcDNA-HA-nm23H2 y anticuerpos que reconocen anti-HA, seguido de purificación en gel por SDS page y tripsinización y envío a análisis de perfil de peso molecular MALDI-MS, la identificación de péptidos y la masa molecular de éstos se realizó usando espectrómetro de masas Voyager con un incremento de masa correspondiente a una o dos fosforilaciones. (80 Daltons, 160 Daltons);

Figura 12 A: anticuerpo policlonal K73 que reconoce el péptido correspondiente a la región fosforilada de nm23H1, obtenido en conejos, purificado varias veces por afinidad frente al péptido fosforilado, el carril 1 y el carril 2 muestran que la proteína recombinante nm23H1 y H2 producida en baculovirus, cuando se fosforila *in vitro* por la caseína quinasa δ , es reconocida por el anticuerpo K73 específico enriquecido IgG que reconoce

serina fosforilada. Estos datos muestran la presencia de fosforilación específica en la región de la Serina 120-125 por un anticuerpo específico K73; figura 12 C: MDA H1177 se incubaron con 50 mMol IC261 a diferentes tiempos, como se describe en el ejemplo 4, 30 mg del extracto total se analizaron para la fosforilación de nm23 con el anticuerpo policlonal K73 purificado frente al péptido fosforilado. El carril 6 (proporcionado a 0 h) muestra 30 mg de extracto, usado en el carril 1, tratado durante 1 hora con 10U de ICP a 37°C. Fig. 12 D, MDA C100 se trataron a dos concentraciones diferentes con IC261 durante 6h, h-prune se inmunoprecipitó con anticuerpo policlonal A59, la interacción con nm23-H1 se detectó mediante moAb anti nm23H1 moAb (NOVOCASTRA). Los carriles 1 y 5 muestran 20 ng de h-prune recombinante WB positiva control y 20 ng de extracto celular MDAH1177, respectivamente;

la figura 13 A muestra los valores de motilidad celular (media aritmética $\pm$ SD para cinco ensayos en duplicado independientes) seguido de tratamiento con dipiridamol, IC261 o dipiridamol e IC261; la figura 13 B (izquierda inferior) muestra que la presencia de IC261 altera el contenido de AMPc linealizado en la célula MDA prune #4 (contenido total de actividad PDE de AMPc) mostrando que el complejo es responsable del incremento de PDE de AMPc en las células. De hecho, la Fig. 13 B (derecha inferior) muestra que la proteína h-prune recombinante *in vitro* en presencia de IC261 no modifica su actividad biológica, siendo el valor de la actividad específica similar al de la proteína no tratada. A partir de estos datos, IC261 inhibe el complejo h-prune-nm23, siendo el último responsable del incremento *in vivo* de la actividad fosfodiesterasa, como es evidente en MDA prune #4;

la figura 14 muestra la detección de h-prune por transferencia Western con un anticuerpo monoclonal específico de prune (4G3/4).

EJEMPLO 1: Análisis estructurales y funcionales de h-PRUNE

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de la secuencia proteica

La base de datos no redundante de secuencias proteicas en el National Center for Biotechnology (NIH, Bethesda) se buscó iterativamente usando el programa PSI-BLAST (Altschul et al., 1997). Se construyeron alineamientos múltiples de secuencias proteicas usando el programa T_coffee (Notredame et al., 1993) y se corrigieron tomando como base los resultados del programa PSI-BLAST.

Se construyeron árboles filogenéticos usando el programa Philip Fitch y el programa de paquetes Molphy ProtML.

Se realizó modelado de homología de las estructuras proteicas con el software SWISS-PDB-viewer y el alineamiento con el molde se ajustó manualmente para minimizar los choques del núcleo proteico. La minimización de energía se realizó usando el programa GROMOS usando un campo de fuerza semejante a Sippl.

Los diagramas de las proteínas con estructura en cinta se generaron usando el programa MOLSCRIPT.

Cultivo celular

Las células HEK-293 y MDA-MB-435 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado **CON 10% SUERO FETAL BOVINO, 100 UNIDADES/ml PENICILINA**, y 100 μ g/ml estreptomycin a 37°C con 5% CO₂.

Expresión y purificación de proteínas en Baculovirus

La expresión de proteínas se realizó usando el Sistema de Expresión en Baculovirus (Invitrogen). Brevemente, el ADNc que codifica h-PRUNE, nm23-H1 y los mutantes de nm23-H1 (Mac Donald et al., 1996) y h-PRUNE: h-PRUNE Δ , D28A, D106A, D179A, D28A-D160A, D28A-D106A-D126A, D28A- Δ , 4D Δ (D28A-D106A- Δ -D179A) se subclonaron en un vector pFastBac-Hta digerido con EcoRI/XhoI.

Para producir los ADNc mutantes de h-PRUNE, se realizó mutagénesis dirigida a sitio de la construcción de h-PRUNE usando el kit QuikChange III (Stratagene) según las instrucciones del fabricante (véase el ejemplo 2).

Las condiciones de infección del virus y purificación se describen en Garzia et al. (2003).

Posteriormente, h-PRUNE y h-PRUNE Δ etiquetadas con histidina se purificaron en una columna MonoQ HR 5/5 (Amersham) usando tampón 10 mM Tris-HCl pH 8,0. La elución de la columna se realizó con un gradiente lineal de 0 a 0,8 M NaCl, durante 20 min y a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones se dializaron además frente a tampón 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, y se ensayaron para actividad.

La pureza de las proteínas aisladas se midió por análisis de electroforesis SDS page.

Identificación y caracterización de la actividad fosfodiesterasa de h-PRUNE

La actividad PDE se midió por un ensayo de detección de AMPc/GMPc, como describen Fisher et al. 1998 y con un ensayo de centelleo (Amersham-Pharmacia Biotech).

Las muestras se diluyeron y se incubaron a 30°C en 100 µl de tampón de ensayo (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 8,3 mM MgCl₂, 1,7 mM EGTA) que contiene la concentración deseada de AMPc o GMPc como sustratos (relación sin marcar a marcado con ³H = 3:1).

Todas las reacciones, incluyendo los blancos que sólo contienen medio, se realizaron en triplicado y se dejó que procedieran durante un tiempo de incubación que proporciona un recambio de los sustratos <25%.

Las reacciones se terminaron añadiendo 50 µl de lechos SPA de silicato de itrio (Amersham).

Las actividades enzimáticas se calcularon para la cantidad de producto radiomarcado detectado según el protocolo del fabricante. Como controles negativos se usaron h-PRUNE pre-incubada con anticuerpos policlonales A59, producidos frente a la región del resto III (Apotech Corporation, CH) y mutante h-PRUNEΔ.

En particular, para la actividad PDE de h-PRUNE y mutantes de h-PRUNE, se incubaron 200 ng de enzimas purificadas durante 10 min a 30°C.

Se determinaron gráficos Lineweaver-Burk con valores de K_m y V_{max} midiendo la hidrólisis con un intervalo de concentración de sustrato (0,05-10,0 µM) y cantidad fija de enzima diluida durante 5-40 min. Las velocidades iniciales se calcularon a cada concentración de sustrato y se representaron frente a la última mediante lo cual se determinaron los parámetros cinéticos.

Para estudiar la influencia de los diferentes tampones y actividad nm23 en la actividad PDE de h-PRUNE y para realizar estudios de inhibición, el ensayo de PDE se modificó como se indica en la sección de "materiales y métodos" del ejemplo 2.

Ensayos de motilidad celular *in vitro*

Se produjeron clones MDA estables que sobreexpresan h-PRUNE, h-PRUNEΔ, h-PRUNE4DΔ y PDE5A humana y se analizaron como se describe en la sección de "materiales y métodos" del ejemplo 2.

La línea celular de cáncer de mama control MDA-C100 se usó en el ensayo de motilidad celular, como se ha descrito previamente (Leo et al., 1993) junto con la línea celular que sobreexpresa nm23-H1 (MDA-H1-177), que muestra inhibición de los procesos de metástasis *in vivo*.

La motilidad celular se determinó mediante la tecnología trans-pocillo de 6 pocillos (Corning-Costar) usando, como concentraciones finales, 0,25%, 0,5% FCS, 2,5 y 5,0 ng/ml de fibronectina (Sigma), que actúan como quimio-atrayentes, respectivamente (para detalles adicionales véase la sección de "materiales y métodos" del ejemplo 2).

Análisis estadístico

Todos los ensayos, incluyendo los de actividad PDE y motilidad celular, se validaron usando el método de ensayo de T disponible en <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>.

Los análisis de FISH y HIC, recogida del caso clínico de tumor y selección TNM se indican en la sección de "materiales y métodos" del ejemplo 2.

RESULTADOS

Análisis estructural y funcional de h-PRUNE

Una búsqueda ITERATIVA en bases de datos de proteínas (PSI-BLAST) realizada sobre la proteína h-PRUNE, permitió recuperar con valores de expectación estadísticamente significativos, los ortólogos eucariotas de PRUNE, seguido de pirofosfatasa inorgánicas a partir de una variedad de proteínas de bacterias y DHH de varios organismos, incluyendo las nucleasas RecJ (figura 1, panel C).

El agrupamiento de las proteínas DHH usando el programa BLASTCLUST y los análisis filogenéticos, usando el método de la máxima probabilidad, muestra que las proteínas PRUNE (humana y de *Drosophila*) pertenecen a la segunda familia de DHH, junto con las pirofosfatasa inorgánicas (figura 1, panel A).

Aunque las dos familias de proteínas DHH comparten un dominio N-terminal común que contiene los cuatro restos conservados típicos de la superfamilia DHH, se distinguen entre sí por sus dominios C-terminales. El dominio N-terminal compartido tiene un plegamiento α/β con láminas β paralelas y contiene los elementos

absolutamente conservados de la forma DXD (Resto-I), D (Resto-II), DHH (Resto-III) y D/E (Resto-IV) (figura 1, paneles A y B).

Todos estos residuos están en la misma cara de este dominio y conjuntamente forman el sitio catalítico quelando al menos dos cationes divalentes. Las proteínas PRUNE contienen la forma DHR como sustitución del DHH canónico (Resto-III) que se observa en todos los demás miembros de esta familia (figura 1, panel A).

En ambas familias DHH, el dominio C-terminal contiene una lámina núcleo de cinco cadenas, cuatro de las cuales forman dos horquillas de cadenas β . Sin embargo, las diferencias en los dominios C-terminales entre la primera y segunda familia de proteínas DHH puede contribuir principalmente a la especificidad de sustrato de las dos superfamilias. Además, el dominio C-terminal del módulo DHH, PRUNE de mamíferos, contiene una extensión no globular en la que hay algunas serinas conservadas que pueden jugar un papel en la regulación de la fosforilación.

El análisis estructural de h-PRUNE mostró similitudes con RecJ (Yamagata et al., 2002) y pirofosfatasa (Ahn et al., 2001), sugiriendo así una actividad similar potencial con la última.

Sin embargo, sus interacciones sinérgicas fuertes con las NDPK semejantes a awd/K-pn sugirieron que las proteínas PRUNE podrían tener sustratos alternativos, tales como nucleótidos.

Los estudios evolutivos acerca de la familia DHH muestran que las fosfoesterasas derivan de varios plegamientos de proteínas que contienen varios dominios fosfoesterasa e hidrolasa. Éstos incluyen: el plegamiento HD, por el que se reconocen las PDE de señalización clásica (PDE1-11) (Aravind et al., 1998); el plegamiento de la β -lactamasa de metal (Galperin et al., 1999, Aravind et al., 1999), del que derivan las PDE semejantes a PdsA; y el plegamiento de fosfoesterasa semejante a calcineurina (Aravind et al., 1998), del que derivan las PDE semejantes a Icc.

El dominio catalítico de las DHH tiene un plegamiento muy distinto de estas otras familias y contiene varios residuos quelantes de metal análogos (ácido aspártico e histidinas) que podrían definir potencialmente una clase completamente nueva de PDE. Con el fin de ensayar esta hipótesis, h-PRUNE se expresó, purificó y ensayó para actividad PDE potencial.

Identificación y caracterización de la actividad PDE de h-PRUNE

Para determinar la capacidad de h-PRUNE para hidrolizar enlaces fosfoéster en nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), h-PRUNE se clonó y expresó usando el sistema de expresión de Baculovirus. h-PRUNE etiquetada con His y h-PRUNE Δ , una mutación creada en la región del resto III (DHRP126-129AAAA), se purificaron por cromatografía de afinidad.

El ensayo de PDE se usó para caracterizar la actividad catalítica de h-PRUNE purificada y para determinar el sustrato específico.

Como se muestra en la figura 2, panel A, h-PRUNE posee actividad PDE significativa, que es mayor para el sustrato AMPc que para GMPc, mientras que h-PRUNE Δ muestra una reducción del 40% de esta actividad. Como control positivo se usó PDE2; los controles negativos fueron tanto h-PRUNE pre-incubada con el anticuerpo policlonal específico A59 como h-PRUNE Δ .

Para confirmar la actividad PDE detectada, h-PRUNE y h-PRUNE Δ se sobreexpresaron de forma transitoria en células HEK-293 humanas y se inmunoprecipitaron y se realizó un ensayo PDE en las proteínas inmunoprecipitadas.

Estos resultados indican que la proteína h-PRUNE purificada, tanto de células de insecto como humanas, muestra actividad PDE.

Para identificar los aminoácidos potencialmente implicados en el sitio catalítico, se realizó un análisis de mutación en sitios únicos y múltiples que afectan a la actividad PDE de h-PRUNE. Todos los residuos de ácido aspártico de los restos característicos de DHH (figura 1, panel B) se mutaron tanto solos como en combinación (figura 2, panel B). Los mutantes se expresaron usando el sistema de expresión de Baculovirus y se purificaron hasta homogeneidad (rendimiento de la purificación 80%).

Las proteínas se ensayaron para su actividad PDE de AMPc y se observó una disminución del 80% en la actividad del mutante h-PRUNE 4D Δ (D28A, D106A, Δ , D179A). En resumen, se encontró que los aminoácidos D28, D126, H127, R128, P129 y D179 eran esenciales para la actividad PDE de h-PRUNE, indicando así que lo más probable es que sean parte del sitio catalítico. Por el contrario, la mutación D106A en el resto II no afectó a la actividad PDE de h-PRUNE.

Para definir los valores K_m , la proteína h-PRUNE etiquetada con His se purificó hasta homogeneidad por otra etapa de purificación usando cromatografía de intercambio iónico (columna Mono-Q) con un alto rendimiento de

purificación (90%). Los valores K_m y V_{max} se determinaron midiendo la hidrólisis de nucleótidos con una cantidad fija de enzima purificada en el intervalo de concentración de sustrato (0,05-10,0 μM) y considerando los puntos de datos en la parte lineal de la reacción. Tanto AMPc como GMPc son sustratos para h-PRUNE y muestran valores K_m de $0,9 \pm 0,03 \mu M$ y $2,3 \pm 0,11 \mu M$, respectivamente (figura 2, paneles C y D).

- 5 Se encontró que las velocidades máximas de recambio de sustrato (V_{max}) eran $12,8 \pm 0,5 \text{ pmoles} \times \text{min}^{-1} \times \mu g^{-1}$ y $16,1 \pm 0,8 \text{ pmoles} \times \text{min}^{-1} \times \mu g^{-1}$ de enzima purificada para AMPc y GMPc, respectivamente.

Así, se destaca la evidencia de una actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos para una proteína de la superfamilia DHH. Para estudiar la influencia del tampón en la actividad PDE de h-PRUNE, se ensayaron tampones Tris-HCl y HEPES en presencia de la misma sal y se observó una mayor actividad PDE en presencia de tampón Tris-HCl (figura 2, panel E).

Considerando la dependencia de ión de las proteínas DHH, se evaluó la dependencia del ión Mg^{2+} y Mn^{2+} de h-PRUNE en el ensayo de PDE de AMPc. Aunque se encontró una mayor actividad de h-PRUNE en tampón Tris-HCl, se realizaron ensayos de PDE en presencia de tampón HEPES para evitar las reacciones de oxo-reducción y se usaron concentraciones crecientes de dos iones divalentes diferentes.

- 15 Aunque se midió algo de actividad PDE en el tampón sin ión, Mg^{2+} estimuló la actividad PDE de h-PRUNE (figura 2, panel E); por el contrario, en presencia de $MnCl_2$ esta actividad se inhibe. Además, el mutante h-PRUNE Δ no se activa por los iones Mg^{2+} , así como la proteína de tipo salvaje (figura 2, panel F), indicando así que el resto III, modificado en el mutante h-PRUNE Δ , es necesario para la actividad fosfodiesterasa. En conclusión, se mostró que la actividad PDE de AMPc de h-PRUNE se ve influida positivamente por la concentración del ion Mg^{2+} .

Clones h-PRUNE MDA de mama estables y correlación con la motilidad celular

Para estudiar la función de h-PRUNE en la regulación de las actividades de nm23-H1 de anti-motilidad y supresoras de metástasis, se emplearon los modelos celulares MDA-C100 y HI-177 (Hartsough et al., 2000, Mao et al., 2001, Tseng et al., 2001).

- 25 Las células MDA435-C100 (células de carcinoma de mama altamente metastásicas, ATCC) se transfectaron con el ADNc del gen de h-PRUNE en una construcción de plásmido que contiene LTR (construcción pBabe, que se emplea para generar retrovirus ecotrópicos en células de mamífero), después de la transfección, se obtuvieron diferentes clones resistentes a puomicina (20 días de cultivo para aislar los clones), resistencia a antibiótico en plásmido y se seleccionaron para sobreexpresión de ADNc de h-prune bajo el promotor LTR.

- 30 Se produjeron varios clones estables que sobreexpresan ADNc de h-PRUNE (clon #3 y #4, éste último depositado en CBA en Génova el 10/12/2004), ADNc de h-PRUNE Δ (clon #10 y #11), ADNc de h-PRUNE4D Δ (clon #19 y #20) y ADNc de PDE5A (clon #14 y #16) en células MDA-C100. Se estabilizó el ADNc de h-PRUNE en MDA-H1-177 que sobreexpresan nm23-H1 (clon #7 y #8), MDA que sobreexpresan nm23H1-P96S (clon #4 y #5) y MDA que sobreexpresan nm23H1-S120G (clon #2 y #3).

- 35 Algunos de estos clones se caracterizaron para determinar el nivel de expresión del ARNm de h-PRUNE usando análisis por PCR en Tiempo Real por tecnología TaqMan (figura 3, panel A). Cuatro clones se seleccionaron por su nivel de expresión de ARNm por análisis cuantitativo y extrapolación del número de copias, para compararlo con el gen de referencia diana (GAPDH) (figura 3, panel B).

- 40 Además, se realizaron análisis de transferencia Western para identificar los niveles de expresión de las proteínas h-PRUNE, nm23 y PDE5A (figura 3, panel C).

Los clones estables producidos se ensayaron para motilidad celular usando las cámaras de cultivo celular Trans-pocillo (Freije et al., 1997, Hartsough et al., 2001, Freije et al., 1997). Se ensayaron 6 clones independientes (MDA-C-100; MDA-PRUNE clon #3 y #4, depositados en CBA en Génova el 10/12/2004; MDA-H1-177-PRUNE clon #7 y #8; MDA-1I-177). Los clones MDA-PRUNE tienen un incremento de 2 veces en la motilidad cuando se comparan con la línea celular control MDA-C100 (figura 3, panel D).

Los valores observados para el clon MDA-H1-177-PRUNE están incrementados 2,2 veces cuando se comparan con la línea celular MDA-H1-177, que sobreexpresa nm23-H1 solo (figura 3, panel D). El valor observado del clon MDA-H1-177 está reducido al menos un 40% comparado con la línea celular MDA-C100, como se ha indicado previamente (Hartsough et al., 2001), confirmando así el papel de nm23-H1 para la inhibición de la motilidad celular.

Con el fin de estudiar la contribución de la actividad PDE de h-PRUNE a la motilidad celular, se realizó un ensayo de motilidad en MDA-C100, MDA-H1-177, MDA-PRUNE (clon #3 y #4 depositados en CBA en Génova el 10/12/2004), MDA-PRUNE Δ (clon #10 y #11) y MDA-PRUNE4D Δ (clon #19 y #20). Estos mutantes se eligieron por su diferente capacidad para influir en la actividad PDE de h-PRUNE.

Se observaron disminuciones del 40% y casi totales (90%) de la motilidad celular en los clones MDA-PRUNE Δ y en MDA-PRUNE4D Δ , respectivamente, ambos comparados con los clones estables de MDA-PRUNE. Para verificar si la actividad PDE de h-PRUNE contribuye sola a la motilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama, se ensayaron los clones que sobreexpresan una PDE bien caracterizada (PDE5A) en MDA-C100 (MDA-PDE5A clon #14 y #16). No se observó ningún incremento en la motilidad celular en ninguno de los dos clones que sobreexpresan PDE5A (figura 3, panel E), indicando así que sólo la actividad PDE de h-PRUNE es capaz de inducir la motilidad celular en este modelo celular convencional.

Además, se ha indicado (Freije et al., 1997, Hartsough et al., 2001, Freije et al., 1997) que las proteínas nm23-H1-S120G (un mutante que no interacciona con h-PRUNE) (Reymond et al., 1999) y nm23H1-P96S (un mutante que retiene su capacidad de unir h-PRUNE) son capaces de inducir la motilidad celular.

El papel de h-PRUNE en la actividad de motilidad celular de mutantes que sobreexpresan con y sin h-PRUNE se investigó y esto se correlacionó con motilidad celular. Los clones MDA-nm23H1-S120G-PRUNE muestran un incremento de casi el 60% en motilidad comparado con la línea celular control MDA-C100, mientras que los clones MDA-nm23H1-P96S-PRUNE muestran un incremento de 200% en motilidad cuando se comparan con las células MDA-C100 (figura 3, panel F).

En conclusión, los resultados indican que la sobreexpresión de h-PRUNE en células MDA-C100 incrementa la motilidad celular. h-PRUNE es capaz de revertir el efecto anti-motilidad de nm23-H1, estimulando así la motilidad celular. Este efecto no se observa cuando h-PRUNE se sobreexpresa en presencia del mutante nm23-H1-S120G con interacción deteriorada con h-PRUNE, postulando así un papel del complejo nm23-H1-h-PRUNE en el incremento de la motilidad celular.

Actividad PDE de h-PRUNE *in vitro* e *in vivo*

Considerando que h-PRUNE y nm23-H1 interaccionan físicamente (Mac Donald et al., 1996), se examinó si nm23 puede influir en la actividad PDE de h-PRUNE y la significancia biológica de la interacción nm23-h-PRUNE. Esto se consiguió pre-incubando nm23-H1 con la proteína h-PRUNE purificada y midiendo la actividad PDE de AMPc *in vitro*.

La actividad PDE de h-PRUNE mostró un incremento de hasta 2 veces sobre el control en presencia de nm23-H1. Además, para verificar que esta actividad incrementada se debe a una interacción física, se ensayaron diferentes mutantes de nm23. El mutante que no interacciona nm23H1-S120G (figura 4, panel A) no fue capaz de incrementar la actividad PDE de h-PRUNE; por el contrario, el mutante que interacciona nm23H1-P96S incrementó la actividad PDE de h-PRUNE casi como el nm23-H1 de tipo salvaje, aunque en menor grado. Esto es posible por la menor afinidad de unión a h-PRUNE, como se ha indicado previamente (Reymond et al., 1999).

Como un experimento control adicional, la actividad PDE de h-PRUNE Δ se ensayó en presencia de la proteína nm23-H1, porque estas dos proteínas no interaccionan durante los ensayos de coimmunoprecipitación. No hay ningún incremento en la actividad PDE medida de h-PRUNE Δ (figura 4, panel A).

Estos resultados demuestran una correlación entre la interacción física directa de h-PRUNE y nm23-H1 y el incremento de la actividad PDE de h-PRUNE. Además, cada clon estable usado en el ensayo de motilidad se analizó para actividad específica PDE de AMPc de h-PRUNE en la proteína inmuno-precipitada (figura 4, panel B).

Tal y como resulta de estos análisis, los clones MDA-PRUNE tienen un incremento de 8 veces de la actividad PDE de AMPc comparado con la de MDA-C100. En lugar de esto, los clones MDA-PRUNE Δ tienen una disminución de 0,5 veces de la actividad PDE de AMPc comparado con la de MDA-PRUNE y esto se correlaciona con sus propiedades de motilidad celular (figura 4, panel B).

Además, se encontró que la actividad PDE de h-PRUNE en los clones MDA-h-PRUNE comparada con los dobles MDA-H1-177-PRUNE estables está incrementada 1,4 veces (figura 4, panel B).

Estos resultados muestran una correlación directa entre la actividad PDE de h-PRUNE y la motilidad celular. Además, los clones MDA-nm23H1-S120G-PRUNE tienen una disminución de 3 veces en la actividad PDE de h-PRUNE comparado con los MDA-nm23H1-P96S-PRUNE, indicando así una correlación directa entre la actividad PDE de AMPc de h-PRUNE, la motilidad celular y las interacciones proteína-proteína. En conclusión, se destaca una correlación directa entre la función PDE de h-PRUNE y las interacciones proteína-proteína, lo que resulta en una influencia significativa en la motilidad celular.

Estudios de inhibidor de PDE de h-PRUNE e influencia en la motilidad celular

Para identificar el papel fisiológico de la actividad PDE de AMPc de h-PRUNE en la célula se ensayó un panel de inhibidores selectivos de PDE y se verificó si alguno afectaba la actividad de la proteína h-PRUNE.

La capacidad de h-PRUNE para hidrolizar AMPc se inhibió selectivamente por dipiridamol (que ya se sabe que actúa frente a PDE5, PDE6, PDE9, PDE19 y PDE11). La CI_{50} medida para la inhibición de dipiridamol de la actividad PDE de h-PRUNE fue $0,78 \pm 0,05 \mu M$ y este valor es menor (mayor especificidad) que los valores de otras inhibiciones de PDE selectivas (PDE5, PDE9, PDE10). Sólo PDE6 y PDE11 tienen un valor de CI_{50} menor que h-PRUNE (figura 5, panel A).

h-PRUNE también fue moderadamente sensible a IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (CI_{50} ; $40,2 \pm 0,8 \mu M$) un inhibidor no selectivo específico de PDE y vinpocetina (CI_{50} ; $22,3 \pm 1,1 \mu M$) un inhibidor específico de PDE1C.

Varios inhibidores diferentes usados en este estudio no afectaron la actividad de hidrólisis de AMPc de h-PRUNE, incluso cuando se aplicaron a una concentración 100 veces mayor que para sus valores de CI_{50} frente a otras PDE. Los resultados de los estudios de inhibición se resumen en la figura 5, panel A.

Los datos presentados anteriormente se verificaron además en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435, con el fin de estudiar la inhibición fisiológica *in vitro*.

Se eligió usar los clones MDA que sobreexpresan h-PRUNE y, como controles adicionales, los MDA-PRUNE Δ , debido a una reducción parcial (40%) de la actividad PDE de h-PRUNE como se ha discutido anteriormente (figura 2, paneles A y B), para verificar en qué grado el dipiridamol era capaz de inhibir sus actividades y correlacionarlas con la motilidad celular.

Los dos clones MDA-PRUNE y PRUNE Δ se incubaron con dipiridamol ($8 \mu M$, una concentración 10 veces mayor que para IC_{50}) durante 24 h para obtener la inactivación completa de la enzima y el ensayo de motilidad se repitió como se ha descrito anteriormente.

Después de tratamiento con dipiridamol, los clones MDA-PRUNE y MDA-PRUNE Δ mostraron una reducción media de la motilidad de 40% y 20%, respectivamente, lo que muestra que el inhibidor actúa frente a la actividad PDE de h-PRUNE, lo que resulta así en una disminución sustancial de la motilidad celular (figura 5, panel B).

Estudio en carcinoma de mama en pacientes que padecen metástasis

Para verificar el papel oncogénico *in vivo* de h-PRUNE hemos seleccionado aleatoriamente cincuenta y nueve casos para los que se han indicado metástasis (TxNxMI según la clasificación TNM que describe el grado anatómico de la enfermedad (Hejna et al., 1999)).

El análisis se realizó en una matriz múltiple de tejido (TMA) que contiene casos de tejidos de tumor primario que mostraban metástasis en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento (al menos 5 años de seguimiento; fecha del diagnóstico: 1992-1997).

Los análisis FISH, usando un PAC que contiene h-PRUNE (279-H19) como sonda, revelaron 22 de 59 (37%) casos de tumor con trisomía o número de copias más alto, lo que indica amplificación de la región genómica de h-PRUNE. Se observó sólo una disomía y ninguna amplificación en un total de 55 casos analizados usando un PAC que contiene nm23-H1 como sonda (figura 6, panel A).

Además, los análisis inmuno-histoquímicos en TMA se realizaron usando dos anticuerpos (A59, K73) que reconocen h-PRUNE y nm23-H1, respectivamente. Se indicaron análisis FISH e inmunohistoquímicos de tejidos normales así como de cáncer no metastásico.

Según la clasificación inmuno-histopatológica, en todos los 22 casos (37%) después de la amplificación citogenética de la región cromosómica de h-PRUNE también se subrayó una alta expresión de la proteína h-PRUNE a diferencia de un nivel de expresión bajo o moderado de nm23-H1, lo que sugiere así que aproximadamente un tercio de la formación de metástasis de mama puede deberse a la amplificación de h-PRUNE y a la sobreexpresión con un nivel disminuido simultáneo de la función supresora de metástasis de nm23-H1.

Además, 7 casos (12%) no presentan amplificación de h-PRUNE pero poseen un nivel alto de proteína h-PRUNE mientras que el nivel de nm23-H1 es bajo (figura 6, panel D). Esto sugiere la presencia de un mecanismo alternativo de sobreexpresión de h-PRUNE independiente de la amplificación génica.

Estos datos indican un papel estimulante de metástasis de la proteína h-PRUNE en carcinoma de mama.

EJEMPLO 2: Perfil de expresión génica de clones estables MDA de mama

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de mutantes

Se usaron los oligonucleótidos siguientes para generar mutantes de h-PRUNE:

h-PRUNE Δ (DHRP126-129AAAA): 5' - GTA GCA GAG GTG CTA GCC GCT
GCA GCC ATC GAG CCG AAA CAC -3' (SEQ ID No 5);
 D28A: 5'-GAA GCC TGT GCT TTG GAC TCC-3' (SEQ ID No 6);
 D106A: 5'-ACC CTC ATC CTT GTC GCT CAT CAT ATC TTA TCC-
 3' (SEQ ID No 7);
 D179a: 5'-GAA CCA TCA TCC TGG CAT GTG TCA ACA TGG-
 3' (SEQ ID No 8).

Los nucleótidos mutados se indican en negrita y el codón alterado está subrayado. Todas las mutaciones se confirmaron por secuenciación de ADN.

Caracterización de la actividad fosfodiesterasa PDE de h-PRUNE

- 5 Para estudiar la influencia del tampón en la actividad PDE de h-PRUNE el ensayo de PDE se modificó usando tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 ó 50 mM HEPES, pH 7,5 a concentraciones crecientes (0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mM) de MgCl₂.

- 10 Para estudiar el efecto de la presencia de iones, los ensayos de PDE se realizaron en tampón 50 mM HEPES, pH 7,5 (con el fin de evitar las reacciones de oxo-reducción) a concentraciones crecientes (1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 mM) de sal MgCl₂ o MnCl₂. Como control negativo, se usó h-PRUNE Δ en las mismas condiciones que para h-PRUNE. La actividad de h-PRUNE en ausencia de iones se ensayó después de diálisis extensa de la proteína frente a 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,7 mM EGTA o tampón 50 mM HEPES, pH 7,5, 1,7 mM EGTA.

- 15 La influencia de la actividad de nm23 (NDPK) en la actividad PDE de h-PRUNE se investigó realizando los ensayos con una pre-incubación de h-PRUNE purificada con varios nm23 (rendimiento de la purificación 70%, -H1, -h1-S120G o -H1-P96S).

El posible efecto de nm23-H1 en h-PRUNE Δ se ensayó pre-incubando la proteína mutante purificada con nm23-H1 y realizando el ensayo de PDE.

- 20 Como en los estudios de inhibidor, se ensayaron ocho inhibidores potenciales diferentes, concretamente: cilostamida, dipiridamol, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), milrinona, rolipram, vinpocetina, sulindac y zaprinast (Sigma).

Se empleó una concentración baja de AMPc (0,01 μ M) con el fin de aproximar la Cl₅₀ a K_i. Todos los estudios de inhibición se realizaron en triplicado y se repitieron tres veces.

Análisis de clones estables

- 25 Los ADNc de h-PRUNE, h-PRUNE Δ y h-PRUNE4D Δ se subclonaron en el vector pBABE digerido con EcoRI/XhoI modificado con etiqueta de His en el extremo N-terminal. El ADNc de PDE5A humana se amplificó por PCR añadiendo extremos de restricción EcoRI y XhoI con el fin de clonarlo en el mismo vector etiquetado con His.

- 30 Los clones MDA-C100, MDA-H1-177, MDA-nm23H1-S120G y MDA-nm23H1-P96S se transfectaron con el vector de expresión pBABE-h-PRUNE. El clon MDA-C100 se transfectó con los vectores de expresión pBABE-h-PRUNE Δ , pBABE-h-PRUNE4D Δ y pBABE-h-PDE5A.

Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamina (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Los transfectantes se seleccionaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 10% suero fetal bovino, 100 Unidades/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina y 2 μ g/ml puromicina (Sigma).

- 35 Con el fin de preparar las líneas transfectadas en gran cantidad, se tripsinizaron placas que contienen cien colonias resistentes a puromicina y se establecieron así las líneas celulares.

Varios clones resistentes a puromicina pBABE-h-PRUNE, pBABE-h-PRUNE Δ , pBABE-h-PRUNE4D Δ y pBABE-h-PDE5A, se aislaron para cada clon MDA, se transfectaron y caracterizaron tanto por análisis de PCR en tiempo real como transferencia western.

- 40 Para el análisis por PCR en tiempo real, se plaquearon clones celulares individuales (líneas celulares MDA-C100, MDA-H1-177, MDA-H1S120G, MDA-H1P96S, varios clones estables h-PRUNE y h-PRUNE Δ) a concentraciones de $7-9 \times 10^6$ células en frascos de 75 cm².

El ARNm se extrajo y purificó por TRIZOL® (Invitrogen) y se ensayó por el sistema de detección por PCR en Tiempo Real cuantitativa TaqMan usando un instrumento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Se sintetizaron

parejas de cebadores génicos (Applied Biosystems: NME1-P/N 4331182; GAPDH) y se usó Ensayo Diseñado para construir la secuencia de la sonda 6FAM (6-carboxifluoresceína) tanto para los genes h-PRUNE como h-PRUNE Δ :

6FAM-CTGCATGGAACCATC (SEQ ID No 3);

5 DIR: AGAGATCTTGGACAGGCAAACT (SEQ ID No 1);

INV: CCATGTTGACACAGTCCAGGAT (SEQ ID No 2).

Se seleccionaron varios clones y se ensayaron para sus niveles de expresión de ARNm por análisis cuantitativo y extrapolación del número de copias, comparado con los diana de referencia (GAPDH).

10 Para los análisis de transferencia western, se analizaron 15 μ g de lisado de proteínas en tampón por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) ó 12,5% (p/v) y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Los lisados se inmuno-detectaron con los anticuerpos policlonales específicos para h-PRUNE (A59, producido frente a la región del resto III) para h-PRUNE, nm23-H1 (clon NM301, específico para la isoforma H1; Santa Cruz) para nm23-H1 y Penta-His frente a la etiqueta His (QIAGEN) para PDE5A, respectivamente.

15 Después de incubación con IgG anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano, se realizó la visualización por quimioluminiscencia aumentada (Amersham). Once líneas celulares, concretamente MDA-PRUNE (clon #3 y #4), MDA-H1-177-PRUNE (clon #7 y #8), MDA-nm23H1-S120G-PRUNE (clon #2 y #3), MDA-nm23H1-P96S-PRUNE (clon #4 y #5) y MDA-PRUNE Δ (clon #11), MDA-PRUNE4D Δ (clon #19), MDA-PDE5A (clon #14) se seleccionaron y las proteínas se normalizaron en transferencias Western.

20 Ensayo de motilidad celular *in vitro*

Se usó la tecnología trans-pocillo (6 pocillos - Corning Costar). En los pocillos inferiores, se incubaron 2,5 ml de DMEM que contiene 0,1% BSA, 100 Unidades/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin, tampón 5 mM HEPES (medio de motilidad) y el quimio-atrayente diluido; en los pocillos superiores, las células se incubaron durante 3 horas a 37°C con 5% CO₂. Después del procedimiento de atracción, las células se fijaron y se tiñeron con disolución de hematoxilina de Gill nº1 según el protocolo del fabricante (Corning-Costar); las células se contaron finalmente en el microscopio.

Análisis FISH

30 PAC 279-H19 (PRUNE - cromosoma 1q21.3) y PAC nm23-H1 (nm23H1 - cromosoma 17q21) marcados por desplazamiento de mella con dUTP-Cy3 (rojo) y pUC177 control marcado por desplazamiento de mella con dUTP-FluorX (verde) en secciones de tejido incluidas en parafina fijadas con formalina con un espesor de 4 μ m (pUC177 fue proporcionado por el Dr. M. Rocchi).

35 Los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI). Se realizaron dos experimentos distintos para cada caso. Las imágenes digitales se capturaron usando un microscopio Olympus de epifluorescencia informatizado proporcionado con Vídeo COHU y software Cytovision. Las señales de hibridación en núcleos intactos, bien conservados y no superpuestos se evaluaron por al menos dos investigadores independientes.

Análisis IHC

Los tumores MDA se inmuno-detectaron con anticuerpos policlonales específicos A59 h-PRUNE y nm23-H1, respectivamente (clon K73, específico para las isoformas H1 y H2; Apotech Corporation, CH).

40 La intensidad de la tinción inmunohistoquímica se usó para clasificar las muestras de tumor como positivas si estaba presente en al menos 20% de las células analizadas con el microscopio (tinción fuerte +++, moderada ++, débil difusa + o negativa 0 (tinción ausente o focalmente débil) para la expresión de las proteínas h-PRUNE y nm23-H1.

Recogida de los casos tumorales y selección TNM

Los casos tumorales se recogieron por AUSL1 de Sassari incluyendo pacientes con un mínimo de seguimiento de 5 años. El Sistema TNM de clasificación se aplicó a este estudio como describe Sobin (Hejna et al., 1999) se usó para describir el grado anatómico de la enfermedad y tomando como base la evaluación de tres componentes: T correspondiente al grado del tumor primario (de T0 a T4), N correspondiente a ausencia o presencia y grado de metástasis en ganglios linfáticos regionales (de N0 a N4) y M que indica la ausencia o presencia de metástasis distantes (M0 o M1). La recogida de 59 casos de tumor de mama se clasificó como TxNxM1 positiva.

Expresión génica en clones celulares de mama

La preparación de las sondas se realizó según el procedimiento siguiente.

El ARN se extrajo de MDA-H1-177-PRUNE (clon #8) y clones MDA-H1-177 por el método TRIZOL®. Los moldes de ARN total que variaron de 15 a 20 µg se marcaron usando el kit de Marcaje de Primera Cadena de ADNc CyScribe de Amersham con las modificaciones siguientes.

El tiempo de la transcripción inversa se incrementó hasta tres horas. La sonda se digirió con ARNasa-H durante 30 minutos a 37°C.

Con el fin de eliminar el ARN residual, las mezclas de reacción se incubaron con 0,25 M NaOH durante 20 minutos y se neutralizaron con 2,8 M MOPS. La cantidad de agente de tinción Cy incorporado se calculó para Cy5 y Cy3. Las dianas marcadas con Cy3 y Cy5 se acoplaron en cantidades iguales y se hibridaron en portas.

Las sondas con menos de 50 pmoles de agente de tinción Cy incorporado no se usaron para hibridación.

El protocolo de hibridación estándar se aplicó a los portas. Se realizaron dos conjuntos de experimentos independientes.

Escaneo y análisis de imágenes

El escaneo y el análisis de imágenes se realizaron, respectivamente, por un software Medway Far 2000-I y Array Pro de Media Cybernetics. La sensibilidad del escáner se mantuvo entre 900 y 1.000 para compensar la saturación y la baja intensidad. Se procesaron las imágenes en formato de 16 bit.

Extracción de datos

Con el fin de establecer la significancia estadística de cualquier diferencia observada en la expresión génica entre dos condiciones experimentales, cada experimento se realizó en triplicado.

Con el fin de describir la significancia y variabilidad de los datos, se realizó un ensayo de T en varios experimentos replicados. Se usó la herramienta T de Cyber disponible en la página de internet <http://www.igb.uci.edu/servers/cybert> para aplicar el ensayo. Se usó un valor de corte a $p=0,05$. Como resultado de este análisis se espera casi un 5% de falsos positivos en diferentes conjuntos de datos. Sólo se usaron los conjuntos de datos que pasaron el ensayo (selección de datos después del ensayo de T).

RESULTADOS

Con el fin de verificar el perfil de expresión génica de los clones estables que sobreexpresan nm23-H1 solo y/o en combinación con h-PRUNE, se realizaron estudios de matriz génica usando una matriz ya preparada que contiene un conjunto de 19.000 genes. Esta matriz contiene un conjunto de datos de ADNc Unigene humano distribuidos en portas de vidrio (Ontario, Canadá, Array facility, <http://www.microarrays.ca/>).

Los ARN de los clones MDA-H1-177 y MDA-H1-177-PRUNE (clon #8) se usaron para realizar la hibridación. Se realizaron dos conjuntos independientes de experimentos en cada clon de cáncer de mama y los valores del ensayo de T ($p=0,05$) se extrapolaron (<http://www.tigem.it/zollo/cancercell/supplemental/array.html>).

Se encontró que los niveles de expresión de varios genes implicados en los procesos de metástasis estaban regulados de manera diferente en MDA-H1-177-PRUNE (clon #8) comparado con el clon MDA-H1-177, como se muestra en la Tabla 1. La Tabla 1 resume los experimentos de matriz realizados en clones celulares de mama estables; en las columnas de izquierda a derecha se indica: la identificación del gen con número ID, número de referencia Unigene y posición en los cromosomas humanos; relación entre los datos de matriz de MDA-H1-177/MDA-H1-177-PRUNE clon #8 después de dos experimentos independientes realizados en duplicado; valor del ensayo T, incluyendo la desviación estándar y el valor p; referencias bibliográficas de los genes; procesos de metástasis correspondientes.

Tabla 1

Identificación del gen ID	Relación de la intensidad de la señal		Relación de la intensidad de la señal	#obs						Referencias del gen	Procesos de metástasis correlacionados
	Cy3/Cy5										
	(H1-177/Clon8)	(H1-177/clon8)			1,442391601	2	1,4418	0,0005	995,8991		
310622:W31182:310622:Hs.181385:proteína no caracterizada de células madre/progenitoras hematopoyéticas MDS030:MDS030:9:9p24.1	1,441332		1,442391601	2	1,4418	0,0005	995,8991	0,006	AUTORES Zhao, M., Gu, J., Li, N., Peng, Y., Han, Z. y Chen, Z. TÍTULO Novel genes expressed in haematopoietic stem/progenitor cells from myelodysplastic syndromes patient PUBLICACIÓN No publicado	Angiogenesis	
489392:AA054454:489392:Hs. 821 59:subunidad de proteosoma (prosoma, macropaina), tipo alfa 1:PSPMA1:11:11p15.1	1,42474		1,423157331	2	1,4329	0,0007	635,9779	0,001	Coux O; Tanaka, K; Golderberg, A; Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Ann. Rev. Biochem. 65:801-847, 1996.	Degradación de Proteínas	
485121:AA037777:485121:Hs.25300 : fosfatidilinositol 4-quinasa tipo II:PI4KII:10:10q24	0,39234		0,394341204	2	0,3933	0,0035	-366,7976	0,0017	J Biol Chem 2001 Mayo 18; 276(20): 16635-40 Minogue S. Anderson JS. Waugh MG, dos Santos M. Corless S, Cramer R. Hsuan JJ.	Endocitosis y reorganización del citoesqueleto	
4692752:BG538790:4692752: Hs. 94881	3,977598		4,013662507	2	3,9955	0,0063	306,9319	0,02	Cancer Lett 1995 Mayo 4;91(1):47-54 Salesiotis AN, Wang CK, Wang CD, Burger A, Li	Metástasis	

307259;W21103:307259;Hs.84344;proteína CGI-135;LOC51024 7.7q11.22	0,851047	0,857366017	2	0,8542	0,0052	-42,6056	0,0149	H, Seth A Hs. 38738 Homo sapiens CLDN15 Claudin 15: Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson-IM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Jul;283(1):C142-7. PMID: 120550B2	Adhesión
4862951:8076631 6:4862951 :Hs.347991:receptor nuclear subfamilia 2, grupo F, miembro 2: NR2F2:15:15q26	0,868882	0,862911048	2	0,8658	0,0048	-41,7638	0,0152	Pereira et al. (1999)	Angiogenesis y desarrollo
266005:N31521:266005:Hs.1986 89:antígeno 1 péfugo ampolloso, 230/2 40KDa:BPAG1:6.6p12-p11	0,777256	0,787969285	2	0,7825	0,0096	-35,8148	0,0177	Brown, A.; Bemier, G.; Mathieu, M.; Rossant, J.; Kothary, R. The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. Nature Genet. 10: 301-306, 1995	Organización del citoesqueleto
278764:N98784:278764:Hs.148495:subunidad de proteosoma 26S (prosoma, macropaina), no ATPasa, 4:	0,695804	0,681432396	2	0,6885	0,0147	-35,7552	0,0178	Deveraux, Q.; Jensen, C.; Rechsteiner, M.: Molecular cloning and expression of a 26S protease subunit enriched in dlleucine	Degradación de proteínas

PSMD4:1:1q21.1									repeats. J. Biol. Chem. 270: 23726-23729, 1995. PubMed ID: 7559544	
54551 17:BM91.1128:54551 17:Bs.111779: proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina): SPARC:5:5q31.3-q32	1.472603	1.515475276	2	1,4938	0,0202	27,9731	0,0227		Biochem Biophys Res Commun 2001 Sep 21;287(2): 422-6 Induction of SPARCO by VEGF in human vascular endothelial cells. Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, Sskai N, Baba M, Kobayashi K, Koshika S, Nagashima Y, Frankenne F, Noel A, Foldart JM, Hata RI.	Angiogénesis
321313:W321 80:321 313:Bs.387254	0,699574	0,671066627	2	0,6851	0,0294	-18,1757	0,0349		Sfiligoi C, De Luca A, Cascone I, Sorbello V, Fusco L, Panzone R, Biglia N, Audero E, Arisio R, Sussolino F, Sismondi P, De Bortoli M. Artículos relacionados. Angioprotein-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. Int J Cancer. 2003 Feb 1;103(4):466-74	Angiogénesis
320701:W32046:320701:Bs.5415	0,772313	0,74904291	2	0,7605	0,0216	-17,8901	0,0355		Sfiligoi C, De Luca A, Cascone I, Sorbello V, Fusco L, Panzone R, Biglia N, Audero E, Arisio R, Busotino F, Sismondi P, De	Angiogénesis

										Bortoli M. Artículos Relacionados, Links Angiotensin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. Int J Cancer. 2003 Feb 1;103(4):466-74	
300555:W07526:300555:Hs.2936:metaloproteinasa 13 de matriz (colagenasa 3): MMP13:11:1:1q22.3	1,094073	1,105961019	2	1,1	0,0076	17,6383	0,036			Del Casar Lizcano JM, Vizoso Pineiro F, Gonzalez Sanchez LO, Marlin Suarez A, Gava R, Cuesta Fernandez E, Diez Santisteban MC. Artículos Relacionados, Links [Espression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13) in gastric cancer] Gastroenterol Hepatol. 2003 Ene 26(1):1-7. Español. COLLAGENASE 3 PRECURSOR	Metástasis
429533:AA011457:429533:Hs.237617: dipeptidilpeptidasa 9: DPP9:19:19p13.3	1,185238	1,164378856	2	1,1752	0,0131	17,3649	0,0366			IV Olson C. Waghmann N. Identification and characterisation of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidases IV. Gene 2002 Oct. 18:2991-(1-2): 185-93	Biología del tumor (metástasis)
4747535:BG676028:4747535:Hs.89626:hormona semejante a la hormona paratiroidea: PTHLH: 12:12p12.1-	0,944871	0,951010591	2	0,8479	0,0045	-16,5107	0,0385			Linerth R., Anderson N, Boey R, Nolan T., Downey S, Brady G, Ashcroft L, Bundred N, Coexpression of parathyroid	Metástasis

p11.2												hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival Clin Cancer Research 2002 Oct (10) 3172-7 PMID: 12374885	
504278:AA1 49501:504278:Hs.332405:arginasa, hígado:ARG1:6:6q23	1,391833	1,329405384	2	1,3602	0,0324	13,4093	0,0473					Davel LE, Jasnis MA, de la Torre E, Goloh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sale ME. Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis of macrophages. FEBS Lett. 2002 Dic 4; 532(1-2):216-20.	Angiogenesis
127468:R08943:127468:Hs.269181:EST, Similar a placofilina 2	1,34385	1,378604879	2	1,3611	0,0180	241,491	0,0263					Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. PUBLICACIÓN J. Cell Biol. 135 (4), 1009-1025 (1996) PUBMED 8922383MEDLINE97081101	Adhesión

Se seleccionaron algunos genes, implicados en procesos de oncogénesis y metástasis y alterados significativamente en los análisis de expresión génica, y se confirmó su nivel de expresión por un método alternativo.

5 Los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron en 11 genes (las parejas de cebadores génicos se seleccionaron de las secuencias de GeneBank ID). Se encontró que 7 y 4 de estos genes seleccionados estaban regulados al alza y a la baja en el clon MDA-H1-177-PRUNE (clon #8), respectivamente. Dicha expresión génica que se diferencia al nivel de los clones estables que sobreexpresan h-PRUNE, cuya expresión se confirmó por matriz de chip y por PCR en Tiempo Real, se indica en la tabla 2.

10 En los modelos celulares descritos anteriormente se encontró una regulación al alza de genes que se sabe que están implicados en la re-organización del citoesqueleto (fosfatidilinositol 4-quinasa tipo ii), activación de proteasas (proteasoma subunidad 26s, proteína de unión nedd4), oncogénesis (l-plastina, rab1b, proteína asociada a brca1 (brap2), fosforilación de proteínas y transporte nuclear (proteína 1 que interacciona con caseína quinasa ii ckp1).

15 Además, se encontró una regulación a la baja en cuatro genes, implicados en los contactos de la matriz extracelular o adhesión celular (Placofilina, LIM), re-organización del citoesqueleto (Plaquina) y actividad oncosupresora (EXT1) y dichas evidencias se indican en la tabla 2. Esta tabla indica la diferente expresión génica en clones MDA estables que sobreexpresan h-PRUNE; en las columnas de izquierda a derecha se indica: identificación ID de GenBank; nombre del gen; relación entre los valores de expresión en matriz del clon #8/clon #177 después de dos experimentos independientes realizados en duplicado; valor P para la expresión en matriz; relación entre los valores de expresión en matriz del clon #8/clon #177 evaluada por PCR en Tiempo Real; valor P para PCR en Tiempo Real; proceso biológico celular correlacionado.

Tabla 2

REGULADO AL ALZA						
ID de GenBank	Nombre del gen	Relación del valor de expresión en matriz clon #8/clon #177	Valor P	Relación del valor de expresión en Tiempo Real clon #8/clon #177	Valor P	Proceso biológico celular
NM_030981.1	Familia RAB 1B ras	0,6902	0,0184	0,4005	0,0001	Oncogénesis
BT007330.1	Fosfatidilinositol 4-quinasa tipo II	0,3933	0,0017	0,2230	0,0013	Reorganización del citoesqueleto
AF035620.1	Proteína asociada a BRACA1 (BRAP2)	0,7563	0,0027	0,0670	0,0062	Oncogénesis
M22300.1	PLASTINA	0,7491	0,0078	0,0990	0,0001	Oncogénesis
NM_018177.2	Proteína de unión 2 a NEDD4 (NABP2)	0,7567	0,0145	0,2230	0,001	Activación de proteasas
NM_016274.3	Proteína 1 que interacciona con CK2 (CKIP1)	0,7929	0,0161	0,3499	0,0004	Proliferación
XM_208021.1	PROTEASOMA 26-S	0,6886	0,0178	0,4475	0,0044	Activación de proteasas

REGULADO A LA BAJA						
ID de GenBank	Nombre del gen	Relación del valor de expresión en matriz clon #8/clon #177	Valor P	Relación del valor de expresión en Tiempo Real clon #8/clon #177	Valor P	Proceso biológico celular
R08943.1	EST R08943 similar a placofilina	1,3611	0,0263	2,9180	0,4764	Adhesión celular
AF061258.1	LIM	1,1717	0,0145	3,0525	0,0092	Adhesión celular
BC0011741	EXT1	2,1573	0,0398	2,9588	0,0623	Supresor tumoral
NM_001723.2	PLAQUINA	0,7826	0,0178	0,5625	0,0619	Organización del citoesqueleto

En resumen, se descubrió que genes implicados en procesos ligados a la oncogénesis estaban alterados significativamente en su nivel de expresión, indicando así una contribución determinante de h-PRUNE al mayor potencial oncogénico de esta línea celular de cáncer de mama.

CONCLUSIONES

- 5 Los análisis estructurales basados en las dos proteínas que pertenecen a la superfamilia DHH, concretamente nucleasa RecJ y pirofosfatasa inorgánica, sugieren que h-PRUNE probablemente posee una actividad fosfoesterasa dependiente de ión metálico. Como resultado de los análisis estructurales de la familia DHH y de los estudios de plegamiento de proteínas evolutivos de fosfoesterasas, se demostró que h-PRUNE de mamíferos posee una actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.
- 10 Como h-PRUNE interacciona con la isoforma de nm23-H1 que tiene actividad NDPK, que se sabe que funciona en nucleótidos, la atención se centró en la caracterización de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y en su papel en la señalización celular. El mutante h-PRUNE Δ que contiene sustituciones en el resto conservado III de la familia DHH muestra una reducción de la actividad PDE (figura 2, paneles A, B, F).
- 15 Los análisis de mutación única o múltiple en varios sitios indican que se encontró que sólo las mutaciones en histidina (127), arginina (128) y prolina (129) del resto III y los ácidos aspárticos D28, D126, D179, presentes respectivamente en el resto I, III y IV, afectaban sustancialmente la actividad PDE de h-PRUNE, indicando así, lo más probablemente, su implicación en el sitio catalítico de PDE de h-PRUNE.
- 20 La región del resto III conservado es responsable de la unión de los iones Mg^{2+} como se predice por modelado de la proteína (figura 1, panel B) y, además, en un ensayo funcional *in vitro* se observó que h-PRUNE también es capaz de funcionar en ausencia (figura 2, panel E) o a bajas concentraciones de ión metálico (figura 2, panel F).
- 25 Se demostró que los niveles de proteína h-PRUNE y nm23 están desequilibrados en tumores de sarcoma y carcinoma de mama, lo que sugiere que h-PRUNE puede regular negativamente la función anti-metastásica de nm23. Un incremento en la expresión de h-PRUNE está correlacionado directamente con una agresividad de estos tumores y progresión del cáncer (Forus et al., 2001). Como varias publicaciones han postulado que la actividad anti-metastásica de nm23-H1 es independiente de la actividad NDPK (Steeg et al., 1993, Wagner 1997), investigamos la influencia de h-PRUNE en la motilidad celular, que representa una de las primeras funciones celulares que adquieren las células cancerosas para migrar desde el sitio del tumor primario.
- 30 Con el fin de confirmar que la actividad PDE de h-PRUNE está implicada directamente en este fenómeno, se sobreexpresaron h-PRUNE, h-PRUNE Δ y h-PRUNE4D Δ en un modelo de cáncer de mama y se observó que la sobreexpresión de la proteína de tipo salvaje induce motilidad celular, mientras una disminución de su función PDE (h-PRUNE Δ , h-PRUNE4D Δ) se corresponde con una disminución de la motilidad celular.
- 35 Por el contrario, se observó una reducción del 80% en la actividad PDE para el mutante h-PRUNE4D Δ y que la sobreexpresión en clon MDA no causa un incremento significativo en la motilidad celular, excluyendo así que otras actividades de h-PRUNE potenciales sean responsables del incremento de la motilidad.
- 40 Aunque ninguna otra PDE caracterizada intracelular estaba asociada con la migración celular, se investigó si el incremento de la actividad PDE en clones MDA estables podía contribuir a la motilidad celular. Para este propósito, PDE5A se sobreexpresó en el mismo modelo celular y se ensayó para influencia en la motilidad celular. PDE5A, elegida por su sensibilidad a dipiridamol (CI_{50} 0,9 μ M), no afecta la motilidad de células de mama MDA, indicando así que la función PDE de h-PRUNE es la única responsable de incrementar la motilidad celular en células de cáncer de mama.
- 45 Además, se ha observado que la sobreexpresión de h-PRUNE en un entorno de alta expresión de nm23-H1 presenta un fenotipo de motilidad disminuida y actividad PDE de h-PRUNE menor comparado con células que sobreexpresan h-PRUNE solo. Aunque la actividad PDE de h-PRUNE está incrementada *in vitro* después de la interacción con nm23-H1 (figura 4, panel A), este efecto no se observó *in vivo*. Estos fenómenos pueden explicarse por la presencia de una alta cantidad de nm23-H1 en MDA-H1-177-PRUNE si se compara con los clones MDA-PRUNE (figura 3, panel B).
- 50 Esto puede influir negativamente en la formación del complejo PRUNE-nm23H1, que podría depender de la presencia de diferentes formas de nm23-H1 oligoméricas y/o modificadas después de la traducción (por ejemplo; fosforilación en serina) (Steeg et al., 2003).
- 55 Con el fin de verificar la hipótesis de que la regulación negativa de h-PRUNE en la función anti-metastásica de nm23 es debida a un incremento en la actividad PDE como resultado de la interacción proteína-proteína, se investigó el efecto de dos mutantes nm23-H1 en la actividad PDE de h-PRUNE. Estos mutantes proteicos son nm23H1-P96S, capaz de interaccionar físicamente con h-PRUNE, y nm23H1-S120G, que no interacciona con h-PRUNE (Reymond et al., 1999); ambos mutantes se transfectaron en células de cáncer de mama (MDA-435) y

son capaces de suprimir el efecto anti-motilidad endógeno de la proteína nm23-H1 de tipo salvaje (Frije et al., 1997, Mac Donald et al., 1996).

Además, se mostró que las células de cáncer de mama que sobreexpresan h-PRUNE en un sistema de alta expresión de nm23, tal como nm23-H1-S120G, tienen una motilidad celular menor en comparación con células que sobreexpresan h-PRUNE en un sistema nm23-H1-P96S.

Así, se demostró además que la interacción física entre estas dos proteínas puede ser responsable de la estimulación de la motilidad. Además, el clon h-PRUNE-nm23-H1-S120G tiene una actividad PDE casi un 66% menor comparado con el valor de PDE observado en el clon que sobreexpresa h-PRUNE y nm23-H1-P96S (figura 4, panel B), indicando así definitivamente una correlación entre los efectos de la interacción proteína-proteína, la actividad PDE de AMPc de h-PRUNE y la motilidad celular.

Con el fin de entender si los inhibidores conocidos de PDE eran capaces de funcionar selectivamente frente a la actividad PDE de h-PRUNE, se ensayó un conjunto de 8 inhibidores de PDE y se descubrió que dipiridamol es capaz de inhibir la actividad PDE de h-PRUNE con un valor CI_{50} significativo.

Además, el uso de dipiridamol reduce significativamente la motilidad de los clones de mama estables h-PRUNE y en menor medida los clones que sobreexpresan h-PRUNE Δ (figura 5, panel B). Es una opinión común que los anti-coagulantes tales como dipiridamol y fármacos similares ejercen su función interfiriendo con la activación de la ruta de coagulación sanguínea mediante la inhibición de la adhesión de las células a las paredes de los capilares. A la vista de los resultados indicados aquí, es razonable pensar que el uso de dipiridamol podría representar un fármaco de prevención y tratamiento para metástasis de cáncer de mama diseminadas.

Además, los datos observados *in vitro* en la activación de la motilidad celular se confirmaron *in vivo* usando un número significativo de tejidos de cáncer de mama de pacientes TxNxM1. En 59 tumores de casos que presentan metástasis distales, se encontró que h-PRUNE estaba amplificada en el número de copias y sobreexpresada en 22 casos (37%), mientras que se encontró que nm23-H1 estaba expresada a niveles menores en todos los casos analizados (figura 6, paneles B, C, D).

Los datos preliminares indican un papel pronóstico negativo de h-PRUNE en cáncer de mama como se deduce por una disminución estadísticamente significativa de la proporción de supervivencia global entre pacientes con sobreexpresión de h-PRUNE. Los datos presentados indican que h-PRUNE regula al alza genes implicados en metástasis y su actividad *in vivo* incrementa el riesgo de un comportamiento más agresivo del tumor, contribuyendo así negativamente al resultado clínico en pacientes con cáncer de mama. Los resultados indicados tienen consecuencias farmacológicas importantes, como la posibilidad de proporcionar fármacos capaces de inhibir selectivamente la actividad PDE de h-PRUNE para usarse en el tratamiento de carcinoma de mama con el fin de bloquear la función de malignidad pro-metastásica de h-PRUNE. Además, 11 genes implicados en los procesos de oncogénesis y metástasis, cuya expresión estaba alterada en MDA-H1-177-PRUNE (clon #8) de mama si se compara con el clon MDA-H1-177, se analizaron por expresión en matriz y se validaron por PCR en Tiempo Real. Los resultados presentados son evidencias adicionales de que la agresividad y potencial metastásico de la línea celular de cáncer de mama MDA están correlacionados con la sobreexpresión de h-PRUNE (ejemplo 2).

Globalmente, estos resultados subrayan el papel de h-PRUNE en la estimulación de la motilidad celular y metástasis influyendo negativamente en la función anti-metastásica de nm23-H1. El modelo empleado para estudiar el papel de h-PRUNE en la progresión del cáncer requiere generalmente la amplificación en células tumorales.

La amplificación da lugar a una actividad PDE de h-PRUNE incrementada en el compartimento citoplásmico, influyendo así negativamente en la función supresora de metástasis de nm23. La activación de la actividad PDE de h-PRUNE se debe a una interacción física con la proteína nm23-H1; la formación del complejo resulta en una disminución sustancial del nivel de la forma libre de nm23-H1, influyendo así en la proliferación celular, motilidad celular y procesos metastásicos (figura 7).

EJEMPLO 3: Estudio del papel de la sobreexpresión de h-PRUNE en el diagnóstico de carcinoma de mama invasivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

En este estudio se incluyeron pacientes con un diagnóstico de carcinoma de mama confirmado por examen histológico. Los casos se recuperaron de dos archivos del Hospital Universitario de Basilea en Suiza con la aprobación del Comité de Ética local y del Instituto de Patología de la Universidad de Sassari, respectivamente. El primer archivo incluyó 1.531 carcinomas ductales invasivos, 310 carcinomas lobulares invasivos, 69 carcinomas mucinosos, 65 carcinomas tubulares, 48 carcinomas medulares y 86 tipos adicionales de carcinomas invasivos. Estuvieron disponibles así muestras de tumor incluidas en parafina fijadas con formalina

del Instituto de Patología, Hospital Universitario de Basilea; el Instituto para Patología Clínica, Basilea; y el Hospital Triemli, Zurich. El segundo archivo incluyó 307 carcinomas ductales invasivos, 69 carcinomas lobulares invasivos, 12 carcinomas mucinosos y 24 tipos adicionales de carcinomas invasivos.

5 Todas las características clínico-patológicas para cada paciente, incluyendo el estadio de la enfermedad en el diagnóstico, terapia, recaída, supervivencia sin enfermedad, y tiempo del último control, se obtuvieron de los registros de Basilea y Sassari.

10 El estadio patológico, diámetro del tumor y estado ganglionar se obtuvieron de los informes primarios de patología. Los datos clínicos estuvieron disponibles después de un seguimiento de 10 años para 2.299 casos (media, 56 meses; intervalo 2-120 meses); los datos clínicos después de un seguimiento de 15 años estuvieron disponibles para 222 pacientes (media, 138 meses; intervalo 121-176 meses). El uso de las muestras y los datos para este estudio se aprobó por los Comités de Ética del Hospital Universitario de Basilea y la Universidad de Sassari.

Matriz Múltiple de Tejidos (TMA)

15 La construcción de TMA se ha descrito previamente (Simon et al., 2001; Simon et al., 2002). Resumiendo, se perforaron cilindros de tejido con un diámetro de 0,6 mm de áreas tumorales representativas de un donante de tejido usando un instrumento de precisión robótico semiautomático y se pusieron en 6 bloques de parafina diferentes, conteniendo cada uno entre 342 y 522 muestras individuales. Se transfirieron cuatro secciones micrométricas de los bloques TMA resultantes a un Sistema de sección recubierto (Instrumedics Inc., Hackensack, Nueva Jersey). La presencia de tejido tumoral en la muestra en múltiples matrices se verificó por tinción con hematoxilina-eosina. Las micromatrices de tejido incluyeron al menos dos secciones de diferentes áreas se cáncer de mama de cada paciente así como tejido normal como control.

Inmunohistoquímica (IHC)

25 Las secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas con formalina, se inmuno-tiñeron usando anticuerpos monoclonal específico anti-h-PRUNE (clon 4G3/4, frente a una proteína de fusión recombinante de 1 a 351 aminoácidos; Apotech Corporation, CH) y anti-nm23-H1 (clon K73, específico de la isoforma -H1; Apotech Corporation, CH). El análisis inmunohistoquímico se realizó usando el Kit Vectastain Elite ABC (vector Laboratories Inc.) según las instrucciones del fabricante y según un protocolo conocido (Forus et al., 2001; D'angelo et al., 2003).

30 Se establecieron protocolos de IHC optimizados por la tinción de secciones histopatológicas control representativas de tejido de mama sano. En tejido de mama normal, la proteína nm23-H1 se expresaba homogéneamente, mientras que la expresión de h-PRUNE estaba ausente o en baja intensidad.

35 La tinción se evaluó semicuantitativamente usando 54 muestras normales situadas aleatoriamente en duplicado a lo largo de múltiples matrices; la intensidad y distribución de la tinción inmunohistoquímica se usó para clasificar las muestras de tumor como positiva (tinción fuerte [+++] a moderada [++], distribuida homogéneamente o presentada por una gran mayoría de las células tumorales) o negativa (tinción ausente o débil [+]) para la expresión tanto de h-PRUNE como de nm23.

Análisis FISH

Se trataron secciones de TMA incluidas en parafina según protocolos conocidos (Simon et al., 2002; Muresu et al., 2002).

40 El clon PAC 279-H19, que abarca la región del gen de h-PRUNE localizada en el cromosoma 1q21.3 y el clon DNA/BAC, específico para el gen de nm23-H1 localizado en el cromosoma 17q21.3, se marcaron por desplazamiento de mella con dUTP-CY3 (rojo) y se usaron como sondas. Los clones pUC177, correspondiente a la región peri-centromérica en el cromosoma 1q12 y pZ17-14, correspondiente a la región centromérica del cromosoma 17, se marcaron por desplazamiento de mella con dCTP-FluorX (verde) y se usaron como controles.

45 Los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI). Se realizaron dos experimentos distintos para cada caso.

50 Las imágenes digitales se capturaron usando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX-61 equipado con los filtros apropiados para la excitación de DAPI, Cy3 (naranja) o FluorX (Vysis) y un vídeo COHU y software Cytovision. Las señales de hibridación en al menos 100 núcleos intactos, bien conservados y no superpuestos, se evaluaron por al menos dos investigadores.

Análisis estadístico

Las variables y categorías siguientes se incluyeron en este estudio: tamaño del tumor primario patológico (pT), estado ganglionar patológico (pN), presencia de metástasis (M), estado del receptor de estrógeno y progesterona (ER y PR, respectivamente), edad en el diagnóstico, tipo histológico de tumor y supervivencia

global (calculada empezando en el momento de la operación quirúrgica). En particular, los estados ganglionar y de receptor no estuvieron disponibles en un gran número de los casos porque estas variables no se requerían para la inclusión de los pacientes en el estudio.

Los análisis de los datos de supervivencia se realizaron con el paquete estadístico Egret (versión 2.0.3). El modelo de regresión de Cox se realizó usando incidencia de mortalidad bruta y mortalidad específica de tumor como censura.

El tiempo de supervivencia global se expresó en meses y las variables independientes (h-PRUNE, nm23-H1, pT, pN) se estratificaron en tres grupos de edad: 23-44 (N=252), 45-64 (N=1.146) y 65-98 (N=1.123).

Las estimaciones de Kaplan Meier se ejecutaron por subdivisión de los datos inmunohistoquímicos de h-PRUNE y nm23-H1.

Usando el ensayo de la Chi Cuadrado de Pearson, se realizó la evaluación de la expresión de h-PRUNE y nm23-H1 en asociación con los parámetros patológicos (tipo histológico del tumor, pT, pN, M, ER, PR). El coeficiente exacto para el análisis de proporción de la muestra se calculó para determinar todos los parámetros significativos (por debajo del nivel 0,05). Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS/7.5 para Windows.

RESULTADOS

La evaluación de los niveles de expresión de h-PRUNE y nm23-H1, así como el número de copias cromosómico de h-PRUNE, se realizó en secciones TMA de los tejidos archivados de 2.109 pacientes con un diagnóstico de carcinoma de mama histológicamente probado y datos disponibles de seguimiento. Se evaluaron secciones adicionales TMA de 412 pacientes con cáncer de mama (es decir, cuya clasificación TNM estaba disponible) para inmunotinción h-prune. La mayoría de los pacientes tenía un carcinoma ductal como la variante histológica (1.883; 73%) y tenían >60 años de edad (1.425; 57%) en el momento del diagnóstico. Los datos de los seguimientos clínicos para cada paciente estaban disponibles, abarcando un periodo medio de 59 meses (intervalo 2-176); la mayoría de los pacientes todavía estaban vivos (1.716; 68%) y sólo unos pocos casos se perdieron en el seguimiento (12; 0,5%) en el momento de este estudio. La expresión de las proteínas h-PRUNE y nm23-H1 se evaluó por análisis inmunohistoquímico usando dos anticuerpos específicos (clon Ab monoclonal 4G3/4 y K73, respectivamente). La Figura 9 (paneles A y B) muestra ejemplos representativos de tinción para la proteína h-PRUNE en una serie de múltiples matrices de tejido.

Se observó una inmunotinción citoplásmica fuertemente positiva para la proteína h-PRUNE (referida como h-PRUNE+) en la mayoría (1.340; 54%) de los 2.463 tumores ensayados (58 casos no se evaluaron); se observó una inmunotinción citoplásmica positiva para la proteína nm23-H1 en 615 (30%) de los 2.061 tumores ensayados. Entre los 2.061 tejidos tumorales evaluados para la expresión de h-PRUNE y nm23-H1, se observó una distribución inversa de inmunotinción positiva [1.180 (57%) carcinomas de mama fueron h-PRUNE+, mientras 615 (30%) fueron nm23-H1+]. En la tabla 3 se indican los resultados de los análisis inmunohistoquímicos (IHC) para las proteínas h-PRUNE y nm23-H1 presentes en carcinomas de mama invasivos. No se observó una correlación estadística entre la expresión de h-PRUNE y nm23-H1.

Tabla 3

Análisis IHC	nm23-H1		Total	P
	Positivo	Negativo		
h-PRUNE positivo	359 (30%)	821 (70%)	1.180	0,219
h-PRUNE negativo	256 (29%)	625 (71%)	881	

La distribución de la expresión de la proteína h-PRUNE y nm23-H1 se evaluó en un subgrupo de pacientes (2.109 pacientes con cáncer de mama) tomando como base los diferentes parámetros histopatológicos. No se observó una correlación significativa entre la expresión de h-PRUNE o nm23-H1 y el tipo de tumor (ductal frente a globular), pT, pN, reactividad ER y PR (tabla 4).

Tabla 4

Parámetros tumorales	h-prune			h-prune		Total	P
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		

Tamaño del tumor primario	T ₁	319 (42%)	440 (58%)	T ₁₋₂	765 (44%)	985 (56%)	1.750	0,63
	T ₂	446 (45%)	545 (55%)					
	T ₃	54 (45%)	65 (55%)	T ₃₋₄	160 (45%)	196 (55%)	356	
	T ₄	106 (45%)	131 (55%)					
Grado	G1	211 (40%)	323 (60%)	G ₁₋₂	584 (41%)	831 (59%)	1.415	0,13
	G2	373 (42%)	508 (58%)					
	G3	336 (48%)	357 (52%)	G ₃	336 (48%)	357 (52%)	693	
Tipo histológico	ductal	621 (42%)	865 (58%)				1.486	0,42
	lobular	117 (40%)	174 (60%)				291	
	otro	125 (49%)	131 (51%)				256	
ER	+	649 (42%)	882 (58%)				1.531	0,37
	-	204 (44%)	259 (56%)				463	
PR	+	279 (43%)	369 (57%)				648	0,34
	-	523 (42%)	714 (58%)				1.237	

Los análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se realizaron en 1.016 tumores de pacientes con cáncer de mama. El clon PAC (279-H19) correspondiente a la región genómica de h-PRUNE en el cromosoma 1q21.3 y un clon control correspondiente a la región peri-centromérica en el cromosoma 1q12 se usaron como sondas. Se encontraron múltiples señales FISH en 1q21.3 en >20% de los núcleos analizados en 173 (17%) casos (Tabla 5; Figura 9C). Considerando los casos con al menos dos copias génicas para centrómero y carcinomas de mama con polisomía del cromosoma 1 completo debido a la presencia de múltiples señales de centrómero, se observó un nivel muy bajo de amplificación de h-PRUNE en el cromosoma 1q21.3 (68 casos de 1.016; 6,7%). Esto indica que el mecanismo de amplificación génica ocurre en un número bajo de casos de cáncer de mama. El incremento en el número de copias de ADN en la región genómica de h-prune está asociado significativamente con una correlación estadística efectiva con la presencia de una inmunotinción positiva de h-prune en tumores con trisomía (p=0,027) o tetrasomía (p=0,033) (Tabla 5). Sin embargo, la baja frecuencia de dicha alteración citogenética sugiere que las rutas patogenéticas implicadas alternativas determinan la activación de h-PRUNE y la expresión somática incrementada de h-prune en cáncer de mama.

Tabla 5

Marcador	No.	Disomía	%	Trisomía	%	P	Tetrasomía	%	P
h-prune negativo	440	386	88	54	12		21	4,8	
h-prune positivo	576	457	79	119	21	0,027	47	8,2	0,033
Total	1.016	843	83	173	17		68	6,7	

ensayados									
-----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

*: múltiples señales en >20% de los núcleos analizados después de hibridación con un clon PAC correspondiente al gen *h-prune* en el cromosoma 1q21.3; **: incluyendo también la amplificación del cromosoma 1 completo; No: número de casos; P: ensayo de Chi cuadrado.

5 Correlación entre h-prune y los parámetros clínico-patológicos

Para evaluar el papel clínico-patológico de la sobreexpresión de h-PRUNE en cáncer de mama, se realizaron análisis inmunohistoquímicos en tumores de mama primarios invasivos usando la serie de 2.109 casos de cáncer de mama (con toda la información patológica de tumor primario y datos de hasta 15 años de seguimiento clínico; Tabla 4) y la serie de 412 casos de cáncer de mama (con una clasificación TNM completa y datos de hasta 10 años de seguimiento clínico; Tabla 6).

Tabla 6

TNM		h-prune			h-prune		Total	P
		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		
Tamaño del tumor	T ₁	83 (58%)	59 (42%)	T ₁₋₂	170 (58%)	122 (42%)	292	0,099
	T ₂	87 (58%)	63 (42%)					
	T ₃	11 (44%)	14 (56%)	T ₃₋₄	26 (47%)	29 (53%)	55	
	T ₄	15 (50%)	15 (50%)					
Estado ganglionar	N0	125 (71%)	50 (29%)	N ₀₋₁	230 (68%)	109 (32%)	329	0,017
	N1	105 (64%)	59 (36%)					
	N2	6 (30%)	14 (70%)	N ₂₋₃	6 (27%)	16 (73%)	22	
	N3	-	2 (100%)					
Metástasis	M0	210 (67%)	103 (33%)				313	0,029
	M1	14 (36%)	25 (64%)				39	

P: ensayo de la Chi cuadrado de Pearson; dos colas; intervalo de confianza del 95%;

Las secciones tumorales del subconjunto de 2.109 pacientes también se investigaron para expresión de nm23-H1 por análisis inmunohistoquímico (Tabla 7).

Tabla 7

Parámetro tumoral		nm23-H1			nm23-H1		Total	P
		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		
Tamaño	T ₁	489 (68%)	226 (32%)	T ₁₋₂	1.162 (69%)	517 (31%)	1.679	0,27
	T ₂	673 (70%)	291 (30%)					
	T ₃	86 (45%)	31 (26%)	T ₃₋₄	254 (73%)	94 (27%)	348	
	T ₄	168 (73%)	63 (27%)					
Grado	G1	360 (69%)	159 (31%)	G ₁₋₂	937 (68%)	434 (32%)	1.371	0,14

	G2	577 (68%)	275 (32%)					
	G3	501 (74%)	179 (26%)	G ₃	501 (74%)	179 (26%)	680	
Histología	ductal	1.031 (69%)	455 (31%)				1.486	0,68
	lobular	201 (69%)	90 (31%)				291	
	otro	167 (65%)	89 (35%)				256	
ER	positivo	1.076 (71%)	447 (29%)				1.523	0,41
	negativo	329 (70%)	142 (30%)				471	
PR	positivo	449 (69%)	203 (31%)				652	0,27
	negativo	871 (71%)	362 (29%)				1.233	

P: ensayo de la Chi cuadrado de Pearson; dos colas; intervalo de confianza del 95%; ER, estado del receptor de estrógeno; PR, estado del receptor de progesterona.

- Este último subconjunto no fue informativo para la presencia de metástasis distantes; la información sobre el estado ganglionar estaba disponible parcialmente para dichos pacientes con cáncer de mama en términos de presencia (N+) o ausencia (N-) de implicación de los ganglios linfáticos (se observó una inmunotinción h-prune positiva en 210/482 [44%] de casos N+ y 179/496 [36%] de casos N-, $P=0,109$; de forma análoga, no se encontró ninguna correlación estadística para la inmunotinción de nm23-H1+ en estos dos grupos). Así, el valor pronóstico de cada parámetro se determinó tomando como base los análisis de supervivencia.
- En diciembre de 2002, 782 (31%) pacientes murieron debido a la enfermedad, siendo la supervivencia media del total de 59 meses, con un seguimiento de los pacientes vivos de 72 meses. Usando el ensayo de la Chi cuadrado de Pearson, se evaluaron las inmunotinciones de h-prune y nm23-H1 para asociación con varios parámetros patológicos: tipo histológico, clasificación del tumor (según han estandarizado Elston y Ellis), pT, ER, PR y (cuando estaba disponible) pN y M. No se observó ninguna correlación estadísticamente significativa entre la expresión de h-prune o nm23-H1 y el tipo de tumor (ductal frente a lobular), grado histológico, pT, reactividad ER y PR (Tabla 4). En cambio, la inmunotinción h-prune positiva se correlacionó significativamente con el estado ganglionar avanzado (grupo N₂-N₃; $p=0,017$) o presencia de metástasis distantes (grupo M₁; $p=0,029$) entre la serie de 412 pacientes con cáncer de mama (Tabla 6). Los análisis estadísticos de esta serie confirmaron la ausencia de cualquier asociación significativa entre la sobreexpresión de h-prune y el tamaño del tumor primario (Tabla 6).

Usando el modelo de Cox ajustado según el estadio de la enfermedad y la edad en el diagnóstico, no se observaron valores pronóstico de la sobreexpresión de h-prune (HR 0,61, CI 95% 0,31-1,18, $p=0,144$) o nm23-H1 (RR 0,98, CI 95% 0,90-1,07, $p=0,158$) (Tabla 8 y 9; figura 10).

Tabla 8

Análisis estadístico en 2.109 pacientes con cáncer de mama			
Marcador*	Proporción de Riesgo	CI 95%	P
h-PRUNE (negativo frente a positivo)	0,93	0,78-1,09	0,369
nm23-H1 (negativo frente a positivo)	0,98	0,90-1,07	0,158
Tamaño del tumor (pT ₁ frente a pT ₂₋₄)	0,81	0,68-0,96	0,017

Grado del tumor (G ₁ frente a G ₂₋₃)	0,70	0,59-0,83	0,001
---	------	-----------	-------

Tabla 9

Marcador*	Proporción de Riesgo	CI 95%	P
h-prune (negativo frente a positivo)	0,61	0,31-1,18	0,144
Tamaño del tumor (pT ₁₋₄)	12,49	4,10-38,02	<0,001
Estado ganglionar (pN ₀₋₃)	2,43	1,34-4,40	0,003

- 5 Globalmente, la clasificación del tumor, tamaño del tumor primario y estado ganglionar axilar son los parámetros que permanecen correlacionados más de cerca con el pronóstico en esta serie de pacientes con cáncer de mama (Tabla 8 y 9).

En conclusión, el marcador h-prune está por lo tanto asociado con el estado de carcinoma de mama avanzado y puede considerarse un nuevo marcador del estado de los ganglios linfáticos en el paso del estado N1 a N2.

- 10 **EJEMPLO 4:** Estudio del uso de IC261 que inhibe la fosforilación de NM23 H1 y H2 y la formación del complejo con h-prune causando una inhibición *in vivo* de la actividad PDE de de AMPc de h-prune.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio que muestra que *in vitro* e *in vivo* las proteínas nm23H1 y H2 son fosforiladas por una Caseína Quinasa 1δ y que la fosforilación media la formación del complejo (figura 11).

Métodos - *in vitro*

- 15 Fosforilación *in vitro*, ensayo de interacción y generación de anticuerpo fosfo-nm23. Se incubaron nm23 recombinante purificada y los mutantes de ésta en una cantidad de 100 ng en tampón de reacción estándar CKI como se describe en Garzia et al. (2003) durante 1 hora a 30°C. Posteriormente, las proteínas nm23 fosforiladas se incubaron con h-prune en tampón estándar co-IP suplementado con 5% BSA. La proteína h-prune se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal, A59, frente a un péptido en la región del resto III de h-prune. La presencia de los diferentes mutantes de nm23 fosforilada o no unida a h-prune se detectó por análisis posteriores de transferencia Western en los inmunoprecipitados, realizados con anticuerpo anti-cola de His (Qiagen) que detecta al mismo tiempo las proteínas h-prune y nm23.

- 25 El anticuerpo policlonal K73 se obtuvo usando como inmunógeno un fosfopéptido N115 a E127, fosforilado en la posición S122, de la proteína nm23-H1, el antisero se usó después de purificación de IgG en la columna de la proteína resultante A en un anticuerpo no selectivo y purificación por afinidad adicional del fosfopéptido (NIHGSVDKSAE) usado como inmunógeno. Este segundo procedimiento se realizó mediante entrecruzamiento de 1 mg de fosfolípido desalado disuelto en DMSO con la resina Affi-gel 25 (biorad) según el protocolo del fabricante. La resina acoplada se usó para la purificación por afinidad usando suero de conejos inmunizados con el fosforilado y ya purificado e IgG enriquecido en péptido (anticuerpo policlonal K73), aplicado directamente en la columna de péptido unido a Affigel, hasta que el anticuerpo fue adsorbido por la columna. La columna se lavó para cada ml de columna con 10 ml de 100 mM Tris-HCl, pH 8, 10 ml de 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8, respectivamente. La elución se realizó con 0,1 M glicina, pH 3.

MÉTODOS-IN VIVO

Digestión de la proteína in situ y Análisis MALDI

- 35 La tripsina, ditiotretitol y yodoacetamida se adquirieron en Sigma. El ácido trifluoroacético (TFA)-HPLC, 99% puro, es de Carlo Erba. Todos los demás reactivos y disolventes con la más alta pureza estaban disponibles en Baker.

- 40 El análisis se realizó en proteínas teñidas con azul de Coomassie escindidas de un gel SDS, lavadas dos veces en gradiente agua milliQ. Las manchas escindidas se lavaron en primer lugar con CAN y después 0,1 M bicarbonato de amonio. La disolución se eliminó y el lavado se repitió dos veces. Las muestras de proteína se redujeron por incubación en ditiotretitol (DTT) durante 45 minutos a 56°C. El tampón reductor se eliminó por lavado con ACN/AMBIC como se describe. Las cisteínas libres se alquilaron por incubación en 55 mM yodoacetamida durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las partículas de gel se lavaron con

bicarbonato de amonio y ACN. La digestión enzimática se realizó con tripsina (12,5 ng/μl) en 10 mM bicarbonato de amonio, pH 8,0. Las porciones de gel se incubaron a 4°C durante 4 horas. La disolución de tripsina se eliminó y se añadió una nueva alícuota de disolución de tampón. Las muestras se incubaron durante 18 horas a 37°C. Se usó un volumen de reacción mínimo, suficiente para la rehidratación completa del gel. Los péptidos se extrajeron lavando las partículas de gel con 10 mM bicarbonato de amonio y 0,1% TFA en 50% ACN a temperatura ambiente.

Los espectros de masas MALDI-TOF se registraron usando un instrumento Voyager DE-PRO de Applied Biosystems y un nuevo espectrómetro de masas Voyager MALDI TOF/TOF. Una mezcla de disolución de péptido y ácido alfa-cianohidroxil cinámico (10 mg/ml en ACN/0,1% TFA en agua, 2:1, v/v) se aplicó a la placa metálica y se secó a temperatura ambiente. Se realizó calibración de masa usando un estándar externo. Los primeros datos se analizaron usando un software suministrado por los fabricantes y se indicaron como masas monoisotópicas.

Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que en ausencia de fosforilación, las proteínas nm23H1 y nm23H2 en los sitios no forman el complejo con h-prune.

Estudio de motilidad celular en clones que sobreexpresan h-prune.

Estudio de la inhibición por IC261.

El clon celular MDA-PRUNE #3 y MDA-PRUNE #4 y las células MDA-435 C-100 (células control) se trataron con 8 μM dipiridamol ó 50 μM IC261 (inhibidor de Caseína Quinasa 1 δ y ε; Calbiochem, Nottingham, UK) durante 24 horas u 8 horas, respectivamente. Los ensayos de motilidad celular se aplicaron a células "en cámaras Boyden " usando 0,5% Suero Fetal FCS concentración como quimio-atrayente. Las células se contaron en microscopio y se aplicó un análisis estadístico para conseguir los datos (Figura 13A).

Las células se contaron en microscopio, los valores de motilidad celular son medias aritméticas ± SD para cinco ensayos independientes, cada uno realizado en duplicado (Clones MDA prune #3 y #4/clones MDA prune #3 y #4 con IC261 p<0,002).

Ensayo de motilidad celular in vitro

Se consiguieron clones MDA estables que sobreexpresan h-prune como se describe en D'Angelo et al., 2004. La línea celular de cáncer de mama control MDA-C100 se usó en el ensayo de motilidad celular (Leone et al., 1993a; Leone et al., 1993b). La motilidad celular se determinó usando la tecnología trans-pocillo (6 pocillos, Corning-Costar) usando 0,5% FCS, concentraciones finales como quimio-atrayentes (véase D'Angelo et al., 2004). El ensayo de inhibición de motilidad *in vitro* de h-prune se realizó como sigue. MDA-prune (clones #3 y #4) y MDA-C100 se incubaron con dipiridamol (8 μM, una concentración 10 veces mayor respecto a su IC_{50}) durante 24 h para obtener la inactivación completa de la enzima, las mismas líneas celulares se incubaron con IC261 a una concentración de 50 μM durante 8 h, condición en la que puede observarse la mayor reducción de la fosforilación de nm23 sin señal de muerte celular y el ensayo de motilidad se repitió como se ha descrito anteriormente. Todos los resultados son la media de cinco experimentos independientes, cada uno realizado en duplicado. El análisis estadístico se realizó con el método del ensayo de la T deteriorado disponible en el sitio <http://www.graphpad.com/quickcals/index.cfm>, los valores con una $P \leq 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Estudio del contenido total de PDE de AMPc en células que sobreexpresan h-prune y sometidas a administración de IC261.

Las células MDA-Prune#4 se dejaron como tales o se trataron con 50 μM IC261 durante 8 horas. Las células se lisaron y se ensayaron para su contenido total de PDE de AMPc usando el método del "ensayo de centelleo por proximidad" de Amersham. En presencia de IC261 no se detectó ninguna alteración de la actividad fosfodiesterasa de AMPc de h-prune recombinante (Figura 13 B, derecha) mientras que se destaca la capacidad de disminuir de forma sensible el contenido total de actividad PDE de AMPc en el clon MDA prune #4 que sobreexpresa prune, lo que muestra que el complejo h-prune y nm23 es responsable del incremento de PDE de AMPc celular (figura 13B, izquierda) y que dicho complejo puede inhibirse por IC261 *in vivo*.

A. Ensayo de actividad PDE frente a AMPc

La actividad PDE se midió con un ensayo de centello por proximidad (Amersham-Pharmacia Biotech). Las muestras, 20 μg de extracto total de MDA-prune#4 y extracto de MDA-C100 usada como control, se incubaron a 30°C en 100 μl de tampón de ensayo (50 mM Tris-HCl [pH 7,4], 8,3 mM $MgCl_2$, 1,7 mM EGTA) que contiene las concentraciones de AMPc deseadas como sustrato (proporción de no marcado frente a marcado con 3H , 3:1). Todas las reacciones, incluyendo los blancos sólo con tampón, se realizaron en triplicado y se dejó que procedieran durante un tiempo de incubación que proporciona un recambio de sustrato (determinado empíricamente) < 25%. Las reacciones se pararon añadiendo 50 μl de perlas SPA de silicato de Itrio

(Amersham). Las actividades enzimáticas para la cantidad de producto no marcado encontrado se calcularon según el protocolo del fabricante. El tratamiento con IC261 fue el mismo que para el ensayo de motilidad descrito anteriormente.

RESULTADOS

- 5 Los resultados obtenidos muestran que mediante la inhibición de la Caseína Quinasa 1 δ usando IC261 es posible inhibir la fosforilación de nm23-H1 y H2 y por lo tanto la unión con la proteína h-prune *in vivo*. Usando este fármaco es posible por lo tanto inhibir la formación del complejo h-prune-nm23, siendo este último dependiente de las fosforilaciones en la región 8120, 8122, 8125 (NIIHGSDSVESAEKE) por la Caseína Quinasa I. Este estudio permite el uso de IC261 para inhibir la unión de nm23H1 y H2 a h-prune e inhibir la motilidad celular inducida por el complejo proteico.

- 10 Un nuevo procedimiento puede prever el uso de nuevos péptidos permeables en la célula y competitivos para la unión de h-prune, quitando cuota de nm23-H1 y H2 fosforiladas *in vivo*, cuya secuencia deriva de la secuencia de aminoácidos de nm23-H1 y H2 en el intervalo de las serinas 8120, 8122 y 8125 (ejemplo H1; NIIHGSDSVESAEKE seguido de la secuencia peptídica permeable de la región de la proteína HIV TAT; 15 GGGYGRKKRRQRRR; 95% de pureza sintetizada por PRIMM). Dichos péptidos o similares son capaces de competir con la fosforilación de la Caseína Quinasa I *in vivo*, en las proteínas H1 y H2 de tipo salvaje y reducir la cuota de nm23 fosforilada responsable de la formación del complejo con h-prune e incrementar la actividad PDE de AMPc de h-prune en la célula y finalmente inducir la motilidad celular. También, se sintetizó un péptido control con la secuencia de reconocimiento de la Caseína Quinasa I desorganizada referido como (H1-: 20 SDEIGKVSSENIAHSE seguido de la secuencia peptídica permeable GGGYGRKKRRQRRR). Usando esta tecnología es posible dirigir más específicamente la inhibición de la interacción entre h-prune y nm23 *in vivo*.

EJEMPLO 5: Preparación de anticuerpo monoclonal frente a h-prune (4G3/4, depositado en el CBA en Génova el 10/12/2004).

- 25 La proteína h-prune, fusionada en el extremo N terminal con una cola y producida en *E. coli* mediante un vector pMaltosa, se purificó por gel. Los ratones se inmunizaron durante 5 semanas (100 μ g de proteína por inyección) y el bazo se extirpó para preparar algunos cultivos de hibridoma. Fueron necesarios aproximadamente 2 mg de antígeno proteico para la inmunización y el análisis. Primm puede proporcionar péptidos sintéticos conjugados para la inmunización en el caso de que la proteína no estuviera disponible. El desarrollo y producción de los anticuerpos monoclonales se llevaron a cabo en diferentes fases:

- 30 - síntesis de péptidos y conjugación de los péptidos (cuando sea necesario).
 - síntesis de aproximadamente 10 mg de péptido, pureza < 70%
 - conjugación de 3-4 mg del péptido con una proteína vehicular (como antígeno)
 - conjugación de 1-2 mg de péptido con una proteína vehicular diferente para cribado por ELISA.

Fase I (1,5 meses):

- 35 Inmunización de 3 ratones BALB/c con el antígeno. Procedimiento para la titulación cuantitativa de inmunoglobulinas específicas en los sueros de los animales inmunizados. Ensayo ELISA de la respuesta inmune y selección de animales para la fusión posterior de células del bazo.

Fase II (2 meses)

- 40 Esplenectomía y fusión de los esplenocitos con células de mielosis; selección de hibridomas mediante ELISA, congelación de los clones más positivos.

Fase III (1-1,5 meses)

Clonación y subclonación de clones positivos (1/2 ó 4) mediante dilución limitante. Congelación de los hibridomas (2 alícuotas/clon). Ensayos de viabilidad, productividad y estabilidad después de descongelar una alícuota.

- 45 Fase IV (1-1,5 meses).

Producción y purificación de 0,5-4 mg de cualquier mAb en cultivo celular a partir de 0,5 l de sobrenadante.

- 50 El hibridoma seleccionado produce IgM murinas que se purificaron a partir del sobrenadante del cultivo de hibridomas. La cantidad de mAb empleada para inmunocitoquímica es igual a una disolución de mAb diluida 1:100 a 300 μ g/ml. El anticuerpo funciona y reconoce prunes tanto humanas como murinas. La detección de la proteína endógena se realiza usando ICC, IF y transferencia Western (Figura 14).

La purificación del anticuerpo se realizó según el protocolo de purificación de IgM siguiente: el sobrenadante de las células lisadas se sometió a un flujo de 1 ml/min. La HiTrap IgM se equilibró (1 ml, Amersham-Pharmacia) con 5 volúmenes de 20 mM fosfato de sodio, pH 7,4, 0,8 M (NH₄)₂SO₄ (Tampón A); 5 volúmenes de 20 mM fosfato de sodio, pH 7,4 (Tampón B); 5 volúmenes de 20 mM fosfato de sodio, pH 7,4, 30% isopropanol (Tampón C). Los ensayos ELISA se realizaron frente al péptido y proteína completa purificada para determinar la especificidad del antígeno producido y la selección de clones.

5

Introducir el sobrenadante de los hibridomas en la columna y repetir tres veces el proceso de elución con los tres tampones, de manera que se dispone: lavado de columna con 15 volúmenes del Tampón A (15 ml); elución de la columna con 12 volúmenes (12 ml) de Tampón B (recogida de fracciones de 1 ml); lectura de la absorbancia de las fracciones a 280 nm y recogida de las fracciones con absorbancia < 0,1 D.O.; diálisis de las fracciones con tubos con un punto de corte entre 12.000-14.000 frente a tampón 1X PBS toda la noche a 4°C. Para regenerar la columna, usar 7 ml de tampón C. Almacenamiento de la columna en tampón B + 20% etanol.

10

Bibliografia

- Aravind, I. y Koonin, E.V. (1998). Trends in biochemical sciences 23,17-19.
- Timmons, L. y Shearn, A., (1996). Genetics 144, 1589-1600.
- Lombardi, D., Lacombe, M.L. y Paggi, M.G., (2000). J. Cell Physiol 182, 144-149.
- Keen, J.C., Davidson, N.E., (2003). Cancer 97, 825-833.
- Domchek, S.M., Weber, B.L, (2002). Curr Opin Oncol 14, 589-593.
- Kuru, B., Camlibel, M., Ali Gulcelik, M., Alagol, H., (2003). J.Surg. Oncol 83, 167-172.
- Morabito, A., Magnani, E., Gion, M., (2003). Clin Breast Cancer 3, 381-390.
- Florenes, V.A, Aamdal, S., Myklebost, O., Maelandsmo, G.M. Bruland, O.S. y Fodstad, O., (1992). Cancer Res 52, 6088-6091.
- Steeg, P.S., (2003). Nat Rev Cancer 3, 55-63.
- Frejje, J.M., Blay, P., Macdonald, N.J., Manrow, King., y Steeg, P.S., (1997). J Biol Chem 272, 5525-5532.
- Hartsough, M.T., Clare, S.E., Mair, M., Elkaloun, AG., Sgroi, D., Osborne, C.K, Clarke, G. y Steeg, P.S. (2001). Cancer Res 61, 2320-2327.

- Freije, J.M., Lawrence J.A., Hollingshead M.G., De la Rosa, A., Narayanan, V., Grever, M., Sausville, E.A, Paull, K, y Steeg P.S. (1997). *Nat Med* 3, 395-401.
- Kantor, J.O., Mc Cormick, B., Steeg, P.S., y Zetter, B.R., (1993) *Cancer Res* 53, 1971-1973.
- Leone A, Flatow, U., Van Houtte K, y Steeg P.S. (1993). *Oncogene* 8, 2325-2333.
- Howlett, A.R., Petersen, O.W., Steeg, P.S. y Bissell M.J. (1994) *J Natl Cancer Inst* 86, 1838-1844.
- Hartsough, M.T., y Steeg P.S., (1998). *Am J Hum Genet* 63, 6 10.
- Lombardi D., L.M.L., Paggi M.G., (2000) *J. Cell Physiol.* 182, 144149.
- Hartsough M.T. y Steeg P.S. (2000). *J. Bioenerg Biomembr* 32, 301-308.
- Mao, H., Liu, H., Fu, X., Fang, Z., Abrams, J., y Worsham, M.J. (2001). *Int J Oncol* 18, 587-591.
- Tseng Y. H., Vicent, D., Zhu, J., Niu, Y., Adeyinka, A., Moyers, J.S., Watson, P.H., y Kahn, C.R (2001). *Cancer Res* 61, 2071-.2079.
- Reymond A, Valorio, S., Merla, G., Al-Maghteh, M., Zuffardi, O., Bulfone A, Ballabio A, y Zollo, M., (1999). *Oncogene* 18, 7244 7252.
- Forus A, D'Angelo A., Henriksen, J., Merla, G., Maelandsmo, G.M. Florenes, Y.A, Olivieri S., Bjerkehagen, B., Meza-Zepeda, L.A., Del Vecchio Blanco, F., Muller, C., Sanvito F., Kononen, J., Nesland, J.M. Fodstad O., Reymond A, Kallioniemi, O.P., Arrigoni G., Ballabio A, Myklebost, O., y Zollo M., (2001). *Oncogene* 20, 6881-6890.
- Altshul, S.F., Madden, T.L., Schaffer A.A., Zhang Z., Miller W., y Lipman, D.J. (1997). *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Notredame C., Higgins D.G., y Heringa J., (2000). *J Mol Biol* 302 205-217.
- Macdonald, N.J., Freije, J.m.p, Stracke, M.L, Manrow R.E., y Steeg, P.S. (1996). *J. Biol Chem* 271, 25107-25116.
- Garzia, L, André A., Amoresano. A., D'Angelo, A., Martusciello R, Cirulli, C., Turumi, T, Marino G., y Zollo M., (2003). *Biotechniques* vol 35, 384-391.
- Fisher D.A, Smith, J.F., Pillar, J.S., St Denis, S.H. y Cheng, J.B. (1998). *J Biol Chem* 273, 15559-15564.

- Leone, A., Seeger R.C., Hong C.C.M., Hu, Y.Y., Arboleda M.J. Brodeur G.M., Stram, D., Slamon D.J., y Steeg, P.S. (1993). *Oncogene* 8, 855-865.
- Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R. y Fukuyama, K (2002). *Proc Natl Acad Sci Usa* 99, 5908-5912.
- Ahn, S., Milner, A. J. Futterer, K, Konopka, M., Ilias, M., Young T.W. y White S,A (2001). *J. Mol Biol* 313, 797, 811.
- Aravind L, y Koonin EV. (1998). *Trends Biochem Sci* 23, 469 472.
- Aravind L., y Koonin EV. (1998). *Nucleic Acids Res* 26, 3746 3752.
- Galperin M.Y., Natale D.A, Aravind L, y Koonin E.V. (1999). *J. Mol Microbiol Biotechnol* 1, 303-305.
- Aravind L., (1999). *In Silico Biol* 1, 69-91.
- Hejna, M.; Raderer M., y Zielinsky, C.C. (1999). *J Natl Cancer Inst* 91, 22-36.
- Stteg, P.S., De la Rosa, A., Flatow, U., Macdonald N.J., Benedictc M., y Leone A., (1993). *Breast Cancer Res Treat* 25, 175-187.
- Wagner, P.D., Steeg, P.S. y Vu, N.D. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9000-9005.
- Simon, R, Nocito, A., Hubscher, T., (2001). *J. Natl Cancer Inst*, 93, 1141-1146.
- Simon, R, Sauter, G., (2002). *Exp Hematol*, 30(12), 1365-1372.
- D'Angelo, A., Garzia, L, Andrè, A., (2003). *Cancer Cell* 2003.
- Muresu, R, Sini, M. C., Cossu, Á., (2002). *Eur J Cancer* 38, 1802 1809.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> zollo, Massimo
 <120> Uso de inhibidores enzimáticos de h-PRUNE para la prevención y tratamiento de las metástasis de tumores que sobreexpresan h-PRUNE
 5 <130> PCT25791

 <150> RM2003 000572
 <151> 11-12-2003
 10 <160> 12

 <170> PatentIn versión 3.2

 <210> 1
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador directo h-PRUNE

 <400> 1
 agagatcttg gacaggcaaa ct 22
 25 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220> .
 30 <223> Cebador inverso h-PRUNE

 <400> 2
 ccatgttgac acagtccagg at 22
 35 <210> 3
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Sonda h-PRUNE 6FAM

 <400> 3
 45 ctgcatggaa ccatc 15

 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Antígeno para el anticuerpo monoclonal anti h-PRUNE
 55 <400> 4
 Ala Leu Glu Glu Ala Val Ala Glu Val Leu Asp His Arg Pro Ile Glu
 1 5 10 15

 Pro Lys .

 <210> 5
 <211> 42
 60 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador h-PRUNE delta
 5 <400> 5
 gtagcagagg tgctagccgc tgcagccatc gagccgaaac ac 42
 <210> 6
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador D28A h-PRUNE
 <400> 6
 gaagcctgtg cttggactc c 21
 <210> 7
 20 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador 106A h-PRUNE
 25 <400> 7
 accctcatcc ttgtcgctca tcatactta tcc 33
 <210> 8
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador D179a h-PRUNE
 35 <400> 8
 gaaccatcat cctggcatgt gtcaacatgg 30
 <210> 9
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Inhibidor de h-prune H1
 <400> 9
 Asn Ile Ile His Gly Ser Asp Ser Val Glu Ser Ala Glu Lys Glu
 1 5 10 15
 50 <210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Inhibidor permeable de h-prune H1
 <400> 10

Asn Ile Ile His Gly Ser Asp Ser Val Glu Ser Ala Glu Lys Glu Gly
1 5 10 15

Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
20 25

<210> 11
<211> 167
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia h-prune

<400> 11
Met Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Pro Val Glu Met
1 5 10 15

Ala Asn Leu Glu Arg Thr Phe Ile Ala Ile Lys Pro Asp Gly Val Gln
20 25 30

Arg Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Lys Arg Phe Glu Gln Lys Gly Phe
35 40 45

Arg Leu Val Ala Met Lys Phe Leu Arg Ala Ser Glu Glu His Leu Lys
50 55 60

Gln His Tyr Ile Asp Leu Lys Asp Arg Pro Phe Phe Pro Gly Leu Val
65 70 75 80

Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Val Val Ala Met Val Trp Glu Gly Leu
85 90 95

Asn Val Val Lys Thr Gly Arg Val Met Leu Gly Glu Thr Asn Pro Ala
100 105 110

Asp Ser Lys Pro Gly Thr Ile Arg Gly Asp Phe Cys Ile Gln Val Gly
115 120 125

Arg Asn Ile Ile His Gly Ser Asp Ser Val Lys Ser Ala Glu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Leu Trp Phe Lys Pro Glu Glu Leu Val Asp Tyr Lys Ser Cys
145 150 155 160

Ala His Asp Trp Val Tyr Glu
165

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Péptido control H1 (-) de la Casein quinasa I

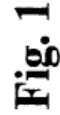
5 <400> 12

ser Asp Glu Ile Gly Lys Val ser Glu Asn Ile Ala His ser Glu
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: NIIHGSDSVESAEKEGGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10) caracterizado por que es permeable.
- 5 2. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: NIIHGSDSVESAEKEGGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID No 10) y caracterizado por que es permeable y es un inhibidor de la actividad fosfodiesterasa de nucleótido cíclico de h-prune, para uso en el campo médico.
3. Uso del péptido según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para la prevención y tratamiento de metástasis de tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE.
- 10 4. Uso según la reivindicación 3, en el que los tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE son carcinoma de mama, sarcoma, neuroblastoma, tumor de próstata, tumor pancreático, tumor de carcinoma de colon, tumor rectal, meduloblastoma, epiteloma, hepatocarcinoma, linfomas de células T o de células B, mieloma y melanoma y tumor pulmonar.
5. Método de cribado para compuestos que inhiben h-PRUNE, que comprende las fases siguientes:
 - 15 a) selección de al menos un compuesto que inhibe fosfodiesterasa (PDE), o derivado, análogo estructural o isómero de éste;
 - b) administración de dicho al menos un compuesto a una concentración entre 0,05 μM y 10 μM en una línea celular que sobreexpresa h-PRUNE, en el que dicha línea celular es MDA-C100 435 prune #4;
 - 20 c) análisis cuantitativo de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de h-PRUNE y/o análisis de motilidad celular frente a concentración de dicho al menos un compuesto y quimio-atrayente y selección del compuesto capaz de inhibir dicha actividad fosfodiesterasa entre los valores de 0,01 a 1 $\text{pmol}/\text{min}^{-1}/\mu\text{g}^{-1}$ y/o inhibir dicha motilidad hasta el logro de valores entre 200 y 1.200 células.
6. Método de cribado según la reivindicación 5, en el que el análisis cuantitativo de la etapa c) se realiza por ensayos de hidrólisis del sustrato AMPc y/o GMPc.
- 25 7. Método de cribado según la reivindicación 6, en el que el sustrato se usa a una concentración entre 0,008 μM y 1 μM .
8. Método para la detección in vitro de h-PRUNE en una muestra biológica para diagnóstico de metástasis de tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE por un ensayo inmunológico que comprende las etapas siguientes:
 - 30 a) poner en contacto dicha muestra biológica con el anticuerpo monoclonal anti-h-PRUNE capaz de reconocer y unirse selectivamente a la proteína recombinante h-PRUNE, caracterizado porque pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM y porque es producido por el clon 4G3/4 (depositado en el CBA en Génova el 10/12/2004);
 - b) detección del complejo antígeno-anticuerpo;
 - c) análisis cuantitativo del complejo antígeno-anticuerpo.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha muestra biológica es una sección de tejido o un fluido biológico.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que dicho anticuerpo anti-h-PRUNE está marcado con un radioisótopo, molécula fluorescente o enzima.
- 40 11. Método para la detección in vitro de h-PRUNE según la reivindicación 8, en el que dicha detección y análisis cuantitativo del complejo antígeno-anticuerpo se realizan por análisis de inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia.
- 45 12. Kit de diagnóstico para la detección de h-PRUNE en una muestra biológica para diagnóstico de metástasis de tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE que comprende el anticuerpo monoclonal anti-h-PRUNE que pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM y es producido por el clon 4G3/4 (depositado en el CBA en Génova el 10/12/2004).
13. Kit de diagnóstico según la reivindicación 12, en el que los tumores caracterizados por una sobreexpresión de h-PRUNE son carcinoma de mama, sarcoma, neuroblastoma, melanoma.
14. Kit de diagnóstico según la reivindicación 12, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-h-PRUNE está marcado con un radioisótopo, molécula fluorescente o enzima.

15. Anticuerpo monoclonal murino capaz de reconocer y unirse selectivamente a la proteína h-PRUNE recombinante, caracterizado porque pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM y es producido por el clon 4G3/4 (depositado en el CBA en Génova el 10/12/2004).



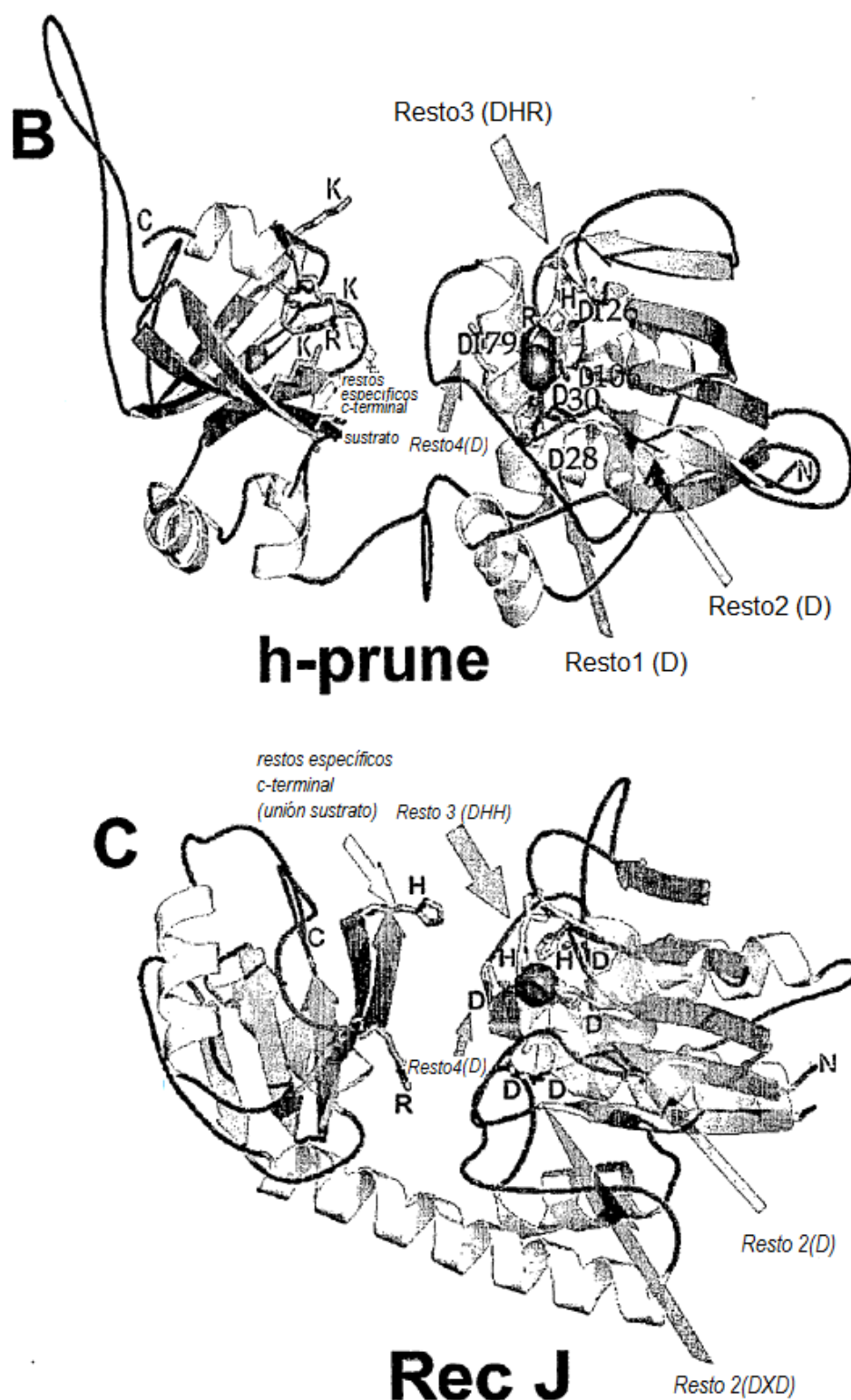


Fig. 1

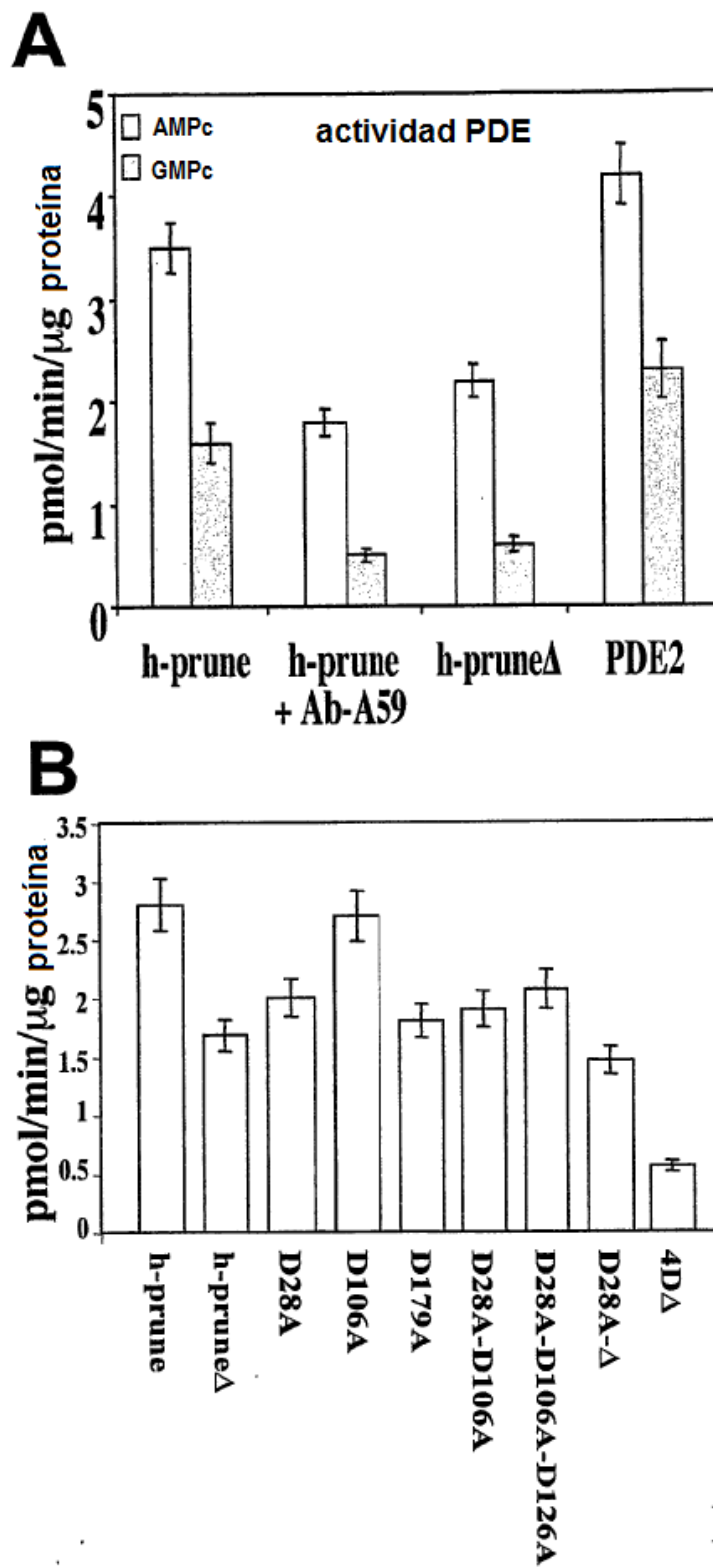


Fig. 2

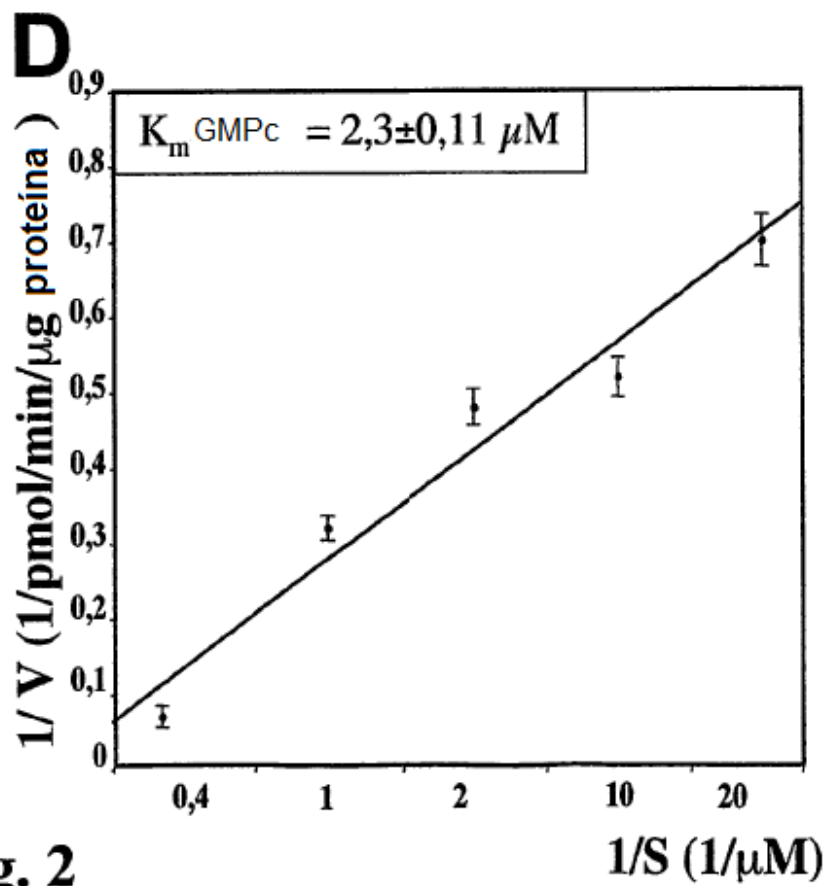
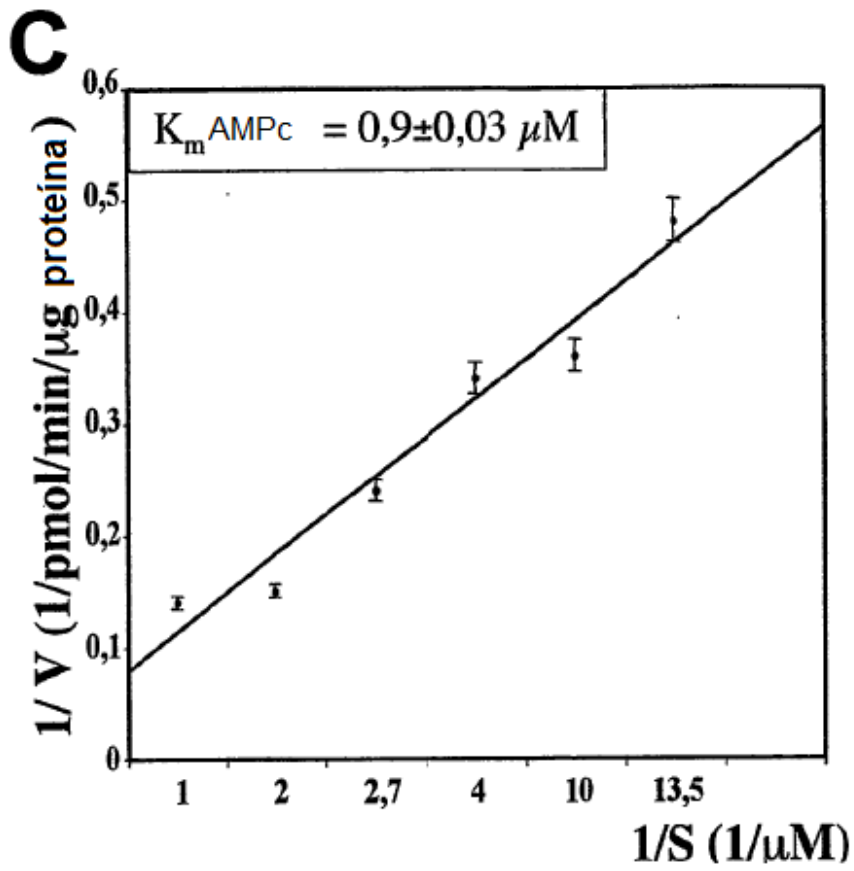


Fig. 2

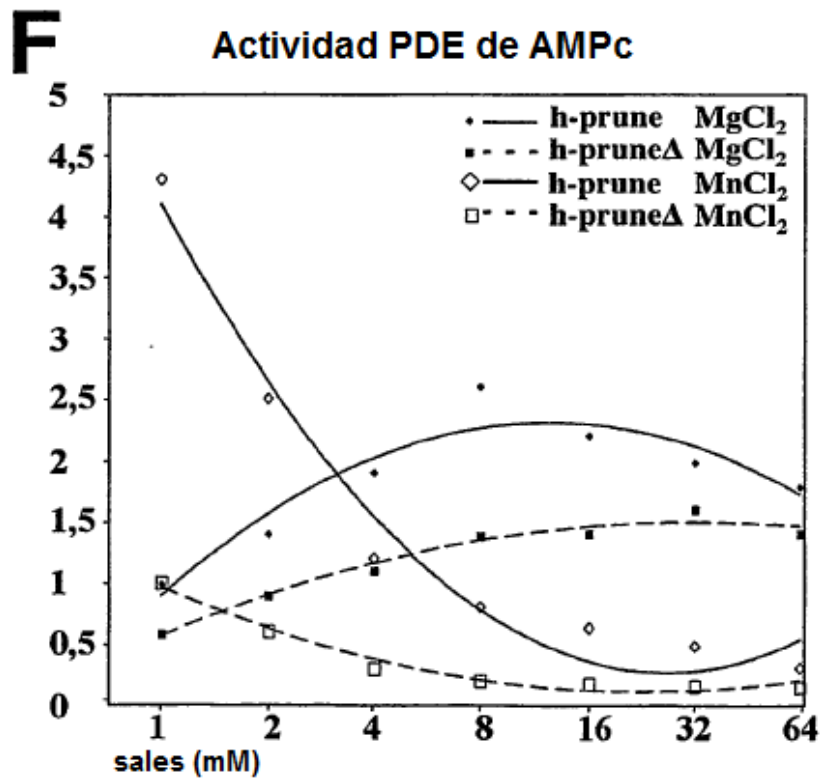
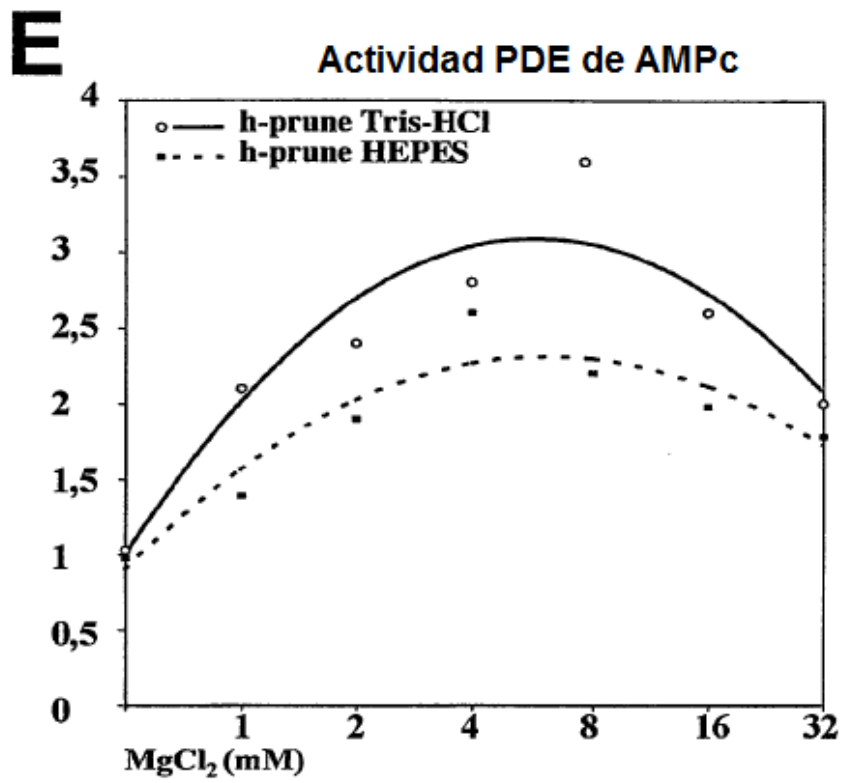


Fig. 2

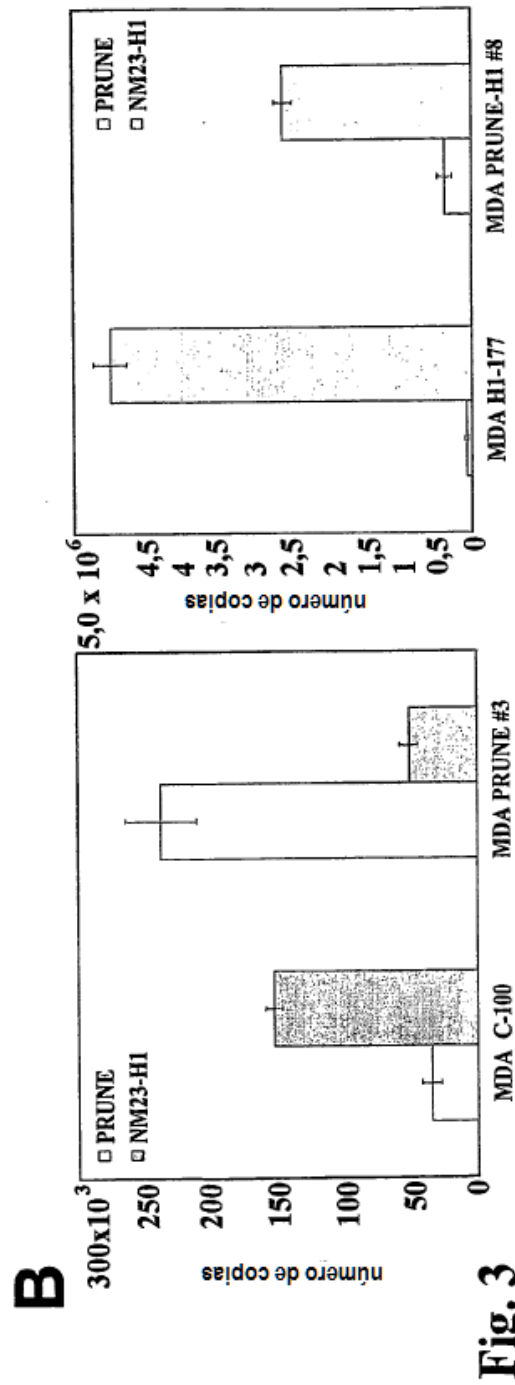
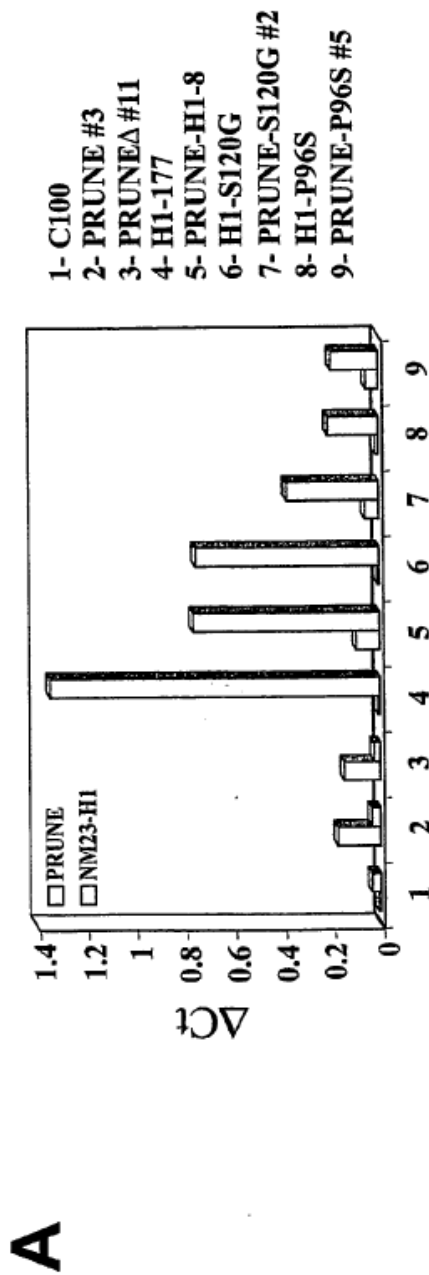


Fig. 3

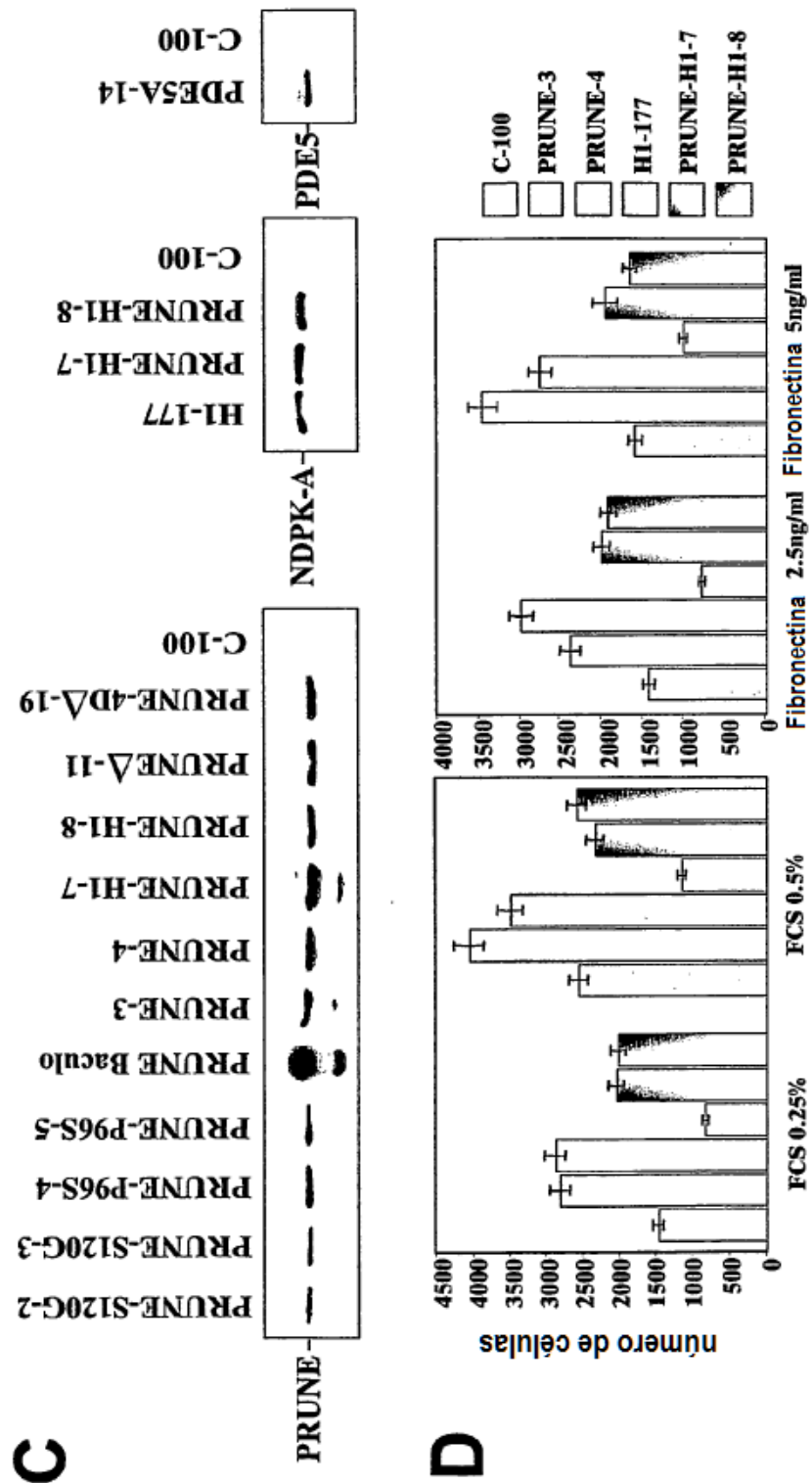
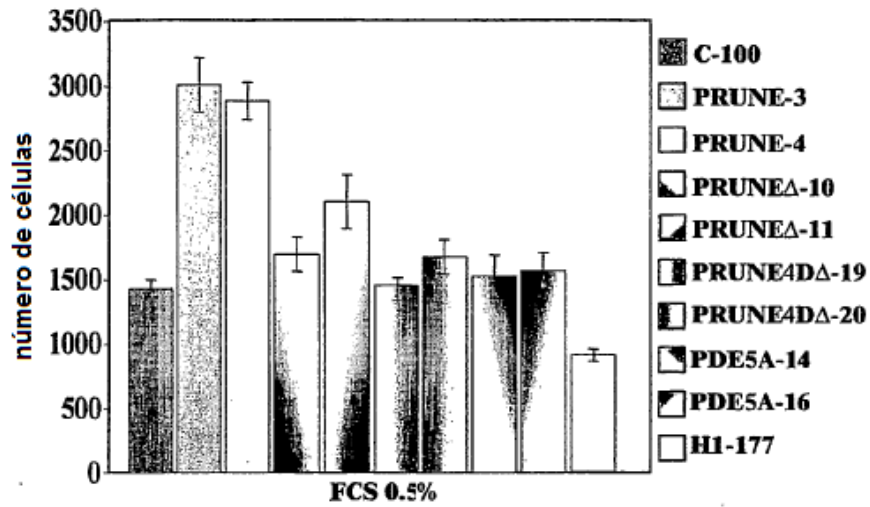


Fig. 3

E



F

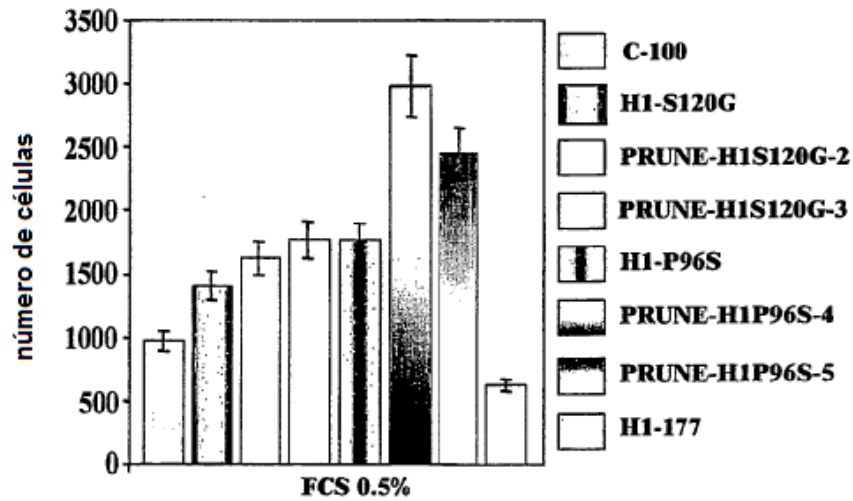
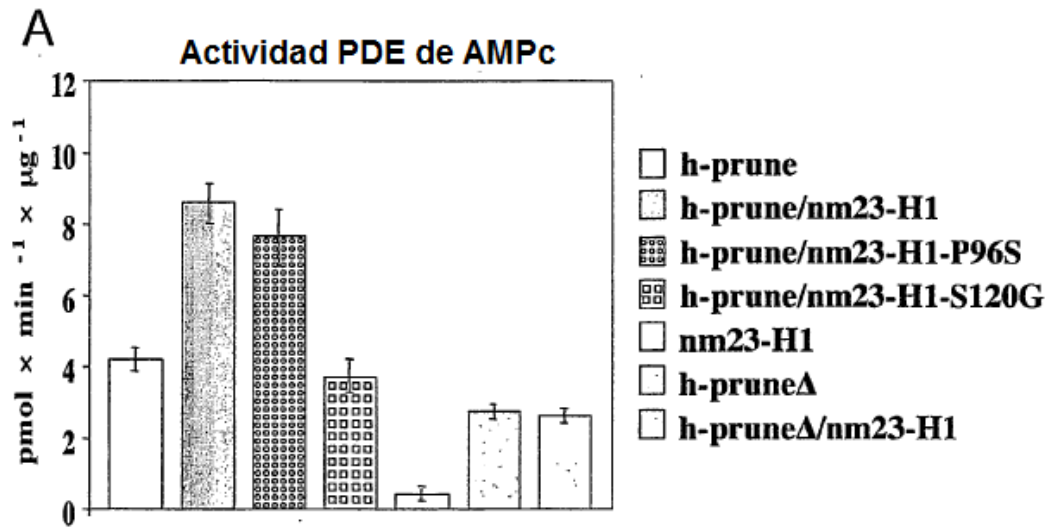


Fig. 3



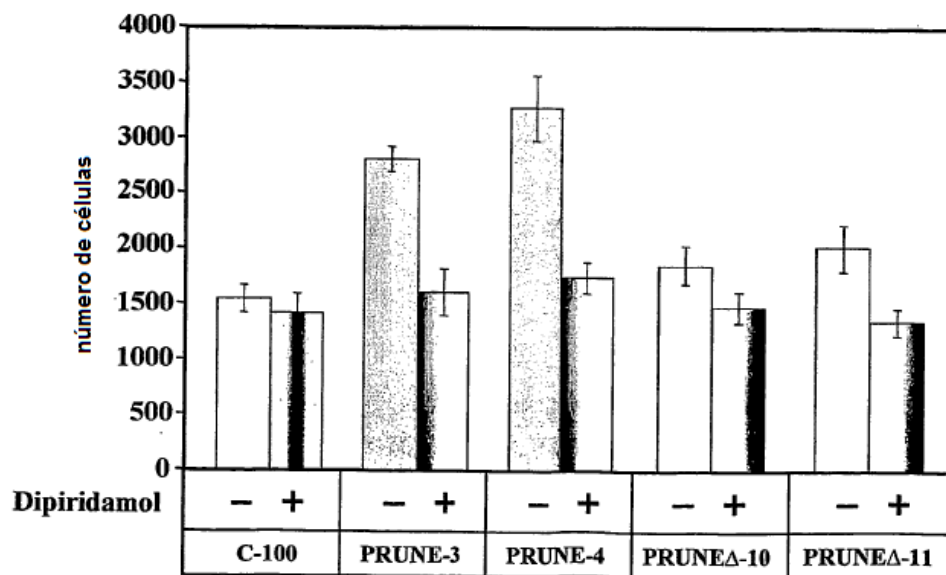
B

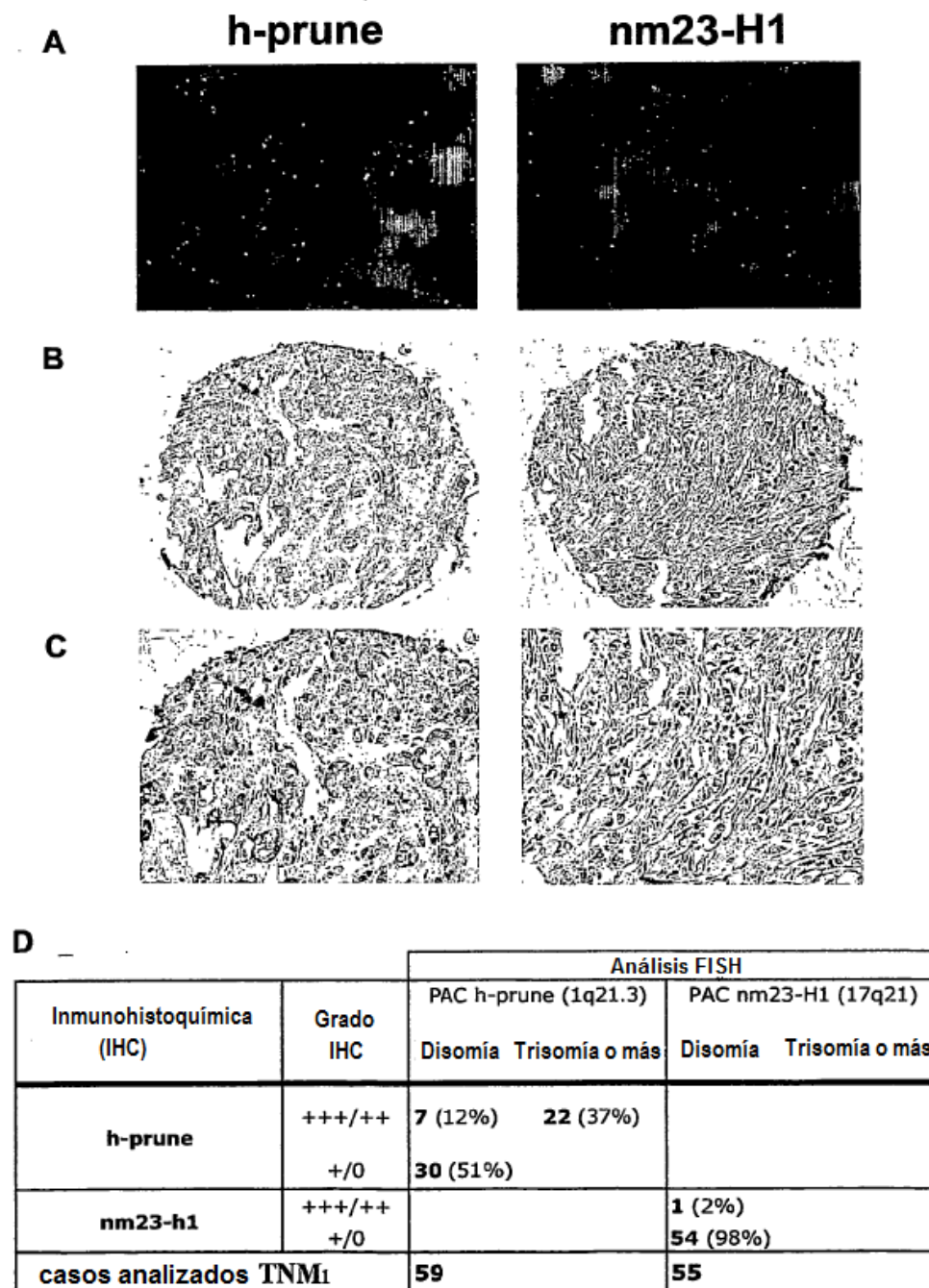
Nombre del clon	Actividad PDE de h-prune (pmol $\times$ min ⁻¹ $\times$ µg ⁻¹)	Motilidad número de células
MDA C-100	3.8 $\pm$ 0.7	1548 $\pm$ 84
MDA H1-177	2.2 $\pm$ 0.4	928 $\pm$ 73
MDA PRUNE #3	35 $\pm$ 5.3	2812 $\pm$ 294
MDA PRUNE #4	28.7 $\pm$ 2.5	3272 $\pm$ 271
MDA PRUNEΔ #10	16.8 $\pm$ 1.2	1682 $\pm$ 64
MDA PRUNEΔ #11	14.6 $\pm$ 0.9	2087 $\pm$ 97
MDA PRUNE-H1 #7	18.8 $\pm$ 2.6	2048 $\pm$ 93
MDA PRUNE-H1 #8	22 $\pm$ 4.2	2006 $\pm$ 87
MDA H1S120G	2.4 $\pm$ 0.8	1328 $\pm$ 54
MDA PRUNE-H1S120G #2	4.4 $\pm$ 1.6	1624 $\pm$ 89
MDA PRUNE-H1S120G #3	5.3 $\pm$ 1.4	1767 $\pm$ 108
MDA H1P96S	3.0 $\pm$ 0.3	1742 $\pm$ 38
MDA PRUNE-H1P96S #4	19.2 $\pm$ 0.3	2982 $\pm$ 184
MDA PRUNE-H1P96S #5	11.6 $\pm$ 0.4	2448 $\pm$ 143

Fig. 4

A

Inhibidor	Selectivo para un tipo de PDE	Cl ₅₀ μ M	h-prune Cl ₅₀ μ M
Cilostamida	PDE3	0.05	>100
Dipiridamol	PDE5/6/9/10/11	0.9/0.38/4.5/1.1/0.37	0.78 $\pm$ 0.05
IBMX	no selectivo	2-59	40.2 $\pm$ 0.8
Milrinona	PDE3	1.3	>100
Rolipram	PDE4	2.0	>100
Vinpocetina	PDE1C	8.1	22.3 $\pm$ 1.1
Zaprinast	PDE1/5/6	6.9/0.76/0.15	>100
Sulindac	PDE de GMPc	—	>100

B**Fig. 5**

**Fig. 6**

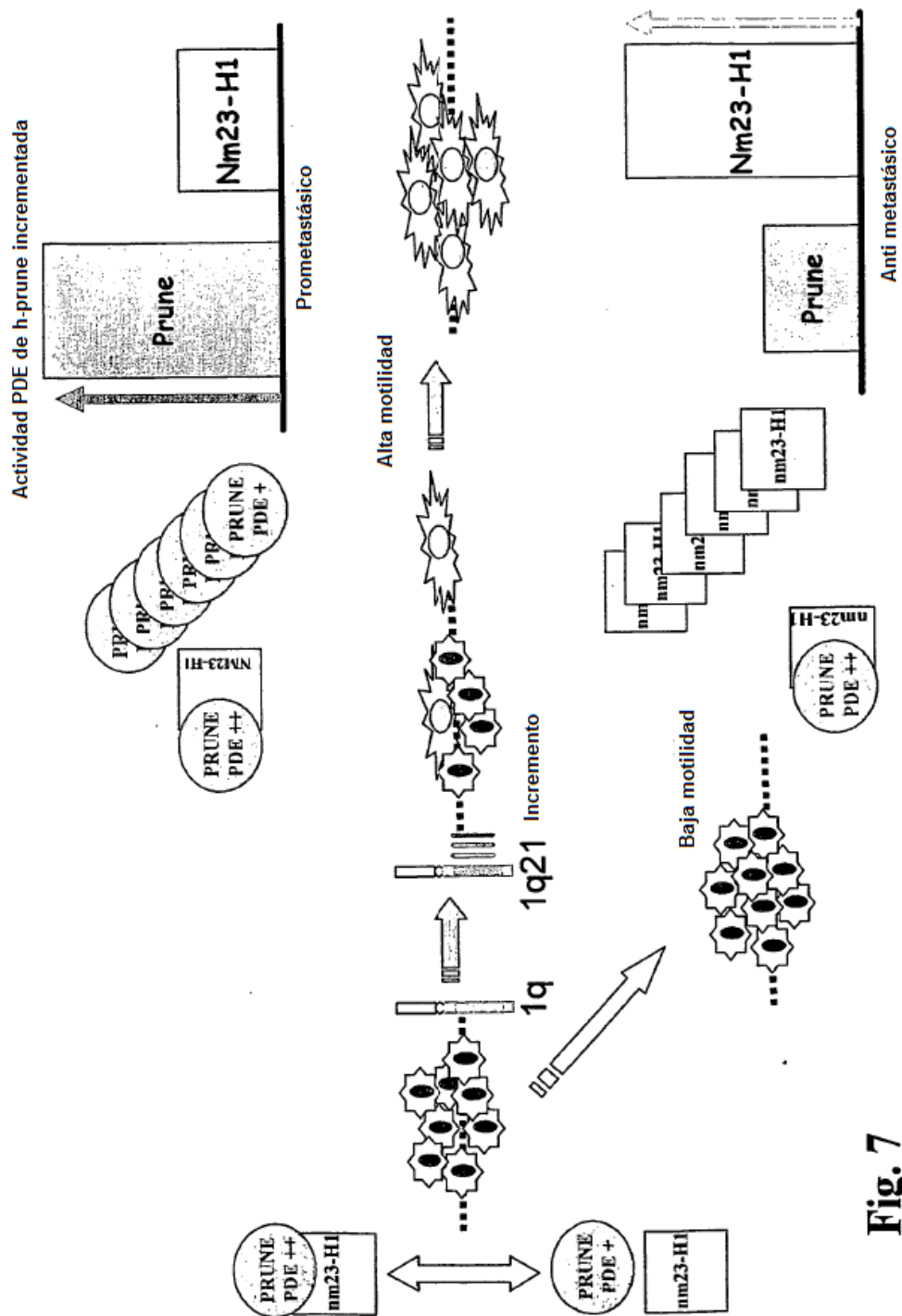


Fig. 7

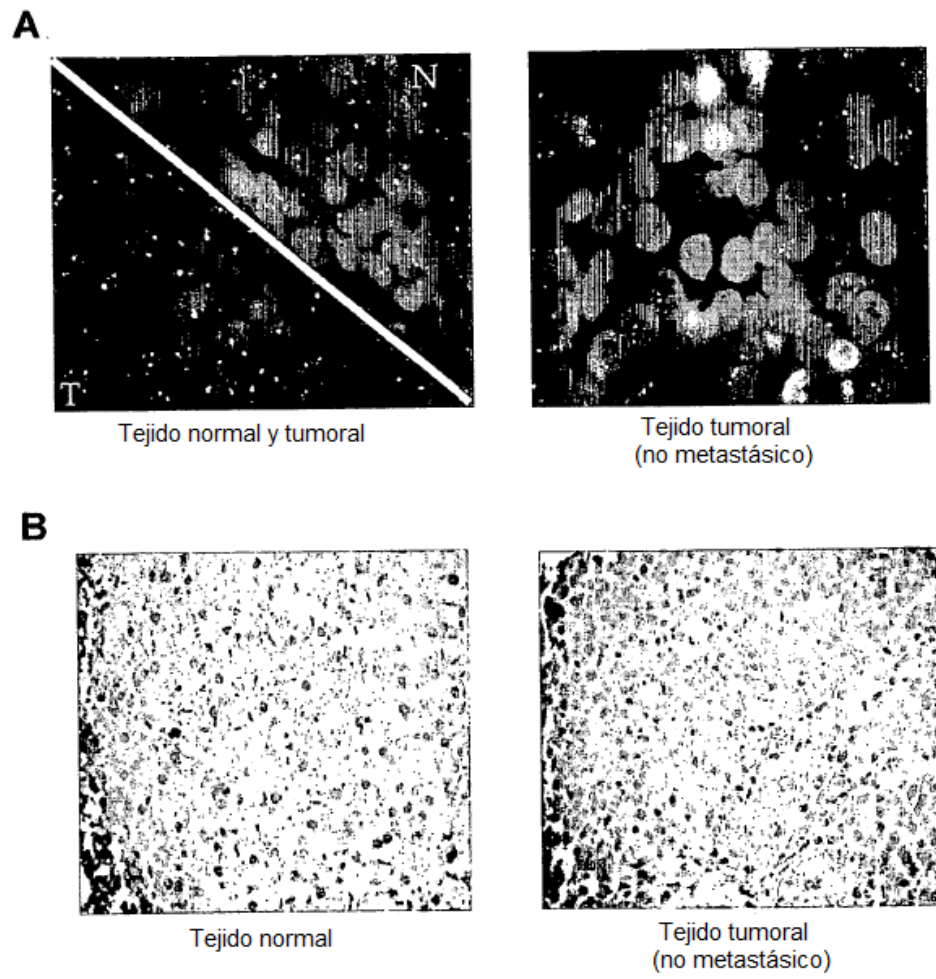


Fig. 8

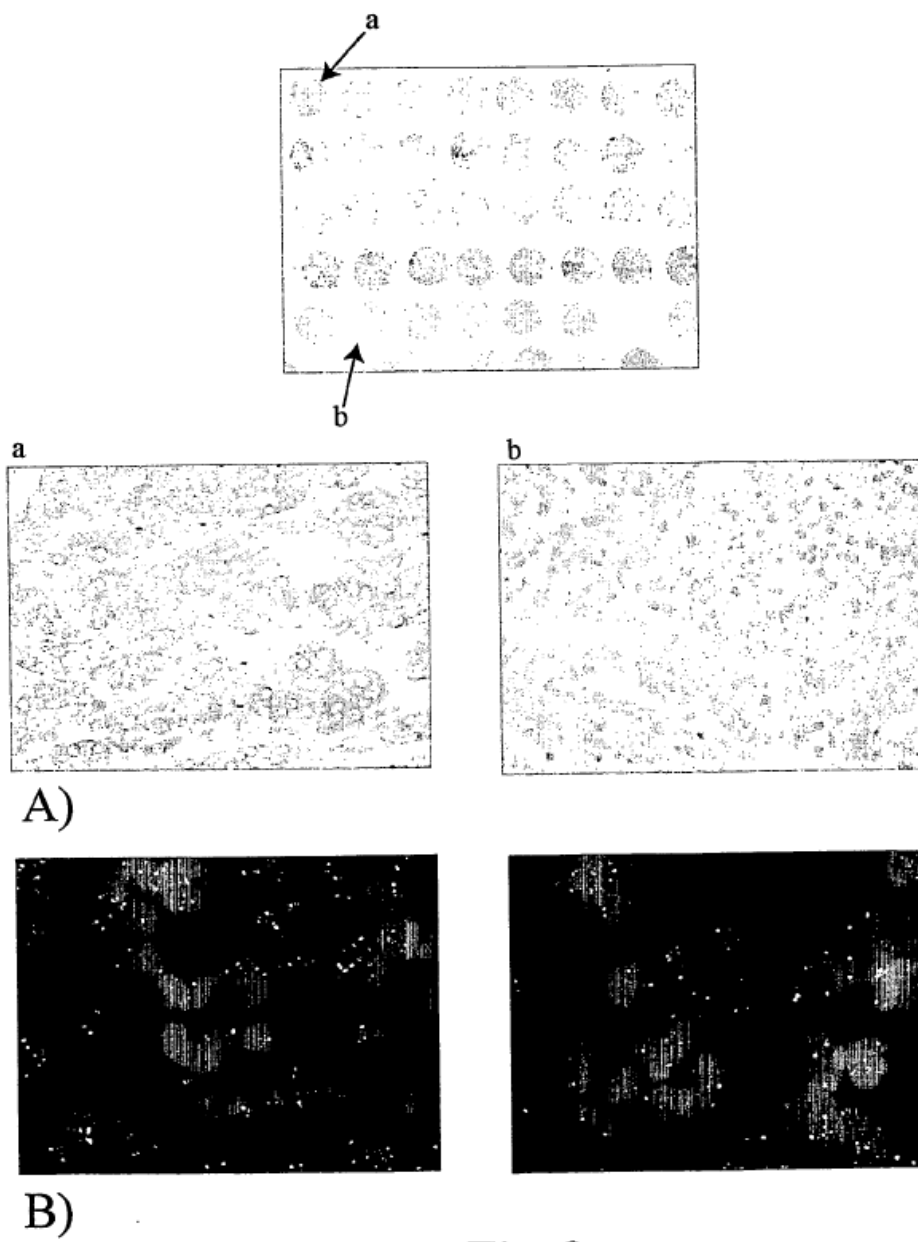


Fig. 9

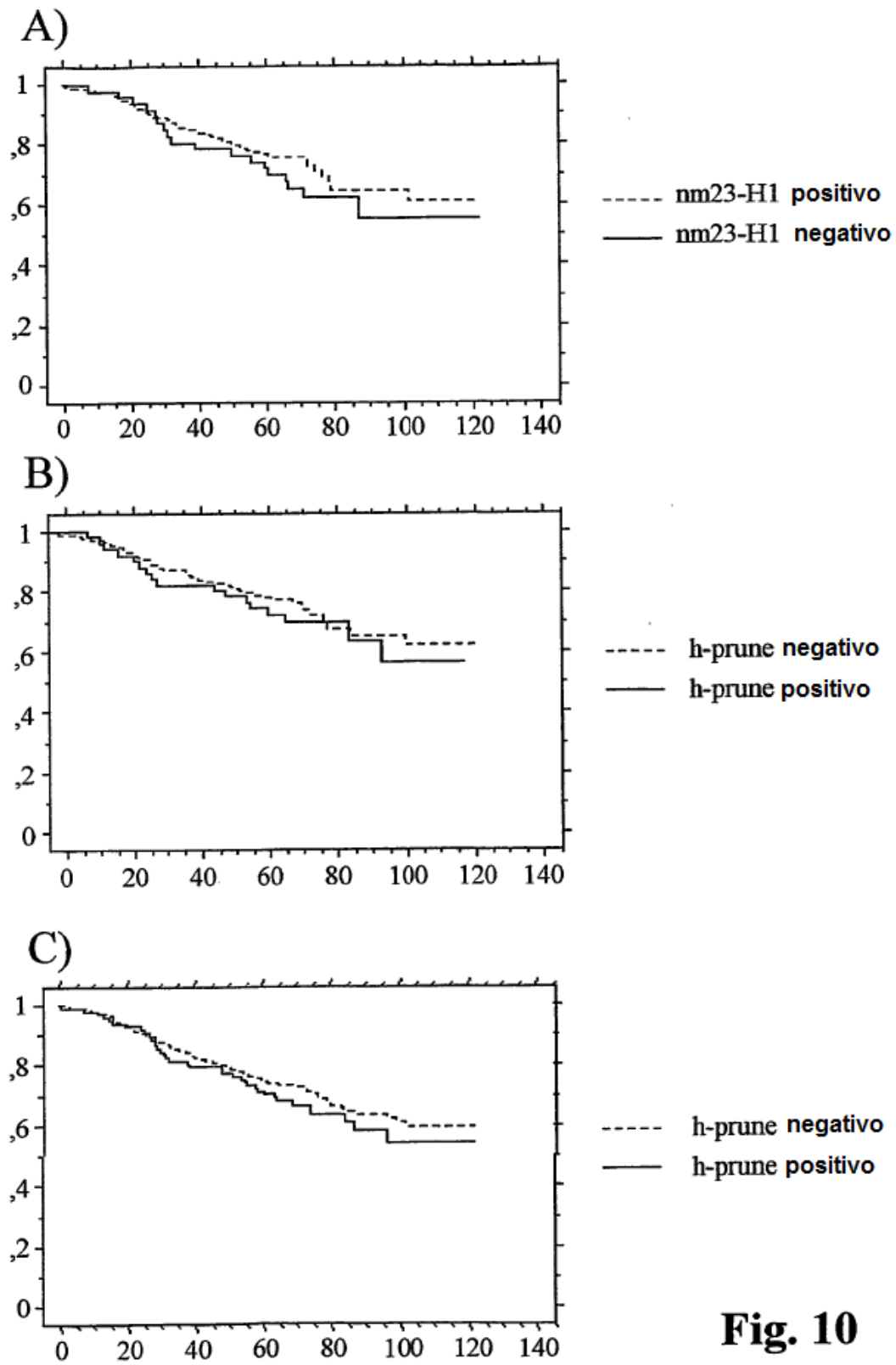
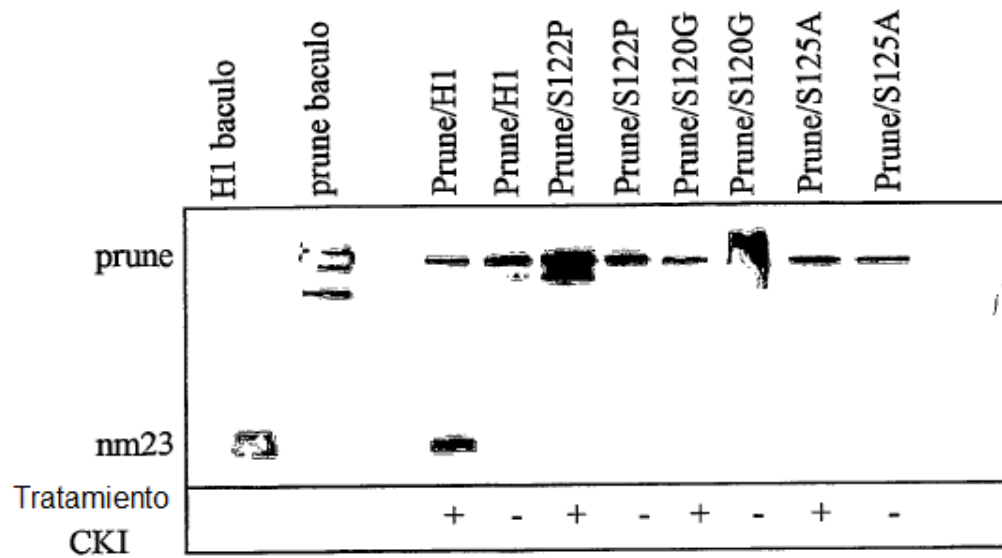


Fig. 10



A)

B)

MYDVPDYASLGSPVEMA
 NLERTFIAIKPDGVQRGLV
 GEIIKRFEQKGFRLVAMK
 FLRASEEHLKQHYIDLKD
 RPFFPGLVKYMNSGPVVA
 MVWEGLNVVKTGRVML
 GETNPADSKPGTIRGDFCI
 QVGRNIIHGSDSVKSAEK
 EISLWFKPEELVDYKSCA
 HDWVYE

Fig. 11

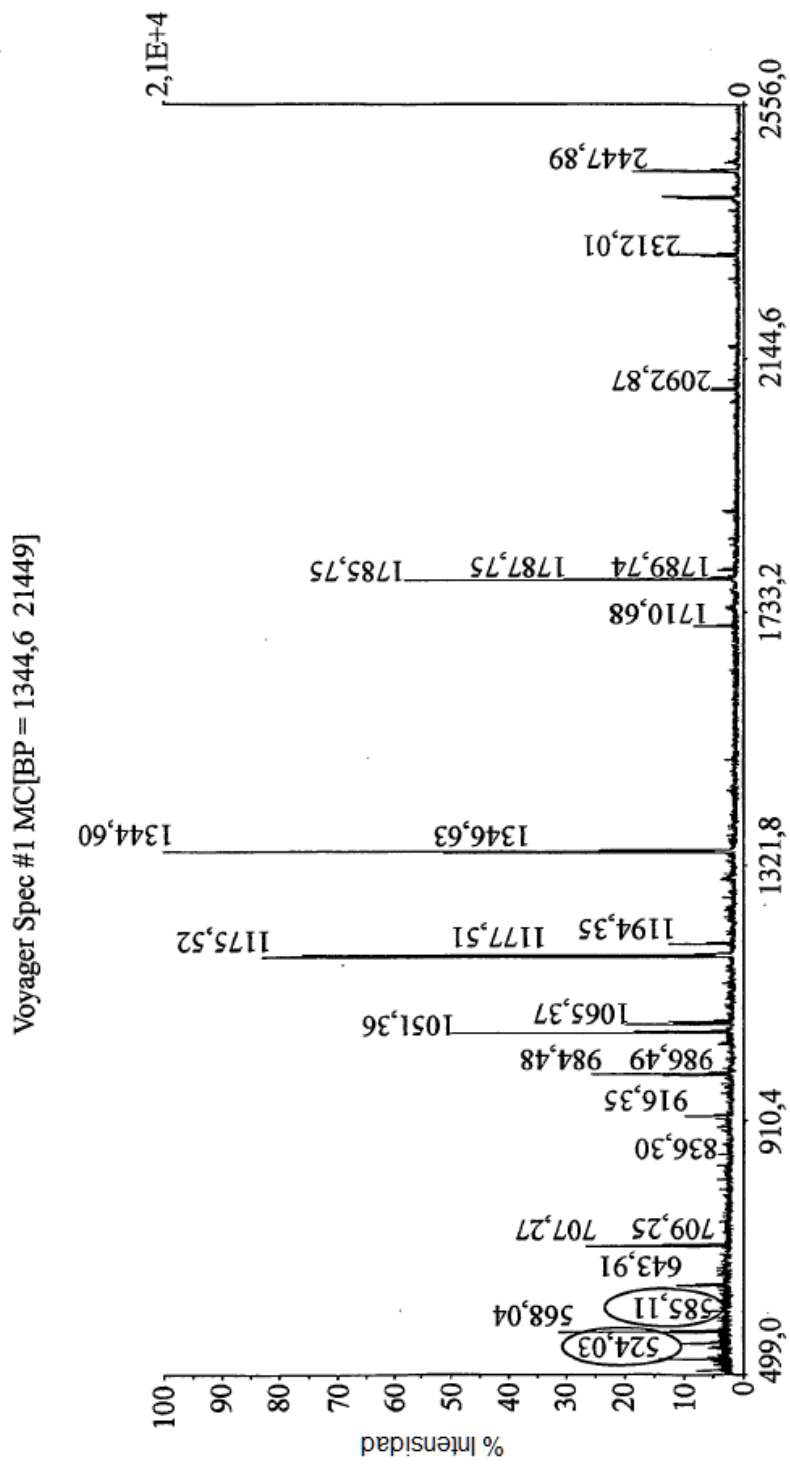


Fig. 11 C

A

	1	2	3	4
CKIδ	+	+	-	-
Isoforma de Nm23	H1	H2	H1	H2

nm23 →

**B**

IC261	0h	2h	4h	6h	8h	0h
CIP	—	—	—	—	—	+
nm23H1 fosforilada						
nm23H1 total						

C

	1	2	3	4	5
IC261 μ Mol		50	200	—	

h-prune →



nm23H1 →

**Fig. 12**

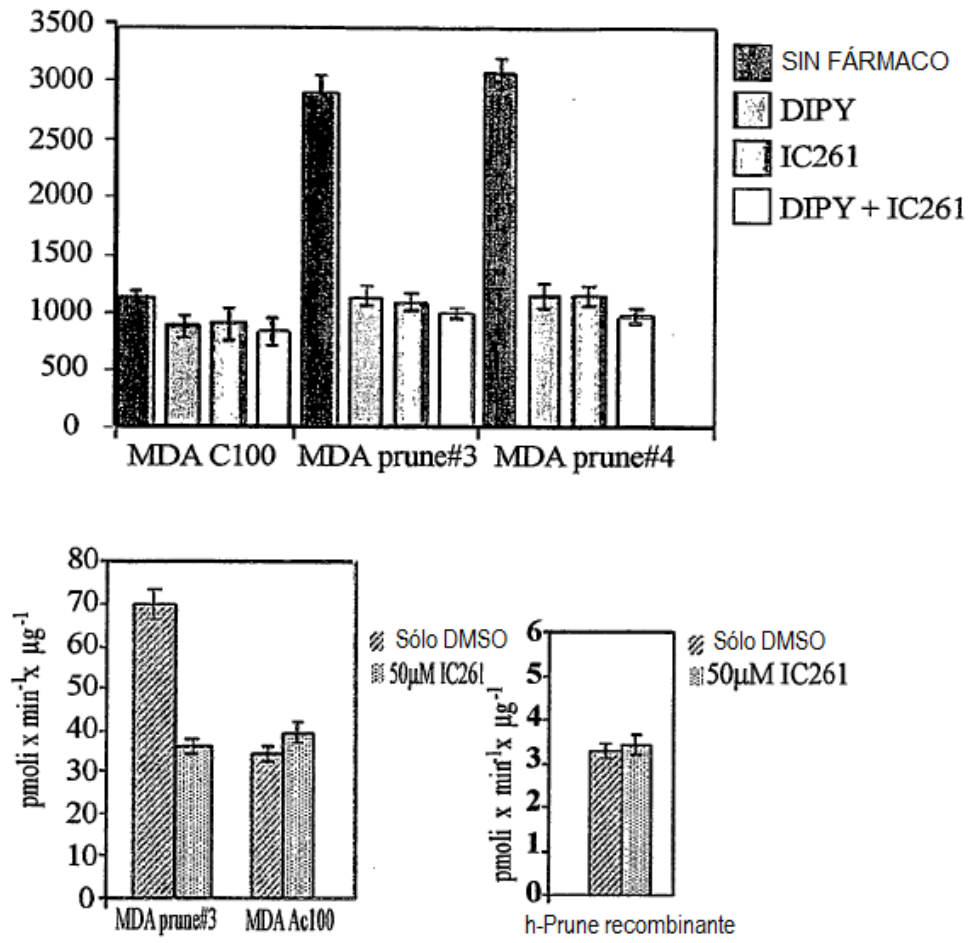


Fig. 13

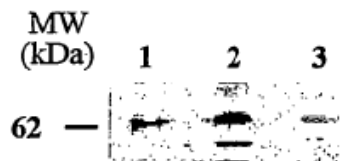


Fig. 14