(12) **PATENT**

(19) NO (11) **326659** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20000736	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.08.11 PCT/NL98/00457
(22)	Inng.dag	2000.02.14	(85)	Videreføringsdag	2000.02.14
(24)	Løpedag	1998.08.11	(30)	Prioritet	1997.08.12, EP, 97202501
(41)	Alm.tilgj	2000.04.11			
(45)	Meddelt	2009.01.26			

(73) Innehaver Leadd BV, Wassenaarseweg 72, NL-2333 AL Leiden, NL
(72) Oppfinner Mathieu Hubertus Maria Noteborn, Leiderdorp, NL
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte ved bestemmelse av transformerende effekt hos et mulig transformerende middel ved bestemmelse av apoptoseinduserende aktivitet**

(56) Anførte publikasjoner
DANEN-VAN OORSCHOT, A.A.A.M. et al.Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, mai 1997, Vol.94, side 5843-5847.
NOTEBORN M et al. Cav-derived apoptin induces apoptosis in human tumor cells in vitro, Journal of controlled release, august 1996, Vol.41, No.1, side S10, XP004037539.
WO 9641191 A1 (AESCULAAP B.V.) 1996.12.19.
ZHUANG S.M. et al.Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces cell death in various human hematologic malignant cells in vitro, Leukemia, Oktober 1995, Vol. 9, Suppl. 1, side S118-S120, XP000602147.

(57) Sammendrag

Det er beskrevet aktivering av apoptinindusert apoptose med forskjellige celletransformerende midler i normale og/eller kreftmottakelige celler. Apoptin, eller også kalt VP3 er et viralt protein avledet fra kyllinganemivirus. Det er også beskrevet preventive anti-kreftterapier av normale og/eller kreftmottakelige celler. Behandling av normale og/eller kreftmottakelige celler med kreftinduserende midler vil aktivere apoptininduserende apoptose, noe som resulterer i elimineringen av potensielle kreftceller. I tillegg er det beskrevet diagnose av kreftmidler. Midler med tumoraktivitet kan bli undersøkt ved å uttrykke dem i normale celler og analysere deres egenskap for å sette i gang apoptinindusert apoptose.

Foreliggende oppfinnelse vedrører området bestemmelse av transformerende egenskap hos mistenkte transformerende midler. Fellesnevneren for foreliggende oppfinnelse er at det ovennevnte område er et område hvor apoptin eller derivater og/eller fragmenter derav (nedenfor er alle referert til som apoptin eller apoptinlignende aktivitet) kan bli anvendt i henhold til oppfinnelsen. Apoptin er et protein som opprinnelig ble funnet i kyllinganemivirus (Noteborn et al,. 1991) og ble opprinnelig kalt VP3. Den apoptotiske aktivitet av dette protein ble oppdaget av gruppen av foreliggende oppfinnere (Noteborn et al., 1994).

Som angitt ovenfor tar foreliggende i bruk den apoptose-induserende effekt av apoptin.

Apoptose er en aktiv og programmert fysiologisk prosess for å eliminere overflødige, utstrakt skadede eller ondartede celler (Earnshaw, 1995, Duke et al., 1996). Apoptose er særpreget ved krymping av celler, segmentering av kjernen og fragmentering av cytoplasma, kondensering og spalting av DNA til fragmenter av domenestørrelse, i de fleste tilfeller full av internukleosomal nedbrytning. De apoptotiske celler blir fragmentert til membraninnesluttede apoptotiske legemer. Til slutt vil naboliggende celler og/eller makrofager raskt fagocyttere disse døende celler (Wyllie et al., 1980, White, 1996). Celler dyrket under vevsdyrkningsbetingelser og celler fra vev kan bli analysert for tegn på apoptose med midler som farger kromasomalt DNA, som for eksempel DAPI eller propidiumjodid, som farger normalt DNA (kromatisk) sterkt og regelmessig, men apoptotisk kromatin svakt og/eller uregelmessig (Noteborn et al., 1994, Telford et al., 1992).

Den apoptotiske prosess kan bli satt i gang av en mengde regulatoriske stimuli (Wyllie, 1995, White, 1996, Levine, 1997). Endringer i celleoverlevelsesgrad spiller en viktig rolle i human patogenese, eksempelvis i utvikling av kreft, noe som er forårsaket av øket proliferasjon og/eller av

minsket celledød (Kerr et al., 1994, Paulovich, 1997). En mengde kjemoterapeutiske midler og bestråling har blitt vist å indusere apoptose i kreftceller som, i mange tilfeller blir fremmet via tumorsupressorproteinet p53 (Thompson, 1995, Bellamy et al., 1995, Steller, 1995, McDonell et al., 1995). Mange krefttyper oppnår imidlertid en mutasjon i p53 under sin utvikling, noe som ofte korrelerer med dårlig respons overfor kreftterapi. Transformerende proteiner av DNA tumorvirus inaktiverer p53 indirekte eller ved direkte å binde til den (Teodoro, 1997). Et eksempel på et slikt middel er det store T-antigen av DNA tumorvirus SV40. I visse hemopoietiske krefttyper er et høyt ekspresjonsnivå av Bcl-2-onkogenet assosiert med en sterk motstandsdyktighet overfor forskjellige apoptoseinduserende kjemoterapeutiske midler (Hockenberry 1994, Sachs og Lotem, 1997). For slike krefttyper som er motstandsdyktige overfor mange cytotoksiske midler er alternativet anti-kreftterapier under utvikling basert på induksjon av apoptose (Thompson, 1995 og Paulovich et al., 1997).

Apoptin er et lite protein avledet fra kyllinganemivirus (CAV; Noteborn og De Boer, 1995, Noteborn et al., 1991, Noteborn et al., 1994) som kan indusere apoptose i humane ondartede og transformerte cellelinjer, men ikke i utransformerte diploide humane celler. In vitro klarer apoptin ikke å indusere programmert celledød i normale lymfoide, dermale fibroblastiske, epidermale, endoteliale og glatte muskelceller. Imidlertid når normale celler blir transformert, for eksempel av de transformerende gener av SV40, blir de mottakelige for apoptose med apoptin. (Danen-van Ooschot, 1997 og Noteborn 1996). Langtidsekspresjon av apoptin i normale humane fibroblaster viste at apoptin har ingen toksisk eller transformerende aktivitet i disse celler. I normale celler ble apoptin funnet å være lokalisert i hovedsak i cytoplasma, mens i transformerte eller ondartede celler var det lokalisert i kjernen, noe som antyder at lokaliseringen av apoptin er relatert til dets dødsinduserende aktivitet (Danen-van Oorschot et al, 1997).

Videre har søker funnet at apoptin kan indusere apoptose i fravær av funksjonell p53 (Zhuang et al., 1995a) og kan ikke bli inhibert av Bcl-2, Bcr-abl (Zhuang et al., 1995), det Bcl-2-assosierende protein BAG-1 og kaskadeinhibitor kukoppeprotein CrmA (Danen-Van Oorschot, 1997, Noteborn, 1996). Endelig synes det som om celler som kun er immortalisert og således minimalt transformert også kan bli avlivet av apoptin.

Det er kjent fra WO 96/41191 at apoptin er lokalisert i cytoplasma og induserer ikke apoptose i normale pattedyrceller, samt at i transformerte og maligne celler lokaliseres apoptin i hjernen og cellene blir mottakelige for apoptinindusert apoptose.

Følgelig er apoptin et ekstremt kraftig anti-tumormiddel, også for tumorer som ikke er eller er mindre mottakelige overfor (kjemo)terapeutiske midler grunnet mangelen på funksjonell p53, (over)-ekspresjon av Bcl-2 eller andre apoptoseinhiberende gener. Det faktum at apoptin ikke induserer apoptose i normale humane celler antyder at en toksisk effekt av apoptinbehandling in vivo vil være meget svak. I tillegg synes det som om selv premaligne, minimalt transformerte celler kan være følsomme overfor den dødsinduserende effekt av apoptin. Ved å vite at apoptin er svært sikker i normale celler, men at så snart en celle blir transformert og/eller immortalisert (uttrykkene kan bli brukt om hverandre heri), utformet foreliggende oppfinnere enkelte anvendelser basert på dette funn. Således fremskaffer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å bestemme den transformerende egenskap av et mulig transformerende middel omfattende å fremskaffe en ikke-transformert celle med induserbar apoptinlignende apoptotisk aktivitet, eksponere nevnte celle til nevnte transformerende middel og bestemme beliggenheten av nevnte apoptotiske aktivitet i nevnte celle eller bestemme induksjonen av apoptose i nevnte celle, hvor nevnte apoptinlignende apoptotiske

aktivitet er fremskaffet av et plasmid som koder for apoptin eller en viral vektor som uttrykker apoptin.

Det er underforstått at den ovennevnte apoptotiske aktivitet også refererer til det materiale som har nevnte aktivitet. Det er foretrukket å fremskaffe nevnte celle med nevnte apoptotiske aktivitet ved å transdusere nevnte celle med et rekombinant nukleinsyremolekyl som koder for nevnte aktivitet. Apoptinlignende aktivitet er heri definert som enhver (fortrinnsvis proteinholdig) substans som har lignende aktivitet som VP3 eller apoptin av kyllinganemivirus. Spesielt innbefattet i nevnte definisjon er alleliske varianter, derivater og/eller fragmenter av apoptin, hvor derivater er definert som å ha aminosyreerstatninger som ikke resulterer i tap av all apoptotisk aktivitet. Det er underforstått at lignende aktivitet betyr at denne type aktivitet er den samme selv om mengden kan være forskjellig. Fremgangsmåtene i henhold til oppfinnelsen er spesielt egnet i applikasjoner hvorved nevnte mulige transformerende midler er en proteinholdig substans. Dette tillater nevnte proteinholdige substans å bli co-uttrykt i nevnte ikke-transformerte celle med nevnte apoptotiske aktivitet. Den eksemplifiserte proteinholdige substans er det store T-antigen av SV40 eller en funksjonell ekvivalent derav.

Modifikasjoner av apoptingenet som resulterer i endringer på apoptinproteinet som tillater apoptinen å trenge inn i kjernen i ikke-transformerte og transformerte/tumorogene celler, kan resultere i induksjonen av apoptose. Apoptinproteinet kan bli forstørret med et nukleært lokaliseringssignal av SV40. Spesielt innbefattet i nevnte definisjon av apoptin er alleliske varianter, derivater og/eller fragmenter av apoptin hvor derivater er definert som å ha aminosyreerstatninger som ikke resulterer i tap av all apoptotisk aktivitet. Dette muliggjør apoptinproteinet å bli uttrykt i ikke-transformerte celler med nevnte apoptotiske aktivitet. Apoptinfragmenter med nevnte apoptotiske aktivitet, men som ikke er i stand til å trenge

inn i kjernen av ikke-transformerte eller transformerte celler med sin egen sekvens, kan være i stand til å trenge inn i kjernen ved hjelp av modifikasjonene og indusere apoptose.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan fremskaffe en mulighet for å bestemme predisposisjonen av en celle til å bli en kreftcelle ved å utstyre nevnte celle med induserbar apoptinlignende apoptotisk aktivitet, og utsette nevnte celle for relativt mild tumorigen aktivitet og bestemme apoptose i nevnte celle og/eller bestemme beliggenheten av nevnte apoptotiske aktivitet i nevnte celle. I dette tilfelle er det mistenkte transformerende middel som diskutert ovenfor allerede til stede i nevnte celle som en mutasjon som fører til onkogen eller tumorigen aktivitet. I dette tilfelle fører det faktum at apoptin kun induserer apoptose i celler som allerede har blitt transformert til muligheten for å undersøke hvorvidt celler har en mutasjon som vil føre til immortalisering eller transformasjon ved mild eksponering til transformerende aktivitet så som UV-bestråling og røntgenstrålebehandling.

På denne måte kan sannsynligheten for at et sett celler fører til kreft bli bestemt. Dette fører selvfølgelig til anvendelser innenfor diagnoseområder angående mulighetene for at personer har en nedarvet risiko for å få kreft og gi preventiv behandling. Denne type diagnose kan også bli anvendt i å råde personer angående sannsynligheten for at deres barn er predisponert for kreft.

Således kan det ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen bestemmes predisponeringen hos et individ for arvemessige typer kreft hvor en prøve av et relevant subsett av celler av et slikt individ utsettes for fremgangsmåten. I tillegg fremskaffer fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen en mulighet for å bestemme en genmutasjon som har onkogen og/eller transformerende aktivitet i en celle.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan også brukes til å studere induksjonen av apoptinindusert apoptose med et transformerende middel så som kjemikalier, virus, UV- og røntgenstråling i en transgen musemodell som resulterer i inhibering av tumordannelse. De transgene apoptinmus kan bli brukt for å analysere den anti-tumorielle effekt av apoptin i transgene kimera som bærer arvemessige typer av kreft og er i stand til å uttrykke apoptin. Videre kan effekten av ekspresjonen av apoptin i en in vivo modell bli studert ved hjelp av de beskrevne transgene apoptinmus.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Søker er tidligere vist at det virale apoptinprotein induserer apoptose i dyrkede transformerte celler av både human og gnageropprinnelse, men ikke i normale humane celler. Søker har nå observert at apoptin ikke klarer å indusere apoptose i dyrkede murine (eller rotte) embryoniske fibroblaster (kulturene var avledet fra 16-18 dager gamle muse-(rotte)embryoer). Dette viser at apoptin også kan bli uttrykt i den intakte embryo uten å forårsake toksisitet, i det minste embryoer av et ikke for tidlig stadium av embryonal utvikling.

Søker har nå vært i stand til å danne transgene apoptinmus som er levedyktige. Søker gir bevis for at konstitutiv ekspresjon av apoptin i en transgen mus ikke resulterer i letale eller andre livstruende/livsbegrensende effekter. Søker har også observert at co-transfeksjon av dyrkede normale humane fibroblaster med apoptingenet og de SV40-transformerende gener vil aktivere den apoptotiske prosess som er etterfulgt av translokasjon av apoptinproteinet fra cytoplasma, hvor det akkumulerer initialt til kjernen.

Fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen gir basis for en diagnostisk test for å påvise potensielt transformerende gener. Normale diploide pattedyrceller, så som human og/eller gnagerceller blir brukt for en slik test. For

dette formål blir de normale diploide celler co-transfektert med et plasmid inneholdende genet(er) som skal studeres og plasmidet som koder for apoptin, eller blir transfektert med genet(er) som skal bli studert og infisert med en viral vektor som uttrykker apoptin. Induksjon av apoptinindusert apoptose og/eller tilstedeværelse av apoptin i kjernen viser at det undersøkte gen har transformerende/tumorogent potensiale.

Videre har søker oppdaget at diploide humane celler isolert fra individer som bærer en kjønnslinjemutasjon i tumor-suppresorgen, og som et resultat er predisponert for å utvikle et vist spektrum krefttyper (heri også referert til som kreftmottakelige), er motstandsdyktige overfor den apoptoseinduserende effekt av apoptin, like som diploide celler fra friske individer, men blir følsomme dersom cellekulturene blir bestrålt med ultraviolett lys.

Dette tillot søker å utvikle diagnostisk assay for å forutsi mottakelighet for kreft. I familier med en nedarvet disponering for kreft grunnet en kjønnslinjemutasjon i et tumorsuppresorgen er det ofte ikke mulig uten utstrakt analyse av kromosomalt DNA å forutsi hvorvidt et familiemedlem er påvirket og bærer sykdomsgenet. Søkers resultater viser at dette kan bli foretatt på en enkel måte ved å ta i bruk apoptingenet. For dette formål blir diploide hudfibroblaster eller lymfocytter isolert fra individet som skal undersøkes, og de dyrkede celler blir transfektert med apoptingenet, etterfulgt av bestråling med UV-lys (266 nm). Dersom de transfekterte celler blir apoptotiske etter UV-bestråling, men ikke går inn i apoptose uten UV-bestråling så er dette en (sterk) indikasjon på at individet er mottakelig for kreft. Ikke alle typer kreftpredisponering som er grunnet en mutasjon i et tumorsuppresorgen har enda blitt undersøkt med apoptin/UV-assayet. Det er imidlertid ingen grunn for å anta at samme fenomen ikke vil bli observert i andre kreftdisponerte celler. En lignende diagnostisk test for å forutsi kreftpåvirkelighet kan også bli ut-

ført ved å bruke røntgenstrålebehandling i stedet for UV-bestråling.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen muliggjør også å fremskaffe mer informasjon angående den molekylære basis for kreftmottagelighet og dets slektsskap med visse stressresponser så som øket reaktivering (ER) (Abrahams et al., 1996). Øket reaktivering er en av reaksjonene hos normale (humane) celler overfor visse DNA-skadende midler, og synes å reflektere cellenes mottakelighet for onkogen transformasjon.

Foreliggende oppfinnelse vil bli forklart i større detalj i den følgende eksperimentelle del.

Eksperimentell del

Celler og celledyrkningsbetingelser

Rotteembryofibroblaster (REF) ble fremstilt fra 14-dager gamle rotteembryoer. Cellene ble tint fra flytende nitrogen, dyrket i DMEM supplementert med 10% føtalt kalveserum og transfektert med plasmid DNA ved cellepassasje 2.

Museembryofibroblaster (MEF) ble fremstilt fra p53+/+mus eller fra p53-/-knock-out mus /Tyler Jacks, 1994 og 1996; Tyler Jacks et al., 1994). Cellene ble dyrket på Corning-skåler i F15-medium supplementert med 10% føtalt kalveserum. P19-celler blir avledet fra et embryonalt musekarsinom/teratokarsinom (Burney et al., 1982). Cellene ble dyrket på gelatiniserte Petriskåler i DMEM supplementert med 8% føtalt kalveserum.

BRK/xho-celler ble fremstilt fra babyrotte nyreceller ved transformasjon med adenovirus type 5 E1-område (Schrier et al., 1983). Cellene ble dyrket i DMEM supplementert med 10% føtalt kalveserum.

Humane diploide forhudsfibroblaster VH10 og VH25 (Klein et al., 1990) ble dyrket i Dulbeccos modifisert Eagle-medium (DMEM) supplementert med 10% føtalt kalveserum.

Primære kulturer av humane epidermale keratinocytter (FSK-1) ble initiert i fullstendig medium som beskrevet (Rheinwald og Green, 1975) med mindre modifikasjoner i henhold til M. Ponec et al., 1981 og dyrket i keratinocytt serumfritt medium (KSFM) etterpå. For forsøkene beskrevet her ble passasje nr. 3 benyttet.

F9605-celler er diploide fibroblaster som er p16-/-, avledet fra pasienter med dysplastisk nevussyndrom (DNS) som er postulert å være en prekursor for familial a-type multippel vortemelanom (FAMMM) syndrom (Gruis et al., 1995). Cellene ble dyrket i DMEM med 10% føtalt kalveserum.

GM1492-celler er humane diploide fibroblaster som ikke uttrykker p53 og er avledet fra pasienter med Blooms syndrom som er en autosomal recessiv lidelse med en høy krefthyppighet (Van Laar et al., 1994). Cellene ble dyrket i DMEM inneholdende 10% føtalt kalveserum.

LF2675T er diploide hudfibroblaster fra pasienter med Li-Fraumenisyndrom, (LFS). Denne sykdom er særpreget ved en kjønnslinjemutasjon i et allele av p53-genet og en tidlig forekomst av forskjellige typer kreft (Srivastava et al., 1990; Abrahams et al., 1996). Cellene ble dyrket i DMEM supplementert med 10% føtalt kalveserum.

401-celler er diploide hudfibroblaster fra individer av Lynch type 2 syndromfamilie med en høy hyppighet av forskjellige typer kreft. Cellene var avledet fra et individ som døde av brystkreft (Abrahams et al., 1996). Cellene ble dyrket i DMEM supplementert med 10% føtalt kalveserum. Alle dyrkningsmedier ble skaffet fra GIBCO/BRL og inneholdt antibiotikaene penicillin og streptomycin.

Bestråling av cellekulturene

Det kondisjonerte medium ble fjernet fra kulturene og cellene ble renset to ganger med PBS. Etter fjerning av PBS ble kulturene UV-bestrålt som tidligere beskrevet (Abrahams et al., 1984) eller behandlet med røntgenstråling (5 gray) ved å bruke et Andrex 225 SMART (Andrex St, København) ved 200 KV 4 mA med et 1 mm A1 filter. Dose og dosegrad ble overvåket med et PTW dosimeter. Etter UV-behandling ble kondisjonert medium returnert og kulturene ble inkubert ved 37°C.

Plasmider

Ekspresjonsplasmidet pCMV-VP3 inneholder CAV DNA-sekvensen som eksklusivt koder for apoptinproteinet (nt 427-868; Noteborn et al., 1991, Noteborn og De Boer, 1996), og plasmid pCMV-des koder for desmin, som er et strukturelt protein av muskelceller (Menke et al. 1997). Plasmid pCMV-neo blir brukt som "tom" negativ kontroll for plasmider som koder for genprodukter med en potensiell effekt på den apoptin-induserte apoptose. Alle uttrykte gener er under regulering av cytomegalovirus (tidlig) forsterket promoter.

Plasmid SV40 inneholder SV40 startpunkt-defektiv (ori-) tidlig-områdeklonen innbefattende både SV40 stort T-antigen- og lite T-antigen-kodende områder regulert av sin egen promoter (Dinsart et al., 1984). Plasmidet pR-s884 uttrykker et fullstendig SV40-stort T-antigen og et avkortet lite T-antigen under transkripsjonell kontroll av den lange terminale repetisjon (LTR) av Rous sarkomavirus (RSV; De Ronde et al., 1989; Smits et al., 1992). Plasmidet PR-SVt inneholder cDNA-sekvenser som koder for SV40 lite T-gen som var fusert til RSV LTR (Philips og Bundell, 1988).

Ekspresjonsplasmidet 21EcoA, som består av de murine H-2Kb histokompatibilitetsantigen gen/promoter-områder (Mellor et al., 1982) og pBr327-sekvenser er en gave fra Professor Dr.

Frank Grosveld, Erasmus Univerisity, Rotterdam, Nederland. Plasmidet 21EcoA inneholder et Not1 innen i det første exon av H-2Kb-genet, som tillater integrering av et fremmed gen som blir regulert av H-2Kb-promoteren. BamH1-fragmentet inneholdende sekvensene som koder for apoptin blir isolert fra pCMV-VP3 og klonet i Not1-sete av 21 EcoA-plasmidet ved å bruke Not1-BamH1-linkere. Sluttplasmidet inneholdende apoptingenet under regulering av H-2Kb-promoteren blir kalt p21EcoA-VP3. Etterpå ble EcoR1-sete ved siden av apoptingenet fjernet ved lineærisering av plasmid p21EcoA-VP3 ved dette spesielle EcoR1-sete, og behandling med Klenow-polymerase. Plasmidet blir kalt p21EcoA-Vp3-Eco.

DNA-fragmentet inneholdende H-2kB-ekspresjonsenheten med apoptingenet ble avskilt fra de prokaryoter DNA-sekvenser ved hjelp av EcoR1-spaltning og agarosegel elektroforese.

Plasmid DNA ble renset med sentrifugering i en CsCl-gradient og kolonnekromatografi i Sephakryl S500 (Pharmacia, Sverige).

Transient transfeksjon

Cellene ble transfektert i monolag-kulturer med transfeksjonsmiddel DOTAP (Boehringer, Mannheim, FRG) i hovedsak som beskrevet av Fischer et al., 1996, eller transfektert med plasmid DNA med kalsiumfosfat utfelling som beskrevet av Graham og Van der Eb (1973).

Indirekte immunofluoresens

Alle celler ble dyrket på mikroskopglassplater. Platene var enten ubelagt (VH10, VH25), eller belagt med 3-amino-propyltrietoksysilan (TESPA; FSK-1). Cellene ble fiksert med 80% aceton i 10 minutter ved romtemperatur, og benyttet for indirekte immunofluoresens som beskrevet (Van den Heuvel, 1990). For å vise tilstedeværelsen og/eller cellulær beliggenhet av apoptin i transfekterte celler, ble monoklonale

antistoff (Mab) CVI-CAV-85,1 (85,1; Noteborn et al., 1991); for human desmin ble muse Mab 33 (Monosan, Uden, Nederland); for SV40 ble T-antigener Pab 419, vennlig fremskaffet av Dr A.-G Jochemsen, University of Leiden, Nederland. Fluoresin iostiocyanat-merket geite anti-mus antistoff (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West grove PA, USA) ble benyttet som andre antistoff. Nukleær DNA ble farget med 2,4-diamino-2-fenylindol (DAPI).

Dannelse av transgene apoptinmus

For dannelsen av transgene apoptinmus, ble befruktede oocytter fra FVB-musestammen og mus fra den murine stamme benyttet som foreldre. Mikro-injeksjoner ble utført i hannponuklei i henhold til Brinster et al. (1981). Per mikroinjeksjon ble 500 kopier av EcoR1 DNA-fragmentet avledet fra plasmid p21EcoA-Vp3-Eco, inneholdende den nødvendige H-2Kb transkripsjonsenhet og det fullstendige apoptingen injisert.

Resultater og diskusjon

Apoptin induserer apoptose i transformerte gnagerceller men ikke i normale embryonale celler.

For å undersøke hvorvidt apoptin ikke klarer å indusere apoptose i normale embryonale gnagerceller, ble kulturer av museembryoceller og rotteembryoceller transient transfektert med et plasmid som koder for apoptin. Som en negativ kontroll ble celler transfektert med et plasmid som koder for desmin, som ikke har apoptotisk aktivitet. Celler som uttrykker apoptin, ble utvalgt via indirekte immunofluoresens med Mab 85.1, og celler som uttrykker desmin med muse-Mab 33. Induksjon av apoptose i apoptin- eller desmin-positive celler ble analysert ved hjelp av DAPI, som forårsaker en regelmessig farging i intakte kjerner, men en uregelmessig og/eller svakt farging i apoptotiske kjerner.

Fem dager etter transfeksjon var omkring 10-20% av de desmin-positive celler apoptotiske, som er det basale nivået som mest sannsynlig er grunnet transfeksjonstjenesten (data ikke vist, Menke et al., 1997, Danen-van Oorschot, 1997a). 2, 3, 4 eller 5 dager etter transfeksjon overskred ikke prosentdelen av apoptotiske apoptinpositive celler signifikant prosentdelen av apoptiske celler observert i de desmin-positive kulturer, noe som indikerer at apoptin ikke induserer apoptose i normale embryonale cellekulturer. Transient transfeksjon av transformerte muse/rotte embroyonale eller babyrotte nyreceller med plasmidet som koder for apoptin, viste at apoptin er i stand til å indusere apoptose i disse celler. Resultatene av apoptinekspresjon i "normale" embryonale gnager- mot transformerte gnagerceller er vist i figur 1.

Disse data viser at apoptin ikke klarer å indusere apoptose i normale voksne og embryonale gnagerceller, men induserer apoptose i de viralt transformerte derivater, i det minste under celledykningsbetingelser.

Ko-ekspresjon av SV40 stort T-antigen og apoptin resulterer i apoptin-indusert apoptose i normale humane diploide celler.

Søker har undersøkt effekten av ekspresjon av transformerende gener på apoptinindusert apoptose i normale humane celler avledet fra friske individer. For dette formål ble humane VH10 diploide fibroblaster og FSK-1 diploide keratinocytter transient ko-transfektert med plasmid pcMV-VP3 som koder for apoptin og enten plasmid pSV40 som koder for både SV40 stort T og lite T-antigen, pR-s884 som koder for stort T-antigen, pR-SVt som koder for lite T-antigen, eller den negative-kontrollplasmid pCMV-neo. Ved indirekte immunofluoresens ble cellene analysert for apoptinindusert apoptose. Både normale VH10 og FSK-1 celler undergikk ikke apoptose når apoptin var transfektert med kontrollplasmidet.

Resultatene viste, som ventet, at ekspresjon av apoptin alene ikke var i stand til å indusere apoptose i normale humane diploide celler, noe som bekrefter data beskrevet av Danen-Van Oorschot (1997). Imidlertid undergikk normale diploide humane fibroblaster og keratinocytter som uttrykker både apoptin og SV40 stort T-antigen, alene eller sammen med lite T-antigen, apoptinindusert apoptose (figur 2). Graden av apoptoseinduksjon var vesentlig øket ved tilstedeværelse av de virale transformerende gener. Ko-ekspresjon av SV40 lite T-antigen med apoptin resulterte ikke i induksjon av apoptose med apoptin. Overgangen av de normale celler fra apoptinresistens til apoptinfølsomhet, kan sannsynligvis bli forklart ved det faktum at apoptinproteinet translokaliserer seg fra en cytoplasmisk beliggenhet til en nukleær beliggenhet. Denne overgangen blir tydelig allerede omtrent 2 dager etter transfeksjon av SV40-plasmidene (figur 3). Det kan konkluderes at en hendelse finner sted, i dette eksempel grunnet ekspresjon av et transformerende produkt fra et DNA-tumor virus, noe som resulterer i translokasjonen av apoptin fra cytoplasma til kjernen og som blir fulgt av induksjon av apoptose.

Ko-ekspresjon av SV40 stort T-antigen og apoptin resulterer i apoptin-indusert apoptose i normale diploide gnagerceller.

Dernest har søker undersøkt effekten av ko-ekspresjon av transformerende gener og apoptin på apoptoseinduksjon i normale muse embryofibroblaster (MEF) avledet fra p53 +/+ mus eller fra transgene p53 -/- mus. Begge typer transient transfekterte MEFs som ko-uttrykker det transformerende SV40 store T-gen med eller uten lite T-antigen i kombinasjon med apoptin, undergikk meget rask apoptose, mens MEF som uttrykker apoptin sammen med et kontrollplasmid eller med et plasmid som koder for det ikke-transformerende lille T-antigen, ikke resulterte i apoptinindusert apoptose. Resultatene er vist i figur 4.

Immunofluoresensanalyse viste også at ko-ekspresjon av apoptin og SV40 stort T-antigen resulterte i cellulær translokasjon av apoptin. I de undersøkte MEF foreligger apoptin i cytoplasma. Ved SV40 stort T-antigen ekspresjon trenger apoptin inn i kjernen, fulgt av induksjon av apoptose. Som sammenligning er prosentdelen av apoptin-positive transformerte museceller også gitt i figur 5.

Disse resultater indikerer at apoptin ikke induserer apoptose i både p53 +/+ og p53 -/- musefibroblaster, men gjør dette ved ekspresjon av et transformerende protein. Denne informasjon er viktig siden det er kjent at "normale" p53 -/- celler er meget mottakelige for spontan transformasjon og lett fortsetter til høyere transformerte fenotyper. Tap av p53 alene er imidlertid ikke tilstrekkelig til å danne en transformert karakter. Videre viser dette funn at apoptin kan indusere apoptose ved ekspresjon av et transformerende protein i andre pattedyrceller enn humane celler.

Ko-ekspresjon av SV40 stort T-antigen og apoptin resulterer i apoptin-indusert apoptose i normale diploide celler avledet fra kreft-mottakelige humane individer.

Ved hjelp av transient transfeksjon og immunofluoresens har søker også undersøkt effekten av apoptin i de normale fibroblaster F9605 og GM1492 som er avledet fra individer som viser en økt krefthyppighet grunnet en genetisk defekt. Apoptin er ikke i stand til å indusere apoptose i normale diploide celler fra disse kreftmottakelige individer. Imidlertid ved ekspresjon av SV40 stort T-antigen induserer apoptin apoptose (figur 6) etter å trenge inn i kjernen (data ikke vist).

Disse data bekrefter at diploide celler, fra arvemessige kreftmottakelige syndromer ikke er følsomme overfor apoptin, mens de blir dette når de uttrykker et transformerende gen. Således er diploide celler fra slike arvemessige syn-

dromer identiske med "normale" diploide humane celler i dette assay.

Effekten av induksjon av apoptose av kovalent binding av et SV40 stort T-antigen nukleær lokaliseringsignal til apoptinproteinet

Dernest har søker undersøkt hvorvidt ekspresjon av et kimerisk protein bestående av apoptin og det nukleære lokaliseringsignal av SV40 LT-antigen (aminosyrer N-Prolin-Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Argenin-Lysin-Valin-C av SV40 stort T-antigen kovalent bundet til N-terminal av apoptin) resulterer i induksjonen av apoptose i ikke- og transformerte humane celler. Det kimeriske protein er kalt NLS-apoptin. For dette formål ble ikke-transformerte VH10 humane fibroblaster og transformerte humane osteosarkoma-avledede Saos-2-celler (Danen-van Oorschot et al., 1997) transfektert med et plasmid som koder for det kimeriske protein NLS-apoptin. I begge celletyper resulterte ekspresjon av NLS-apoptin i nukleær lokalisering av apoptin og induksjon av apoptose. Ekspresjon av det ikke-apoptotiske protein Green Fluorescent Protein (GFP; (Pines, 1995) kovalent bundet til NLS trengte inn i kjernen, noe som ikke resulterte i induksjon av apoptose.

Disse data viser at et modifisert apoptin som tillater dets beliggenhet i kjernen på en celle-transformert-uavhengig måte vil være i stand til å translokere til kjernen, fulgt av induksjon av apoptose.

Et fusjonsprodukt av de første N-terminale 69 aminosyrer av apoptin og det ikke-apoptotiske GFP-protein resulterer ikke i induksjon av apoptose, og dette samfaller med det faktum at dette kimeriske protein ikke trenger inn i kjernen (Noteborn og Pietersen, 1998). Søker har nå kovalent bundet de 8 aminosyrer av NLS til N-terminalen av apoptinfragmentet som består av aminosyrene 1-69 (NLS-apoptin/1-69). Transfeksjon av både ikke-transformerte VH10-celler og tumori-

gene humane celler (så som humane osterosarkoma-avledede-Saos-2-celler) med et plasmid som koder for NLS-apoptin/1-69 resulterte i nukleær lokalisering av NLS-apoptin/1-69 fuglt av induksjon av apoptose.

Disse data indikerer at ved siden av den C-terminale del av apoptin, gjør også den N-terminale del (1-69 a.a.) dette når den blir translokert til kjernen. I disse forsøk ble som ventet, NLS-GFP translokert til kjernen, men resulterte ikke i induksjonen av apoptose.

Normale diploide celler fra kreftmottakelige individer undergår apoptinindusert apoptose etter UV-bestråling.

Søker har også undersøkt effekten av UV-bestråling på apoptoseinduksjon med apoptin på diploide celler. Diploide fibroblaster avledet fra friske personer (VH25) eller fra individer med kreftmottakelige syndrom (LF2675T-celler fra en Li Fraumeni Syndrom pasient, og 401-celler fra en Lynch type 2 Syndrompasient) ble transient transfektert med et plasmid som koder for apoptin. Før transfeksjon ble deler av cellene UV-bestrålt. Som negativ kontroll ble cellene transfektert med et plasmid som koder for proteinet desmin.

Alle 3 celletyper, VH25, LF2675T og 401 viste ikke apoptinindusert apoptose uten UV-bestråling. I kombinasjon med UV-bestråling undergikk imidlertid LF2675T og 401-cellene, men ikke VH25-cellene, apoptinindusert apoptose meget raskt. Selv om søker ikke har noe forklaring for dette fenomen, syntes det som om det korrelerer med en annen cellulær egenskap. Diploide celler fra pasienter som er kreftmottakelige grunnet en kjønnslignende mutasjon i et suppressorgen viser en uventet reaksjon for UV-bestråling. Når normale diploide fibroblaster blir behandlet med UV- eller et annet DNA-skadede middel, reagerer de med en mengde transiente responser, innbefattende aktivering av signal transduksjonsveier, induksjon av ekspresjon av en mengde gener, inhibering av cellulær DNA-replikasjon og aktivering av

SOS-lignende fenomener så som øket reaktivering (ER) og øket mutagenese (EM). Abrahams et al. (1996) har funnet at normale diploide fibroblaster fra pasienter med en arvelig kreftpredisposisjon grunnet en kjønnslignende mutasjon i et tumor suppressorgen, viser den samme respons overfor UV-bestråling som celler fra normale individer, bortsett fra for en respons: øket reaktivering. ER-responsen i celler fra disse pasienter er mye høyere enn i celler fra normale individer, og således blir disse pasientceller kalt Ersuper (+). Den molekylærbiologiske basis for ER-fenomenet er fremdeles uklart. Påvisningen av ER er en tidskrevende metode, ettersom den er basert på målingen av den (økede) overlevelse av et UV-bestrålt virus i UV-skadet (eller røntgentstrålet skadede) celler, sammenlignet med overlevelsen av ikke-skadede celler. Et assay basert på apoptininduserte apoptose ved UV-bestråling er vesentlig enklere og raskere (se nedenfor). Det faktum at apoptin blir aktiv i kreftmottakelige celler ved UV-bestråling gjør det også mulig å studere ER-prosessen. Det finnes tegn som indikerer at ER spiller en viktig rolle i prosessen med kreftinduksjon av DNA-skadende midler.

Normale diploide celler fra kreftmottakelige individer undergår apoptininduserte apoptose etter røntgenstrålebehandling.

Dernest har søker også undersøkt effekten av røntgenstrålebehandling på apoptoseinduksjonen med apoptin på humane diploide celler. Diploide fibroblaster avledet fra friske individer (VH10) eller fra personer med et kreftmottakelig syndrom så som LF2675- og 401-celler ble transfektert med et plasmid som koder for apoptin. Før transfeksjon ble deler av cellene behandlet med røntgenstråler (dose; 5 gray). Som negativ kontroll ble cellene transfektert med et plasmid som koder for proteinet desmin.

Som ventet viste alle analyserte ikke-bestrålte celler av cellelinjene: VH10, LF2675 og 401, ikke apoptininduserte

apoptose. I kombinasjon med røntgenstrålebehandling, undergikk imidlertid cellelinjene avledet fra de kreftmottakelige individer apoptose, mens dem avledet fra friske personer ikke gjorde dette. Fem dager etter transfeksjon hadde størstedelen av disse røntgenstrålet behandlede apoptin positive kreftmottakelige celler blitt apoptotiske. Cellene behandlet med røntgenstråler og som uttrykte det ikke-apoptotiske middel desmin, undergikk ikke apoptinindusert apoptose.

Disse resultater antyder at behandling med røntgenstråler, som forårsaker DNA-skade så som den ovenfor beskrevne UV-C-behandling, resulterer i induksjonen av apoptose med apoptin i normale ikke-transformerte humane celler.

Diagnostisk assay for kreftinduserende gener basert på apoptinindusert apoptose.

Danen-Van Oorschot et al. (1997a) har rapportert at den cellulære lokalisering av apoptin er forskjellig i tumorigene/transformerte humane celler sammenlignet med lokaliseringen i normale ikke-transformerte celler. Videre korrelerer akkumulering av apoptin i kjernen med apoptoseinduksjon, mens cytoplasmatisk lokalisering korrelerer med cellelevedyktighet og normal proliferativ kapasitet.

Basert på foreliggende rapport er søker i stand til å utvikle et diagnostisk assay for identifikasjonen av kreftinduserende og/eller transformerende midler eller gener. En første type assay omfatter å transfektere "normale" celler, for eksempel fra human eller gnager opprinnelse, med et plasmid som koder for apoptin, eller infiserer cellene med virale vektorer som uttrykker apoptin, sammen med et plasmid som koder for et forsøksmessig transformerende/kreftinduserende gen. Derpå vil cellene bli undersøkt, (1) for egenskapen å undergå apoptose ved apoptingenet og (2) for et skift i lokaliseringen av apoptin fra cytoplasma til kjernen.

Den intracellulære lokalisering av apoptin kan bli bestemt ved å bruke et immunofluoresens assay med monoklonale antistoff som er spesifikke for apoptin, så som CVI-CAV-85.1. Dersom prosentdelen av apoptose i normale celler som ko-uttrykker apoptin og det forsøksmessige transformerende/-kreftinduserende gen er signifikant høyere enn i apoptin-positive kontrollceller som uttrykker et kontrollplasmid kan det konkluderes med at det analyserte genet faktisk kan ha transformerende/kreftinduserende aktivitet.

Et andre eksempel på en diagnostisk test er basert på behandlingen av dyrkede normale diploide celler med et forsøksvist karcinogent middel. Midlet kan for eksempel bli tilsatt til kulturmedia for forskjellige tidslengder. Derpå blir cellene transfektert med et plasmid som koder for apoptin eller infisert med en viral vektor som uttrykker apoptin. Denne metode kan også bli utført ved først å transfekteres/infiseres de normale celler, og så behandle cellene med midlet som skal undersøkes. De følgende trinn i assayet er de samme som beskrevet for første type diagnostisk assay.

Diagnostisk assay for mottakelighet overfor kreft

Dataene presentert i foreliggende beskrivelse tillater å utvikle et assay for å bestemme hvorvidt et individ med en ukjent cellulær/genetisk bakgrunn er mottakelig overfor kreft sammenlignet med normale friske personer. Normale diploide celler fra et individ som er mottagelig mot kreft er ufølsomme overfor apoptinindusert apoptose, men blir dette etter behandling med UV- eller røntgenstråler eller annet DNA-skadende middel. Nedenfor er det beskrevet et eksempel på et slikt diagnostisk assay basert på effekten av UV-bestråling. Dette assay kan også bli utført med andre mutagene/karcinogene midler.

Primære normale diploide celler isoleres fra en hudbiopsi fra individet som skal undersøkes og dyrkes i et egnet me-

dium. Dernest blir cellene bestrålt med UV og påfølgende transfektert med et plasmid som koder for apoptin, eller infisert med en viral vektor som uttrykker apoptin, eller cellene blir først transfektert/infisert og så bestrålt. I parallell vil diploide celler fra et normalt friskt individ bli brukt som en kontroll.

Ved å bruke et indirekte immunofluorescensassay basert på apoptinspesifikke Mabs blir cellene analysert for tilstedeværelsen av apoptin i kjernen og/eller for å undergå apoptose. Dersom prosentdelen av celler som undergår apoptose blant de apoptinpositive UV-bestrålte celler er signifikant høyere enn prosentdelen av apoptose i UV-behandlede celler hos et normalt individ, vil dette være et sterkt tegn på at individet hvorfra cellene er isolert vil være mottakelige overfor kreft.

Anvendelse av apoptinproteiner i farmasøytiske formuleringer for anti-kreftterapi.

På basis av de ovennevnte resultater kan det også utvikles fremgangsmåter for å anvende apoptin i anti-kreftterapi, ikke som et gen(DNA), men som et protein. Apoptin er et relativt lite protein som gjør det mulig å innføre det i celler som et protein. (Dersom fragmenter av apoptinproteinet fremdeles har den ønskede apoptotiske effekt på kreftceller vil det bli brukt proteinfragmenter i stedet for det intakte protein). Målet er å utvikle effektive farmasøytiske formuleringer som sikrer stabilitet av den aktive komponent (=apoptin eller et fragment derav) og om mulig spesifisitet overfor kreftcellen som den skal rettes mot.

Neoplasir som det er håp om å behandle med egnede apoptininneholdende formuleringer som både er helbredende og forebyggende innbefatter: arvelige former for kolorektal kreft (familial adenomatøs polyposis (APC) og arvelig ikke-polyposis kolorektal kreft (HNPCC), kreft i leveren (eller an-

dre organer som kan behandles med perfusjonsteknikker), leukemi og lymfomer (som kan behandles via blodbanen), hudkreft og muligens lungekreft (via luftveiene).

Konstruksjonen og analysen av et ekspresjonsplasmid for dannelse av transgene apoptinmus.

Det faktum at det har blitt observert at apoptin ikke klarer å indusere apoptose i dyrkede murine embryoniske fibroblaster fører til den konklusjonen at apoptin også kan bli uttrykt i intakte embryoer og voksne mus uten å forårsake toksisitet, i det minste embryoer av et ikke for tidlig stadium av embryonal utvikling. Det er blitt valgt et ekspresjonssystem basert på den murine H-2Kb transkripsjonsenhet som tillater konstitutiv ekspresjon av fremmede gener under embryogenese og ved voksne stadier i forskjellige organer (Drezen et al., 1992; Morello et al., 1986).

Følgelig er ekspresjonsplasmidet p21EcoA-Vp3-Eco blitt konstruert som uttrykker apoptin under regulering av den murine H-2Kb-promoter. Videre inneholder ekspresjonsvektoren de andre H-2Kb-elementer som vil tillate ekspresjon av apoptingenet. Figur 8 viser en skjematisk representasjon av den transgene apoptin ekspresjonsvektor p21EcoA-Vp3-Eco.

Ved hjelp av transiente transfeksjoner av transformerte Saos-2-celler med plasmidet p21EcoA-Vp3-Eco var søker i stand til å vise at apoptin faktisk kunne bli uttrykt i forbindelse med H-2Kb-sekvensene. Videre resulterte det uttrykte apoptin i induksjonen av apoptose i en lignende grad som apoptin uttrykt ved hjelp av plasmidet pCMV-VP3 (se figur 9).

Disse resultater antyder at den benyttede ekspresjonsvektor p21EcoA-Vp3-Eco uttrykker apoptin på en slik måte at transformerte celler vil undergå apoptose.

Dannelsen av transgene apoptinmus

Totalt 300 befruktede oocytter ble mikroinjisert med et DNA-fragment omfattende H-2Kb transkripsjonsenheten og apoptingenet og overført til 11 fostermus. Totalt ble det oppnådd et avkom på 51 nyfødte mus. Ved hjelp av Southern-blot analyse (Southern, 1975) av BamHI- eller XbaI-spaltet musehale-DNA ved å bruke et 32P-merket DNA-fragment bestående av hele VP3-genet, ble det vist at apoptin/H-2Kb-enheten var integrert inne i det genomiske DNA hos totalt 7 grunnleggende (F0) mus. Alle transgene apoptinmus så friske ut. Av ukjente grunner døde imidlertid en transgen apoptinmus ved en alder på 5-6 uker. De transgene apoptinmus ble parret med FVB hanner eller hunner. Hale-DNA fra avkommet ble analysert for tilstedeværelsen av apoptingenet ved å bruke en polymerase kjedereaksjon (PCR)-analyse ved å bruke primerne P1 (5' - CTCTCCAACAACATACT-CCACCCGG-3') og P2 (CTTATACGCCTTTTT-GCGGTTCGGG-3'). Fra alle F0-mus ble det oppnådd en eller flere transgene apoptin F1-mus (figur 10). Alle mus av F1-generasjonen av de transgene apoptindyr ble vist å være levedyktige og viser så langt ingen patologisk defekt som kunne bli korrelert med ekspresjonen av apoptin.

Ved hjelp av Northern-blot-analyse (Noteborn et al., 1992) kunne ekspresjonen av apoptingenet som ventet bli bestemt i forskjellige organer.

Beskrivelse av figurene

Figur 1 viser den apoptininduserte apoptoseaktivitet i "normale" gnagerembryofibroblaster mot celler av transformerte gnagercellelinjer. Cellene var transient transfektert med pCMV-VP3. Etterfølgende ble cellene fiksert ved flere tidsintervaller etter transfeksjon og analysert med indirekte immunofluorescens ved å bruke det apoptinspesifike Mab 85.1. Prosentdelen av apoptinpositive celler som

farget unormalt med DAPI er gitt som relativt mål på induksjonen av apoptose.

Figur 2 viser effekten av SV40 stort T-antigen og/eller lite T-antigen på apoptinindusert apoptose i fibroblaster og keratinocytter fra normale individer. VH10 og FSK-1-celler ble transient transfektert med plasmid pCMV-VP3 og pCMV-neo eller SV40 som uttrykker SV40 stort T og lite T antigen, pR-s884 som uttrykker SV40 stort T antigen og pR-SVt som uttrykker SV40 lite t antigen. Etterfølgende ble cellene fiksert ved flere tidsintervaller etter transfeksjon og analysert med indirekte immunofluorescens ved å bruke det apoptinspesifike Mab 85.1. Prosentdelen av apoptinpositive celler som farget unormalt med DAPI er gitt som relativt mål for apoptose.

Figur 3 viser beliggenheten av apoptin i normale humane diploide celler som uttrykker kun apoptin eller sammen med SV40 stort T og/eller lite T antigen. De samme celler analysert i figur 2, med hensyn til induksjonen av apoptose ble også undersøkt for lokaliseringen av apoptin i kjernen eller cytoplasma. Prosentdelen av apoptinpositive celler inneholdende apoptin i kjernen og som fremdeles ikke har undergått apoptose er gitt som relativt mål på apoptinlokalisering i kjernen.

Figur 4 viser effekten av SV40 stor T antigen og/eller lite T antigen på apoptinindusert apoptose i musefibroblaster som er avledet fra normale p53 +/+ mus eller fra en transgen p53 -/- knock-out-mus. Cellene ble transient transfektert med plasmid pCMV-VP3 som uttrykker apoptin og kontrollplasmidet pCMV-neo eller med pSV40 som uttrykker SV40 stort T antigen, pR-s884 som uttrykker stort T antigen og pR-SVt som koder for lite T antigen. Etterfølgende ble cellene fiksert ved flere tidsintervaller etter transfeksjon og analysert med indirekte immunofluorescens ved å bruke det apoptinspesifikke Mab 85.1. Prosentdelen av

apoptinpositive celler som farget unormalt med DAPI er gitt som relativt mål for apoptose.

Figur 5 viser beliggenheten av apoptin i embryoniske p53 +/+ eller p53 -/- musefibroblaster som uttrykker kun apoptin eller sammen med SV40 stort T antigen og/eller lite T antigen. De samme celler som ble analysert i figur 4 med hensyn til induksjonen av apoptose ble nå også undersøkt for lokaliseringen av apoptin i kjernen eller cytoplasma. Prosentdelen av apoptinpositive celler inneholdende apoptin i kjernen og som fremdeles er apoptotiske er gitt som relativt mål på apoptinlokalisering i kjernen

Figur 6 viser effekten av SV40 stort T antigen på apoptin-indusert apoptoseaktivitet i "normale" diploide humane fibroblaster 9605 eller G4905 avledet fra kreftmottakelige individer. Cellene ble transient transfektert med pCMV-VP3 og pCMV-neo eller pSV40 som uttrykker både stort T og lite T antigen av SV40, pR-s884 som uttrykker stort T antigen og pR-SVt som uttrykker lite T antigen. Etterfølgende ble cellene fiksert ved flere tidsintervaller etter transfeksjon og analysert med indirekte immunofluorescens ved å bruke det apoptinspesifikke Mab 85.1. Prosentdelen av apoptinpositive celler som farget unormalt med DAPI er gitt som relativt mål for apoptose.

Figur 7 viser effekten av UV-bestråling på apoptindindusert apoptose i "normale" diploide fibroblaster avledet fra normale friske individer mot kreftmottakelige kreftpasienter. Cellene ble "liksom"-behandlet eller behandlet med UV-lys og deretter transient transfektert med pCMV-VP3 eller med pCMV-des. Til slutt ble cellene fiksert ved flere tidsintervaller etter transfeksjon og analysert med indirekte immunofluorescens ved å bruke det apoptinspesifikke Mab 85.1. Prosentdelen av apoptinpositive celler som farget unormalt med DAPI er gitt som relativt mål for apoptose.

Figur 8 viser en skjematisk representasjon av den transgene apoptin ekspresjonsvektor.

Figur 9 viser den apoptininduserte apoptoseaktivitet i Saos-2 celler. Cellene ble transient transfektert med p21EcoA-Vp3-Eco, pCMV-VP3 (som begge uttrykker apoptin) eller med pCMV-des, som uttrykker det ikke-apoptotiske desmin. Derpå ble cellene fiksert ved flere tidsintervaller etter transfeksjon og analysert med indirekte immunofluorescens ved å bruke det apoptinspesifikke Mab 85.1. Prosentdelen av apoptinpositive celler som farget unormalt med DAPI er gitt som et relativt mål på induksjonen av apoptose.

Figur 10.
Skjematisk representasjon av kullet av de VP3 (apoptin)-transgene mus. De hvitfargede bokser er grunnleggende mus. De gule- og grønnfargede bokser representerer avkommet (F1) av de forskjellige apoptintransgene grunnleggere.

p a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved bestemmelse av den transformerende egenskap hos et mulig transformerende middel omfattende
- å fremskaffe en ikke-transformert diploid celle med induserbar apoptin-apoptotisk aktivitet,
- eksponere nevnte celle til nevnte transformerende middel og
- bestemme beliggenheten av nevnte apoptotiske aktivitet inne i nevnte celle eller bestemme induksjonen av apoptose i nevnte celle,

hvor nevnte apoptin-apoptotiske aktivitet er fremskaffet av et plasmid som koder for apoptin eller en viral vektor som uttrykker apoptin.

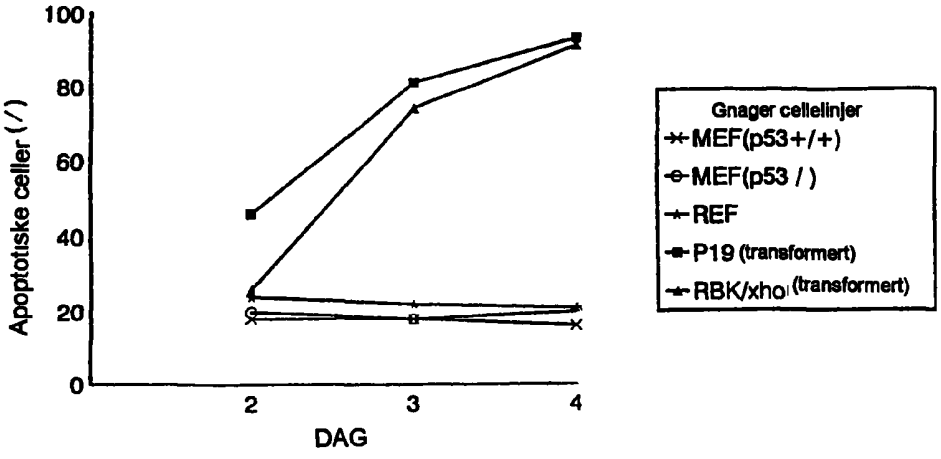
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1 hvorved nevnte apoptotiske aktivitet blir fremskaffet ved å transdusere nevnte celle med et rekombinant nukleinsyremolekyl som koder for nevnte aktivitet.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2 hvorved nevnte mulige transformerende middel er en proteinholdig substans.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3 hvorved nevnte proteinholdige substans blir co-uttrykt i nevnte ikke-transformerte celle med nevnte apoptotiske aktivitet.

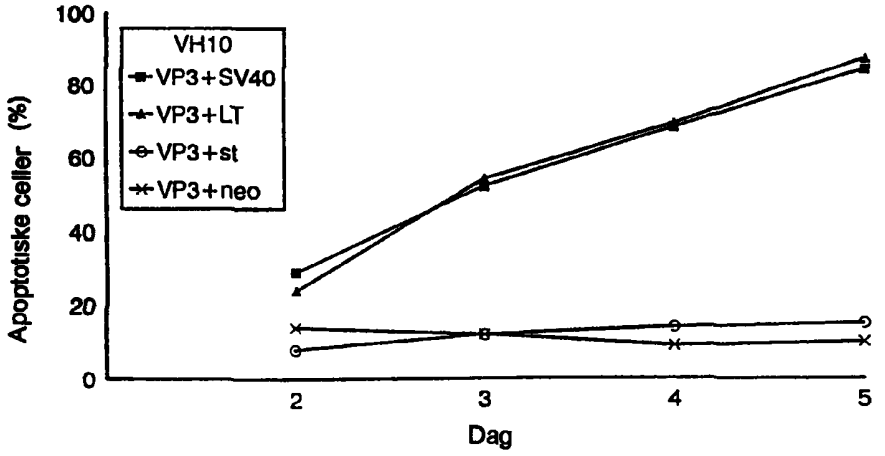
Figur 1

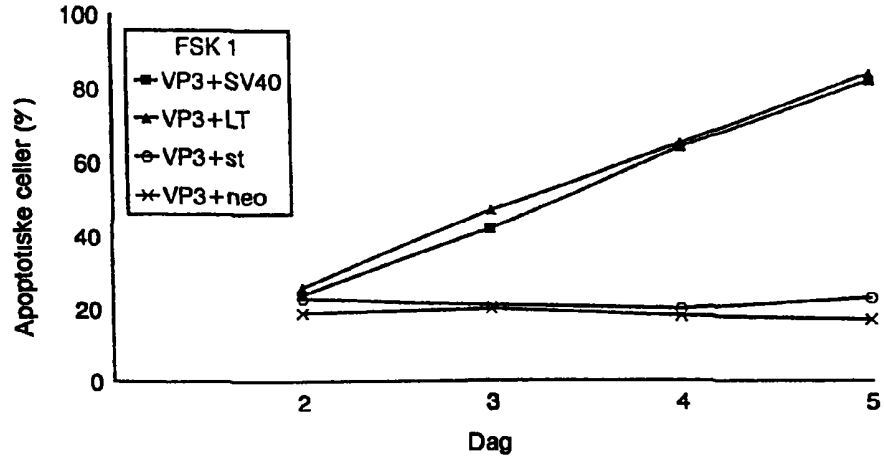
Apoptin-indusert apoptose i normale gnager-embryo fibroblaster mot transformerte cellelinjer



Figur 2

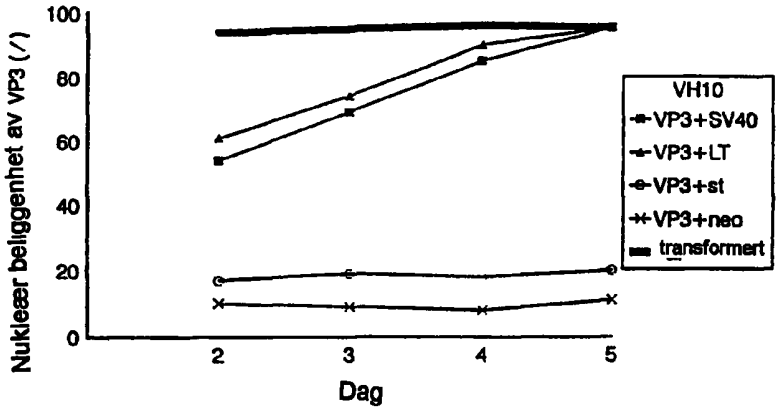
Effekt av SV40 LT+st, LT eller st antigen pa apoptin-indusert apoptose i VH10 og FSK-1

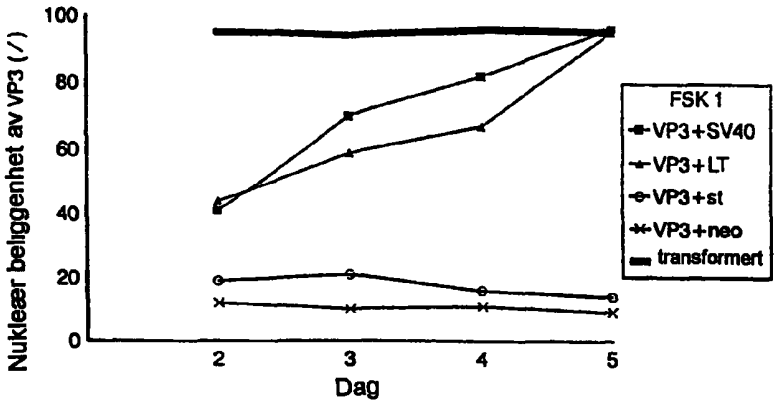




Figur 3

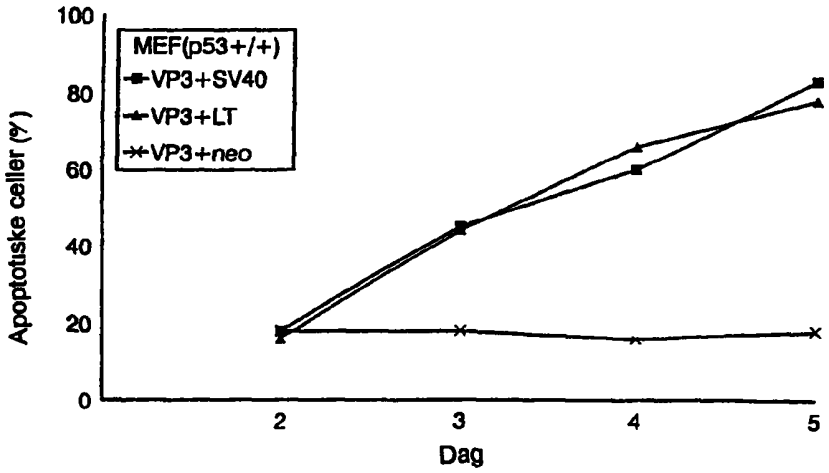
Beliggenhet i VH10 og FSK-1 som uttrykker apoptin alene eller med SV40 LT+st, LT eller st antigen

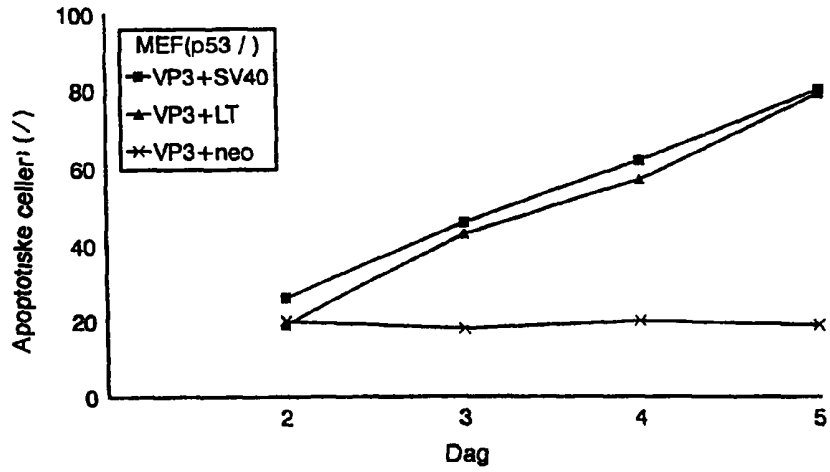




Figur 4

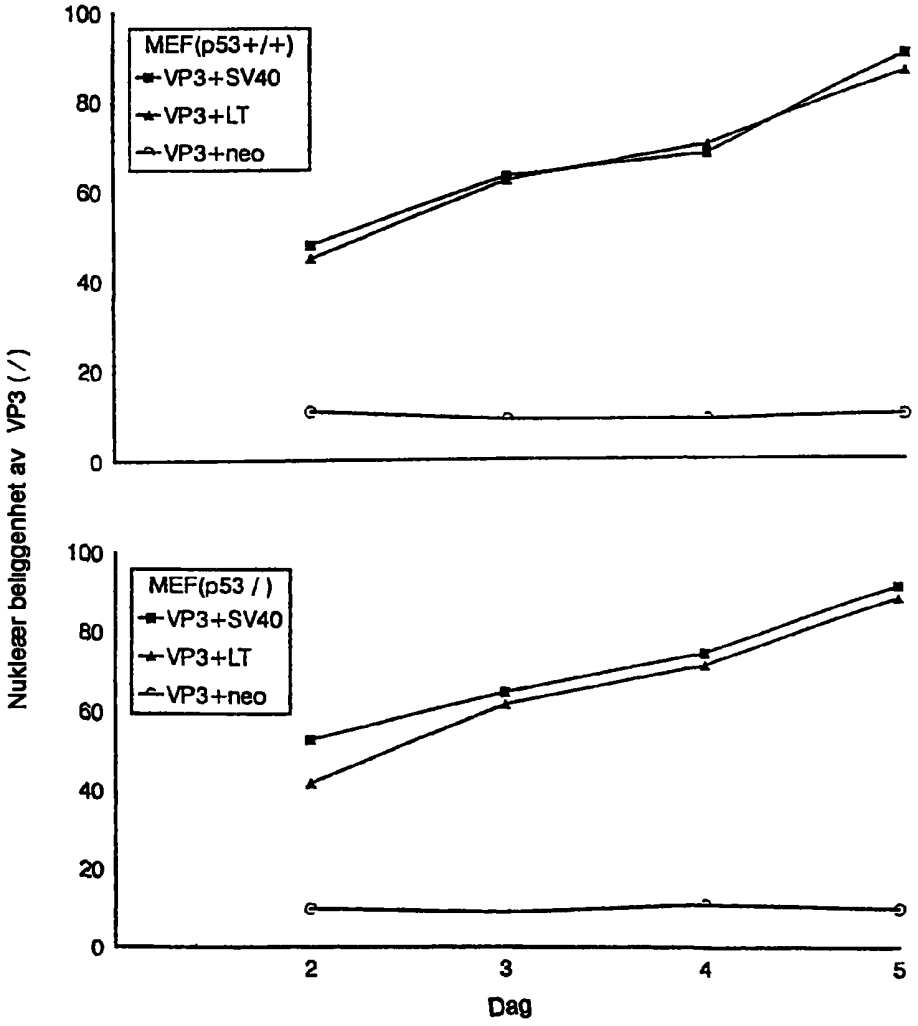
Effekt av SV40 LT+st eller LT antigen på apoptin-indusert apoptose i MEF(P53+/+) og MEF(p53-/-)





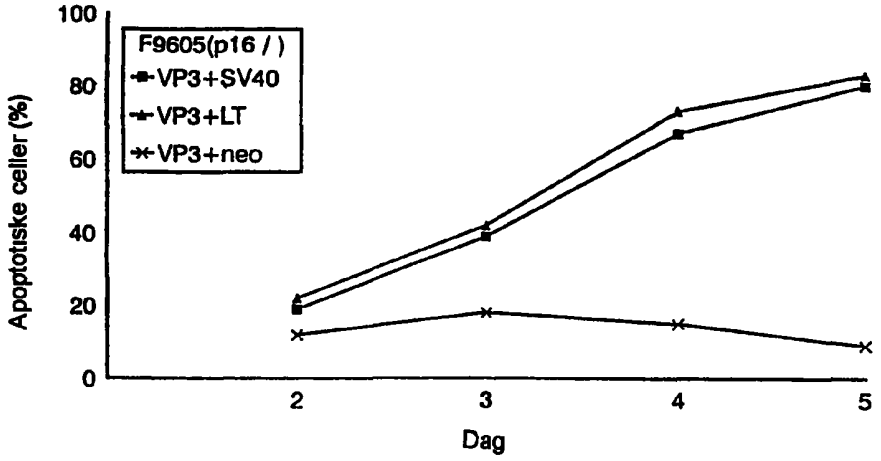
Figur 5

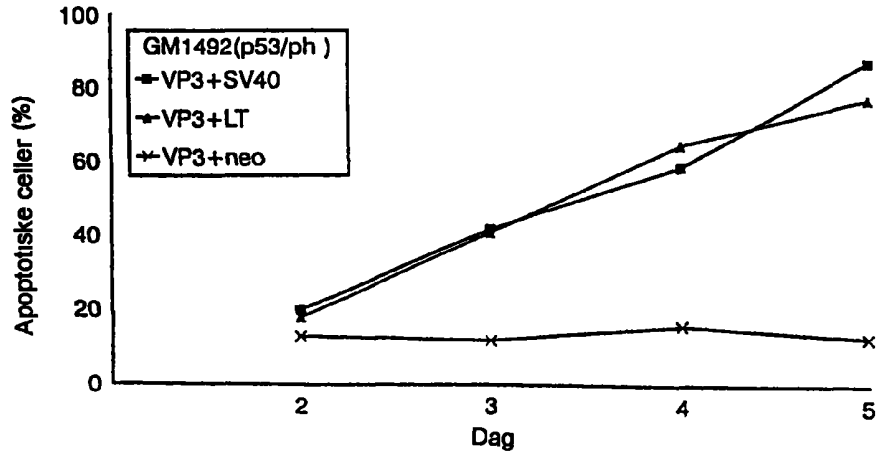
Beliggenhet av apoptin i MEF(p53+/+) eller MEF(p53-/-) som uttrykker apoptin alene eller sammen med SV40 LT+st eller LT antigen



Figur 6

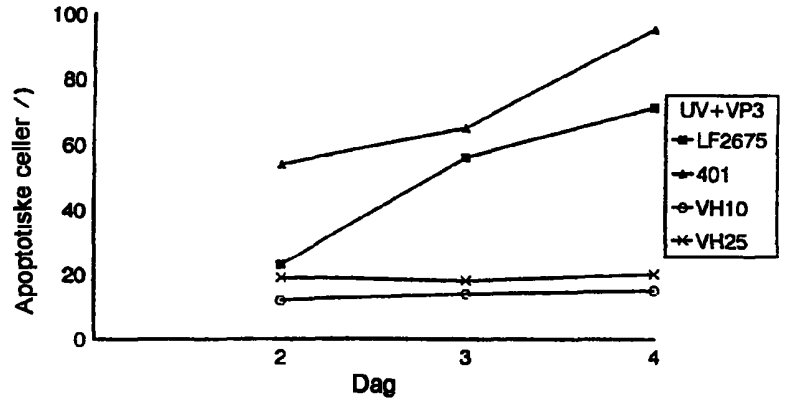
Effekt av SV40 LT+st eller LT antigen på apoptin-indusert apoptose i normale diploide humane fibroblaster avledet fra kreft-mottakelige individer

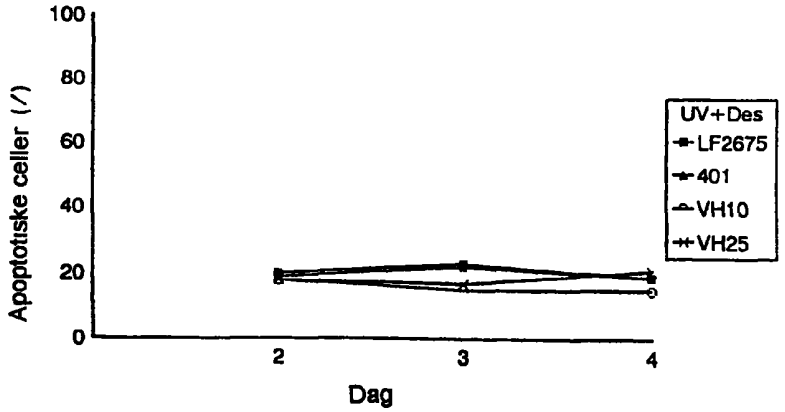


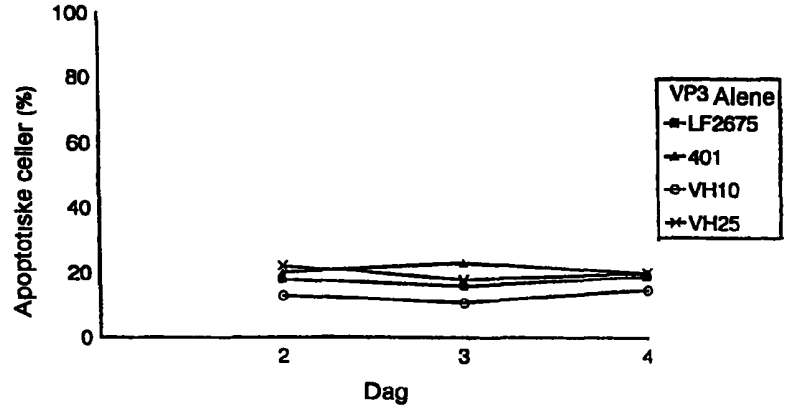


Figur 7

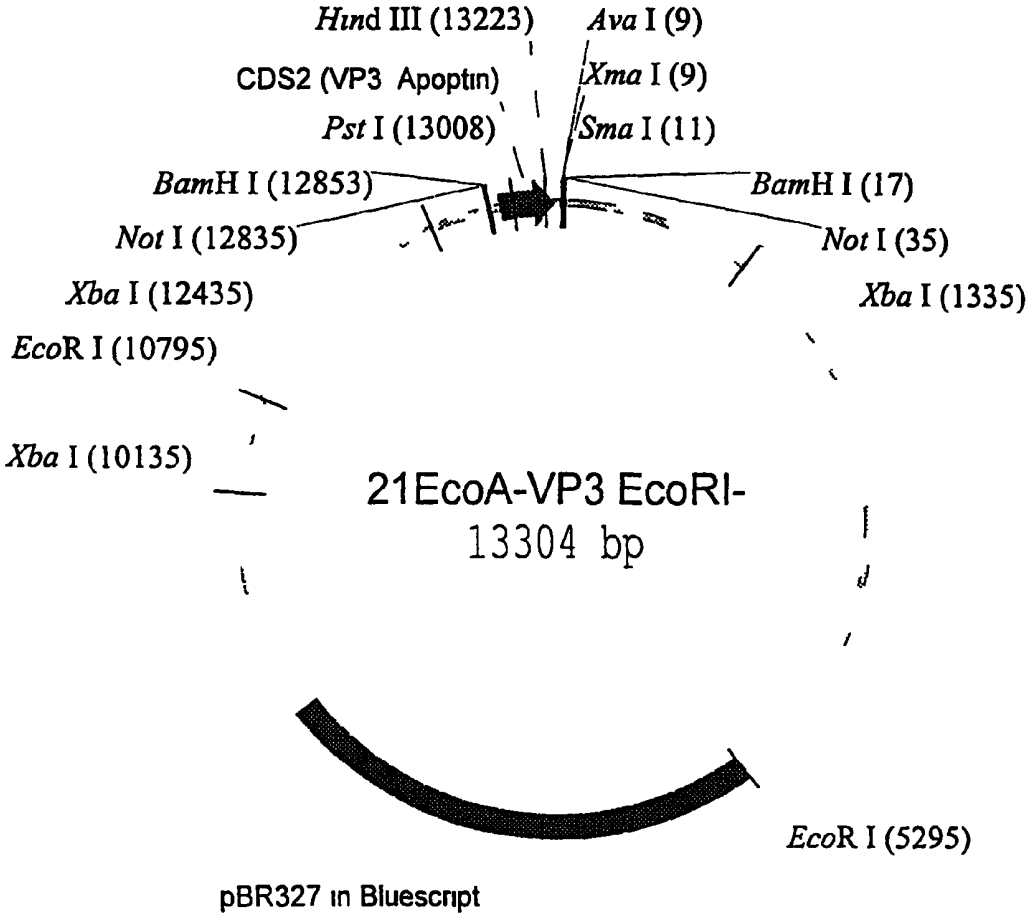
Effekt av UV-bestråling på apoptin-indusert apoptose i normale diploide fibroblaster avledet fra friske mot kreft-mottakelige individer





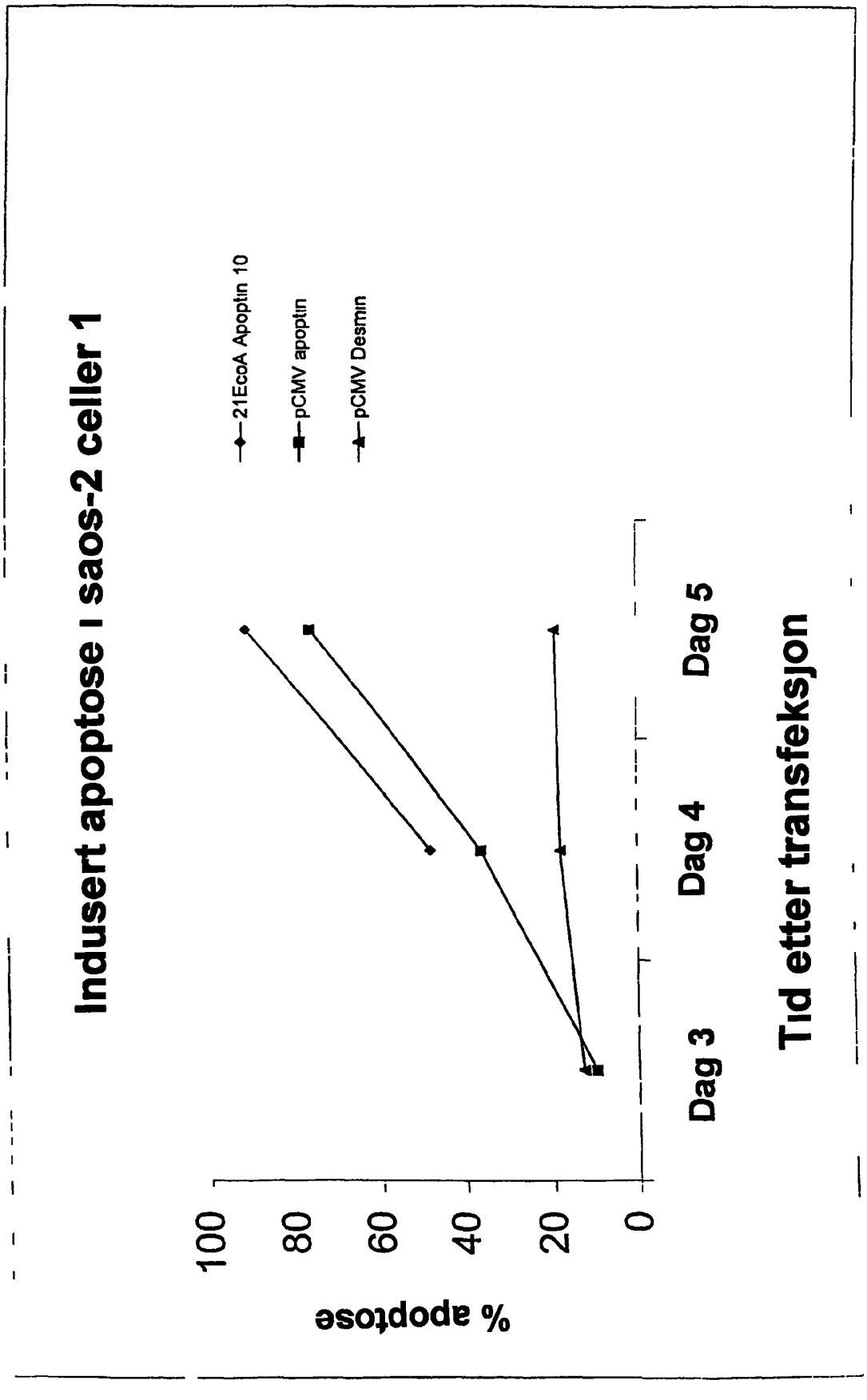


Figur 8



pBR327 in Bluescript

Figur 9


Indusert apoptose i saos-2 celler 1
21EcoA Apoptin 10
pCMV apoptin
pCMV Desmin
% apoptose
100
80
60
40
20
0
Dag 3
Dag 4
Dag 5
Tid etter transfeksjon

Figur 10

Oversikt over VP3 transgene mus

