

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.04.28	(73) Titular(es): YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM HI TECH PARK, EDMOND J. SAFRA CAMPUS, THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, GIVAT RAM, P.O. BOX 39135 91390 JERUSALEM	IL
(30) Prioridade(s): 2002.04.29 IL 14940402	(72) Inventor(es): YINON BEN-NERIAH IRIT ALKALAY SHARON AMIT YAARA BIRMAN	IL IL IL IL
(43) Data de publicação do pedido: 2005.05.11	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.07.21 207/2010		

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A FOSFORILAÇÃO DE BETACATENINA**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA MODULADORES DE FOSFORILAÇÃO DE Β-CATENINA. MAIS ESPECIFICAMENTE, O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA INIBIDORES E FACILITADORES DA FOSFORILAÇÃO DA SERINA 45 (S45) DE Β-CATENINA. SÃO EXEMPLOS DE INIBIDORES PROPORCIONADOS PELO INVENTO, AS PROTEÍNAS DISHEVELLED (DVL), WNT, FOSFATASE PP2A E CK17. EXEMPLOS DE FACILITADORES DE FOSFORILAÇÃO DE Β-CATENINA SÃO INIBIDORES DE FOSFATASE E PROTEÍNAS QUE PROMOVEM ACETILAÇÃO DE CATENINA, TAIS COMO FRAT1. ALÉM DISSO, O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA COMPOSIÇÕES E UTILIZAÇÕES DOS MODULADORES DO INVENTO ESPECIFICAMENTE PARA O TRATAMENTO DE CANCRO, ASSIM COMO UM MÉTODO PARA RASTREAR TAIS MODULADORES.

RESUMO

"Métodos e composições para modular a fosforilação de beta-catenina"

O presente invento proporciona moduladores de fosforilação de β -catenina. Mais especificamente, o presente invento proporciona inibidores e facilitadores da fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina. São exemplos de inibidores proporcionados pelo invento, as proteínas Dishevelled (Dvl), Wnt, fosfatase PP2A e CK17. Exemplos de facilitadores de fosforilação de β -catenina são inibidores de fosfatase e proteínas que promovem acetilação de catenina, tais como FRAT1. Além disso, o presente invento proporciona composições e utilizações dos moduladores do invento especificamente para o tratamento de cancro, assim como um método para rastrear tais moduladores.

DESCRIÇÃO

"Métodos e composições para modular a fosforilação de beta-catenina"

Campo do invento

O presente invento refere-se ao campo do tratamento do cancro. Mais especificamente, o presente invento divulga moduladores de β -catenina, métodos para o rastreio de tais moduladores, assim como suas composições e utilizações.

Antecedentes do invento

Estudos genéticos em moscas, sapos e mamíferos posicionaram a via Wnt como uma reguladora principal do desenvolvimento animal, tanto durante a embriogénese como no organismo maduro [Wodarz, A. e R. Nusse (1998) *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 59-88; Eastman, Q. e R. Grosschedl (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11: 233-240; Peifer, M. e P. Polakis (2000) *Science* 287: 1606-1609; Huelsken, J. e W. Birchmeier (2001) *Curr Opin Genet Dev* 11: 547-553]. Um alvo principal da via Wnt é a catenina citoplasmática que, quando estabilizada em resposta a sinalização Wnt, entra no núcleo e serve como um co-activador da transcrição induzida por TCF/LEF [Willert, K. e R. Nusse (1998) *Curr Opin Genet Dev* 8: 95-102; Bienz, M. e H. Clevers (2000) *Cell* 103: 311-320; Polakis, P. (2000) *Genes Dev* 14: 1837-1851]. As células não estimuladas contêm um complexo multiproteico citoplasmático contendo β -catenina, a Ser/Thr-quinase glicogénio-sintase-quinase-3 β (GSK-3 β), axina [Zeng, L. et al. (1997) *Cell* 90: 181-192; Ikeda, S. et al. (1998) *EMBO J* 17: 1371-1384; Sakanaka, C. et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 3020-3023] ou o seu homólogo Axil/Conductina [Behrens, J. et al. (1998) *Science* 280: 596-599; Yamamoto, H. et al. (1998) *Mol Cell Biol* 18: 2867-2875], e o supressor de tumor de polipose cólica adenomatosa (APC) [Grodén, J. et al. (1991) *Cell* 66: 589-600; Kinzler, K.W. et al., (1991) *Science* 253: 661-665]. Pensa-se que a APC e a axina desempenham uma função estrutural, facilitando a fosforilação GSK-3 β de β -catenina na região do terminal N [Hart, M.J., R. et al. (1998) *Curr Biol* 8: 573-581; Hinoi, T. et al. (2000) *J Biol Chem* 275: 34399-34406]. Este(s) evento(s)

de fosforilação marca(m) a β -catenina para ubiquitinação pela SCF ^{β} -TrCP E3 e subsequente degradação no proteossoma [Aberle, H. *et al.* (1997) EMBO J 16: 3797-3804; Hart, M. *et al.* (1999) Curr Biol 9: 207-210; Kitagawa, M. *et al.* (1999) EMBO J 18: 2401-2410; Latres, E. *et al.* (1999) Oncogene 18: 849-854; Winston, J.T. *et al.* (1999) Genes Dev 13: 270-283].

A sinalização de Wnt inicia-se por proteínas Wnt excretadas, que se ligam a membros da família de receptores Frizzled [Wodarz e Nusse (1998) *id ibid.*]. A ligação de Wnt resulta na activação de Dishevelled (Dvl-1, 2 e 3 em humanos e ratinhos) [Boutros, M. e M. Mlodzik (1999) Mech Dev 83: 27-37], a qual, através da sua associação com axina, evita que GSK-3 β fosforile β -catenina, levando à sua estabilização [Yamamoto, H. *et al.* (1999) J Biol Chem 274: 10681-10684]. O mecanismo da acção de Dvl na inibição de fosforilação de β -catenina por GSK-3 β é essencialmente desconhecido. De acordo com um modelo prevalecente, este mecanismo envolve PRAT (GBP), uma proteína de ligação de GSK-3 β que desloca axina de GSK-3 β resultando na falha de fosforilação de β -catenina [Li, L. *et al.* (1999) EMBO J 18: 4233-4240; Farr, G.H. *et al.* (2000) J Cell Biol 148: 691-702; Bax, B. *et al.* (2001) Structure (Camb) 9: 1143-1152; Fraser, E. *et al.* (2002) J Biol Chem 277(3):2176-85]. Contudo, não existem presentemente evidências que relacionem directamente a actividade Dvl com dissociação de axina-GSK-3 β induzida por FRAT.

A importância da fosforilação de β -catenina no controlo da sua degradação tem sido principalmente inferida a partir de estudos de mutações no terminal N da β -catenina em células de tumor [Polakis (2000) *id ibid.*]. Estas mutações, tal como aberrações de APC ou de axina, levam à acumulação excessiva de β -catenina no núcleo e desregulam a expressão dos seus genes alvo promovendo transformação neoplásica [Morin, P. J. *et al.* (1997) Science 275: 1787-1790; Rubinfeld, B. *et al.* (1997) Science 275 : 1790-1792; Sparks, A. B. *et al.* (1998) Cancer Res 58: 1130-1134]. As mutações de β -catenina acumulam-se ao redor do local de ligação SCF-TrCP e consequentemente pensa-se que comprometem a ubiquitinação da β -catenina e a sua degradação consequente [Wong, C.M. *et al.* (2001) Cancer 92: 136-145]. Muitas destas mutações de estabilização ocorrem nos resíduos Ser/Thr ao longo de um possível local de fosforilação

pela GSK que molda o motivo de ligação de ubiquitina-ligase E3, realçando o papel de GSK-3 β na determinação da estabilidade de β -catenina [Polakis (2000) *id ibid.*]. Contudo, a serina **45** (S45), o local de mutação única de tumor mais frequente, não se adequa a um local GSK-3 β [Polakis (2000) *id ibid.*; Wong *et al.* (2001) *id ibid.*]. Tal facto pode ter contribuído para a noção de que a β -catenina é um substrato da GSK-3 β não usual que obvia a necessidade de fosforilação iniciadora para despoletar o início de uma cascata de fosforilação pela GSK-3 β [Ding, V. W. *et al.* (2000) *JBiol Chem* 275: 32475-32481; Cohen, P. e S. Frame (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 769-776; Harwood, A. J. (2001) *Cell* 105: 821-824]. Contrariamente a esta perspectiva, os resultados dos inventores mostram que a fosforilação de β -catenina na S45 é induzida por um complexo axina-CKI independentemente de GSK-3 β . Além disso, este evento molecular parece constituir um alvo principal para a regulação da via Wnt, dado que os inventores mostram que Dvl pode funcionar como um inibidor de fosforilação de β -catenina (consultar os exemplos).

Portanto, com base nas observações dos inventores, divulgam-se moduladores para fosforilação de β -catenina. Enquanto normalmente a β -catenina fosforilada é alvo de degradação, em muitos tumores (particularmente no cancro colorrectal) a maquinaria de fosforilação está mutada e a β -catenina não fosforilada acumula-se no núcleo e funciona como um activador de transcrição. Consequentemente, os moduladores divulgados, especialmente os facilitadores de fosforilação de β -catenina são ferramentas importantes para a prevenção e controlo do desenvolvimento de cancro particularmente dos tipos de cancro que resultam da acumulação e excesso de actividade de β -catenina não fosforilada. Surpreendentemente, determinados tipos de tumores (e.g., melanoma maligno) acumulam estavelmente β -catenina fosforilada. Numa divulgação adicional apresenta-se um método para suprimir fosforilação de β -catenina nesta classe específica de tumores, por tratamento de células com um inibidor tal como divulgado.

O invento descreve tanto facilitadores como inibidores de fosforilação de β -catenina. Assim, adicionalmente, divulga-se

um método para rastreio de moduladores, *i.e.* inibidores e facilitadores de fosforilação de β -catenina.

Os objectivos do invento tornar-se-ão evidentes à medida que a descrição avança.

Sumário do invento

O presente invento refere-se a moduladores de fosforilação de β -catenina e à sua utilização no tratamento de cancro.

Assim, num primeiro aspecto, o presente invento reivindica um método de rastreio para um agente anticanceroso em que o referido método compreende as etapas de:

- (a) colocar em contacto um agente com uma mistura reaccional compreendendo β -catenina, axina e/ou caseína-quinase I alfa (CKIa),
- (b) incubar a referida mistura em condições que permitem uma alteração na fosforilação de β -catenina na serina 45 (S45), e
- (c) detectar a fosforilação de β -catenina em S45, em que o aumento da fosforilação de β -catenina em S45 indica que o referido agente é útil como um agente anticanceroso.

Tal como divulgado, um modulador é um inibidor de fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina, sendo o referido inibidor seleccionado de qualquer uma das proteínas Dishevelled (Dvl), uma proteína Wnt, fosfatase PP2A e inibidores de CKI. Divulga-se adicionalmente um modulador, que é um facilitador de fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina, sendo o facilitador seleccionado de qualquer um de inibidores de fosfatase, acetilases e proteínas que promovem acetilação de β -catenina. Preferentemente, o referido inibidor de fosfatase é ácido ocadáico e a referida proteína que promove acetilação de β -catenina é FRAT.

A presente divulgação apresenta um método de rastreio para um agente que modula a fosforilação de S45 de β -catenina, em que o referido método compreende as etapas de:

- a. proporcionar um agente candidato, colocar em contacto o referido agente com uma mistura reaccional compreendendo

β -catenina e quaisquer outros reagentes necessários para a fosforilação de β -catenina, em que a referida mistura é uma mistura de células ou uma mistura isenta de células,

b. incubar a referida mistura sob condições adequadas, e

c. detectar por meios adequados se a S45 de β -catenina foi ou não fosforilada, em que os referidos meios de detecção podem ser qualquer um entre uma reacção com um anticorpo específico, mapeamento com fosfopéptidos ou espectrometria de massa,

em que um aumento da fosforilação da S45 de β -catenina indica que a referida substância é um facilitador da fosforilação de β -catenina e uma diminuição da fosforilação da S45 de β -catenina indica que a referida substância é um inibidor da fosforilação de β -catenina.

Divulga-se adicionalmente um modulador de fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina que foi identificado pelo método de rastreio descrito no invento. O referido modulador pode ser um inibidor ou um facilitador de fosforilação da S45 de β -catenina.

A presente divulgação apresenta um método para aumentar a fosforilação de β -catenina numa célula por tratamento da célula com um facilitador tal como definido pelo invento.

Num aspecto adicional, o presente invento refere-se a uma composição farmacêutica, de preferência para o tratamento de cancro, compreendendo CKI-7.

Ainda numa concretização adicional, o presente invento refere-se à utilização de CKI-7 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro, de preferência em que a β -catenina do referido cancro está estabilizada e a sua fosforilação não está comprometida.

Ainda numa concretização adicional, o presente invento compreende a utilização de CKI-7 para o tratamento de cancro, nomeadamente melanoma maligno.

Divulga-se adicionalmente a utilização do modulador de fosforilação de β -catenina para o tratamento de células

cancerosas em que a β -catenina está estabilizada e a sua fosforilação está comprometida, tal como em adenoma ou carcinoma do cólon, por exemplo e o referido modulador é um facilitador de fosforilação de β -catenina. Alternativamente, a utilização do modulador de fosforilação de β -catenina, tal como definido pelo invento, é para o tratamento de células cancerosas em que a β -catenina está estabilizada e a sua fosforilação não está comprometida, tal como em melanoma, por exemplo e o referido modulador é um inibidor de fosforilação de β -catenina. Numa segunda concretização, o modulador de fosforilação de β -catenina, tal como definido pelo invento, é para ser utilizado na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de cancro, *i.e.* CKI-7.

Numa divulgação adicional, o modulador de fosforilação de β -catenina é para ser utilizado na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de cancro.

São objectivos adicionais do presente invento a utilização de um ARNsi de CKI- α para o fabrico de um medicamento identificado para o tratamento de cancro e uma composição farmacêutica compreendendo um ARNsi de CKI- α .

Numa divulgação adicional, o modulador de fosforilação de β -catenina é para ser utilizado na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de células cancerígenas. Deve notar-se que nos tipos de cancro para os quais a fosforilação de catenina está comprometida, o modulador de eleição deve ser um facilitador de fosforilação de catenina. Alternativamente, nos tipos de cancro para os quais a fosforilação de β -catenina não está comprometida, o modulador de eleição deve ser um inibidor de fosforilação de β -catenina.

Descrição sucinta das figuras

Figuras 1a-c: A axina induz fosforilação de β -catenina exclusivamente em S45, apesar da degradação proteossómica necessitar adicionalmente de fosforilação mediada por GSK em T41, S37 e S33.

Figura 1a: Estabilidade de β -catenina [β -catenina wt ou com mutação N-terminal (DP)] em resposta a transfecção de

axina e GSK-3 β . Incluiu-se na pista 7 um fragmento Flag- Δ F-box- β -TrCP dominante negativo (WD). Incluiu-se um vector de expressão de GFP em todas as transfecções como uma referência de expressão.

Figura 1b: Análise de fosforilação de β -catenina com anticorpos anti-fosfopéptido em células com inibição de proteossoma.

Figura 1c: Análise de fosforilação de β -catenina por espectrometria de massa (MS). Digeriram-se as bandas de Flag- β -catenina purificada por imunoafinidade com endoproteinase Asp-N e analisaram-se os péptidos N-terminais resultantes, incluindo Asp17-Leu31 e Asp32-Glu55 (apresentados no topo), por MS com nanoelectropulverização. As razões m/z apresentadas (6 painéis superiores) correspondem aos iões triplamente carregados [M+3H] $^{3+}$ do péptido Asp32-Glu55 que está marcado por asteriscos (incluindo todas as suas variantes isotópicas). Apresentam-se espectros de péptidos contendo 1 (+1P) e 4 (+4P) grupos fosfato de β -catenina sozinha (painéis 1,2), β -catenina co-expressa com axina (painéis 3,4) e axina mais GSK-3 β (painéis 5, 6). Seleccionaram-se para fragmentação os iões [M+3H] $^{3+}$ a partir dos péptidos marcados com barras (cinzentas e pretas). Os espectros dos painéis inferiores (7,8) correspondem a fragmentos derivados de MS/MS do péptido da barra cinzenta (do painel 3) e do péptido da barra preta (do painel 6). Fragmentou-se o péptido Asp32-Glu55 em metades por MS/MS, uma parte C-terminal contendo Ser45 e uma parte N-terminal contendo Ser33/Ser37/Thr41. O fragmento C-terminal da barra cinzenta está maioritariamente fosforilado, enquanto o fragmento N-terminal está maioritariamente não fosforilado (painel 7). A relação entre fragmentos não fosforilados e fosforilados (+1P) indica-se por setas inclinadas. O fragmento N-terminal da barra preta (painel 8) está na maioritariamente fosforilado triplamente (+3P). O seu fragmento C-terminal tem apenas uma fosforilação (não apresentado), tal como o da barra cinzenta. A análise MS/MS do péptido Asp17-Leu31 (de +1P no MS) revela fosforilação em Ser29 em quantidade reduzida mas significativa (não apresentada).

Abreviaturas: frag., fragmentos.

Figuras 2a-b: As mutações nos quatro locais de fosforilação do terminal N de β -catenina restringem a cascata de fosforilação, levando a estabilização da β -catenina.

Figura 2a: Detectaram-se β -catenina de tipo selvagem (wt) e mutada em células tratadas com MG-132 com anticorpos anti-Myc ou anti-fosfo- β -catenina.

Figura 2b: Análise de estabilidade do local de fosforilação dos mutantes de β -catenina em células MG-132 não tratadas.

Figuras 3a-c: A fosforilação de S45 mediada por axina é independente de GSK-3 β .

Figura 3a: A fosforilação S45 não é afectada por LiCl. Análise de β -catenina wt ou T41A de células tratadas com MG-132, com ou sem LiCl. Não se detectou sinal de fosforilação em 833/87 no mutante T41A (consultar figura 2a):

Figura 3b: A L525P-axina não liga GSK3 β . Imunoprecipitação anti-Flag a partir de células transfectadas com Flag-GSK3 β e axina wt ou L525P Myc-axina.

Figura 3c: A L525P-axina induz fosforilação de S45 e mantém uma cascata de fosforilação-degradação na presença de GSK-3 β exógeno. Transfectaram-se todas as células com Myc- β -catenina e os vectores de expressão indicados.

Abreviaturas: Lis. Tot., lisado total.

Figura 4: A fosforilação em S45 independente de axina e por substituição promove a cascata de fosforilação GSK-3p, resultando em degradação de β -catenina. Transfectaram-se todas as células com o mutante 45PKA de β -catenina e os vectores de expressão indicados. Detectaram-se HA-GSK-3 β (W1) ou Flag-R96A-GSK-3 β (R96A) utilizando anticorpos anti-GSK-3 β (a posição de GSK-3 β varia de acordo com a sua marcação).

Figuras 5a-e: Identificação de β -catenina S45 quinase.

Figura 5a: A axina purificada por imunoafinidade e CKI δ (aal-318) recombinante, fosforilam β -catenina *in vitro* em S45 criando um local de iniciação para fosforilação sequencial em S33/37 por GSK-3 β recombinante. Imunoprecipitou-se Flag- β -catenina a partir de células transfectadas 293 e submeteu-se a um ensaio de quinase *in vitro* utilizando a quinase indicada ou Flag-axina purificada por imunoafinidade a partir de produtos de transformação 293, com ou sem ATP (30 μ M) e analisou-se por hibridação de "Western", utilizando anticorpos anti-fosfo- β -catenina.

Figura 5b: A CKI negativa dominante inibe a fosforilação de S45 induzida por axina. Transfectaram-se células 293 com Myc- β -catenina sozinha (pista 1), com axina (pistas 2-5) e CKI ϵ wt (pista 3) ou dn-CKI ϵ (D-N, pista 4; K-R, pista 5). A seta CKI inferior aponta para hCKI ϵ endógena, enquanto a seta superior aponta para as proteínas xCKI ϵ exógenas detectadas por anti-CKI ϵ monoclonal.

Figura 5c: A CKI-7 inibe fosforilação de S45 induzida por axina de ϵ -catenina wt, mas não a fosforilação constitutiva de 45PKA.

Figura 5d: Efeitos de inibidores específicos de quinase sobre a fosforilação de β -catenina endógena em S41, 45 e S33 em células HeLa. Utilizou-se CKI-7 a 100 μ M, H89 a 5 μ M e LiCl a 40mM. Detectou-se β -catenina com anticorpo anti- β -catenina ou anticorpos anti-fosfo- β -catenina.

Figura 5e: Contribuição comparável de CKI alfa e épsilon para a fosforilação de β -catenina em células RK0.

Abreviaturas: inib., inibidor.

Figuras 6a-d: A via Wnt tem como alvo a iniciação da fosforilação de β -catenina em S45 mediada por axina.

Figura 6a: A Wnt3A inibe a fosforilação em S45. Incubaram-se células de ratinho L, células de hepatoma SNU449 [Sato et al.(2000) Nat Genet 24(3):245-50], células HeLa e

células Jurkat T transfectadas com β -catenina (5 h) com meio condicionado de células L excretoras wt ou Wnt3A [Shibamoto *et al.* (1998) *Genes Cells* 3: 659-670]. Adicionaram-se MG-132 ou ácido ocadáico (OKA, adicionou-se 1 μ M às culturas indicadas. Detectou-se β -catenina endógena (HeLa, células L e SNU449) e exógena (Jurkat) com anticorpo anti- β -catenina ou anticorpos anti-fosfo- β -catenina. Os números sob as diferentes pistas são valores de densitometria relativa em relação à intensidade de sinal de culturas não tratadas.

Figura 6b: A Dvl-1 inibe fosforilação de S45 mediada por axina. Espectros de massa do péptido Asp32-Glu55 com um grupo fosfato (+1P): de β -catenina co-expressa com L525P-axina (m-axina), comparativamente com o de β -catenina co-expressa com L525P-axina e Dvl-1.

Figura 6c: A sobre-expressão de Dvl-1 resulta em inibição de fosforilação de S45 e estabilização de β -catenina. Detectou-se β -catenina de produtos de transformação 293 utilizando anticorpos anti-Myc ou anti-fosfo- β -catenina.

Figura 6d: A Dvl-1 não tem efeito sobre a cascata GSK3 β independente da axina e iniciada por fosforilação de S45: Análise de células transfectadas com 45PKA.

Figuras 7a-c: O tratamento com ácido ocadáico induz fosforilação de Ser45 e Ser33 e actividade de quinase em S45.

Figura 7a: Incubaram-se células HeLa com MG132 com ou sem ácido ocadáico (1 μ M durante 3h). Analisaram-se lisados celulares por hibridação de "Western" com α p45 e α p33.

Figura 7b: Trataram-se células SNU449 [Sato *et al.* (2000) *id ibid.*] com ácido ocadáico (1 μ M durante 1 ou 3 h) e testaram-se os respectivos lisados relativamente a fosforilação de S45 por hibridação de "Western",

Figura 7c: O ácido ocadáico induz fosforilação de β -catenina e degradação na linha celular SW480 com mutação APC.

Figuras 8a-e: Possível modelo representativo da cascata de fosforilação/degradação de β -catenina.

Figura 8a: A axina recruta CKI para fosforilar β -catenina em S45.

Figura 8b: A fosforilação de S45 inicia β -catenina para a cascata de fosforilação por GSK-3 β seguinte, atingido finalmente os locais S33/37.

Figura 8c: Mesmo que 8b.

Figura 8d: A fosforilação em S33/37 cria um local de encaixe para β -TrCP/E3RS promovendo a ubiquitinação e degradação da β -catenina.

Figura 8e: A sinalização de Wnt, possivelmente através de Dvl e CKI, regula a fosforilação de S45.

Figura 9 FRAT1 estabiliza β -catenina fosforilada

Figura 9a: Hibridação de “Western” apresentando os níveis de fosfo- β -catenina (p β Cat), β -catenina (β Cat) e das proteínas reguladoras, tal como indicadas, em células 293 transfectadas. Frat1 estabiliza fosfo- β -catenina, que é aumentada adicionalmente por expressão reduzida de Dvl. Variou-se expressão de Dvl por um aumento consecutivo por duas vezes do plasmídeo transfectado (0,25-4 μ g).

Figura 9b: Hibridação de “Western” apresentando os níveis de expressão de fosfo- β -catenina (p β Cat), β -catenina (β Cat) e das proteínas de regulação indicadas. Dvl Δ PDZ é incapaz de cooperar com Frat1 na estabilização de fosfo- β -catenina, mas contudo suprime a fosforilação de β -catenina em S45 induzindo assim a estabilização de β -catenina não fosforilada.

Figura 9c: Frat1 estabiliza uma fosfo- β -catenina activa na transcrição em células 293. Gráfico apresentando a actividade de transcrição de β -catenina fosforilada através da sua activação do repórter de luciferase TOPFLASH [Korinek et al. (1997) Science, 275: 1752-3], tal como expresso em unidades relativas de luciferase (RLU), na presença ou ausência de

Frat1. Utilizou-se o repórter do local de mutação TCF (FOPFLASH) para controlar o efeito independente de TCF da transfecção Frat1/axina/GSK.

Figura 9d: Hibridação de “Western” apresentando os níveis de β -catenina endógena e transfectada, assim como β -catenina fosforilada na presença de p300/CBP, E1A e Frat. A expressão de E1A variou com um aumento de duas vezes consecutivas do plasmídeo transfectado (3–6 μ g). p300/CBP e E1A estabilizam a fosfo- β -catenina de modo semelhante a Frat1. A pista esquerda foi transfectada sem GSK3.

Figura 9e: A fosfo- β -catenina estabilizada por p300/CBP e Frat1 é acetilada nos resíduos de lisina. Transfectaram-se células 293 com Myc- β -catenina e analisaram-se por imunoprecipitação de Myc- β -catenina e hibridação de “Western”, utilizando anticorpos anti-acetilisina ou anti-p33, anti-37, anti-41 (Cell Signaling Inc). MG = tratado com inibidor de proteossoma MG132-a. NT = sem qualquer plasmídeo transfectado adicional (excepto para β -catenina, GSK3 e axina).

Figura 10: A fosforilação de β -catenina é essencial para a activação da transcrição de MITF-M, um gene de sobrevivência de melanoma e para crescimento de melanoma em cultura de tecidos.

Figura 10a: Gráfico que apresenta a actividade de transcrição de β -catenina relativamente ao plasmídeo pGL3-MITF/M com repórter de luciferase. A actividade de transcrição induzida por Frat1 necessita de fosforilação de β -catenina. A actividade de transcrição de MITF-M é expressa em unidades relativas de luciferase (RLU). Utilizou-se um repórter de local de mutação TCF (pGL3-MITF/M195.3) para controlar o efeito independente de TCF de transfecção de Frat1). Os plasmídeos CKI dominantes negativos K/R e D/N são explicados na figura 5b.

Figura 10b: A fosforilação de β -catenina é exclusiva do derivado metastático B1 do tumor de melanoma A1. Trataram-se as células LB33A1 e LB33B1 com ou sem MG132 a 20 μ M durante 4 horas, recolheu-se e analisou-se os seus lisados por hibridação de “Western” com os anticorpos indicados.

Figura 10c: A actividade de transcrição de MITF necessita de fosforilação de β -catenina. Transfectaram-se as duas linhas celulares de melanoma relacionadas LB33A1 e LB33B1 com o plasmídeo repórter de luciferase pGL3-MITF/M [Takeda *et al.* (2000) J Biol Chem 275: 14013-6] sozinho ou conjuntamente com o plasmídeo de expressão Dvl Δ PDZ. 24 horas após a transfecção, tratou-se uma amostra de células com LiCl 20mM durante 24 horas, tal como indicado. Recolheram-se as células e determinou-se a sua actividade de luciferase do lisado utilizando o sistema de ensaio de luciferase da Promega. A actividade de transcrição de MITF-M expressa-se em unidades relativas de luciferase (RLU).

Utilizou-se um repórter do local de mutação TCF (pGL3-MITF/M195.3) para controlar a transcrição independente de TCF.

Figura 10d: O bloqueio da fosforilação de β -catenina numa linha celular de melanoma afecta o crescimento celular. Trataram-se células LB33B1 com concentrações crescentes do inibidor de fosforilação de S45, CKI7 e contaram-se as células vivas 24 horas após o tratamento.

Abreviaturas: N.T., não tratadas ou transfectadas; Num. Rel. Cel. 24 h após Trat., número relativo de células 24 horas após o tratamento.

Descrição detalhada do invento

As seguintes abreviaturas são utilizadas ao longo do presente pedido:

- * APC: polipose cólica adenomatosa
- * CKI: caseína-quinase I
- * DP: positivo dominante
- * Dvl : Dishevelled
- * GFP : proteína fluorescente verde
- * GSK3 β (GSK): glicogénio sintase quinase 3 β
- * MS : espectrometria de massa
- * OKA : ácido ocadáico
- * PKA : proteína quinase A
- * S45 : serina 45 de β -catenina

Os estudos dos inventores tinham como objectivo a resposta a determinadas questões chave sobre a regulação da via Wnt- β -catenina, nomeadamente, qual ou quais os eventos moleculares que desencadeiam a cascata de fosforilação-degradação de β -catenina e quais destes são alvo de regulação por Wnt.

A presente divulgação apresenta a modulação de fosforilação de β -catenina. Especificamente, compreende moduladores de fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina e métodos para rastrear tais moduladores, assim como suas composições e utilizações.

Num aspecto, o presente invento compreende a utilização de um modulador de fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina, em que o referido modulador é um inibidor que é CKI-7.

Entenda-se que o termo “modulador” se utiliza ao longo deste fascículo para qualquer substância, seja um fármaco, um composto, uma proteína ou um péptido, capaz de aumentar ou diminuir a fosforilação de β -catenina. O modulador é capaz de interagir com a β -catenina, directa ou indirectamente, de modo a poder aumentar ou inibir a sua fosforilação. Alternativamente, o modulador pode afectar, *i.e.*, induzir ou reprimir, a maquinaria de fosforilação de S45 (ou a actividade de S45-quinase).

Além disso, outro efeito do modulador pode ser desencadear uma alteração na localização intracelular de β -catenina e desse modo afectar a sua fosforilação. Normalmente, a β -catenina encontra-se em dois reservatórios intracelulares: ligada a E-caderina na membrana celular e num complexo com outras proteínas, incluindo APC e axina, no citoplasma. Após activação, a β -catenina é translocada para o núcleo. A fosforilação ou desfosforilação de β -catenina pode assim afectar a sua localização intracelular e provocar a sua translocação entre esses diferentes compartimentos celulares.

O referido inibidor, tal como divulgado, é seleccionado de qualquer um de proteína Dishevelled (Dvl), uma proteína Wnt e a fosfatase PP2A.

Contrariamente ao geralmente assumido na área, as experiências dos inventores indicaram surpreendentemente que o principal evento molecular de regulação da via de sinalização Wnt é a fosforilação da S45 de β -catenina mediada por axina/CKI e não a fosforilação de β -catenina mediada por GSK3. Os resultados publicados por Liu *et al.* apontam para um mecanismo de quinase dupla para a fosforilação/degradação de β -catenina [Liu, C. *et al.* (2002) *Cell* 108: 837-847]. Contudo, os resultados de Liu estão em conformidade com a noção prevalecente que a sinalização Wnt regula a estabilização de β -catenina através de GSK3. Tal está em franca oposição aos resultados aqui apresentados, em que a sinalização Wnt3A e a sobre-expressão Dvl regulam fosforilação de S45 independentemente de GSK3. Para observar a extensão completa da fosforilação de S45, a β -catenina tem que ser estabilizada. Tal pode conseguir-se por inibição do proteossoma ou por utilização de uma linha celular mutada nos locais de fosforilação a montante de S45 (consultar figura 6a). Nestas condições, todas as quatro linhas celulares ensaiadas, incluindo uma linha celular derivada de carcinoma de cólon contendo uma β -catenina com mutação S37, foram sensíveis a Wnt3A ao regularem negativamente a cascata de fosforilação completa desde S45 em diante (figura 6a). Assim, os resultados dos inventores mostram que a fosforilação de S45 é a primeira etapa da cascata de fosforilação de β -catenina e é regulada pela sinalização de Wnt através de axina e independentemente de GSK3 β .

Tal como demonstrado no exemplo 7 e na figura 10d, a anulação da fosforilação de β -catenina com CKI7, um inibidor CKI, em células de melanoma LB33B1 afectou a sua proliferação.

Detecta-se muitas vezes β -catenina hiper-fosforilada em determinados tipos de tumores tais como melanomas malignos humanos, nos quais aquela se acumula especialmente no núcleo [Kielhorn, E. *et al.* (2003) *Int. J. Cancer* 103 (5): 652-6]. Parece que a β -catenina fosforilada estabilizada contribui para a indução de um conjunto único de genes alvo TCF, diferente dos genes regulados por TCF conhecidos (que são alvos de β -catenina não fosforilada). Um exemplo deste conjunto de genes diferente pode ser MITF-M, um factor de transcrição que é necessário para a sobrevivência de células

de melanoma [Widlund, H. R. *et al.* (2002) *J. Cell Biol.* 158 (6): 1079-87]. Assim, a β -catenina fosforilada pode também desempenhar um importante papel no processo de tumorigénese, possivelmente como um activador de transcrição de oncogenes potenciais. A inibição da fosforilação de β -catenina em S45 seria assim um meio de reprimir factores de tumorigénese críticos, tal como MITF-M.

A PP2A foi anteriormente implicada na sinalização Wnt mas o seu local alvo e efeito (*i.e.*, S45) são desconhecidos. O ácido ocadáico ou um agente semelhante, ao inibirem a PP2A fosfatase, podem ser úteis na indução da actividade de fosforilação da axina-CKI resultando num aumento da degradação da β -catenina em cancro de cólon com mutação APC e possivelmente noutros tumores. Tal ocorre porque a sobre-expressão de axina em células com mutação APC ou axina pode conduzir a degradação de β -catenina [Kishida S. *et al.* (1998) *J Biol Chem* 273 (18): 10823-6] e apoptose de tumor [Sato S. *et al.* (2000) *id ibid.*]. O ácido ocadáico induziria a apoptose do tumor por aumento da actividade de axina endógena. Assim, os compostos que facilitam a fosforilação de S45 serão úteis como agentes anticancerosos.

Divulga-se adicionalmente que o referido facilitador de fosforilação de β -catenina é qualquer um de FEAT, p300/CBP, E1A ou qualquer outra proteína acetilase. O facilitador de fosforilação de β -catenina pode ser qualquer proteína ou factor, como por exemplo um inibidor de histona-desacetilase (HDAC) que promove a acetilação de β -catenina. Preferentemente, o referido facilitador é FRAT, incluindo qualquer das suas isoformas FRAT1, FRAT2 ou FRAT3 [Chai, J.H. *et al.* (2001) *Mamm. Genome* 12 (11): 813-21; Saitoh e Katoh (2001) *Int. J. Oncol.* 19 (2): 311-5; Jonkers, J. *et al.* (1997) *EMBO J.* 16 (3): 441-50].

No exemplo 6, os inventores mostraram que a oncoproteína Frat1 [Jonkers, J. *et al.* (1997) *id ibid.*], que se julga habitualmente que funciona como um inibidor de fosforilação GSK3 [Li, L. *et al.* (1999) *EMBO J.* 18 (15): 4233-40; Salic, A. *et al.* (2000) *Mol. Cell* 5 (3): 523-32], é de facto um facilitador de fosforilação de β -catenina. Além disso, tal como apresentado na figura 9d, os inventores identificaram

dois outros facilitadores de fosforilação de β -catenina, EIA de adenovírus e p300/CBP [Goodman e Smolik (2000) Genes Dev. 14 (13): 1553-77], que quando são sobre-expressos em células 293 induzem a acumulação de β -catenina hiper-fosforilada. Os resultados dos inventores sugerem que a β -catenina fosforilada sofre acetilação nos seus resíduos Lys. Esta β -catenina fosforilada e acetilada é resistente à degradação e pode funcionar como um activador de transcrição.

A presente divulgação apresenta adicionalmente um método de rastreio para um agente que modula fosforilação de S45 em β -catenina, em que o referido método compreende as etapas de:

- a. proporcionar um agente candidato, colocar o referido agente em contacto com a mistura reaccional compreendendo β -catenina e quaisquer outros reagentes necessários para a fosforilação de β -catenina, em que a referida mistura é uma mistura celular ou uma mistura isenta de células,
- b. incubar a referida mistura em condições adequadas, e
- c. detectar por meios adequados se a S45 de β -catenina foi ou não fosforilada,

em que o aumento da fosforilação de S45 de β -catenina indica que a referida substância é um facilitador de fosforilação de β -catenina e a diminuição da fosforilação de S45 de β -catenina indica que a referida substância é um inibidor de fosforilação de β -catenina.

O método pode ser efectuado numa mistura celular ou numa mistura isenta de células compreendendo β -catenina, axina, opcionalmente CKI e GSK3 β e qualquer outro reagente necessário para fosforilação de β -catenina. Pode observar-se fosforilação de S45 de β -catenina por quaisquer meios adequados para detecção de fosforilação de proteínas. Preferentemente, detecta-se a fosforilação de S45 de β -catenina com um anticorpo anti-fosfopéptido específico, por mapeamento de fosfopéptidos ou por espectrometria de massa.

Tal como demonstrado nos exemplos, podem utilizar-se genes regulados por TCF como um critério de avaliação para o método do invento. Assim, os facilitadores de fosforilação de β -catenina induzirão a expressão de um repórter TCF após transfecção do referido repórter em combinação com o

facilitador a ensaiar nas células de interesse. Outro gene repórter a utilizar como um critério de avaliação para o método do invento é o plasmídeo repórter MITF.

Os facilitadores de fosforilação de β -catenina induzirão a expressão de um plasmídeo repórter MITF, enquanto os inibidores de fosforilação de β -catenina suprimirão a sua expressão.

Outro critério de avaliação a utilizar no método do invento é a taxa de proliferação de determinadas linhas celulares na presença de β -catenina fosforilada ou não fosforilada. Tal como apresentado no exemplo 7, as células de melanoma B1 abrandaram a sua proliferação na presença de um inibidor CKI específico. Assim, os factores que são capazes de abrandar o crescimento de células de melanoma B1, por exemplo, serão identificados como inibidores de fosforilação de β -catenina.

Tal como demonstrado nos exemplos 1, 2 e 3, um dos principais papéis da axina na via Wnt é o de proporcionar a actividade de quinase que inicia a cascata de fosforilação de β -catenina em S45. Este processo é mediado pelas isoformas α , β ou ϵ de CKI dado que foram todas detectadas em associação com axina por LC/MS. Contudo, sob condições fisiológicas específicas, uma isoforma CKI específica pode funcionar com axina. A associação de axina com uma única isoforma de CKI pode necessitar de uma molécula intermediária. A fosforilação de S45 pelo complexo axina-CKI é necessária e suficiente para mobilizar uma cascata mediada por GSK3.

Consequentemente, no método de rastreio para um modulador de β -catenina, a mistura reaccional pode conter de preferência axina e/ou CKI. Especificamente, a axina pode ser purificada por imunoafinidade a partir de células transfectadas.

Sem ficar vinculado à teoria, pode propor-se um modelo para a cascata de fosforilação/degradação de β -catenina, tal como apresentado na figura 8. Neste modelo, a axina liga-se a β -catenina e recruta CKI para fosforilar S45. A fosforilação de S45 inicia a β -catenina para a cascata de fosforilação GSK-3 β que se lhe segue e atingindo finalmente os locais S33/37. A

fosforilação em S33/37 cria um local de acoplamento para o complexo β -TrCP/E3RS, que promove a ubiquitinação e degradação de β -catenina. A sinalização de Wnt, possivelmente através de Dvl e CKI, regula a fosforilação de S45 por eliminação de axina (e.g., por indução da sua degradação) ou extinção do recrutamento de CKI para S45. Alternativamente, a sinalização de Wnt, possivelmente através de PP2A, induz a desfosforilação de β -catenina em S45.

Assim, a descrição apresenta um modulador de fosforilação da serina 45 (S45) de β -catenina que é identificado pelo método de rastreio descrito no invento. O referido modulador pode ser um inibidor ou um facilitador de fosforilação da S45 de β -catenina.

O modulador identificado pelo método do invento pode ser utilizado para aumentar ou inibir fosforilação de β -catenina, preferentemente no resíduo S45 de β -catenina.

Divulga-se adicionalmente um método de aumentar a fosforilação de β -catenina numa célula por tratamento da célula com um modulador de fosforilação de β -catenina, em que o referido modulador é um facilitador de fosforilação de β -catenina tal como um inibidor de fosfatase. O referido facilitador pode ser ácido ocadáico. Alternativamente, o referido facilitador pode ser uma proteína que promove acetilação de β -catenina.

Tal como demonstrado no exemplo 6, proteínas tais como E1A e FRAT1 podem induzir a estabilização de β -catenina fosforilada, provavelmente por acetilação de proteína. Assim, a FRAT1 é outro facilitador preferido de fosforilação de β -catenina.

Num aspecto adicional, o presente invento proporciona uma composição farmacêutica para o tratamento de cancro, compreendendo um modulador de β -catenina tal como definido no invento, que é CKI-7. Desde que a β -catenina seja estabilizada, o referido modulador pode ser um facilitador ou um inibidor de fosforilação de β -catenina.

Entenda-se que por estabilização de β -catenina se pretende referir uma forma de β -catenina que não sofre degradação.

Divulga-se que a referida composição farmacêutica é para utilização no tratamento de células cancerígenas de um organismo, nomeadamente um humano, em que a β -catenina é estabilizada. Em determinados casos nos quais a β -catenina é estabilizada e a sua via de fosforilação está comprometida, tal como por exemplo em células cancerígenas de carcinoma ou adenoma colorrectal, a composição farmacêutica preferida a utilizar deve compreender um facilitador de fosforilação de β -catenina como o agente activo.

Alternativamente, quando a β -catenina é estabilizada mas a sua via de fosforilação não está comprometida, como por exemplo em células cancerígenas de melanoma maligno, a composição farmacêutica a utilizar compreenderá um inibidor de fosforilação de β -catenina como agente activo.

A composição farmacêutica do invento pode conter adicionalmente agentes activos e/ou aditivos, diluentes e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis adicionais.

A preparação de composições farmacêuticas é bem conhecida na especialidade e tem sido descrita em muitos artigos e livros de texto, consultar e.g., Gennaro A.R. ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania e especialmente as suas páginas 1521-1712.

As mutações de β -catenina que afectam a sua fosforilação têm sido divulgadas numa grande variedade de cancros humanos. A grande maioria de tumores colorrectais contém mutações no gene APC cujo produto se demonstrou estar envolvido em fosforilação de β -catenina. Os tumores colorrectais que não apresentem uma mutação APC apresentarão muito provavelmente uma mutação no gene de β -catenina que afecta locais de fosforilação. Curiosamente, a maioria das mutações de β -catenina presentes em cancros humanos localizam-se entre a serina 29 (S29) e a lisina 49 (K49), uma região rica em locais de fosforilação e que está também envolvida na degradação de β -catenina. Além dos tumores colorrectais, também se

divulgaram tais mutações em tumores tais como desmóide (também conhecida como fibromatose agressiva), do endométrio, gástrico, hepatocelular, hepatoblastoma, tumor de Wilm (cancro de rim pediátrico), meduloblastoma; melanoma, tumores do ovário, pancreático, pilomatricoma, cancro da próstata, da tiróide e tumores do endométrio uterino [Polakis (2000) *id ibid.*]. Assim, a estabilização de β -catenina pode promover cancro em muitos tipos de tecidos.

A forte correlação entre uma via de fosforilação de β -catenina deficiente e a formação (e progressão) de tumor tornou esta via um ponto crucial para terapia. A restauração da fosforilação de β -catenina deve parar o processo cancerígeno. Há indicações que a desestabilização induzida de β -catenina desencadeia a morte de células cancerígenas [Verma *et al.* (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-300; Kim *et al.* (2002) Mol Cancer Ther. 1:1355-9]. A expressão de axina conduz de forma concomitante à destruição de β -catenina e apoptose em células tumorais [Sato *et al.* (2000) *id ibid*]. Além disso, os resultados dos inventores mostram que um dos principais efeitos da axina é induzir fosforilação de S45 e subsequente degradação de β -catenina. Assim, é corroborada a ideia de que a apoptose de tumor é uma consequência do efeito de fosforilação da axina.

Portanto, os resultados aqui apresentados, que demonstram que a fosforilação em S45 é a etapa iniciadora de fosforilação de β -catenina e que a modulação desta etapa pode afectar fosforilação de β -catenina, são altamente aplicáveis para terapia de cancro. Tal como apresentado na figura 7, os inibidores de fosfatase, nomeadamente o ácido ocadáico, são facilitadores importantes da fosforilação de β -catenina.

Contudo, nas células de cancro contendo β -catenina fosforilada é importante utilizar um modulador diferente. Neste caso o modulador deve ser um inibidor de fosforilação de β -catenina como CKI-7 por exemplo.

Portanto, noutro aspecto, o presente invento compreende a utilização de CKI-7 para o tratamento de cancro ou células cancerígenas.

A utilização do modulador do invento é para o tratamento de células cancerígenas nas quais a fosforilação de β -catenina não está comprometida. No referido cancro (ou células cancerígenas), o referido modulador é um inibidor de fosforilação de β -catenina, que é CKI-7.

O modulador de fosforilação de β -catenina, tal como divulgado, é para ser utilizado na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de cancro. Alternativamente, a referida composição farmacêutica é para o tratamento de células cancerígenas.

Tal como se demonstra nos exemplos seguintes, a regulação fina da fosforilação de β -catenina é crítica para a homeostase celular e é diferente em tipos de células diferentes. Em linhagens hematopoiéticas, por exemplo, Wnt pode induzir a proliferação de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes através de estabilização de β -catenina [X. He (2003) Juan March meeting review, Dev. Cell. (em impressão)]. Quando a β -catenina estabilizada está presente em células (i.e., quando está presente a níveis elevados na sua forma não degradável) e as referidas células são células cancerígenas, podem seguir-se duas vias. Via A, se a referida β -catenina não for fosforilada, tal como em adenomas ou carcinomas do cólon por exemplo, pretende-se aumentar a sua fosforilação de modo a induzir a sua degradação. Assim, deve utilizar-se um facilitador do invento para tratar o referido cancro ou células cancerígenas. Via B, quando a referida β -catenina for fosforilada, tal como em melanomas malignos por exemplo, pretende-se inibir a sua fosforilação de modo a bloquear a activação por transcrição dos alvos a jusante que são oncogenes potenciais. Assim, um inibidor do invento, que é CKI-7, deve ser utilizado para tratar o referido cancro ou células cancerígenas.

Finalmente, a divulgação pretende apresentar um método para o tratamento de cancro num indivíduo com essa necessidade, compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do modulador como divulgado, que será um facilitador ou um inibidor, de acordo com o tipo específico de cancro tal como anteriormente especificado.

Deve referir-se que, tal como utilizado neste fascículo e nas reivindicações anexas, as formas singulares de “um(a)” e “o/a” incluem os respectivos plurais salvo se o contexto indicar claramente o contrário.

Ao longo do presente fascículo e das reivindicações que se lhe seguem, salvo se o contexto indicar outra alternativa, a palavra “compreender” e suas variações tais como “compreende” e “compreendendo”, serão entendidas como implicando a inclusão de um elemento ou etapa ou grupo de elementos ou etapas mencionados mas não a exclusão de qualquer outro elemento ou etapa ou grupo de elementos ou etapas.

Os exemplos 1-4 e 7 seguidamente apresentados são representativos de técnicas utilizadas pelos inventores para levar à prática aspectos do presente invento. Deve considerar-se que apesar de estas técnicas serem exemplificativas de concretizações preferidas para levar o invento à prática os peritos na especialidade, à luz da presente divulgação, reconhecerão que se podem efectuar várias modificações sem afastamento da essência e âmbito pretendidos do invento.

Exemplos

Procedimentos experimentais

Hibridação de “Western”

As hibridações de “Western” foram efectuadas pelo método clássico descrito em “Molecular Cloning – A laboratory manual de Sambrock et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a edição, 1989”.

Sistema de expressão de β -catenina

Transfectaram-se transitoriamente células 293T utilizando o procedimento de fosfato de cálcio. Utilizaram-se os seguintes vectores de expressão: β -catenina marcada com Myc ou com Flag (0,5 μ g) (um clone de β -catenina humana obtido de R. Grosschedl), axina marcada com Flag ou com Myc (2 μ g) (ADNc de ratinho proporcionado por F. Costantini), HA-GSK3 β ou Flag-

GSK3 β (3,5 μ g) (um clone de coelho obtido de JR Woodgett) [Woodgett, J. R. (1990) EMBO J 9: 2431-2438]. Os mutantes de β -catenina incluem DP, (S33, S37, T40, S45, S47 substituídos por alanina) mutantes pontuais simples (S29F, S33Y, S37A, T41A, S45F) e 45PKA (T41S, T42R, A43R). Vectores adicionais: Flag-WD, um fragmento de β -TrCP dominante negativo (Δ F-box) [Yaron, A. et al. (1998) Nature 396: 590-594]; Flag-Dvl-1 (um clone cDIVA de ratinho obtido de S-I Yanagawa) [Lee, J.S. et al. (1999) J Biol Chem 274: 21464-21470]; WT e CKI ϵ de *Xenopus* dominante negativo (XCKI ϵ -D128N) (proporcionado por T. Shcwarz-Romond) [McKay, R.M. et al. (2001) Dev Biol 235: 378-387]. Após um intervalo de 24-48 h após transfecção, recolheram-se as células e processaram-se para as várias experiências. Utilizou-se MG-132 (Sigma) a 20 μ M durante 5 h; adicionou-se LiCl (40 mM) durante 6 h e CKI-7 (100 μ M) durante 16 h antes da recolha. Detectou-se β -catenina, axina ou GSK-3 β nos lisados celulares utilizando anticorpos anti-Myc (Ab-1, Oncogenes Research Products, 2 μ g/ml), anti-Flag (M2, Sigma, 1 μ g/ml) e anti-HA (fluido de ascites 12CA5; 1:5000), respectivamente. A expressão de GFP foi monitorizada com anticorpo anti-GFP (JL-8, Clontech, 1 μ g/ml). Em algumas experiências (figura 4) detectou-se GSK-3 β utilizando anticorpos monoclonais anti-GSK-3 β (clone 7, Transduction Laboratories, 0,1 μ g/ml). Detectou-se β -catenina endógena e exógena (figura 5d e 6a) com anticorpos anti- β -catenina (clone 14, Transduction Laboratories) (0,25 μ g/ml).

Ensaio de quinase *in vitro*

Adsorveu-se por imunoafinidade 250 μ g de lisado de proteína de produtos de transfecção de 293 com Flag- β -catenina por contas de afinidade M2 Flag e utilizou-se como um substrato para as reacções com quinase. Incubaram-se as imunocontas em tampão de quinase contendo Tris 50 mM (pH 7,5), MgCl 10 mM, DTT 5 mM, glicerol a 5%, ATP (30 μ M) e inibidores de fosfatase. Adicionou-se CKI- δ recombinante (fragmento aa1-318, 200 U, New England Biolabs), GSK-3 β (20 U, New England Biolabs) ou Flag-axina purificada por imunoafinidade (0,2 μ g de proteína, eluída com péptido do lisado 293 adsorvido nas imunocontas) à mistura reaccional durante 30 min a 30°C. Efectuou-se a fosforilação sequencial de β -catenina por adição

de GSK-3 β 15 min após CKI- δ e incubação adicional durante 15 min.

Análise de fosforilação de β -catenina

Hibridação de "Western" e espectrometria de massa (MS). Utilizaram-se três anticorpos anti-fosfopéptido de β -catenina diferentes comerciais: i) Anti-fosfo-Thr41/Ser45 (Cell Signaling Technology), um anticorpo policlonal específico para pT41 e pS45 (α p41,45). ii) Anti-fosfo-Ser33/37/Thr41 (Cell Signaling Technology), um anticorpo policlonal que reconhece pS33 (α p33). Estes dois anticorpos policlonais foram utilizados numa diluição de 1:1000, de acordo com as instruções do fabricante. iii) Anti-fosfo-Ser33/37 (BC-22, Sigma) um anticorpo monoclonal específico para pS37 (utilizado como fluido de ascites a uma diluição de 1:3000; α p37). As especificidades dos anticorpos foram determinadas por estudos de inibição de fosfopéptidos. D32S(P04)GIHSGATTTAPS⁴⁵ anulou o sinal α p33, mas não o α p37; D³²SGIH(P04)GATTTAPS⁴⁵ bloqueou o sinal α p37 mas não o α p33. A fosforilação do sinal de β -catenina de α p41,45 foi inibida por dois fosfopéptidos de β -catenina: parcialmente por G³⁴IHS(P04)GATT(P04)TA⁴³ e completamente por G³⁸ATT(P04)TAPS(P04)LS⁴⁷, indicando que tanto pT41, como pS45 são reconhecidos pelos anticorpos. As proteínas para análise por MS foram purificadas por imunoafinidade com contas de afinidade M2 Flag (Sigma), separadas por SDS-PAGE, coradas com Coomassie e as bandas de β -catenina foram digeridas no gel com endoproteinase Asp-N. Os péptidos resultantes foram dessalinizados em pequenas colunas, eluídos com MeOH a 20%, HCOOH a 5% e analisados por espectrometria de massa com nanoelectropulverização [Yaron et al. (1998) *id ibid.*], utilizando um espectrómetro de massa de tempo de voo com quadrupolo (PE-Sciex, Canadá).

Monitorização da transactivação de transcrição de β -catenina

Transfectaram-se células com o plasmídeo repórter de luciferase TOPFLASH ou pGL3-MITF/M [Korinek et al. (1997) Science, 275: 1752-3; Takeda et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:14013-6] e com as combinações de plasmídeos de expressão relevantes. Recolheram-se as células 24 horas após a transfecção. Determinou-se a actividade de luciferase nos

lisados celulares utilizando o sistema de ensaio de luciferase da Promega. A actividade de transcrição é expressa em Unidades de Luciferase Relativas (RLU). Utilizaram-se repórteres de local de mutante TCF (FOPFLASH e pGL3-MITF/M195.3) para controlar a transactivação de transcrição independente de TCF.

Exemplo 1

A axina induz a cascata de fosforilação-degradação de β -catenina, iniciada por fosforilação no resíduo de serina 45.

Para estudar a cascata de fosforilação que promove a degradação de β -catenina, montou-se um sistema de expressão de proteína simples em células 293: A sobre-expressão combinada de axina e GSK-3 β desencadeia a degradação de β -catenina (marcada com Myc) expressa exogenamente (figura 1a). Neste sistema, nenhum dos componentes sozinho foi suficiente para promover a degradação de β -catenina numa vasta gama de expressão de plasmídeo (figura 1a e dados não apresentados). A degradação foi bloqueada por tratamento das células com o inibidor de proteossoma MG-132 (figura 1b) ou por sobre-expressão de um β -TrCP dominante negativo, uma conhecida β -catenina-ubiquitina-ligase (E3) [Polakis (2000) *id ibid.*] (figura 1a, pista 7). Analisaram-se os lisados celulares para fosforilação de β -catenina utilizando uma série de anticorpos anti-fosfopéptido de β -catenina comerciais: anticorpo específico tanto para pT41, como para pS45 (α p41,45) e anticorpos que reconhecem qualquer um de pS33 ou pS37. Não se detectou qualquer fosforilação por transfecção apenas de Myc- β -catenina ou em combinação com GSK-3 β (figura 1b, pistas 2, 3). A expressão de axina induziu um sinal proeminente com α p41,45 e sinais pequenos com α p33 e α p37, o que é possivelmente atribuível a actividade GSK-3 β endógena (pista 5). A co-expressão de axina e GSK-3 β aumentou a fosforilação de S33 e S37 numa elevada extensão (10-30 vezes), enquanto o sinal de fosforilação de T41/S45 foi aumentado modestamente (2-4 vezes, comparar as pistas 4, 5), provavelmente devido a fosforilação de T41 mediada por GSK-3 β . Contrariamente, uma β -catenina mutada no terminal N (dominante positiva, DP) não apresentou qualquer sinal de fosforilação e foi estável, independentemente de inibição proteossómica (figura 1a, b). Também se verificou fosforilação de S45 por expressão de APC, no entanto numa extensão muito mais pequena

(dados não apresentados). Tal pode sugerir que APC tem um papel na reacção de iniciação, que é provavelmente limitado a apoiar a actividade de axina. De facto, a análise mutacional de APC em cancro, mostrou que muitas mutações de APC impedem o seu envolvimento com a axina, mantendo porém a associação com β -catenina [Hart, M.J. *et al.* (1998) *Curr Biol* 8: 573-581; Fearnhead, N.S. *et al.* (2001) *Hum Mol Genet* 10: 721-733].

Para resolver a especificidade de fosforilação de axina e GSK-3 β , analisou-se adicionalmente a fosforilação de β -catenina por espectrometria de massa (MS). A análise por MS mostrou fosforilação vestigial da região N-terminal da β -catenina quando transfectada sozinha (figura 1c, painéis 1, 2). A co-expressão de axina resultou num sinal de fosforilação principal em S45, com sinais de fosforilação que foram apenas fracamente detectáveis em qualquer dos outros locais potenciais de fosforilação no terminal N (painéis 3, 4, 7). Reciprocamente, a expressão combinada de axina e GSK-3 β resultou em sinais de fosforilação em S45 e quatro locais de fosforilação do terminal N consecutivos: T41, S37, S33 (painéis 6, 8) e S29 (não apresentado), com intensidade de sinal decrescente.

Os estudos de β -catenina em vários tumores humanos indicaram que são frequentemente mutados vários locais potenciais de fosforilação do terminal N, levando à estabilização e aumento da expressão nuclear da proteína mutada [Morin *et al.* (1997) *id ibid.*; Rubinfeld *et al.* (1997) *id ibid.*; Wong *et al.* (2001) *id ibid.*]. Muitas destas mutações de tumores estão concentradas em torno do local de ligação consensual de β -TrCP [Yaron *et al.* (1998) *id ibid.*] (DS*GXXS*, em que S* significa fosfoserina), explicando a estabilização de β -catenina. No entanto, dois locais de mutação comuns, S45 e T41, estão posicionados numa região C-terminal relativamente ao motivo de reconhecimento de β -TrCP canónico. Assim, a estabilização de β -catenina por mutações T41/S45 necessita de uma explicação diferente. Uma possibilidade é a formação de um local de ancoragem E3 redundante em torno de pT41 e pS45 (S*XXXS*) [Aberle *et al.* (1997) *id ibid.*; Yaron *et al.* (1998) *id ibid.*], que está ausente nos mutantes. A outra possibilidade é que estas mutações influenciam a fosforilação de S33 e S37, que é necessária para gerar o local de ligação

β -TrCP. Para abordar esta questão, criou-se uma série de mutações pontuais nos locais de fosforilação do terminal N detectados por MS e analisou-se a sua fosforilação e degradação no sistema 293. A expressão de axina ou axina-GSK-3 β produziu sinais de fosforilação com α p41,45 em todos os mutantes, excepto S45F (figura 2a). Tal também diz respeito ao mutante T41A, que apenas pode ser fosforilado em S45, indicando que a axina pode induzir uma fosforilação S45 exclusiva. Por outro lado, nenhum dos mutantes, com a excepção de S29F, foi fosforilado tanto em S33, como em S37, em resposta a transfecção com axina-GSK-3 β (figura 2a). De modo coerente com o seu estado de fosforilação, somente β -catenina wt e S29F foram degradadas após co-expressão de axina-GSK-3 β (figura 2b). Todos os outros mutantes resistiram à degradação, de acordo com a estabilidade dos seus homólogos de tumor em cancro humano [Polakis (2000) *id ibid.*]. As mutações em S37 e S33 permitem fosforilação em T41/S45 (figura 2a, pistas 7-12), mas resistem à degradação (figura 2b, pistas 5-8), a ocorrência de um local de reconhecimento de β -TrCP redundante funcionalmente a jusante de S37 é improvável. Assim, parece que a fosforilação em S45 inicia uma cascata GSK-3 β linear, na qual cada local de fosforilação funciona como o local de iniciação necessário para o local sucessivo. Embora corra até S29, o objectivo da cascata é aparentemente restrito a gerar o local de reconhecimento de β -TrCP canónico em torno de S33/37. Esta hipótese é corroborada pela prevalência de mutações de tumor em Asp32 e Gly34 [Wong *et al.* (2001) *id ibid.*], que não afectam a fosforilação, mas provavelmente comprometem o motivo de reconhecimento de β -TrCP.

Exemplo 2

A fosforilação de S45, que por si só é independente de GSK-3 β , é necessária, e suficiente, para iniciar uma cascata de fosforilação-degradação dependente de GSK-3 β

As experiências anteriores implicam a axina na fosforilação de S45, mas não excluem a contribuição de GSK-3 β para este evento. Tradicionalmente, sabe-se que GSK-3 β tem como alvo a fosforilação de substratos iniciados em +4P [Frame, S. *et al.* (2001) *Mol Cell* 7: 1321-1327], uma especificidade corroborada por recentes estudos estruturais da enzima [Dajani, R. *et al.* (2001) *Cell* 105: 721-732]. O facto

do local de fosforilação S45 não ser precedido por um local de iniciação +4P levou à proposta que o complexo molecular de axina e GSK-3 β é capaz de ultrapassar a necessidade de iniciação da enzima não complexada [Cohen e Frame (2001) *id ibid.*]. Para avaliar a contribuição de GSK-3 β na fosforilação de S45 mediada por axina, efectuaram-se dois tipos de experiências. No primeiro conjunto, incubaram-se células 293 antes de recolha com LiCl, um inibidor de GSK-3 β capaz de mimetizar um efeito Wnt [Klein, P.S. e D.A. Melton (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8455-8459; Shambolic, V. et al. (1996) *Curr Biol* 6: 1664-1668]. Enquanto a fosforilação modesta de S33/37 induzida por axina de β -catenina wt foi anulada por LiCl, o sinal de fosforilação homólogo T41/S45 foi afectado minimamente (figura 3a, comparar pistas 3, 6). De igual modo, não se detectou qualquer diferença na análise MY de péptidos S45 em células tratadas com LiCl relativamente a células não tratadas (dados não apresentados). Além disso, o tratamento com LiCl não teve qualquer efeito na fosforilação de S45 de uma β -catenina mutada em T41A (figura 3a, comparar pistas 3, 6), indicando que a fosforilação de S45 foi independente de GSK-3 β .

No segundo conjunto de experiências, ensaiou-se uma axina mutada (Leu 525 convertida para Pro, [L525P-axina]), que é incapaz de interactuar com GSK-3 β (figura 3b) [Smaller, M.J. et al. (1999) *EMBO J* 18: 2823-2835; Rubinfeld, B. et al. (2001) *J Biol Chem* 276: 39037-39045]. A L525P-axina foi tão eficaz como a axina wt a induzir fosforilação de S45 (figura 3c, pistas 2, 4) e na análise por MS [consultar seguidamente, figura 5c]). Contrariamente a axina wt, o mutante L525P é incapaz de envolver a GSK-3 β endógena para a fosforilação de S33/37 (figura 3c, pista 2 vs. 4). No entanto, quando complementado por GSK-3 β exógeno, L525P e axina wt geraram sinais de fosforilação de S33/37 comparáveis (figura 3c, pistas 3, 5 e dados de MS [não apresentados]) e degradação de β -catenina (figura 3c, pista 7 e figura 1a, pista 6). Conjuntamente, estas experiências demonstram que a iniciação de fosforilação em S45 não necessita de GSK-3 β , mas sim de uma proteína quinase diferente.

Estes dados demonstram que a fosforilação de S45 é essencial para iniciar a fosforilação de GSK-3 β , não indicando

no entanto se é suficiente para mobilizar a cascata. Para abordar esta questão, os inventores construíram uma β -catenina contendo um substituto do local de fosforilação mediado por proteína quinase A (PKA) em S45 (45PKA). Esta manipulação não afectou a expressão, nem a estabilidade de β -catenina (dados não apresentados), mas resultou na sua fosforilação de S45 constitutiva em células 293 (figura 4, pista 1), que foi inibida por H89, um inibidor específico de PKA (dados não apresentados). A fosforilação de S45 de 45PKA não necessitou de axina, nem foi aumentada por sobre-expressão de axina (figura 4, pistas 1 e 2). Assim, 45PKA provou ser fundamental no estudo da iniciação e progressão da cascata de fosforilação de GSK-3 β independentemente de axina. A transfecção de GSK-3 β resultou em fosforilação S33/37 pronunciada do mutante 45PKA (pista 3), bem como na sua degradação completa (pista 5). Tal está em franca oposição com a incapacidade de GSK-3 β induzir fosforilação e degradação de β -catenina wt quando transfectada sozinha (figura 1). Para controlar o efeito de GSK-3 β wt, utilizou-se um mutante R96A-GSK-3 β , que não pode albergar uma fosfoserina de iniciação e é portanto incapaz de fosforilar substratos dependentes de iniciação [Frame et al. (2001) *id ibid.*]. R96A-GSK-3 β não induziu fosforilação de 45PKA em S33/37 (figura 4, pista 4) e a sua subsequente degradação (pista 6). Estes resultados indicam que a β -catenina é um substrato dependente de iniciação genuíno para GSK-3 β e que a iniciação de S45 é tanto necessária, como suficiente para levar a cabo a cascata GSK-3 β . No entanto, as experiências anteriores não podem abordar papéis adicionais para a axina na cascata. É possível que quando GSK-3 β está presente em quantidades limitantes, a axina auxilie no recrutamento de GSK-3 β para β -catenina. Os dados que comparam o efeito de axina wt com o de L525P-axina corroboram tal papel: a L525P-axina, que é incapaz de se associar com GSK-3 β endógena, não induziu fosforilação de S33/37 (figura 3c, pista 4).

Exemplo 3

A fosforilação de S45 induzida por axina é mediada por CKI

Para identificar a quinase iniciadora associada a axina, purificou-se por imunoafinidade Flag-axina de células 293 transfectadas e analisaram-se as suas proteínas associadas endógenas por LC/MS. Apenas se detectaram 5 proteínas quinases

em associação com axina numa quantidade elevada: As duas isoformas de GSK-3, α e β , e três isoformas de CKI, ϵ , δ e α . Estas isoformas de CKI tem um domínio de quinase altamente conservado e parecem ter especificidades de substrato semelhantes ou idênticas [Fish, K.J. *et al.* (1995) *J Biol Chem* 270: 14875-14883]. Vários estudos implicaram CKI ϵ na via Wnt, principalmente como um efector positivo [Peters, J.M. *et al.* (1999) *Nature* 401: 345-350; Lee, E. *et al.* (2001) *J Cell Biol* 154: 983-993; McKay *et al.* (2001) *id ibid.*; Gao, Z.H. *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1182-1187]. Demonstrou-se que CKI ϵ interacciona com a axina [Sakanaka, C. *et al.* (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12548-12552; Rubinfeld *et al.* (2001) *id ibid.*] e recentemente foi proposto que esta quinase media a fosforilação de APC induzida por axina, estabilizando assim o complexo de degradação de β -catenina [Rubinfeld *et al.* (2001) *id ibid.*]. Assim, avaliou-se CKI como um candidato a quinase de S45 tanto em ensaios *in vitro*, como *in vivo*.

Primeiro, ensaiou-se a fosforilação *in vitro* de β -catenina utilizando uma Flag-axina purificada por imunoafinidade (a preparação LC/MS) e as enzimas recombinantes CKI δ (um fragmento N-terminal de 318aa) e GSK-3 β (figura 5a). Tanto a CKI δ , como a axina induziram a fosforilação de β -catenina em S45/T41, mas não em S33 (pistas 3, 7). Para implicar directamente CKI na iniciação da cascata de fosforilação GSK-3 β , submeteu-se β -catenina a fosforilação sequencial por CKI seguida de GSK-3 β . A GSK-3 β foi incapaz de fosforilar sozinha a β -catenina (pista 4), induzindo porém um sinal pS33 pronunciado após fosforilação de S45 por CKI (pista 5).

Noutro conjunto de experiências analisou-se o papel *in vivo* de CKI na fosforilação de S45, utilizando duas construções CKI ϵ dominantes negativas (dnXCKI ϵ s K85R e D128N) [McKay *et al.* (2001) *id ibid.*] e um inibidor específico de CKI (CKI-7) [Chijiwa, T. *et al.* (1989) *J Biol Chem* 264: 4924-4927]. A co-expressão dos dois dnXCKI ϵ s, mas não de quinase wt, com axina, eliminou a capacidade da axina induzir fosforilação de S45 em células 293 (figura 5b, pistas 5, 4, 3). Seguidamente, ensaiou-se o efeito de CKI-7 na fosforilação de S45 induzida por axina, comparativamente ao seu efeito na fosforilação constitutiva de 45PKA. O tratamento com CKI-7 diminuiu o sinal de p45 induzido por axina de β -catenina wt,

mas não afectou a fosforilação de p45 de 45PKA (figura 5c). O efeito de inibição foi ensaiado adicionalmente na fosforilação de S45 de β -catenina endógena em células HeLa inibidas por proteossoma (figura 5d): CKI-7 suprimiu a fosforilação tanto de S45/T41, como de S83 (pista 3), enquanto o inibidor de GSK-3 β , LiCl, bloqueou exclusivamente a fosforilação de S33 (pista 6). Na mesma experiência, H89, um inibidor de PKA, não teve qualquer efeito na fosforilação de β -catenina wt (pista 5). Conjuntamente, estes resultados *in vitro* e *in vivo* indicam que CKI medeia a função de axina na iniciação da cascata de fosforilação-degradação de β -catenina.

A análise por LC-MS/MS do complexo de fosforilação S45 revelou três isoformas CKI em associação com axina purificada por imunoafinidade. Para determinar qual das CKI é responsável por fosforilação de S45, trataram-se células RKO com oligonucleótidos de ARNsi de CKI α , ou um ARNsi comum para CKI ϵ e CKI δ . Determinou-se a fosforilação de β -catenina em S45 e p33 72 horas após tratamento com ARNsi, comparativamente com o tratamento apenas com inibidores de proteossoma (figura 5e). A análise por hibridação de "Western" apresenta uma expressão reduzida de CKI α e CKI ϵ , conjuntamente com uma redução notável dos sinais de fosforilação tanto de S45, como de S33. Assim, parece que as duas isoformas de CKI têm um efeito comparável na indução de fosforilação de S45 em células RKO.

Exemplo 4

A fosforilação de S45 é regulada por sinalização Wnt através de Dvl

O controlo da estabilidade da β -catenina é uma tarefa principal da via Wnt e é mediada através de membros da família de proteínas Dishevelled conservadas (Dvl 1, 2, 3) [Boutros e Mlodzik (1999) *id ibid.*]. O modelo actual sugere que Dvl transmite o sinal Wnt quando associada com axina [Kishida, S. et al. (1999) Mol Cell Biol 19: 4414-4422; Smalley et al. (1999) *id ibid.*; Salic, A. et al. (2000) Mol Cell 5: 523-532]. Dado que os resultados anteriores demonstraram que a axina controla o evento de iniciação na cascata de fosforilação-degradação de β -catenina, falta perceber se Wnt e Dvl regulam a fosforilação de S45. Para este fim, estimularam-se primeiramente várias linhas celulares com Wnt3A [Roelink, H. e

R. Nusse. (1991) *Genes Dev* 5: 381-388; Shibamoto, S. *et al.* (1998) *id ibid.*; Lee *et al.* (1999) *id ibid.*] e monitorizou-se a fosforilação de S45 por análise de hibridação de "Western". A estimulação de Wnt estabilizou β -catenina endógena em células L de ratinho (fibroblastos) (figura 6a, pistas 1, 2) e β -catenina exógena em linfócitos Jurkat (pistas 5, 6). Não afectou os níveis de uma β -catenina mutada em S37 já estabilizada na linha celular de hepatoma SNU449 [Sato, S. *et al.* (2000) *Nat Genet* 24: 245-250] (pistas 9-11). A fosforilação de S45 de β -catenina foi evidente em células L com proteossoma inibido (pista 3), células Jurkat (pista 7) e células HeLa (pista 14). Também foi evidente em células SNU449 tratadas com ácido ocadáico (OKA, pista 10). O tratamento com Wnt3A resultou em inibição de fosforilação de S45 em todas as quatro linhas celulares (pistas 4, 8, 11, 15) e a subsequente inibição de fosforilação de S33/37 em células Jurkat, HeLa e L (pistas 8, 15, 4), o que sugere que a sinalização Wnt intervém entre axina e fosforilação de S45.

Para analisar o papel de Dvl na regulação da fosforilação de S45, introduziu-se Dvl-1 de ratinho [Lee *et al.* (1999) *id ibid.*] no sistema 293 e avaliou-se a fosforilação de S45 por hibridação de "Western" e análise por MS. A transfecção de Dvl resultou em inibição quase completa de fosforilação de S45 induzida por axina (figura 6c, pistas 5, 6), paralelamente com estabilização de β -catenina (pista 9). Verificou-se um efeito de Dvl semelhante para a fosforilação de S45 induzida por L525P-axina. A análise por MS (figura 6b) e por hibridação de "Western" (dados não apresentados) indicou que Dvl inibe a fosforilação de S45 induzida por axina-CKI. No entanto, Dvl, como um mediador de sinal de Wnt, poderia também regular as etapas subsequentes da cascata de fosforilação de GSK-3 β . Para avaliar este possível papel duplo de Dvl, co-expressou-se Dvl com o mutante 45PKA de β -catenina que inicia a cascata GSK-3 β independentemente de axina (figura 4). Dvl não teve qualquer efeito em fosforilação de S45 mediada por PKA (figura 6d, comparar pistas 1, 2), nem bloqueou a fosforilação S33/37 mediada por GSK-3 β (figura 6d, pistas 3, 4). De igual modo, e em contraste com o efeito estabilizador de Dvl na β -catenina wt (figura 6c, pista 9), a degradação de 45PKA não foi inibida por Dvl (figura 6d, pistas 6, 7). Esta observação indica que o evento de fosforilação de S45 mediado por axina/CKI, e não a

resultante cascata de fosforilação de GSK-3 β , é o alvo crítico para sinalização Wnt.

Exemplo 5

Indução de fosforilação de pSer45 e pSer33 por ácido ocadáico

O ácido ocadáico é um inibidor selectivo de fosfatase PP2A, enquanto inibe em menor extensão (10-50 vezes menos) fosfatase PP1. Trataram-se células HeLa e Sw480 com inibição de proteossoma (tratadas com MG132 20 μ M) ou células de carcinoma de cólon SNU 449 mutadas em Ser 37 [Sato et al. (2000) *id ibid.*] com ácido ocadáico (1 μ M) durante 1 ou 3 h, recolheram-se e analisou-se o seu lisado por hibridação de "Western" com anticorpos anti-fosfo- β -catenina: anti-pSer45 e anti-pSer33 (apenas para células HeLa e RK0). Tal como se pode verificar na figura 7, o tratamento com ácido ocadáico induz um sinal de fosforilação intenso com ambos os anticorpos. No entanto, dado que a fosforilação de S45 precede a fosforilação de S33, o efeito ocadáico pode ser reservado a S45. Este é um exemplo de um composto que pode regular positivamente a fosforilação de S45, enquanto Wnt3A regula negativamente o mesmo evento de fosforilação (figura 6a).

Exemplo 6

FRAT1 promove a fosforilação de β -catenina

A sobre-expressão de Frat1 em células 293 conjuntamente com axina e GSK3 resultou em hiperfosforilação de β -catenina na iniciação de S45 GSK3 (não apresentada) e nos locais de fosforilação de GSK3 sucessivos (T41, S37 e S33, figura 9a). Surpreendentemente, a β -catenina fosforilada não foi degradada, apesar da ausência de inibidores de proteossoma e, em vez disso, acumula-se nas células transfectadas (figura 9a). A co-expressão de pequenas quantidades de Dvl nestas células não reprimiu a fosforilação de S45 e de S33, mas pelo contrário, aumentou o efeito de estabilização de Frat1 na fosfo- β -catenina (figura 9a). A maior expressão de Dvl suprimiu a fosforilação de β -catenina, provavelmente devido ao seu efeito predominante na fosforilação de S45 (figura 9a). Contrariamente ao efeito Dvl wt, a transfecção de 293 com um mutante de deleção de Dvl isento do motivo de interacção com Frat, PDZ (Dvl- Δ PDZ), resultou na estabilização

de β -catenina não fosforilada (figura 9b). Dvl- Δ PDZ suprime a fosforilação de S45, no entanto não pode activar Frat e assim é incapaz de estabilizar β -catenina fosforilada:

Transfectaram-se células 293 com o plasmídeo repórter de luciferase TOPFLASH e os plasmídeos de expressão para β -catenina, axina, GSK, Frat e Dvl, de acordo com as combinações indicadas na figura 9c. Recolheram-se as células 24 horas após transfecção e determinou-se a actividade de luciferase dos seus lisados utilizando o sistema de ensaio de luciferase da Promega. Os ensaios do repórter TCF indicaram que a β -catenina robustamente fosforilada obtida por sobre-expressão de Frat1 em células 293 funciona como um co-activador de TCF/LEF eficaz, muito melhor do que a β -catenina estabilizada por Dvl (figura 9c).

p300/CBP é um activador de transcrição, que se verificou que coopera com β -catenina na activação de genes regulados por TCF [Hecht, A. et al. (2000) EMBO J. 19(8): 1839-50]. Transfectaram-se células 293 com os plasmídeos de expressão para Myc- β -catenina, p300/CBP, E1A e Frat, tal como indicado na figura 9d. p300/CBP e E1A estabilizam fosfo- β -catenina de modo semelhante a Frat1.

Em alguns casos, os efeitos de transcrição de p300/CBP são mediados através da sua actividade de acetil-transferase [Chan, H.M. e La Thangue, N.B. (2001) J. Cell Sci. 114 (Pt13):2363-73]. Curiosamente, verificou-se que a sobre-expressão de ambos p300/CBP e Frat1 induz acetilação de lisinas de β -catenina (figura 9e). As espécies de β -catenina acetiladas competem com as fosforiladas, indicando uma possível ligação entre os dois eventos. A acetilação da proteína proíbe a ubiquitinação dos resíduos de lisina modificados e assim pode resultar na estabilização de uma proteína modificada [Brooks e Gu (2003) Curr. Opin. Cell Biol. 15(2): 164-71]. E1A pode funcionar como um regulador negativo e positivo da actividade de acetil-transferase de p300/CBP [Chan e La Thangue (2001) *id ibid.*; Gallimore e Turnell (2001) Oncogene 20(54): 7824-35]. A concentrações menores, E1A funciona no recrutamento de p300/CBP e, assim, pode facilitar a acetilação de proteína [Ait-Si-Ali, S. et al. (1998) Nature 396(6707):184-6], enquanto a concentrações mais elevadas,

antagoniza a actividade de acetil-transferase de p300/CBP [Li, Q. *et al.* (1999) EMBO J. 18(20): 5634-52]. Tal pode explicar os efeitos opostos de E1A em combinação com p300/CBP e Frat1 na fosforilação de β -catenina: enquanto baixas concentrações de E1A aumentam a estabilização de β -catenina fosforilada, concentrações mais elevadas de E1A suprimem a acumulação de β -catenina fosforilada (figura 9d). As experiências dos inventores indicam assim que determinados oncogenes, tais como Frat1 e E1A, têm a capacidade de induzir a estabilização de β -catenina fosforilada, possivelmente através de acetilação de proteína.

Exemplo 7

A inibição de CKI suprime a fosforilação de β -catenina

MITF (factor de transcrição associado a *microftalmia*) é um factor de transcrição de determinação de linhagem, que modula a diferenciação e pigmentação de melanócitos, que funciona a jusante da via Wnt. MITF tem sido utilizado como um marcador de células de melanoma e foi demonstrado que é necessário para o crescimento de melanoma induzido por β -catenina [Widlund *et al.* (2002) *id ibid.*].

Transfectaram-se células RKO com o plasmídeo repórter de luciferase pGL3-MITF/M [Takeda *et al.* (2000) *id ibid.*] e as combinações de plasmídeos de expressão indicadas no gráfico (figura 10a). Recolheram-se as células 24 horas após transfecção e determinou-se a actividade de luciferase do seu lisado utilizando o sistema de ensaio de luciferase da Promega. A co-transfecção de um plasmídeo repórter MITF com Frat1 em células RKO aumenta a sua transcrição (figura 10a), enquanto se verificou que os plasmídeos dominantes negativos CKI (DN-CKI) reduzem a actividade do repórter MITF tanto basal, como aumentada por Frat1. Os CKI dominantes negativos funcionam por supressão de fosforilação de S45 de β -catenina, causando acumulação de β -catenina nas células na sua forma não fosforilada (consultar figura 5b). Dado que a β -catenina não fosforilada não é afectada por Frat1, a β -catenina não acumulou em células RKO transfectadas com Frat1 e consequentemente, não houve qualquer transcrição do repórter MITF (figura 10a).

A linha celular de melanoma altamente metastático LB33B1 (B1) é um derivado de células LB33A1 (A1) malignas de grau baixo [Ikeda H. *et al.* (1997) *Immunity* 6(2): 199-208]. Ambas as linhas celulares contêm um teor elevado semelhante de β -catenina, independentemente da inibição de proteossoma, no entanto a β -catenina de B1 é fosforilada (figura 10b). Os inventores demonstram que o repórter MITF é altamente activo nas células B1, mas não no melanoma A1 (figura 10c). Para avaliar a contribuição de β -catenina fosforilada em comparação com a não fosforilada para a actividade de transcrição de MITF, trataram-se células B1 transfectadas com repórter com LiCl, que suprime a fosforilação de GSK3, ou co-transfectaram-se com Dvl-APDZ, que não pode cooperar com Frat1, no entanto suprime a fosforilação de S45. Tanto o tratamento com LiCl, como a transfecção com Dvl-APDZ resultaram na inibição da actividade de promotor de MITF (figura 10c) apesar da presença de β -catenina estável (figura 10b). A eliminação da fosforilação de β -catenina em células de melanoma pode comprometer o seu crescimento e, de facto, o tratamento de células de melanoma B1 com CKI7, um pequena molécula inibidora específica de CKI, atrasou a sua proliferação (figura 10d) conjuntamente com supressão da fosforilação de β -catenina (dados não apresentados). Assim, as experiências dos inventores sugerem que os inibidores de fosforilação de S45, tais como CKI7, podem constituir um meio eficaz de quimioterapia de determinadas doenças malignas (e.g., melanoma maligno).

Lisboa, 2010-10-20

REIVINDICAÇÕES

1. Método de rastreio para um agente anticanceroso, em que o referido método compreende as etapas de:

- (a) colocar em contacto um agente com uma mistura reaccional compreendendo β -catenina, axina e/ou caseína-quinase I alfa (CK1a),
- (b) incubar a referida mistura sob condições que permitem uma alteração na fosforilação de β -catenina na serina 45 (S45), e
- (c) detectar a fosforilação de β -catenina em S45,

em que o aumento da fosforilação da β -catenina em S45 indica que o referido agente é útil como agente anticanceroso.

2. Utilização de CKI-7 para o fabrico de um medicamento identificado para o tratamento de cancro.

3. Utilização da reivindicação 2, em que a β -catenina do referido cancro é estabilizada e a sua fosforilação não é comprometida.

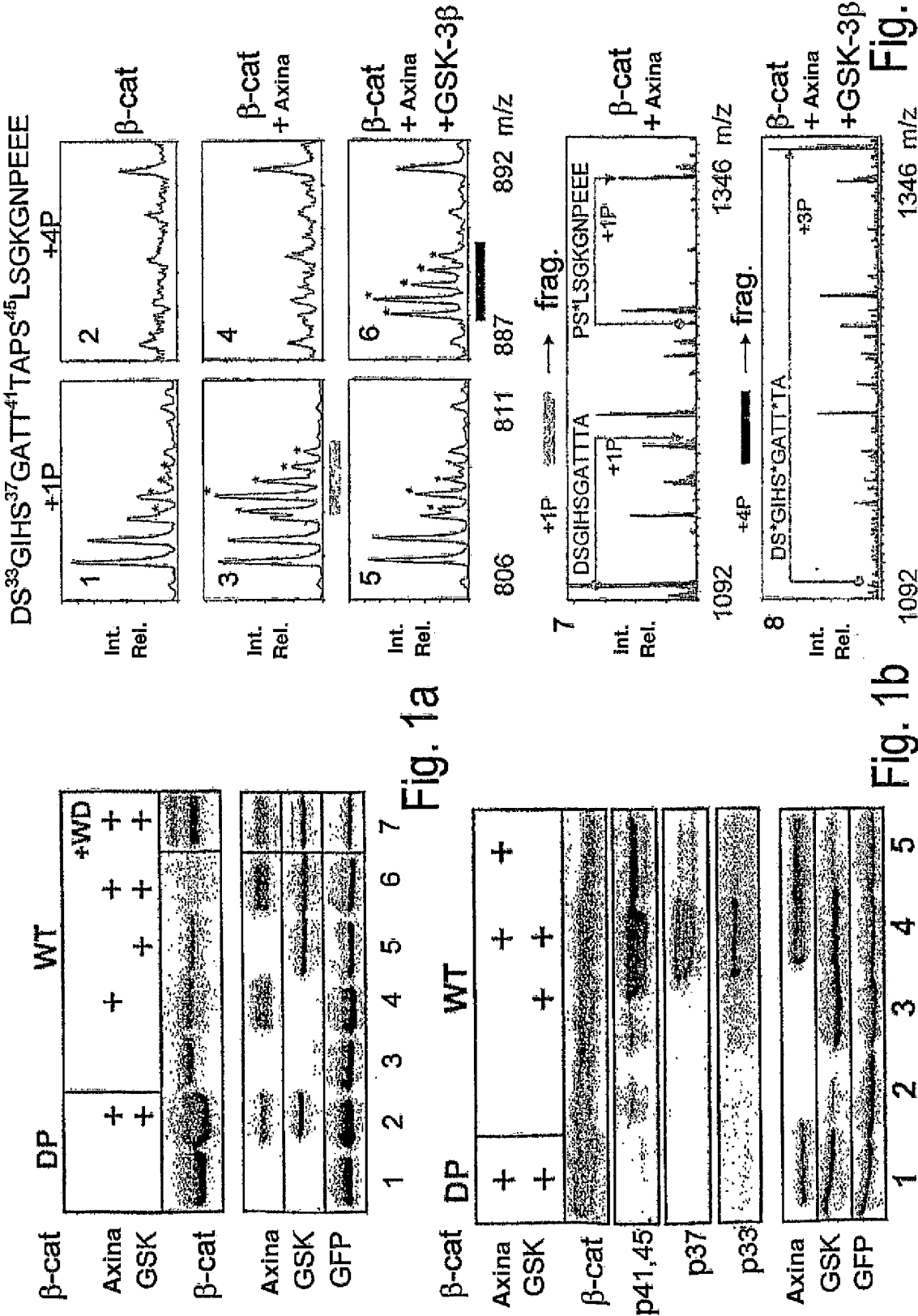
4. Utilização da reivindicação 3, em que o referido cancro é melanoma maligno.

5. Composição farmacêutica compreendendo CKI-7.

6. Utilização de um ARNsi de CKI- α para o fabrico de um medicamento identificado para o tratamento de cancro.

7. Composição farmacêutica compreendendo um ARNsi de CKI- α .

Lisboa, 2010-10-20



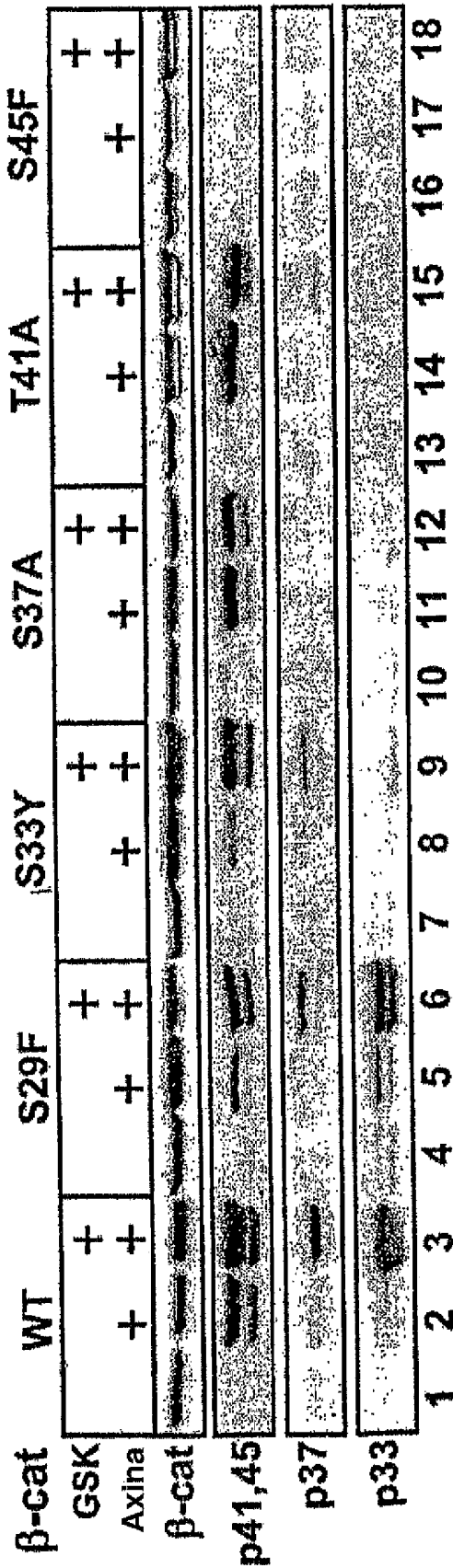


Fig. 2a

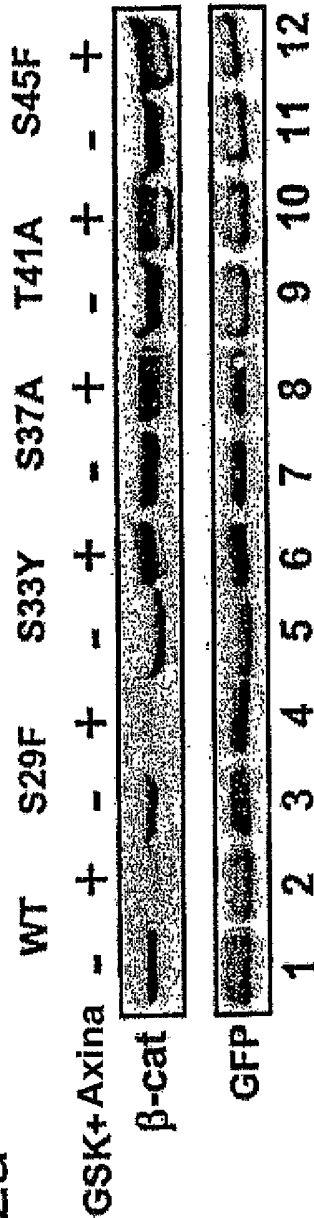


Fig. 2b

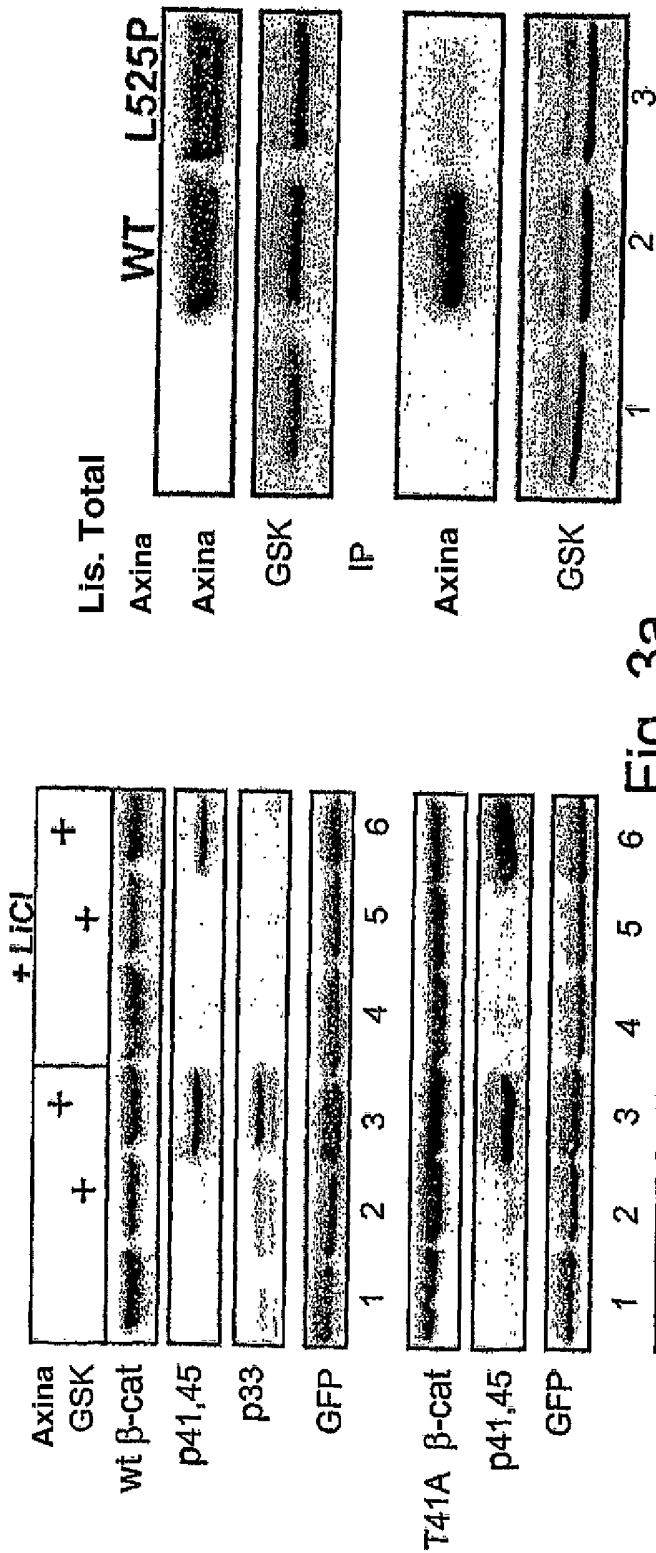


Fig. 3a

Fig. 3b

Fig. 3c

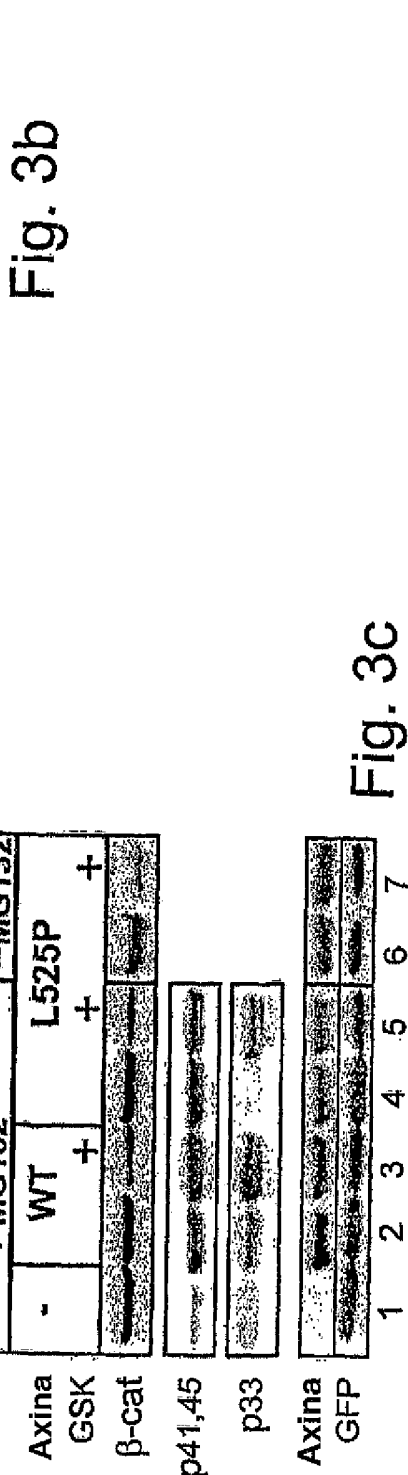


Fig. 3b

Fig. 3c

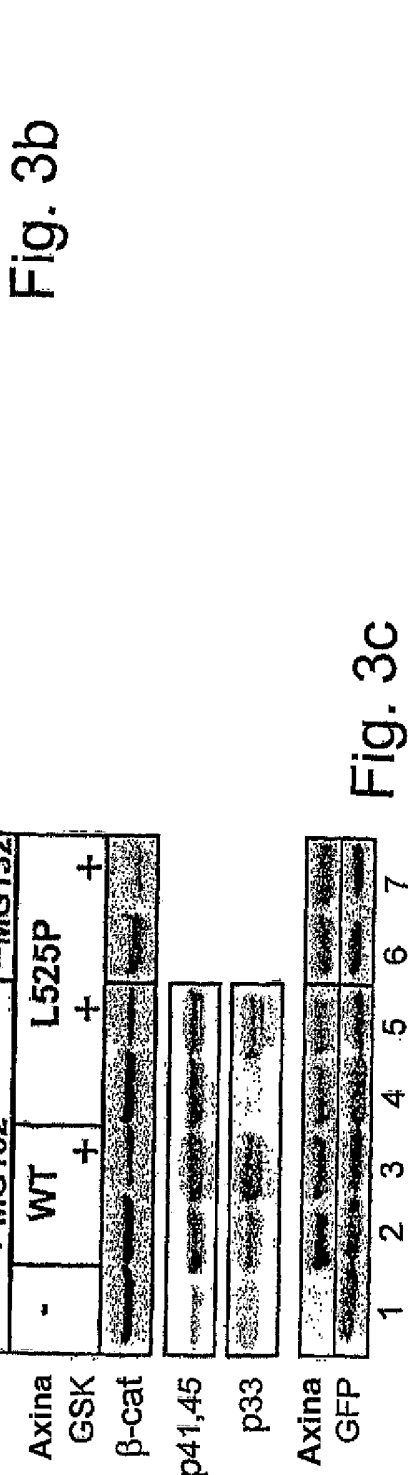


Fig. 3c

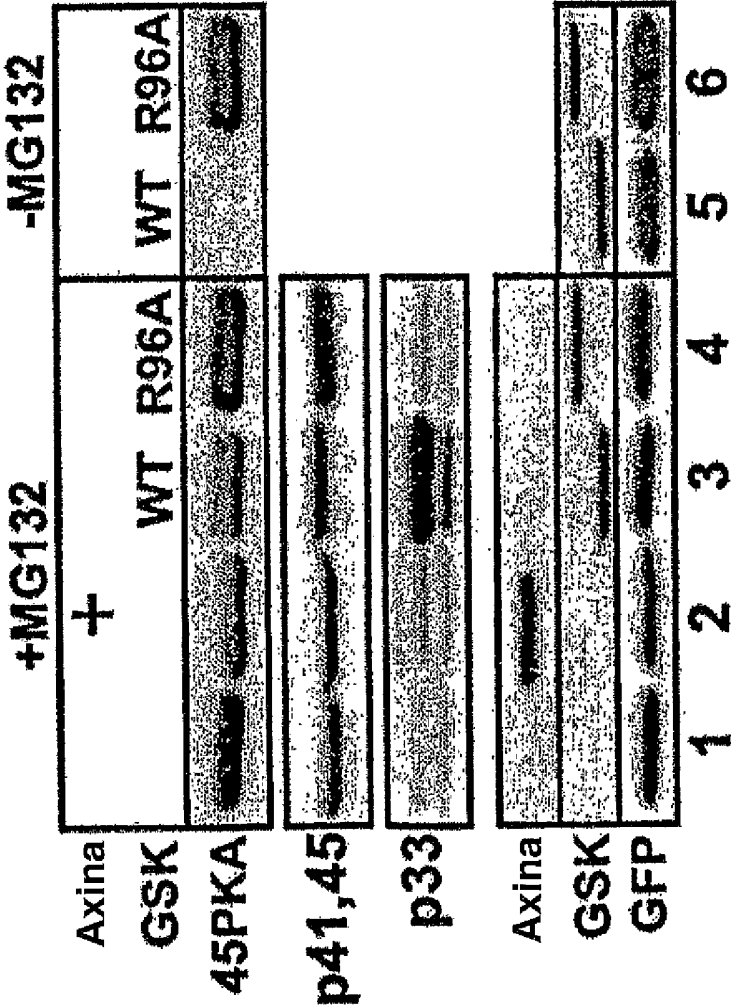


Fig. 4

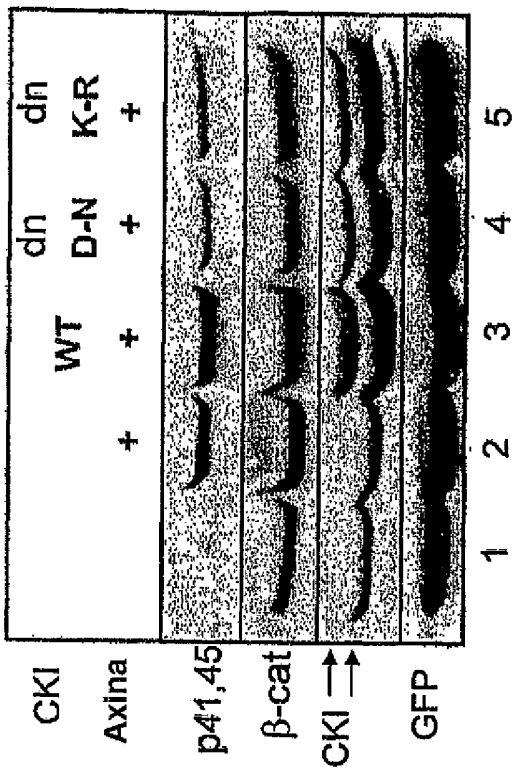


Fig. 5b

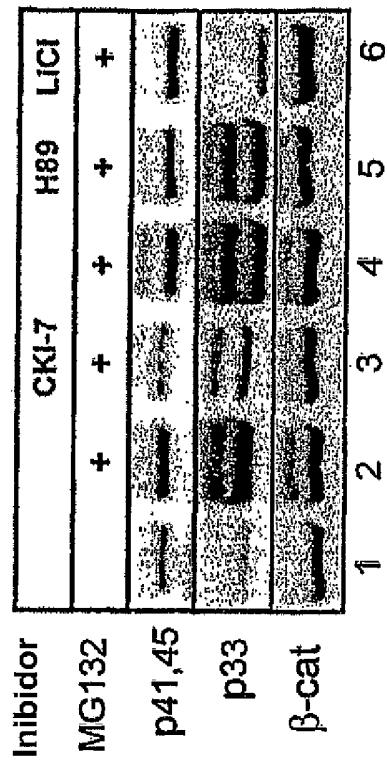


Fig. 5d

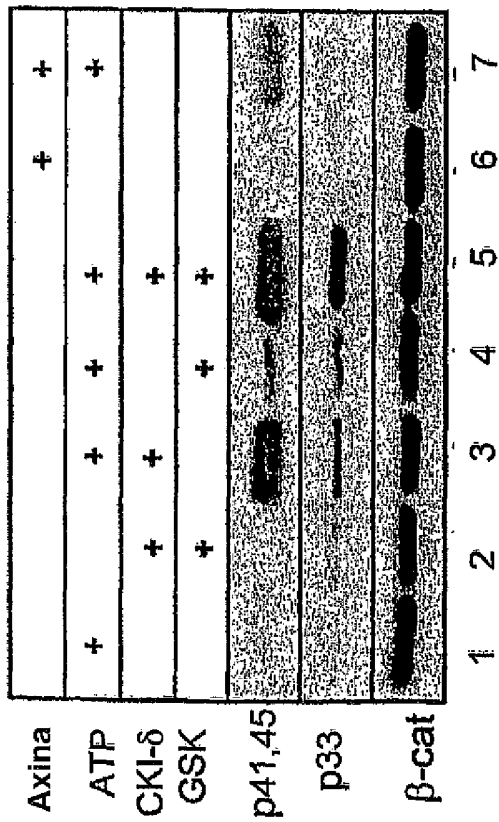


Fig. 5a

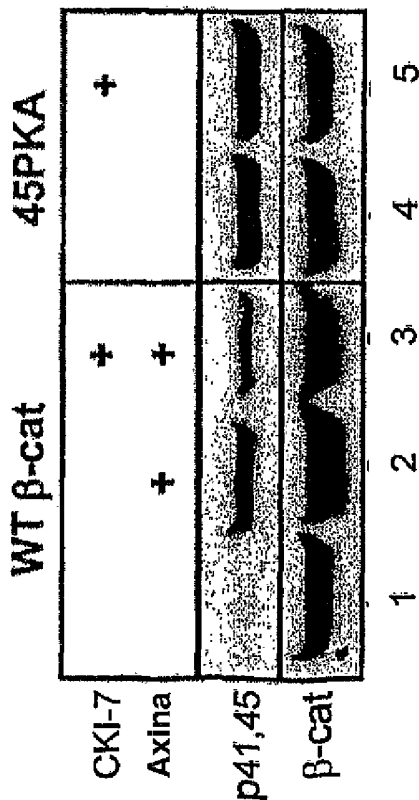


Fig. 5c

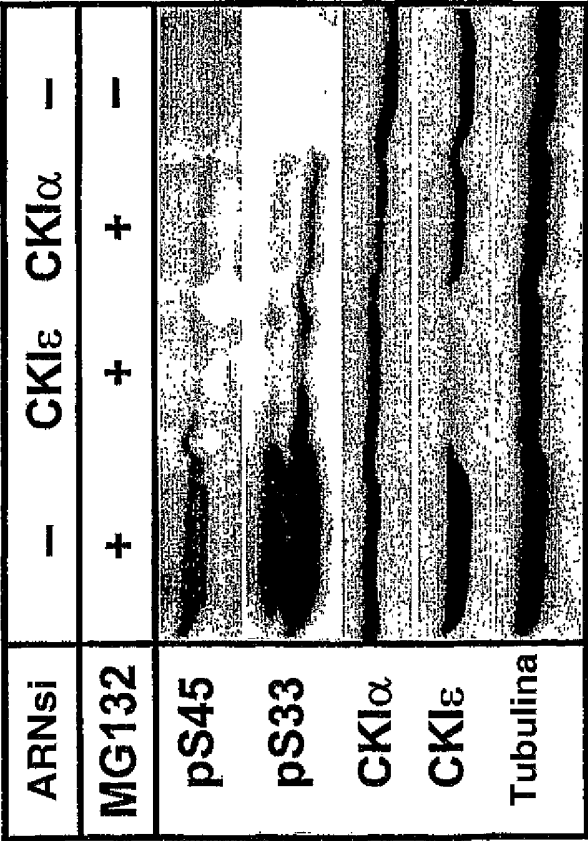
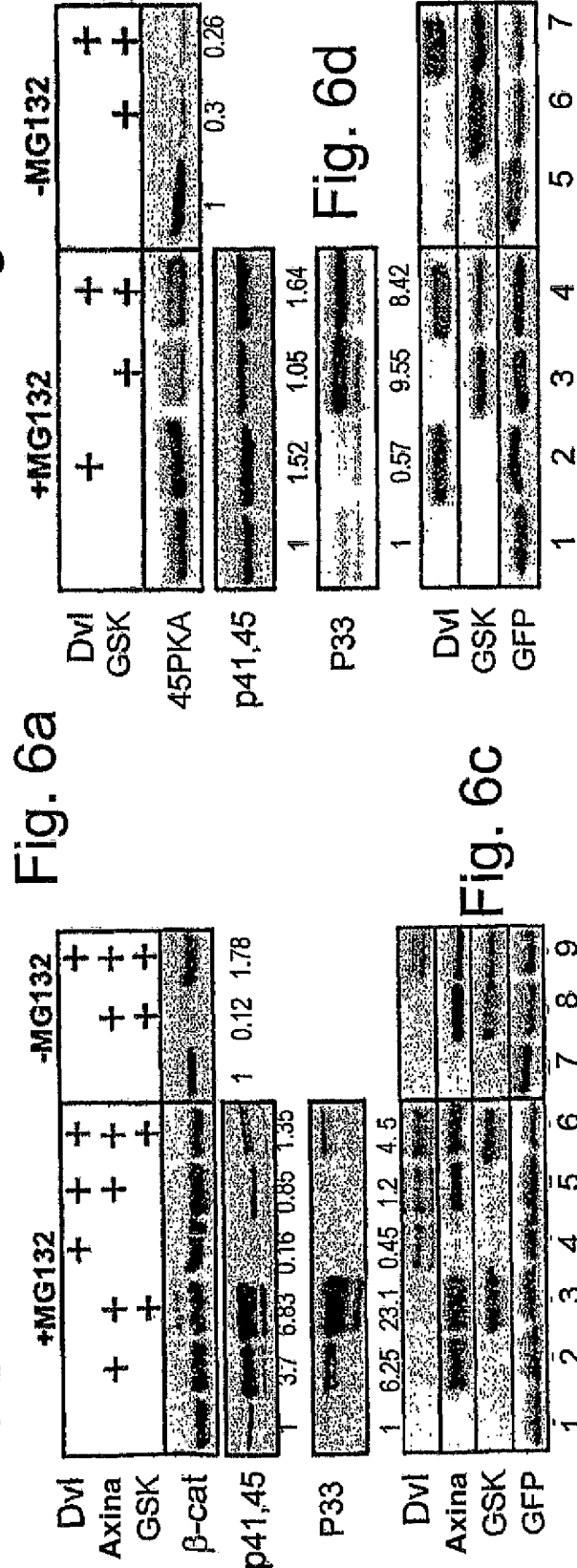
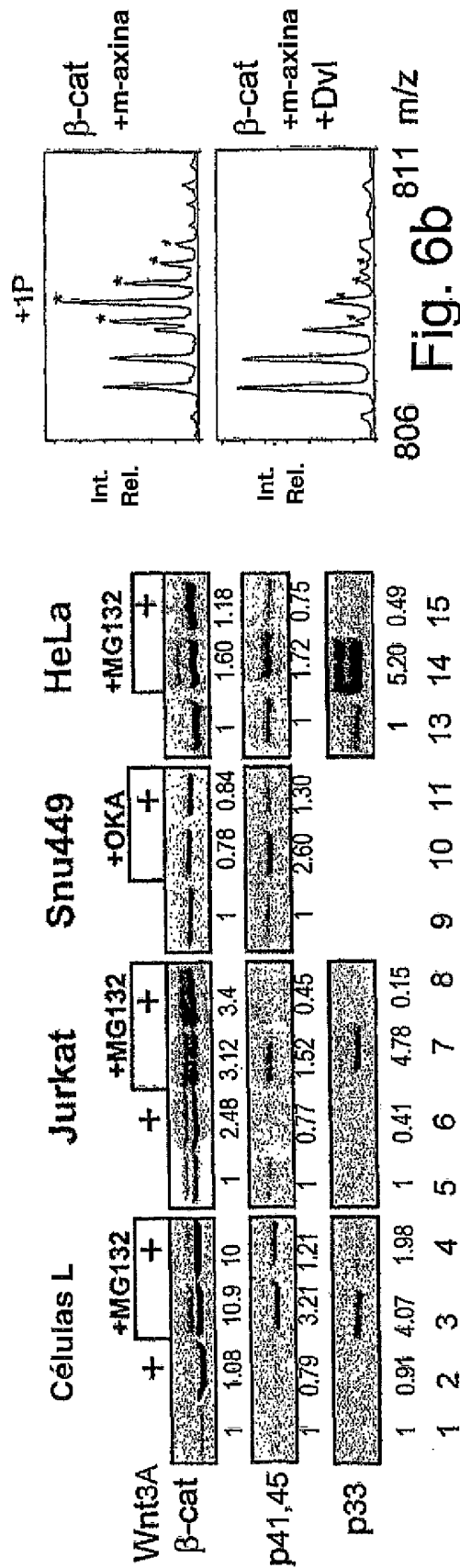


Fig. 5e



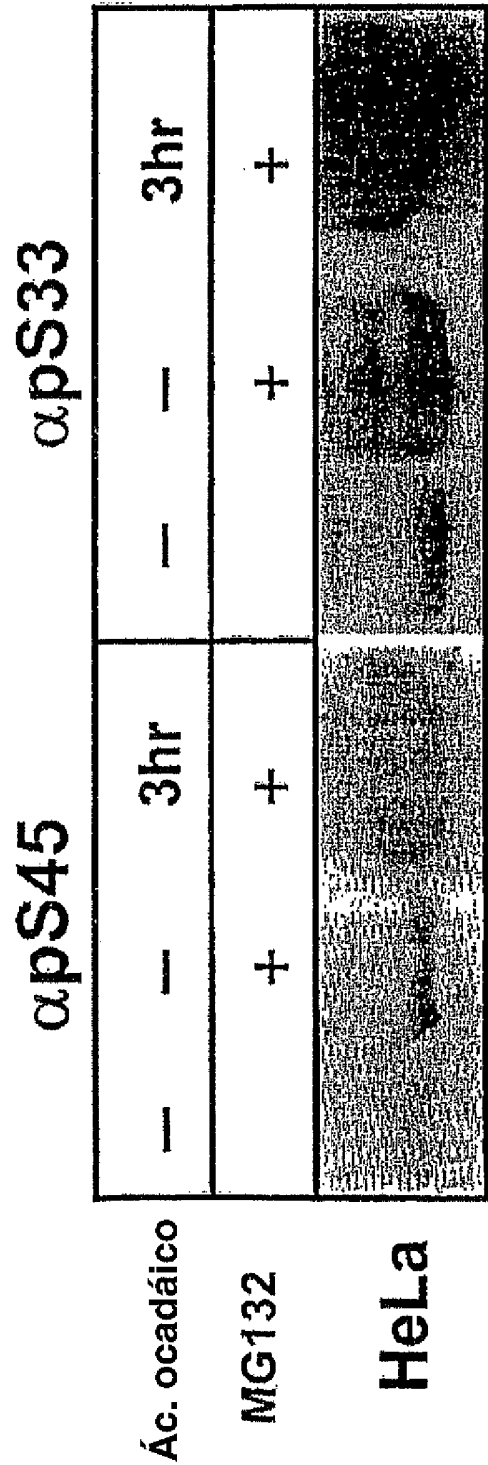


Fig. 7a

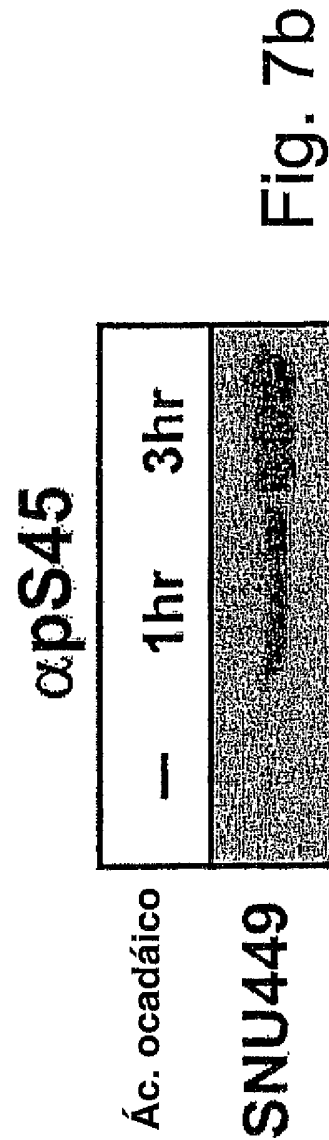


Fig. 7b

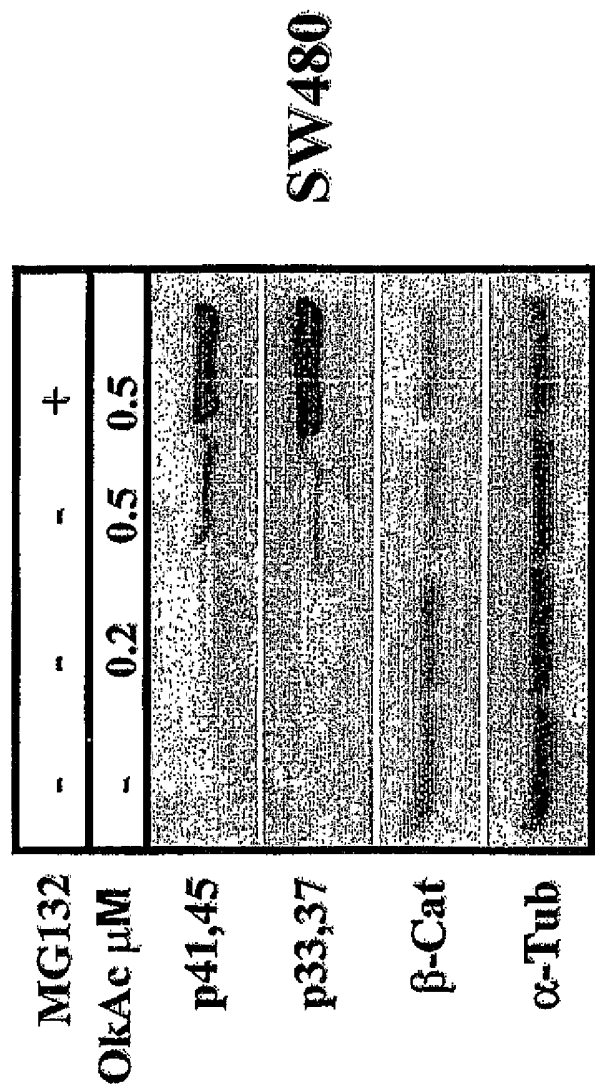


Fig 7c

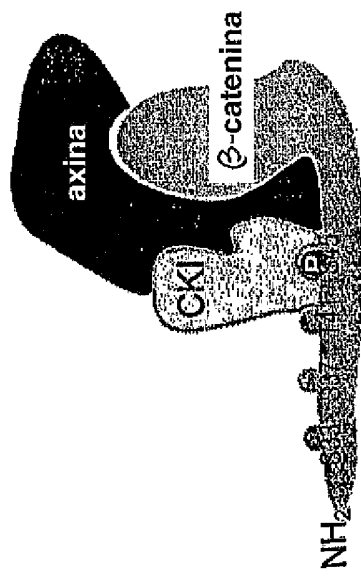


Fig. 8a

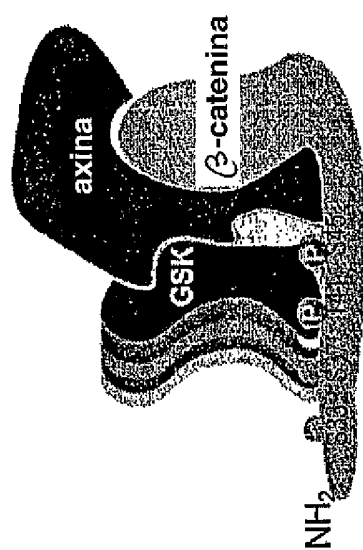


Fig. 8b

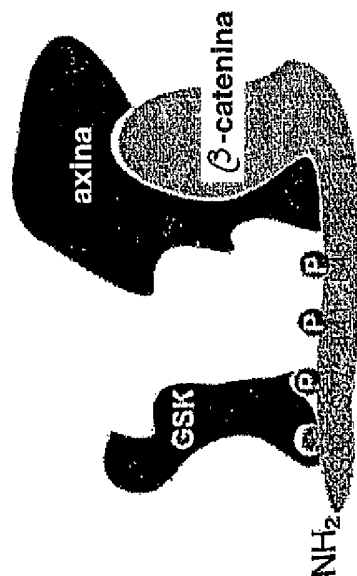


Fig. 8c

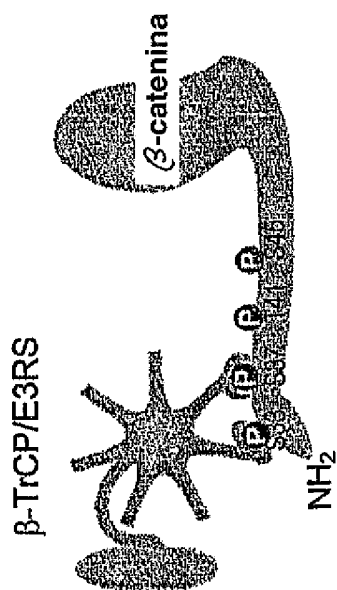


Fig. 8d

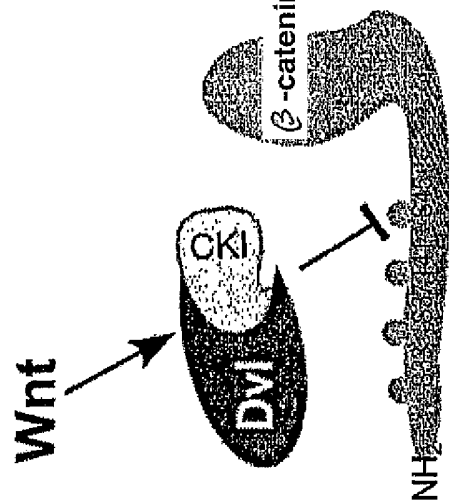


Fig. 8e

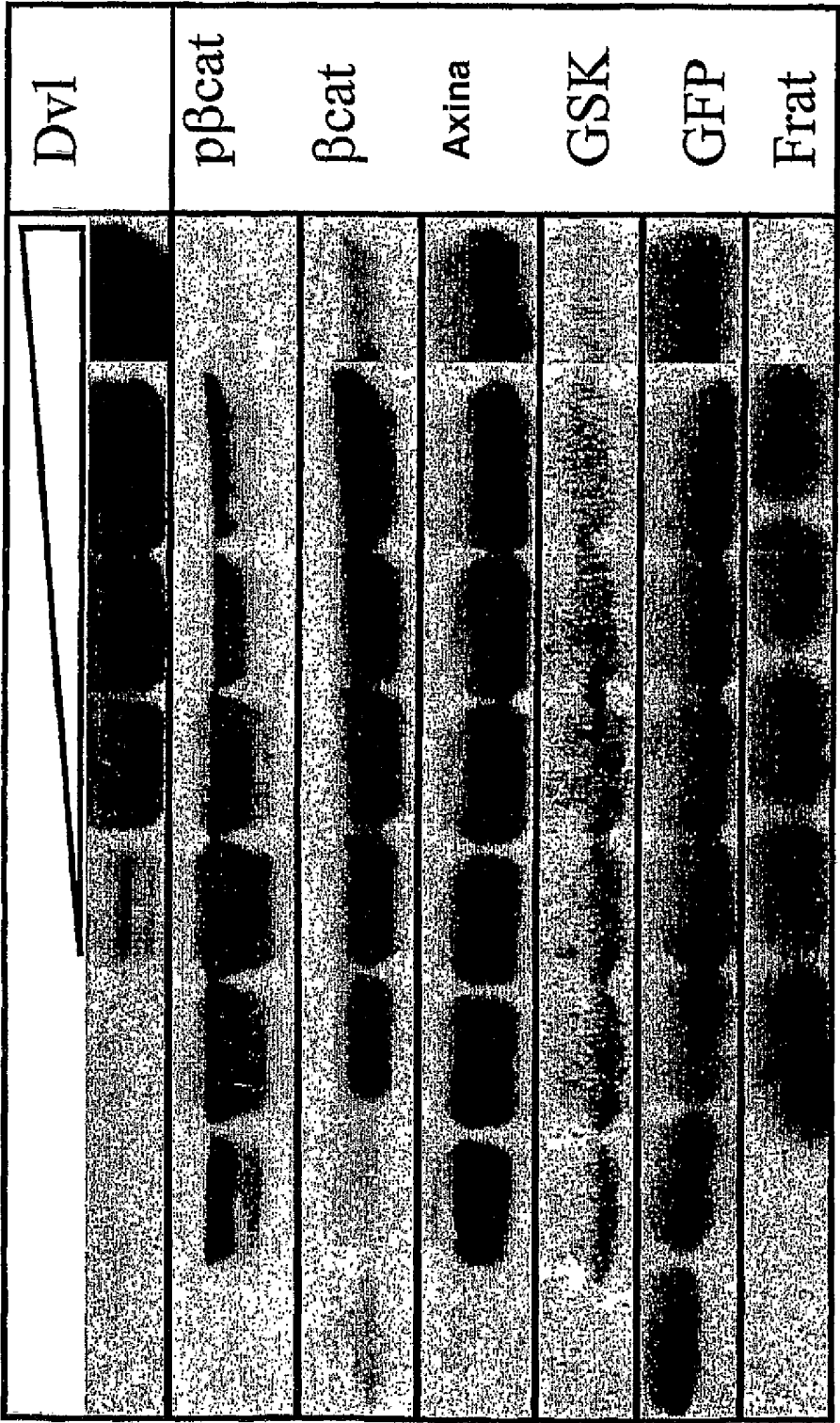


Fig. 9a

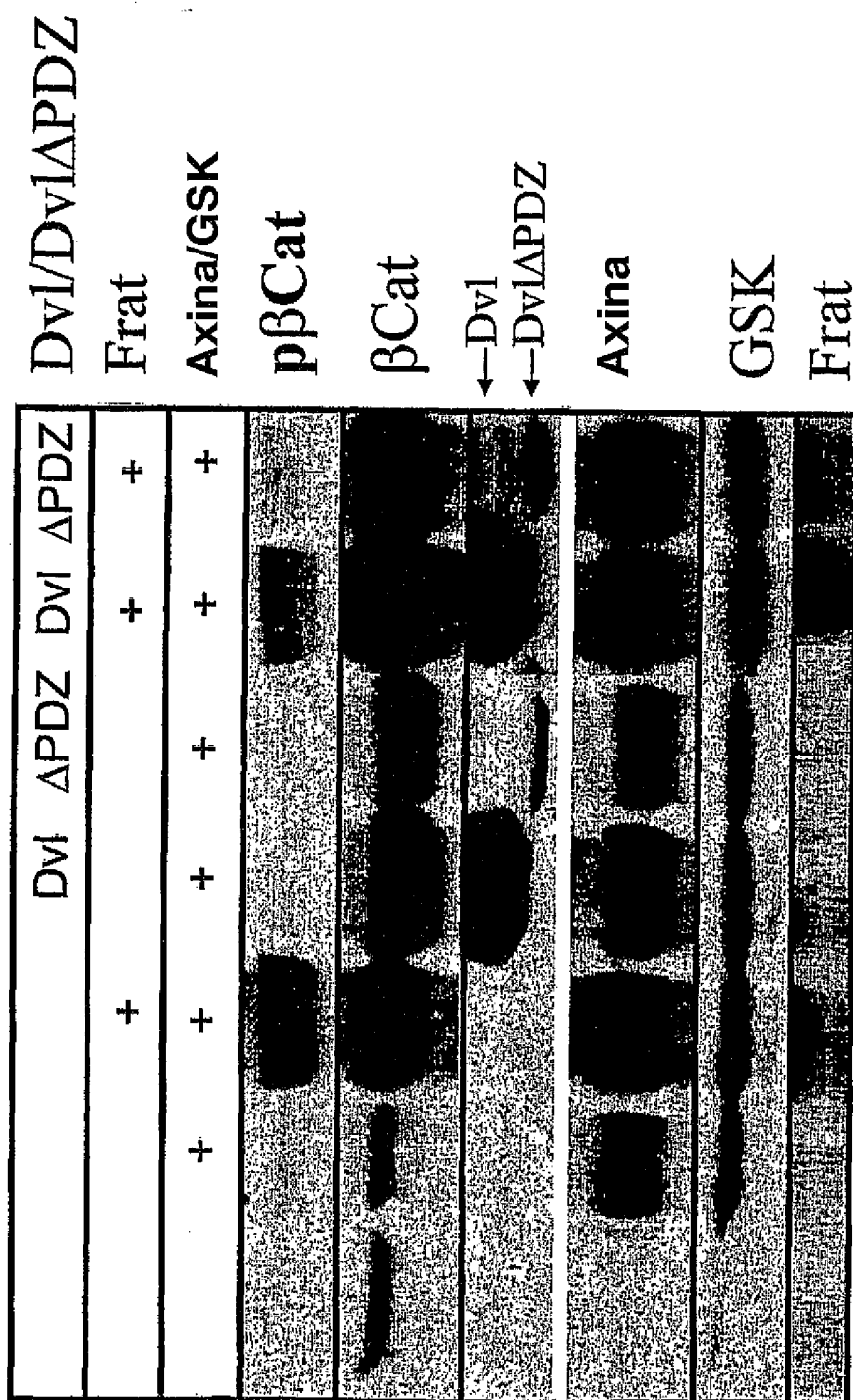


Fig. 9b

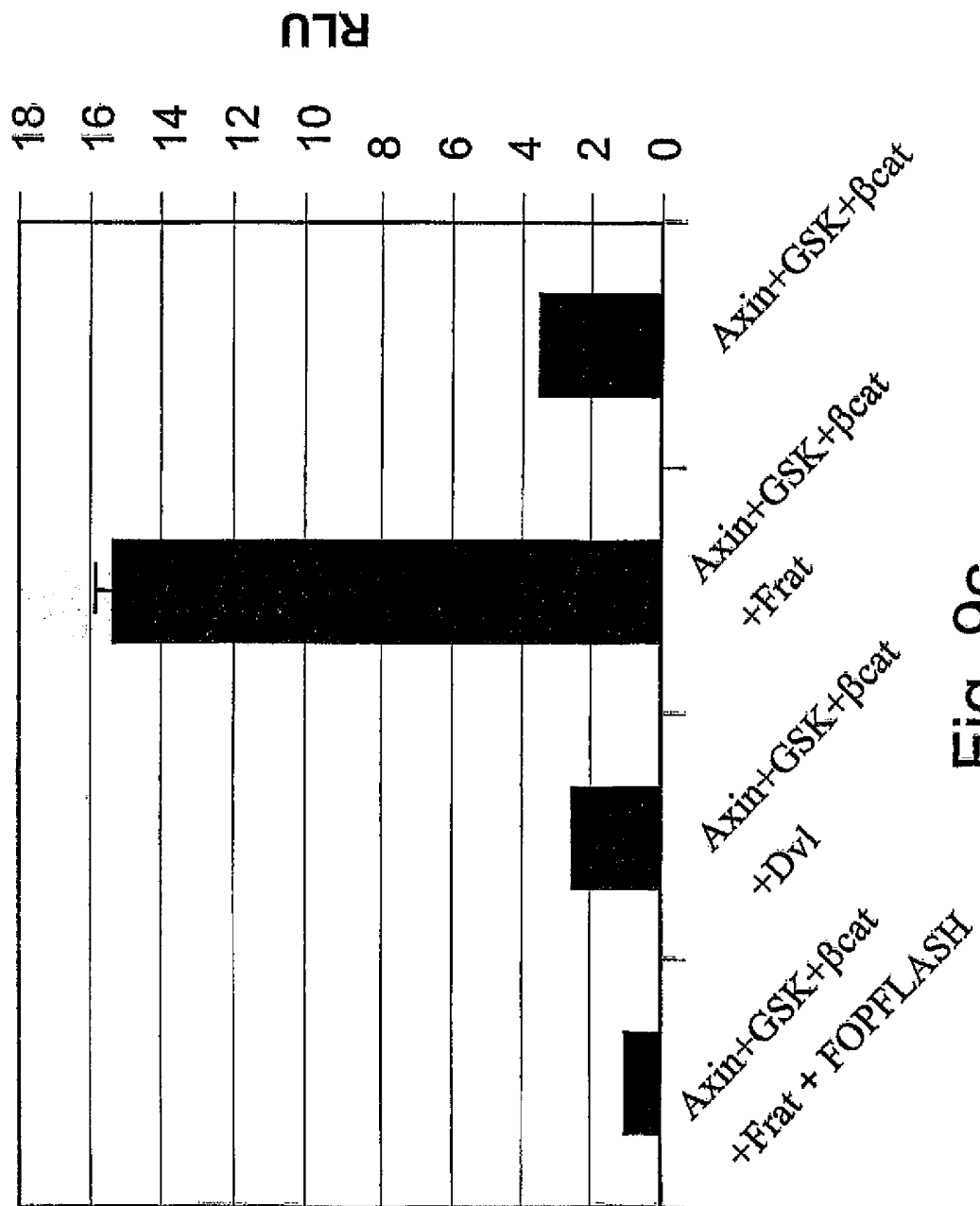


Fig. 9c

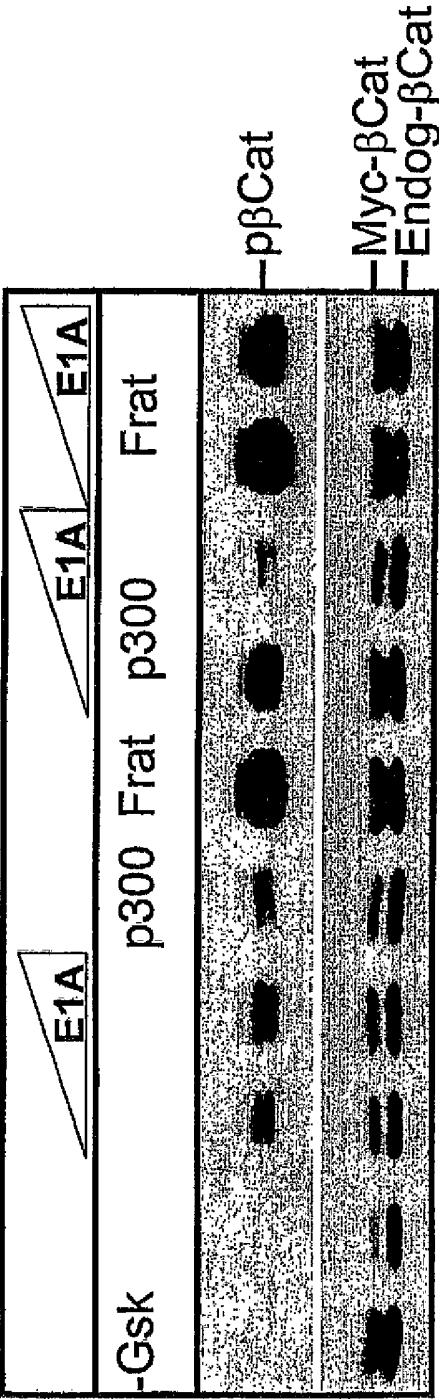


Fig. 9d

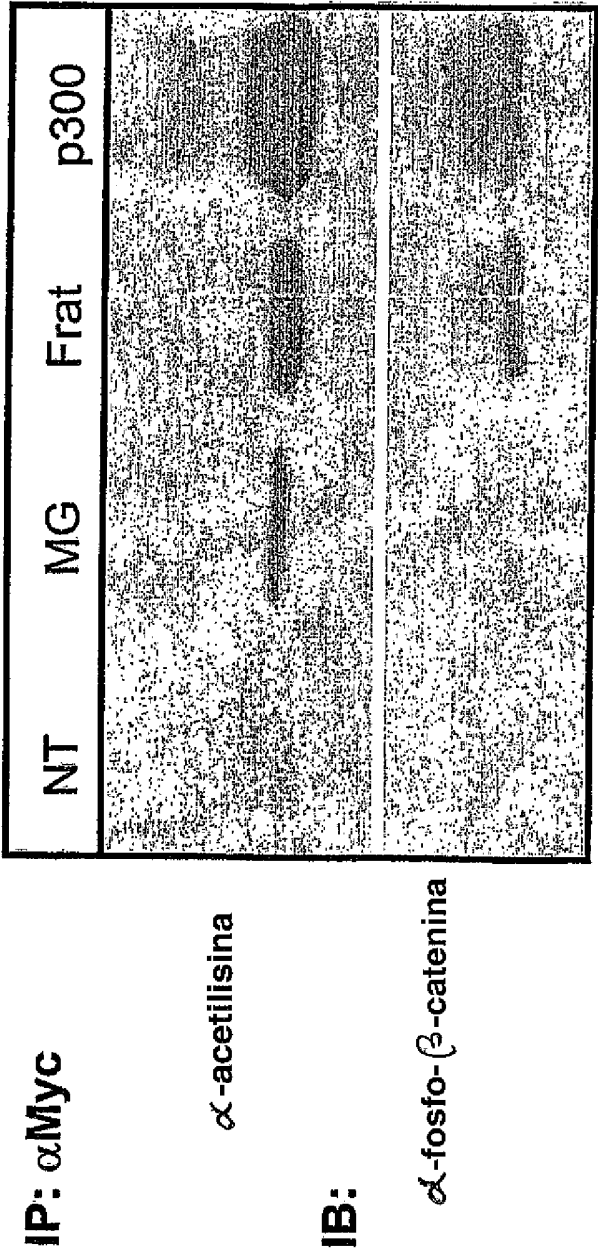


Fig. 9e

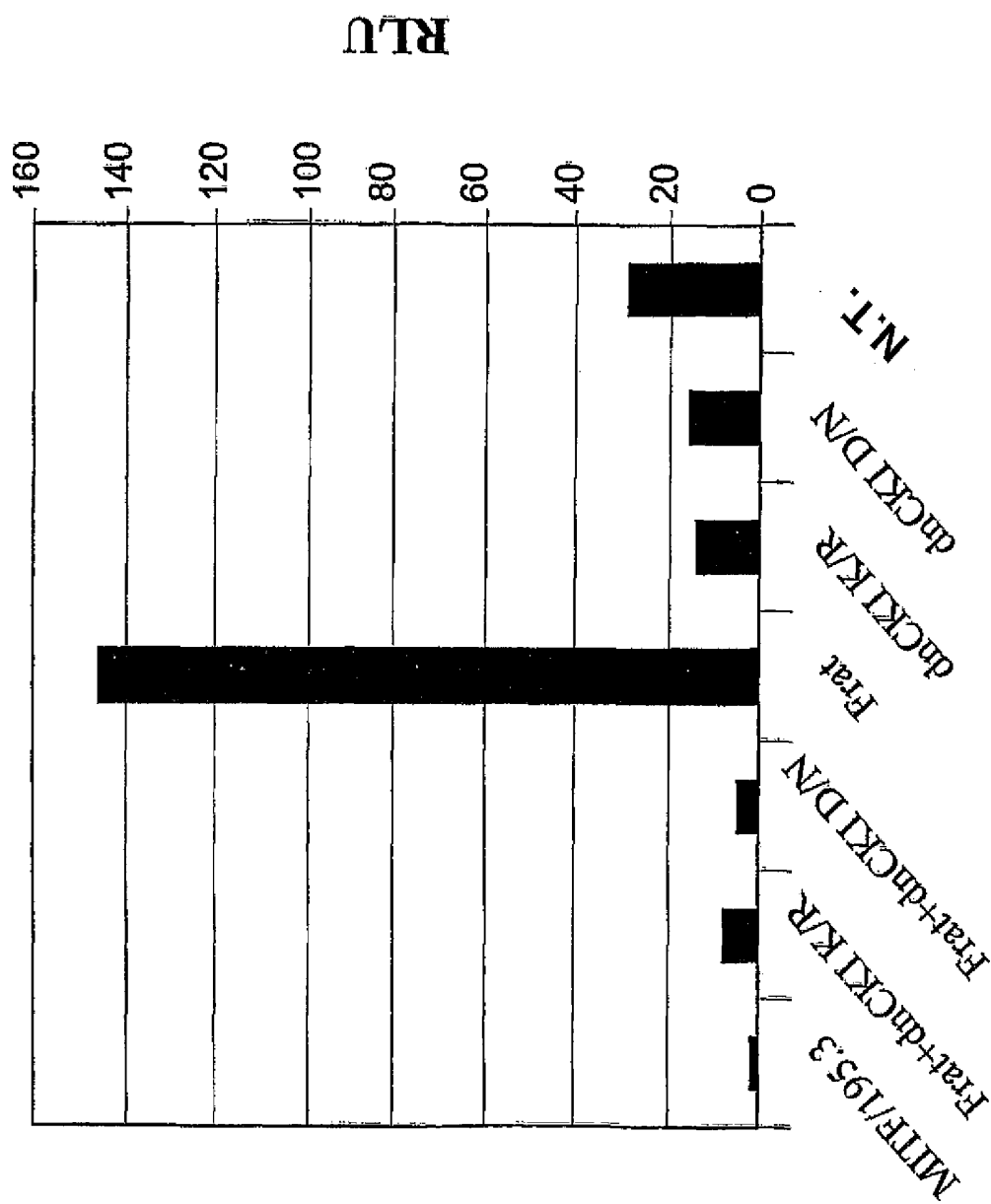


Fig. 10a

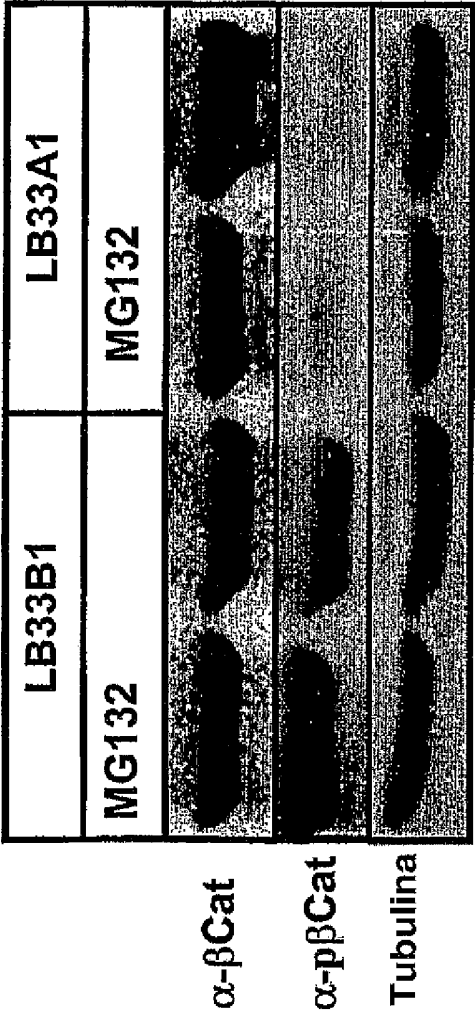


Fig. 10b

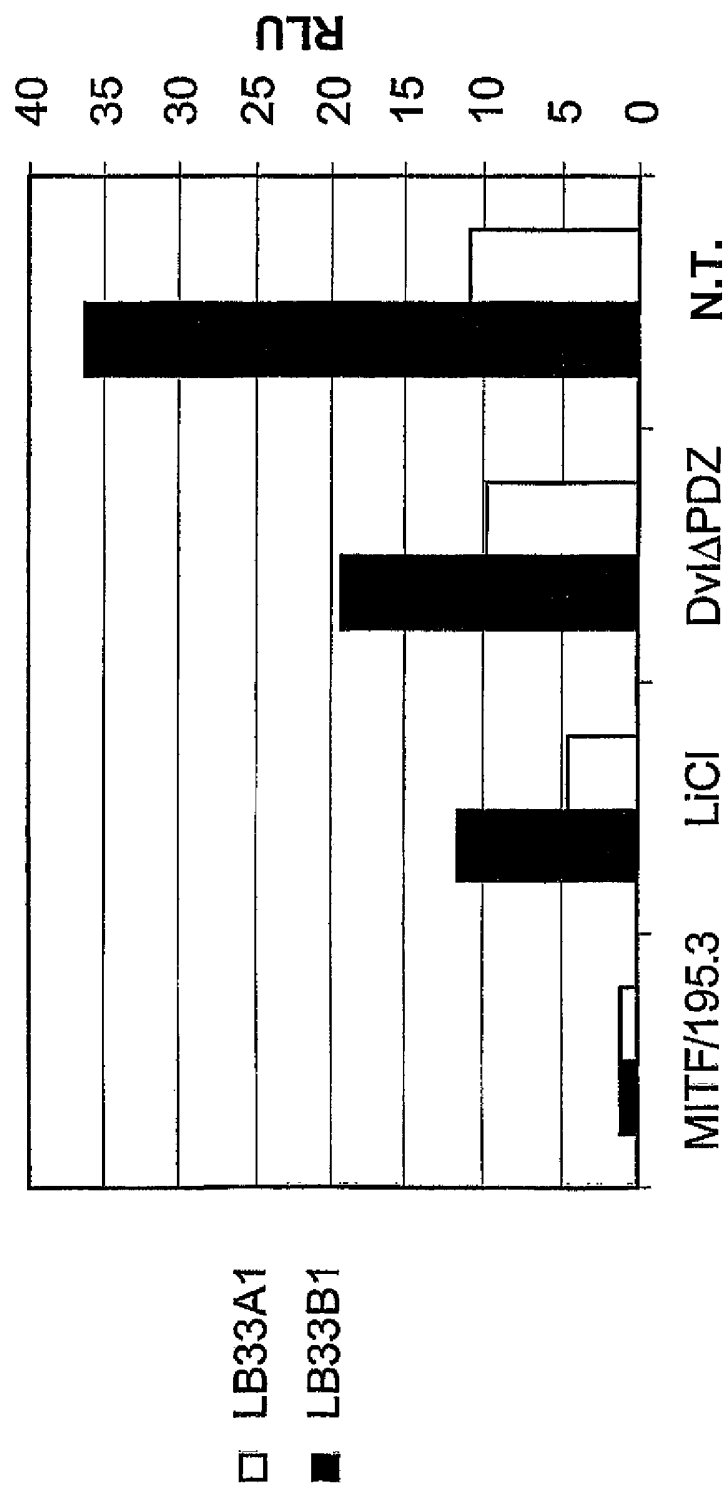


Fig. 10c

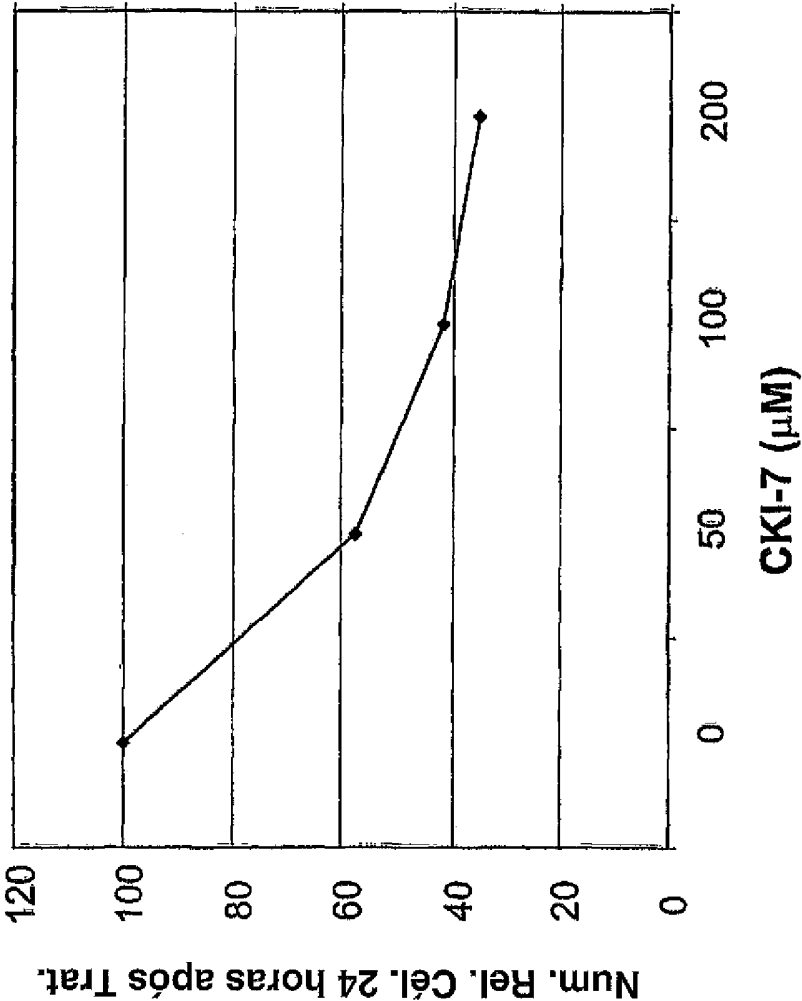


Fig. 10d