

(11) Número de Publicação: **PT 2428252 E**

(51) Classificação Internacional:

A61P 35/00 (2014.01) **C07K 16/28** (2014.01)
A61K 39/395 (2014.01) **A61K 38/17** (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.12.28**

(30) Prioridade(s): **2006.12.28 US 877367 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2012.03.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.11.05**
237/2014

(73) Titular(es):

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG
IM NEUENHEIMER FELD 672 69120
HEIDELBERG DE
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS DE

(72) Inventor(es):

ANA MARTIN-VILLALBA DE
SUSANNE KLEBER DE
BENEDIKT WIESTLER DE
PETER G. KRAMMER DE
CHRISTEL HEROLD-MENDE DE

(74) Mandatário:

NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO
RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE DE BLOCOS DE INVASÃO CD95 DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA IN VIVO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO COM ALTO GRAU DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME ATRAVÉS DA PREVENÇÃO OU DESTRUIÇÃO DA LIGAÇÃO DE CD95 AO SEU LIGANDO, CD95L, IN VIVO, APÓS O QUE A NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE CD95 REDUZ A ATIVIDADE INDESEJÁVEL DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS E INVASÃO NOS TECIDOS CORPORAIS.

RESUMO

**"NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE DE BLOCOS DE INVASÃO CD95
DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA *IN VIVO*"**

A presente invenção refere-se a métodos para tratar um indivíduo com alto grau de glioblastoma multiforme através da prevenção ou destruição da ligação de CD95 ao seu ligando, CD95L, *in vivo*, após o que a neutralização da atividade CD95 reduz a atividade indesejável da migração das células gliais e invasão nos tecidos corporais.

DESCRIÇÃO

"NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE DE BLOCOS DE INVASÃO CD95 DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA *IN VIVO*"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com métodos para tratar um indivíduo com alto grau de glioblastoma multiforme através da prevenção ou destruição da ligação de CD95 ao seu ligando, CD95L, *in vivo*, após o que a neutralização da atividade CD95 reduz dramaticamente a migração das células que invadem o hemisfério contralateral.

ANTECEDENTES

Invasão do tecido circundante do cérebro por células tumorais isoladas representa um dos principais obstáculos a uma terapia eficiente do glioblastoma multiforme (GBM). Os gliomas abrangem a maioria dos tumores com origem no sistema nervoso central (CNS). Em adultos, os tumores mais comuns são as neoplasias de alto grau derivadas de astrócitos ou oligodendrócitos. A Organização Mundial de Saúde classifica estes tumores malignos de acordo com o seu grau de anaplasia no grau II (astrocitoma difuso), grau III (astrocitoma anaplásico) e grau IV (GBM)¹.

Os gliomas contribuem para mais de 50% de todos os tumores cerebrais e são, até ao momento, os tumores cerebrais primários mais comuns em adultos. Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico, a taxa de

sobrevivência é extremamente baixa. Somente 3% permanecem vivos cinco anos após o diagnóstico. A evolução clínica dos gliomas malignos depende da invasão das células tumorais isoladas em tecido normal do cérebro. As células migratórias podem escapar à ablação cirúrgica do tumor e são depois os principais alvos de radioterapia e quimioterapia adjuvante pós-cirúrgica. Os agentes quimioterapêuticos e a irradiação agem principalmente através da indução de apoptose. Esta indução da apoptose envolve a ativação do sistema receptor/ligando de morte CD95 (Apo-1/Fas). No entanto, a maioria das células malignas de glioma são resistentes a apoptose induzida por CD95. Aqui nós mostramos que a ativação de CD95 aumenta a migração/invasão em culturas de glioma humano, primário e a longo prazo, resistente a apoptose. Quer dizer, a ativação de CD95 pode implicar iniciar a atividade de CD95 pelo uso de um anticorpo agonista de CD95 ou CD95L recombinante.

A tendência dos tumores de glioma primários migrarem durante a apoptose aumenta com o grau de malignidade. O CD95 medeia a migração via do passo PI3K/ILK/GSK3-beta;/MMP de um modo independente de caspase. Para além disso tentámos descobrir a molécula ligante a jusante de CD95. Um candidato possível foi Fosfoproteína enriquecida em Diabetes/Fosfoproteína enriquecida em Astrocytos-15-kDalton" (PED/PEA-15). Experiências de quebra excluíram PED/PEA-15 como molécula ligante num passo de sinalização de migração mediada através do Sistema CD95/CD95L. O mais importantemente a radiação-gama também aumentou a migração de células resistentes a morte induzida por CD95. A migração mediada por irradiação pode ser bloqueada pela neutralização de CD95L. Portanto, uma reação de tumor à estimulação de CD95 deve determinar as opções terapêuticas seguintes. Ver Kleber, S., "Gamma irradiation leads to CD95 dependent invasion in apoptosis resistant glioblastoma

cells," Ph.D. Thesis, Deutsches Krebsforschungszentrum, University of Heidelberg, janeiro 3, 2006 (urn:nbn:de:bsz:16-opus-59926, disponível em www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/5992/), que é aqui incorporada como referência na íntegra.

Os principais tipos de gliomas são ependimomas, astrocitomas, e oligodendrogliomas, embora também existam formas celulares mistas de condições de células de glioma, tais como oligoastrocitomas.

Para além disso a uma caracterização celular, os tumores de glioma são também caracterizados de acordo com a patologia e a gravidade da invasão celular, o que é tipicamente reconhecido pelos peritos na matéria como um sistema de classificação por "gradação".

O sistema de classificação mais comumente usado é o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para astrocitomas. o sistema da OMS atribui aos astrocitomas um grau desde I até IV, em que I é o menos agressivo e IV é o mais agressivo. Portanto, o astrocitoma pilocítico é um exemplo de um glioma de Grau I da OMS; o astrocitoma difuso é um exemplo de Grau II da OMS; o astrocitoma anaplásico (maligno) é um exemplo de Grau III da OMS; e o glioblastoma multiforme é um exemplo de Grau IV da OMS. O último é o glioma mais comum em adultos e, infelizmente, tem o pior prognóstico para os doentes atingidos.

Genericamente, os gliomas de "baixo grau" são tipicamente bem-diferenciados, de crescimento mais lento, biologicamente menos agressivos, e pressagiam um melhor prognóstico para o doente; enquanto que os gliomas de "alto grau", são indiferenciados ou anaplásicos, de crescimento

rápido e podendo invadir os tecidos adjacentes, carregam um pior prognóstico. Gliomas de alto grau são tumores altamente vasculares e têm uma tendência para infiltrar tecidos, criar necrose e hipóxia, e destroem a barreira sangue-cérebro onde o tumor está localizado.

Existem também gliomas infratentoriais, que ocorrem principalmente em crianças e em adultos supratentoriais. Os gliomas infratentoriais estão localizados em todas as áreas cerebrais inferiores abaixo da superfície inferior dos lóbulos temporal e occipital, estendendo-se para a coluna cervical superior, e inclui o cerebelo. A região supratentorial está localizada acima do tentório do cerebelo e contém o cérebro anterior.

O grau do tumor é um importante fator de prognóstico: sobrevivência média para os astrocitomas de grau III é 3 a 4 anos e para os astrocitomas de grau IV de 10 a 12 meses. O glioma mais frequente (65%) é o GBM¹. A resistência celular a múltiplos estímulos pró-apoptóticos e à invasão de células tumorais migratórias no tecido normal circundante do cérebro são os principais obstáculos a uma terapia eficaz.

O tratamento atual de gliomas malignos (grau III e IV) envolve cirurgia, seguida por radiação e quimioterapia. Os agentes quimioterapêuticos e a irradiação- γ atuam primariamente induzindo a apoptose. A indução da apoptose envolve frequentemente a ativação do sistema de morte do ligando CD95/CD95 (CD95L; Apo1L/FasL)^{2,3}. A ligação de CD95L trimerizado pelo receptor CD95 conduz ao recrutamento do adaptador FADD de proteína (domínio de morte associada a Fas, MORT1)⁴ e caspase 8 e 10 num complexo de sinalização indutor de morte (DISC)⁵. O FADD contém um domínio de morte

(DD) e um domínio efetor de morte (DED). Através do seu DD, o FADD liga-se ao DD de CD95⁶. O DED recruta a procaspase-8 contendo DED para o DISC⁷. A procaspase-8 no DISC é ativada através da auto-clivagem e compromete a célula a apoptose por ativação de caspases efetoras a jusante⁸.

O sistema CD95/CD95L é usado por células de glioma maligno para aumentar a sua capacidade de invasão. O CD95 induz a invasão celular através da via de PI3K/ILK/GSK3 β e posterior expressão de metaloproteinases. O aumento da expressão CD95L é exibido por células de glioma irradiadas que escapam a ablação cirúrgica. A atividade de CD95 induzida por irradiação aumentou a migração de células de glioma. Num modelo singénico de murino de GBM intracraniano, a expressão de CD95/CD95L foi surpreendentemente regulada mediante interação com o estroma circundante do cérebro.

O grau de expressão de CD95 e CD95L correlaciona-se positivamente com o grau do tumor. Aqui nós mostramos que o acionamento de CD95 causou a apoptose de tumores menos malignos (I-II OMS), enquanto que os tumores de grau IV foram resistentes à apoptose induzida pelo CD95. Nestas células altamente malignas, o CD95 medeia a migração / invasão. A ligação de CD95 pelo CD95L ativa PI3K e ILK, conduzindo assim a inibição da GSK3 β e para a indução de metaloproteinases. A irradiação de células resistentes à apoptose aumentou a expressão de CD95 e CD95L, que por sua vez aumentou a expressão de metaloproteinases e, subsequentemente, a migração / invasão. Num modelo de rato singénico de gliomas intracranianos, CD95 e a expressão de CD95L foi regulada positivamente após interação com o estroma circundante. A neutralização da atividade de CD95

reduziu drasticamente o número de células que invadem o hemisfério contralateral.

Kleber, S. "Gamma-Bestrahlung föhrt zur CD95-abhängiger Invasivität in apoptoseresistenten Glioblastomzellen., 2006, Dissertation (Heidelberg) ensina que o anticorpo anti-CD95L inibe a migração in vitro de células de glioblastoma induzidas por uma proteína de fusão proteína de fusão zíper de leucina-CD95L e resume as terapias de gliomas atuais.

RESUMO

A presente invenção fornece um método para tratar um indivíduo com alto grau de glioma, compreendendo administrar um agente que neutraliza a atividade de CD95 num indivíduo com alto grau de glioma.

Numa forma de realização, agente que neutraliza a atividade de CD95 é um composto que impede a ligação de CD95 ao CD95L ou interrompe um complexo de CD95/CD95L.

Numa forma de realização o composto liga-se a CD95 ou liga-se a CD95L ou liga-se ao complexo CD95/CD95L.

Em outra forma de realização, o composto é um anticorpo que se liga a CD95. Numa outra forma de realização, o composto é um anticorpo que se liga a CD95L. Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser monoclonais, policlonais ou quiméricos. No entanto, também os anticorpos de cadeia simples ou fragmentos de anticorpo funcionais podem ser usados. Numa forma de realização, o anticorpo que se liga a CD95 é Nok1. Assim, a presente invenção contempla qualquer agente de neutralização ou "inibidor" de CD95 ou CD95L ou atividade CD95R (receptor CD95).

Para a produção de anticorpos de acordo com a invenção, vários hospedeiros incluindo cabras, coelhos, ratos, ratinhos, seres humanos, e outros, podem ser imunizados por injeção com a proteína ou qualquer seu fragmento ou oligopéptido que tem propriedades imunogénicas. Dependendo da espécie hospedeira, vários adjuvantes podem ser utilizados para aumentar a resposta imunológica. É preferido que os péptidos, fragmentos ou oligopéptidos usados para induzir anticorpos para a proteína têm uma sequência de aminoácidos consistindo de pelo menos cinco aminoácidos, e mais preferencialmente pelo menos 10 aminoácidos. Os anticorpos monoclonais para as proteínas podem ser preparados utilizando qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas de anticorpo por linhas de células contínuas em cultura. Estes incluem, mas não estão limitadas a, a técnica de hibridoma, a técnica de hibridoma de células B humanas. Além disso, as técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos", emenda de genes de anticorpo de ratinho para genes de anticorpos humanos para obter uma molécula com especificidade antigénica e atividade biológica apropriadas podem ser usadas. Os anticorpos podem ser utilizados com ou sem modificação, e podem ser marcados unindo-os, covalentemente ou não covalentemente, com, por exemplo, uma molécula repórter.

Vários imunoensaios podem ser usados para o rastreio para identificar anticorpos com a especificidade desejada. Numerosos protocolos para ensaios de ligação competitivos e imunoradométricos utilizando quer anticorpos policlonais ou monoclonais com especificidades estabelecidas são bem conhecidos na técnica. Tais imunoensaios envolvem tipicamente a medição da formação de complexos entre a proteína, i.e. CD95 e o seu anticorpo específico. Um imunoensaio de base monoclonal, de dois sítios, utilizando

anticorpos monoclonais reativos para dois epitopos de proteínas de não interferência são preferidos, mas pode também ser empregue um ensaio de ligação competitiva.

Um inibidor pode ser um inibidor de ligando de CD95 (ligando Fas; ligando APO1). Por exemplo, os inibidores de CD95-ligando podem ser selecionados a partir de (a) um anticorpo ligando anti-CD95 inibitório ou um seu fragmento; (b) uma molécula receptora de CD95 solúvel ou uma porção de ligação ao ligando CD95 destes; e (c) um inibidor ligando Fas selecionado a partir de FLINT, DcR3 ou seus fragmentos.

Também contemplados são anticorpos anti-CD95L inibitórios e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos e as moléculas CD95R solúveis ou porções de ligação a CD95L das mesmas. Exemplos de anticorpos anti-CD95L inibidores adequados são descritos em EP-A-0 842 948, WO 96/29350, e WO 95/13293, bem como anticorpos quiméricos ou humanizados obtidos a partir destes, cf. por exemplo WO 98/10070. Ainda preferidas são moléculas receptoras de CD95 solúveis, por exemplo, uma molécula receptora de CD95 solúvel sem domínio de transmembrana, tal como descrito na EP-A-0 595 659 e EP-A-0 965 637 ou péptidos CD95R, tal como descrito na WO 99/65935.

Numa forma de realização, um inibidor de CD95L, que compreende um domínio extracelular da molécula de CD95R, tal como os aminoácidos 1-172 (MLG...SRS) da sequência de CD95 madura de acordo com a Patente U.S. No. 5,891,434, o qual pode ser fundido a um domínio de polipéptido heterólogo, em particular de uma molécula de imunoglobulina Fc incluindo a região de dobradiça, por exemplo a partir da molécula de IgG1 humana. Uma proteína de fusão compreende um domínio extracelular de CD95 e um domínio Fc humano está

descrito em WO 95/27735. Portanto, de acordo com uma forma de realização preferida, o agente que se liga ao CD95L é uma proteína de fusão compreendendo um domínio extracelular de CD95 e um domínio de Fc humana. De acordo com uma forma de realização especialmente preferida, o agente que se liga ao CD95L é APG101 (CD95-FC, SEQ ID NO: 1). APG101 compreende os domínios CD95R-ECD (aminoácidos 17-172; domínio extracelular de ECD) e IgG1-Fc (aminoácidos 173-400).

O APG101 e seus derivados são divulgados em WO95/27735 e WO2004/085478.

O inibidor de ligando Fas FLINT ou DcR3 ou um fragmento, por exemplo, um seu fragmento solúvel, por exemplo, o domínio extracelular, opcionalmente, fundidos com um polipeptídeo heterólogo, em particular de uma molécula de imunoglobulina Fc é descrito em WO 99/14330 ou WO 99/50413. FLINT e DcR3 são proteínas que são capazes de se ligar ao ligando de CD95.

Numa forma de realização adicional da presente invenção, o inibidor é um inibidor de CD95R o qual pode ser selecionado de (a) um inibidor do anticorpo receptor de anti-CD95 ou um seu fragmento, e (b) um fragmento de ligando CD95 inibidor. Um fragmento de um anticorpo receptor anti-CD95 inibidor de acordo com a invenção apresenta em preferência o mesmo local de ligação ao epitopo que o que faz o anticorpo correspondente. Numa outra forma de realização da invenção um fragmento de um fragmento de um anticorpo receptor anti-CD95 inibidor tem substancialmente a mesma atividade de inibição de CD95R que o anticorpo correspondente. Um fragmento de ligando CD95 inibidor apresenta de preferência substancialmente a mesma atividade de inibição que a que

apresenta o fragmento de ligando correspondente inibidor de CD95.

Exemplos de anticorpos anti-CD95R inibidores e fragmentos de CD95L inibidores adequados são descritos na EP-AO 842 948 e EP-A-0 862 919.

Também descrito é um inibidor o qual é uma molécula efetora de ácido nucleico. A molécula efetora de ácido nucleico pode ser ADN, ARN, PNA ou um híbrido ADN-ARN. Podem ser vetores de expressão de cadeia simples ou de cadeia dupla. Vetores de expressão derivados de retrovírus, adenovírus, herpes ou de vacinas de vírus ou de diversos plasmídeos bacterianos podem ser usados para a aplicação de sequências de nucleótidos aos órgãos alvo, tecidos ou população de células. Essas construções podem ser usadas para introduzir sequências sentido ou antisentido não traduzíveis numa célula. Mesmo na ausência de integração no ADN, esses vetores podem continuar a transcrever moléculas de ARN até serem desativadas por nucleases endógenas. A expressão transiente pode durar um mês ou mais, com um vetor não-replicante e ainda mais se os elementos de replicação apropriadas fazerem parte do sistema de vetor.

A molécula de ácido nucleico efetora pode ser especialmente selecionada a partir de moléculas antisentido, moléculas de ARNi e ribozimas, as quais são capazes de inibir a expressão do gene CD95R e/ou CD95L. Ver, por exemplo, a U.S. 20060234968. Também divulgado é que a outra forma de realização, o glioma de alto grau é um glioma de Grau III da OMS. De acordo com a invenção o glioma de grau elevado é um glioma de Grau IV da OMS.

Também divulgado é um o agente de neutralização da atividade de CD95 previne uma interação entre CD95 e a proteína p85 de PI3K.

De acordo com a presente invenção da atividade de CD95 pode ser determinada pela pessoa perita na técnica por qualquer tipo de ensaio adequado, tal como descrito no Exemplo 25 ou Exemplo 26.

A presente divulgação também de relaciona com uma composição farmacêutica, que compreende pelo menos um agente que neutraliza a atividade de CD95 a um indivíduo com gliomas de alto grau. Numa forma de realização o agente é Nok1 ou CD95-FC (APG101). CD95-FC liga a CD95L e desse modo previne a sua ligação a CD95.

Numa outra forma de realização da divulgação, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agente que liga CD95 e pelo menos um outro agente que liga a CD95L. A presente invenção fornece ainda um método para tratar um doente com glioma através da administração de uma das composições farmacêuticas aqui contempladas. Numa forma de realização, o glioma é um glioma classificado de Grau III e Grau IV da OMS, ou um glioma de "alto grau".

Numa outra forma de realização preferida da divulgação a composição farmacêutica pode compreender adicionalmente agentes ativos para o tratamento de cancro e em particular para o tratamento de glioma de alto grau.

As composições farmacêuticas podem ser administradas isoladamente ou em combinação com pelo menos um outro agente, tal como o composto de estabilização, que pode ser administrado em qualquer transportador farmacêutico estéril biocompatível, incluindo soro fisiológico, soro fisiológico tamponado, dextrose e água. As composições podem ser administradas a um doente isoladamente ou em combinação com outros agentes, fármacos ou hormonas. As composições farmacêuticas usadas nesta invenção poderão ser

administradas por qualquer dos vários meios incluindo via oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, por via subcutânea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual ou retal.

Além dos componentes ativos, estas composições farmacêuticas podem conter transportadores adequados farmaceuticamente aceitáveis compreendendo excipientes e auxiliares, que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações, que podem ser usados farmaceuticamente. Mais pormenores sobre as técnicas de formulação e administração podem ser encontrados na última edição de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Composições farmacêuticas adequadas para uso na invenção incluem composições em que os componentes ativos estão contidos numa quantidade eficaz para se atingir o fim proposto. A determinação de uma dose eficaz está dentro das capacidades dos especialistas na técnica. Para muitos compostos, a dose terapêutica eficaz pode ser estimada inicialmente quer em ensaios de cultura de células, por exemplo, linhas de células de pré-adipócitos ou em modelos animais, geralmente ratinhos, coelhos, cães ou porcos. O modelo animal também pode ser usado para determinar o intervalo de concentração e a via de administração apropriados. Essa informação pode então ser utilizada para determinar as doses úteis e vias de administração em humanos. Uma dose terapeuticamente eficaz refere-se à quantidade de ingrediente ativo, por exemplo, um ácido nucleico ou uma proteína da invenção ou um anticorpo, o qual é suficiente para o tratamento de uma condição específica. A eficácia terapêutica e a toxicidade podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em

culturas de células ou animais de experiência, por exemplo, ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população) e LD50 (a dose letal para 50% da população). A razão entre os efeitos tóxicos e terapêuticos das doses é o índice terapêutico, e pode ser expressa como a razão, LD50/ED50. As composições farmacêuticas que exibem índices terapêuticos grandes, são preferidas. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e os estudos em animais são usados na formulação de uma gama de dosagem para uso humano. A dosagem contida em tais composições é, de preferência, dentro de uma gama de concentrações em circulação que inclui a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem varia dentro desta gama dependendo da dosagem de aplicação, da sensibilidade do doente, e da via de administração. A dosagem exata será determinada pelo médico, à luz de fatores relacionados com o sujeito que necessita do tratamento. A dosagem e a administração são ajustadas para proporcionar níveis suficientes do grupo ativo ou para manter o efeito desejado. Fatores que podem ser levados em conta incluem a gravidade do estado de doença, a saúde geral do indivíduo, idade, peso e sexo do indivíduo, dieta, tempo e frequência de administração, combinação do medicamento(s), sensibilidade de reação e tolerância/resposta à terapia. As composições farmacêuticas de ação prolongada podem ser administradas a cada 3 a 4 dias, a cada semana ou uma vez a cada duas semanas, dependendo da meia vida e da taxa de eliminação da formulação particular. As quantidades de dosagem normais podem variar desde 0,1 até 100,000 microgramas, até uma dose total de cerca de 1 g, dependendo da via de administração. A orientação quanto a dosagens particulares e métodos de administração é fornecida na literatura e geralmente disponível aos praticantes da técnica. Os peritos na técnica empregam formulações diferentes para nucleótidos e para proteínas ou para os seus inibidores. De

modo semelhante, a administração de polinucleótidos ou polipeptídios será específica para particulares células, condições, localizações, etc.

Um outro aspecto a divulgação relaciona-se com um método de um método de rastreio de um agente, o qual modula/afeta, preferencialmente neutraliza a atividade de CD95, que compreende os passos de

- (a) incubação de uma mistura que compreende
 - (i) CD95 ou um seu fragmento funcional
 - (ii) um agente candidatosob condições em que CD95 ou um seu fragmento funcional, possui uma atividade de referência;
- (b) detetar a atividade de CD95 ou um seu fragmento funcional, para determinar a atividade na presença do agente;
- (c) determinar a diferença entre a atividade na presença do agente e a atividade de referência.

De acordo com uma forma de realização preferida de um tal ensaio, um agente a ser testado para romper a interação entre CD95 e PI3K, de preferência entre CD95 e a subunidade p85 de PI3K.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Sensibilidade à morte induzida por CD95 e expressão de CD95.

- (a) As linhas de células de glioblastoma A172, T98G e LN18 foram incubadas com as doses indicadas de LZ-CD95L (ng/mL), estaurosporina (1 μ M), ou

deixadas sem tratamento (Co). Após 24 h e 48 h a fragmentação do ADN foi analisada por FACS.

(b) A análise de FACS de expressão de CD95 na superfície A172, T98G e LN18.

(c) As culturas esferóides foram incorporadas numa matriz de colagénio e tratadas com LZ-CD95L (5ng/mL). A invasão de células individuais na matriz foi observada com um microscópio de lapso de tempo superior a 24 horas. A distância das células invasoras ($n = 10$ por esferóide; 3 esferóides por tratamento) à beira do esferóide foi desenhada na média dos gráficos \pm D.P. * $P<0,05$

(d) Imagens de contraste de fase representativas de esferóides T98G e LN18 a 0 h e 24 h após tratamento. Os resultados são representativos de três experiências independentes

Figura 2: Células resistentes à morte induzida por CD95 regulada para cima MMP-2 e MMP-9

(a) As células T98G e LN18 foram tratadas com α -Apo-1 (1 μ g/mL) durante os tempos indicados. A expressão de MMP-2 e MMP9 foi medida por PCR quantitativo de tempo real. Os dados são os resultados de cinco experiências independentes, como média \pm D.P., * $P<0,05$, ** $P<0,01$.

Figura 3: A migração induzida por CD95 é mediada através da ativação de ILK / AKT e a inibição da GSK3 [beta]

(a) A GSK3 β foi fosforilada e desse modo inibida nas células T98G e LN 18 por tratamento com α -Apo-1 (1 μ g/ mL).

(b) As células T98G foram infetadas com um vetor de lentivírus vazio (Co) ou com um mutante GSK3 β

constitutivamente ativo (GSK S9A). As células GSK S9A infetadas com T98G migraram significativamente menos que os seus vetores homólogos vazios mediante o tratamento com α -Apo-1 (2 μ g/mL) ou LZ-CD95L (CD95L, 5ng/mL) às 36 h. Um anticorpo neutralizante para CD95L (Nok1 10 μ g) bloqueou a migração induzida por CD95L do vetor e as células infetadas GSK S9A, (c) as células T98G infetadas GSK S9A e os respetivos controlos foram estimuladas com as doses indicadas de LZ-CD95L (ng/mL) durante 48 h e a fragmentação de ADN foi analisada por FACS. (d) Curvas de crescimento de T98G Co e GSK S9A são mostrados. (e) O inibidor de ILK (KP-SD1, 10 μ M) bloqueou α -Apo-1-(2 μ g/mL) e a migração das células T98G induzidas por LZ-CD95L (5ng/mL). (f) O inibidor PI3K (LY 290059, 25 μ M) bloqueou a ativação induzida por α -Apo-1 de AKT e a inibição de GSK3 β em células T98G. (g) β -catenina ativa (verde) foi translocada para o núcleo após estimulação com α -Apo-1 (1 μ g/mL), fosfo-GSK3 β (vermelho) não se alterou após a estimulação de CD95. A DAPI (azul) foi usada para visualizar os núcleos em células T98G. (h) A clivagem de Caspase-8 em T98G, LN18 e Jurkat 16 (J16) foi detetada após estimulação de CD95 por Western Blotting, (i) O inibidor de ERK (PD 98059, 25 μ M) não interferiu com a migração induzida por CD95. Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P<0,05$, ** $P<0,01$, e são representativos de duas experiências independentes P: fosforilação, T: total.

Figura 4: Expressão do sistema CD95/CD95L em glioblastomas primários

A análise FACS da expressão da superfície de CD95 em astrocitoma, oligodendrogioma primários e linhas de células de glioblastoma com passagens baixas (≤ 4). Para a

fragmentação de ADN as células foram tratadas com as doses indicadas de LZ-CD95L (CD95L) durante 24 h e 48 h, e analisadas por FACS.

Figura 5: Função do sistema CD95/CD95L em glioblastomas primários resistentes à apoptose

(a) A análise de FACS de expressão de superfície de CD95 em NCH primário (89, 125 e 270), linhas de células de glioblastoma altamente repicadas (≥ 50). Para a fragmentação de ADN as células foram tratadas com doses indicadas de LZ-CD95L (ng/mL) durante 24 h e 48 h, e analisadas por FACS. Os resultados são representados como média \pm D.P. e são representativos de três experiências independentes, (b) As células NCH 89, 125 e 270 mostraram uma regulação positiva dos níveis de mRNA MMP-2 e MMP9 40 h após de tratamento α -Apo-1 (1 μ g/mL), como detetado por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados são representados como média \pm D.P., * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ e são representativos de três experiências independentes. (c) O ensaio de migração para células NCH 89, 125 e 270 tratadas com α -Apo-1 (0,1 μ g/mL + Proteína A). Os resultados são expressos como média \pm D.P. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e são representativos de duas experiências independentes.

Figura 6: Migração induzida por irradiação- γ em células de glioblastoma T98G e primárias

(a + b) T98G as células foram de γ -irradiadas nas doses indicadas e que os níveis de ARNm de CD95 e CD95L (a) e MMP-2 e -9 (b) foram determinados por PCR quantitativo em tempo real, após 40 h. Os resultados são representados como a média \pm D.P., * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e são representativos

de três experiências independentes, (c + d) Indução de migração em T98G (c) e células NCH primárias (NCH 125, 270 e 89) (d) depois de irradiação- γ . Um anticorpo neutralizante para CD95L (Nok1, 10 μ g) bloqueou a migração induzida por irradiação- γ . Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P<0,05$ e representativos de duas experiências independentes, (e) pontuação CD95L de 9 gliomas recorrentes diferentes após radioterapia. Três áreas por tumor foram analisadas e as células positivas para CD95L foram contadas e as pontuações atribuídas de acordo com o número de células positivas. Os tumores recorrentes analisados foram NCH 907, 202, 910, 860, 655, 408, 30, 388 e 715. (f) As colorações foram realizada em secções de tecido de tumor recorrentes consecutivas de CD95L, CD95 e MMP9, bem como a coloração dupla de GFAP (verde) e CD95L (vermelho).

Figura 7: CD95 e CD95L são reguladas para cima em células de glioma de murino *in vivo* e induzem a migração

(a) Coloração imunohistoquímica para CD95L de GBM primário. (b-c) A expressão de superfície CD95 e CD95L na linha de células de glioma de murino SMA-560 foi determinada em condições normais de cultura de células, após a formação de esferóides ou a seguir à implantação intracraniana. Variações de CD95 (b) e CD95L (c) (GeoMean de BD CellQuest Pro), sob as condições acima mencionadas foram normalizadas para níveis de expressão sob condições de cultura de células. Os resultados representam três experiências independentes e são expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$. (d) Culturas esferóides foram incorporadas numa matriz de colagénio e os anticorpos foram tratados com anticorpos para CD95 (Jo2), um anticorpo neutralizante para CD95L (MFL3) ou o anticorpo de controlo de isotipo adequado nas

concentrações indicadas. A migração das células foi monitorizada durante 48 h e a distância das células à beira do esferóide é descrita ($n = 10$ células, 3 esferóides por tratamento). (e) Montagem experimental. A migração de explantes tumorais em colagénio após tratamento com isotipo MFL3 ou o controlo adequado é representado como descrito acima ($n = 10$, 3 esferóides por tratamento). (f) Os números de células SMA-560 no hemisfério contralateral de ratinhos Vm/Dk tratados quer com MFL3 ou o anticorpo de controlo de isotipo foram contados e normalizados para a superfície do tumor. Os resultados mostrados são representativos de duas experiências independentes e expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

Figura 8: Inibição da GSK3 β é independente de caspase

(a) A GSK3 β é fosforilada e desse modo inibida em T98G e células LN18 após tratamento com LZ-CD95L (5ng/mL). (b) A pré-incubação com o inibidor de caspase zVAD-fmk (40 μ M) não interfere com a inibição induzida por α -Apo-1 (2 μ g/mL) de GSK3 β . (c) A quebra de PED com siARN bloqueou a ativação de ERK, mas não alterou a inibição de GSK3 β induzida por α -Apo-1. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Figura 9: Expressão e função do sistema de CD95/CD95L nos glioblastomas primários

(a-b) análise de FACS de expressão de superfície de CD95 em linhas de células de glioblastoma primário (NCH 82, 37, 125, 149, 89, 156, 270 e 199), com passagens elevadas ($> = 50$). Para fragmentação as células de ADN foram tratadas com as doses indicadas de LZ-CD95L (ng/mL) durante 24 h e 48 h

e analisadas por FACS. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. e são representativos de duas experiências independentes, (c) os níveis de ARNm de CD95 e CD95L em tecido de tumor humano, são determinados por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Figura 10: Influência de irradiação na migração de glioblastoma primário

Análise FACS de expressão de superfície de CD95 em linhas de células de glioblastoma primário (NCH 342, 354, 357, 378, 417, 419 e 2421). A indução de migração dessas células primárias NCH mediante irradiação- γ , que poderia ser bloqueada por um anticorpo neutralizante para CD95L (Nok1, 10 μ g). Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ e representativos de duas experiências independentes.

Figura 11: CD95 aciona a invasão de células resistentes a apoptose via MMPs

(A) As linhas de células de glioblastoma T98G e LN18 foram incubadas com as concentrações indicadas de CD95L-T4, Estaurosporina (St, 1 μ M) ou deixadas sem tratamento (Co). Após 24h a fragmentação do ADN foi analisada por FACS (paineel superior). Análise FACS de expressão de superfície de CD95 em T98G e LN18 (paineel inferior). (B) As células T98G e LN18 foram tratadas com CD95L-T4 ou deixadas sem tratamento, para detetar a migração de células individuais através de uma câmara de Boyden, com 8 μ m de tamanho de poro. (C) As células T98G foram tratadas com CD95L-T4 durante 24 h ou deixadas sem tratamento. Posteriormente, a atividade de MMP-9 foi avaliada pela técnica de Zimografia

de Gel. (D e E) As células T98G e LN18 foram tratadas com α Apo-1, durante 48 h, ou deixadas sem tratamento. A expressão da MMP-2 e MMP-9 foi medida por PCR quantitativo em tempo real. Os dados são resultados de cinco experiências independentes como média \pm D.P., * $P < 0,05$. (F) As células T98G foram transfetadas com uma pool de siARN contra a MMP-2 e MMP-9 (shM-MPs) ou com Lipofectamina (lipo) isoladamente. 48h após a transfeção, as células foram tratadas com CD95L-T4, 48h depois foi medida a migração num ensaio de migração de duas dimensões. (G) A expressão da MMP-2 e MMP-9, tal como medido por RT-PCR quantitativo. Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$ e são representativos de pelo menos duas experiências independentes.

Figura 12: CD95 ativam a invasão das células de glioma primárias resistentes a apoptose via MMPs

(A) Linhas de células NCH89, 125 e 270 cultivadas a curto prazo foram incubadas com as concentrações indicadas de CD95L-T4, Estaurosporina (St., 1 μ M) ou deixada sem tratamento (Co). Após 24h a fragmentação do ADN foi analisada por FACS (painéis superiores). Análise FACS de expressão de CD95 na superfície NCH89, 125 e 270 (painéis inferiores). (B) As células NCH foram tratados durante 48 h com α Apo-1 ou deixadas sem tratamento, para detetar a migração de células únicas através de uma câmara de Boyden, com 8 μ m de tamanho de poro. Os resultados são expressos como média \pm D.P. ** $P < 0,01$ e são representativos de três experiências independentes. ((C e D) NCH89, 125 e 270 células foram tratadas com α Apo-1, durante 48 h. A expressão da MMP-2 (C) e MMP-9 (D) foi medido por PCR quantitativo em tempo real. (E) As células NCH125 foram transfetadas com uma pool de siARN contra a MMP-2 e MMP-9

(SHM-MPs) sozinhas ou com Lipofectamina (Lipo). 48h após a transfeção, as células foram tratadas com CD95L-T4, a migração foi mais tarde medida num ensaio de migração 48h bidimensionais. (F) Expressão da MMP-2 e MMP-9, tal como medido por RT-PCR quantitativo. Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ e são representativos de pelo menos duas experiências independentes.

Figura 13: CD95 induz a migração através do PI3K/AKT/GSK3 β

(A) A fosforilação de AKT e ERK é mostrada nas células T98G e LN18 após tratamento com CD95L-T4 nos pontos de tempo indicados. (B) Em células T98G, LN18 e NCH 125 e 270, mas não em NCH89, a fosforilação da AKT exibiu uma forma de sino dependente da concentração, após a estimulação com CD95L-T4, respetivamente. (C) O tratamento das células T98G com CD95L-T4 (10 ng/mL) e α Apo-1 (1 μ g/mL) induziu a fosforilação de GSK3b. A cinética da inibição de GSK3b exibiu uma curva em forma de sino. (D) As células T98G foram infetadas com um vetor de lentivírus vazio (Co) ou um mutante constitutivamente ativo GSK3b (GSK S9A). Nas células T98G infetadas com GSK S9A 36h migrou significativamente menos do que os seus homólogos vetor vazio sobre o tratamento com α Apo-1 ou CD95L. Um anticorpo neutralizante para CD95L (Nok1) bloqueou a migração induzida por CD95L de células infetadas por GSK S9A ou por vetores. (E) A catenina-b acumula no citosol das células T98G 30 minutos após tratamento com o CD95L-T4 (10 ng/mL). (F) Catenina-b ativa (verde) translocada para o núcleo após estimulação com α Apo-1. DAPI (azul) e P-GSK3 β (vermelho) foi usada para visualizar os núcleos e citosol, respetivamente em células T98G. (G e H) 24 horas após a transfeção transitória de T98G com o repórter Catenina-

b/TCF transcrecional (TOP-FLASH; G), o plasmídeo de controlo (FOP-FLASH; G), ou a construção NFkB-repórter (NFkB-Luc; H). As células foram tratadas com CD95L-T4 (G e H), LiCl (G) ou deixada sem tratamento (G e H). A atividade de luciferase foi ensaiada 12h (G) ou 8 h (H) e em seguida normalizada para a expressão de luciferase renilla. Os resultados são expressos como média \pm D.P. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ e são representativos de duas experiências independentes. P: fosforilada, T: total.

Figura 14: Src e p85 associadas a CD95 para ativar AKT

(A e B) Células LN18 e T98G foram estimuladas com CD95L-T4 nos pontos de tempo e concentrações indicados. Nos painéis esquerdos CD95 foi imunoprecipitado e os imunoprecipitados imunotransferidos com anticorpos anti-p85, anti-CD95 e anti-Src. Nos painéis do meio, p85 foi imunoprecipitado e os imunoprecipitados sondadas com anticorpos anti-p85 e anti-CD95. Grânulos de proteína A são incluídos como um controlo negativo. Os lisados celulares integrais (CMT) sondados com anti-p85, anti-CD95 e anti-Src estão mostrados nos painéis direitos. (C) As células T98G foram tratadas durante os tempos e concentrações indicados com CD95L-T4. Os CD95 foram imunoprecipitados e os imunoprecipitados foram imunotransferidos com anticorpo anti-Yes. (D) células T98G e NCH 125 foram transfetadas com siARN contra Yes ou Fyn ou com Lipofectamina (Lipo) sozinha. 72h após a transfeção, as células foram tratadas com CD95L-T4, 24 horas depois a migração foi medida num ensaio de migração de duas dimensões. (E) Expressão de Yes-mARN como medido por RT-PCR quantitativo e níveis de proteína Yes como avaliado por análise de FACS é mostrada. (F), células T98G e NCH125 foram transfetadas com siARN contra Yes, um plasmídeo de sobre expressão Yes (pCMV- Yes) ou ambos. 72h

após a transfeção, as células foram tratadas com CD95L-T4, 24 horas depois da migração foi medida num ensaio de migração de duas dimensões. (G) siARN Yes e PI3K inibidor (LY 290059) bloquearam a fosforilação induzida por CD95 de AKT. P: fosforilada; T: total; *: banda específica; n.s.: banda não específica.

Figura 15: Formação DISC ineficiente em células de glioma resistentes à apoptose

(A) 48h após a transfeção transiente de T98G e NCH 125 ou com um HA-PTEN (PTEN), ou o vetor vazio (Mock), as células foram tratadas com CD95L-T4 (500 ng/mL). Para detetar a morte celular em células que sobre expressam PTEN, foi realizada uma coloração de FACS intracelular contra o marcador HA. Posteriormente foi realizada análise de dispersão para a parte da frente em células de HA positivas. Os resultados são expressos como média \pm D.P. e são representativos de duas experiências independentes. (B) As células T98G foram tratadas durante 1 h com α Apo-1, zVAD-fmk, uma combinação de zVAD-fmk e α Apo-1 ou deixada sem tratamento (Co). A fosforilação de GSK3 β foi analisada por Western Blot. (C) A clivagem do caspase-8 em T98G, LN18 e Jurkat 16 (J16) foi detetada por análise de Western Blot, a 5 min após a estimulação de CD95. (D) Em células T98G e LN18 tratadas com CD95LT4 durante 5 min, ou CD95 (painéis superiores) ou da caspase-8 (painéis inferiores) foram imunoprecipitados. Os imunoprecipitados foram imunotransferidos com anticorpo anti-FADD e anti-CD95 (painéis superiores) e com anti-CD95 e anti-caspase-8 (painéis inferiores). As células Jurkat foram incluídas como um controlo positivo. (E) As células T98G foram transfetadas ou com Yes shARN ou com um shARN não-alvo, como um controlo negativo. Após 72h, as células foram

tratadas com CD95L-T4 ou deixadas por tratar e a imunoprecipitação de CD95 foi realizada, os imunoprecipitados foram então imunotransferidos com anticorpo anti-FADD, a cadeia pesada de IgG serve como controlo de carga. À direita é mostrada a eficiência de quebra avaliada pelo RTPCR quantitativo. (F) A expressão quantitativa de FADD, Yes e Fyn em células T98G e LN18 foi medido por análise de FACS. Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$ e são representativos de três experiências independentes. MIF: média de intensidade de fluorescência P: fosforilada; T: total.

Figura 16: Modelo esquemático para CD95 sinalização de invasão em glioblastoma

CD95L induz o recrutamento do Yes membro da família Src e a subunidade p85 de PI3K (representado aqui pelas suas duas subunidades: p85 e p110) para CD95, ativando desse modo AKT. Os fosforilados AKT ativados e GSK3b inativados, permitiram a translocação da catenina- β nos núcleos, onde induzem a transcrição das MMPs. Esta via de sinalização pode ser bloqueada por siARN contra Yes, ou MMP-2 e -9, o inibidor específico de PI3K em (Ly290059) ou infecção por lentivírus com um mutante dominante ativo de GSK3 β (S9A).

Figura 17: Expressão de CD95L, Yes e fosfo-Src em amostras clínicas de GBM

(A) Coloração imuno-histoquímica representativa do CD95L (vermelho) em GBM humano primário. Note-se a expressão aumentada de CD95L na interface tumor/hospedeiro (A.b), em comparação com as áreas tumorais mais sólidos (A.a*) ou parênquima cerebral (A.c). (B) Coloração imuno-histoquímica de quinases da família Src fosforilada (p-Src; B.a,c,e,f) e

Yes (B.b, d, g, h). B.a-d. A visão global da zona de infiltração tumoral, notar robusta fosforilação de Src e expressão do Yes na zona de interação tumor/hospedeiro (para a esquerda) e reduzida ou nenhuma p-Src em áreas de tumores sólidos (à direita*). A expressão Yes foi encontrada na interface tumor/hospedeiro (B.b, d e g) e em áreas de tumores sólidos dispersos (B.h). Forte fosforilação da Src em células tumorais nas zonas de tumores sólidos (B.f) e na zona de infiltração (B.e).

Figura 18: CD95 e CD95L é regulada positivamente em células de glioma de murino *in vivo* e induz a migração

(A e B) A expressão de superfície CD95 e CD95L na linha de células de glioma de murino SMA-560 foi determinada sob condições normais de cultura de células, após a formação de esferóides ou a seguir à implantação intracraniana. As alterações foram normalizadas para os níveis e condições das culturas celulares. Os resultados representam três experiências independentes e são apresentados como média ± D.P., * $P < 0,05$. (C) As culturas esfereróides foram incorporadas numa matriz de colagénio e tratadas com anticorpos para CD95 (Jo2), um anticorpo neutralizante para CD95L (MFL3) ou o anticorpo de controlo de isotipo adequado nas concentrações indicadas. A migração das células foi monitorizada durante 48h e a distância de células para a borda do esferóide é descrita ($n = 10$ células, 3 esferóides por tratamento). (D) Esquema experimental. Migração de colagénio em explantes de tumores após tratamento ou com MFL3 ou o controlo de isotipo adequado é apresentado como descrito acima ($n = 10$, 3 esferóides por tratamento). (E) As imagens representativas de isotipo imunocorado com GFP ou tumores SMA tratados com MFL3. São mostrados o hemisfério carregando tumor e o contralateral

(ipsilateral). Numerosas células SMA-560 (GFP-positivas) no hemisfério contralateral de ratinhos Vm/Dk ou tratados com MFL3 ou o anticorpo de controlo de isotipo foram contadas e normalizadas para a área do tumor. Os resultados apresentados são representativos de duas experiências independentes e expressos como média \pm D.P., * $P<0,05$, ** $P<0,001$. Barra de escala: 100 μM

Figura 19: Produção de CD95L-T4

Localização dos aminoácidos N- e C-terminais dentro de TRAIL-RBD, formando um antiparalelo cordão- β . (A) O alargamento da estrutura TRAIL-RBD (terminal N: verde; terminal C: vermelho). (B) Posição do terminal C e N dentro da estrutura do TRAIL-RBD. Linha de cima: vista lateral do eixo central do TRAIL-RBD. Linha de baixo: vista de cima do eixo central da TRAIL-RBD. Da esquerda para a direita: mono-, di- e trímero. (C) Sequência de aminoácidos CD95L-T4. O péptido de sinal está sublinhado (Met1-Gly20). O terminal N (seta verde) e os aminoácidos de terminal C (seta vermelha) do CD95L-RBD são propostos para formar um antiparalelo cordão- β . A sequência T4-Foldon é impressa em azul (itálico). (D) Modelo de complexos TRAIL-T4-DR5. Linha Superior: vista lateral de TRAIL-DR5 co-complexo com o T4-Foldon (azul claro) posicionado acima do TRAIL-RBD (azul escuro). As cadeias DR5 são coloridas de vermelho escuro. Os aminoácidos terminais N da TRAIL-RBD e T4-Foldon são coloridos de verde, os aminoácidos do terminal C são coloridos de vermelho. Linha de cima: vista lateral do eixo central do TRAIL-RBD. Linha de baixo: vista de cima do eixo central da TRAIL-RBD. Esquerda: Modelo de fita. Direita: modelo de superfície. (E), Purificação por afinidade de CD95L-T4. CD95L-T4 contendo o sobrenadante das células HEK293T transientemente transfetadas foi purificado por

afinidade usando Sepharose de Etreptactina. As proteínas especificamente eluídas por destiobiotina foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE e coloração com prata. A posição de CD95L-T4 é indicada por uma seta. CD95L-T4 mostra um peso molecular aparente de aproximadamente 30 kDa. A diferença para o peso molecular teórico de 23 kDa, é provavelmente devida à glicosilação. (C) Análise de CD95L-T4 purificado por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Para a determinação do peso molecular aparente nativo o CD95L-T4 foi separado por SEC, utilizando uma coluna Superdex 200. O gráfico mostra o perfil de eluição (OD 280 nm) do CD95L-T4 por Etreptactina purificada. As Frações B3-C2 colhidas da SEC (ver B) foram analisadas por SDS-PAGE e coloração de prata. (G) Determinação do peso molecular aparente. Curva de calibração da coluna Superdex 200 com base nos volumes de retenção das proteínas indicadas. O peso molecular nativo aparente de CD95L-T4 é 90,3 kDa, indicando uma proteína trimérica estável. AP-G101 antagoniza a atividade indutora de apoptose de CD95L-T4 nas células Jurkat. (H) CD95L-T4 induz a apoptose em células Jurkat de uma forma dependente da dose, tal como mostrado por um aumento na atividade de Caspase 3/7. A adição de 10 µg/mL de anti-StrepMAB, um anticorpo de reticulação os triméros CD95L-T4, amplia a extensão da apoptose. (I) A atividade indutora de apoptose de 250 ng/mL de CD95L-T4 nas células Jurkat é antagonizada pelo APG101 de um modo dependente da dose.

Figura 20: Sistema de CD95/CD95L e sensibilidade à apoptose em glioblastomas primária

(A e B) Análise de FACS da expressão de superfície de CD95 em linhas de células primárias de glioblastoma (NCH82, 37, 125, 149, 89, 156, 270 e 199), com passagens elevadas

(>50). Para as células de fragmentação de ADN foram tratadas com doses indicadas de CD95L (ng/mL) durante 24 h e 48 h e analisadas por FACS. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. e são representativos de duas experiências independentes. (C) os níveis de mRNA de CD95 e CD95L em tecido de tumor humano, determinados por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Figura 21: Moduladores de ativação de PI3K mediada por CD95

(A) As células LN18 foram incubadas com as concentrações indicadas de CD95L-T4 com ou sem um anticorpo neutralizante para CD95L (Nok1), α APO-1, Estaurosporina (St., 1 μ M), ou deixado sem tratamento (Co). Após 24h e 48h a fragmentação de ADN foi analisada por FACS (B) T98G e as linhas de células em cultura de curto prazo, NCH89 e 125 foram incubadas com as concentrações indicadas de α Apo-1, Estaurosporina (St., 1 μ M), ou deixado sem tratamento (Co). Após 24h e 48h a fragmentação do ADN foi analisada por FACS. (C) As células NCH125 e NCH270 foram tratadas durante 48 h com CD95L-T4 ou deixadas sem tratamento, para detetar a migração de células únicas através de uma câmara de Boyden, com 8 μ m de tamanho de poro. (D) Fosforilação GSK em células T98G medida por coloração de FACS intracelular. (E) As células T98G infetadas por GSK S9A e os respetivos controlos foram estimuladas com as doses indicadas de CD95L (ng/mL) durante 48h e a fragmentação do ADN foi analisada por FACS. São mostradas as curvas de crescimento de T98G Co e GSK S9A. (F) As células T98G e NCH125 foram transfetadas com siARN contra Yes ou Fyn ou com Lipofectamina sozinha (lipo). É mostrada a expressão de Fyn medida por RT-PCR quantitativo. Os resultados são expressos como média \pm D.P., * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$.

Figura 22: A Tabela 1**DESCRÍÇÃO PORMENORIZADA**

É geralmente apreciado que o complexo CD95/CD95L induz apoptose^{18,20}. No entanto, há evidências crescentes de que CD95 pode mediar processos independentes de apoptose, tais como proliferação, angiogénesis, fibrose e inflamação^{19,20}. A sobre expressão de CD95 em células de carcinoma do pulmão de Lewis resultou numa vantagem de sobrevivência de células tumorais *in vivo*²¹. Ao longo das mesmas linhas, o desencadear de CD95 tem sido relatado que conduz a progressão do ciclo celular em células de glioma²². Em astrocitoma maligno, a ligação CD95 promoveu a expressão das quimiocinas pró-inflamatórias e a angiogénesis²³⁻²⁵. Relata-se aqui que a ativação de CD95 nos glioblastomas inicia uma cascata de eventos de sinalização que conduzem, finalmente, ao aumento da capacidade de invasão. A migração induzida por CD95 foi observada pela primeira vez células tubulares renais cultivadas²⁶ e, recentemente, tem sido relatada em células tumorais do ovário, mama, pulmão e rim¹³. Neste último estudo, um gradiente de soro foi adicionado ao estímulo CD95, a fim de instigar e dirigir a migração celular¹³. As células do glioblastoma, pelo contrário, caracterizam-se pelo seu fenótipo de propensão à invasão e migram na ausência de um estímulo adicional.

Aqui são divulgados métodos para bloquear *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo* o comportamento de glioblastoma altamente invasivo pela única neutralização da atividade de CD95. É também divulgada qualquer método ou mecanismo para neutralizar ou bloquear de outro modo a atividade de CD95, tal como pelo uso de um anticorpo que se liga a ele ou por

regulação negativa ou inibindo a expressão do gene CD95 ou tradução de transcrito CD95 mARN.

Para invadir e propagar no cérebro normal circundante, as células tumorais precisam de digerir os componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, laminina e colagénio do tipo IV. A família de enzimas melhor caracterizada que degradam ECM é a família MMP. Glioblastomas deficientes em MMP9 são menos invasivos *in vitro* e *in vivo*²⁷. Os glioblastomas produzem níveis significativamente mais elevados de MMP9 do que os gliomas de baixo grau e de tecido cerebral normal²⁷. Os níveis de MMP9 aumentaram durante o crescimento das células de glioblastoma que tinham sido implantadas intracranianamente em ratinhos nus²⁸. Estas proteases têm também um papel no estabelecimento e manutenção de um microambiente que facilita a sobrevivência de células tumorais. Por consequência, as MMPs regulam a angiogénesis tumoral e inibição da MMP9 reduziu as estruturas tipo capilares em culturas mistas de células endoteliais e glioma²⁷. As mesmas características aplicam a expressão de CD95L: (i) os níveis correlacionam positivamente com o grau de malignidade^{23,29,30}, (ii), os níveis aumentam após inoculação intracraniana, (iii), em amostras humanas de GBM uma das suas localizações preferenciais é nos vasos tumorais.

É aqui demonstrado que a ativação de CD95 aumenta a expressão de mARN de MMP9 e MMP2 em linhas de células de glioblastoma estabelecidas e as culturas primárias e a quebra de MMP2 e MMP2 bloqueia a migração induzida por CD95.

A região promotora de MMP9 contém locais de ligação putativos para o AP-1, NF_κB, Sp1 e AP-2³¹. O complexo de transcrição AP-1 desempenha um papel essencial para

estimular a transcrição de MMP9^{31,32}. A transcrição dirigida por AP-1 de MMP9 em células de glioblastoma foi previamente relatado para ser a jusante da via PI3K/ILK/GSK^{9,10} ou em vez disso pode exigir a actividade ERK e JNK³³.

c-Jun, um componente putativo do complexo transcrição AP-1, foi identificado como um dos genes alvo TCF/β-catenina mais altamente induzidos^{36,37}. A inibição de GSK3 β, tal como aqui relatado, permite à β-catenina não fosforilada acumular-se e translocar-se para o núcleo, onde funciona como um co-fator para os fatores de transcrição da família TCF/Lef³⁵. Além disso, a actividade de NF_κB foi observada concomitantemente. Uma vez que CD95L-T4 diminui a actividade de ERK, acreditamos que em células T98G a AKT regula a actividade de NF_κB através de fosforilação/ativação da quinase IKK, que por sua vez fosforila o I_κB e permite a libertação de NF_κB ativado⁶⁶. Alternativamente, o I_κB pode transativar a subunidade p65⁶⁴. Em contraste, a indução da motilidade e invasibilidade relatado anteriormente para as linhas de células de tumor ou endodérmica origem mesodérmica envolve ERK₁ NF_κB e actividade da caspase-8¹³.

Em contraste, o tratamento de células de glioblastoma com CD95L não fez nenhuma activação da ERK nem a clivagem da caspase-8. A invasão mediada por CD95 de células de glioblastoma não pôde ser bloqueada por um ERK ou um inibidor geral de caspase. Em vez disso, nestas células de origem neuroectodérmica a invasibilidade foi regulada pela via PI3K/ILK/GSK, porque ela pode ser bloqueada por uma PI3K-, um inibidor de ILK e por uma forma dominante ativa da GSK3 β. A actividade de PI3K é também necessária para a associação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que, em seguida, aumenta a expressão de MMP9 via ERK³⁴. Assim, a actividade mediada por CD95 de PI3K facilita

um aumento adicional na atividade de MMP9 por EGFR. Portanto, a ativação de CD95 induz a migração/invasão através da via PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenina/MMP e/ou o PI3K/AKT/NF_KB/ MMP.

GSK3 β é encontrado num complexo multiprotéico com a proteína supressora do tumor da polipose adenomatosa do cólon (APC), axina e β -catenina. Nas células não estimuladas, GSK3 β fosforila β -catenina, marcando-o para ubiquitinação e degradação posterior³⁵. A inibição da GSK3 β desestabiliza este complexo de degradação, o que permite a β -catenina não fosforilada acumular-se e translocar-se para o núcleo, onde funciona como um co-fator para transcrição dos fatores da família dos fatores de aumento das células-T/linfóide (TCF/LEF)³⁵. C-Jun, um componente putativo do complexo de transcrição AP-1, foi identificado como um dos genes alvo TCF/ β -catenina mais altamente induzidos^{36,37}.

Foi recentemente verificado que c-Jun fosforilada interage com TCF4 e, assim, regula a tumorogénesis intestinal integrando as vias JNK e GSK. Nós supomos que as elevadas atividades basais de ERK e JNK, juntamente com a inibição de GSK3 β determina a atividade tumorogénica de CD95. Neste contexto, os presentes inventores verificaram que elevados níveis basais de GSK3 β fosforilada correlacionam-se positivamente com a capacidade de aumentar a migração de CD95 (dados não apresentados), enquanto que os níveis de expressão de CD95 de superfície não tem qualquer influência. Por consequência, os gliomas malignos apresentam maiores pools de livres β -catenina fosforilada do que os menos malignos (dados próprios não publicados).

No passado, vários relatos têm apontado um importante papel para a fosforilação da tirosina em sinalização induzida por CD95^{58,59}. Estes relatórios preliminares, no entanto, sugeriram que a fosforilação em tirosina induzida por CD95 é um pré-requisito para a apoptose mediada por CD95^{56,60,69}. Nessa linha, a fosfatase SHP-1, PCH-2 e SHIP foram encontrados para se associaram com CD95 para neutralizar a sobrevivência das vias iniciadas por fatores⁵⁴. Recentemente, a fosforilação da tirosina induzida por Src de caspase-8 verificou-se prejudicar a apoptose induzida por CD95⁵³. Descrevemos agora uma nova associação de membros da família Sr-c Yes e p85 com CD95. TRANCE, outro membro da família TNF, ativa PI3K através de um complexo de sinalização que envolve c-Src e TRAF6⁷¹. A inibição de Fyn, outro membro da família Src, diminuiu migração induzida por CD95 das células de glioblastoma, embora não significativamente. Isto pode ser explicado pelo facto de Fyn estar envolvido na sinalização mediada por EGFR em células neurais e EGFR é um receptor de muito importante para a invasão de glioma que foi encontrado em associação com o CD95. Assim, a inibição da sinalização mediada por CD95 pode afetar a sinalização mediada pelo EGFR e vice-versa. Se outra molécula adaptadora está ainda a faltar no complexo de ativação de PI3K do CD95 (PAC) continua a ser sujeito de estudos futuros. Alternativamente, Yes e p85 podem interagir diretamente com CD95 através de fosfotirosina previamente identificada contendo motivo no DD de CD95⁵⁴. Consequentemente, nas células T98G, a quebra de Yes permite o recrutamento induzido por CD95L-T4 de FADD para CD95, indicando que Yes e FADD pode competir pela ligação ao CD95. Nessa linha, a análise dos níveis de expressão Yes revelou uma muito maior expressão nas células T98G que nas LN18. Mais importante, a expressão do Yes e a fosforilação da família das quinases Src foi consistentemente encontrada no local de interação do

tumor/hospedeiro em amostras clínicas de GBM, indicando o seu envolvimento na invasão tumoral.

Bamhart *et al.* (2004)¹³ mostraram anteriormente que o CD95L exógeno induz a migração de células tumorais de origem endodérmica, *in vitro*. Nestas células CD95L induz a migração através da caspase-8 e ERK¹³. Estes autores especulam que o CD95L pode estar envolvido na evasão do tumor a quimioterapia e radioterapia, uma vez que ambos os tratamentos aumentam a expressão de CD95L. No nosso estudo observou-se que CD95L também induz a migração de células de GBM. Além disso, o presente estudo representa um avanço conceptual significativo no campo da biologia do tumor uma vez que demonstra pela primeira vez que: (i) a única interação de células tumorais com o parênquima envolvente induz a expressão de CD95L em células hospedeiras e do tumor (ii) os sinais de invasão de CD95L em células de GBM através Yes/PI3K/MMPs e não através caspase-8/ERK como é o caso das células tumorais de origem endodérmica, (iii) a neutralização de atividade de CD95 bloqueia a migração de células basais de GBM *in vivo* num modelo singénico de rato de GBM que reproduz a situação clínica. Além disso, este estudo mostra que a estequiometria molecular dos componentes de sinalização PI3K parece determinar a resposta celular a CD95.

Em resumo, os dados atuais indicam que os tumores Grau IV da OMS são resistentes a apoptose induzida por CD95, mas aumentou a sua capacidade de invasão por estimulação de CD95.

Apesar da resistência clínica conhecida à irradiação de GBM, a terapia corrente para GBM engloba cirurgia seguida por irradiação e quimioterapia adjuvante. O regime de irradiação padrão utiliza uma dose ideal de 60 Gy

geralmente dada em frações diárias de 1,8 a 2 Gy durante aproximadamente 6 semanas com radioterapia concomitante focalmente dirigida. A área alvo é a área aumentada vista tipicamente na MR1 com um adicional de 2 a 3 cm de margem³⁸. Este regime foi desenvolvido com base no conhecimento de que a principal falha do tratamento de gliomas malignos é a recorrência do tumor no espaço a 2 cm do local original do tumor, o que ocorre em aproximadamente 80% a 90% dos casos³⁸. A radiação induz danos por interação direta com o alvo celular ou indiretamente, através da interação com outros átomos ou moléculas (por exemplo, água) dentro da célula para produzir radicais livres que afetam secundariamente as estruturas críticas. Além disso, a irradiação tem sido demonstrado que aumenta a expressão de receptores de morte e ligantes de morte, os quais em alguns casos, matam a célula via apoptose³. A presente invenção confirma que a irradiação das células de gliobastoma aumenta grandemente os níveis de CD95 e CD95L. No entanto, as células permanecem resistentes à destruição induzida por radiação. Em vez disso, nós mostramos que as células irradiadas apresentam um potencial de migração altamente dependente de CD95L. Mesmo as células que não migram significativamente após a única estimulação de CD95 fizeram-no após a irradiação. Assim, um aumento dos níveis de CD95 mediado por irradiação adicional ou possíveis alterações no total da atividade de quinase pode tornar as células sensíveis à migração induzida por CD95. Nessa linha, a terapia por irradiação X é o único fator ambiental inequivocamente ligado a um maior risco dos tumores cerebrais, incluindo glioma, muitas vezes, dentro de dez anos após a terapia³⁹. Mais importante, em contraste com os tumores originais onde CD95 e CD95L foram expressos apenas no interior do tumor, a expressão de GBM recorrente de CD95L e CD95 aumentaram drasticamente. Em linha com os dados *in vitro*, não se detetaram células apoptóticas perto

das células CD95L positivas, mas em vez disso um aumento da expressão de MMP9.

Estratégias experimentais atuais para bloquear o foco da invasão de glioblastoma na inibição da atividade de MMP pela expressão dos inibidores naturais TIMP2 e TIMP4 ou dependem do direcionamento direto do gene alvo de MMP ARNm por estratégias anti-sentido. No entanto, enquanto TIMP2 diminui a angiogénese e a invasão também protege as células tumorais da apoptose⁴⁰. Outras estratégias para inibir a produção de MMP consistem em atingir as vias de transdução do sinal que conduzem à sua expressão, as quais estão, não só de forma semelhante, envolvidas na indução da invasão tumoral, mas também em algumas funções neuronais básicas, tornando assim estas estratégias menos atraentes para aplicação clínica.

Em contraste, enquanto a atividade CD95 é necessária para remodelação da neurite durante o desenvolvimento do cérebro embrionário⁴¹ e de depuramento das células cerebrais danificadas no cérebro doente⁴²⁻⁴⁵ nenhuma atividade CD95 é detetável no cérebro do adulto saudável. Assim, a segmentação de CD95 deve ter menos efeitos colaterais do que os outros fatores de indução da migração, que são normalmente envolvidos em funções normais do cérebro.

Assim, CD95 aparece como um alvo muito potente e atrativo para o tratamento da primeira linha de glioblastoma humano.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Reagentes e procedimentos gerais

Foram usados os seguintes anticorpos: anti G247-4 de CD95L humano (1:200), o anticorpo neutralizante para CD95L (Nok1), o anti-CD95 de murino (Jo2), o anti CD95L de murino (MFL3) e o controlo de isotipo adequado, um hamster IgG1, $\lambda 1$, foram adquiridos na Becton Dickinson. Os anticorpos contra CD95 (α -Apo-1) foram gerados como descrito previamente⁴⁶, GSK3 β fosforilada (P-Ser9-GSK3 β , 1:1000), AKT fosforilado (P-Ser473-KT, 1:1000), AKT total (T-AKT, 1:1000), quinases da família Src (Src, 1:1000), Src fosforilada (P-Tyr416 1:50) e total de β -catenina (1:1000) foram adquiridos a partir de New England Biolabs. Os anticorpos contra CD95 (CD95, 1:1000), GSK3 β total (t-GSK3 β , 1:1000), ERK1/2 fosforilada (P-ERK, 1:1000), Yes total (Yes, 1:1000 ou 1:200), o total de Fyn (1:200) e ERK total (T-ERK, 1:1000) foram adquiridos na β -catenina ativa (P-Ser37 ou P-Thr41; 1:800) foram adquiridos na Upstate, GE-213 anti-MMP9 (1:100) foi adquirido na Oncogene, anti-GFP (1:400) foi adquirido a partir de Molecular Probes, anti-GADPH foi adquirido na Abcam e o anticorpo anti-caspase-8 (1:10) foi gerado no nosso laboratório a partir de sobrenadante de hibridoma⁴⁷. O anticorpo anti-PED (1:2000) foi gentilmente cedido pelo Dr. Herve Chneiweiss. Para a visualização de anticorpos específicos em colorações histológicas foram usados estreptavidina-fosfatase alcalina/VermelhoRápido ambos adquiridos na Dako. Para os estudos de imunofluorescência usaram-se antiodies monoclonais Alexa Fluor 488 (1:500, Sondas Moleculares) e anti-Rodamina (Dianova 200 1).

O inibidor de MAPK, PD98059 (25 μ M), o inibidor de PI3K LY 290059 (25 μ M) e o inibidor pancaspase zVAD-fmk (40 μ M) foram adquiridos a partir de Calbio-chem. O inibidor de ILK (20 μ M) foi gentilmente fornecido por S. Dedhar. As células foram pré-incubadas 30 minutos com inibidores (LY 290059 e zVAD-fmk) antes do tratamento ou com CD95L-T4 ou α Apo-1. A geração de Leucinezipper-CD95L (LZ-CD95L) foi realizada como descrito previamente⁴¹. Os agentes bloqueadores (zVAD-fmk, PD98059, LY 290059 e KP-SD1) foram administrados 30 minutos antes do tratamento com LZ-CD95L ou α Apo-1. As células foram lisadas para análise bioquímica adicional. A extração de proteínas e imunoblotting foi realizada como descrito anteriormente⁴¹.

EXEMPLO 2 - Amostras Primárias

Espécimes de tecido de tumores NCH foram obtidos no intra-operativamente, após consentimento informado dos doentes e aprovação da comissão de ética local. O tecido fresco foi dividido em duas partes, uma parte para estabelecer culturas de tumor primário e outra para extração de ARN. Os dados clínicos dos respetivos doentes a que se refere a classificação do tumor, idade na cirurgia e sexo estão resumidos na Tabela I (Fig. 22).

EXEMPLO 3 - Experimentação Animal

As experiências com animais foram aprovadas pela comissão de uso e cuidados animais institucionais German Cancer Research Center e o Regierungspräsidium Karlsruhe. Para injeções intracranianas, usaram-se ratinhos Vm/Dk isogénicos com 8 a 12 semanas de idade. 5.000 células SMA-560 foram colhidas por tripsinização, ressuspensas em 1

μ L de meio de Eagle modificado da Dulbeccos (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), 1% de penicilina/estreptomicina (PS) e 1% de L-Glutamina 200 mM) e carregado numa seringa Flexifil de 10 μ L (WPI, Berlim, Alemanha). Um orifício de trepanação foi perfurado 2,75 mm lateral ao bregma e a agulha foi introduzida até uma profundidade de 3 mm. Os ratinhos foram sacrificados 7, 14 ou 18 dias após as injeções.

EXEMPLO 4 - Explantes tumorais

Catorze dias após a inoculação do tumor, sacrificaram-se os ratinhos e extraíram-se os tumores. Os explantes dos tumores foram então incubados durante 1 hora qualquer em meio, meio mais o anticorpo de controlo de isotipo (10 μ g/mL) ou meio com MFL3 (10 μ g/mL). Após incorporação dos explantes em colagénio, a invasão de células foi registada durante 72 horas com um microscópio de lapso de tempo (Olympus, Alemanha).

EXEMPLO 5 - Células e culturas esferóides

As linhas de células de glioblastoma estabelecidas A172, T98G e LN18 e as células primárias de glioblastoma (NCHS) foram cultivadas em meio DMEM (suplementado com 10% de FCS e 1% de PS) numa incubadora CO₂ a 36,5°C e 90% de humidade. As linhas de células NCH foram estabelecidas em laboratório de C. Herold-Mende como descrito⁴⁸. Para a análise bioquímica e molecular 1×10^6 células foram plaqueadas para placas de cultura de 10 cm com meio e incubadas como descrito anteriormente. Os esferóides foram produzidos como descrito previamente⁴⁹. Em resumo, células T98G e LN18 (2-3 $\times 10^4$) foram colocadas em gotas em suspensão (20 μ L), sobre as tampas das placas de cultura de 10 cm contendo 10 mL de

DMEM. Após 48 h, os agregados celulares foram recolhidos e transferidos para uma placa de base revestida com agar a 2% cheia com meio. Após mais 48 h os esferóides foram incorporados em um gel de colagénio tridimensional para análise de invasão.

EXEMPLO 6 - Ensaio de Invasão de Colagénio

Um modelo fisiológico para investigar a invasão é o ensaio em gel de colagénio tridimensional. Os esferóides foram tratados 1 hora antes de serem incorporados numa solução de gel de colagénio (Vitrogen 3 mg/mL de solução, na concentração final de 2,4 mg/mL), com α Apo-1 (2 μ g/mL), LZ-CD95L (5 ng/mL) ou Nok1 (50 ng)/LZ-CD95L (5 ng/mL). Após polimerização do gel de colagénio (3,060 min a 37°C) DMEM foi colocado no cimo dos géis. A invasão das células na matriz de colagénio foi documentada com um microscópio de lapso de tempo (Olympus, Alemanha). A distância de células invasoras individuais à beira do esferóide ($n = 10$ por esferóide; 3 esferóides por tratamento) foi determinada com o software de imagem J 1.34 (com base na imagem de NIH).

EXEMPLO 7 - Homogeneização de tecidos

Para a análise FACS, os tumores foram removidos nos pontos de tempo indicados, com tripsina durante 20 min a 37°C, lavadas três vezes em PBS/10% de FCS, trituradas com pipetas de Pasteur de vidro, filtrada através de uma malha de nylon de 100 μ m (BD Falcon) e ressuspensas em PBS/10% FCS para Análise por Classificador celular ativado de fluorescência (FACS, Becton Dickinson).

EXEMPLO 8 - Ensaio de migração

A migração das células de glioma *in vitro* foi medida pela migração através de insertos transpoços revestidos com colagénio I (Falcon). 5×10^4 células foram colocadas em placas em 200 μL de meio em insertos transpoços revestidos com colagénio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com 8 μm de tamanho de poro. As células eram ou γ -irradiadas antes do plaqueamento ou tratadas após o plaqueamento com α -Apol (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Proteína A para reticulação), LZ-CD95L (5 ng/mL), Nok1 (50 ng)/LZ-CD95L (5ng/mL), Nok1 (50ng) sobrenadante LZ (SN, 5 ng/mL), CD95L (10 ng/mL) e CD95L-T34. De preferência, 24h após o plaqueamento as células foram deixadas sem alimento com DMEM basal durante mais 24 horas, antes de serem tratadas. O número de células migradas foi contado completamente às 12 h, 24 h e 36 h após o tratamento. Em todas as experiências em triplicado foram contadas em cada tratamento.

EXEMPLO 9 - Pontuação e análise de tumor

A pontuação de CD95L em gliomas originais e recorrentes foi realizada por análise de três áreas (ampliação de 250 vezes) de cada tumor corado CD95L. As células positivas foram contadas de um modo cego duplo e as pontuações atribuídas de acordo com o número de células positivas.

Para a análise de migração induzida por CD95 *in vivo*, uma suspensão de 5.000 células SMA-560 e 3 μg de MFL3 ou o anticorpo de isotipo apropriado foi injetado no estriado esquerdo de ratinhos Vm/Dk. Após uma semana, os ratinhos foram sacrificados e os cérebros extraídos. Após coloração imuno-histoquímica, as células GFP positivas no hemisfério

contralateral de três áreas representativas por amostra foram contadas e normalizada para a superfície do tumor, tal como avaliado por software Cell^R (Olympus, Alemanha).

EXEMPLO 11 - Irradiação- γ

$2,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 cm 12 h antes da irradiação. As células foram irradiadas com 1, 3, 10 e 50 Gy, à temperatura ambiente utilizando uma fonte ^{137}Cs (Célula Gama 1000, Atomic Energy of Canada, Ltd., ON) em 10,23 Gy/min. As células foram tratadas com Nok1 (10 $\mu\text{g/mL}$) ou deixada sem tratamento imediatamente após a irradiação. Seguidamente as células foram usadas para os ensaios de migração, a extração de ARN ou ensaio Nicoletti.

EXEMPLO 12 - Análise Estatística

A análise estatística dos dados de migração e expressão de mRNA foi realizada utilizando o teste t de Student não paramétrico para comparar as diferenças entre os grupos de tratamento e controlos. Os intervalos de confiança foram determinados a 95%, e * valores $P < 0,05$, ** valor $P < 0,01$. *** Valor $P < 0,005$ foram considerados estatisticamente significativos.

EXEMPLO 13 - Imunoprecipitação

2×10^7 células foram tratadas com 10, 500 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de CD95L-T4, durante 1 minuto e 5 minutos (a menos que indicado em contrário) a 37°C ou deixadas sem tratamento, lavou-se duas vezes em PBS suplementado com inibidores de fosfatase (NaF, NaN3, pNPP, naPPi, β -Glicerolfosfato, 10 mM cada, e 2 mM de ortovanadato), e subsequentemente lisadas

em tampão A (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, coquetel de inibidores de protease [Roche], 1% de Triton X-100 [Serva, Heidelberg, Alemanha], glicerol a 10%, e inibidores da fosfatase [NaF, NaN3, pNPP, NaPPi, β -glicerolfosfato, 10 mM cada e ortovanadato 2 mM]) (condição estimulada) ou lisadas sem tratamento (condição não estimulada). A concentração de proteína foi determinada utilizando kit BCA (Pierce). 1 mg de proteína foi imunoprecipitada durante a noite com anti-caspase-8, como previamente descrito⁵⁸, 5 μ g de α Apo-1 ou 2,5 μ g de anti-p85 e 30 μ L de proteína A Sepharose. As pérolas foram lavadas 5 vezes com 20 volumes de tampão de lise. Os imunoprecipitados foram analisados em 15% ou 7,5% de SDS-PAGE. Subsequentemente, os géis foram transferidos para membrana de nitrocelose Hybond (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemanha), bloqueados com BSA a 2% em PBS/Tween (PBS mais 0,05% de Tween 20) durante 1 hora, e incubadas com os anticorpos primários em BSA PBS/Tween a 2%, a 4°C durante a noite. As manchas foram desenvolvidas com um método de quimiluminescência seguindo o protocolo do fabricante (PerkinElmer Life Sciences, Rodgan, Alemanha).

EXEMPLO 14 - A análise celular por citometria de fluxo

Coloração extracelular:

Expressão de CD95 na superfície das células individuais foi analisada por FACS. 1×10^6 células/mL de soro fisiológico tampão fosfato contendo 10% de soro fetal de vitela (PBS 10%FCS) foram incubadas com α Apo-1 (0,01 μ g/ μ L) durante 20 minutos sobre gelo, seguido pelo anticorpo secundário (1:30 de cabra-anti-ratinho conjugado com ficoeritrina; Dianova) durante 30 minutos. A análise citométrica de fluxo foi

realizada num FACSCalibur (Becton Dickinson) usando um Quest Software celular. Um mínimo de 10.000 células por amostra foi analisado.

Coloração FACS intracelular:

Para medir tanto a eficiência de sobre expressão de PTEN, a eficiência de quebra de Yes ou os níveis basais de FADD, Fyn e Yes, foram realizadas colorações FACS intracelulares. As células foram tratadas com tripsina, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspensão em 4% de paraformaldeído em tampão PB, durante 15 minutos sobre gelo. Após incubação, as células fixadas foram centrifugadas (3000 rpm, 4°C, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com PBS/0,1% de saponina e 10% de FCS. As amostras foram incubadas em gelo durante 30 minutos com o primeiro anticorpo α -HÁ 1:1000 Roche, α -Yes 1:200 ou α -Fyn 1:200 Santa Cruz), seguido por dois passos de lavagem com PBS/0,1% de saponina e FCS a 10% antes da adição do anticorpo secundário α -rato-PE, 1:33 ou Pharmingen α -coelho-Alexa488® 1:250 Sondas Moleculares) durante 20 minutos adicionais. As células coradas foram lavadas duas vezes com PBS/0,1% de Saponina e 10% de FCS e o sedimento ressuspensão no mesmo tampão. As células foram então analisadas por FACS. Os valores foram dados como média intensidade de fluorescência normalizada (MIF) para o抗ígeno específico.

EXEMPLO 15 - Deteção de apoptose (ensaio de Nicoletti)

Para quantificar a fragmentação do ADN, as células destacadas com tripsina/EDTA (Gibco), foram centrifugadas a 200 x g, e fixadas com etanol a 70% a -20°C durante 1 hora. As células fixadas foram coradas com uma solução de iodeto

de propídio (50 µg/mL, citrato de sódio 0,0025% e 0,0025% de Triton-X-100) durante 1 hora ou durante a noite a 4°C e analisadas por FACS.

EXEMPLO 16 - Zimografia de Gelatina para MMP-2 e -9

O meio condicionado não tratado ou tratado (10 ng/mL e 20 ng/mL de CD95L-T4) células T98G foram colocadas sob condições não redutoras num gel de SDS-poliacrilamida a 10% contendo 1 mg/mL de gelatina. Após eletroforese e lavagem do gel com o Triton X-100 (2,5% v/v, duas vezes durante 30 minutos), o gel foi incubado em tampão de reação MMP [50 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,8), 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L deCaCl₂] a 37°C durante 16 h. A atividade gelatinolítica foi detetada como bandas transparentes na coloração com solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 e incubação em solução de descoloração (ácido acético 10%, metanol 20%).

EXEMPLO 17 - Imunohistoquímica

Células T98G foram fixadas com PFA a 4%, a 37 °C, durante 15 minutos, incubadas com cloreto de amónio 50 mM e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS durante 5 minutos. Após bloqueio, as células foram incubadas com os respetivos anticorpos primários, e as imunorreatividades foram visualizadas com um anticorpo monoclonal ou policlonal acoplada a rodamina ou isoftiocianato de fluoresceína (ITCF).

As amostras clínicas de GBM OMS IV foram fixadas com PFA a 4% e embebidos em parafina. Secções consecutivas de 5 µm de espessura foram com os anticorpos do rato contra CD95L, Yes e fosfo-Src (Tyr416). Para validação dos anticorpos anti-CD95L e anti-CD95, foram usadas amígdalas humanas. Após

incubação com anticorpos secundários acoplados com biotina, seguido por incubação com secções estreptavidina-fosfatase alcalinas (Dako) foram desenvolvidas com Fastred (Dako), e incorporados com Glycergel (Dako).

Os tumores de murino foram fixados com PFA a 4%. Após a inclusão em parafina, fatias consecutivas de 5 μm de espessura foram imunomarcadas com GFP anti coelho.

EXEMPLO 18 - Infeção de Lentivírus

As células T98G e LN18 foram infetadas com o vetor de lentivírus pEIGW e pEIGW-GSK3 β S9A numa infecção múltipla (MOI) de 5. Os plasmídeos foram construídos por substituição da sequência de eGFP entre o promotor EF1a e o elemento WPRE em pWPTSeGFP (gentilmente cedido por D. Trono, Genebra) com a cassette IRES-eGFP de pLRES2-EGFP (Clontech, Alemanha). O vetor de lentivírus recombinante pEIGW-GSK3 β S9A foi construído usando pcDNA3 HA-GSK3 β S9A (gentilmente cedido por Trevor C. Dale). Este vetor codifica um mutante constitutivamente ativo GSK3b contendo uma substituição de serina por alanina no resíduo 9 (GSK3 β S9A). Todos os lentivírus foram propagados usando métodos anteriormente descritos⁴¹. A expressão de todos os transgenes foi confirmada em células infetadas por análise FACS de expressão de GFP. A percentagem de células infetadas foi de 80-90%.

EXEMPLO 19 - PCR em tempo real

O ARN das células tratadas quer com α Apo-1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou deixada sem tratamento foi extraído com o Qiagen RNeasy Mini Kit às 48h, salvo indicação contrária. Após a transcrição reversa, o ARNm alvo foi detetado por PCR em tempo real de Taqman com os seguintes iniciadores

específicos do gene: CD95-forw. 5`- ACT GTG ACC CTT GCA CCA AAT-3`; CD95-rev. 5`- GCC ACC CCA AGT TAG ATC TGG-3`; CD95-sonda 5`- AAT CAT CAA GGA ATG CAC ACT CAC CAG CA-3`; CD95L-forw 5`- AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC-3`; CD95L-rev 5`-AAA GCA GGA CAA TTC CAT AGG. TG-3`; CD95L-sonda 5`- TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG G-3`; MMP-9-forw. 5`- GAT CCA AAA CTA CTC GGA AGA CTT G-3`; MMP-9-rev. 5`- GAA GGC GCG GGC AAA-3`; MMP-9-sonda 5`- CGC GGG CGG TGA TTG ACG AC`3;. MMP-2-forw 5`- GGA CAC ACT AAA GAA GAT GCA GAA GT-3`; MMP-2 ver. 5`- CGC ATG GTC TCG ATG GTA TTC-3`; MMP-2-sonda 5`- AGT GCC CCA GCA AGG TGA TCT TGA CC-3`; b-actina-dir 5`- ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC GA-`; b-actina-ver. 5`- CAG CGG AAC CGC TCA TTG ATG CCA G-3`; sonda de actina-b-5` - ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT-3`. Para a prova de quebra de Yes, o ARNm alvo foi detetado por PCR SybrGreen em tempo real com o uso dos seguintes iniciadores da família Src quinase: Yes-dir. 5`- TAT GCG TGC CAG ATT GCT G-3`; Yes-rev. 5`- ZZC AGG AGC TGT CCA TTT GA-3`; Fyn-dir. 5`- TGA ACA GCT CGG AAG GAG AT-3`; Fyn-rev. 5`- GGT TTV ACT CTC CGC GAT AA - 3`; como limpeza do gene Gapdh foi usado com as seguintes sequências:. Gapdh-dir. 5`- GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG-3`; Gapdh-rev 5`- CCT CCG ACG CCT GCT TCA CCA C-3`. O PCR em tempo real foi medido numa ABIPRISM-7300i (Applied Biosystems, EUA).

EXEMPLO 20 - Sobreexpressão PTEN

A sobre expressão de plasmídeos PTEN (pBP-PTEN-HA) e o vetor vazio (pBP) foram gentilmente cedida por Frank Furnari (San Diego, EUA)⁵⁹. As células T98G foram transfetadas com pBP-PTEN-HA e pBP (6 µg) usando as células JetPei. As células transfetadas foram cultivadas durante um adicional de 48 - 72 horas antes do tratamento.

EXEMPLO 21 - Experiências de Quebra

Experiências de quebra foram realizadas por transfeção transiente com Lipofectamina 2000TM (Invitrogen Life Technologies) seguindo o manual de instruções. Experiências de migração foram realizadas usando ou siARN validado contra Yes (Qiagen SI00302218), e um segundo siARN, visando um membro diferente da família das quinases Src, Fyn (Qiagen SI00605451), que foi usado como um controlo negativo ou pools de vetores shARNmir-pGIPZ validados para Yes, MMP-2 e MMP-9 e um vetor shARNmir-pGIZ não-alvo como um controlo negativo (RHS 4430-98843955, -98820654, -99161516, -98514235, -98709361, -99137419, -99291751, -99298712, -99138418 e RHS4346-OB, respectivamente, Open Biosystems, EUA). Após transfeção transiente com siARNs diferentes as células foram cultivadas durante 72h antes de tratados com CD95LT4 (10 ng/mL e 20 ng/mL), a migração foi analisada 24 h depois do tratamento com um ensaio de migração bidimensional. A quebra foi controlada por PCR quantitativo em tempo real e FACS. Para excluir os efeitos fora do alvo do Yes-siARN, as células foram transfetadas com siARN contra Yes, um plasmídeo de sobre expressão Yes (p-CMV-Yes) ou ambos e cultivadas durante 48 horas antes de serem transferidas para uma placa de migração. Após 48h adicionais as células foram tratadas com CD95L-T4 (10 ng/mL e 20 ng/mL). A migração foi medida 24 horas após o tratamento, num ensaio de migração de duas dimensões.

Para os estudos de imunoprecipitação, as células transfetadas foram cultivadas durante 72 h antes do tratamento.

EXEMPLO 22 - Ensaios de Gene Repórter de Luciferase

Vetores repórter de luciferase foram gentilmente fornecidos a partir das seguintes fontes: pTOPFLASH e pFOPFLASH (Randall T. Moon, Howard Hughes Medical Institute of Washington, EUA) e o NF_κB plasmídeo com seis sítios NF_κB de ligação (Min Li-Weber, German Cancer Research Center Heidelberg, Alemanha). As experiências de transfeção foram realizadas com reagente Lipofectamina 2000TM (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 células por poço, 24 h antes da transfeção. As construções Firefly-Luciferase foram co-transfetadas com um plasmídeo CMV-Renilla-Luciferase (10 ng) para normalizar os valores de luciferase. A atividade luciferase foi medida 24h após a transfeção, dependendo da construção, usando kits disponíveis comercialmente da Promega (Madison, WI, EUA). A luminescência foi quantificada usando um luminômetro de microplacas de 96 poços Ascient. Todas as transfeções foram realizadas em quadruplicado, em pelo menos duas ocasiões independentes, e as barras de erro representadas como m.d.p..

EXEMPLO 23 - Geração de CD95L-T4**Engenharia genética humana de CD95-ligando-T4 (CD95L-T4)**

O complexo TRAIL/DR5 bem como a estrutura TNF- α foram usadas como modelos de desenvolvimento de estratégias para expressão do domínio de ligação recetor de CD95L humano (CD95L-RBD). Desde que a estrutura de CD95L-RBD humano trimérico é, em princípio, semelhante às estruturas de TNF- α - ou TRAIL-RBD (entradas PDB: 1TNF e 1DOG/1DU3,

respetivamente^{51, 55, 62}), as seguintes observações foram tidas em conta:

1. Os aminoácidos N- e C-terminais de RBD de TRAIL e TNF- α formam um cordão antiparalelo β .
2. Os aminoácidos terminais deste cordão β estão localizadas ao lado uma da outra, no mesmo local da molécula perto do eixo central do trímero TRAIL-RBD (ver Figura 19).

Isto significa que, por razões estereoquímicas, o uso de terminais N- e C- na mesma molécula para a fusão dos domínios de proteínas (por exemplo, para a adição de motivos de estabilização ou tags) é mutuamente exclusivo. A estabilização ideal do motivo deve ser uma pequena trímero, bem definido, localizado perto do eixo central do trímero CD95L com os seus terminais C e N em locais opostos do motivo de estabilização, a fim de minimizar o risco de interferência com os sítios de interação de ligando/receptor. Um domínio proteico trimérico adequado cumprindo estes critérios é o motivo T4-Foldon de fibritina do bacteriófago T4⁶¹⁻⁶⁵. De acordo com as considerações acima mencionadas o T4-Foldon foi fundido no terminal C ao CD95L-RBD humano (Glu142-Leu281 de CD95L). Entre o CD95L-RBD e o T4-Foldon, foi colocado um elemento ligante flexível (GSSGSSGSSGS) e um marcador de hexahistidina e uma marca strep II (HHHHH-HSAWSHPQFEK) foi adicionada no C terminal. Esta marca de afinidade foi ligada ao T4-Foldon por um elemento ligante flexível (SGPSSSSS). Para permitir a expressão baseada na secreção, um péptido de sinal de humano lgk foi fundido com o terminal N (Glu142). O local de clivagem de péptido de sinal previsto formado pela fusão do lgk líder para o CD95LRBD é esperado para libertar um produto final com uma glutamina localizada no terminal N, o

que corresponde a Glu142 de CD95L humano. A sequência de aminoácidos do CD95L-T4-construção mostrado na Figura 19C foi retrotraduzida e seu uso de codões otimizados para a expressão com base em células de mamíferos. A síntese do gene foi realizada por ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemanha). A cassette de expressão final foi subclonada pCDNA4-HisMaxbackbone, usando um único sítio Hind-III- e Not-I- sítios do plasmídeo. Um resumo esquemático, incluindo todas as características acima descritas, é apresentado exemplificativamente para o complexo TRAIL-T4-DR5 (Figura 19 D).

Expressão e purificação de CD95L-T4

As células HEK 293T cultivadas em DMEM + GlutaMAX (Gibco) suplementado com 10% de FBS, 100 unidades/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, foram transfetadas transientemente com um plasmídeo que codifica CD95L-T4. O sobrenadante da cultura de célula recombinantes contendo CD95L-T4 foi colhido três dias após a transfeção e clarificado por centrifugação a 300 g, seguido por filtração através de filtro estéril de 0,22 μ m. Para a purificação por afinidade 1 mL de estreptactina sepharose (IBA GmbH, Gottingen, Alemanha) foi compactada numa coluna e equilibrada com 15 mL de tampão W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0). O sobrenadante da cultura de células foi aplicado na coluna com uma taxa de fluxo de 4 mL/min. Subsequentemente, a coluna foi lavada com tampão de W e o CD95L-T4 ligado foi eluído gradualmente por adição de 7 x 1 mL de tampão E (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Destiobiotina 2,5 mM, pH 8,0). O teor de proteína das frações eluídas foi analisado por SDS-PAGE e coloração com prata (Figura 19 E). As frações E2-E5 foram posteriormente concentradas por ultrafiltração e posteriormente analisado por cromatografia

de exclusão por tamanho (SEC). A SEC foi realizada numa coluna Superdex 200 usando um sistema de cromatografia Akta (GEHealthcare). A coluna foi equilibrada com solução salina tamponada com fosfato e o concentrado, CD95L-T4 purificado em estreptactina (E2-E5) foi carregado na coluna SEC com um fluxo de 0,5 mL/min. A eluição de CD95L-T4 foi monitorizada por absorvância a 280 nm. O peso molecular aparente de CD95L-T4 purificado foi determinada com base na calibração da coluna de Superdex 200 com proteínas padrão de filtração em gel (Figura 19 C e G) (Bio-Rad GmbH, Munique, Alemanha).

Ensaio de apoptose

Um ensaio celular com uma linha de células T humano Jurkat A3 permanente A (cat. no. CRL2570, ATCC), foi utilizada para determinar a atividade indutora de apoptose de CD95L-T4. As células Jurkat foram cultivadas em frascos com meio RPMI 1640 + GlutaMAX (Gibco) suplementado com FBS a 10% (Biochrom), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Antes do ensaio, as 100.000 células foram semeadas por poço numa placa de microtitulação de 96 poços. A adição de concentrações diferentes de CD95L-T4 aos poços (volume final: 200 µL) foi seguida de uma incubação de 3 h a 37 °C. As células foram lisadas por adição de 20 µL de tampão de lise (250 mM de HEPES, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de EGTA, 5% de Triton- X-100, 100 mM de DTT, 10 mM de AEBSF, pH 7,5) e as placas foram colocadas sobre gelo durante 30 minutos. A apoptose é acompanhada por um aumento da atividade da caspase-3 e caspase-7. Assim, a clivagem do substrato Ac-DEVD-AFC específico para caspase-3/-7 (Biomol) foi usada para determinar a extensão da apoptose. Na verdade, a atividade da caspase correlaciona-se com a percentagem de células em apoptose determinada morfológicamente após coloração das células com iodeto de

propídio e Hoechst-33342 (dados não mostrados). Para o ensaio da atividade da caspase, 20 μ L de lisado celular foi transferido para uma placa de microtitulação preta de 96 poços. Após a adição de 80 μ L de tampão contendo 50 mM de HEPES, 1% de sacarose, 0,1% de CHAPS, 50 μ M de Ac-DEVD-AFC, e DTT a 25 mM, pH 7,5, a placa foi transferida para um leitor de placa de microtitulação Tecan Infinite F500 e o aumento na intensidade de fluorescência foi monitorizado (comprimento de onda de excitação de 400 nm, comprimento de onda de emissão de 505 nm) (Figura 19 H).

Este ensaio de apoptose também foi usado para a determinação da atividade biológica do agente biofarmacêutico APG101. APG101 - uma proteína de fusão do domínio extracelular do receptor CD95 humano (o parceiro de ligação in vivo do ligando CD95), com Fc humano - antagoniza o efeito indutor de apoptose de CD95L. Antes da adição de CD95L-T4 com as células de Jurkat, CD95L-T4 a uma concentração constante foi incubada durante 30 minutos a 37°C, com diferentes concentrações de APG101 (Figura 19 I).

EXEMPLO 24 - CD95 Medeia a Invasão de Células de Glioblastoma Resistentes à Apoptose

Em linhas de células de glioma maligno humano de longo prazo, examinámos em primeiro lugar a indução de apoptose após ativação de CD95. O tratamento com o zíper de leucina (LZ)-CD95L induziu efeitos variáveis nas diferentes linhas de células de glioma: LZ-CD95L não induzem a apoptose nas células A172, causou apoptose somente em altas doses em células T98G ou já mediou a apoptose em baixas doses nas células LN18 (Fig. 1a). A especificidade da morte induzida de LZ-CD95L foi comprovada pela neutralização da apoptose por um anticorpo contra CD95L (NOK1; dados não mostrados).

A resistência de A172 à apoptose induzida por CD95 pode ser atribuída ao baixo nível de expressão de superfície de CD95 (Fig. 1b). As linhas de células LN18 e T98G, no entanto, exibiram diferenças de sensibilidade à apoptose comparativamente mostrando entretanto níveis elevados de expressão de superfície de CD95 (Fig. 1b).

A potência para ativar CD95 proporcionalmente correlaciona-se com o grau de oligomerização de CD95L. Uma vez que o CD95L disponível tem uma tendência para formar agregados, nós desenvolvemos um CD95L humano com uma capacidade de construção de trímero estável, o CD95L-T4 (Figura 19). Linhas de células de glioma diferentes apresentaram diferentes sensibilidades para o tratamento com CD95L-T4: A apoptose foi induzida mesmo em baixas concentrações em células LN18, mas não em células T98G (Figura 11A). A especificidade da morte induzida de CD95L-T4 foi testada por neutralização da apoptose por um anticorpo para CD95L (NOK1; Figura 21). As duas linhas de células LN18 e T98G, no entanto, exibiram comparavelmente elevados níveis de expressão de superfície de CD95 (Figura 11A). Estas linhas de células expressaram também outras moléculas necessárias para a apoptose mediada por CD95, tal como FADD, caspase-8 ou caspase-3 (Figura 15C e D)^{63, 72}.

As células malignas de glioma são caracterizadas pelo seu potencial replicativo, indução de angiogéneses, migração/invasão e evasão de apoptose. A estimulação de CD95 não alterou a taxa de proliferação de células T98G (dados não mostrados). Para testar o comportamento de invasão geramos culturas esferóides de células T98G e LN 18 e plaquearam-se numa matriz de colagénio. O tratamento com LZ-CD95L aumentou a invasão de células que migram para as imediações da matriz numa extensão maior do que em células T98G LN18 (Fig. 1c, Fig. 11 B). Este foi também o caso

quando as células foram plaqueadas na câmara superior de duas câmaras separadas por uma membrana revestida de colagénio. As células altamente sensíveis à apoptose LN18 não reagiram à ativação de CD95 com o aumento da migração. As células T98G, pelo contrário, aumentaram o seu potencial de migração após tratamento com LZ-CD95L, ou com um anticorpo estimulante para CD95 (α Apo-1) (fig. 3b).

A migração de células de glioma requer clivagem de componentes da matriz extracelular através de MMPs. Em células T98G, a atividade MMP-9, como avaliada pela técnica de zimografia, aumentou após o tratamento com CD95L-T4 (Figura 11C). Por consequência, a estimulação de CD95 aumentou a expressão dos níveis de mRNA de MMP-2 e MMP-9 na tendência de T98G para a migração mas não nas células LN-18 sensíveis à apoptose (Figura 11D e E). Mais importante, a migração induzida por CD95 das células T98G poderia ser bloqueada com pool siRNA contra a MMP-2 e -9, indicando que estes MMPs são necessários para a migração induzida por CD95 (Figura 1F e G).

Numa outra série de experiências foram usadas culturas de glioma de curto prazo derivado de doentes com tumores. Estas células exibiram as aberrações genéticas típicas de GBM, incluindo perdas de cópia única dos locais PTEN e CDKN2a e ganho de cópia única do local EGFR, avaliadas por análises de série-CGH (Bernhard Radlwimmer, comunicação pessoal). Cada cultura derivada de GBM primário aqui examinada exibiu elevada expressão de superfície de CD95 ($n=18$) e níveis similares ou superiores de resistência à apoptose induzida por CD95 ($n=8$), em comparação com as observada na linha de células T98G propensa a invasão (figura 12A, Figura 20 e dados não mostrados). Ambos os níveis de expressão de CD95 de superfície e de resistência

à apoptose mediada por CD95 não foram afetados pelo número de passagens em cultura (dados não mostrados). Examinamos ainda a invasão induzida por CD95 nas culturas derivadas de GBM NCH89, NCH125 e NCH270. A ativação de CD95 em NCH125 e NCH270 aumentou a expressão de MMP-2 e MMP-9 e, subsequentemente, a migração induzida (Figura 12B a D). A estimulação de CD95 em células NCH89 nem aumentou a migração nem a expressão de MMP-9 (Figura 12B a D). Assim, a resposta a migração para CD95 não se correlaciona estritamente com o grau de resistência à apoptose. Na mesma linha, a expressão de CD95 e CD95L ARNm diferiu entre os tumores de GBM primários altamente invasivos testados (Figura 20). As MMPs são necessárias para a migração de NCH125 induzida por CD95L-T4, tal como uma pool siARN para MMP-2 e -9 bloqueou significativamente a migração (Figura 12E).

EXEMPLO 25 - CD95 Medeia a Invasão do Passo Via a PI3K/ILK/GSK/MMP de Modo Independente de Caspase

A invasão de células de glioma requer clivagem de componentes da matriz extracelular através de metaloproteinases de matriz (MMP), como já descrito acima. Por conseguinte, os níveis de mARN de MMP9 e MMP-2 aumentaram consideravelmente após ativação do CD95 nas T98G propensas a migração mas não nas células LN18 resistentes a apoptose (Fig. 2). A quinase ligada a integrina (ILK) foi recentemente referida mediar a expressão de MMP9 através da inibição de glicogénio sintase quinase-3 β (GSK3 β)^{9,10}. A inibição da fosforilação via GSK3 β no seu resíduo serina-9 (fosfo-Ser9) foi observada em células T98G mediante tratamento com LZ-CD95L ou anticorpo α Apo-1 (Fig. 3a e Fig. 8.). A fosforilação da GSK3 β foi também encontrada em células LN18, mas com diferentes cinéticas (Fig. 3a e Fig.

8.). As células T98G propensas a migração exibiram mais altos níveis de fosfo-Ser9-GSK3 β basal e aumentando gradualmente a fosforilação de longa duração da GSK3 β mediante ativação de CD95 (Fig. 3a e Fig. 8.). As células LN18 propensas a apoptose mostraram uma fosforilação transiente (5-10 min) da GSK3 β mediante ativação de CD95 (Fig. 3a). A sobre expressão da GSK3 β mutante constitutivamente ativa (GSK S9A) bloqueou a migração das células T98G induzida por CD95 (Fig. 3b). As células T98G expressando GSK S9A e os seus homólogos de tipo selvagem exibiram níveis comparáveis de sensibilidade a apoptose induzida pelo CD95 e da taxa de crescimento (Fig. 3 c-d). Assim, a inibição da migração por GSK3 β constitutivamente ativa em células T98G não pode ser atribuída a uma taxa de proliferação celular diferente. Consequentemente, o pré-tratamento com o inibidor KP-DP-1 de ILK bloqueou a migração mediada por CD95 de células T98G sem afetar a migração da base (Fig. 3e). ILK ativa a proteína quinase B (PKB/AKT) e inibe a atividade GSK3 β num modo dependente de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)¹¹. Por conseguinte, a inibição de PI3K bloqueada por LY294002 induzida por CD95 a atividade de AKT e a Ser9 fosforilação da GSK3 β em células T98G, sem alterar o estado de fosforilação da quinase do receptor extracelular (ERK) (Fig. 3f).

A β -catenina forma um complexo juntamente com GSK3 β ativa, a polipose coli adenomatosa (APC) e complexo de degradação de proteínas axina. A fosforilação de β -catenina por GSK3 β visa a degradação proteosomal. Como consequência da inibição da GSK3 β , a β -catenina acumula-se e transloca-se para o núcleo, onde se engata a extremidade terminal N de proteínas de ligação a ADN da família TCF/Lef¹² induzindo a expressão de diferentes genes-alvo incluindo as MMPs. Nas

células T98G, que desencadeia a translocação nuclear induzida por CD95 de β -catenina ativa, não fosforilada na serina 37 que visa GSK ou Treonina 41 (Fig. 3G). Tomadas em conjunto, a ativação de CD95 induz a migração/invasão através do passo de PI3K/ILK/GSK3 β / β -catenina/MMP.

CD95 transduz o sinal de apoptose através da ativação de caspases. Foi recentemente relatado que o CD95 medeia a migração através da ativação de caspase-8, e NF_KB ERK em linhas de células tumorais do mesênquima resistentes à apoptose induzida por CD95¹³. Em contraste com as células LN18, a estimulação CD95 de células T98G não induziu a clivagem de caspase-8 (Fig. 3h). Consequentemente, o pré-tratamento de células T98G com um inibidor de caspase de largo espectro, benzoil-VAD.fluorometil cetona (zVAD.fmk) não bloqueiam a fosforilação ser9 da GSK3 β em células T98G (Fig. 8). Pré-tratamento de células T98G com o inibidor PD98059 de MEK também não interfere com a migração induzida por CD95 (Fig. 3i).

Para além das caspases, a fosfoproteína enriquecida em diabetes/fosfoproteína enriquecida em astrócitos-15 kDa (PED/PEA-15) tem uma DED e pode, portanto, interagir com outras moléculas no DISC. A sobre expressão de PED foi avaliada para bloquear a apoptose CD95 e TNFR-1 induzida por ativação simultânea de ERK e inibição de quinase Jun N-terminal (JNK)^{14,15}. A atividade anti-apoptótica de PED aumenta se fosforilada por AKT¹⁶. Em células T98G, a interferência curta (si)-ARN para PED mas não um siARN controlo diminuiu os níveis de PED e a sua ativação reportada de ERK, mas não a inativação de CD95 mediada por GSK3 β (Fig. 8). Além disso, os níveis de FLIPL, outra molécula que pode ser recrutada para o DISC e inibir a

apoptose, permaneceram inalterados após o tratamento com LZCD95L (dados não mostrados).

Um dos melhores indutores descritos de invasão de GBM é EGF. A sua ligação ao EGFR promove a expressão de MMP-9 através da ativação de MAPK/ERK e o passo de PI3K²⁷. O PI3K ativa AKT/PKB, o qual por sua vez é capaz de fosforilar GSK3 β levando a sua inativação. Para testar se a sinalização PI3K ou MAPK poderia ser responsável pela invasão observada determinou-se a fosforilação de ERK e AKT. A estimulação de células T98G e LN18 com AKT ativado por CD95L-T4 mas não ERK (Figura 13A). Curiosamente, a atividade de ERK foi ainda bloqueada com o aumento do tempo seguinte à estimulação (Figura 13A). Nas células T98G, NCH125 e NCH270 propensa à invasão, a fosforilação da AKT exibiram uma curva em forma de sino dependente da concentração (Figura 13B). Em contraste, em células NCH89, que não reage a CD95 com o aumento da invasão, CD95L-T4 não ativou AKT acima dos níveis basais (Figura 13B). A inibição da GSK3 β , via fosforilação na sua serina-9 (fosfo-Ser9) foi observada em células T98G mediante o tratamento com CD95L-T4 ou α Apo-1 de anticorpo por Western Blot e de coloração de FACS (Figura 13C e Figura 21).

A sobre expressão de uma GSK3 β mutante constitutivamente ativa (GSK S9A) via infecção de lentivírus bloqueou migração das células T98G induzida por CD95 (Figura 13D). Células T98G expressando GSK S9A e os seus homólogos de tipo selvagem exibiram taxas de crescimento comparáveis e níveis de sensibilidade à apoptose induzida por CD95 (Figura 21). Assim, a inibição da migração por GSK3 β constitutivamente ativa em células T98G não pode ser atribuído a uma taxa de proliferação celular diferente. A

GSK3 β ativa forma um complexo com β -catenina, a polipose coli adenomatosa (APC) e proteínas axina - o complexo de degradação. A fosforilação de β -catenina por GSK3 β visa-a para degradação de proteosoma. Como consequência da inibição da GSK3 β , a β -catenina acumula-se e transloca-se para o núcleo, onde se engata a extremidade N-terminal de proteínas de ligação a ADN da família TCF (fator de células T)/Lef (fator de reforço linfóide)¹², induzindo a expressão de genes alvo diferentes, incluindo c-Jun, um fator de transcrição essencial para a expressão de MMP-9^{31, 32}. Alternativamente, a inibição da atividade de GSK3 β pode aumentar diretamente a expressão de AP-1¹⁰. Para estudar se a estimulação de CD95 desencadeia a atividade de transcrição de β -catenina examinamos a expressão da atividade repórter transcrecional da β -catenina citoplasmática e da β -catenina nuclear. LiCl, um conhecido inibidor da GSK3 β e indutor da atividade transcrecional da β -catenina foi usado como um controlo positivo. Em células T98G, desencadeando a acumulação citoplasmática de β -catenina induzida por CD95 30 minutos após a estimulação com CD95L-T4 (Figura 13E). Além disso, foi observada a translocação nuclear de β -catenina ativa, não fosforilada na GSK dirigida Ser 37 ou Thr 41 (Figura 13F). Atividade TCF/Lef-repórter (TOP-FLASH) foi também significativamente induzida por CD95L-T4 (Figura 13G). A mutação do domínio de ligação TCF/Lef aboliu a indução CD95L-T4 da atividade luciferase (FOP-FLASH; Figura 13G). Além disso, a atividade de NF κ B aumentou significativamente 8h após estimulação com 20 mas não de 10 ng/mL de CD95L-T4 (Figura 13H). Tomados em conjunto, a ativação de CD95 induz a migração/invasão através da PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenina/MMP e possivelmente o passo PI3K/AKT/NF κ B/MMP.

EXEMPLO 26 - Migração Induzida por CD95 é também Detetada em Culturas de Glioma Primário Resistentes à Apoptose

Numa outra série de experiências foram usadas culturas de glioma de curto prazo derivadas de tumores de doentes. As células de astrocitoma difuso (OMS II) exibiram maior expressão na superfície de CD95 e foram relativamente sensíveis a apoptose mediada por CD95 (Fig. 4). Em contraste, as células provenientes de oligodendroglioma (OMS III) ou o glioblastoma (OMS IV) foram altamente resistentes a apoptose mediada por CD95, apesar de a expressão de superfície elevada CD95 (Fig. 4 e Fig. 9.). Cada cultura derivada de GBM primário aqui examinada exibiu elevada expressão de superfície de CD95 (n=18) e os níveis iguais ou superiores de resistência à apoptose induzida por CD95 (n=8), em comparação com as observadas na linha celular T98G propensa a invasão (Fig. 9). Ambos os níveis de expressão de superfície de CD95 e a resistência à apoptose mediada por CD95 não foram afetados pelo número de passagens em cultura (dados não mostrados). Foram testados mais três culturas derivadas de GBM que eram relativamente (NCH125) ou altamente resistente (NCH89 e NCH270) à apoptose induzida por CD95. A ativação de CD95 em NCH125 e NCH270 aumentou a expressão de MMP9 e MMP-2 e posteriormente a migração (Fig. 5a-c). A estimulação de CD95 em células NCH89 nem aumentou a migração nem a expressão de MMP9 e MMP-2 (Fig. 5b-c). Assim, a resposta de migração de CD95 não se correlaciona rigorosamente com o grau de resistência à apoptose. Na mesma linha, a expressão de CD95 e de CD95L ARNm foi muito diferente entre os tumores de GBM primários altamente invasivos testados (Fig. 9).

EXEMPLO 27 – A IRRADIAÇÃO AUMENTA A CAPACIDADE DE INVASÃO PELA VIA DO SISTEMA CD95/CD95L

No cenário clínico, as células invasoras que escapam à cirurgia são os alvos da radioterapia e quimioterapia adjuvante. Tem sido relatado que a irradiação- γ aumenta a expressão de CD95 e CD95L e, assim, induz a apoptose³. Considerando os dados presentes queríamos avaliar se a irradiação induzida pelo CD95 e CD95L poderia também aumentar a capacidade de invasão das células de glioma. Primeiro, mostramos que a irradiação das células T98G aumenta a expressão de CD95 e CD95L mARN (Fig. 6a). A maior expressão de CD95 e CD95L mARN foi encontrada na dose de 3 Grays (Gy). Com a mesma dose, a MMP-2 mARN foi significativamente induzida (Fig. 6b). A MMP9 ARNm foi também significativamente regulada positivamente a 3 e 10 Gy, mas em menor extensão (Fig. 6b). Mais importante ainda, a expressão de MMP foi espelhada por uma taxa de migração mais elevada das células irradiadas que podem ser revertidas por neutralização de CD95L (Fig. 6c). As culturas primárias de GBM exibiram também um fenótipo mais invasivo após a irradiação (Fig. 6d e Fig. 10.). A migração induzida por irradiação foi totalmente dependente de CD95L (Fig. 6d). Interessantemente, mesmo em culturas de NCH89 que não exibem um fenótipo invasivo após a ativação direta de CD95, 10 Gy de irradiação aumentou o número de células que migram via de CD95L (Fig. 6d). A irradiação induziu significativamente a migração de uma maneira dependente do CD95 em nove de dez culturas primárias derivadas de GBM aqui examinados (Fig. 6d e Fig. 10.). A única cultura que não apresenta uma tendência significativa para migrar mediante a estimulação de CD95 tinham menores níveis de expressão de superfície de CD95 (NCH 417; Fig. 10). Nós estudamos a expressão destas moléculas em tumores

recorrentes que surgem após a cirurgia e a irradiação do tumor original. Os níveis de expressão de CD95L dentro do tumor foram pontuados como 0 a 4 (Fig. 6e). Embora os níveis no primeiro glioma detetado nunca foram superiores a 0 (1-24 células positivas a CD95L por campo), um aumento drástico de expressão CD95L após a radioterapia foi detetada em oito dos nove tumores recorrentes estudados (Fig. 6e). O CD95L foi detetado em células tumorais positivas para GFAP (Fig. 6f). A expressão adicional de CD95 e de MMP9 foi detetada na mesma região, em fatias consecutivas (Fig. 6f). Importante, as células apoptóticas não foram observadas perto de células que expressam CD95L (dados não mostrados).

EXEMPLO 28 - PI3K É ATIVADO PELA VIA DO RECRUTAMENTO DE SRC PARA CD95

Src liga a atividade CD95 a PI3K, como mostrado por experiências de co-imunoprecipitação (Figura 14A a C). De facto, o tratamento de células T98G e LN18 com recrutamento induzido CD95L-T4 de Src e a subunidade p85 de PI3K para CD95. A associação de p85 com CD95 foi examinada por imunoprecipitação ou CD95 ou p85. O grau de associação de p85 com CD95 inversamente correlacionada com a concentração de CD95L-T4 nas células T98G (Figura 14B). No entanto, em células LN18 o recrutamento p85 para CD95 foi detetado apenas a concentrações elevadas de CD95L-T4 (Figura 14A). A imunoprecipitação de CD95 permitiu a deteção de um membro da família Src em cinco minutos após o tratamento com baixa concentração de CD95L-T4 (Figura 14A e B). A associação Src diminuiu numa concentração mais elevada (Figura 14A e B). Assim, a baixas concentrações de CD95L-T4 tanto Src como p85 associadas a níveis detetáveis com CD95 em células T98G, mas apenas em células LN18 foi detetado Src. Além

disso, depois de uma triagem com anticorpos para vários SFKs, como Fyn, Lyn, pp60 e Yes, identificamos Yes como o membro da família Src que liga CD95 a PI3K (Figura 14C). Para validar o papel de Yes na migração das células de glioma, foram realizadas experiências de quebra. Em células transfetadas com Yes siARN, a expressão do Yes, como avaliada por FACS e de qRT-PCR, foi reduzida enquanto que a expressão de Fyn, outro membro da família Src, permaneceu inalterada (Figura 14E). O siARN para Yes, mas não para Fyn, significativamente suprimiu a migração induzida por CD95L-T4e de células T98G de NCH125 (Figura 14D). Este bloco de migração foi resgatado por sobre expressão de Yes em células T98G e LN18 (Figura 14F). Tal como o inibidor de PI3K LY290059, o siARN para Yes também inibiu a fosforilação de AKT induzida por CD95 (Figura 14G).

EXEMPLO 29 - FORMAÇÃO INEFICIENTE DE DISC EM CÉLULAS DE GLIOMA RESISTENTES A APOPTOSE

O papel do passo PI3K repressor de PTEN (MMAC1, TEP1) foi examinado. Enquanto as células LN18 propensas a apoptose têm PTEN intacto, células T98G carregam uma mutação pontual (codão 42 CTT a CGT; Glicina para Glutamina) num alelo e falta do segundo alelo de PTEN e uma perda total de um do cromossoma 10^{57,59}. Contudo, a sobre expressão de PTEN, não sensibiliza as células T98G nem NCH125 para a apoptose mediada por CD95 (Figura 15A).

Questionamos ainda se as caspases estavam envolvidas na ativação de PI3K induzida por CD95. A inibição de caspases pelo inibidor geral de caspases zVAD-fmk não impediu a fosforilação de GSK3 β (Figura 15B). Da mesma forma, a clivagem de caspase-8 induzida por CD95 só podia ser detetado em LN18, mas não em células T98G (Figura 15C).

Para investigar se os componentes de DISC foram eficientemente recrutados nessas células nós analisamos o recrutamento FADD em imunoprecipitados de CD95. Considerando que, após a estimulação com CD95L-T4 o recrutamento de FADD para CD95 aumentou nas células 18LN, nenhum aumento foi detetado nas células T98G (Figura 15D). Por conseguinte, o recrutamento da caspase-8 para CD95 aumentada após a estimulação com CD95L-T4 em células LN18 e J16, mas não em células T98G (Figura 15D). Mais importante ainda, em células T98G, a quebra de siARN de Yes habilita a indução de CD95L-T4 de recrutamento FADD para CD95 (Figura 15E). Ao longo desta linha, enquanto que os níveis de expressão de FADD eram semelhantes nas células LN18 e T98G, os níveis de Yes eram significativamente mais elevados nas células T98G (Figura 15F). Ao contrário de Yes, a expressão de Fyn foi significativamente mais elevada em células LN18 (Figura 15F).

EXEMPLO 30 - O Sistema de Cd95/Cd95L é um Importante Mediador da Invasão de Glioma In Vivo

A expressão de CD95L em doentes que sofrem de Glioblastoma multiforme mostrou uma distribuição tipo triângulo de CD95L em todos os tumores examinados (Fig. 7a, 17A). No interior do tumor, apenas pequenas quantidades de CD95L foram expressos (Fig. 7a.1, 17A.a). A expressão aumentada na interface tumor-parênquima (Fig. 7a.2), atingiu um pico no parênquima cerebral adjacente ao tumor (figura 7a.3, 17A.b) e voltaram a diminuir com o aumento da distância ao glioma (figura 7a.4, 17A.c). Foi detetado CD95L nas células do glioma, neurônios e macrófagos (dados não mostrados). A expressão adicional de CD95L dentro do tumor foi observada em células de glioma que cercam vasos tumorais. Do mesmo modo, a fosforilação de quinases da família Src (pSrc) e

expressão de Yes foram consistentemente encontradas na interface tumor-hospedeiro em todas as amostras examinadas, sugerindo um papel na invasão tumoral (Figura 17B). Dentro das áreas de tumores sólidos, a expressão de Yes variou altamente entre as amostras de tumores, desde muito alta até à expressão apenas nas células tumorais dispersas. Nestes domínios expressando altamente Yes a fosforilação de Src ou não foi detetada ou a deteção foi bastante limitada (Figura 17B).

Para a tradução das nossas observações numa forma *in vivo* mais fisiológica examinamos o papel do sistema CD95/CD95L num modelo do rato de Glioblastoma multiforme. Para estes estudos, a linha de células de glioma de murino SMA-560 estabelecida foi injetada intracranianamente num hospedeiro Vm/Dk singénico, como descrito. O uso de um modelo de tumor singénico foi importante para permitir a indução de tumor da expressão de CD95L no tecido cerebral circundante.

As células SMA-560 expressam apenas baixos níveis de receptor de CD95 na superfície das mesmas (Fig. 7b, 18A) e nenhum CD95L (fig. 7c, 18B), quando mantidas nas condições de cultura de células. Como relatado por outros¹⁷ verificamos que as células SMA-560 foram resistentes à apoptose induzida por CD95 (dados não mostrados). Após a formação de esferóides, os níveis de CD95 aumentaram ligeiramente (Fig. 7b, 18A), enquanto que a análise de FACS não conseguiu identificar CD95L na superfície da célula (fig. 7c, 18B). Apesar da quantidade relativamente pequena de níveis de CD95 de superfície, os esferóides formados a partir dessas células apresentam o aumento da migração em ensaio de invasão de colagénio após a estimulação de CD95 num modo dependente da dose (Fig. 7d, 18C). De acordo com a nossa descoberta de que os esferóides não expressam CD95L (Fig. 7c, 18B), o bloqueio da CD95L usando o anticorpo

neutralizante CD95L MFL3 não alterou a invasão (Fig. 7d, 18C).

Curiosamente, a análise de FACS dos níveis de superfície de CD95 e CD95L mostraram um aumento significativo de ambas as moléculas (figura 7b e 7c, 18A e 18B), quando as células isoladas a partir de tumores sólidos, foram analisadas 14 e 18 dias após a inoculação. Isto indica a necessidade de interação tumor-hospedeiro e, portanto, uma conversa cruzada entre os fatores do hospedeiro e as células tumorais como determinado no caso de GBM de murino.

Para uma análise mais pormenorizada do significado funcional deste aumento, foram extraídas a partir de fragmentos de tumores sólido 14 dias após a injeção intracraniana de células pré-incubadas e destes para uma hora, com qualquer meio sozinho, meio com MFL3 ou o anticorpo isotipo adequado, respetivamente. Depois de incorporadas em géis de colagénio, a migração foi monitorizada durante um período de 72 horas (fig. 7e, 18D). Surpreendentemente, a pré-incubação com o anticorpo MFL3 neutralizante de CD95L, mas não com o isotipo ou o meio sozinho, diminuiu a migração das células para fora do núcleo do tumor em cerca de 50% (fig. 7e, 18D).

Para verificar estes resultados *in vivo*, nós injetámos células SMA-560 e MFL3 positivas para GFP ou o anticorpo isotipo adequado para o corpo estriado esquerdo de Vm/Dk. O tratamento de ratinhos com MFL3 reduziu significativamente a migração de células tumorais para o hemisfério contralateral (Fig. 7f, 18E). Concluímos a partir destes dados que o sistema de CD95/CD95L é um importante mediador da invasão glioma maligno na circundante do cérebro *in vivo*.

Lista de Referências

Toda a literatura citada nesta aplicação é aqui incorporada como referência.

1. Kleihues, P., Burger, P. C., & Scheithauer, B. W. The new WHO classification of brain tumours *Brain Pathol.* 3, 255-268 (1993).
2. Friesen, C, Herr, I., Krammer, P. H., & Debatin, K. M. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug- induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 2, 574-7 (1996).
3. Fulda, S. et al. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ* 5, 88493 (1998).
4. Kischkel, F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-88 (1995).
5. Kischkel, F. C. et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8 *J.Biol.Chem.* 276, 46639-46646 (2001).
6. Boldin, M. P. et al. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-8 (1995).

7. Medema, J. P. *et al.* FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-804 (1997).
8. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-87 (1998).
9. Troussard, A. A., Tan, C, Yoganathan, T. N., & Dedhar, S. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 19, 7420-7427 (1999).
10. Troussard, A. A. *et al.* The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* 19, 5444-5452 (2000).
11. Delcommenne, M. *et al.* Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 11211-11216 (1998).
12. Eastman, Q. & Grosschedl, R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 233-240 (1999).
13. Barnhart, B. C. *et al.* CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.* 23, 3175-3185 (2004).
14. Condorelli, G. *et al.* PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis *Oncogene* 18, 4409-4415 (1999).

15. Condorelli, G. et al. Multiple members of the mitogen-activated protein kinase family are necessary for PED/PEA-15. anti-apoptotic function *J.Biol.Chem.* 277, 11013-11018 (2002).
16. Trencia, A. et al. Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action *Mol.Cell Biol.* 23, 4511- 4521 (2003).
17. Ashley, D. M., Kong, F. M., Bigner, D. D., & Hale, L. P. Endogenous expression of transforming growth factor beta1 inhibits growth and tumorigenicity and enhances Fas-mediated apoptosis in a murine highgrade glioma model. *Cancer Res.* 58, 302-309 (1998).
18. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795 (2000).
19. Biancone, L. et al. Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo *J.Exp.Med.* 186, 147-152 (1997).
20. Hohlbaum, A. M., Saff, R. R., & Marshak-Rothstein, A. Fas-ligand--iron fist or Achilles' heel? *Clin.Immunol.* 103, 1-6 (2002).
21. Lee, J. K., Sayers, T. J., Back, T. C, Wigginton, J. M., & Wilttrout, R. H. Lack of FasL-mediated killing leads to in vivo tumor promotion in mouse Lewis lung cancer *Apoptosis.* 8, 151 -160 (2003).
22. Shinohara, H., Yagita, H., Ikawa, Y., & Oyaizu, N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via

extracellular signal-regulated kinase activation *Cancer Res.* 60, 1766-1772 (2000).

23. Choi, C. et al. Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase *Cancer Res.* 61, 3084-3091 (2001).

24. Choi, C., Gillespie, G. Y., Van Wagoner, N. J., & Benveniste, E. N. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells *J.Neurooncol.* 56, 13-19 (2002).

25. Choi, K., Benveniste, E. N., & Choi, C. Induction of intercellular adhesion molecule-1 by Fas ligation: proinflammatory roles of Fas in human astrogloma cells *Neurosci.Lett.* 352, 21-24 (2003).

26. Jarad, G. et al. Fas activation induces renal tubular epithelial cell beta 8 integrin expression and function in the absence of apoptosis *J.Biol.Chem.* 277, 4782647833 (2002).

27. Rao, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases *Nat.Rev.Cancer* 3, 489-501 (2003).

28. Sawaya, R. et al. Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase during tumor growth in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 251, 632-636 (1998).

29. Frei, K., Ambar, B., Adachi, N., Yonekawa, Y., & Fontana, A. Ex vivo células malignas de glioma are

sensitive to Fas (CD95/APO-1) ligand-mediated apoptosis *J.Neuroimmunol.* 87, 105-113 (1998).

30. Weller, M. et al. Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines *J.Clin.Invest.* 94, 954-964 (1994).

31. Sato, H. & Seiki, M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells *Oncogene* 8, 395-405 (1993).

32. Gum, R. et al. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1 -independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences *J.Biol.Chem.* 21 [lambda], 10672-10680 (1996).

33. Lakka, S. S. et al. Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro *Oncogene* 21, 5601-5608 (2002).

34. Ellerbroek, S. M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res.* 61, 1855-1861 (2001).

35. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer *Nature* 434, 843-850 (2005).

36. Mann, B. et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human

colorectal carcinomas *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 16031608 (1999).

37. Staal, F. J. et al. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion *J.Immunol.* 172, 10991108 (2004).

38. Burton, E. C. & Prados, M. D. Malignant gliomas *Curr.Treat.Options.Oncol.* 1, 459-468 (2000).

39. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas *Acta Neuropathol.(Berl)* 109, 93-108 (2005).

40. Valente, P. et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int.J.Cancer* 75, 246-253 (1998).

41. Zuliani, C. et al. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death.Differ.* 13, 31-40 (2006).

42. Demjen, D. et al. Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat.Med.* 10, 389-395 (2004).

43. Martin-Villalba, A. et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1 L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19, 3809-17 (1999).

44. Martin-Villalba, A. et al. Therapeutic neutralization of CD95L and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death and Differentiation* 8, 679- 686 (2001).

45. Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 120-129 (2000).
46. Trauth, B. C. et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-5 (1989).
47. Scaffidi, C, Medema, J. P., Krammer, P. H., & Peter, M. E. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 272, 26953-8 (1997).
48. Ninck, S. et al. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck *Int.J.Cancer* 106, 34-44 (2003).
49. Del Duca, D., Werbowetski, T., & Del Maestro, R. F. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion *J.Neurooncol.* 67, 295-303 (2004).
50. Boggon, T.J. and Eck.M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927.
51. Cha, S.S., Shin.H.C, Choi.K.Y., and Oh1B-H. (1999). Expression, purification and crystallization of recombinant human TRAIL. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1101-4.
52. Choi, K., Benveniste.E.N., and Choi.C. (2003). Induction of intercellular adhesion molecule-1 by Fas ligation: proinflammatory roles of Fas in human astrogloma cells. *Neurosci. Lett.* 352, 21-24.

53. Cursi,S., RufiniA, Stagni.V., Condo.l., Matafora.V., Bachi.A., Bonifazi.A.P., Coppola.L., Superti-Furga.G., Testi.R., and Barila.D. (2006). Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J.* 25, 1895-1905.
54. Daigle,l., Yousefi.S., Colonna.M., Green, D.R., and Simon.H.U. (2002). Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat. Med.* 8, 61-67.
55. Eck,M.J. and Sprang.S.R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264, 17595-605.
56. Eischen,C.M., Dick.C.J., and Leibson.P.J. (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 153, 1947-54.
57. Fan,X., Aalto.Y., Sanko.S.G., Knuutila.S., Klatzmann.D., and Castresana.J.S. (2002). Genetic profile, PTEN mutation and therapeutic role of PTEN in glioblastomas. *Int. J. Oncol.* 21, 1141-1150.
58. Feig,C., Tchikov.V., Schutze.S., and Peter.M.E. (2007). Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.* 26, 221-231.
59. Fumari,F.B., Lin, H., Huang.H.S., and Cavenee.W.K. (1997). Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12479-12484.

60. Gulbins,E., Hermission.M., Brenner.B., Grassme.H.U., Linderkamp.O., Dichgans.J., Weller.M., and Lang.F. (1998). Cellular stimulation via CD95 involves activation of phospho-inositide-3-kinase. *Pflugers Arch.* 435, 546- 554.
61. Guthe,S., Kapinos.L, Moglich.A.. Meier.S., Grzesiek.S., and Kieffhaber.T. (2004). Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibritin. *J. Mol. Biol.* 337, 905-915.
62. Hymowitz,S.G., Christinger.H.W., Fuh.G., Ultsch.M., O'Connell.M., Kelley.R.F., Ashkenazi.A., and de Vos.A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5 [In Process Citation]. *Mol Cell* 4, 563-71.
63. Kugler,W., Erdlenbruch.B., Junemann.A., Heinemann.D., Eibl.H., and Lakomek.M. (2002). Erucylphosphocholine-induced apoptosis in glioma cells: involvement of death receptor signalling and caspase activation. *J. Neurochem.* 82, 1160-1170.
64. Madrid,L.V., Wang.C.Y., Guttridge. D.C, Schottelius. A.J., Baldwin. A.S., Jr., and Mayo.M.W. (2000). Akt suppresses apoptosis by stimulating the trans activation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* 20, 1626-1638.
65. Meier,S., Guthe.S., Kieffhaber.T., and Grzesiek. S. (2004). Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibritin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable beta-hairpin: atomic details of trimer dissociation and local beta-hairpin stability from residual dipolar couplings 1. *J. Mol. Biol.* 344, 1051-1069.

66. Ozes,O.N., Mayo.L.D., Gustin.JA, Pfeffer.S.R., Pfeffer.LM., and Donner.D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.
67. Park.CM., Park.M.J., Kwak.H.J., Lee.H.C, Kim.M.S., Lee.S.H., Park.l.C, Rhee.C.H., and Hong.S.I. (2006). Ionizing Radiation Enhances Matrix Metalloproteinase-2 Secretion and Invasion of Glioma Cells through Src/Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated p38/Akt and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathways. *Cancer Res.* 66, 8511-8519.
68. Patt,S. and Cervos-Navarro.J. (1992). Combined erbB gene overexpression and decreased H-ras gene expression in human gliomas. *Acta Histo chem. Suppl* 42, 131-138.
69. Schlottmann,K.E., Gulbins.E., Lau.S.M., and Coggeshall.K.M. (1996). Activation of Srcfamily tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 60, 546-554.
70. Thomas,S.M. and Brugge.J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.
71. Wong, B. R., Besser.D., Kim, N., Arron.J.R., Vologodskaia.M., Hanafusa.H., and Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signalling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* 4, 1041-1049.
72. Karmakar,S., Weinberg.M.S., Banik.N.L, Patel.S.J., and Ray.S.K. (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma

T98G and U87MG cells treated with sulforaphane.
Neuroscience 141, 1265-1280.

73. Kleber, S. "Gamma-Bestrahlung fuhrt zur CD95-abhâangiger Invasivitât in apoptoseresistenten Glioblastomzellen." 3 janeiro 2006, Dissertation, Heidelberg.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum
 Universitätsklinikum Heidelberg
 <120> Neutralização da atividade de blocos de inibição CD45 de células glioblastoma
 <130> 41373P WO/2008Crm
 <150> US 68/877, 367
 <151> 2008-12-28
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 400
 <212> 887
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Sig.Bsq.
 <222> {1} .. {181}
 <220>
 <221> CD45R-ECB
 <222> {171} .. {1721}
 <220>
 <221> IgG1-Fc
 <222> {1733} .. {4000}
 <400> 1
 Met Val Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
 20 25 30
 Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Val Glu Thr Gln Asn
 35 40 45
 Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
 50 55 60
 Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gln Asp Glu Pro
 65 70 75 80
 Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Tyr Thr Asp Lys Ala His
 85 90 95
 Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 100 105 110
 Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg

118	120	125
Cys Lys Pro Asn Phe Thr Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp		
130	135	135
Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr		
145	150	155
Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Cys Asp Lys Thr		
165	170	175
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
185	185	190
Val Phe Leu Thr Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
195	200	205
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
210	215	220
Gl Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
225	230	235
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
245	250	255
Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
260	265	270
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys His Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
275	280	285
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu		
290	295	300
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys		
305	310	315
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
325	330	335
Asn Gly Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
340	345	350
Ser Asp Glu Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
355	360	365
Arg Trp Glu Glu Glu Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu His		
375	375	380

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(21)
 <223> 2
 <224> ctgtgtaccc ttgcacccaa 2

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Primer
 <222> (3)..(21)
 <223> 3
 <224> ccaccccaaa gtttagatccg 3

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(29)
 <223> 4
 <224> atccatccaaag gaaatgcacaaat ccacccggaa

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(21)
 <223> 5
 <224> aasgtggccc atttccagg 5

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<230>		
<211>	Primer	
<222>	(1) .. (23)	
<400>	6	
	aaaggcaaggac aattccatcg gtg	23
<210>	7	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	<i>Homo sapiens</i>	
<220>		
<221>	Primer	
<222>	(1) .. (25)	
<400>	7	
	tccaaactcaaa ggtccatggc tctcg	25
<210>	8	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	<i>Homo sapiens</i>	
<220>		
<221>	Primer	
<222>	(1) .. (25)	
<400>	8	
	gttcccaaaaaac tactggaaag acttg	25
<210>	9	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	<i>Homo sapiens</i>	
<220>		
<221>	Primer	
<222>	(1) .. (15)	
<400>	9	
	gaaggccgggg gcaaa	15
<210>	10	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	<i>Homo sapiens</i>	
<220>		
<221>	Primer	
<222>	(1) .. (20)	
<400>	10	
	cgcggggcggt gattgacgac	20
<210>	11	

<211> 26	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> Primer	
<222> (1) .. (26)	
<403> 11	
ggcacacactt aaggaaatgc aaggat	26
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> Primer	
<222> (1) .. (21)	
<403> 12	
cgtatgtttt cgtatgtttt c	21
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> Primer	
<222> (1) .. (26)	
<403> 13	
agtgcaccccg caagggtgttc ttgtacc	26
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> Primer	
<222> (1) .. (23)	
<403> 14	
accacccatctt tttccatata ctttt	23
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> Primer	
<222> (1) .. (25)	
<403> 15	

Copyright © 2009 by Pearson Education, Inc.

10

«210» 16
«211» 26
«212» ~~0000~~
«213» ~~None~~ sapientes

<210> 17
<211> 18
<212> 2000
<213> *homo sapiens*

```
<320>
<331> Primer
<332> (3' . . 39)
<340> 3'
tagtagtagtag tagtagtagtag
```

```
<<110> 1$  
<<111> 2$  
<<112> 0$0$  
<<113> Home region
```

«220»
«221» **Pedman**
«222» (1) .. (20)

ANSWER

«210» 19
 «211» 20
 «212» ~~2000~~
 «213» ~~2000~~ ~~2000~~

Exercises

Ergonomics in Design

<210> 38
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

223

<221> Primer	
<222> (1)..(20)	
<400> 20	
ggttttcaactc tcggcgataa	39
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
.	
<230>	
<231> Primer	
<232> (1)..(24)	
<400> 21	
ggtcggagtc aacggatattg gtcg	24
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
.	
<230>	
<231> Primer	
<232> (1)..(22)	
<400> 22	
cctccgacgc ctgtttccaccc ac	22

Lisboa, 27 de Novembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Medicamento para uso no tratamento de um indivíduo com glioma de elevado grau, compreendendo um agente que neutraliza a atividade de recetor de CD95 através da prevenção do recetor CD95 se ligar a CD95L ou pela destruição do complexo recetor de CD95/CD95L, em que o agente é selecionado a partir de
 - (a) um anticorpo inibidor anti-CD95L ou um seu fragmento funcional,
 - (b) uma molécula de recetor CD95 solúvel ou uma sua porção de ligação de CD95L,
 - (c) um inibidor ligando de Fas selecionado a partir de FLINT, DcR3 ou seus fragmentos,
 - (d) um anticorpo que se liga a CD95 ou um seu fragmento funcional, e
 - (e) uma proteína de fusão compreendendo um domínio recetor de CD95 extracelular e um domínio Fc humano.
2. Medicamento para uso no tratamento de um indivíduo alto grau de glioma de acordo com a reivindicação 1, em que o agente é um composto que se liga a recetor de CD95.
3. Medicamento para uso no tratamento de um indivíduo com alto grau de glioma de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o composto é um anticorpo que se liga ao recetor CD95.
4. Medicamento para uso no tratamento de um indivíduo com alto grau de glioma de acordo com a reivindicação 1, em que o agente é um composto que se liga a um CD95L.

5. Medicamento para uso no tratamento de um indivíduo com alto grau de glioma de acordo com a reivindicação 4, em que o composto é um anticorpo que se liga a CD95L.
6. Medicamento para uso no tratamento de um indivíduo com alto grau de glioma de acordo com qualquer das reivindicações 1 até 5, em que o alto grau de glioma é um glioma de Grau IV da OMS.

Lisboa, 27 de Novembro de 2014

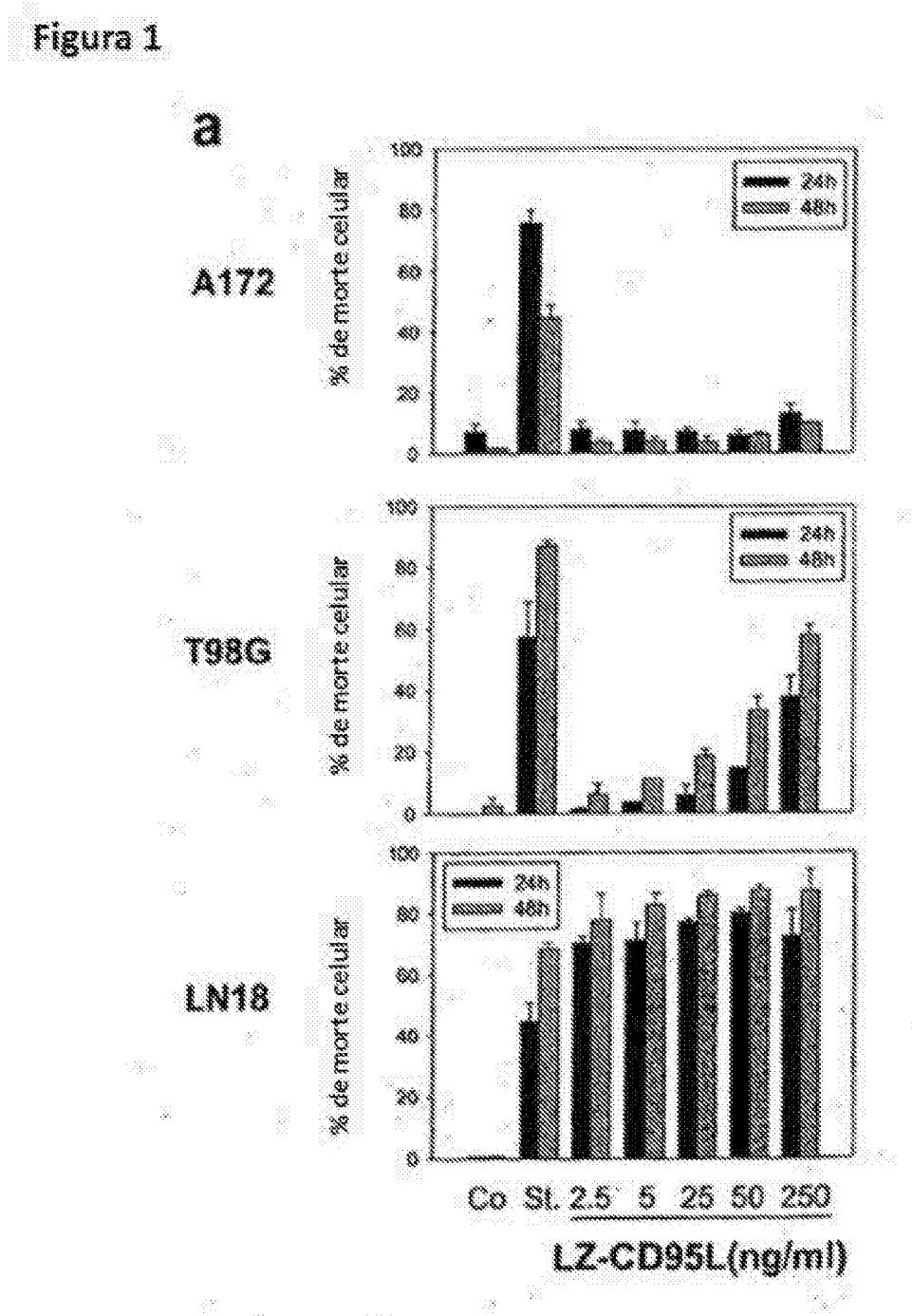
Figura 1

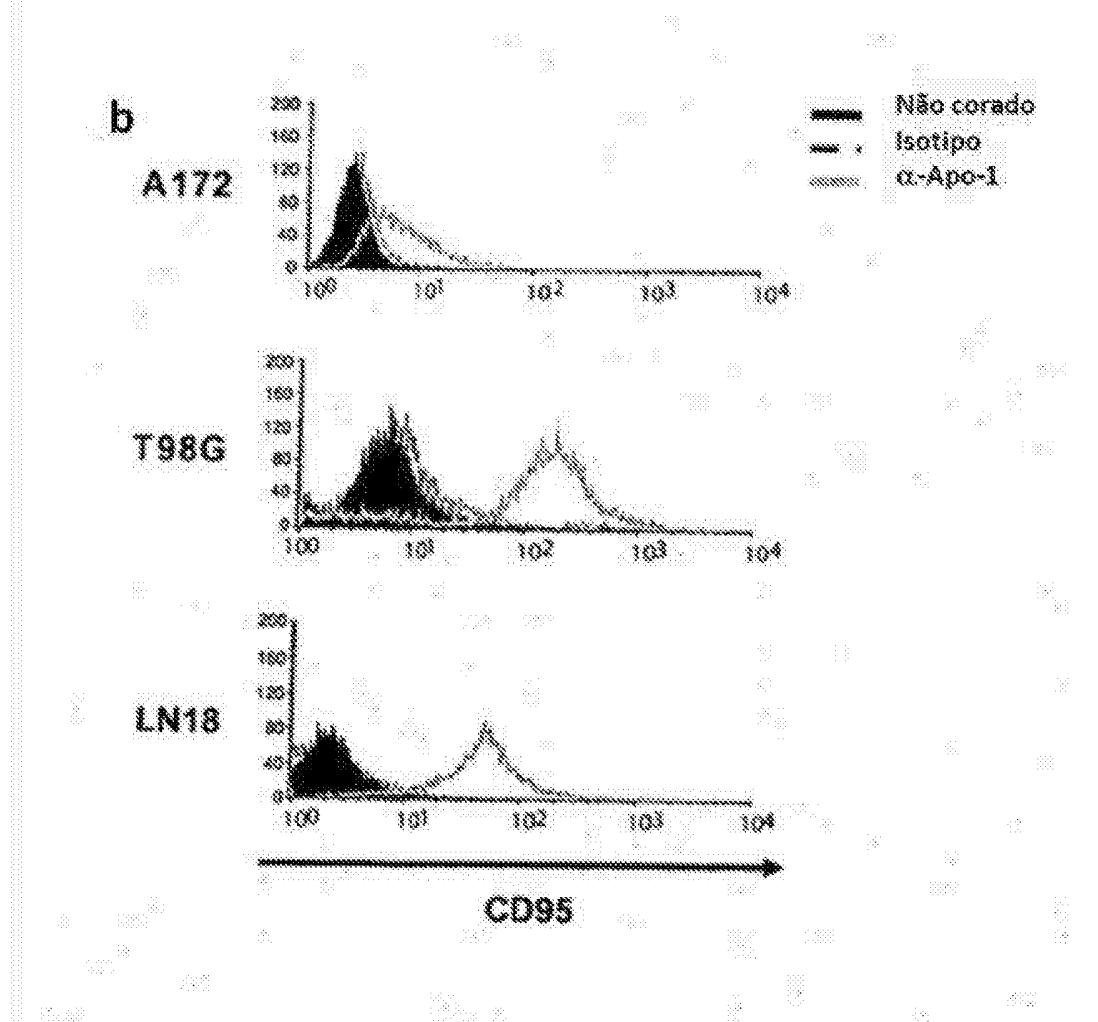
Figura 1 (continuação)

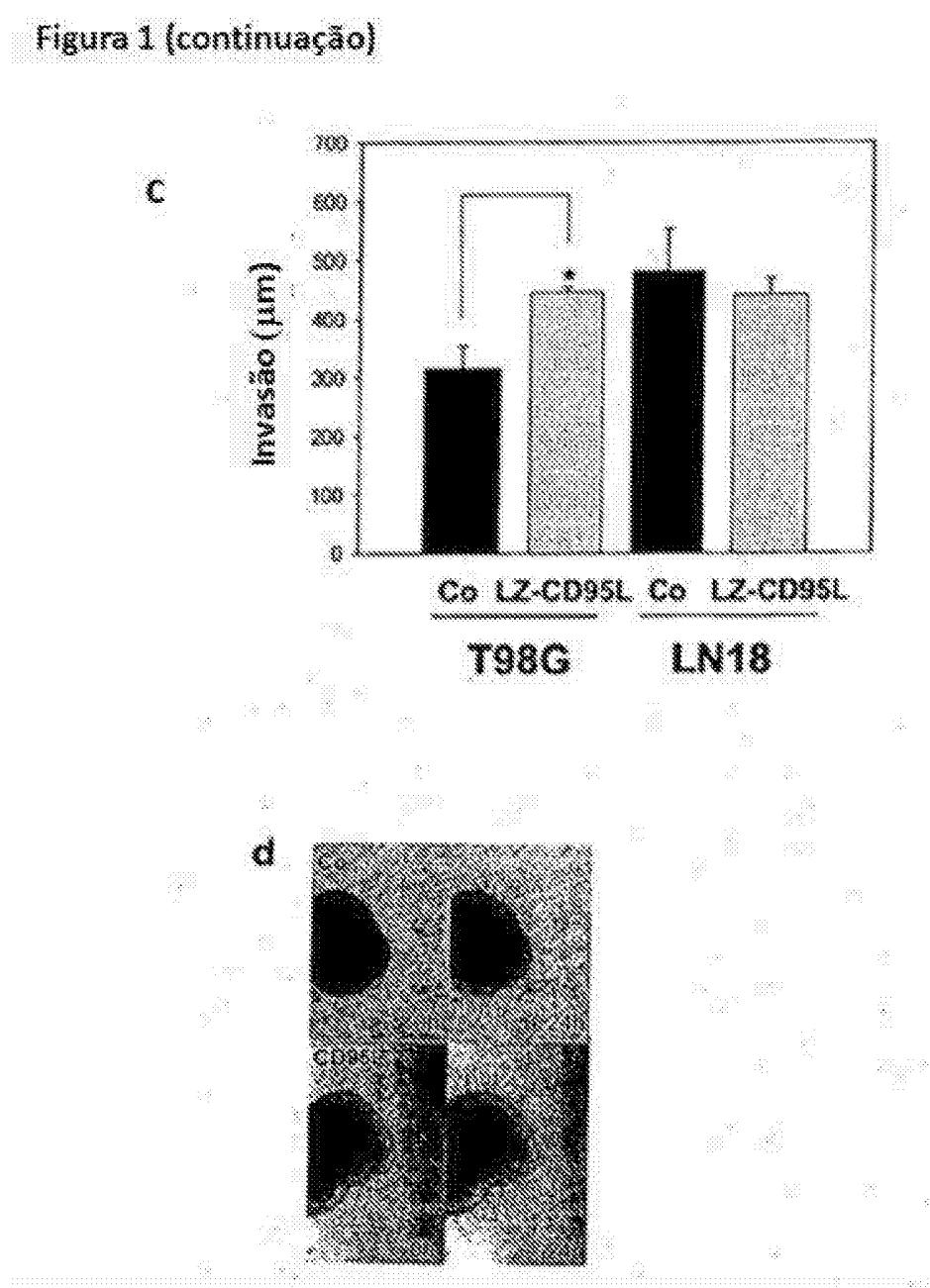
Figura 1 (continuação)

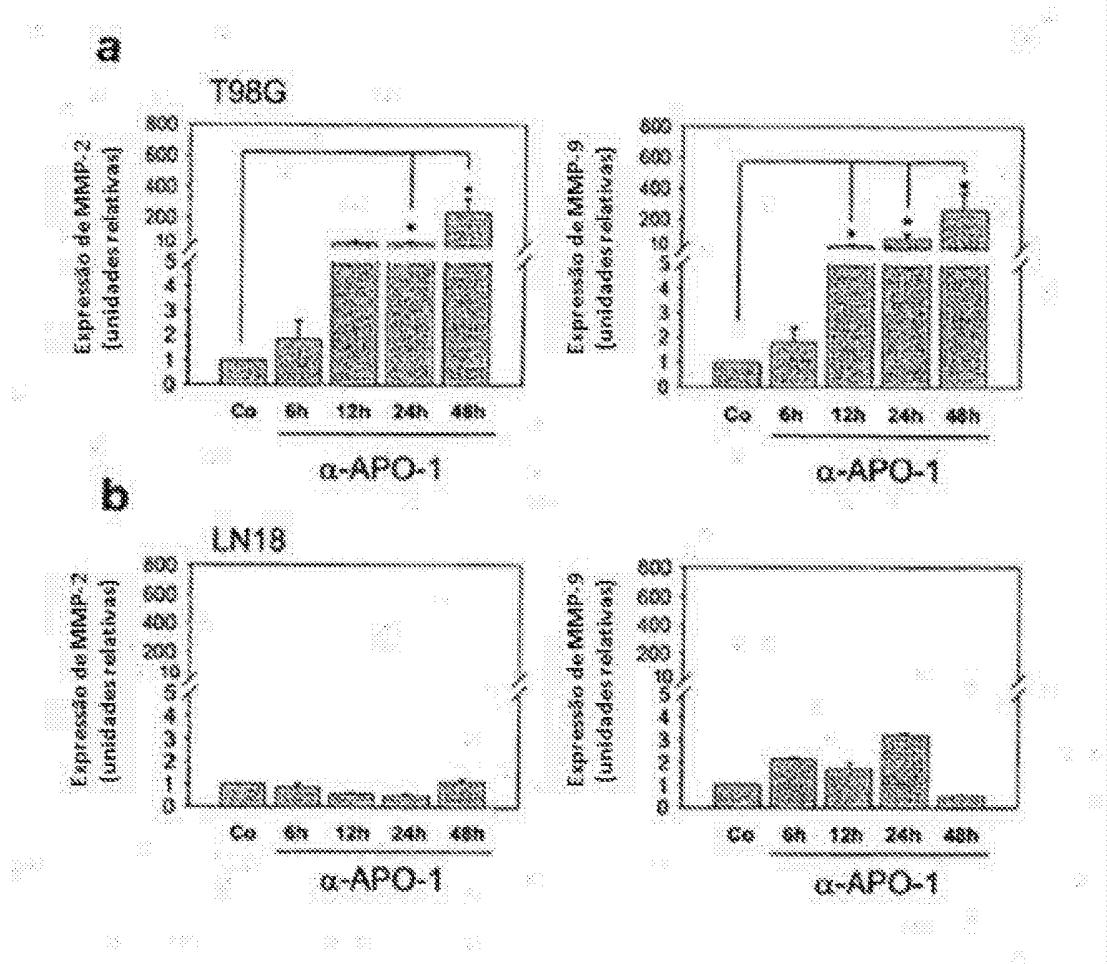
Figura 2

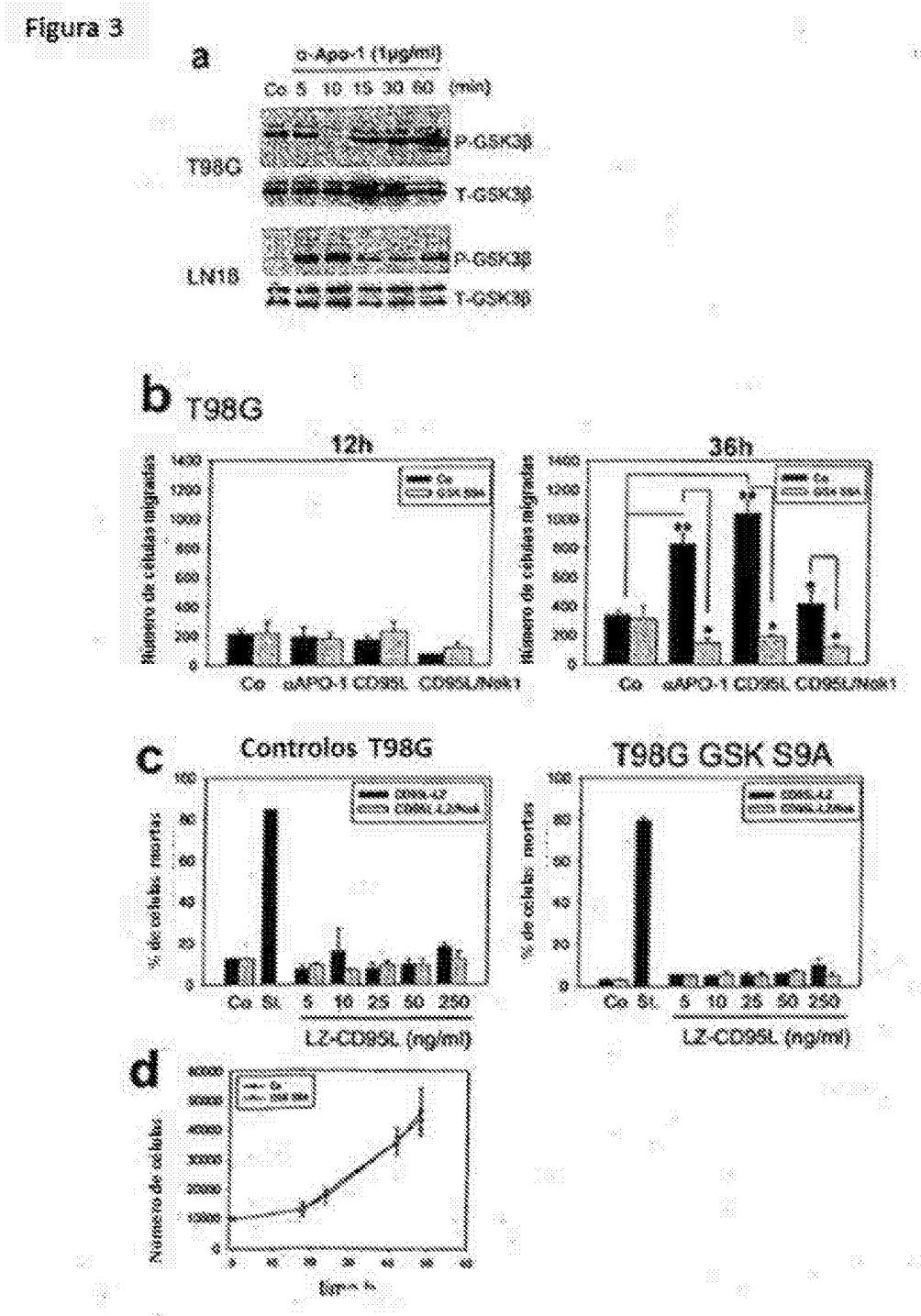
Figura 3

Figura 3 (continuação)

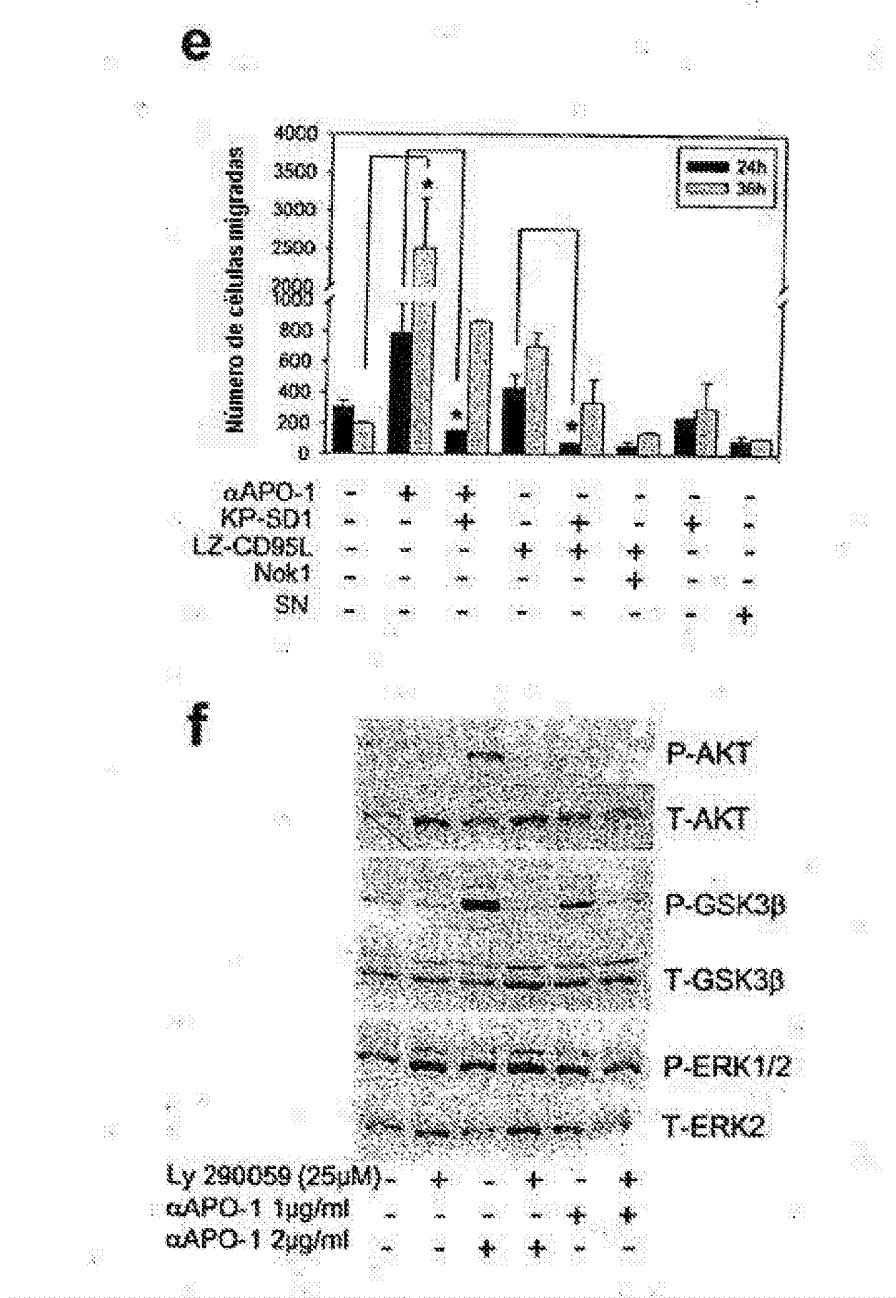


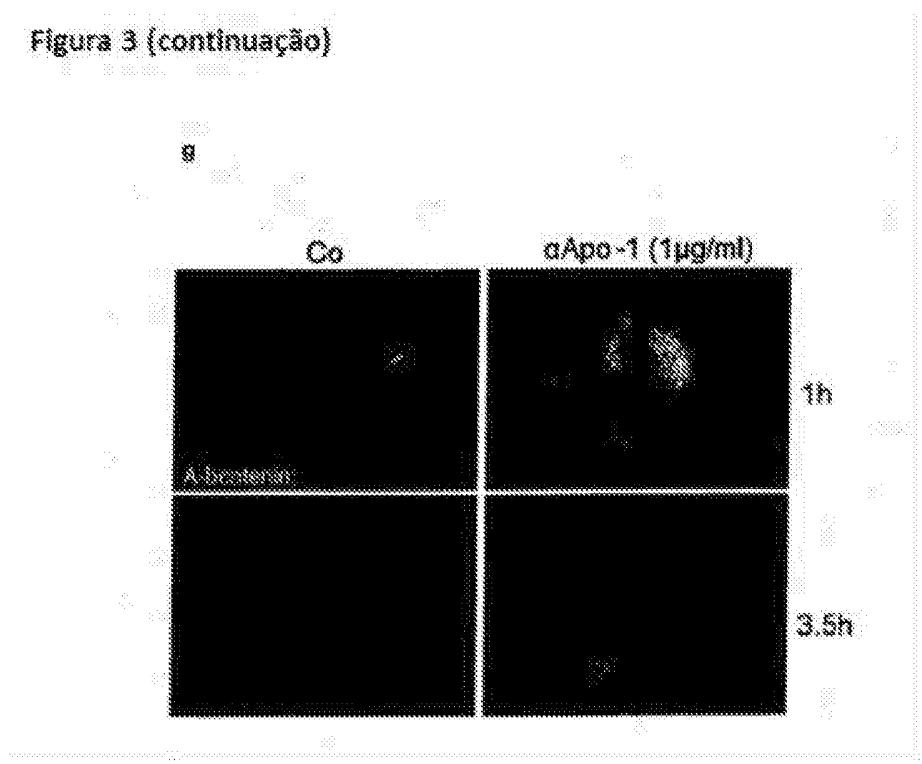
Figura 3 (continuação)

Figura 3 (continuação)

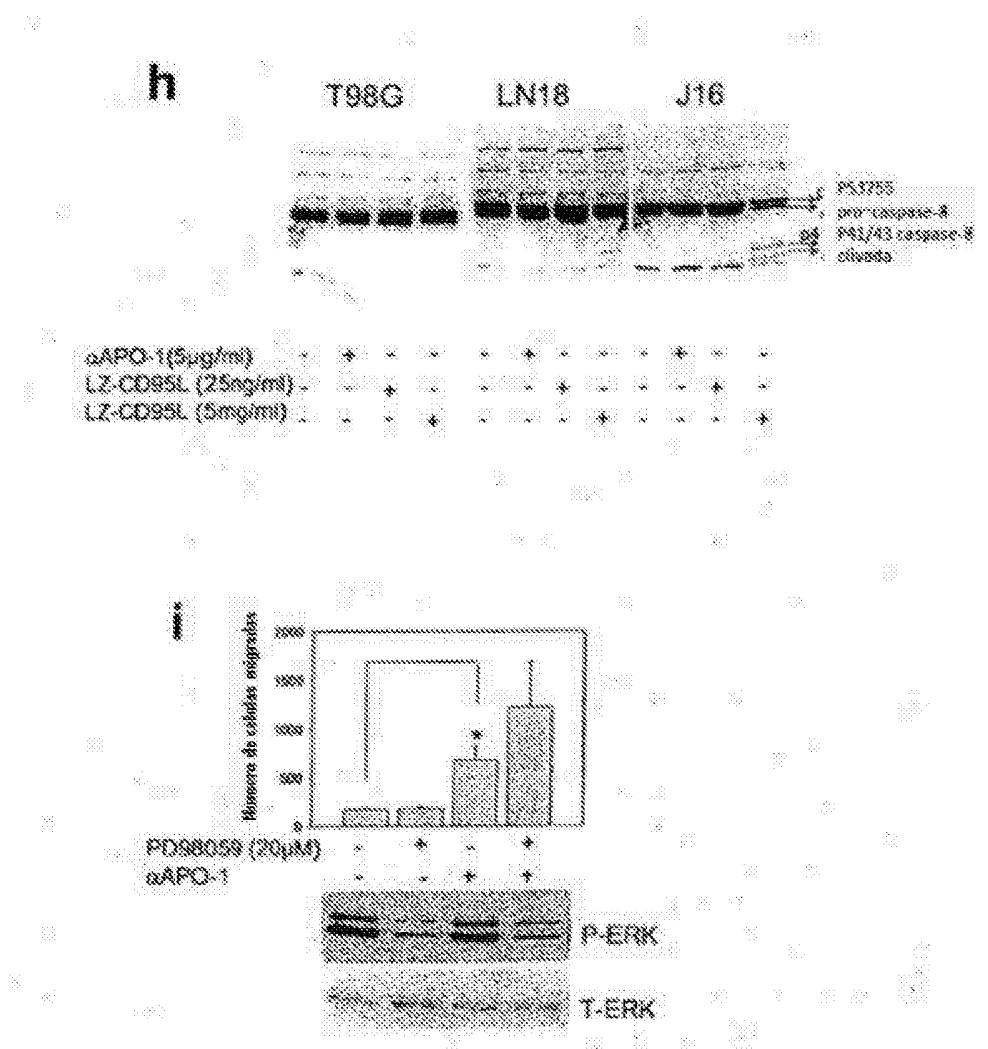


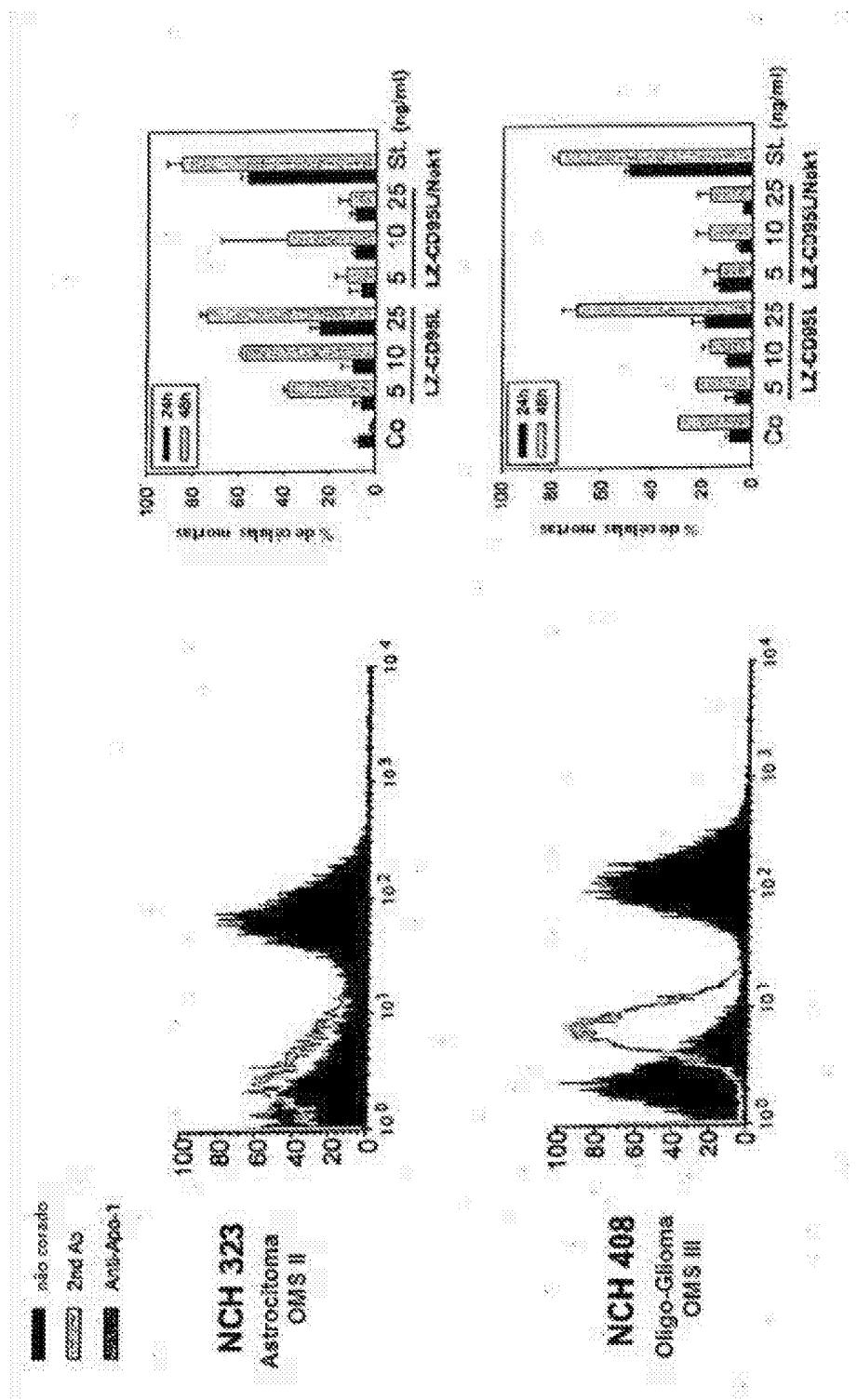
Figura 4

Figura 4 (continuação)

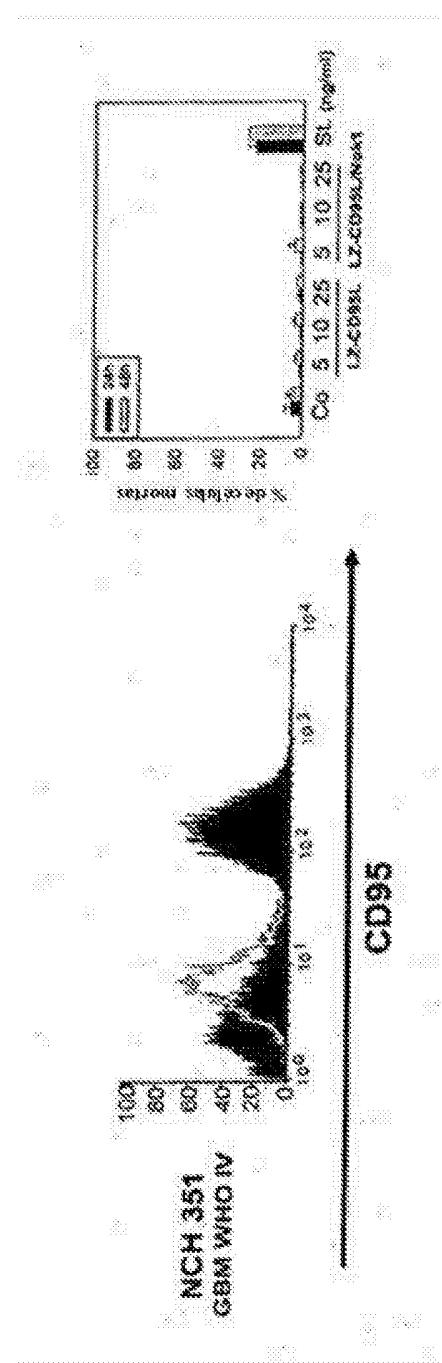


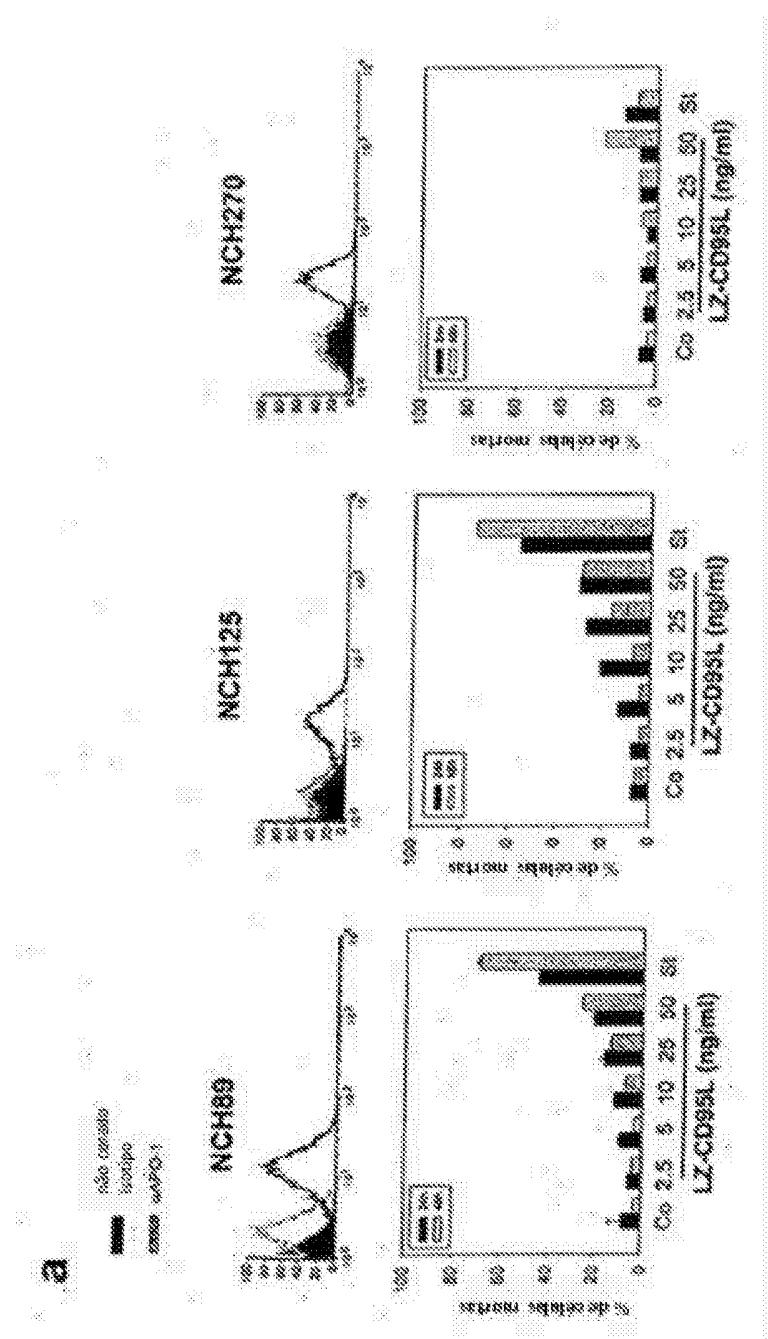
Figura 5

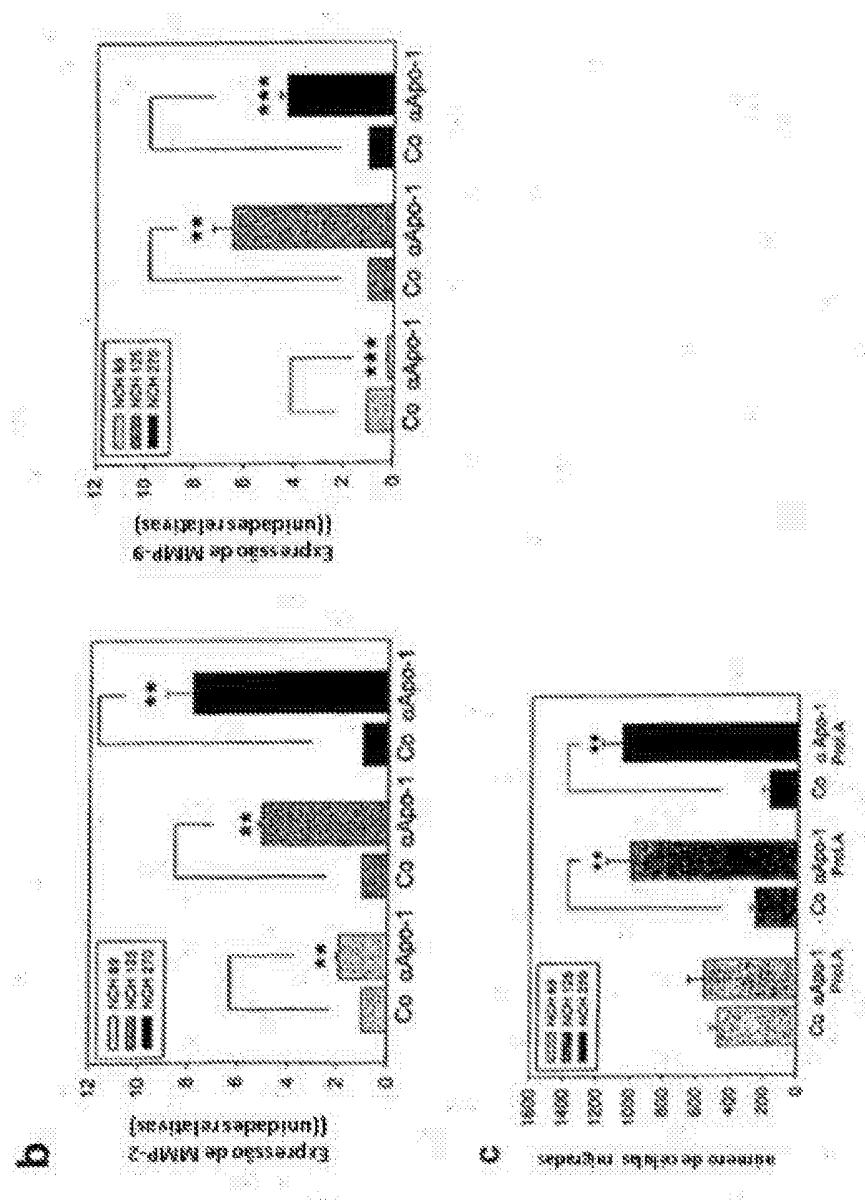
Figura 5 (continuação)

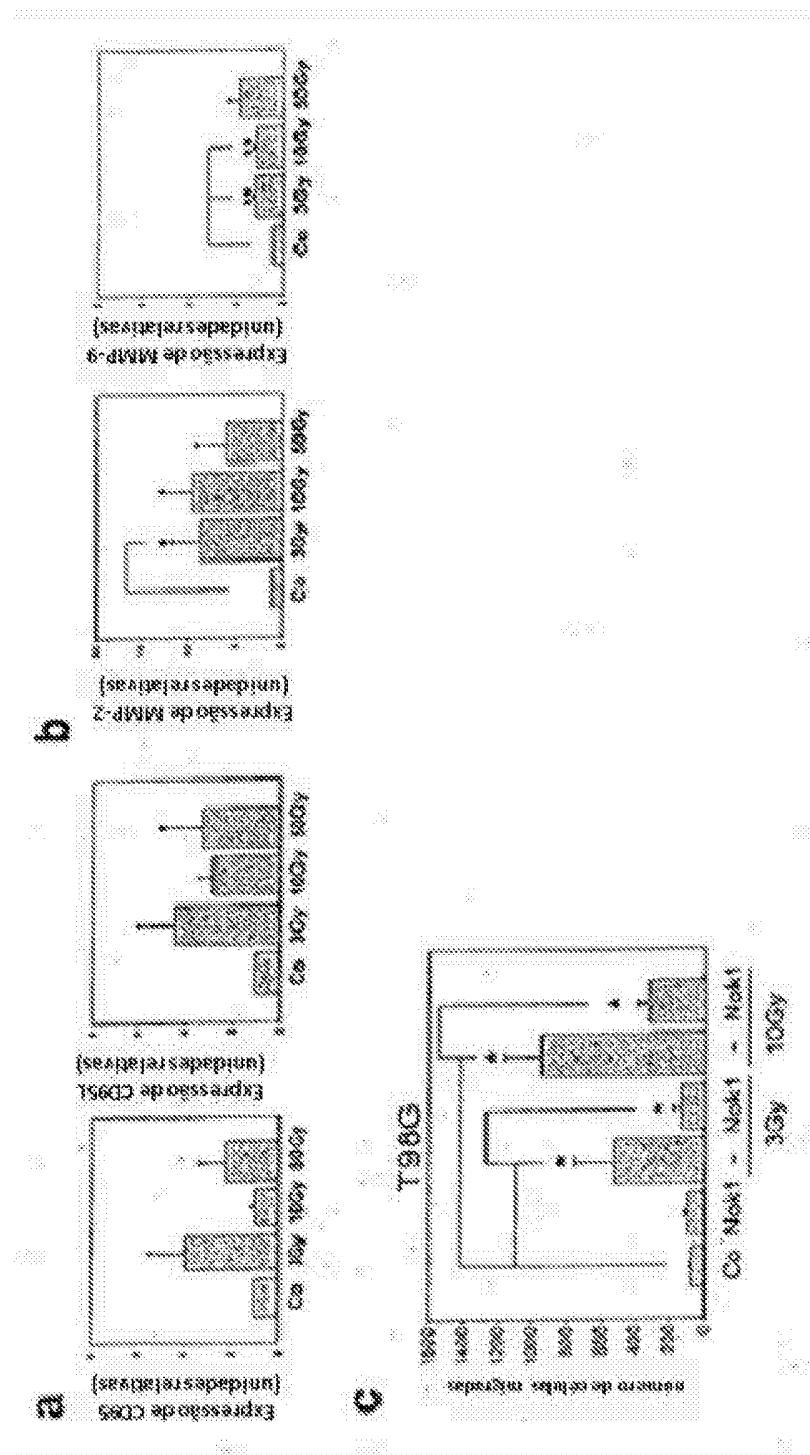
Figura 6

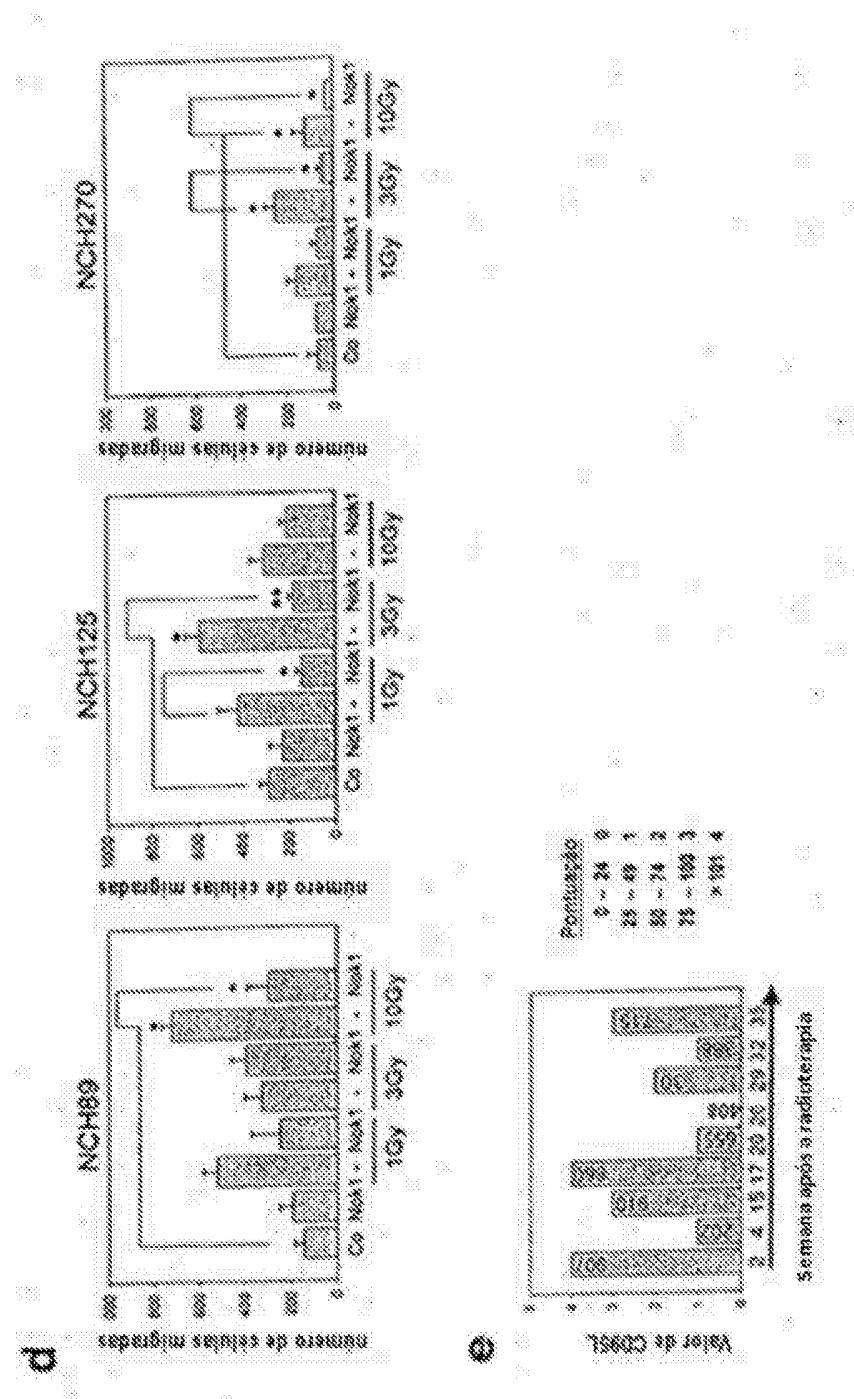
Figura 6 (continuação)

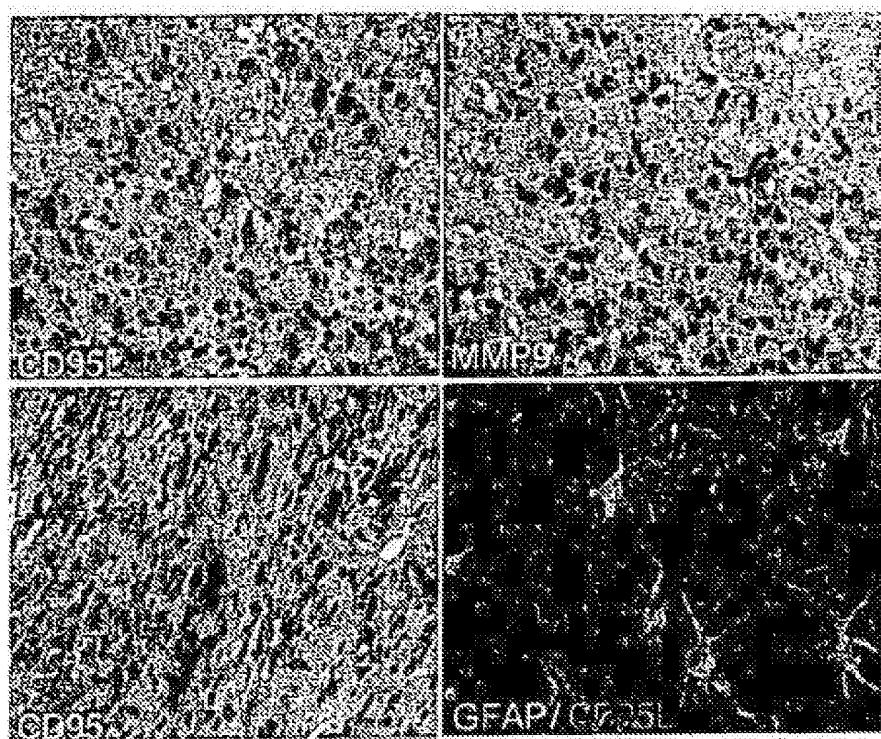
Figura 6 (continuação)

Figura 7

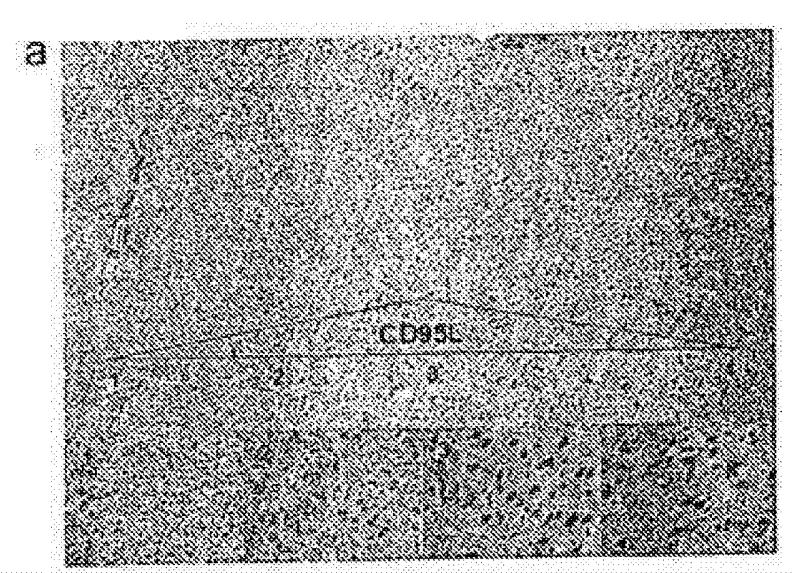


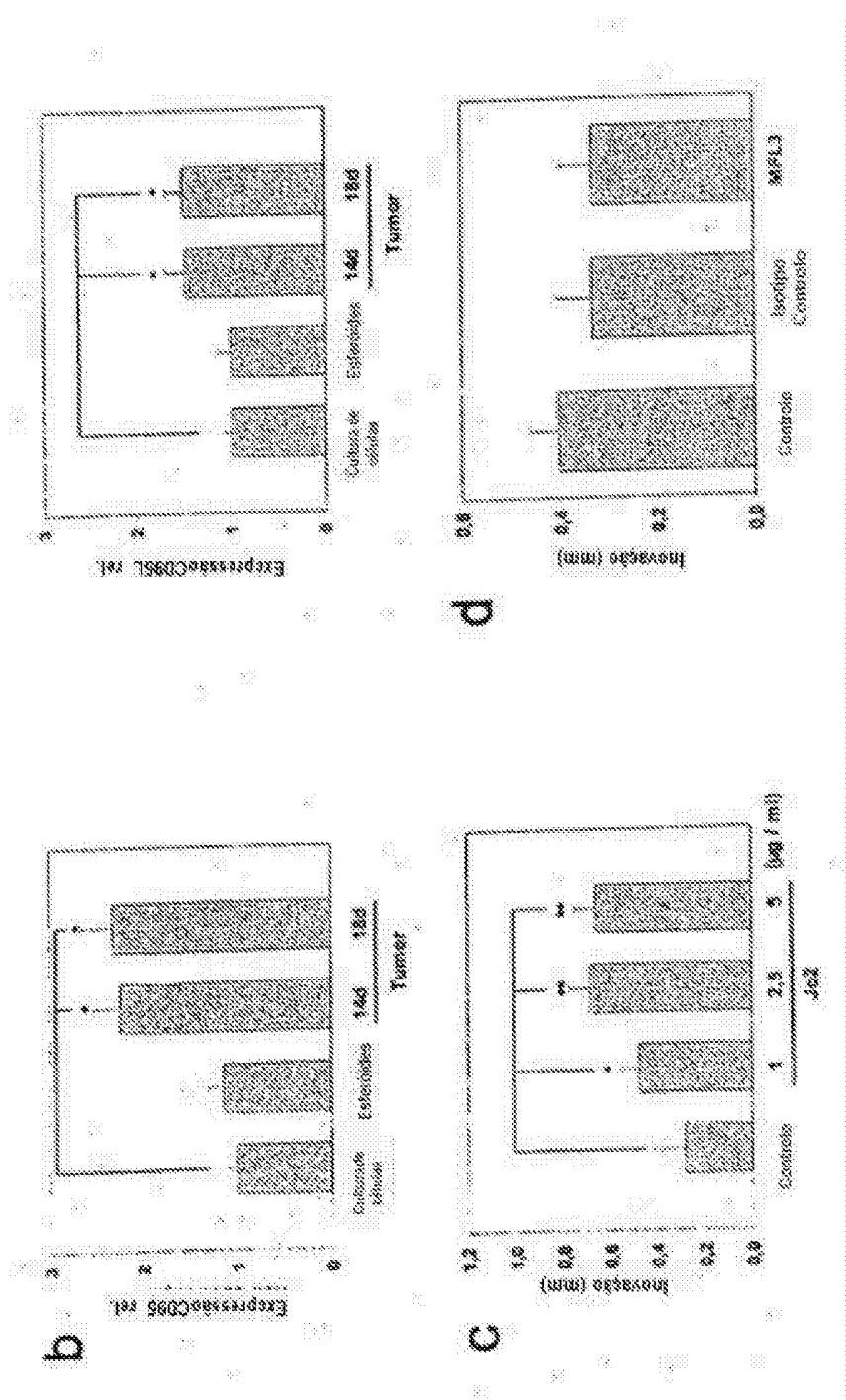
Figura 7 (continuação)

Figura 7 (continuação)

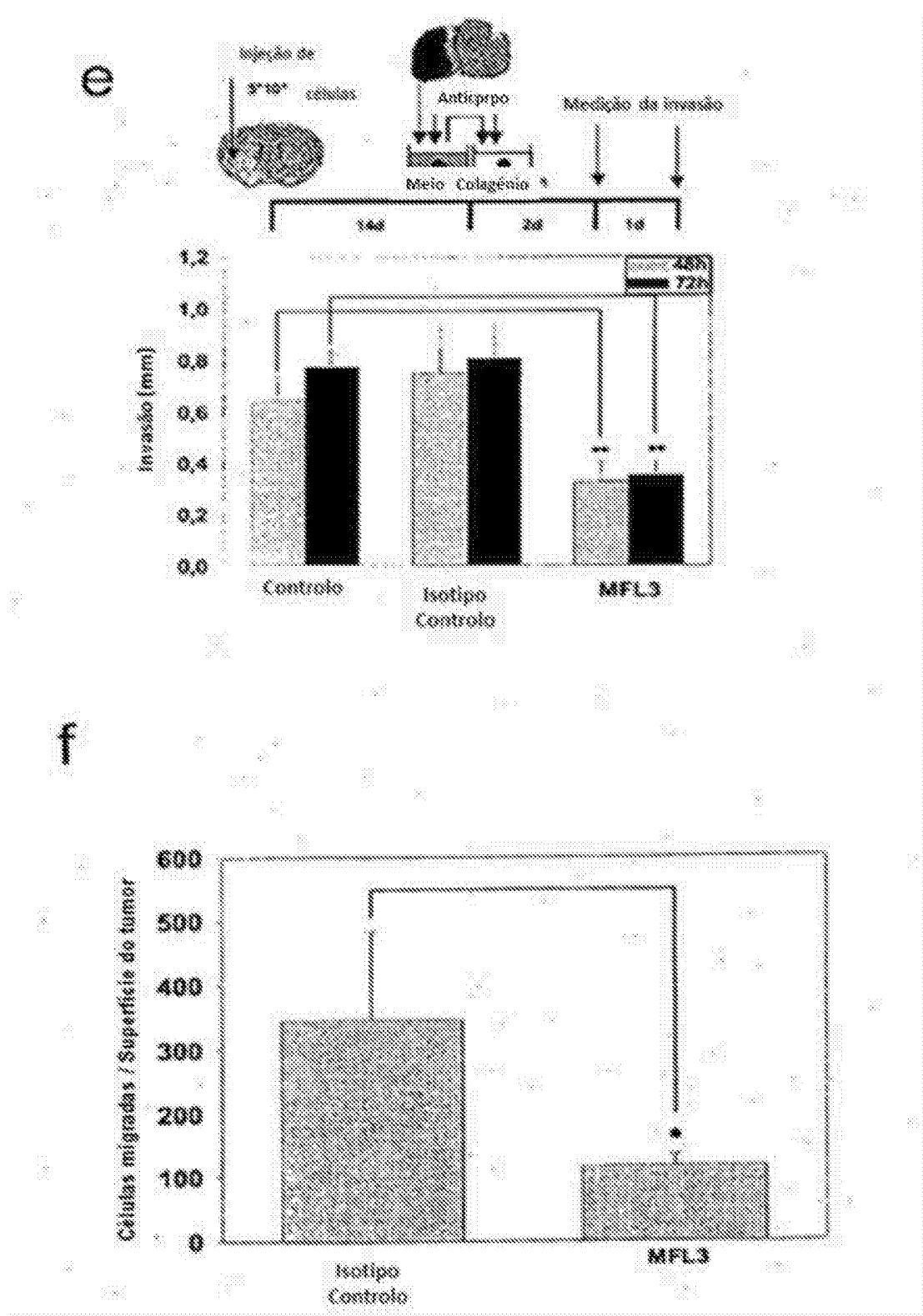


Figura 8

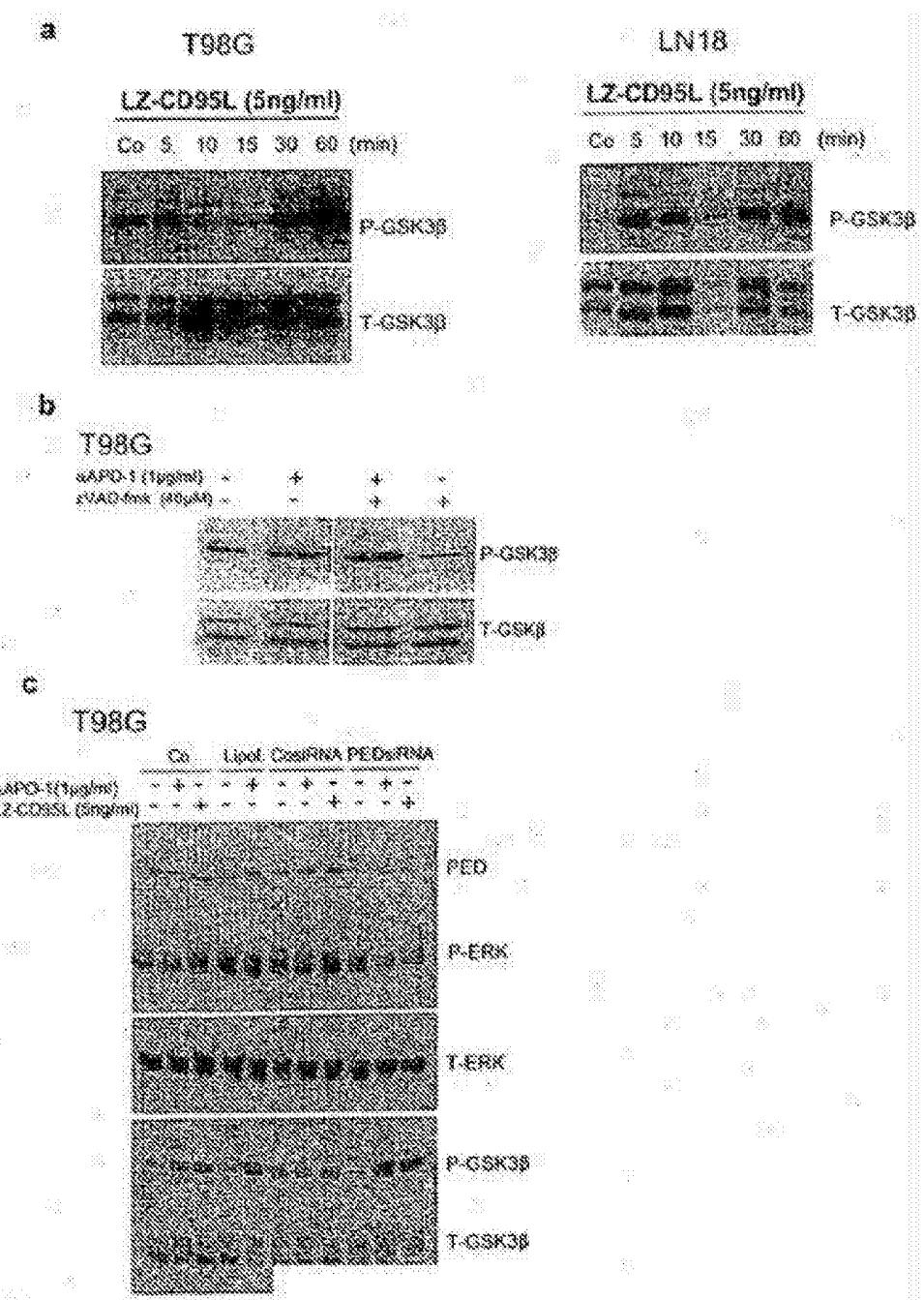


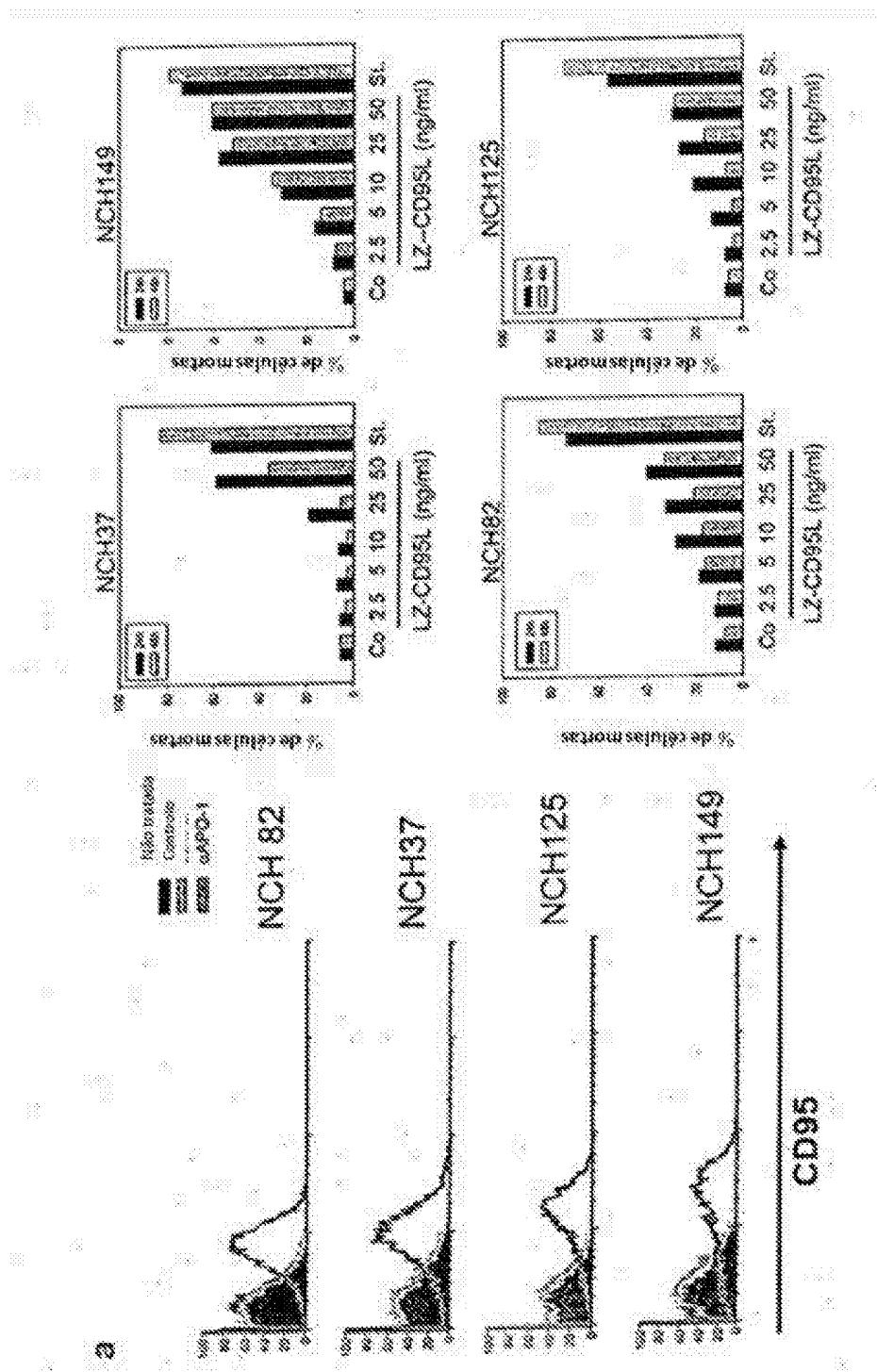
Figura 9 (continuação)

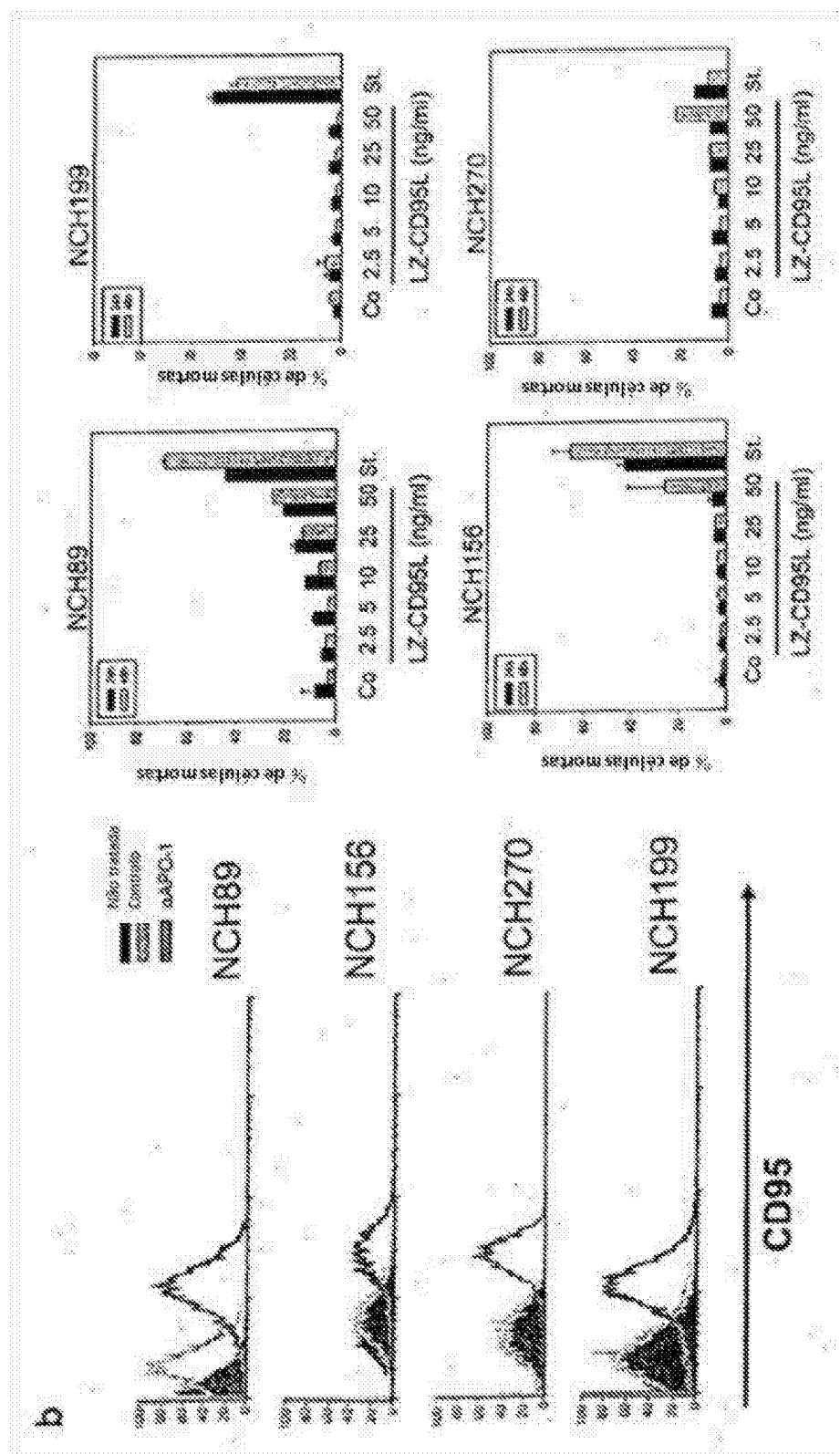
Figura 9 (continuação)

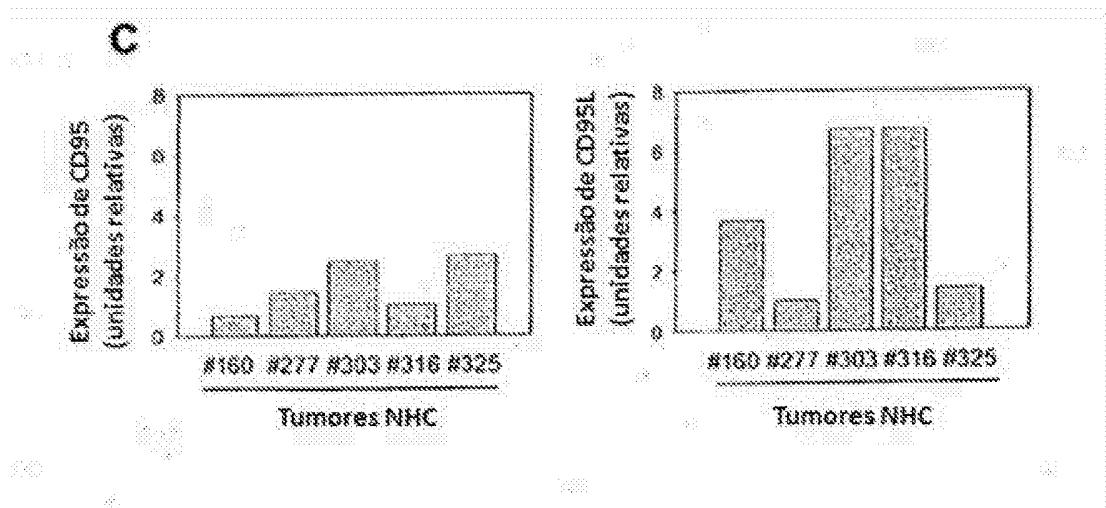
Figura 9 (continuação)

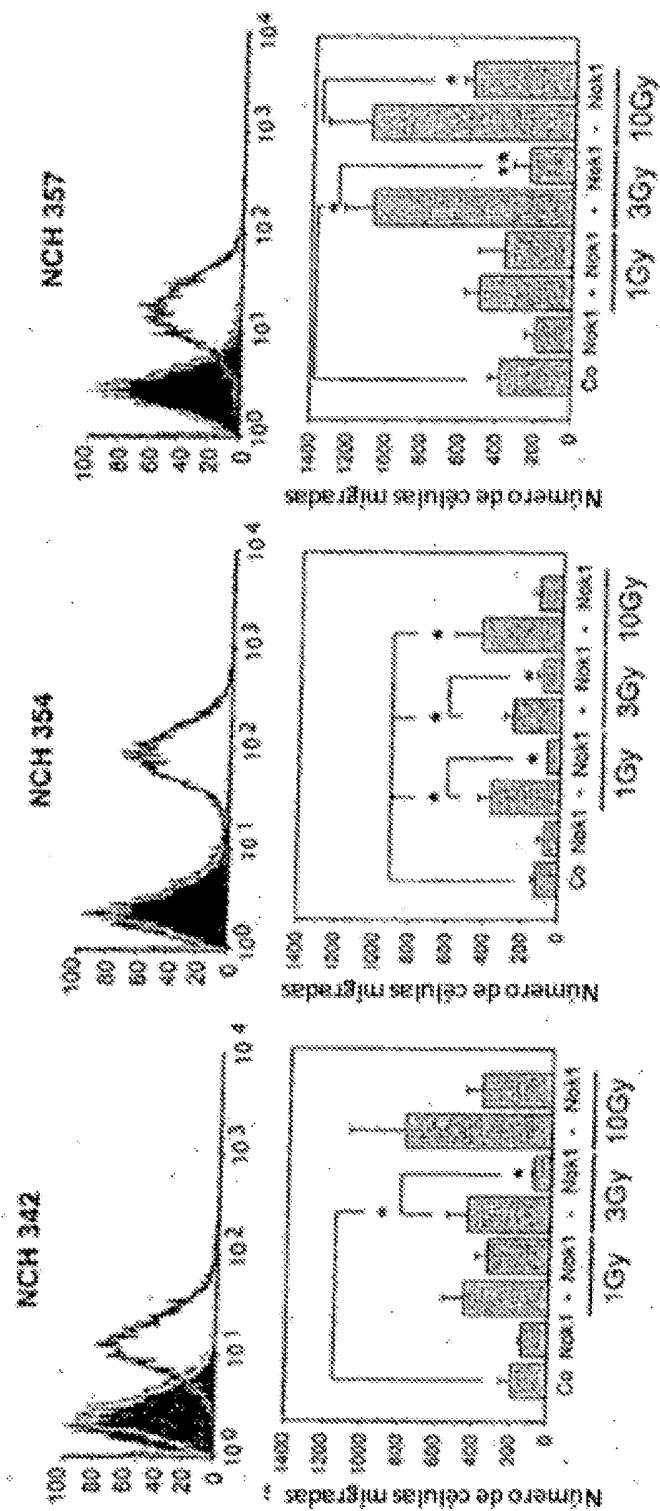
Figura 10

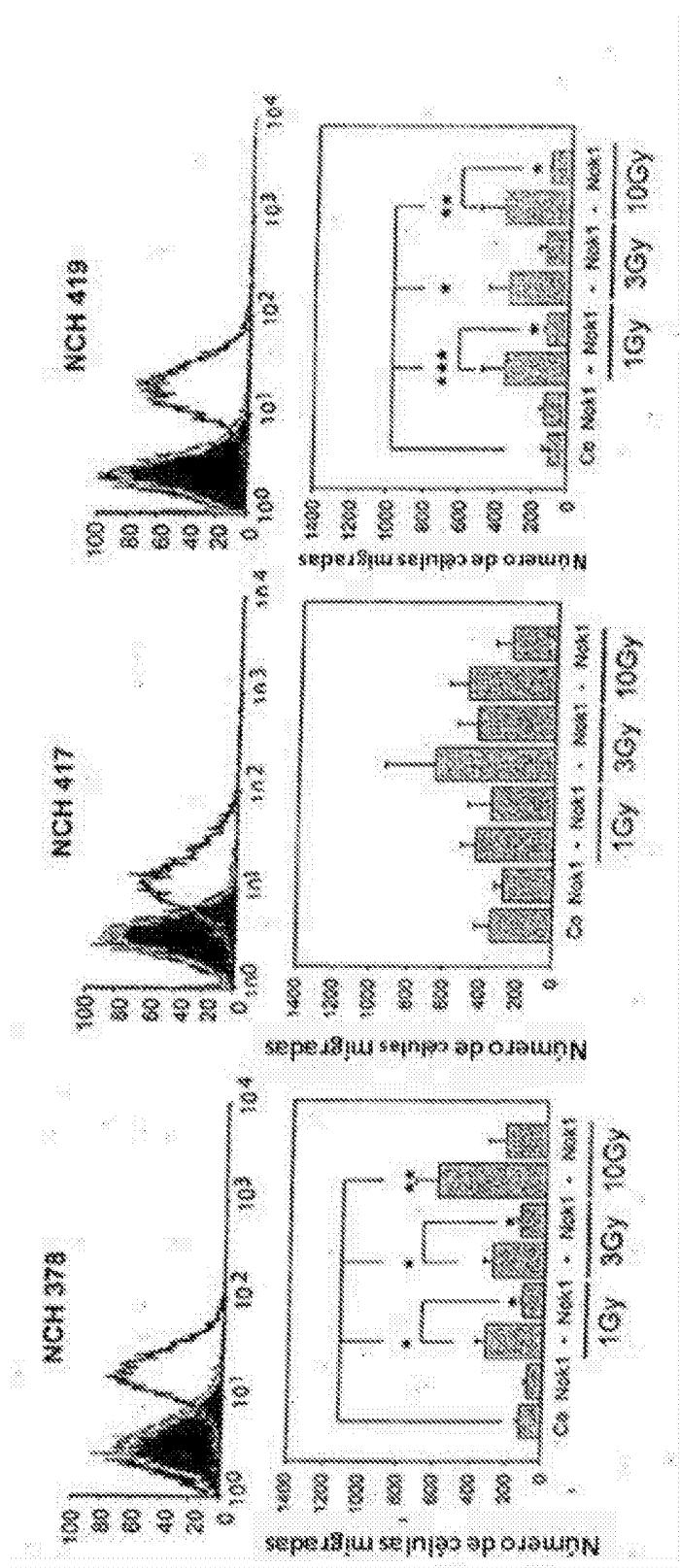
Figura 10 (continuação)

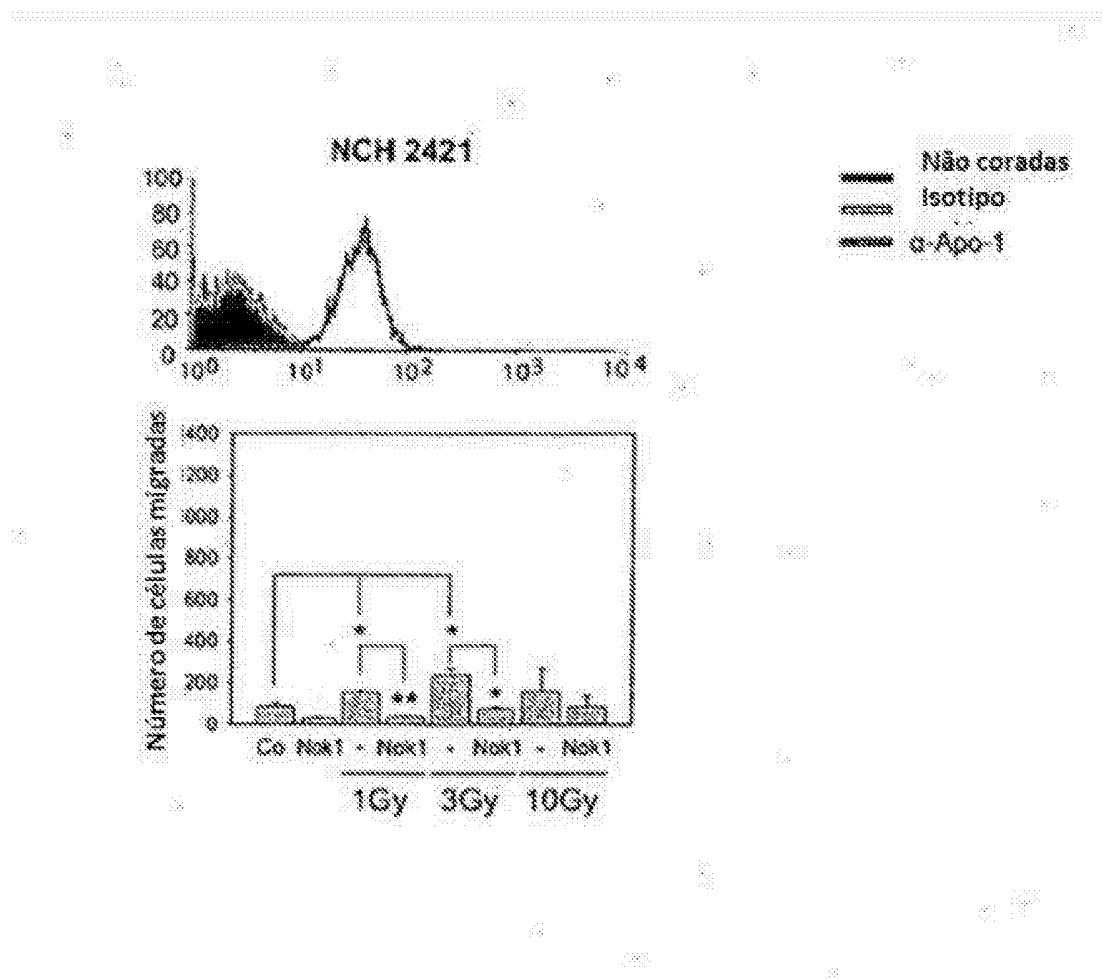
Figura 10 (continuação)

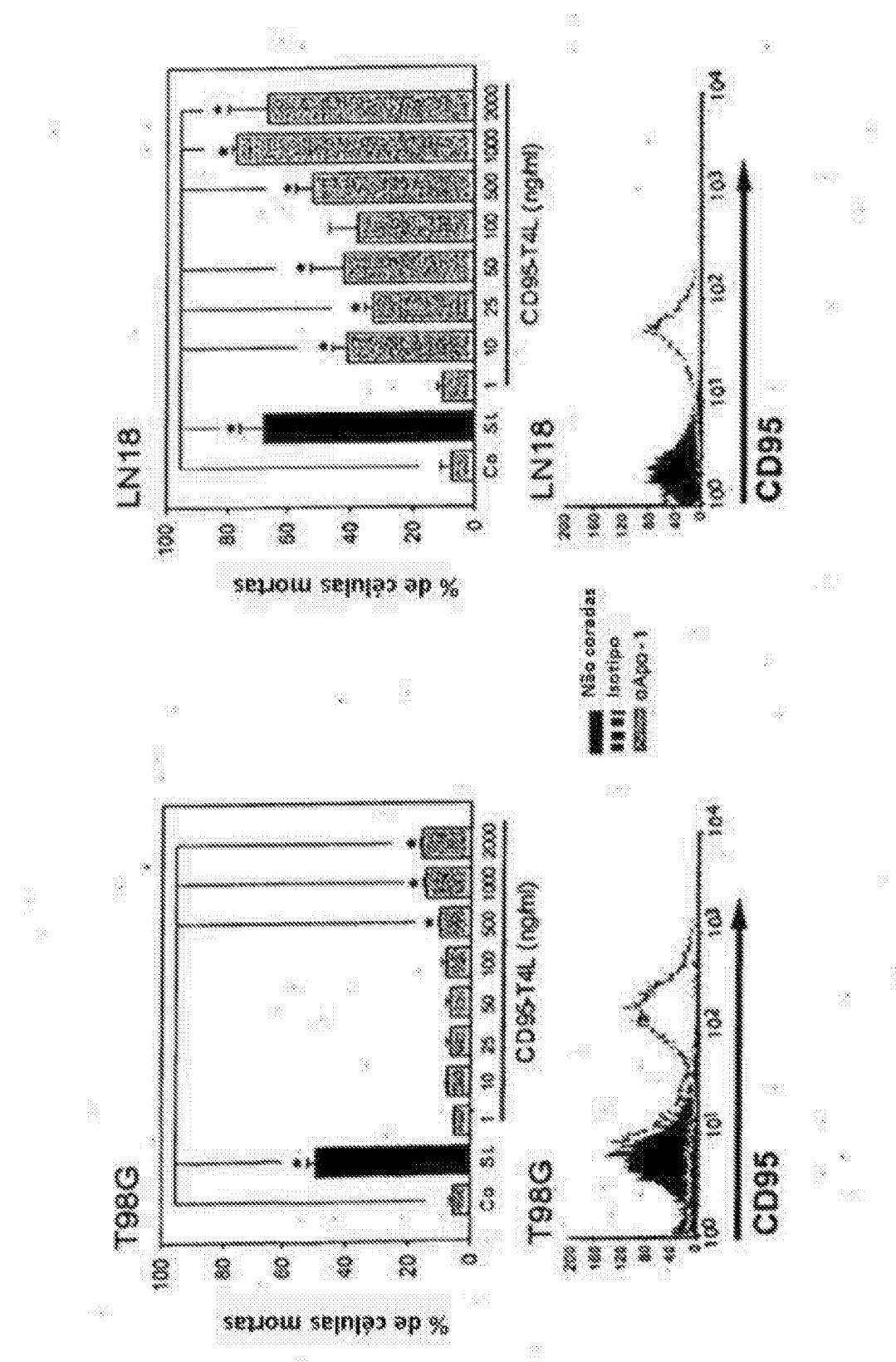
Figura 11

Figura 11 (continuação)

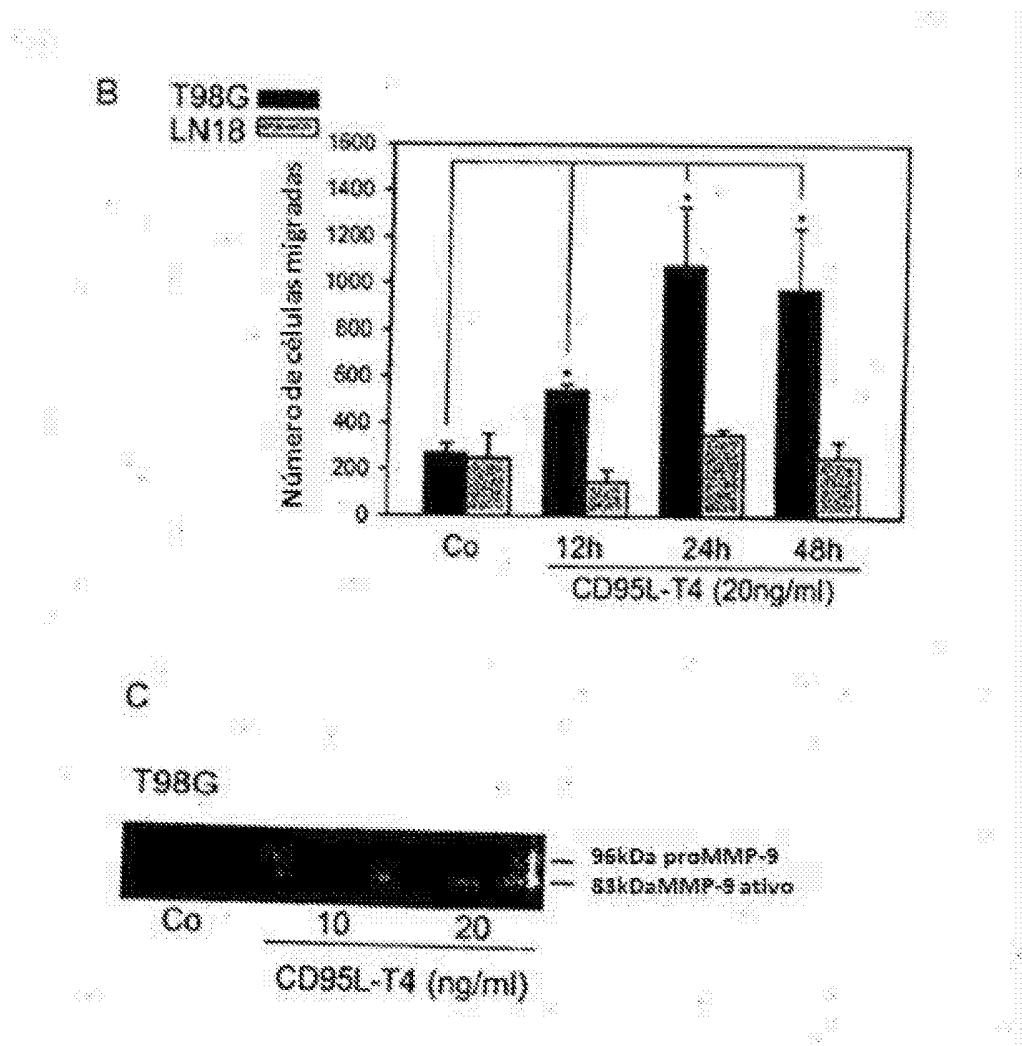


Figura 11 (continuação)

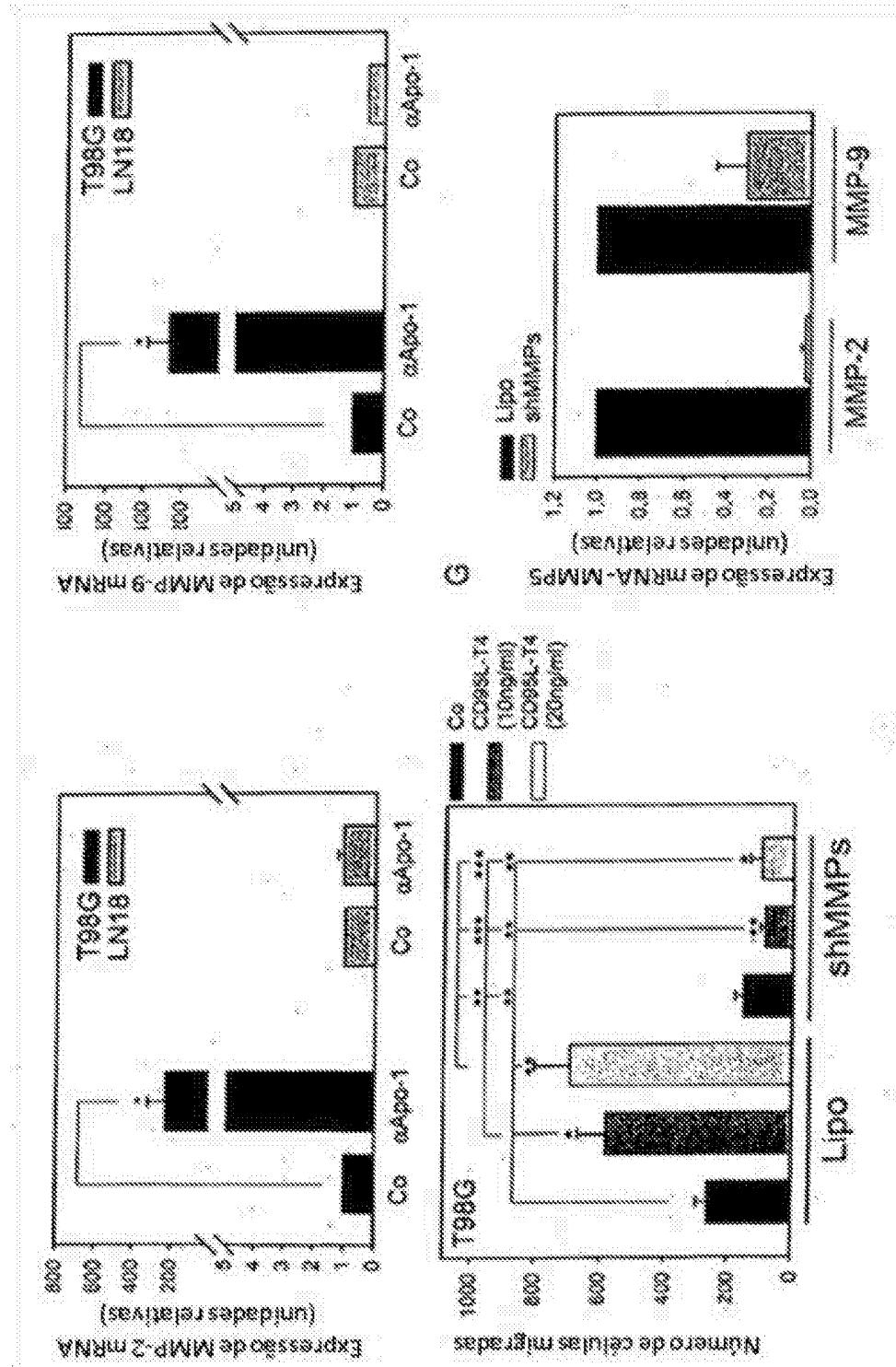


Figura 12

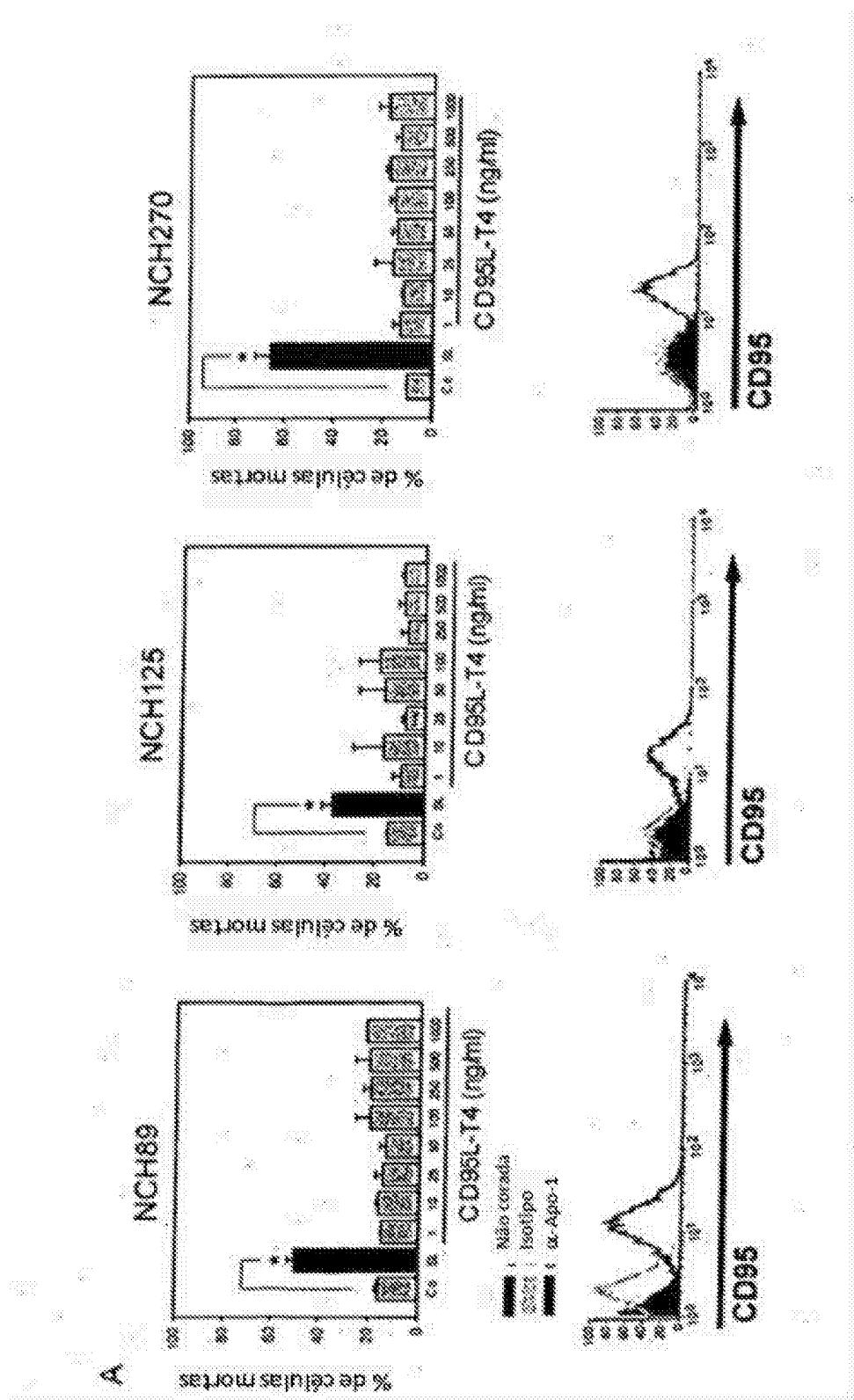


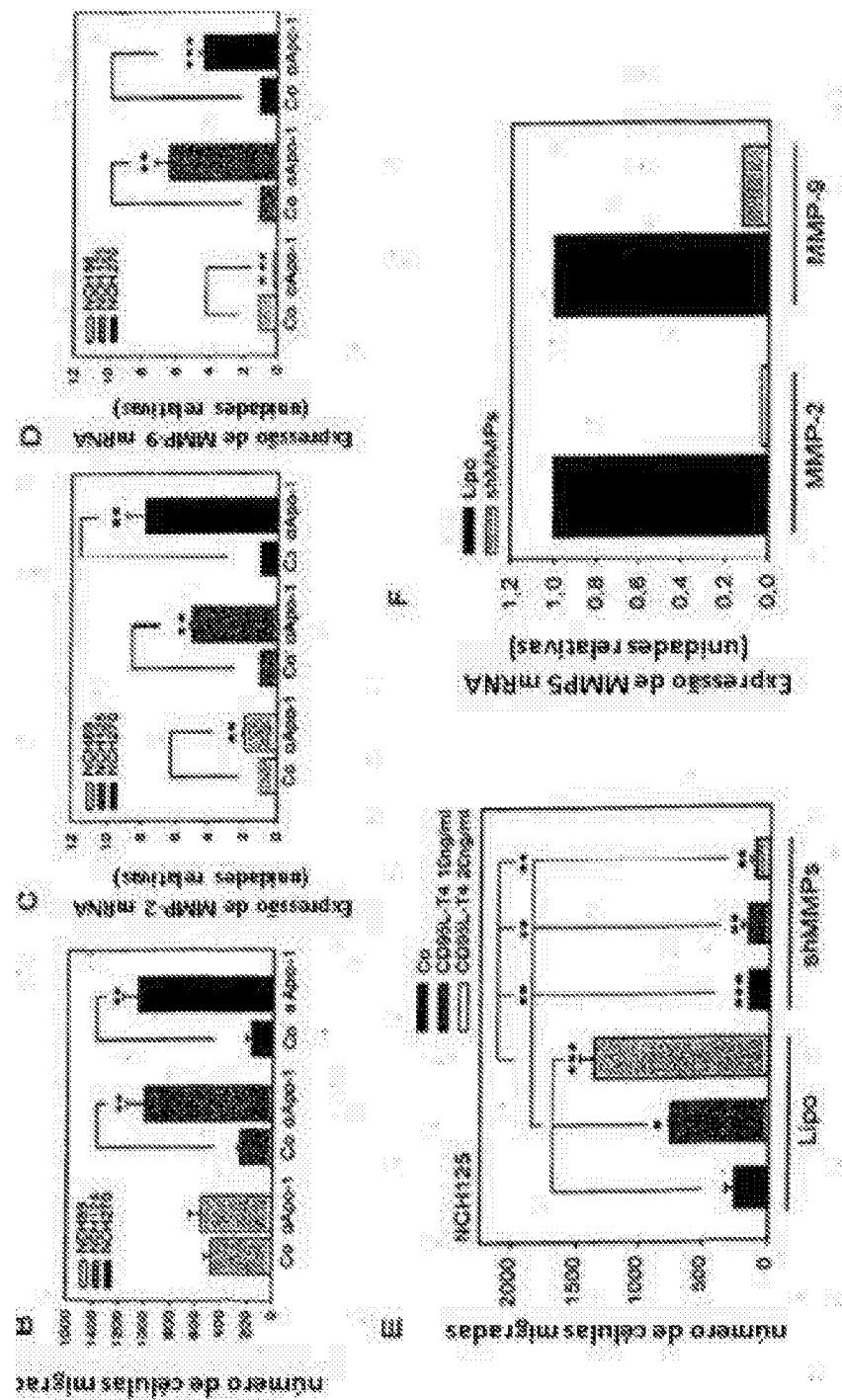
Figura 12 (continuação)

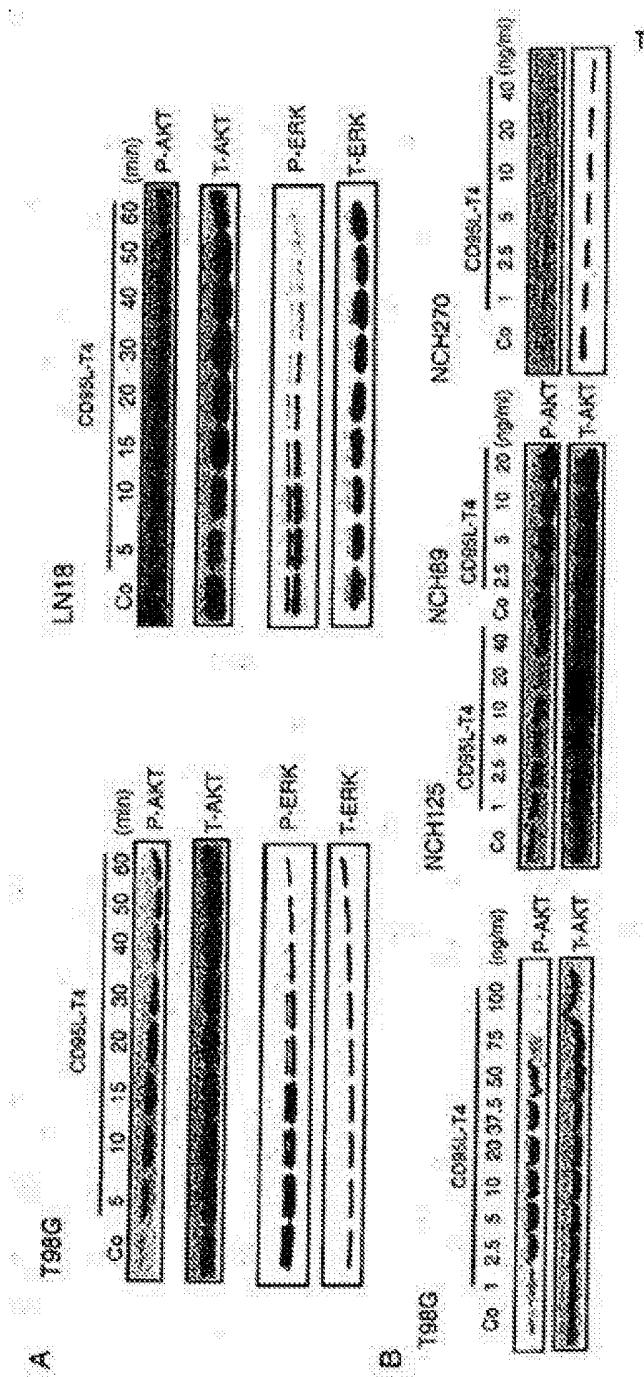
Figura 13

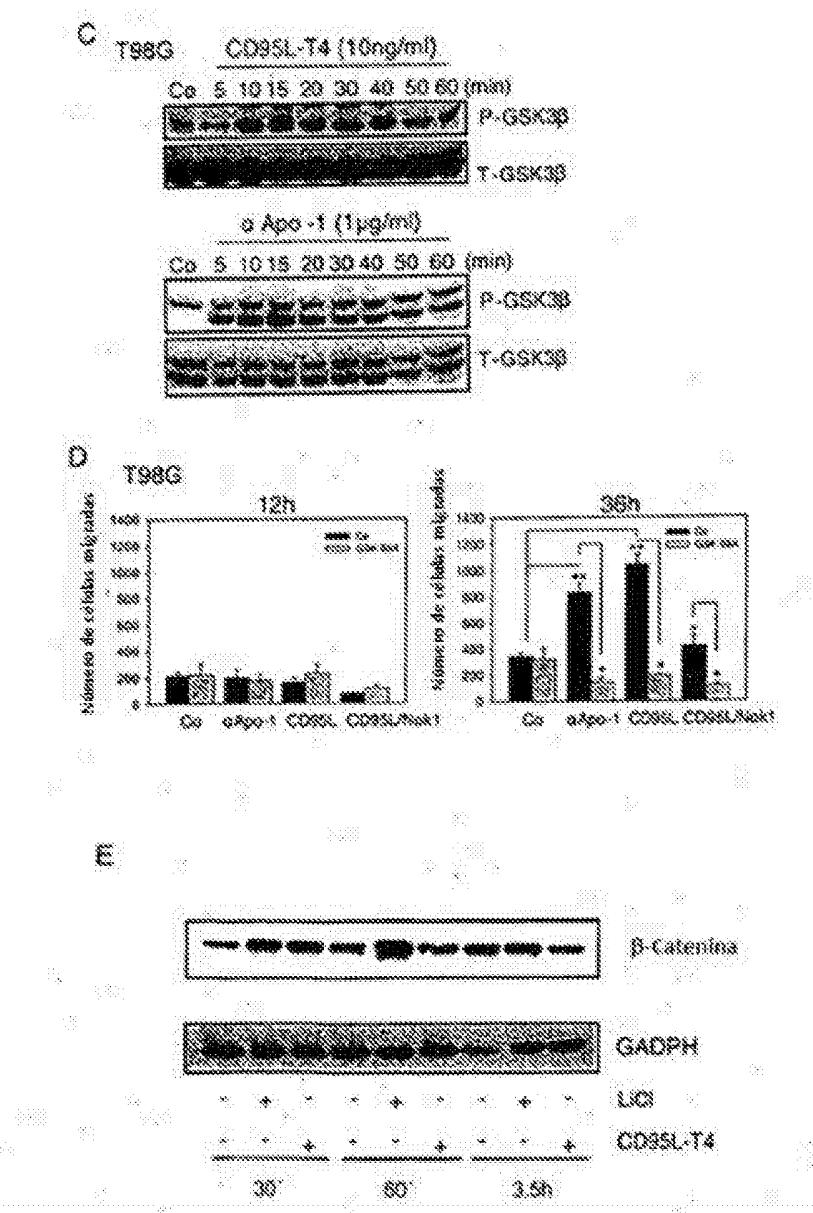
Figura 13 (continuação)

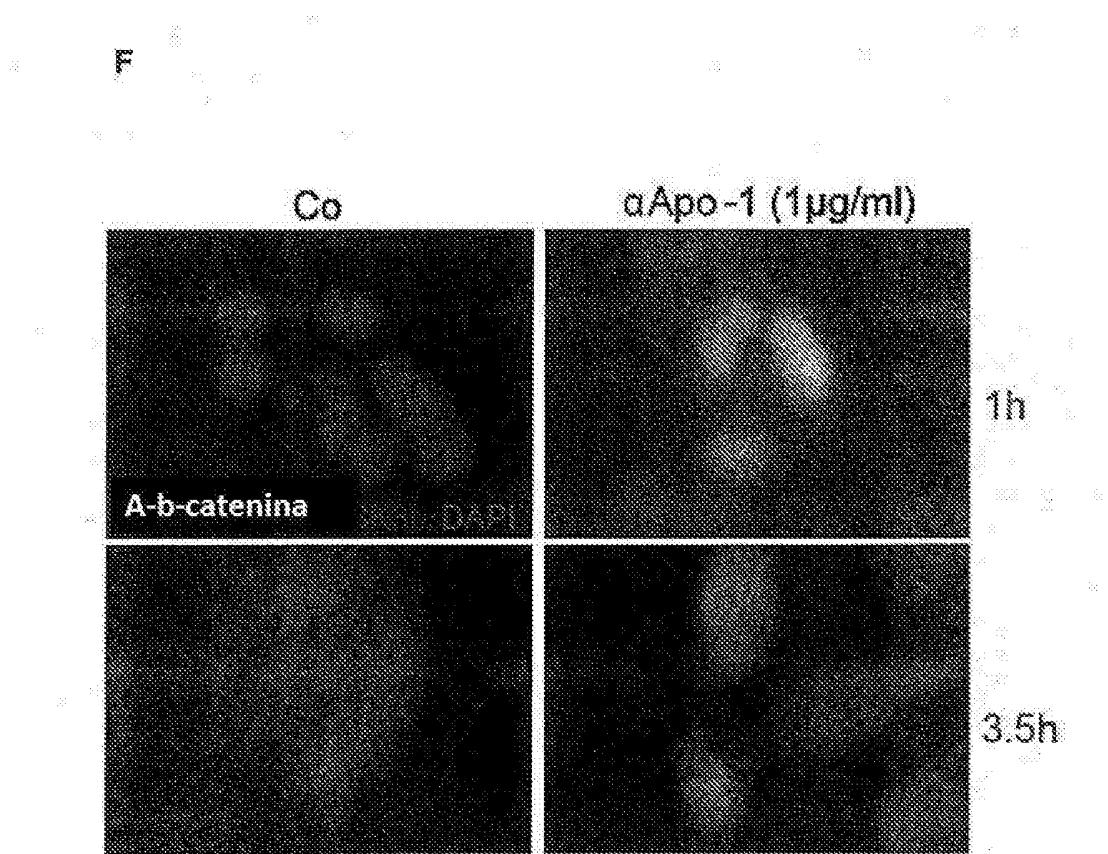
Figura 13 (continuação)

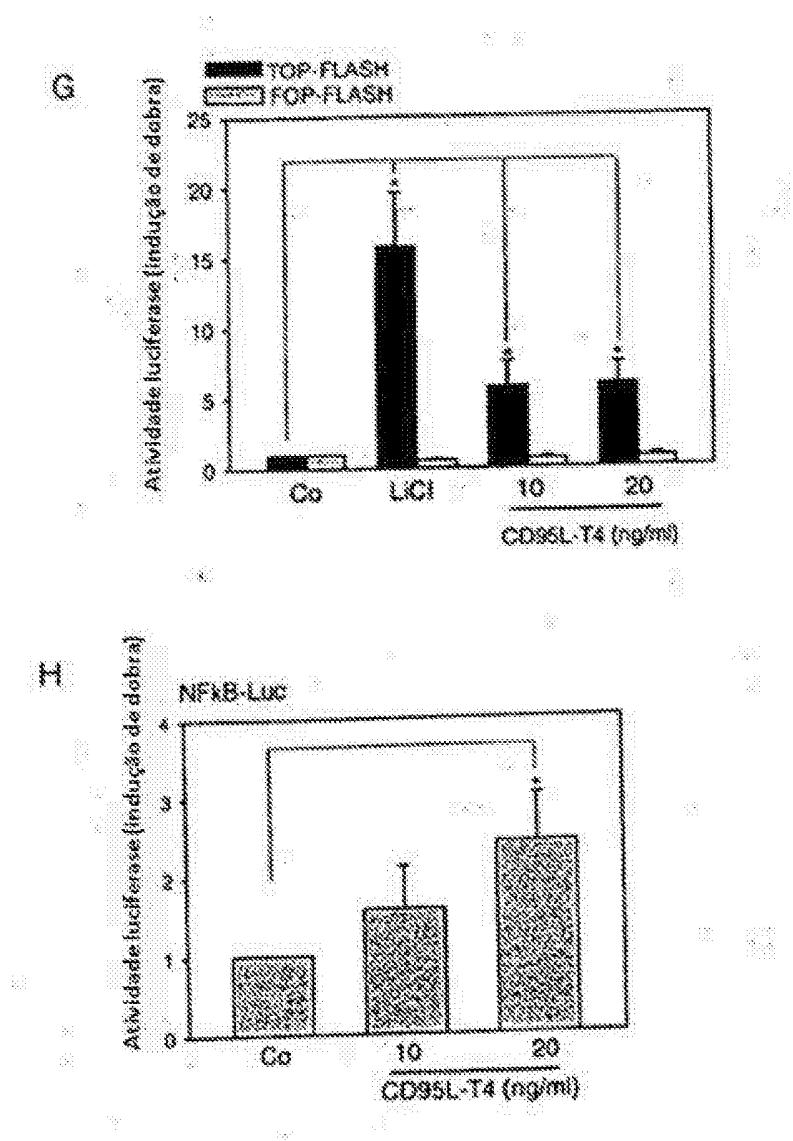
Figura 13 (continuação)

Figura 14

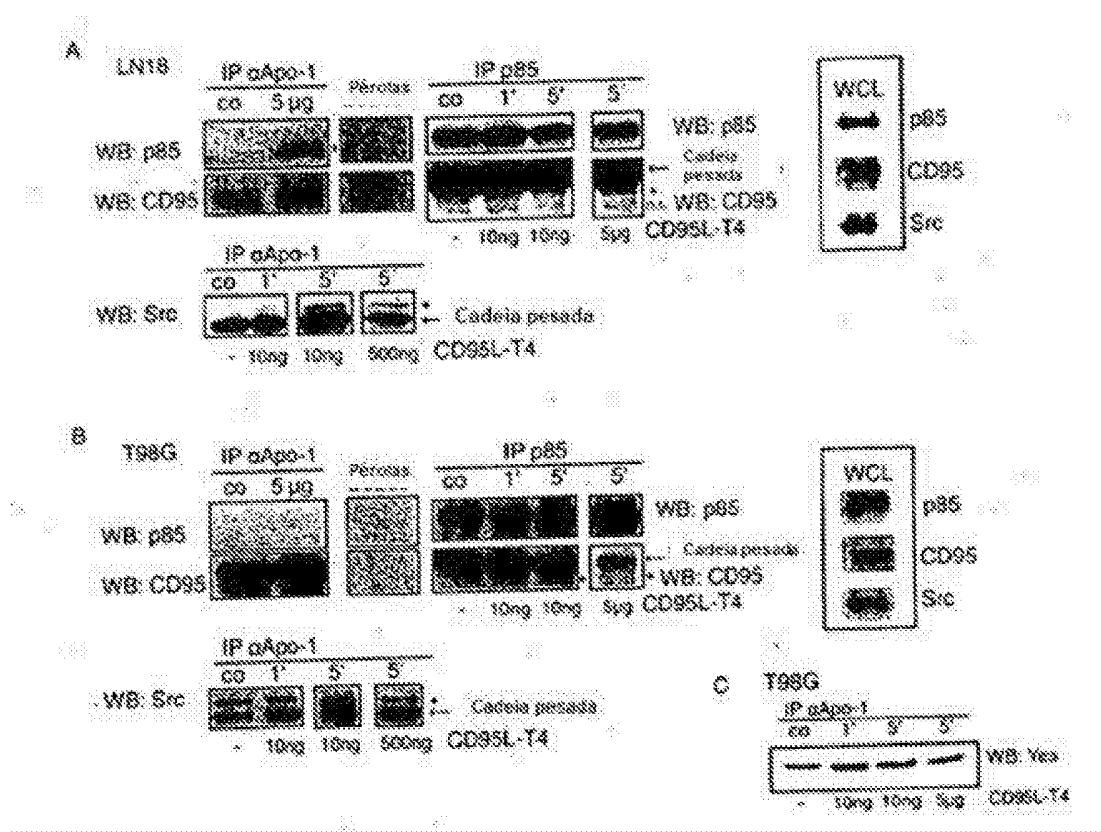


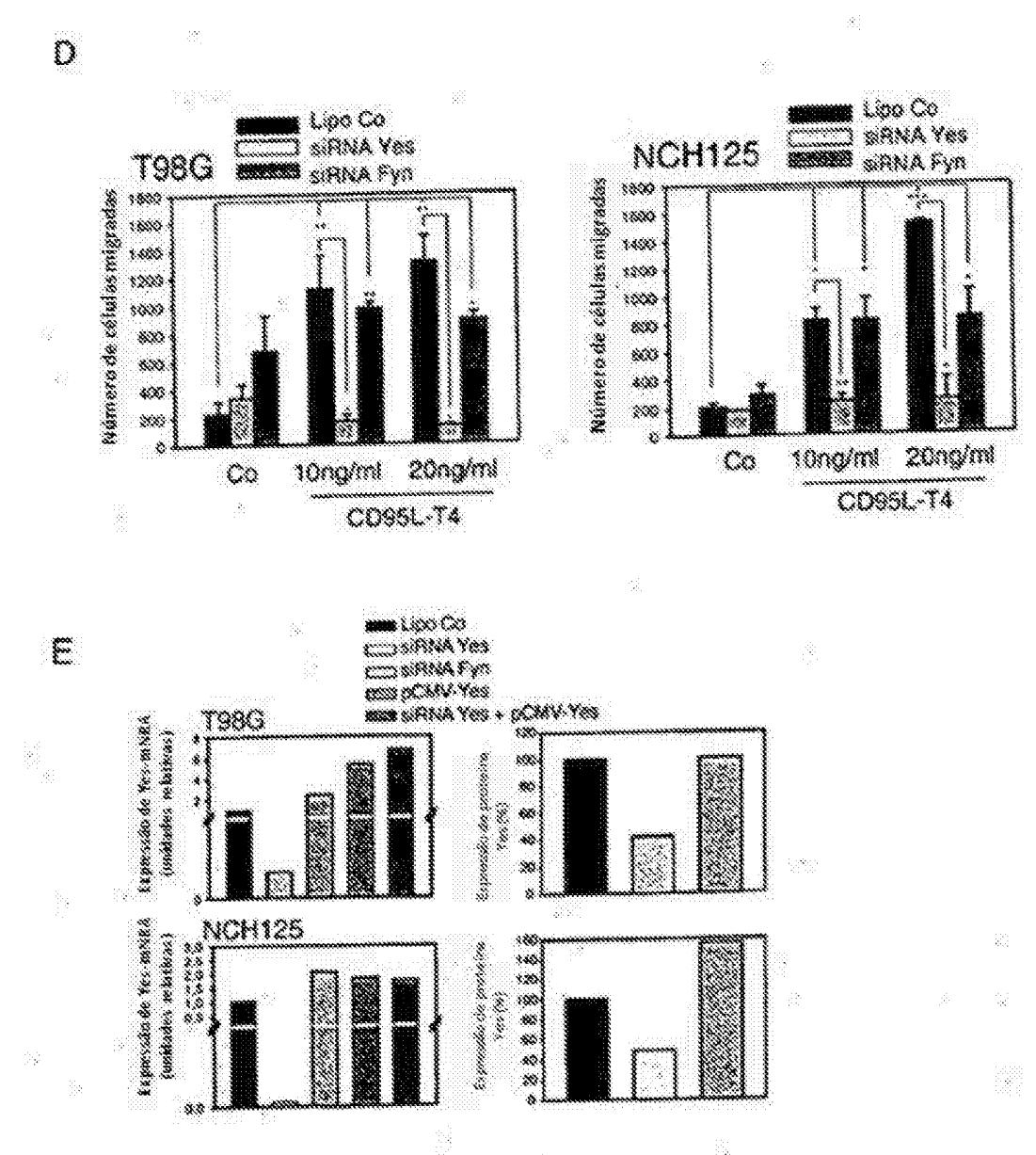
Figura 14 (continuação)

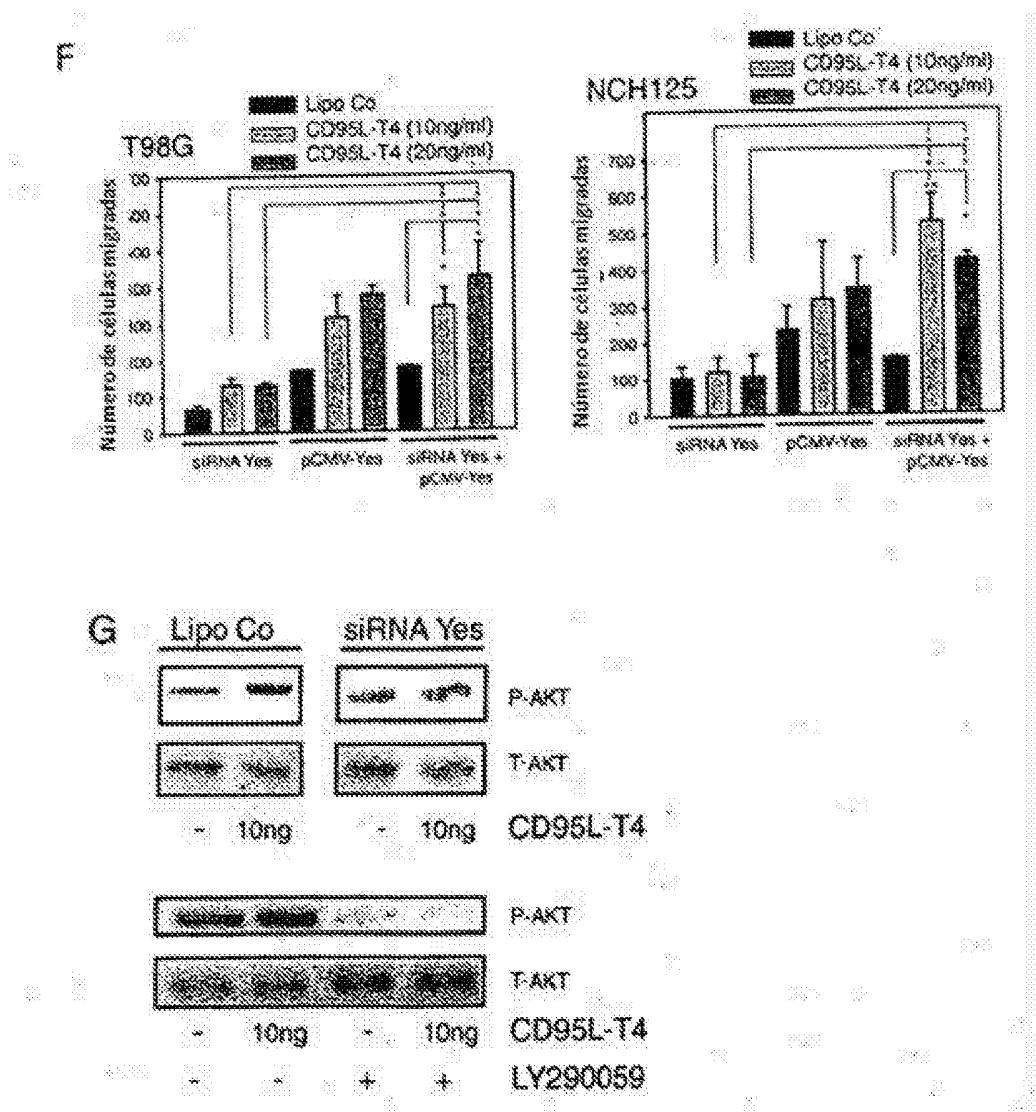
Figura 14 (continuação)

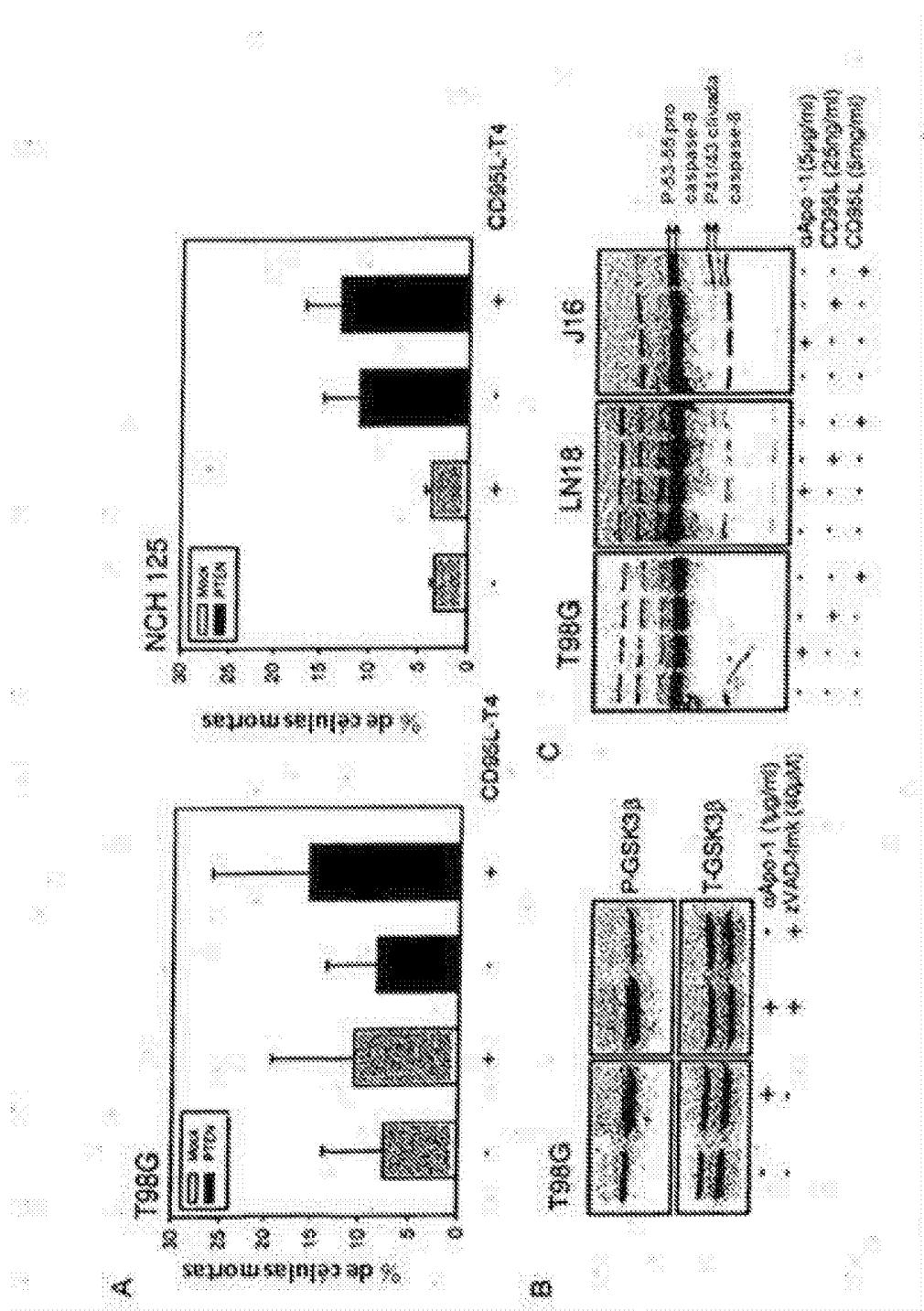
Figura 15

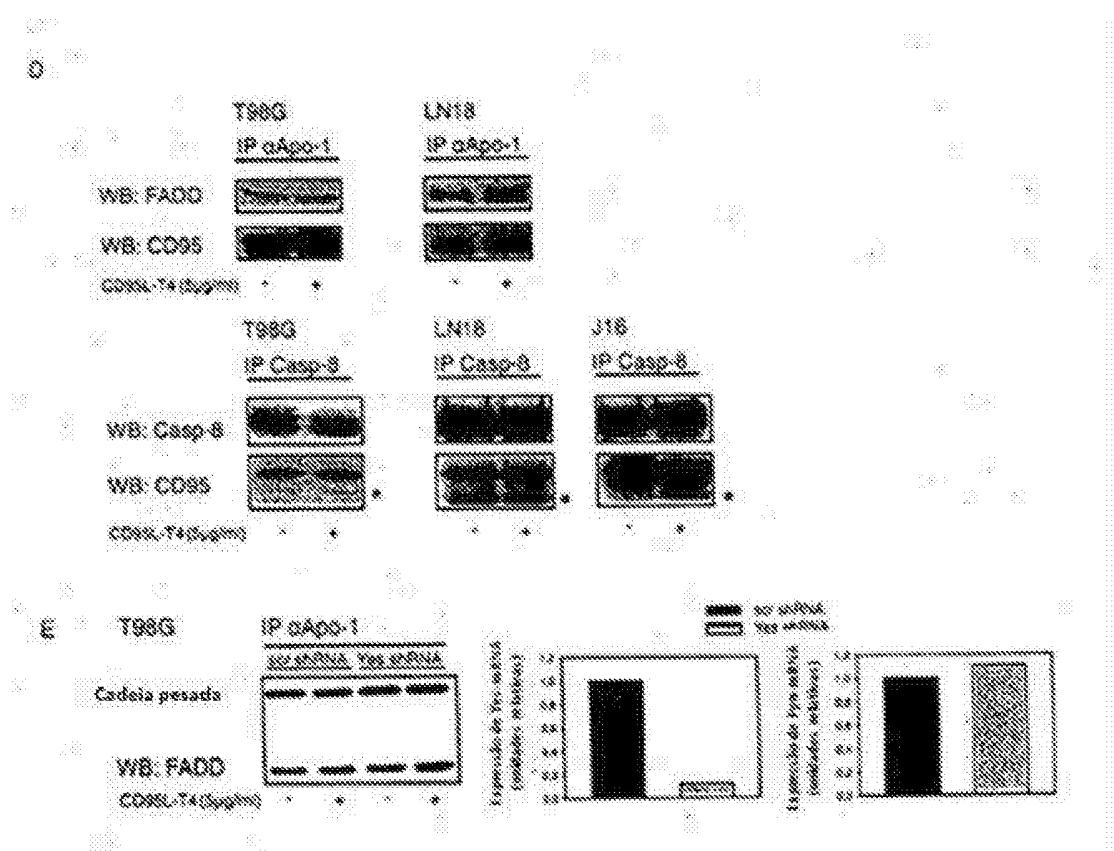
Figura 15 (continuação)

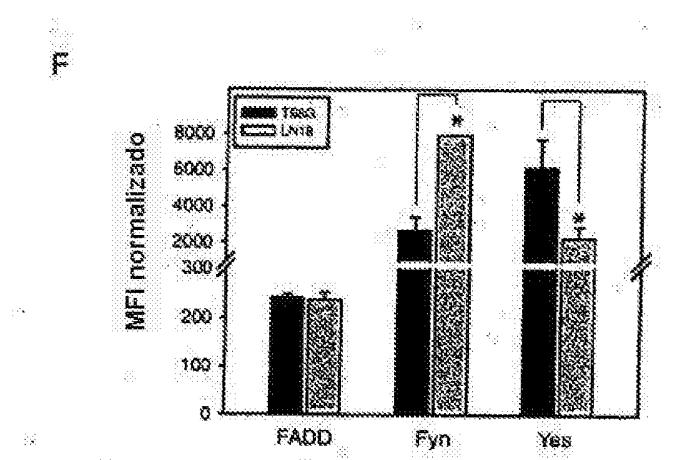
Figura 15 (continuação)

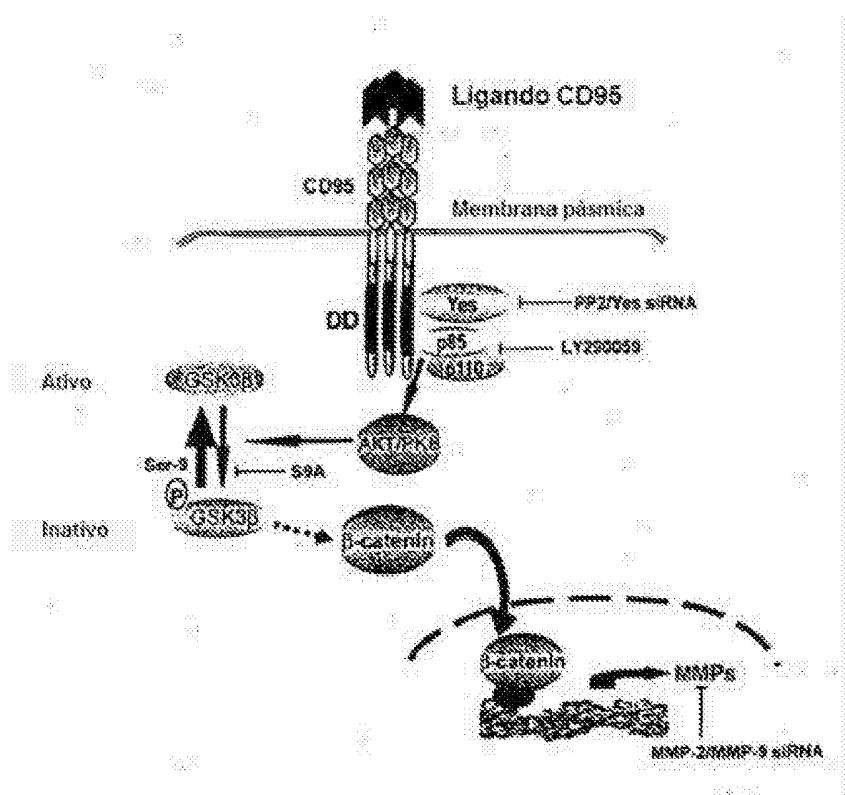
Figura 16

Figura 17

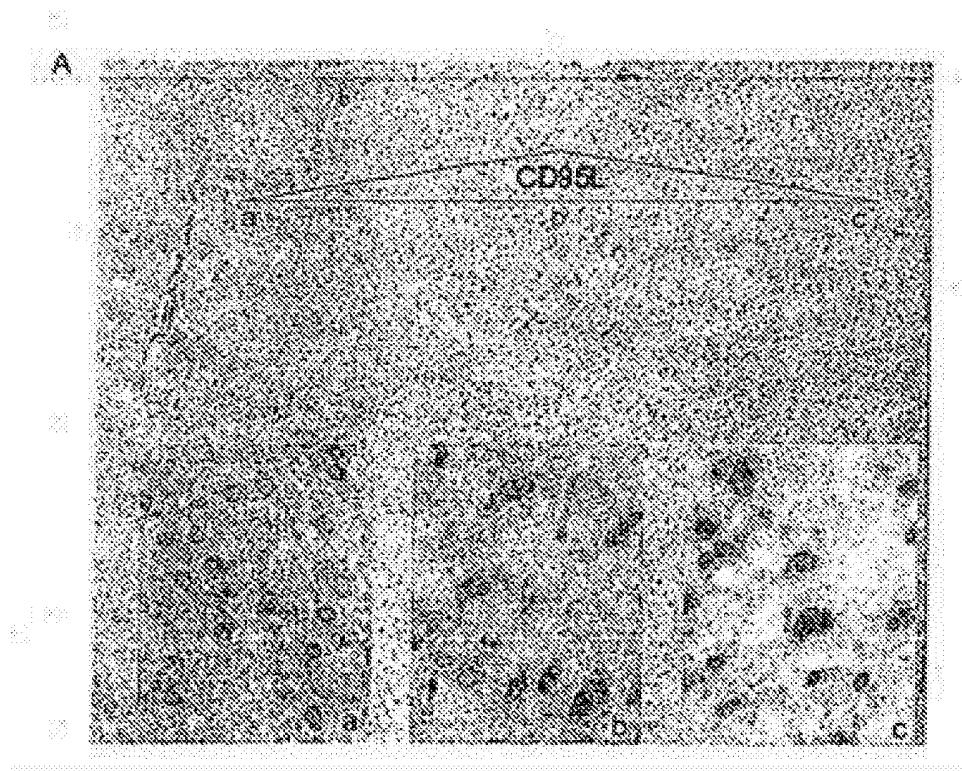


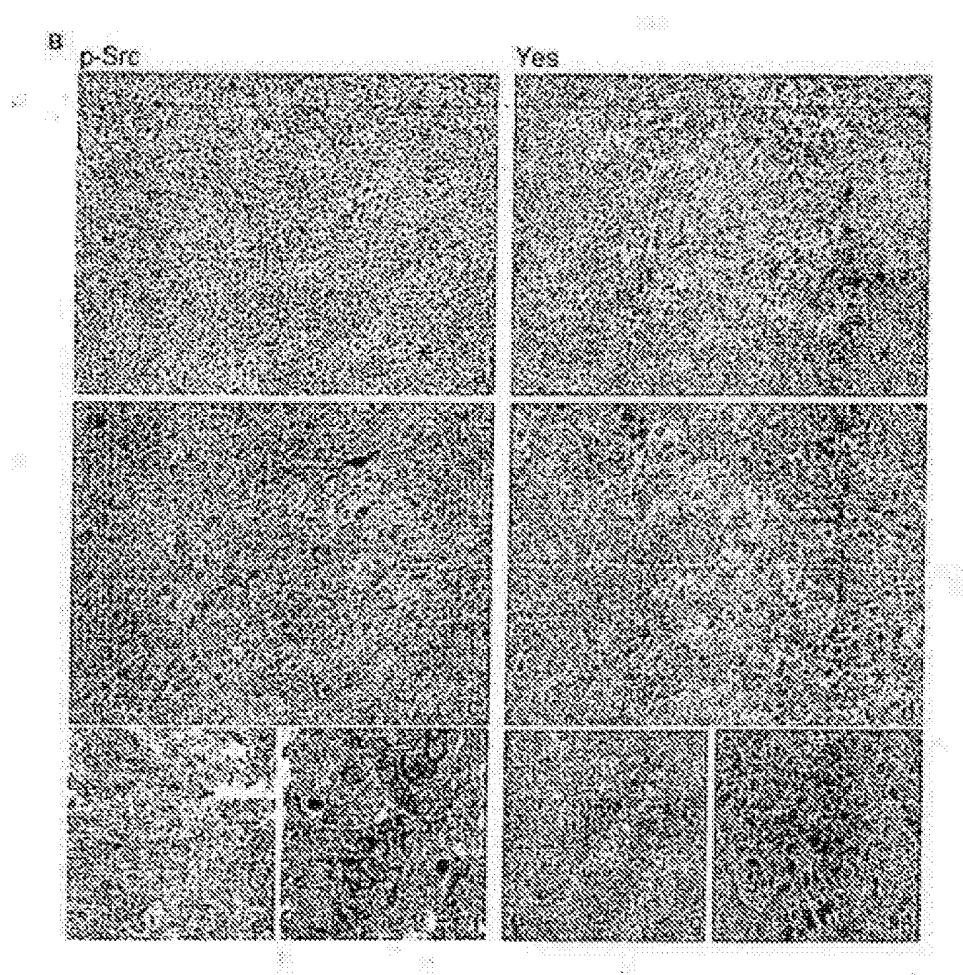
Figura 17 (continuação)

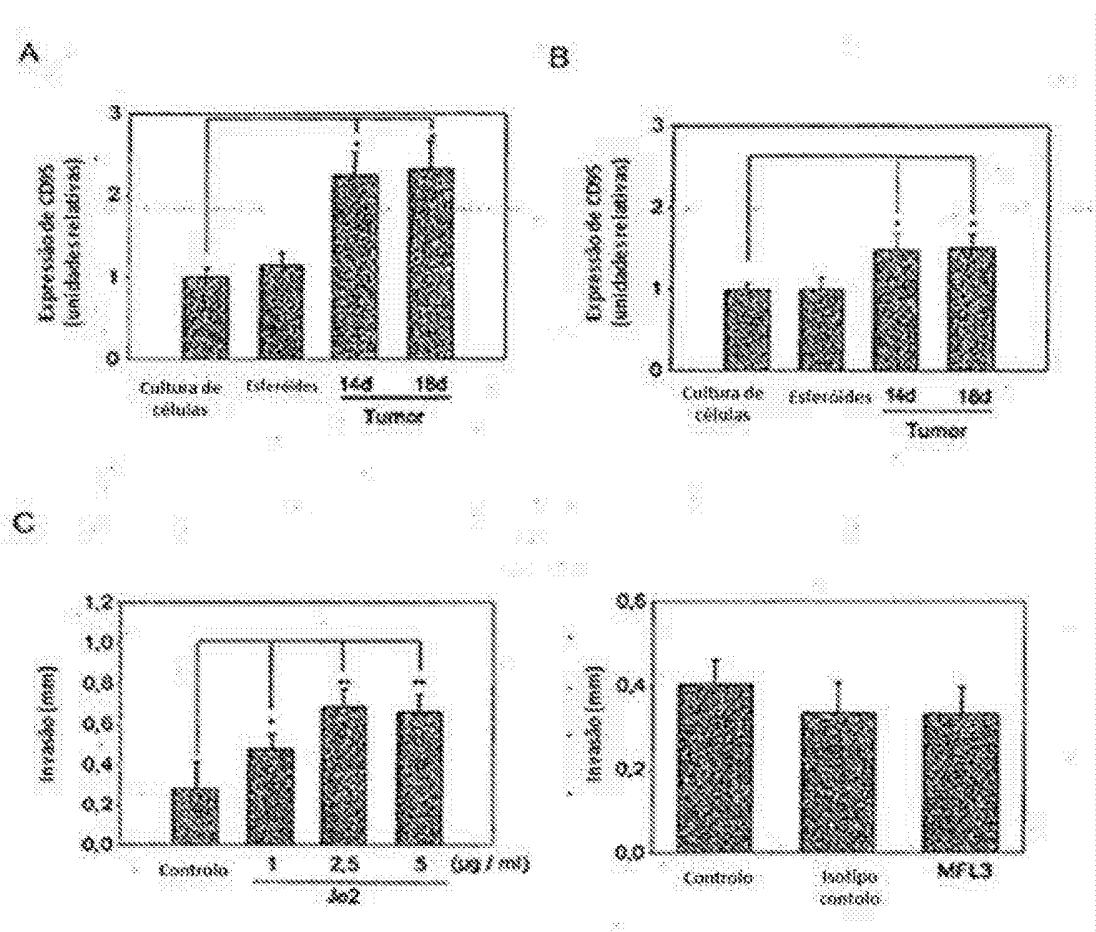
Figura 18

Figura 18 (continuação)

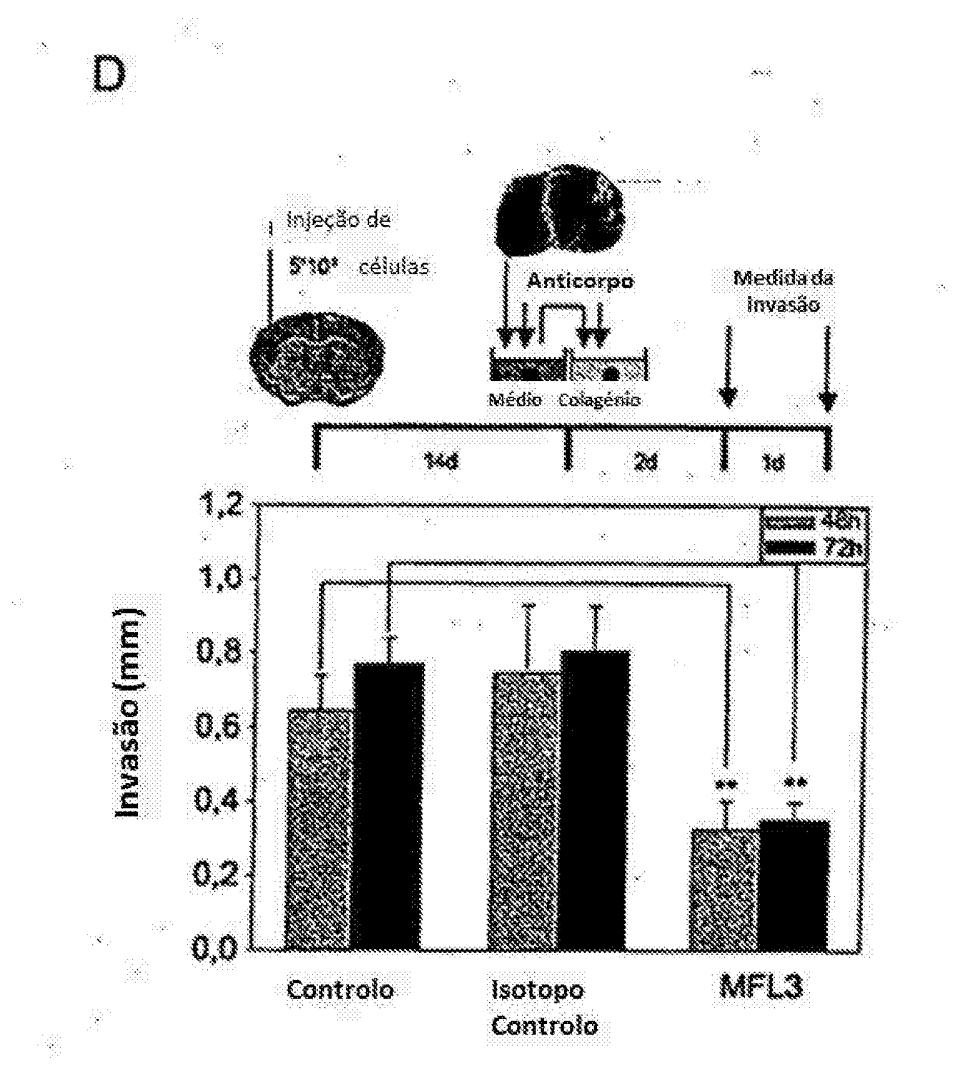


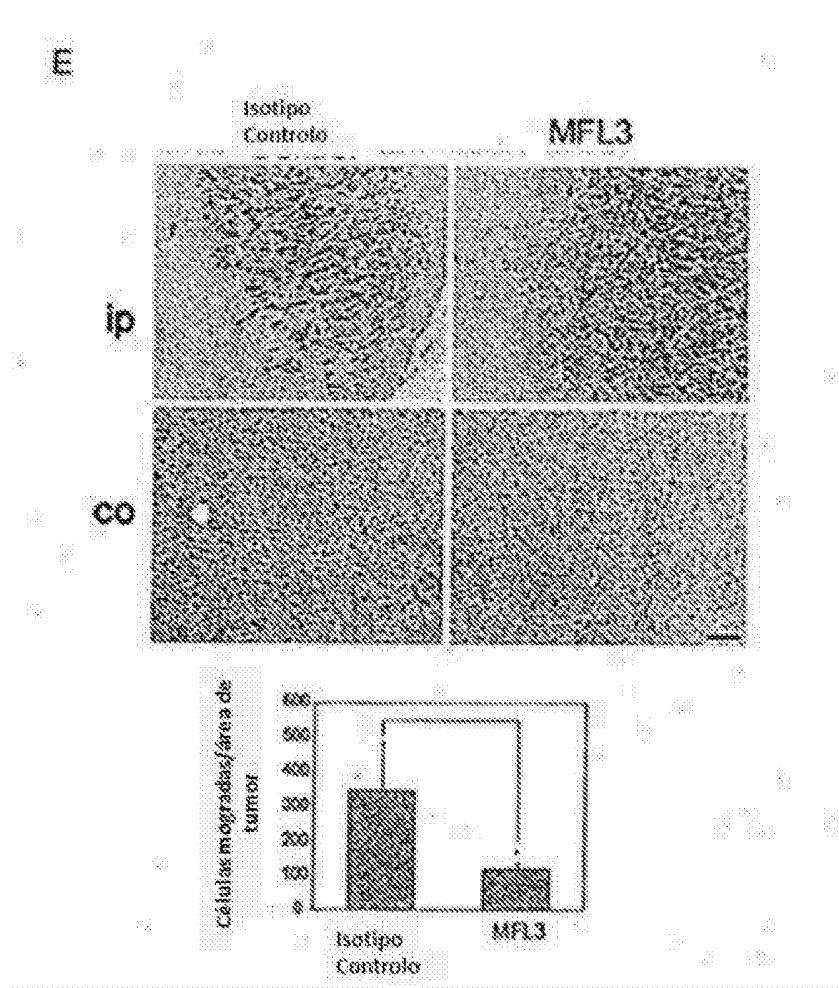
Figura 18 (continuação)

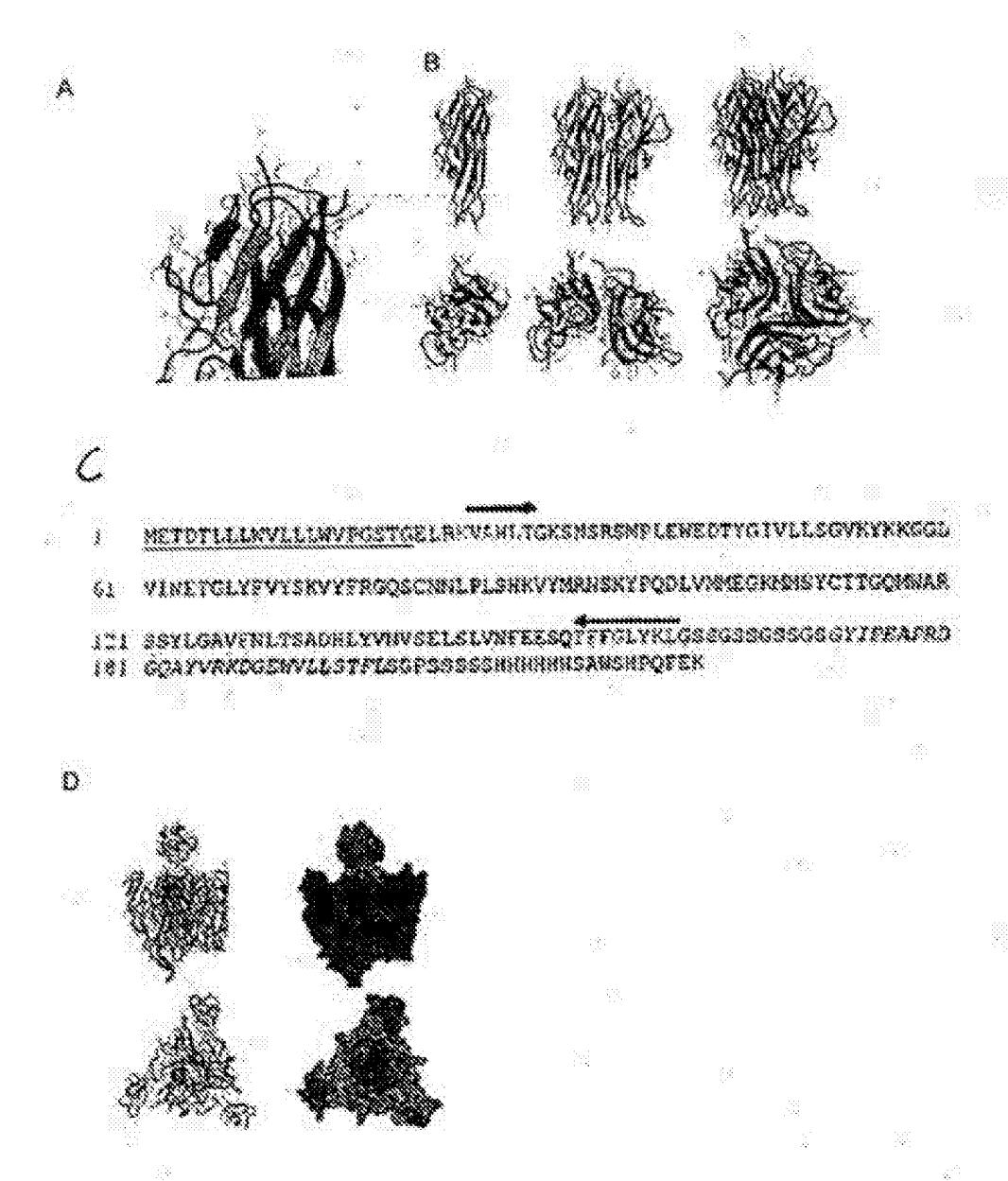
Figura 19

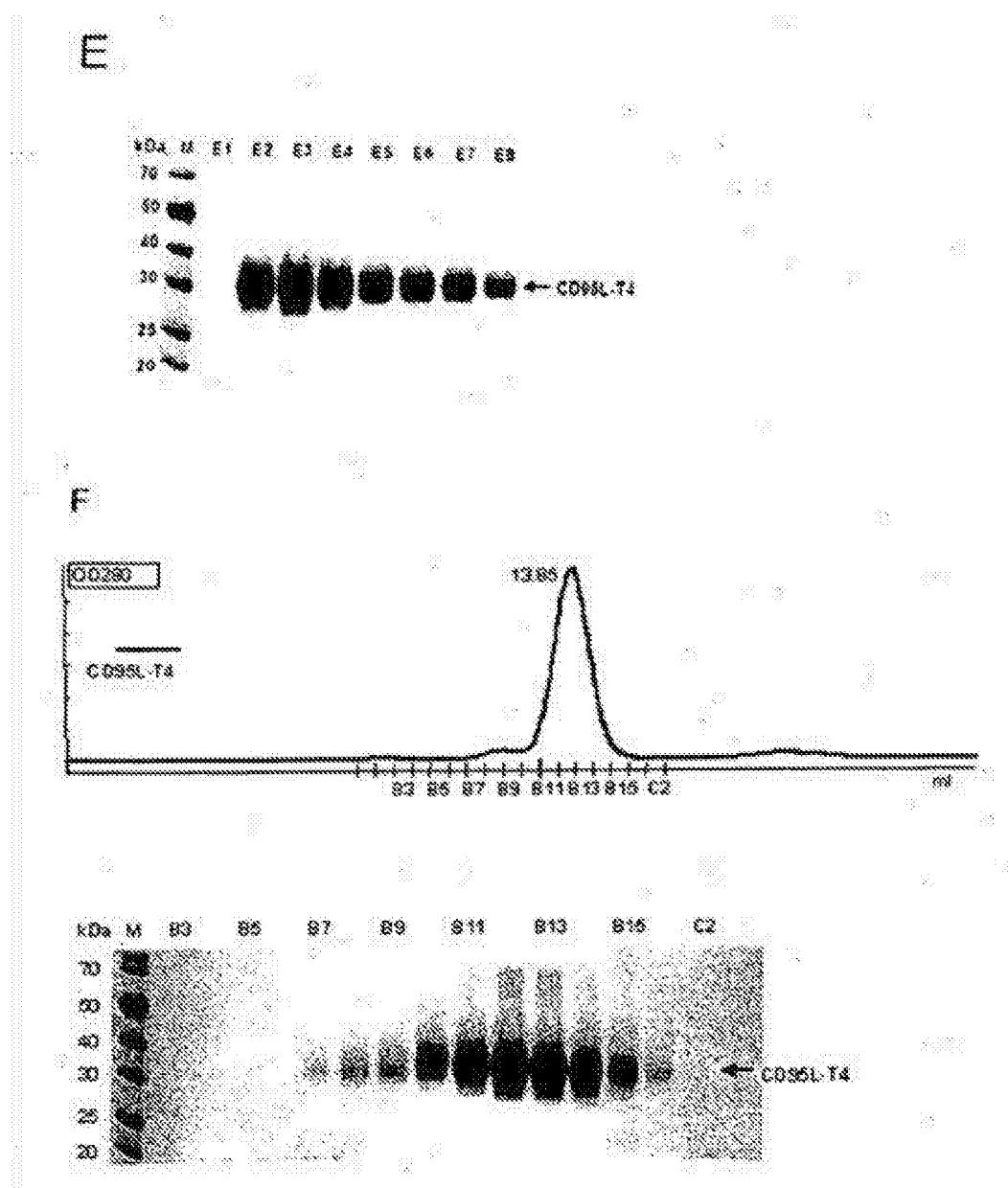
Figura 19 (continuação)

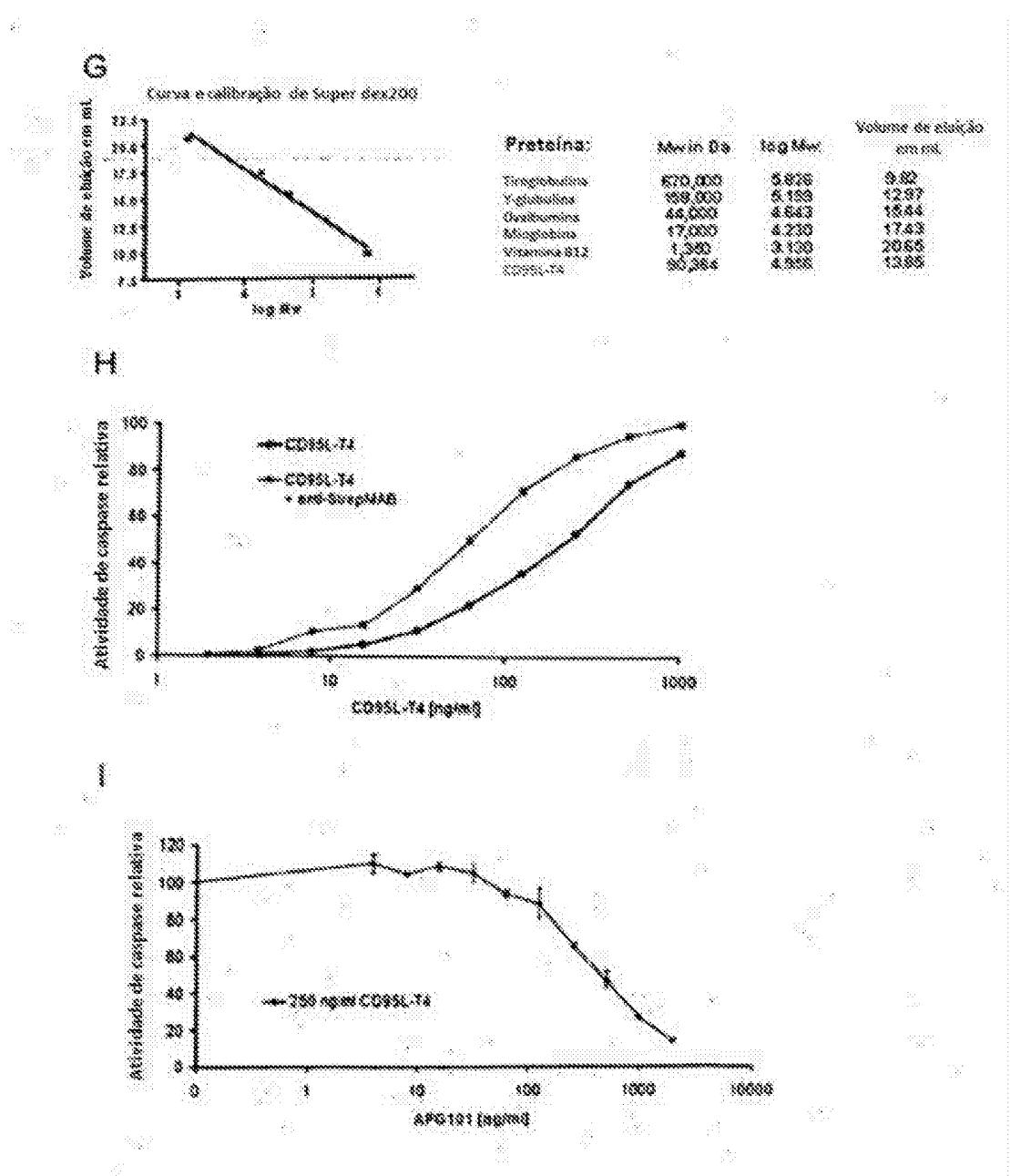
Figura 19 (continuação)

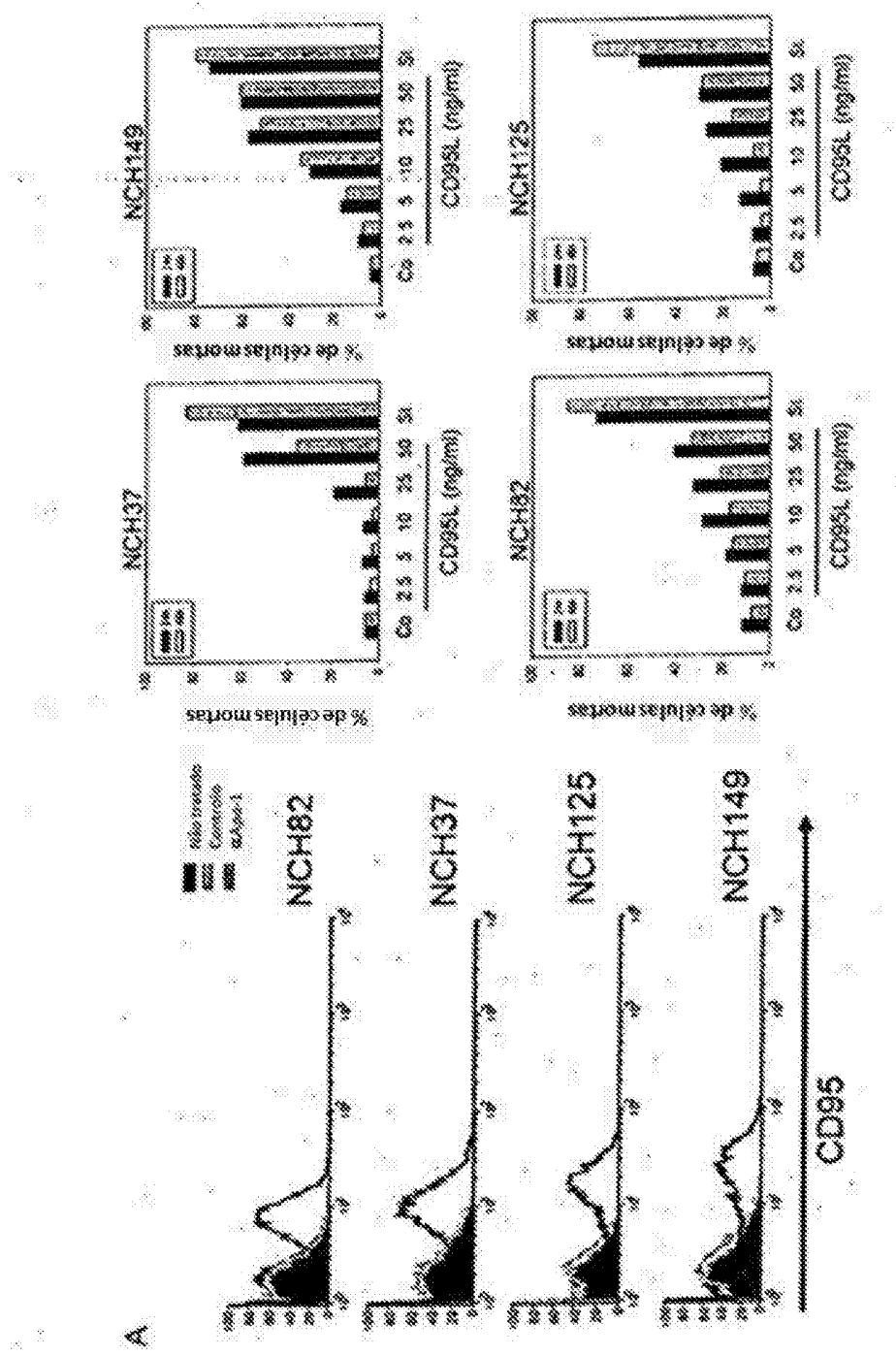
Figura 20

Figura 20 (continuação)

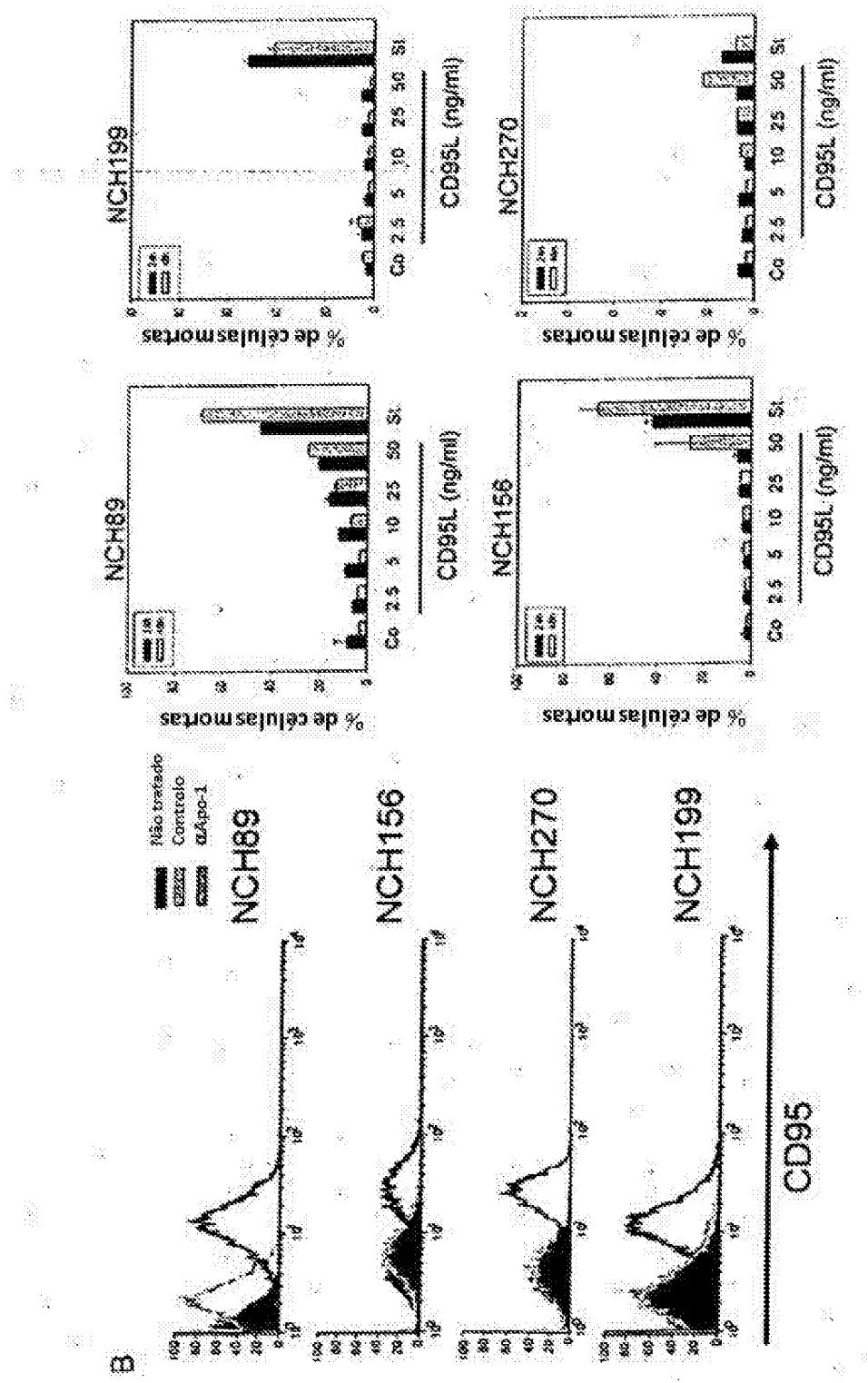


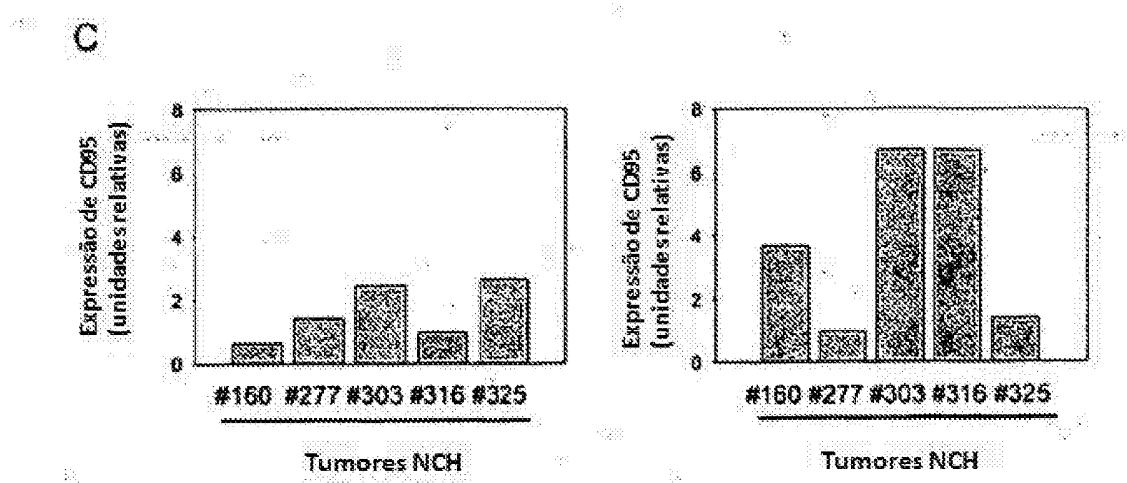
Figura 20 (continuação)

Figura 21

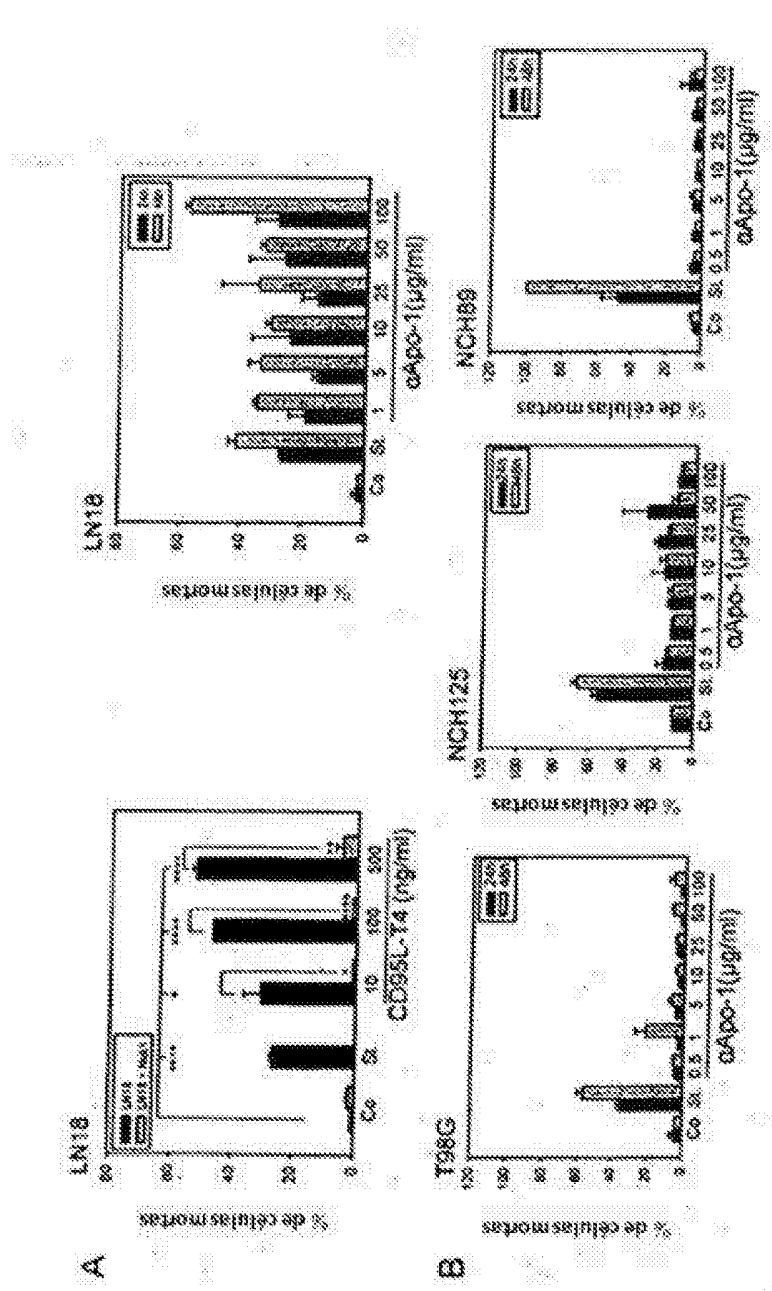


Figura 21 (continuação)

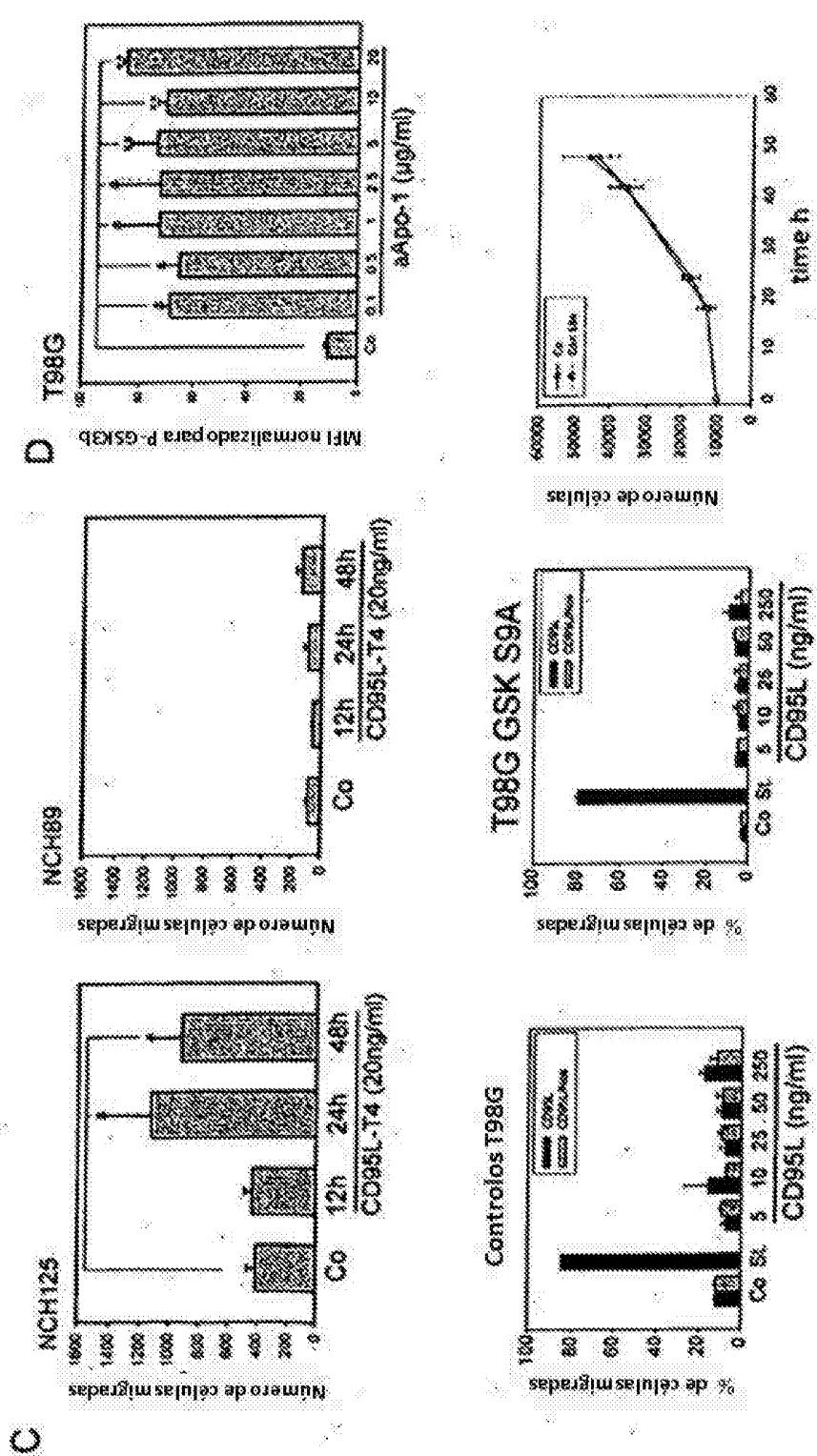


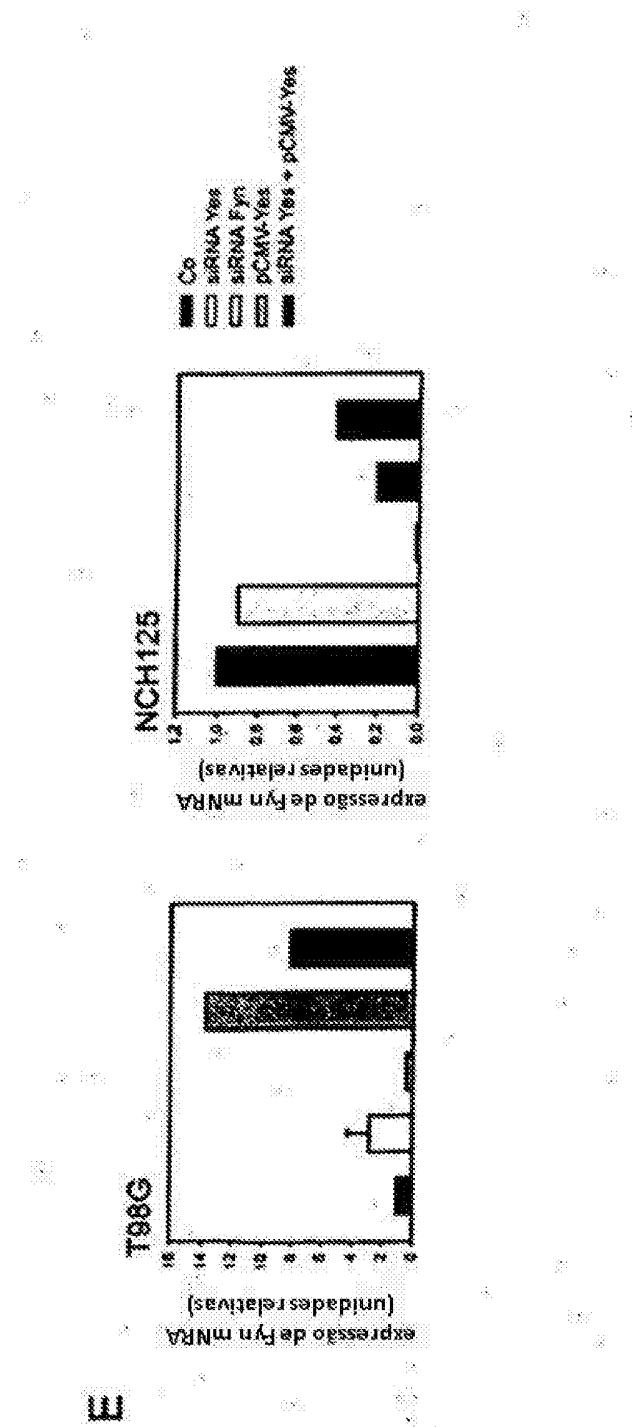
Figura 21 (continuação)

Tabela 1. Sumário dos dados clínicos a partir de doentes com tumor

Nº	Sexo	Idade à cirurgia	Diagnóstico	Tempo de sobrevivência
NCH37	Masculino	52	Gliossarcoma OMS IV	40
NCH82	Masculino	56	GBM	16
NCH89	Feminino	41	GBM	29
NCH125	Masculino	43	GBM	57
NCH149	Masculino	54	GBM	71
NCH156	Masculino	54	GBM	69
NCH160	Masculino	58	GBM	54
NCH199	Masculino	38	GBM secundário	28
NCH270	Masculino	72	GBM	32
NCH277	Feminino	78	GBM	173
NCH316	Feminino	72	GBM	94
NCH323	Masculino	25	Astrocitoma OMS II	Vivo
NCH325	Masculino	31	GBM	Vivo
NCH342	Masculino	44	GBM	80
NCH351	Masculino	37	GBM	60
NCH354	Feminino	38	GBM	96
NCH356	Masculino	67	GBM	86
NCH357	Masculino	29	GBM	64
NCH378	Feminino	71	GBM	40
NCH408	Masculino	35	Oligodendrogioma OMS III	Vivo
NCH417	Masculino	69	GBM	-
NCH419	Feminino	61	OMS III-IV	vivo

Nº.	Deteção de tumor	Diagnóstico	Tempo após irradiação (w)	Idade à cirurgia	Tempo de sobrevivência pós recidiva (w)
19 408	Original recorrente	GBM	20	51	38
115 655	Original recorrente	GBM	20	56	56
253 90717	Original recorrente	GBM	2	56	91
724 202	Original recorrente	GBM	4	56	25
554 910	Original recorrente	GBM	15	59	71
251 30	Original recorrente	GBM	29	66	58
746 388	Original recorrente	GBM	32	54	69
809 715	Original recorrente	GBM	35	64	53
259 860	Original recorrente	GBM	17	60	64