



(11) *Número de Publicação:* PT 932664 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N005/08 A C12Q001/25 B
C12Q001/68 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1997.06.20

(30) *Prioridade:* 1996.06.26 GB 9613418

(43) *Data de publicação do pedido:*
1999.08.04

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.09.26

(73) *Titular(es):*

CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED
CAMBRIDGE HOUSE, 6-10 CAMBRIDGE TERRACE REGENT'S
PARK, LONDON NW1 4JL GB

(72) *Inventor(es):*

RONALD A. LASKEY
TORSTEN KRUEDE
MARK R. JACKMAN
JONATHAN N.J. PINES

GB
GB
GB
GB

(74) *Mandatário(s):*

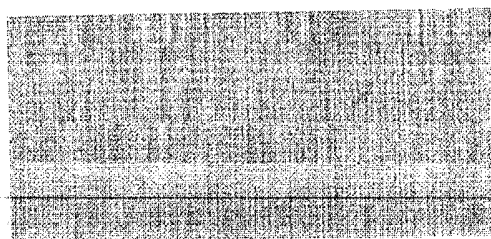
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA

PT

(54) *Epígrafe:* UM SISTEMA ISENTO DE CÉLULAS PARA INICIAÇÃO DE REPLICAÇÃO DE ADN

(57) *Resumo:*

UM SISTEMA ISENTO DE CÉLULAS PARA INICIAÇÃO DE REPLICAÇÃO DE
ADN





DESCRIÇÃO

"Um sistema isento de células para iniciação de replicação de ADN"

O presente invento refere-se a procedimentos *in vitro* para replicação de ADN, e mais especificamente proporciona um sistema para iniciação de replicação semiconservativa de ADN sob o controlo do ciclo celular somático. Refere-se também à utilização de um tal sistema, por exemplo na identificação de agentes que modulem a replicação do ADN, em particular que a inibam ou estimulem, proporcionando deste modo, por exemplo, agentes com utilidade baseada no seu potencial terapêutico.

A iniciação da replicação do ADN é um passo chave na regulação do ciclo de divisão celular. Uma plethora de sinais intra- e extracelulares é integrada durante a fase G1 do ciclo celular numa decisão de desistir do ciclo de divisão ou de iniciar a fase S e assim continuar a proliferação (Heichman e Roberts, 1994). Uma vez iniciada a fase S, os mecanismos de controlo asseguram que todo o ADN cromossómico seja replicado antes dos cromossomas serem segregados para as duas células filhas na mitose (Nurse, 1994).

As experiências de fusão celular e de transplante nuclear proporcionaram provas convincentes de que os núcleos celulares quiescentes são induzidos a iniciarem a replicação do ADN quando introduzidos em células em fase S (Graham *et al.*, 1966; Harris *et al.*, 1966; de Terra, 1967; Johnson e Harris, 1969). Quando foram fundidas células sincronizadas, as células em fase S induziram replicação do ADN apenas em núcleos G1, mas não em núcleos G2 (Harris *et al.*, 1966; de Terra, 1967; Guttus e Guttus, 1968; Ord, 1969; Rao e Johnson, 1970). Estes resultados indicaram que as células em fase S contêm factores específicos dominantes que desencadeiam a replicação do ADN e são evolutivamente conservados. Os núcleos G1 não replicados são os substratos fisiológicos para a iniciação da replicação do ADN, enquanto que a re-replicação em núcleos G2 é evitada até estes terem sofrido mitose (Romanowski e Madine, 1996).

Provas genéticas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* proporcionaram provas independentes de um indutor da fase S (Hartwell, 1974). A proteína-quinase CDC28 é um regulador chave do ciclo de divisão celular de levedura

(Nasmyth, 1993). Esta associa-se a diferentes subunidades reguladoras de ciclinas CLN e CLB ao longo da progressão do ciclo celular para executar funções específicas do ciclo celular de um modo temporalmente regulado. A associação a ciclinas específicas das fases G1 e S, seguida pela activação pós-tradução da subunidade catalítica é essencial para o aparecimento da fase S em leveduras (Nasmyth, 1993). Em eucariotas superiores, a situação é mais complexa na medida em que diferentes subunidades catalíticas de quinases dependentes de ciclinas (Cdk) se associam a diferentes ciclinas em tempos diferentes para regular a progressão do ciclo celular [revisto em (Heichman e Roberts, 1994; Nurse, 1994; Sherr, 1994)]. Experiências com anticorpos, construções de ARN anti-sentido ou expressão ectópica de genes de ciclinas indicam um papel das ciclinas D, E e A na indução da transição da fase G1 para S em células somáticas de mamífero *in vivo* (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992; Zindy *et al.*, 1992; Ohtsubo e Roberts, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994; Wimmel *et al.*, 1994; Ohtsubo *et al.*, 1995; Resnitzky e Reed, 1995).

A análise bioquímica directa da iniciação da replicação em células somáticas eucarióticas tem sido impedida pela ausência de um sistema eficiente de replicação de ADN de mamífero isento de células para complementar estas abordagens celulares e genéticas. Os sistemas existentes de replicação de ADN isentos de células são inadequados para o estudo da iniciação da replicação do ADN cromossómico pelas seguintes razões:

Primeiro, os sistemas virais isentos de células tais como o derivado do Vírus Símio 40 (SV40) e suas células somáticas hospedeiras dependem de elementos virais de controlo essenciais para além de extractos celulares de mamífero; nomeadamente sequências de ADN viral que actuam *in cis* incluindo a origem de replicação de ADN bidireccional e o antígeno T proteico iniciador que actua *in trans* (Li e Kelly, 1984; Challberg e Kelly, 1989; Stillman, 1989). Ambos os elementos de controlo são codificados pelo vírus e servem para superar o controlo celular de replicação de uma vez por ciclo celular o que permite que ocorra uma replicação contínua do ADN viral no núcleo da célula infectada.

Segundo, um sistema isento de células derivado de ovos activados da rã *Xenopus laevis* pode replicar núcleos de células de mamífero sob controlo do ciclo celular embrionário inicial (Lohka e Masui, 1983; Blow e Laskey, 1986;



Newport, 1987; Murray e Kirschner, 1989). Estes ciclos celulares embrionários iniciais são invulgares e diferem significativamente dos ciclos celulares da maioria das células somáticas dos vertebrados. Duram apenas 35 minutos, em comparação com aproximadamente um dia em células somáticas e consistem em fases S e M alternadas sem intervenção das fases G1 e G2. Por isso, os passos reguladores chave do ciclo somático, as transições de G1 para S e de G2 para M estão formalmente ausentes nos ciclos embrionários iniciais. Para além disso, a duração da fase S no ciclo embrionário (25 min) é mais curta em mais de uma ordem de grandeza que no ciclo somático (aproximadamente 8 h). Embora estes sistemas isentos de células sejam valiosos na identificação de aspectos enzimáticos e estruturais da replicação do ADN, são limitados para o estudo da regulação da iniciação sob controlo do ciclo celular somático.

O presente invento baseia-se no desenvolvimento de um sistema isento de células a partir de células humanas que inicia a replicação de ADN sob controlo do ciclo celular. Os núcleos em fase G1 mas não os em fase G2 iniciam a replicação quando co-incubados com núcleos em fase S em extractos citosólicos de fase S, mas não de células em fase G1 ou G2. Os núcleos em fase S na incubação podem ser substituídos por um extracto salino ou podem ser omitidos, induzindo iniciação de replicação semiconservativa do ADN em núcleos em fase G1. Este extracto nuclear pode por sua vez ser substituído por ciclinas A e E complexadas com Cdk2, mas não por Cdk2 sozinha ou por ciclina B1 humana complexada com Cdk2. (Os inventores utilizaram ciclinas humanas recombinantes expressas em baculovírus). Em citosol de fase S, as ciclinas A/Cdk2 e E/Cdk2 desencadeiam sinergeticamente a iniciação da replicação do ADN em núcleos G1.

De acordo com um aspecto do presente invento é, portanto, proporcionado um sistema isento de células para iniciação da replicação de ADN sob controlo do ciclo celular, incluindo citosol de fase S, factores ou extracto citosólicos, i.e. uma fracção citosólica de fase S, nos quais são co-incubados núcleos em fase G1, e podem também ser utilizados núcleos em fase S ou uma fracção destes, e/ou ciclinas A e/ou E (de preferência ambas) complexadas com a sua quinase cognata dependente de ciclinas (Cdk2).

Obtém-se um extracto solúvel adequado de núcleos em fase S utilizando um tampão aquoso, tal como uma solução de NaCl, tal como divulgado na secção experimental abaixo.

Também tal como discutido abaixo, a inclusão de ambas as ciclinas A/Cdk2 e E/Cdk2, em vez de um ou do outro complexo, tem um efeito sinérgico no nível detectável de replicação de ADN. Se forem incluídos um ou o outro ou ambos os complexos ciclina/Cdk, a concentração preferida pode ser de cerca de 0,1-1 µg/ml.

Quando aplicável, em vez de se utilizar uma ciclina A e/ou uma ciclina E de tipo selvagem e Cdk2, pode ser empregue uma sequência de aminoácidos variante, mutante, derivada, alélica ou homóloga que difira num ou mais resíduos de aminoácido da sequência de aminoácidos de tipo selvagem, através de uma ou mais de entre adição, inserção, deleção e substituição de um ou mais aminoácidos. As referências a ciclina A e/ou ciclina E e Cdk2 devem ser compreendidas de acordo com isto.

Se forem incluídos núcleos em fase S, pode ser empregue uma variedade de proporções em termos de números em comparação com números de núcleos em fase G1. Enquanto que o aumento da proporção de núcleos em fase S:G1 aumenta o nível de iniciação de replicação do ADN, aumenta também o nível de ruído de fundo que num certo ponto pode começar a mascarar o sinal. Na secção experimental são ilustradas várias proporções e podem ser empregues de acordo com diferentes concretizações do presente invento. Assim, sem limitação do presente invento, proporções exemplificativas incluem cerca de 1:1, cerca de 1:3 ou mais, cerca de 1:1 ou mais, cerca de 3:1 ou mais, cerca de 5:1 ou mais, até cerca de 9:1 ou mais.

Se forem incluídos núcleos em fase S ou uma fracção destes, isto pode ser por volta de 1 a 2 horas após a entrada em fase S. Pode ser preferido por volta das 2 horas.

Podem ser incluídos núcleos em fase G1 em tempos diferentes dentro da fase G1. Pode ser preferido para determinados fins incluir os núcleos G1 na última metade da fase G1, tal como por volta de dois terços da fase G1, embora para outros fins, p.ex. na pesquisa de substâncias capazes de estimular a

iniciação da replicação de ADN, pode ser preferido incluir os núcleos em fase G1 na metade inicial da fase G1, tal como por volta de um terço da fase G1. Claro que a duração absoluta da fase G1 varia de uma célula ou tipo celular para outros.

O desenvolvimento de um sistema isento de células humano que inicie a replicação semiconservativa de ADN sob controlo do ciclo celular permite uma grande amplitude de experiências por fraccionamento, adição proteica e imunodepleção selectiva de proteínas alvo. Isto deve permitir outras perspectivas sobre o controlo da replicação de ADN e o seu acoplamento ao ciclo celular em células humanas. Adicionalmente, o sistema permitirá uma variedade de utilizações na derivação de produtos de benefício prático, tais como pesquisa e identificação de agentes terapêuticos que inibam a replicação do ADN e que podiam ser assim utilizados como fármacos anti-cancro, e também de agentes que estimulem a replicação do ADN, que podiam ser utilizados para terapêuticas de reparação de tecidos.

De forma concordante, um outro aspecto do presente invento inclui a utilização de um sistema isento de células para iniciação da replicação de ADN sob controlo do ciclo celular na pesquisa ou identificação de agentes que modulem, p.ex. inibam ou estimulem, a replicação ou síntese de ADN, ou sua iniciação.

Os métodos de obtenção de agentes capazes de modular a replicação de ADN ou a sua iniciação incluem métodos em que é utilizado um ponto final adequado na presença e ausência de uma substância de teste. É incluída abaixo uma descrição detalhada a este respeito. Vale a pena notar, no entanto, que a tecnologia combinatória de bibliotecas proporciona um modo eficiente de testar um número potencialmente vasto de diferentes substâncias quanto à capacidade de modulação e à actividade. Tais bibliotecas e sua utilização são conhecidas na arte, para todos os tipos de produtos naturais, pequenas moléculas e péptidos, entre outros. Em certas circunstâncias pode ser preferida a utilização de bibliotecas peptídicas.

Os agentes apropriados podem ser obtidos, concebidos e utilizados para qualquer um de vários fins.



Agentes que inibam a replicação ou síntese de ADN ou a sua iniciação podem ser utilizados contra desordens de proliferação celular, tais como tumores/cancro, inflamação e psoríase. Podem ser utilizados por exemplo na indução de apoptose, na inibição de replicação celular, como agentes antitumorais ou anti-inflamatórios, e por aí adiante. Agentes que estimulem a replicação ou síntese de ADN ou a sua iniciação podem ser utilizados em qualquer contexto onde a estimulação celular seja necessária ou desejável, tal como na promoção de angiogénese, na cicatrização de feridas, queimaduras ou enxertos de tecido. Podem por exemplo estimular o crescimento celular, regeneração celular, formação de vasos sanguíneos, por exemplo em tecido enfartado ou comprometido ou em medicação para enxertos.

Num aspecto geral, o presente invento proporciona um método de ensaio para uma substância com capacidade para modular, p.ex. inibir ou estimular, a síntese de ADN, incluindo o método:

- (a) tratamento de um sistema isento de células tal como divulgado com uma substância de teste; e
- (b) determinação da síntese de ADN.

Pode assim ser identificado um composto de teste que interrompa, reduza, interfira com, ou elimine total ou parcialmente a síntese ou replicação de ADN. Igualmente, um composto de teste que estimule, aumente, potencie ou amplie a síntese ou replicação de ADN pode assim ser identificado.

A síntese de ADN pode ser determinada através de qualquer meio adequado que pode convenientemente envolver a marcação de um desoxinucleósido e a determinação da incorporação do marcador no ADN. Qualquer marcador adequado pode ser empregue, incluindo radioactividade e fluorescência. A contagem de cintilações ou a análise por FACS podem convenientemente ser empregues. Em princípio a quantidade de ADN a ser sintetizada pode ser medida, mas isto não seria compatível com uma pesquisa de grandes quantidades de substâncias de teste.

O desempenho de um método de ensaio de acordo com o presente invento pode ser seguido de isolamento e/ou fabrico e/ou utilização de um

composto, substância ou molécula que dê positivo no teste quanto à capacidade para modular a síntese de ADN.

A quantidade de substância ou composto de teste que pode ser adicionada a um ensaio do presente invento será normalmente determinada através de tentativa e erro dependendo do tipo de composto utilizado. Tipicamente, podem ser utilizadas concentrações de cerca de 1 pM a 1 mM ou mais de composto inibidor putativo, por exemplo de 0,01 nM a 100 µM, p.ex. de 0,1 a 50 µM, tal como cerca de 10 µM. Podem ser utilizadas concentrações maiores quando a substância de teste é um péptido. Mesmo uma molécula com ligação fraca pode ser um composto piloto útil para investigação e desenvolvimento adicionais.

Os compostos que podem ser utilizados podem ser compostos químicos naturais ou sintéticos utilizados em programas de pesquisa de fármacos. Podem também ser utilizados extractos de procariotas e/ou eucariotas, tais como plantas, que contenham vários componentes caracterizados ou não caracterizados.

Anticorpos e seus fragmentos de ligação, dirigidos a um ou mais componentes do aparelho de replicação do ADN ou outro componente celular, formam uma outra classe de compostos inibidores putativos. Os anticorpos inibidores candidatos podem ser caracterizados e as suas regiões de ligação determinadas para proporcionar anticorpos de cadeia simples e seus fragmentos que são responsáveis pela interrupção da interacção.

Outros compostos inibidores candidatos podem basear-se na modelação da estrutura tridimensional de um polipéptido ou fragmento peptídico e utilização de concepção racional de fármacos para proporcionar potenciais compostos inibidores com determinadas características de forma molecular, tamanho e carga.

Um composto que se verificou ter a capacidade de afectar a replicação de ADN tem potencial terapêutico e outros em vários contextos, tal como discutido. Para tratamento terapêutico um tal composto pode ser utilizado em combinação com qualquer outra substância activa, p.ex. para terapia antitumoral outro composto ou terapia antitumoral, tal como radioterapia ou

quimioterapia. Assim, o ensaio do invento, quando conduzido *in vivo*, não necessita de medir o grau de modulação, p.ex. inibição ou estimulação, da síntese de ADN causada pelo composto a testar. Em vez disso pode ser medido o efeito na viabilidade celular, morte celular (p.ex. na presença e ausência de radio- e/ou quimioterapia), e por aí diante.

Um agente identificado utilizando uma ou mais pesquisas primárias como tendo capacidade para modular a síntese de ADN pode ser ainda avaliado utilizando uma ou mais pesquisas secundárias. Uma pesquisa secundária pode envolver um teste à capacidade para penetrar numa célula e de ser transportado para o núcleo, e/ou teste à capacidade para modular a replicação celular.

Após a identificação de uma substância ou agente que module ou afecte a replicação do ADN, a substância ou agente pode ser adicionalmente investigado. Para além disso, pode ser fabricada e/ou utilizada na preparação, i.e. fabrico ou formulação, de uma composição tal como um medicamento, composição farmacêutica ou fármaco. Estes podem ser administrados a indivíduos, p.ex. para qualquer um dos fins discutidos aqui noutra sítio.

Tal como observado, o agente pode ser peptídico, p.ex. um péptido que inclui uma sequência tal como acima descrita, ou pode ser um análogo funcional de um tal péptido.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "análogo funcional" refere-se a ~~variantes peptídicas ou compostos orgânicos possuindo a mesma actividade~~ funcional que um péptido em questão. Exemplos de tais análogos incluem compostos químicos que são modulados para se parecerem com a estrutura tridimensional de um domínio peptídico ou polipeptídico, e em particular com o arranjo dos resíduos dos aminoácidos chave.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona a utilização de uma substância identificada ou obtida utilizando um sistema isento de células de acordo com o presente invento em métodos de concepção ou pesquisa de mímicas da substância.

De forma concordante, o presente invento proporciona um método de concepção de mímicas de uma substância peptídica capaz de modular a



replicação do ADN identificada ou obtida utilizando um sistema isento de células tal como divulgado, compreendendo o referido método:

- (i) análise da substância para determinar os resíduos de aminoácidos essenciais e importantes para a actividade moduladora para definir um farmacóforo; e,
- (ii) modelação do farmacóforo para conceber e/ou pesquisar mímicas candidatos possuindo a actividade moduladora.

As técnicas de modelação adequadas são conhecidas na arte. Isto inclui a concepção das chamadas "mímicas" que envolve o estudo das interacções funcionais dos oligonucleótidos fluorogénicos, das moléculas e a concepção de compostos que contenham grupos funcionais arranjados de tal modo que possam reproduzir essas interacções.

A concepção de mímicas de um composto farmacologicamente activo conhecido é uma abordagem conhecida ao desenvolvimento de compostos farmacêuticos baseados num composto "piloto". Isto poderia ser desejável quando o composto activo é difícil ou dispendioso de sintetizar ou quando não é apropriado para um determinado método de administração, p.ex. os péptidos não são bem adequados como agentes activos para composições orais uma vez que tendem a ser rapidamente degradados por proteases no canal alimentar. A concepção, síntese e teste de mímicas podem ser utilizados para evitar a pesquisa aleatória de uma grande quantidade de moléculas quanto a uma propriedade alvo.

Existem vários passos vulgarmente tomados na concepção de uma mímica de um composto possuindo uma dada propriedade alvo. Primeiro, são determinadas as partes específicas do composto que são críticas e/ou importantes na determinação da propriedade alvo. No caso de um péptido, isto pode ser feito variando sistematicamente os resíduos de aminoácidos no péptido, p.ex. substituindo um resíduo de cada vez. Estas partes ou resíduos que constituem a região activa do composto são conhecidas como o seu "farmacóforo".

Uma vez encontrado o farmacóforo, a sua estrutura é modelada de acordo com as suas propriedades físicas, p.ex. estereoquímica, ligação, tamanho e/ou carga, utilizando dados de uma variedade de fontes, p.ex.



técnicas espectroscópicas, dados de difracção por raio X e RMN. A análise computacional, mapeamento de semelhanças (que modela a carga e/ou volume de um farmacóforo, em vez da ligação entre átomos) e outras técnicas, podem ser utilizadas neste processo de modelação.

Numa variante desta abordagem, são modeladas a estrutura tridimensional do ligando e do seu parceiro de ligação. Isto pode ser especialmente útil quando o ligando e/ou o parceiro de ligação mudam de conformação por ligação, permitindo que o modelo tenha isto em conta na concepção da mímica.

É então seleccionada uma molécula molde na qual podem ser enxertados os grupos químicos que imitam o farmacóforo. A molécula molde e os grupos químicos nela enxertados podem ser convenientemente seleccionados de forma a que a mímica seja fácil de sintetizar, tenha probabilidade de ser farmacologicamente aceitável e que não se degrade *in vivo*, mantendo ao mesmo tempo a actividade biológica do composto piloto. A mímica ou mímicas encontradas por esta abordagem podem então ser pesquisadas para se observar se têm a propriedade alvo, ou até que ponto a exibem. Optimizações ou modificações adicionais podem então ser efectuadas para chegar a uma ou mais mímicas finais para testes *in vivo* ou clínicos.

A mímica ou mímicas encontradas por esta abordagem podem então ser pesquisadas para se observar se têm a propriedade alvo, ou até que ponto a exibem. Optimizações ou modificações adicionais podem então ser efectuadas para chegar a uma ou mais mímicas finais para testes *in vivo* ou clínicos.

As mímicas deste tipo juntamente com a sua utilização em terapia formam outro aspecto do invento.

Geralmente, uma tal substância, p.ex. inibidora ou estimuladora, de acordo com o presente invento, é proporcionada numa forma isolada e/ou purificada, i.e. substancialmente pura. Isto pode incluir estar numa composição onde representa pelo menos cerca de 90% do ingrediente activo, de preferência pelo menos cerca de 95%, sendo preferível pelo menos cerca de 98%. Tal composição pode, no entanto, incluir materiais transportadores inertes ou outros excipientes farmacêutica e fisiologicamente aceitáveis. Tal como observado

abaixo, uma composição de acordo com o presente invento pode incluir para além de um composto inibidor tal como divulgado, uma ou mais moléculas diferentes de utilidade terapêutica, tais como um agente antitumoral.

O presente invento estende-se em vários aspectos não apenas a uma substância identificada como um modulador da replicação do ADN, de acordo com o que é aqui divulgado, mas também a uma composição farmacêutica, um medicamento, um fármaco ou outra composição compreendendo uma tal substância, a um método compreendendo a administração de uma tal composição a um doente, p.ex. para um fim discutido aqui noutro sítio, que pode incluir tratamento preventivo, à utilização de uma tal substância no fabrico de uma composição para administração, p.ex. para um fim discutido aqui noutro sítio, e a um método de fazer uma composição farmacêutica compreendendo a mistura de uma tal substância com um excipiente, veículo ou transportador farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, outros ingredientes.

Uma substância de acordo com o presente invento pode ser proporcionada para utilização num método de tratamento do corpo humano ou animal através de uma terapia que afecte a replicação do ADN nas células, p.ex. células tumorais. Outros fins de um método de tratamento empregando uma substância de acordo com o presente invento são discutidos aqui noutro sítio.

Assim o invento proporciona ainda um método de modulação da replicação do ADN, p.ex. para um fim aqui discutido noutro sítio, que inclui a administração de um agente que modula a replicação ou síntese de ADN, sendo um tal método útil em tratamento quando tal modulação é desejável.

O invento proporciona ainda um método de tratamento que inclui a administração a um doente de um agente que modula a replicação ou síntese do ADN. Fins exemplificativos de tal tratamento são discutidos aqui noutro sítio.

Quer seja um polipéptido, anticorpo, péptido, molécula de ácido nucleico, molécula pequena, mímica ou outro composto farmacêuticamente útil de acordo com o presente invento, para ser dado a um indivíduo, a administração é de preferência numa "quantidade profilacticamente eficaz" ou numa "quantidade terapeuticamente eficaz" (conforme seja o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia), sendo esta suficiente para apresentar benefício ao

indivíduo. A quantidade real administrada e a taxa e duração das administrações, dependerão da natureza e gravidade do que está a ser tratado. A prescrição de tratamento, p.ex. decisões sobre dosagem etc., é da responsabilidade dos médicos gerais e de outros médicos.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultânea ou sequencialmente, dependendo da condição a tratar.

As composições farmacêuticas de acordo com o presente invento e para utilização de acordo com o presente invento podem incluir, para além do ingrediente activo, um excipiente, transportador, tampão, estabilizante ou outros materiais bem conhecidos dos peritos na arte, farmaceuticamente aceitáveis. Tais materiais não devem de ser tóxicos e não devem interferir na eficácia do ingrediente activo. A natureza precisa do transportador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral, ou por injeção, p.ex. cutânea, subcutânea ou intravenosa.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode incluir um transportador sólido tal como gelatina ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas incluem geralmente um transportador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Podem ser incluídos soro fisiológico, solução de dextrose ou de outro sacárido ou glicóis tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no local da afecção, o ingrediente activo estará na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável que seja apirrogénica e possua um pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os peritos na arte relevante são bem capazes de preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotónicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer Lactada. Podem ser incluídos conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos, conforme necessário.

Em formulações de transportadores podem ser utilizados lipossomas, particularmente lipossomas catiónicos.

Exemplos das técnicas e protocolos acima mencionados podem ser encontrados em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edição, Osol, A. (ed.), 1980.

O agente pode ser administrado de um modo localizado a um local de tumor ou a outro local desejado ou pode ser entregue de um modo que atinja células tumorais ou outras.

Podem ser utilizadas terapias direccionadas para entregar o agente activo mais especificamente a certos tipos de células, através da utilização de sistemas direccionados tais como anticorpos ou ligandos específicos de células. O direccionamento pode ser desejável por uma variedade de razões, por exemplo se o agente for inaceitavelmente tóxico, ou se de outro modo for necessária uma dosagem demasiado elevada, ou se de outro modo não for capaz de entrar nas células alvo.

Em vez de se administrar estes agentes directamente, eles podem ser produzidos nas células alvo através de expressão a partir de um gene de codificação introduzido nas células, p.ex. num vector viral (uma variante da técnica de VDEPT - ver abaixo). O vector pode ser dirigido às células específicas a tratar, ou pode conter elementos reguladores que são activados de forma mais ou menos selectivamente pelas células alvo.

O agente (p.ex. molécula pequena, mimica) pode ser administrado numa forma precursora, para conversão na forma activa através de um agente activador produzido em, ou dirigido para, as células a tratar. Este tipo de abordagem é por vezes conhecido como ADEPT ou VDEPT, o primeiro envolvendo o direccionamento do activador para as células através de conjugação com um anticorpo específico para as células, enquanto que o último envolve a produção do activador, p.ex. uma enzima, num vector, através de expressão a partir do ADN de codificação num vector viral (ver por exemplo, EP-A-415731 e WO/ 90/07936).

Um agente pode ser administrado numa forma que seja inactiva mas que seja convertida numa forma activa no corpo. Por exemplo, o agente pode ser fosforilado (p.ex. para melhorar a solubilidade) sendo o fosfato clivado para proporcionar uma forma activa do agente no corpo.



Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultânea ou sequencialmente, dependendo da condição a tratar, tal como cancro ou qualquer outra condição em que seja desejado um efeito sobre a viabilidade celular.

O ácido nucleico de acordo com o presente invento que codifica um polipéptido ou péptido capaz de modular a replicação de ADN, pode ser utilizado em métodos de terapia génica, por exemplo no tratamento de indivíduos, p.ex. com o objectivo de prevenir ou curar (total ou parcialmente) uma desordem ou para outro fim tal como discutido aqui noutro sítio.

Vectores tais como vectores virais têm sido utilizados na arte anterior para introduzir um ácido nucleico numa grande variedade de células alvo diferentes. Tipicamente os vectores são expostos às células alvo de forma a que a transfecção possa ter lugar numa proporção suficiente de células para proporcionar um efeito terapêutico ou profilático útil a partir da expressão do polipéptido desejado. O ácido nucleico transfectado pode ser permanentemente incorporado no genoma de cada uma das células alvo, proporcionando um efeito de longa duração, ou alternativamente o tratamento pode ter que ser repetido periodicamente.

É conhecida na arte uma variedade de vectores, tanto vectores virais como vectores plasmídicos, ver Patente US Nº 5252479 e WO 93/07282. Em particular, têm sido utilizados vários vírus como vectores de transferência de genes, incluindo papovavírus, tais como SV40, vírus da vacínia, vírus de herpes, incluindo HSV e EBV e retrovírus. Muitos protocolos de terapia génica na arte anterior utilizaram retrovírus de murídeo incapacitados.

Como alternativa à utilização de vectores virais, outros métodos conhecidos de introdução de ácidos nucleicos em células incluem electroporação, co-precipitação com fosfato de cálcio, técnicas mecânicas tais como microinjecção, transferência mediada por lipossomas e absorção directa de ADN e transferência de ADN mediada por receptores.

A transferência génica mediada por receptores, na qual o ácido nucleico é ligado a um ligando proteico através de uma polilisina, sendo o ligando específico para um receptor presente na superfície das células alvo, é um

exemplo de uma técnica para direccionar especificamente ácidos nucleicos para determinadas células.

Um polipéptido, péptido ou outra substância capaz de modular ou interferir na replicação do ADN ou outra substância tal como aqui divulgado, ou uma molécula de ácido nucleico que codifique uma tal molécula peptídica, pode ser proporcionada num estojo, p.ex. selada num contentor adequado que proteja o seu conteúdo do ambiente externo. Um tal estojo pode incluir instruções para utilização.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1. Iniciação da síntese de ADN em núcleos em fase G1 co-incubados com núcleos em fase S num extracto celular em fase S humano. Foram sincronizadas células HeLa nas fases G1 e S do ciclo celular e os núcleos foram preparados tal como descrito em Procedimentos Experimentais. A análise da posição do ciclo celular destes núcleos foi feita através de citometria de fluxo.

A Figura 1A mostra a síntese de ADN em núcleos em fase G1 e S *in vitro*. As percentagens de núcleos que apenas incorporaram biotina-dUTP *in vitro* (barras cinzentas) e de núcleos que incorporaram biotina-dUTP *in vitro* e BrdU *in vivo* (barras pretas) foram determinadas através de microscopia de fluorescência. Foram utilizados anticorpo anti-BrdU ligado a fluoresceína e estreptavidina ligada a TexasRed para detectar o marcador incorporado *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Foi utilizado um total de $1,2 \times 10^6$ núcleos em cada experiência e as proporções de núcleos em fase S para G1 estão indicadas. O gráfico mostra a % dos núcleos totais que replicam a diferentes proporções de núcleos S:G1.

A Figura 1B mostra que os núcleos em fase S induzem a síntese de ADN de um modo dependente da dose em núcleos G1 co-incubados *in vitro*. Os dados são expressos como percentagens de núcleos em fase G1 na reacção que incorporou marcador apenas *in vitro* tal como especificado no método (1) em Procedimentos Experimentais. O gráfico mostra a % de núcleos G1 iniciados a diferentes proporções de núcleos S:G1.

Figura 2. Indução específica do ciclo celular da iniciação da síntese de ADN em núcleos em fase G1. Foram sincronizadas células HeLa em vários tempos após a entrada nas fases G1 e S e os núcleos foram isolados. A análise da posição do ciclo celular destes núcleos foi feita através de citometria de fluxo.

Figura 2A. Foram preparados núcleos em fase G1 nos tempos indicados após uma libertação da mitose e co-incubados com núcleos em fase S numa proporção de 1:1 num citosol de células em fase S. O gráfico mostra a % de núcleos G1 iniciados a diferentes horas após a entrada em G1 (núcleos em fase S constantes).

Figura 2B. Foram preparados núcleos em fase S nos tempos indicados após libertação de um bloqueio na fase S muito inicial e foram co-incubados com núcleos em fase G1 numa proporção de 1:1 num citosol de células em fase S. O gráfico mostra a % de núcleos G1 iniciados a diferentes horas após a entrada das células em fase S na fase S (núcleos G1 constantes).

Figura 2C: Foram co-incubados núcleos em fase G1 e S numa proporção de 1:1 num extracto citosólico derivado da fase G1 ou S. A percentagem de núcleos em fase G1 que iniciou a síntese de ADN na reacção foi determinada tal como na Figura 1, tal como é mostrado para a fracção citosólica de células em fase G1 e S.

Figura 3. Os núcleos em fase G2 não iniciam a síntese de ADN *in vitro* na presença de núcleos em fase S. Foram sincronizadas células HeLa na fase G2 e S do ciclo celular e os núcleos foram isolados. A análise da posição no ciclo celular destes núcleos foi feita através de citometria de fluxo. A figura mostra a síntese de ADN em núcleos em fase G2 e S *in vitro*, registando a % de núcleos totais que replicam a diferentes proporções de núcleos S:G2. As percentagens de núcleos que apenas incorporaram o marcador *in vitro* (barras cinzentas) e de núcleos que incorporaram o marcador *in vitro* e *in vivo* (barras pretas) foram determinadas através de microscopia de fluorescência indirecta.

Figura 4. Iniciação da síntese de ADN *in vitro* na presença de um extracto nuclear solúvel de células em fase S. Foram preparados extractos nucleares e citosólicos de células sincronizadas nas fases G1, S e G2. Foram incubados

núcleos em fase G1 nos extractos sem adição de núcleos em fase S e foi determinada a percentagem de núcleos que iniciaram a síntese de ADN *in vitro* através de microscopia de fluorescência.

A Figura 4A mostra os resultados de experiências nas quais foram incubados núcleos em fase G1 em extracto citosólico derivado de células HeLa em fase G1, S ou G2 na presença de um extracto nuclear em fase S. A percentagem de núcleos em fase G1 que iniciou a síntese de ADN na reacção foi determinada tal como descrito nos métodos (1) e (2) em Procedimentos Experimentais e está representada para o extracto citosólico em fase G1, S e G2.

Figura 4B. Titulação de extractos nucleares. Foram adicionados extractos nucleares de células em fase G1, S e G2 nas quantidades indicadas (μ l) a reacções contendo núcleos em fase G1 e extracto citosólico em fase S e a % de núcleos G1 iniciados foi calculada e representada no gráfico.

A Figura 4C mostra o decurso no tempo da iniciação *in vitro*. Foram adicionados extractos nucleares (10 μ l) de células em fase G1, S e G2 a reacções contendo núcleos em fase G1 e extracto citosólico em fase S. As reacções foram paradas nos tempos indicados (horas) e a % de núcleos em fase G1 iniciados foi representada para cada tempo.

Figura 5. A eficiência da iniciação varia com a posição precisa no ciclo celular dos núcleos substrato. Foram sincronizadas células HeLa a vários tempos após a entrada na fase G1 e na fase G2. Os núcleos G1 e G2 foram preparados e incubados com extractos nucleares e citosólicos de células em fase S. As percentagens máximas indicadas de núcleos que iniciaram a síntese de ADN *in vitro* foram determinadas após a subtracção dos contaminantes da fase S tal como especificado no método (2) em Procedimentos Experimentais e representadas a diferentes tempos em horas após saída de M.

Figura 6. Replicação semiconservativa de ADN iniciada *in vitro*. A síntese de ADN foi iniciada por extractos nucleares e citosólicos em fase S em núcleos G1 na presença de BrdUTP e α P³²dATP. Foi efectuada centrifugação de gradiente de densidade flutuante de CsCl do ADN sintetizado *in vitro*. Os núcleos em fase G1 foram incubados em citosol da fase S com (painel a) e sem

(painel b) extracto nuclear em fase S durante 2 h. O ADN nuclear foi então tratado com 0,2 U de MNase e o ADN purificado foi separado em gradientes de densidade de CsCl. As posições do ADN hemissubstituído (HL) e não substituído (LL) no gradiente fraccionado estão indicadas. (são representados kcpm por fracção para diferentes números de fracção).

Figura 7. As ciclinas A e E, complexadas com Cdk2, iniciam a síntese de ADN *in vitro*. Foram co-expressas as ciclinas humanas E, A e B1 recombinantes com os seus parceiros quinase Cdk2 e Cdc2 e purificados tal como especificado em Procedimentos Experimentais.

A Figura 7A mostra a titulação de ciclinas recombinantes e quinases para uma reacção contendo um extracto citosólico de células em fase S e de núcleos em fase G1 como substratos. A % de núcleos G1 iniciados está representada em função de μ l de proteína adicionada.

A Figura 7B mostra a titulação cruzada das ciclinas A e E, cada uma, complexada com Cdk2, para reacções semelhantes. A percentagem de núcleos em fase G1 que iniciou a síntese de ADN na reacção foi determinada tal como descrito no método (2) em Procedimentos Experimentais e representada para diferentes proporções de ciclina A/Cdk2:ciclina E/Cdk2 (1 μ l de proteína).

Descrevemos abaixo o estabelecimento de um novo sistema isento de células a partir de células somáticas humanas que obedece a controlos do ciclo celular somático. Com este sistema, analisamos os factores que desencadeiam a iniciação da replicação de ADN em núcleos de células somáticas.

A. RESULTADOS

A.1 Os núcleos em fase G1 iniciam a síntese de ADN quando co-incubados com núcleos e citosol da fase S

Como passo inicial para estabelecer um sistema humano isento de células para iniciação de replicação de ADN procurámos adaptar condições permissivas observadas em experiências de fusão celular. Em fusões entre células sincronizadas em fase S e G1 ou G2 apenas os núcleos em fase G1, mas não os núcleos em fase G2, iniciaram a replicação de ADN no heterocarião (Rao e

Johnson, 1970). Por isso sincronizámos primeiro células HeLa nas fases G1 e S do ciclo celular e isolámos núcleos destas culturas. O ADN em replicação nestes núcleos foi pré-marcado com BrdU *in vivo* para permitir uma identificação clara, através de microscopia de imunofluorescência, dos núcleos que já tinham estado na fase S. Os núcleos em fase S e G1 foram então incubados em proporções nucleares definidas num extracto citosólico preparado a partir de células em fase S, suplementado com nucleósido- e desoxinucleósido-trifosfatos. Estas reacções continham biotina-16-dUTP como marcador para o ADN sintetizado durante a incubação *in vitro*. Foi utilizada microscopia de fluorescência indirecta para determinar o número de núcleos que incorporavam marcador *in vivo* e *in vitro*. Utilizámos este ensaio para distinguir os núcleos que tinham iniciado a síntese de ADN *in vivo* e alongado a síntese *in vitro* (Heintz e Stillman, 1988; Krude, 1995) de núcleos que iniciaram a síntese de ADN *in vitro*.

Os núcleos em fase S alongaram eficientemente a replicação de ADN (Figura 1A) sob estas condições. Os núcleos G1 incubados sem adição de núcleos em fase S não iniciaram a replicação de ADN numa extensão significativa *in vitro* (Figura 1B). Em contraste, uma co-incubação de quantidades iguais de núcleos em fase G1 com núcleos em fase S conduziu à iniciação da síntese de ADN numa fracção significativa dos núcleos em fase G1 (Figura 1A). Em todos os núcleos que iniciaram a síntese de ADN *in vitro*, observámos um padrão de focos de replicação típico da fase S inicial, enquanto que os núcleos que já estavam na fase S apresentaram padrões de focos característicos de estádios mais tardios da fase S. Considerámos a possibilidade de alguns núcleos que sintetizam ADN *in vitro* poderem de facto ter iniciado a replicação de ADN *in vivo*, mas não terem ainda acumulado marcador suficiente para detecção através de microscopia imunofluorescente. Estes núcleos apareceriam então como falsos-positivos. Esta possibilidade é excluída através de experiências descritas abaixo tal como explicado na discussão.

A eficiência da iniciação da síntese de ADN em núcleos G1 foi ainda analisada variando a proporção entre núcleos em fase G1 e S. O número de núcleos G1 que iniciam *in vitro* dependia claramente da quantidade de núcleos em fase S que co-replicavam (Figura 1B). Concluimos que os núcleos em fase S que replicam exportam moléculas que induzem a iniciação da síntese de ADN em núcleos G1 vizinhos.

A seguir, examinámos ainda as contribuições de núcleos e extracto citosólico para a síntese de ADN *in vitro* (Figura 2). Primeiro, perguntámos se os núcleos preparados em tempos diferentes durante a progressão ao longo da fase G1 eram capazes de iniciar a síntese de ADN *in vitro*. Foram preparados núcleos entre 2 h e 9 h após libertação da mitose. Estes foram incubados com um número idêntico de núcleos em fase S num extracto citosólico de células em fase S. Os núcleos de todos os estádios da fase G1 iniciaram a síntese de ADN sob estas condições, no entanto, uma proporção mais elevada de núcleos preparados a partir de estádios mais tardios da fase G1 iniciaram a síntese de ADN do que núcleos de estádios mais iniciais de G1 (Figura 2A). Analisámos então se a capacidade de núcleos em fase S para desencadear a iniciação em núcleos em fase G1 vizinhos é restrita a um estágio em particular da progressão da fase S. Foram preparados núcleos a partir de células 2 h, 5,5 h e 7,5 h após libertação de um bloqueio muito cedo na fase S para obter preparações de núcleos no início, meio e final da fase S. Os núcleos do início e meio da fase S induziram núcleos G1 a iniciarem síntese de ADN com eficiências semelhantes, os núcleos do final da fase S foram claramente menos eficientes (Figura 2B). Foram observadas diferenças notavelmente semelhantes em experiências de fusão celular (Johnson e Mullinger, 1975).

Finalmente, visámos a contribuição do extracto citosólico para a iniciação da síntese de ADN *in vitro* e preparámos extractos citosólicos a partir de células sincronizadas em fase G1 e S. Ambos os extractos permitiram o alongamento da síntese de ADN em núcleos em fase S (dados não mostrados). Em contraste, apenas extractos citosólicos em fase S, mas não em fase G1, sustentaram uma iniciação eficiente da síntese de ADN em núcleos G1 em co-incubação com núcleos em fase S (Figura 2C).

A.2 Núcleos em fase G2 não iniciam a síntese de ADN

Investigámos a capacidade do citosol e de núcleos em fase S para discriminar entre núcleos não replicados (G1) e replicados (G2) como substratos. Os núcleos foram isolados a partir de células sincronizadas nas fases G2 e S do ciclo celular e incubados em proporções definidas num extracto citosólico de células em fase S. Os números de núcleos que sintetizaram ADN *in vivo*, antes da preparação e durante a incubação *in vitro*, foram determinados através de microscopia de fluorescência (Figura 3). Todos os núcleos em fase S

alongaram a síntese de ADN sob estas condições. A preparação de núcleos em fase G2 continha aproximadamente 35% de contaminantes da fase S tardia que também continuaram a síntese de ADN *in vitro*. De importância, não se observou iniciação de síntese de ADN em núcleos em fase G2 co-incubados com núcleos em fase S num extracto citosólico em fase S (Figura 3). Concluímos portanto que estas incubações *in vitro* obedecem a controlos do ciclo celular. A síntese de ADN inicia-se eficientemente apenas em núcleos G1, mas não em núcleos G2.

Em resumo, as experiências de co-incubação descritas acima demonstram claramente que é possível reconstruir *in vitro* as condições que iniciam a síntese de ADN humano especificamente em núcleos G1, mas não em G2 (Rao e Johnson, 1970).

A.3 Extractos nucleares em fase S podem substituir núcleos em fase S, iniciando a síntese de ADN em núcleos em fase G1, mas não em G2

Para reduzir a complexidade do sistema substituímos os núcleos em fase S indutores por extracto nuclear solúvel de células em fase S. Quando este foi adicionado a reacções contendo núcleos em fase G1 e extracto citosólico em fase S, iniciou-se a síntese de ADN em alguns núcleos em fase G1. Esta iniciação dependeu também do extracto citosólico de células em fase S, uma vez que extractos citosólicos de células em fase G1 ou G2 não permitiram uma iniciação eficiente da síntese de ADN na presença do extracto nuclear de células em fase S (Figura 4A). A adição de quantidades crescentes de extracto nuclear em fase S, mas não de células em fase G1 ou G2, conduziu a um aumento dependente da dose de núcleos G1 a iniciarem síntese de ADN *in vitro* (Figura 4B). Durante esta reacção, a percentagem de núcleos em fase G1 que iniciaram a síntese de ADN aumentou linearmente durante cerca de duas horas (Figura 4C).

A percentagem máxima de núcleos em fase G1 que iniciam *in vitro* variou entre preparações diferentes de núcleos (dados não mostrados). Não pôde ser aumentada através de concentrações superiores de extracto nuclear ou através de incubações mais prolongadas (Figura 4B e 4C). Para testar se este número se correlacionava com qualquer estágio de progressão da fase G1, preparámos núcleos de células sincronizadas em fase G1 em tempos diferentes após

libertação da mitose. A percentagem máxima em núcleos em fase G1 que iniciam *in vitro* aumentou claramente durante a progressão da fase G1 e as eficiências máximas foram obtidas nos estádios tardios da fase G1 (Figura 5). De importância, núcleos preparados a partir de células em fase G2 não iniciaram de todo a síntese de ADN (Figura 5).

Quantificámos de seguida a quantidade de síntese de ADN neste sistema medindo a incorporação de $\alpha^{32}\text{P}$ -dAMP no ADN nuclear (Tabela 1). Os núcleos em fase S alongaram eficientemente *in vitro* a síntese de ADN preexistente. Após 2 h de incubação os núcleos em fase S tinham sintetizado cerca de 10% do seu conteúdo de ADN genómico diplóide, o que é equivalente a cerca de 50% da taxa de replicação observada *in vivo* [Tabela 1, (a)]. Sem extracto nuclear em fase S os núcleos G1 apenas suportaram alongamento nos núcleos em fase S contaminantes (ver Figura 1), embora a uma eficiência ligeiramente reduzida [Tabela 1, (b)]. Na presença de um extracto nuclear em fase S, a síntese de ADN foi iniciada em cerca de 10% dos núcleos G1 *in vitro* e a eficiência desta síntese adicional de ADN em cada um dos núcleos na incubação de 2 h era comparável com a dos núcleos em fase S que se tinha iniciado *in vivo* [Tabela 1, (c) e (d)]. Concluímos que os núcleos G1 iniciam a síntese de ADN na presença de extractos nucleares e citosólicos de células em fase S *in vitro* e que alongam à mesma taxa (cerca de 50% da taxa *in vivo*) que os núcleos em fase S pré-iniciados.

A.4 Extracto nuclear em fase S desencadeia replicação semiconservativa de ADN em núcleos G1

Para confirmar que o ADN sintetizado após a iniciação *in vitro* é devido a replicação semiconservativa de ADN utilizámos substituição com BrdU e centrifugação de gradiente de densidade. Os núcleos G1 foram incubados em extractos citosólicos e nucleares de células em fase S na presença de BrdUTP e dATP marcado radioactivamente. Após uma incubação de 2 h o ADN genómico foi tratado com nuclease micrococcal (MNase) para gerar fragmentos de ADN definidos de comprimento mono- e polinucleossómico. Após uma incubação de 2 h, os núcleos foram tratados com 0 U, 0,1 U, 0,3 U ou 1 U de MNase durante 10 min e o ADN tratado foi analisado através de electroforese em gel e autorradiografia. Isto indicou também que o ADN sintetizado *in vitro* é montado em cromatina constituída por nucleossomas regularmente espaçados. A

centrifugação em gradiente de densidade deste ADN genómico polinucleossómico mostrou que o ADN sintetizado com e sem extracto nuclear em fase S era hemissubstituído com BrdU (Figura 6). De importância, a síntese adicional de ADN observada após iniciação *in vitro* na presença do extracto nuclear em fase S era claramente de densidade hemissubstituída (HL) (Figura 6, painel a). Estes dados mostram que este sistema inicia (e ainda alonga) a replicação de ADN semiconservativa em extractos de células humanas.

A.5 Ciclinas da fase S e Cdk2 substituem o extracto nuclear e desencadeiam a iniciação de síntese de ADN em núcleos em fase G1

Experiências de controlo indicaram que a iniciação, mas não o alongamento, da replicação de ADN em núcleos G1 incubados tal como em cima é completamente inibida pelo inibidor de quinases 6-DMAP a uma concentração de 3 mM (dados não mostrados). Tentámos por isso substituir o extracto nuclear iniciador de células em fase S por preparações de ciclinas humanas recombinantes e suas quinases dependentes de ciclinas cognatas (Cdk). Experiências preliminares mostraram que o extracto nuclear em fase S continha actividade de histona-H1-quinase e de ciclina A (dados não mostrados).

Expressámos Cdk2 humana sozinha ou complexada com as ciclinas A e E da fase S, como controlo, ciclina mitótica B1 complexada com Cdc2. Estas preparações foram adicionadas a reacções contendo núcleos em fase G1 e extracto citosólico de células em fase S na ausência de extracto nuclear. As percentagens de núcleos G1 que iniciaram a replicação de ADN foram monitorizadas através de microscopia de fluorescência (Figura 7). A ciclina mitótica B1/Cdc2 e a quinase Cdk2 sozinhas não desencadeiam a iniciação da síntese de ADN *in vitro* (Figura 7A). No entanto, cada uma das ciclinas A e E da fase S, complexadas com Cdk2, induziu a síntese de ADN de forma moderadamente eficiente (Figura 7A). De importância, uma combinação de ambas as ciclinas A e E complexadas com Cdk2, iniciou a síntese de ADN sinergeticamente com a eficiência máxima (Figura 7A, B) observada com um extracto nuclear em fase S (ver Figura 5). A adição do extracto nuclear a concentrações óptimas de ambas as ciclinas não aumentou a eficiência da iniciação *in vitro* (dados não mostrados). Para além disso, concentrações mais elevadas de ambas as ciclinas A e E, complexadas com Cdk2, juntas

conduziram a uma inibição da iniciação *in vitro* de um modo dependente da dose (Figura 7A), sugerindo um mecanismo de controlo retroactivo negativo.

Concluimos que as ciclinas A e E promotoras da fase S, ambas complexadas com a sua quinase Cdk2 cognata, desencadeiam a iniciação de síntese de ADN em núcleos G1 *in vitro*.

B. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

B.1 Cultura celular e sincronização

As células HeLa-S3 foram cultivadas como monocamadas subconfluentes de crescimento exponencial em placas de 145 mm em meio DME (Gibco), suplementado com 5% de soro fetal de vitelo (Gibco), 10 U/ml de penicilina (Sigma) e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Sigma).

Para preparar núcleos ou extractos da fase S, as células foram sincronizadas em fase S através de um único bloqueio em meio de cultura contendo timidina 2,5 mM (Sigma) durante 25 horas (Rao e Johnson, 1970), seguido por uma libertação para o meio de cultura durante 2 h. Para preparar núcleos em fase S muito inicial, foram utilizados dois bloqueios sequenciais de 25 h em timidina 2,5 mM, separados por um intervalo de 12 horas sem timidina (Rao e Johnson, 1970). Foram obtidas células em vários estádios específicos da fase S através da libertação para o meio de cultura de células em fase S muito inicial durante os tempos indicados nos resultados. As células foram sincronizadas em fase G2 através da libertação para o meio de cultura de células bloqueadas em fase S muito inicial durante 9-10 h. A passagem para G1 foi inibida adicionando 40 ng/ml de nocodazolo (Sigma) ao meio de cultura durante 5 h antes da preparação. As células mitóticas em acumulação foram removidas da preparação de núcleos G2 através de desprendimento selectivo durante as lavagens em tampão hipotónico (ver abaixo). As células na fase G1 foram obtidas através da libertação para o meio de cultura de células bloqueadas em fase S muito inicial durante 3 horas, seguido pela adição de 40 ng/ml de nocodazolo (Sigma) ao meio de cultura durante mais 12 horas para as parar em mitose (Johnson *et al.*, 1993). Estas células mitóticas foram então libertadas para meio de cultura fresco durante 6 h, a menos que indicado em contrário.



A sincronização celular foi determinada através de citometria de fluxo de núcleos isolados. Um milhão de núcleos directamente corados com iodeto de propídio (5 $\mu\text{g/ml}$ em PBS contendo Triton X-100 a 0,4%) e analisados por FACScan (Becton Dickinson) e pelo software Lysis II. Os dados são apresentados como histogramas mostrando o conteúdo de ADN relativo (eixo dos xx) e o número de células (eixo dos yy).

B.2 Preparação dos núcleos

Os núcleos foram preparados tal como descrito (Heintz e Stillman, 1988; Krude, 1995) com pequenas modificações: As células foram lavadas duas vezes com tampão hipotónico gelado (HEPES-potássio 20 mM; pH 7,8; acetato de potássio 5 mM, MgCl_2 0,5 mM, DTT 0,5 mM). Todos os passos subsequentes foram efectuados a 4°C. Deixou-se que as células inchassem durante 10 minutos em 20 ml de tampão hipotónico por placa e o tampão em excesso foi removido. Neste estágio, as células mitóticas foram removidas, porque se desprenderam do substrato sob condições hipotónicas. As células em interfase ainda aderentes ao substrato foram raspadas das placas e rebentadas com 25 golpes num homogeneizador "dounce" (Wheaton), utilizando um pilão de ajuste livre. Os núcleos foram sedimentados a 4000 rpm durante 5 min numa centrífuga Eppendorf 5415C. O sobrenadante foi utilizado para uma preparação do extracto citosólico. Os núcleos sedimentados foram ressuspensos e lavados três vezes em PBS e finalmente sedimentados a 5000 rpm durante 5 min. O sobrenadante em excesso foi removido e os núcleos sedimentados foram ressuspensos no volume residual. As concentrações de núcleos foram determinadas com um hemocítmetro.

B.3 Preparação de extractos isentos de células

O sobrenadante citosólico da preparação de núcleos foi novamente centrifugado a 20000 $\times g$ num rotor Sorvall SS34 durante 30 min e congelado em N_2 líquido. Os extractos citosólicos continham 9-11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, determinado com um estojo Bio-Rad (Bradford, 1976) e albumina de soro bovino como padrão.

Para a preparação de extractos nucleares os núcleos sedimentados foram ressuspensos em tampão hipotónico contendo NaCl 0,4 M a $1,5 \times 10^8$

núcleos/ml. As proteínas nucleares foram extraídas durante 90 min a 4°C. O material nuclear foi sedimentado durante 30 min a 14000 rpm numa centrífuga Eppendorf 5415C. O sobrenadante foi directamente utilizado e preparado de fresco para cada experiência. Os extractos nucleares continham 7-9 µg/µl de proteína.

Estes extractos eram aparentemente isentos de núcleos uma vez que o material nuclear residual nos extractos não podia ser detectado através de microscopia (não mostrado).

B.4 Preparação de baculovírus recombinantes

Foi utilizada a reacção em cadeia com polimerase (PCR) para adicionar um epítipo de afinidade de seis histidinas (His6) ao terminal carboxilo dos ADNc de Cdc2 e Cdk2 humanas (Lee e Nurse, 1987; Tsai *et al.*, 1991). Os ADNc de Cdc2 e Cdk2 foram clonados nos locais *Xma*I e *Spe*I do vector de expressão de baculovírus pAcA4 (Belyaev e Roy, 1993). A ciclina A e ciclina B1 humanas (Pines e Hunter, 1989; Pines e Hunter, 1990) foram clonadas nos locais *Xba*I e *Bgl*II de pAcA4. A ciclina E humana (Koff *et al.*, 1991) foi clonada no vector de expressão de baculovírus pVL941. Os baculovírus recombinantes foram gerados utilizando o sistema Baculogold™ de PharMingen (San Diego, CA).

B.5 Expressão e purificação parcial dos complexos ciclina/Cdk humanos

Para expressar os complexos humanos ciclina A/Cdk2, ciclina E/Cdk2 e ciclina B1/Cdc2, foram co-infectadas células de insecto Sf9 com os baculovírus recombinantes de ciclina A e Cdk2, ciclina E e Cdk2, ciclina B1 e Cdc2, respectivamente, numa multiplicidade de infecções de 5 para cada baculovírus recombinante. Cada complexo ciclina/Cdk foi purificado a partir de uma cultura celular infectada de 800 ml ($1,5 \times 10^9$ células) utilizando uma coluna de afinidade de Ni^{2+} para isolar complexos contendo Cdk2 ou Cdc2. As culturas celulares de insecto infectadas foram colhidas 60 h após a infecção, lavadas em Hepes NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e lisadas em tampão de lise gelado (Hepes NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 25 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 1 mg/ml, antipaina, quimostatina A e pepstatina A) através de homogeneização "dounce". Imediatamente a seguir à homogeneização o NaCl no lisado foi ajustado para 0,3 M. Os lisados foram clarificados através de

centrifugação a 20000 $\times g$ durante 15 min e depois a 100000 $\times g$ durante 30 min, foi então adicionado ao sobrenadante resultante $MgCl_2$ 5 mM, antes de passar por gravidade através de colunas de afinidade de Ni^{2+} NTA-agarose (0,5 ml; Qiagen). Após carregar as colunas de Ni^{2+} NTA com o sobrenadante as colunas foram lavadas com 50 volumes de coluna de tampão de lavagem (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, glicerol a 10% v/v, imidazolo 5 mM, PMSF 1 mM). As proteínas ligadas foram eluídas com imidazolo 50 mM em tampão de lavagem. Os complexos ciclina/Cdk(his)₆ foram separados da Cdk(his)₆ monomérica e de outros contaminantes através da injeção de eluato de imidazolo numa coluna de filtração em gel Sephacryl S-200 26/60 (Pharmacia) que tinha sido pré-equilibrada com tampão de filtração em gel (Hepes NaOH 25 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, glicerol a 10% v/v). As fracções de filtração em gel foram ensaiadas quanto à actividade de histona H1 efectuando reacções de histona-H1-quinase tal como descrito em (Jackman *et al.*, 1995). A fosforilação da histona H1 foi medida utilizando filtros de fosfoceleulose (Pierce) e determinando as contagens de Cerenkov num contador de cintilações.

Como controlo, foram detectadas quantidades negligenciáveis de actividade de histona-H1-quinase em fracções isoladas de forma idêntica de lisados de células Sf9 que tinham sido infectadas com baculovírus de tipo selvagem ou com baculovírus recombinantes Cdc2/Cdk2, indicando que a actividade de histona-H1-quinase nas fracções de filtração em gel era devida à expressão de ciclina-Cdk humanos. As actividades de histona-H1-quinase dos perfis de eluição da filtração em gel indicaram que ciclina A/Cdk2 e ciclina B1/Cdc2 migravam a um volume correspondente a um PM de aproximadamente 150 kDa. Isto está intimamente de acordo com o volume de eluição dos complexos ciclina A/Cdk2 e ciclina B1/Cdc2 purificados (160 kDa) obtido por (Desai *et al.*, 1992). Ciclina E/Cdk2 migrou como um complexo de aproximadamente 140 kDa. A análise de "Western Blot" mostrou a presença da ciclina relevante em cada um dos complexos ciclina-Cdk parcialmente purificados e confirmou que cada um dos complexos ciclina-Cdk parcialmente purificados continha apenas uma ciclina humana (dados não mostrados).

Medindo as actividades específicas dos complexos ciclina-Cdk parcialmente purificados e comparando-as com as obtidas através da medição da actividade de histona-H1-quinase dos sobrenadantes dos lisados, este protocolo de purificação resultou num enriquecimento da actividade de

ciclina/Cdk de aproximadamente 50000 para cada ciclina/Cdk de lisados de células de insecto infectadas. As actividades específicas dos nossos ciclina B1/Cdc2 (2,5 nmol/min/mg) e ciclina A/Cdk2 (6,2 nmol/min/mg) parcialmente purificados encontradas co-infectando células de insecto são aproximadamente 10 vezes maiores que as descritas para ciclina B1/Cdc2 e ciclina A/Cdk2, encontradas após mistura de ciclinas purificadas com o seu parceiro Cdk *in vitro* e activação da actividade de quinase através da incubação com lisado de células de insecto (Desai *et al.*, 1992). O ciclina E/Cdk2 parcialmente purificado tinha uma actividade específica de histona-H1-quinase de 0,3 nmol/min/mg.

As fracções contendo actividade de histona-H1-quinase dependente de ciclinas foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C após ter sido adicionada BSA numa concentração de 5 mg/ml.

B.6 Reacções de síntese de ADN in vitro

As reacções padrão de síntese de ADN nuclear continham 30 µl de extractos citosólicos e até 10 µl de extracto nuclear ou de uma preparação de proteínas recombinantes. Quando foram utilizados volumes menores, o volume restante foi ajustado para os 10 µl finais com tampão de extracção. As reacções continham ainda 10 µl de uma mistura tamponada de nucleótidos [rendendo concentrações finais de: KDHEPES 40 mM, pH 7,8; MgCl₂ 7 mM; ATP 3 mM; GTP, CTP, UTP 0,1 mM de cada; dATP, dGTP e dCTP 0,1 mM de cada; biotina-16-dUTP 0,25 µM, DTT 0,5 mM; fosfato de creatina 40 mM; 5 µg de fosfocreatina-quinase (todos Boehringer Mannheim)]. Em experiências de co-incubação nuclear foram utilizados 1×10⁶ núcleos tal como especificado e noutras experiências foram utilizados 0,4-0,6×10⁵ núcleos como substratos. Para uma quantificação da síntese de ADN nuclear as reacções continham também 1-2 µCi de αP³²-dATP e biotina-16-dUTP foi substituída por dTTP 0,1 mM, ou, para substituições de densidade, por BrdUTP 0,1 mM (Sigma). As reacções foram misturadas em gelo e iniciadas através da transferência para 37°C. O tempo de incubação padrão foi de 2 h, a menos que indicado em contrário. Para a microscopia de fluorescência, as reacções foram paradas através da diluição com 500 µl de PBS à temperatura ambiente e foram processadas tal como especificado abaixo. Para quantificação da síntese de ADN, as reacções foram transferidas para filtros de fibra de vidro GF/C, os ácidos nucleicos foram precipitados com TCA a 10%, foram lavados e os dNMP

radioactivos incorporados foram determinados através de contagem de cintilações.

B.7 Análise dos produtos de reacção

A marcação fluorescente e a microscopia de fluorescência foram efectuadas exactamente tal como descrito (Krude, 1995), utilizando Hoechst 33258 para visualizar o ADN total, anticorpos conjugados com fluoresceína para visualizar o ADN substituído com BrdU sintetizado *in vivo* e estreptavidina conjugada com Texas Red para visualizar o ADN biotinilado sintetizado *in vitro*. Para cada experiência, foram registados mais de mil núcleos para alcançar significância estatística.

As percentagens de núcleos iniciados na reacção *in vitro* foram calculadas através da seguinte equação:

$$\text{percentagem de núcleos iniciados} = \frac{P_{\text{vitro}} - P_s}{100 - P_s} \times 100\%$$

onde P_{vitro} é a percentagem de todos os núcleos que incorporam marcador *in vitro* e P_s é a percentagem de núcleos na reacção que já estavam na fase S. P_s foi determinado através de pré-marcação *in vivo* [método (1)] ou através de subtracção de P_{vitro} da reacção, P_{vitro} de uma reacção de controlo que permitiu apenas o alongamento da replicação em citosol da fase G1 na ausência de extractos nucleares ou complexos ciclina-Cdk [método (2)]. Em experiências de controlo, ambos os métodos produziram resultados idênticos. Para cada experiência o método utilizado é especificado na legenda da figura. Estes cálculos são derivados dos utilizados em estudos de fusão celular (Rao e Johnson, 1970).

O tratamento das reacções de replicação com MNase (Boehringer Mannheim) foi efectuado tal como descrito (Shimamura *et al.*, 1988). O ADN resistente à nuclease foi separado em géis de agarose a 1,5% em tampão TAE (Sambrook *et al.*, 1989) e visualizado através de autorradiografia do gel seco. A centrifugação em gradiente de densidade do ADN tratado com MNase foi efectuada tal como descrito anteriormente (Blow e Laskey, 1986 Lenno *et al.*, 1992).

C. DISCUSSÃO

Nas experiências acima relatadas, utilizámos extractos e núcleos de células sincronizadas para estabelecer um sistema isento de células humano que inicie a replicação de ADN sob controlo do ciclo celular. Núcleos de células HeLa em fase G1, mas não em fase G2 iniciaram a replicação de ADN *in vitro*. Esta reacção dependeu de factores citosólicos e nucleares das células em fase S. Os últimos puderam ser substituídos funcionalmente pelas ciclinas A e E humanas recombinantes complexadas com Cdk2.

C.1 Evidência da iniciação de síntese de ADN *in vitro*

Utilizámos microscopia de fluorescência para visualizar a replicação do ADN em núcleos individuais *in vitro*. Tal como relatado anteriormente, os núcleos em fase S continuaram a alongar eficientemente a replicação de ADN *in vitro* (Heintz e Stillman, 1988; Krude, 1995). Estes núcleos em fase S foram identificados através de pré-marcação do ADN em replicação *in vivo* antes da preparação dos núcleos. Foi utilizado um marcador diferente para identificar os núcleos que incorporaram o marcador *in vitro*. Os núcleos marcados *in vitro*, mas não *in vivo*, foram designados como tendo iniciado a síntese de ADN *in vitro*. Uma proporção de núcleos pode de facto ter iniciado a replicação de ADN *in vivo*, mas não ter acumulado ainda marcador suficiente para detecção através de microscopia de fluorescência. Estes núcleos apareceriam então como falsos-positivos, mas não podem ser responsáveis pela iniciação *in vitro* descrita acima pelas seguintes razões: Primeiro, numa experiência ao longo do tempo, a sua percentagem devia ser constante e não devia aumentar com o tempo *in vitro*, porque o marcador é claramente detectável após apenas 5 a 10 minutos da incubação *in vitro* (Krude, 1995). A percentagem de núcleos G1 que iniciam a síntese de ADN *in vitro* aumentou linearmente ao longo de todo o período de incubação até serem atingidas as eficiências máximas de até 85% após 2 horas (Figura 4; e dados não mostrados para as experiências de co-incubação). Por outro lado, uma preparação de núcleos G1 continha menos de 1% de núcleos que puderam ser designados como tendo iniciado a síntese de ADN *in vitro* por estes critérios (Figura 1A). Segundo, a adição de extracto nuclear (e de complexos ciclina-Cdk2 recombinantes) induziu um aumento dependente da dose na percentagem de núcleos que iniciaram a síntese de ADN *in vitro* acima de um fundo constante de núcleos em fase S, presentes como contaminantes

do procedimento de sincronização (Figuras 4 e 7). Terceiro, apenas a iniciação da síntese de ADN em núcleos G1, mas não o alongamento em núcleos em fase S foi inibida por 6-DMAP 3 mM (dados não mostrados). Portanto, concluímos que os núcleos que incorporaram marcador apenas *in vitro* e não *in vivo*, iniciaram a síntese de ADN *in vitro* e que os falsos-positivos ocorrem com uma abundância muito reduzida de menos de 1% dos núcleos G1 analisados.

C.2 Iniciação de replicação semiconservativa de ADN *in vitro*

Neste sistema, várias linhas de evidência indicam que a síntese de ADN iniciada em núcleos G1 é devida a verdadeira replicação semiconservativa do ADN e não a reparação do ADN. Primeiro, em experiências de substituição de densidade, o ADN sintetizado em núcleos G1 após iniciação *in vitro* era hemissubstituído com BrdU, tal como o era o ADN sintetizado em núcleos que alongam a fase S sob condições idênticas (Figura 6). Segundo, a taxa e quantidade de ADN sintetizado por núcleo G1 após iniciação *in vitro* era quase idêntica à taxa e quantidade de ADN sintetizado por núcleo que alonga a fase S (Tabela 1). Esta síntese de ADN foi inibida por 30 µg/ml de afidicolina, um inibidor das ADN-polimerases α e δ (não mostrado) e para além disso, o ADN replicado *in vitro* foi eficientemente montado em cromatina (Figura 6), excluindo mitocôndrias ou bactérias contaminantes como substratos para esta síntese de ADN [p.ex. ver: (Heintz e Stillman, 1988)]. Terceiro, o ADN sintetizado num núcleo G1 após iniciação *in vitro* situava-se sempre em focos de replicação subnucleares discretos num padrão típico para a fase S inicial em células humanas (Nakamura *et al.*, 1984; Nakayasu e Berezney, 1989; Krude, 1995; Krude *et al.*, 1996) (Figura 1; e dados não mostrados). Por outro lado, os núcleos em fase S que alongam *in vitro* continuaram a síntese de ADN em focos de replicação subnucleares que estavam activos *in vivo*, antes da preparação (Krude, 1995). Neste núcleos, os padrões dos focos de replicação eram típicos para todos os estádios da fase S, incluindo S média e final [ver p.ex. (Nakayasu e Berezney, 1989; Krude *et al.*, 1996) para referências]. Durante a incubação *in vitro* estes focos de replicação activos moveram-se relativamente aos seus locais de pré-marcação *in vivo* antes da preparação (Figura 1), tal como descrito para o seu comportamento dinâmico *in vivo* (Manders *et al.*, 1992). Tomados em conjunto, estes dados indicam que a síntese de ADN iniciada *in vitro* é replicação semiconservativa de ADN com características dinâmicas e morfológicas de fase S inicial.

C.3 Factores necessários para a iniciação in vitro

As condições experimentais deste sistema humano foram adaptadas de experiências de fusão celular onde a replicação de ADN é iniciada sob controlo do ciclo celular num núcleo de uma célula em fase G1, mas não em fase G2, após fusão com células em fase S (Rao e Johnson, 1970). Isolámos núcleos de células humanas sincronizadas e co-incubámos núcleos G1 ou G2 com núcleos em fase S em extractos citosólicos de células sincronizadas. Estes extractos citosólicos alongam a replicação de ADN em núcleos em fase S (Heintz e Stillman, 1988; Krude, 1995) e suportam também a replicação do ADN de SV40 (Li e Kelly, 1984; D'Urso *et al.*, 1990). De importância, a iniciação da síntese de ADN em núcleos em fase G1, mas não em fase G2 foi desencadeada por um sinal derivado de núcleos em fase S. Este sinal persistiu ao longo da fase S, embora com uma eficiência reduzida na fase S tardia (Figura 2; e dados não mostrados), tal como observado em experiências de fusão celular (Johnson e Mullinger, 1975). Este sinal pode ser funcionalmente substituído por um extracto nuclear solúvel de células em fase S e, com a mesma eficiência, pelas ciclinas A e E humanas recombinantes complexadas com Cdk2 (ver abaixo). Estas proteínas são predominantemente nucleares durante a fase G1 e S (Girard *et al.*, 1991; Pines e Hunter, 1991; Dulic *et al.*, 1992; Koff *et al.*, 1992; Pagano *et al.*, 1992; Rosenblatt *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 1993; Ohtsubo *et al.*, 1995). Tomados em conjunto, estes dados indicam que pelo menos um sinal que desencadeia a iniciação da síntese de ADN em núcleos G1 *in vitro* é derivado de uma estrutura nuclear da fase S, e não do citosol da fase S tal como anteriormente especulado (Rao e Johnson, 1970; Heichman e Roberts, 1994). Por outro lado, o citosol de células em fase S, mas não em fase G1 ou G2, contribui com factores para a reacção que permitem que a iniciação ocorra mas que não são suficientes para iniciar a síntese de ADN por si próprios. A dependência da iniciação da replicação das fases do ciclo celular dos componentes do sistema é portanto mais complexa que para a iniciação da replicação do ADN de SV40 (D'Urso *et al.*, 1990). Para o ADN de SV40, um extracto citosólico de células de fase S humanas, ou um extracto da fase G1 suplementado com ciclina A/Cdc2 ou ciclina B/Cdc2 heterólogos, é suficiente para iniciar a replicação de ADN na presença do antigénio T proteico iniciador viral (D'Urso *et al.*, 1990). Para iniciação da síntese de ADN em núcleos G1 na ausência de factores virais exógenos, o citosol da fase S não é suficiente, mas

apenas permissivo. A base para esta permissividade é desconhecida, mas é muito provável que o citosol da fase S contenha factores activos de replicação sintetizados e/ou activados apenas na fase S, que são necessários para montar os complexos de iniciação e replicação em núcleos G1. No entanto, o alongamento da replicação de ADN em núcleos em fase S pré-iniciados *in vivo* não dependeu de extractos da fase S. Foi observado em extractos citosólicos e nucleares de células G1, S e G2 e na ausência de extracto nuclear, consistente com relatos anteriores (Heintz e Stillman, 1988; Krude, 1995).

De importância, os núcleos G2 não reiniciam síntese de ADN neste sistema. Por essa razão, extractos de células humanas são capazes de se diferenciar entre núcleos de acordo com o seu estágio no ciclo celular. Isto é consistente com resultados obtidos no sistema de replicação de ADN isento de células de ovos de *Xenopus laevis* utilizando núcleos de células G1 e G2 humanas (Leno *et al.*, 1992). No entanto, estes dois sistemas são fundamentalmente diferentes; na embriogénese inicial de *Xenopus*, uma fase S muito rápida alterna com mitose na ausência das fases G1 e G2. O controlo destes acontecimentos é imitado em extractos de ovos de *Xenopus* activados por proteínas maternas depositadas no ovo e activadas durante a fertilização (Lohka e Masui, 1983; Blow e Laskey, 1986; Hutchison *et al.*, 1987; Murray e Kirschner, 1989). Após a transição da blástula média, o ciclo celular embrionário abrande e são introduzidas as fases G1 e G2 no ciclo celular juntamente com o controlo das transições de G1 para S e de G2 para M. Os extractos e núcleos de células somáticas humanas utilizados neste estudo parecem portanto reflectir mais intimamente as actividades que operam no controlo da fase G1 para S que extractos de ovos de *Xenopus*. Estamos presentemente a comparar directamente o sistema humano com o de *Xenopus* para identificar diferenças na regulação dos ciclos celulares iniciais de anfíbio e somático de mamífero.

C.4 Eficiência da iniciação da replicação de ADN em núcleos G1 in vitro

Este sistema de replicação isento de células permitiu-nos investigar as contribuições da fase G1 do ciclo celular para a iniciação da replicação do ADN *in vitro*. A capacidade máxima dos núcleos G1 para iniciarem correlacionou-se com a posição na fase G1 no momento da sua preparação (Figuras 2 e 4). Era relativamente baixa em G1 inicial e aumentou para os níveis máximos em estádios tardios de G1. No entanto, foi detectada uma diferença significativa

nesta eficiência com as duas abordagens experimentais descritas neste artigo: Em experiências de co-incubação, até 50% dos núcleos em G1 inicial iniciaram. Para G1 tardia este valor chegou a 85% (Figura 2, e dados não mostrados). Em contraste, nos sistemas solúveis as eficiências foram menos de 5% para núcleos em G1 inicial e até 35% para G1 tardia (Figuras 4 e 7). Estas diferenças na eficiência de iniciação *in vitro* podiam ser devidas às seguintes razões:

Primeiro, os núcleos em fase G1 desencadeados pelos complexos ciclina-Cdk2 para iniciarem *in vitro* podiam ser derivados de uma subpopulação de células que passaram um ponto de restrição na G1 média *in vivo* e estão deste modo já comprometidas a entrar na fase S em resposta a sinais indutores (Zetterberg *et al.*, 1995). Esta subpopulação aumentaria na população de células G1 à medida que progredissem ao longo de G1. Estamos presentemente a testar a ciclina D e as suas quinases cognatas quanto a um papel nesta progressão. Num segundo modelo, os núcleos em fase S, mas não os extractos solúveis e as proteínas recombinantes, podiam sequestrar ou inactivar um ou mais inibidores hipotéticos da iniciação da replicação de ADN que está associada a núcleos em G1 inicial e, numa menor extensão, em G1 tardia. Este ou estes inibidores hipotéticos podiam ser um ou mais dos inibidores conhecidos das ciclinas de G1 e suas Cdk, tais como p21^{Cip1}, p27^{Kip1} ou proteínas codificadas pela família génica INK4 [revisto por (Draetta, 1994; Sherr, 1994; Sherr e Roberts, 1995)]; ou podiam estar relacionados com p40^{Sic1} de levedura (Nugroho e Mendenhall, 1994, Schwob *et al.*, 1994). No entanto, esta possibilidade tem de ser tratada com cautela, uma vez que uma adição das ciclinas A/Cdk2 e/ou E/Cdk2 recombinantes em excesso não estimulou a eficiência dos núcleos em G1 inicial para iniciar *in vitro* (Figura 7; e dados não mostrados), enquanto que a sobre-expressão de ciclinas de G1 *in vivo* podia aliviar a paragem em G1 mediada por inibidores [(Sherr e Roberts, 1995) e referências inclusas]. Em qualquer caso, ambos os modelos são consistentes com uma via de activação de múltiplos passos operando na fase G1 que prepara os núcleos G1 para iniciarem a fase S apenas em G1 muito tardia.

C.5 Ciclina A/Cdk2 e ciclina E/Cdk2 são ambos necessários para iniciar optimamente a fase S em núcleos G1

Ciclina A/Cdk2 e ciclina E/Cdk2 recombinantes humanos desencadearam a iniciação da replicação de ADN *in vitro* sinergeticamente até uma eficiência

máxima de 35% (Figura 7). Eficiências idênticas foram obtidas com extracto nuclear de células em fase S (Figuras 4 e 5). Uma combinação de ambas as ciclinas e extracto nuclear não aumentou a eficiência da iniciação *in vitro* (dados não mostrados). É portanto muito provável que o extracto nuclear tenha activado a mesma via que os complexos ciclina-Cdk2 para desencadear a iniciação da síntese de ADN em núcleos em fase G1. O extracto nuclear da fase S tinha actividade de histona-H1-quinase e continha as proteínas ciclina A e Cdk2, mas quantidades menores de ciclina E do que de ciclina A, tal como medidas através de imunotransferência (dados não mostrados).

Os nossos dados apoiam fortemente um papel das ciclinas A e E complexadas com Cdk2 na transição de G1 para S no ciclo celular. A sobre-expressão dos genes ectópicos da ciclina A, E (e D) em fibroblastos de roedor diplóides não transformados resultou num encurtamento da fase G1 e numa entrada acelerada em S *in vivo* (Ohtsubo e Roberts, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994; Wimmel *et al.*, 1994; Resnitzky *et al.*, 1995). A injeção de anticorpos anti-ciclina A ou E, ou de construções de ARN anti-sentido correspondentes, em células de mamífero inibiu o aparecimento da fase S (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992; Zindy *et al.*, 1992; Ohtsubo *et al.*, 1995). Os dados relatados neste artigo demonstram que ciclina A/Cdk2 e E/Cdk2 actuam sinergeticamente para desencadear a fase S *in vitro*, e cada ciclina/Cdk2 sozinho conduziu a um nível significativamente inferior de iniciação. Os dois complexos ciclina/Cdk2 parecem portanto actuar através de duas vias separadas que convergem em G1 tardia ou que actuam em sucessão, com o E-Cdk2 activo a preceder o A-Cdk2 no desencadear da transição de G1 para S. Esta última possibilidade é apoiada pelos dados de expressão *in vivo*, uma vez que a expressão da ciclina E precede a ciclina A no ciclo celular (Girard *et al.*, 1991; Pines e Hunter, 1991; Koff *et al.*, 1992; Rosenblatt *et al.*, 1992; Zindy *et al.*, 1992; Henglein *et al.*, 1994; Ohtsubo *et al.*, 1995). O complexo mitótico ciclina B1/Cdc2 por outro lado comporta-se de forma diferente. Não só é desnecessário para a transição G1 para S neste sistema (Figura 7), como é inibidor para a iniciação *in vitro* (dados não mostrados). Isto é consistente com o papel conhecido desta ciclina na regulação da mitose (Nurse, 1990; Nurse, 1994). Inesperadamente, elevadas concentrações de ambas as ciclinas A/Cdk2 e E/Cdk2, em conjunto, inibiram drasticamente a iniciação da replicação de ADN *in vitro* (Figura 7). A razão para isto é desconhecida.

TABELA 1. Síntese de ADN durante uma incubação de 2 h *in vitro*.

Núcleos em fase G1 (6,5 h após a mitose) e em fase S foram incubados num extracto citosólico e, quando indicado, também num extracto nuclear de células em fase S na presença de αP^{32} -dATP durante 2 h. A quantidade de ADN sintetizado foi determinada através de precipitação com TCA. A percentagem de núcleos que sofreram síntese de ADN em cada reacção foi determinada através da incorporação de biotina-dUTP e microscopia de fluorescência em paralelo. Já tinha sido mostrado que os núcleos em fase G1 que sintetizavam ADN na ausência de um extracto nuclear da fase S na reacção (b) tinham contaminantes da fase S, através de pré-marcação *in vivo* (ver Figura 1). São mostrados valores médios de quatro experiências independentes.

REFERÊNCIAS

- Belyaev, A. S. e Roy, P. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 1219-1223.
Blow, J. J. e Laskey, R. A. (1986) *Cell* 47, 577-587.
Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
Cardoso, *et al.* (1993) *Cell* 74, 979-992.
Challberg, M. D. e Kelly, T. J. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58, 671-717.
D'Urso, *et al.* (1990) *Science* 250, 786-791.
de Terra, N. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 607-614.
Desai, *et al.* (1992) *Mol. Biol. Cell* 3, 571-582.
Draetta, G. F. (1994) *Curr. Op. Cell Biol.* 6, 842-846.
Dulic, *et al.* (1992) *Science* 257, 1958-1961.
Girard, *et al.* (1991) *Cell* 67, 1169-1179.
Graham, *et al.* (1966) *Dev. Biol.* 14, 349-381.
Guttes, S. e Guttes, E. (1968) *J. Cell Biol.* 37, 761-772.
Harris, *et al.* (1966) *J. Cell Sci.* 1, 1-30.
Hartwell, L. H. (1974) *Bacter. Rev.* 38, 164-198.
Heichman, K. A. e Roberts, J. M. (1994) *Cell* 79, 557-562.
Heintz, N. H. e Stillman, B. W. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 1923-1931.
Henglein, *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5490-5494.
Hutchinson, *et al.* (1987) *EMBO J.* 6, 2003-2010.
Jackman, *et al.* (1995) *EMBO J.* 14, 1646-1654.

- Johnson, *et al.* (1993) *The synchronization of mammalian cells. In the cell cycle. A practical approach.*, P. Fantes e R. Roberts, eds. (Oxford: IRL press em Oxford University press), págs. 1-24.
- Johnson, R. T. e Harris, H. (1969) *J. Cell Sci.* 5, 625-643.
- Johnson, R. T. e Mullinger, A. M. (1975), *J. Cell Sci.* 18, 455-490
- Koff, *et al.* (1991) *Cell* 66, 1217-1228.
- Koff, *et al.* (1992) *Science* 257, 1689-1693.
- Krude, T. (1995) *Exp. Cell Res.* 220, 304-311.
- Krude, *et al.* (1996) *J. Cell Sci.* 109, 309-318.
- Lee, M. G. e Nurse, P. (1987) *Nature* 327, 31-35.
- Leno, *et al.* (1992) *Cell* 69, 151-158.
- Li, J. e Kelly, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6973-6977.
- Lohka, M. J. e Masui, Y. (1983) *Science* 220, 719-721.
- Manders, *et al.* (1992) *J. Cell Sci.* 103, 857-862.
- Murray, A. W. e Kirschner, M. W. (1989) *Nature* 339, 275-280.
- Nakamura, *et al.* (1984) *Exp. Cell Res.* 151, 123-133.
- Nakayasu, H. e Berezney, R. (1989) *J. Cell Biol.* 108, 1-11.
- Nasmyth, K. (1993) *Curr. Op. Cell Bio.* 5, 166-179.
- Newport, J. (1987) *Cell* 48, 205-217.
- Nugroho, T. T e Mendenhall, M. D. (1994) *Mol. Cell Biol.* 14, 3320-3328.
- Nurse, P. (1994) *Cell* 79, 547-550.
- Nurse, P. (1990) *Nature* 344, 503-508.
- Ohtsubo, M. e Roberts, J. M. (1993) *Science* 259, 1908-1912.
- Ohtsubo, *et al.* (1995) *Mol. Cell Biol.* 15, 2612-2624.
- Ord, M. J. (1969) *Nature* 221, 964-966.
- Pagano, *et al.* (1992) *EMBO J.* 11, 961-971.
- Pines, J. e Hunter, T. (1990) *Nature* 346, 389-401.
- Pines, J. e Hunter, T. (1991) *J. Cell Biol.* 115, 1-17.
- Pines, J. e Hunter, T. (1989) *Cell* 58, 833-846.
- Rao, P. N. e Johnson, R. T. (1970) *Nature* 225, 159-164.
- Resnitzky, *et al.* (1994) *Mol. Cell Biol.* 14, 1669-1679.
- Resnitzky, *et al.* (1995) *Mol. Cell Biol.* 15, 4347-4352.
- Resnitzky, D. e Reed, S. I. (1995), *Mol. Cell Biol.* 15, 3463-3469.
- Romanowski, P. e Madine, M. A. (1996) *Trends Cell Biol.* 6, 184-188.
- Rosenblatt, *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2824-2828.

- Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Segunda edição (Cold Spring Harbor, New York, USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schwob, *et al.* (1994) *Cell* 79, 233-24.
- Sherr, C. H. (1994) *Cell* 79, 551-555.
- Sherr, C. H. e Roberts, J. M. (1995) *Genes Dev.* 9, 1149-1163.
- Shimamura, *et al.*, (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 4257-4269.
- Stillman, B. W. (1989) *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 197-245.
- Tsai, *et al.* (1991) *Nature* 353, 174-177.
- Wimmel, *et al.* (1994) *Oncogene* 9, 995-997.
- Zetterberg, *et al.* (1995) *Op. Cell Biol.* 7, 835-842.
- Zindy, *et al.* (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182, 1144-1154.

Tabela 1

Síntese de ADN durante uma incubação de 2 h *in vitro*

	<u>pmole de dNMP incorporado</u> 10 ⁵ núcleos	% de núcleos em replicação	<u>pmole de dNMP incorporado</u> 10 ⁵ núcleos em replicação	
(a) "núcleos em fase S"	182	95,0	191	
(b) "núcleos em fase G1"	9*	8,2*	134*	contaminantes da fase S
(c) "núcleos G1" + extracto nuclear S	32	19,3	167	incluindo contam. da fase S
(d) verdadeiros núcleos G1 + extracto nuclear S	23	10,9	211	excluindo contam. da fase S [(c)-(b)]

* mostrou-se serem contaminantes da fase S através de pré-marcação *in vivo* (ver Figura 1)

Lisboa, 21. DEZ. 2001

Por CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED
- O AGENTE OFICIAL -

○ ADJUNTO



Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Oj. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema isento de células para iniciação de replicação de ADN sob controlo do ciclo celular, incluindo
citosol da fase S ou uma sua fracção no qual são co-incubados
núcleos em fase G1, e
núcleos em fase S ou uma sua fracção.
2. Sistema isento de células para iniciação de replicação de ADN sob controlo do ciclo celular, incluindo
citosol da fase S ou uma sua fracção no qual são co-incubados
núcleos em fase G1, e
ciclina A e/ou E complexadas com a sua quinase dependente de ciclina cognata (Cdk2).
3. Sistema isento de células de acordo com a reivindicação 1 ou 2 incluindo núcleos em fase S juntamente com ciclina A e ciclina E ambas complexadas com Cdk2.
4. Sistema isento de células de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3 em que o citosol da fase S ou uma sua fracção é suplementado com nucleósido- e desoxinucleósido-trifosfatos.
5. Sistema isento de células de acordo com a reivindicação 4 em que é incluído um desoxinucleósido-trifosfato marcado.
6. Utilização de um sistema isento de células de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores para identificação ou obtenção de um agente que module a replicação de ADN.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 6 em que o agente é um inibidor da replicação de ADN.
8. Utilização de acordo com a reivindicação 6 em que o agente é um estimulante da replicação de ADN.

9. Método de ensaio para uma substância com capacidade para modular a síntese de ADN, incluindo o método:

- (a) tratamento de um sistema isento de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 com uma substância de teste; e
- (b) determinação da síntese de ADN.

10. Método incluindo, após identificação de uma substância como possuindo capacidade para modular a síntese de ADN de acordo com a reivindicação 9, a modificação da substância.

11. Método de acordo com a reivindicação 10 em que a substância é modificada para alterar uma propriedade da substância.

12. Método de acordo com a reivindicação 11 em que a substância é modificada para alterar a sua capacidade para modular a síntese de ADN.

13. Método incluindo, após identificação de uma substância como possuindo capacidade para modular a síntese de ADN de acordo com a reivindicação 9, a formulação da substância ou de uma forma modificada desta, numa composição incluindo pelo menos um componente adicional.

14. Método de acordo com a reivindicação 13 em que a composição inclui um excipiente farmacologicamente aceitável.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 14, em que a substância é um inibidor da síntese de ADN.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 14, em que a substância é um estimulante da síntese de ADN.

Lisboa, 21. DEZ. 2001

Por CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200-195 LISBOA



Figura 1

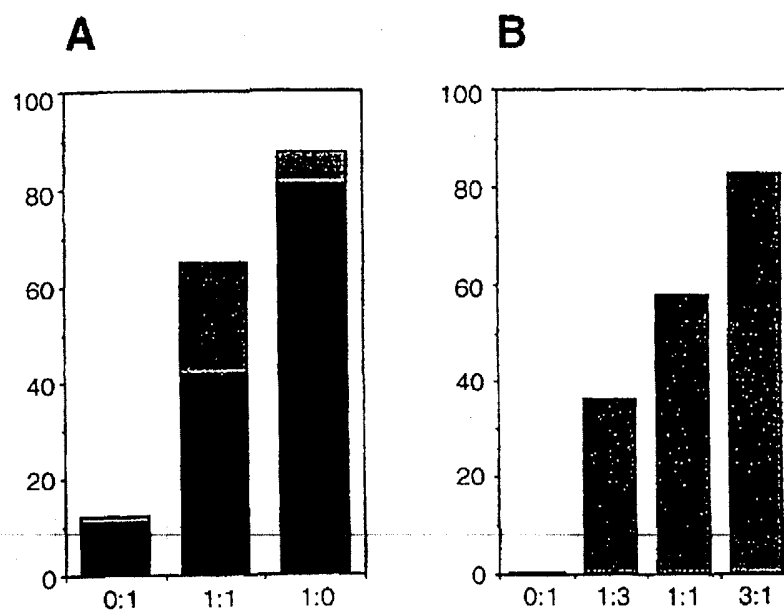
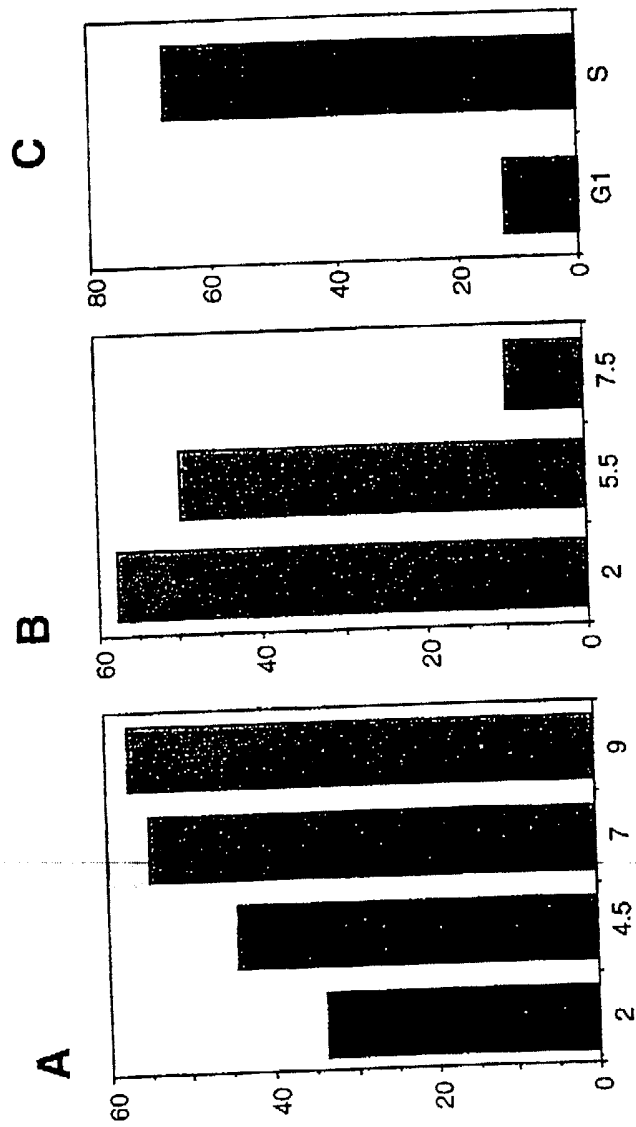




Figura 2

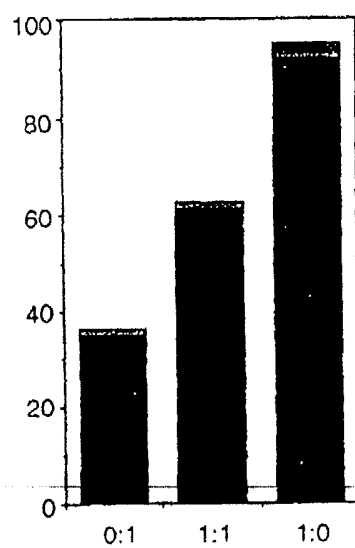


87 338
EP 0 932 664 /PT

3/7

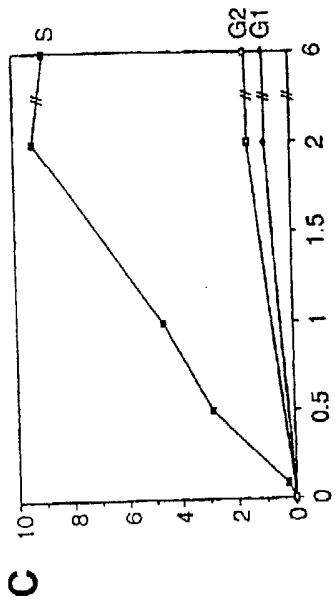
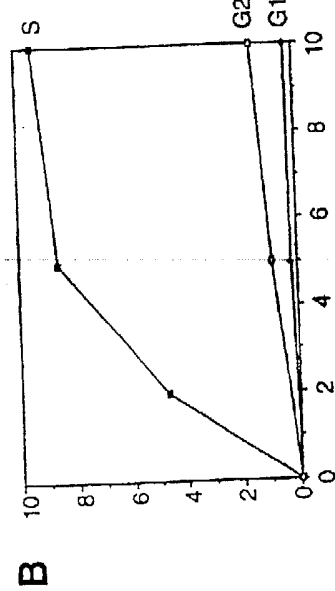
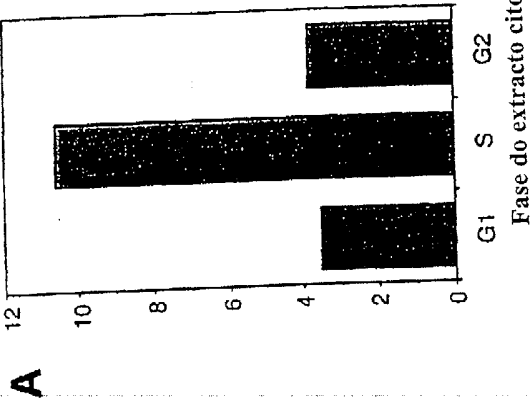
[Handwritten signature]

Figura 3



[Handwritten signature]

Figura 4



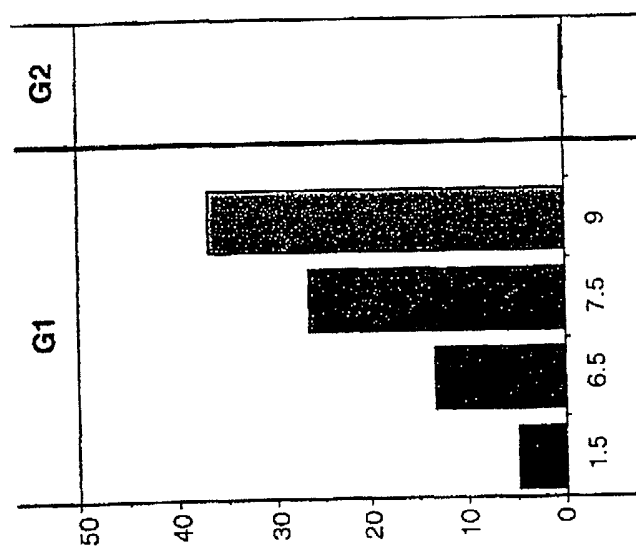


Figura 5



Figura 6

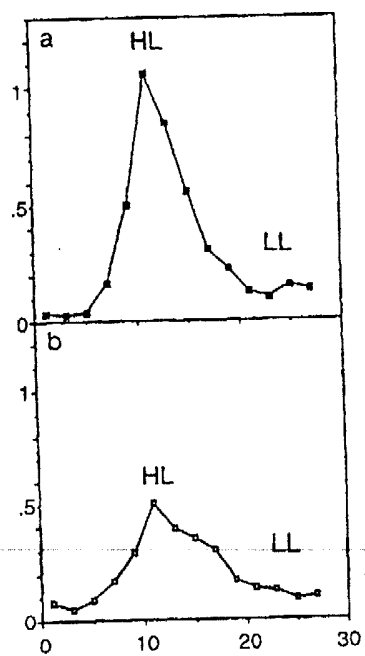




Figura 7

