



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(11) Número de Publicação: **PT 1083224 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) **A61K 31/713** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2000.09.01**

(30) Prioridade(s): **1999.09.02 EP 9920285**
1999.10.21 EP 9920346

(43) Data de publicação do pedido: **2001.03.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.12.06**
003/2007

(73) Titular(es):

LEADD B.V.
WASSENAARSEWEG 72 2333 AL LEIDEN NL

(72) Inventor(es):

MATHIEU HUBERTUS MARIA NOTEBORN NL
ASTRID ADRIANA ANNA MARIA DANEN-VAN OORSCHOTNL

(74) Mandatário:

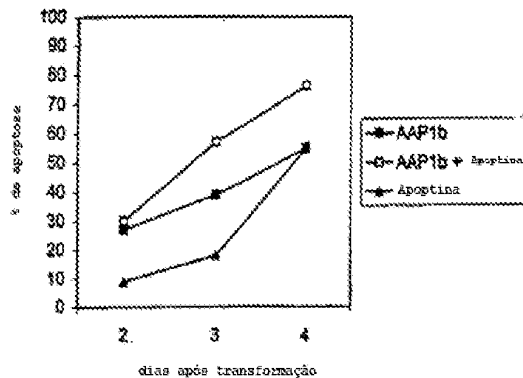
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS PT
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

(54) Epígrafe: **PROTEÍNA ASSOCIADA A APOPTINA**

(57) Resumo:

RESUMO**"PROTEÍNA ASSOCIADA A APOPTINA"**

O invento está relacionado com o campo da apoptose. O invento proporciona novas possibilidades terapêuticas, por exemplo novas terapias combinatórias ou novos compostos terapêuticos que podem funcionar por si sós, sequenciadamente ou conjuntamente com apoptina, especialmente nos casos em que p53 é (parcialmente) não funcional.



DESCRIÇÃO

"PROTEÍNA ASSOCIADA A APOPTINA"

O invento está relacionado com o campo da apoptose. A apoptose é um processo fisiológico activo e programado para eliminação de células supérfluas, alteradas ou malignas (Earshaw, 1995, Duke et al., 1996). A apoptose caracteriza-se pela retracção das células, segmentação do núcleo, condensação e clivagem do DNA em fragmentos do tamanho de domínios, na maior parte das células seguido de degradação internucleossómica. As células apoptóticas fragmentam-se em corpos apoptóticos delimitados por uma membrana. Finalmente, as células vizinhas e/ou macrófagos fagocitam rapidamente estas células mortas (Wyllie et al., 1980, White, 1996). As células que crescem em condições de cultura de tecidos e as células derivadas de material tecidual podem ser analisadas relativamente ao processo de apoptose com agentes que coram o DNA, e.g., DAPI, que cora fortemente e de forma regular o DNA normal, enquanto que o DNA apoptótico é corado fracamente e/ou irregularmente (Noteborn et al., 1994, Telford et al., 1992).

O processo apoptótico pode ser iniciado por uma variedade de estímulos (Wyllie, 1995, White 1996, Levine 1997). As alterações na taxa de sobrevivência celular desempenham um papel importante na patogénese de doenças

humanas, e.g. no desenvolvimento de cancro e em doenças auto-imunes, onde o aumento da proliferação ou decréscimo da morte celular (Kerr et al., Paulovich, 1997) é observado. Demonstrou-se que uma variedade de compostos quimioterapêuticos e radiação induzem apoptose em células tumorais, em muitos casos através da proteína p53 selvagem (Thompson, 1995, Bellamy et al., 1995, Steller, 1995, McDonnell et al., 1995).

No entanto, muitos tumores adquirem uma mutação em p53 durante o seu desenvolvimento, frequentemente correlacionada com uma resposta fraca à terapia do cancro. Determinados genes transformantes de vírus de DNA tumorigénicos podem inactivar p53 através da ligação directa a esta proteína (Teodoro, 1997). Um exemplo de tal agente é o antigénio T grande do vírus de DNA causador de tumores SV40. Para vários tumores (leucémicos), um nível de expressão elevado do proto-oncogene Bcl-2 ou Bcr-abl está associado a uma forte resistência a vários agentes quimioterapêuticos indutores de apoptose (Hockenberry, 1994, Sachs and Lotem, 1997).

Para tais tumores sem p53 funcional (representando mais de metade dos tumores) estão em desenvolvimento terapias anti-tumorais alternativas baseadas na indução de apoptose independente de p53 (Thompson 1995, Paulovich et al., 1997). Tem de se pesquisar factores envolvidos na indução de apoptose, que não necessitem de p53 e/ou possam ser bloqueados por actividades anti-apoptóticas, tais como

as do tipo Bcl-2 ou Bcr-abl. Estes factores devem ser parte de uma via de apoptose distinta ou devem estar a jusante (longe) dos compostos inibidores de apoptose.

A apoptina é uma pequena proteína derivada do vírus da anemia das galinhas (CAV; Noteborn and De Boer, 1995, Noteborn *et al.*, 1991, Noteborna *et al.*, 1994; 1998^a), que pode induzir apoptose em linhas celulares humanas malignas e transformadas, mas não em culturas de células humanas não transformadas. *In vitro*, a apoptina não induz a morte celular programada em células normais linfóides, dérmicas, epidérmicas, endoteliais e de músculo liso. No entanto, quando as células normais são transformadas tornam-se susceptíveis a apoptose pela apoptina. A expressão prolongada a apoptina, em fibroblastos humanos normais, revelou que a apoptina não tem actividade tóxica ou transformante nestas células (Danen-van Oorschot, 1997 and Noteborn, 1996).

Nas células normais, a apoptina é predominantemente encontrada no citoplasma, enquanto que nas células transformadas ou malignas, *i.e.* caracterizadas por hiperplasia, metaplasia, displasia ou aplasia, está situada no núcleo, sugerindo que a localização da apoptina está relacionada com a sua actividade (Danen-van Oorschot *et al.*, 1997). A apoptose induzida por apoptina ocorre na ausência de p53 funcional (Zhuang *et al.*, 1995a) e não pode ser bloqueada por Bcl-2, Bcr-abl (Zhuang *et al.*, 1995) ou pela proteína associada a Bcl-2, BAG-1 (Danen-Van Oorschot, 1997a, Noteborn, 1996).

Assim, a apoptina é um composto terapêutico para a destruição selectiva de células tumorais, ou ainda hiperplasia, metaplasia, aplasia ou displasia, especialmente para as células tumorais que se tornaram resistentes à indução (químio)-terapêutica de apoptose, devido à ausência de p53 funcional e (sobre)-expressão de Bcl-2 e de outros agentes inibidores de apoptose (Noteborn and Pietersen, 1998). Parece, que mesmo as células pré-malignas minimamente transformadas, são sensíveis ao efeito indutor de morte da apoptina. Ainda, Noteborn and Zhang (1998) mostraram que a apoptose induzida por apoptina pode ser usada no diagnóstico de células com propensão para cancro e no tratamento de células com propensão para cancro.

O facto de a apoptina não induzir a apoptose de células humanas normais, pelo menos não *in vitro*, mostra que um efeito tóxico do tratamento com apoptina *in vivo* será muito baixo. Noteborn and Pietersen (1998) e Pietersen et al. (1998) demonstraram que a apoptina expressa em adenovírus não possui um efeito tóxico *in vivo*. Ainda, em ratinhos labro foi mostrado que a apoptina possui uma forte actividade anti-tumoral.

No entanto, para aumentar mais o leque de compostos terapêuticos anti-cancro ou anti-doença auto-imune disponíveis, outros compostos terapêuticos são desejáveis, projectados para funcionarem por si sós, sequencialmente ou conjuntamente com apoptina, especialmente nos casos em que p53 é (parcialmente) não funcional.

O invento proporciona novas possibilidades terapêuticas, por exemplo novas terapias combinatórias ou novos compostos terapêuticos que podem funcionar sozinhos, sequenciadamente ou conjuntamente com apoptina, especialmente nos casos em que p53 é (parcialmente) não funcional.

Numa primeira realização, o invento proporciona um ácido nucleico isolado ou recombinante codificador de AAP-1 e apoptina, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional, o qual é capaz de induzir apoptose. Substância proteica é aqui definida como uma substância compreendendo um peptídeo, polipeptídeo ou proteína, facultativamente tendo sido modificada, por exemplo através de glicosilação, miristilação, fosforilação, pela adição de lípidos, por dimerização ou multimerização homóloga ou heteróloga, ou quaisquer outras modificações (pós-tradução) conhecidas na área.

Associada a apoptina é aqui definido como pertencente à cascata de substâncias especificamente envolvidas na cascata de acontecimentos encontrados na via de apoptose como induzíveis pela apoptina, de preferência as substâncias que estão especificamente envolvidas na via de apoptose independente de p53.

Numa realização preferida, o invento proporciona um ácido nucleico isolado ou recombinante de acordo com o

invento, em que o ácido nucleico codificador de AAP-1 compreende na Figura 2 (SEQ ID NO:9) os ácidos nucleicos 142 a 829, ou um seu fragmento funcional, o qual é capaz de induzir apoptose. Mais de preferência, a substância proteica codificada associada a apoptina colocaliza-se com outras substâncias indutoras de apoptose, por exemplo apoptina, quando as duas substâncias indutoras de apoptose estão presentes na mesma célula. Nas células normais não transformadas as duas proteínas indutoras de apoptose colocalizam-se no citoplasma, enquanto que nas células transformadas ou malignas as duas proteínas indutoras de apoptose colocalizam-se no núcleo. Numa outra realização do invento a substância associada a apoptina é capaz de se ligar ao factor de transcrição de ratinho YY1, o qual se mostrou anteriormente ligar-se ao homólogo de AAP-1 de ratinho RYBP (Garcia et al., 1999). Numa realização ainda mais preferida, o ácido nucleico isolado ou recombinante ou seu equivalente funcional ou fragmento codificador de uma substância proteica associada a apoptina capaz de proporcionar apoptose, deriva de uma biblioteca de cDNA, de preferência de uma biblioteca de cDNA de vertebrado, como seja uma derivada de aves de aviário, mas mais preferencialmente uma biblioteca de cDNA de mamífero, de preferência a referida biblioteca de cDNA compreende cDNA humano.

Numa outra realização, o invento proporciona um ácido nucleico isolado ou recombinante ou seu fragmento funcional codificador de uma substância proteica associada a apoptina, capaz de proporcionar apoptose como se mostra

na figura 1 ou 2, em particular codificador de uma nova proteína capaz de proporcionar apoptose ou seu fragmento funcional designado proteína associada a apoptina 1, aqui abreviado também como AAP-1. Obviamente, um ácido nucleico isolado ou recombinante ou seu fragmento funcional codificador de uma substância proteica adicional associada a apoptina capaz de se associar com a proteína AAP-1 é aqui igualmente proporcionado, e os meios e métodos para se chegar a tal proteína adicional, situada na cascata de apoptina, seguem os da descrição detalhada aqui apresentada.

Ainda, o invento proporciona um vector compreendendo um ácido nucleico de acordo com o invento. Exemplos de tal vector estão apresentados na descrição detalhada aqui feita; como seja o vector pMT2SM-AAP-1-a ou -b, o vector pMT2SM expressando cDNAs de AAP-1-a ou de AAP1-b ligados a Myc, um plasmídeo expressando um fragmento da proteína associada a apoptina, vectores de elevado nível de expressão tais como pMAL ou pET22b compreendendo um ácido nucleico de acordo com o invento, etc. Estes e outros vectores são, por exemplo, úteis na pesquisa de outras substâncias proteicas associadas a apoptina da cascata, como definido atrás, ou para a (sobre)expressão de uma proteína codificada por um ácido nucleico de acordo com o invento.

Ainda numa outra realização, o invento proporciona um vector compreendendo um ácido nucleico de acordo com o invento, o referido vector compreendendo um veículo para introdução de genes, tornando o invento muito útil na

terapia génica. Ao equipar-se um veículo de introdução de genes com um ácido nucleico de acordo com o invento, e ao ser direccionado o referido veículo para uma célula ou células que sofreram proliferação excessiva e/ou que demonstraram taxas de morte mais baixas, o referido veículo de introdução de genes proporciona à referida célula ou células os meios necessários para a apoptose, oferecendo possibilidades terapêuticas difíceis de alcançar.

Ainda, o invento proporciona uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico ou um vector de acordo com o invento. Exemplos compreendem células bacterianas ou de levedura transformadas ou transfectadas como descrito na descrição detalhada aqui apresentada. Prefere-se uma célula hospedeira de acordo com o invento que seja uma célula eucariótica transformada, como seja uma célula de levedura ou uma célula de vertebrado, como sejam células de mamífero ou células Cos transformadas ou transfectadas com um ácido nucleico ou vector de acordo com o invento. As referidas células são em geral capazes de expressar ou produzir uma substância proteica capaz de proporcionar apoptose com a capacidade de se associar à apoptina.

O invento proporciona ainda um método (linguagem da reivindicação 7).

O invento ainda descreve uma substância proteica associada à apoptina isolada ou recombinante capaz de proporcionar apoptose. Como exemplo aqui mostrado na figura

4, a expressão de tal substância proteica associada à apoptina em células, como sejam células tumorais ou outras células com excesso de proliferação, induz o processo apoptótico. Pode fazê-lo sozinha ou na presença de outras substâncias indutoras de apoptose, tais como apoptina, e especialmente independente de p53, mostrando que também nos casos em que p53 (funcional) está ausente, a apoptose pode ser induzida por uma substância de acordo com o invento. Quando a substância proteica associada a apoptina, capaz de proporcionar apoptose, é usada juntamente com uma outra substância indutora de apoptose, por exemplo apoptina, as duas substâncias proteicas colocalizam-se no citoplasma de células normais e não resultam em apoptose. Enquanto nas células transformadas ou malignas, as duas proteínas indutoras de apoptose colocalizam-se no núcleo e induzem apoptose. O invento também descreve uma substância proteica de acordo com o invento que se liga ao factor de transcrição YY1, o qual já mostrou ligar-se ao homólogo de AAP1 de ratinho RYBP. Em particular, o invento descreve uma substância proteica de acordo com o invento, codificada por um ácido nucleico de acordo com o invento, por exemplo compreendendo pelo menos uma parte de uma sequência de aminoácido como se mostra na figura 3 ou um seu equivalente funcional ou seu fragmento funcional, capaz de proporcionar apoptose sozinha ou em combinação com outras substâncias indutoras de apoptose, tais como apoptina. O invento ainda proporciona uma composição proteica (linguagem da reivindicação 3).

O invento ainda proporciona um método para

indução de apoptose *in vitro*, em células onde é observado o aumento da proliferação celular ou decréscimo da morte celular, compreendendo a introdução nas referidas células de uma sequência de ácido nucleico codificadora de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional, o qual é capaz de induzir apoptose, ou um método para indução de apoptose *in vitro*, em células onde se observa aumento da proliferação celular ou decréscimo da morte celular, compreendendo a introdução de AAP-1 nas referidas células, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional, o qual é capaz de induzir apoptose.

O invento também proporciona um método compreendendo ainda um método de acordo com a reivindicação 8 ou 9, compreendendo ainda a proteína apoptina ou um ácido nucleico codificador de apoptina.

O invento ainda proporciona um método para indução de apoptose, *in vitro*, em que nas referidas células é introduzido um ácido nucleico de acordo com o invento ou uma composição proteica de acordo com o invento.

O invento também proporciona um método para indução de apoptose *in vitro*, método esse de acordo com a reivindicação 8 ou 10, onde o referido ácido nucleico codificador de AAP-1 compreende na Figura 2 (SEQ ID NO:9) os ácidos nucleicos 142 a 829, ou um seu fragmento fun-

cional, o qual codifica AAP-1 e o qual é capaz de induzir apoptose.

O invento também descreve a produção de um anticorpo isolado ou sintético que reconhece especificamente uma substância proteica ou seu equivalente funcional ou seu fragmento funcional de acordo com o invento. Tal anticorpo é, por exemplo, obtido através da imunização de um animal experimental com uma substância proteica associada à apoptina ou com um seu fragmento imunogénico ou seu equivalente e colheita dos anticorpos policlonais a partir do referido animal imunizado (como aqui apresentado na descrição detalhada) ou obtidos por outros métodos conhecidos, tais como através da produção de anticorpos monoclonais, ou anticorpos de cadeia simples ou proteínas de ligação expressas a partir de ácido nucleico recombinante de uma biblioteca de ácido nucleico, por exemplo, obtido por técnicas de apresentação em fagos.

Com tal anticorpo, o invento também descreve uma substância proteica especificamente reconhecida pelo anticorpo de acordo com o invento, por exemplo, obtida através de imunoprecipitação, transferência Western ou outras técnicas imunológicas conhecidas.

Ainda, o invento proporciona a utilização de um ácido nucleico, vector, célula hospedeira ou substância proteica de acordo com o invento, para a indução de apoptose, por exemplo como mostrado na figura 4. Em

particular, em tal utilização é proporcionada a referida apoptose independente de p53. Em particular, é proporcionada tal utilização, compreendendo ainda a utilização de um ácido nucleico codificador de apoptina ou um seu equivalente ou fragmento funcional, ou a utilização de apoptina ou um seu equivalente ou fragmento funcional. Como se pode observar na figura 4, a combinação destas substâncias indutoras de apoptose aumenta a percentagem de apoptose das células tumorais tratadas.

Tal utilização conforme proporcionada pelo invento é particularmente útil do ponto de vista terapêutico. O invento proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico, vector, célula hospedeira ou substância proteica de acordo com o invento. Adicionalmente, é proporcionada tal composição farmacêutica de acordo com o invento ainda compreendendo um ácido nucleico codificador de apoptina ou um seu equivalente ou fragmento funcional ou apoptina ou um seu equivalente ou fragmento funcional.

Tal composição farmacêutica é, em particular, proporcionada para a indução de apoptose, por exemplo em que a referida apoptose é independente de p53, para o tratamento de uma doença em que se observa aumento da proliferação celular ou decréscimo da morte celular, como é em geral o caso se a doença compreender cancro ou doença auto-imune. Com isto, o invento proporciona um método para o tratamento de um indivíduo portador de uma doença em que

se observa o aumento da proliferação celular ou decréscimo da morte celular, compreendendo o tratamento do referido indivíduo com uma composição farmacêutica de acordo com o invento. Em particular estas composições compreendem um factor de uma via de apoptose, o qual é específico das células transformadas. Assim, estas composições são essenciais para novos tratamentos, mas igualmente para o diagnóstico de doenças relacionadas com aberrações no processo apoptótico, como sejam o cancro e doenças auto-imunes.

No campo do diagnóstico, o invento descreve um método para a detecção da presença de células cancerosas ou células com propensão para cancro numa amostra de células, compreendendo a transfecção de células na referida amostra com um ácido nucleico ou vector de acordo com o invento, cultura das referidas células e determinação da percentagem de apoptose das células na referida amostra. Por exemplo, podemos concluir que a localização celular de AAP-1 é diferente nas células tumorigénicas/transformadas comparativamente com as células normais não transformadas. Ainda, uma acumulação de AAP-1 no núcleo está correlacionada com a indução de apoptose, enquanto que a localização citoplasmática está relacionada com a viabilidade celular e a capacidade proliferativa normal. O invento descreve assim um método para a detecção da presença de células cancerosas ou células que têm propensão para cancerosas numa amostra de células, compreendendo a transfecção de células na referida amostra com um ácido nucleico ou um vector de acordo com o invento e determinação da localização intra-

celular de uma substância proteica derivada do referido ácido nucleico ou vector em células na referida amostra. Em particular, o invento descreve um método em que a presença da referida substância proteica nas referidas células é detectada por imunocoloração das referidas células com um anticorpo, como seja com um ensaio de imunofluorescência, ou um outro imunoensaio conhecido. De preferência, o referido anticorpo compreende um anticorpo de acordo com o invento.

Igualmente, o invento descreve um método para a identificação de um agente indutor de cancro putativo, como sejam genes transformantes ou seus fragmentos funcionais, compreendendo a exposição de uma amostra de células ao referido agente, por exemplo através de transfecção, ou meramente através da adição do agente ao meio das células e detecção da presença de células cancerosas ou células com propensão para cancerosas numa amostra de células com um método de acordo com o invento.

Ainda, o invento descreve um método para detectar células potencialmente cancerosas numa amostra de células, e assim detectar a propensão para cancro do indivíduo de onde foram extraídas as células da amostra, compreendendo a exposição das referidas células a um agente indutor de cancro, como seja luz UV, e detecção da presença de células cancerosas ou células que têm propensão para cancerosas, numa amostra de células com um método de acordo com o invento.

O invento será explicado mais detalhadamente na descrição detalhada que se segue, a qual não é limitativa do invento.

Descrição detalhada

Usámos o sistema de duplo híbrido em leveduras (Durfee *et al.*, 1993) para identificar os compostos celulares associados a apoptina, os quais são essenciais na indução de apoptose. O sistema usado é uma estratégia *in vivo* para identificar proteínas humanas capazes de se associarem fisicamente com apoptina. Foi usado para o rastreio de bibliotecas de cDNA relativamente a clones codificadores de proteínas capazes de se ligarem a uma proteína com interesse (Fields and Song, 1989, Yang *et al.* 1992). O invento proporciona, por exemplo, novas proteínas que se associam a apoptina, uma das quais é designada proteína de associação a apoptina 1, abreviada como AAP-1. O invento também proporciona um método para a indução de apoptose através da interferência com a função desta nova proteína AAP-1 descoberta ou seus equivalentes ou fragmentos funcionais e/ou a indução de apoptose através da expressão em excesso de AAP-1 ou gene relacionado ou seus equivalentes ou fragmentos funcionais.

O invento também proporciona uma terapia anti-tumoral baseada na interferência com a função de proteínas tipo AAP-1 e/ou a sua produção em excesso. As proteínas

tipo AAP-1 normalmente não são muito abundantes em linhas de células imortalizadas. Assim, um nível elevado aberrante de proteínas tipo AAP-1 resultará na indução do processo oposto de transformação celular, designadamente apoptose. O invento ainda proporciona o mediador de apoptose induzida por apoptina, o qual é específico de tumor. O invento proporciona uma terapia para cancro, doenças auto-imunes ou doenças relacionadas, que se baseia em proteínas tipo AAP-1 por si sós ou em combinação com apoptina e/ou compostos tipo apoptina.

Construção de pGBT9-VP3

Para construção do plasmídeo "armadilha", o qual permite a identificação de proteínas associadas a apoptina através de um sistema de duplo híbrido de levedura, o plasmídeo pET-16b-VP3 (Noteborn, resultados não publicados) foi tratado com NdeI e BamHI. O fragmento de DNA NdeI-BamHI de 0,4 Kb foi isolado a partir de agarose de baixo ponto de fusão. O plasmídeo pGBT9 (Clontech Laboratories, Inc Palo Alto, USA) foi tratado com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. O fragmento de DNA de 5,4 Kb foi isolado e ligado a uma elemento de ligação EcoRI-NdeI e ao fragmento de DNA de 0,4 Kb contendo as sequências codificadoras de apoptina começando no seu próprio codão de iniciação ATG. A construção final contendo um gene de fusão da sequência do domínio de ligação a GAL4 e a apoptina sob a regulação do promotor de levedura ADH foi designada pGBT-VP3 e demonstrou-se estar correcta por análise com enzimas de

restrição e sequenciação do DNA de acordo com o método de Sanger (1977).

Todos os passos de clonagem foram essencialmente realizados como descrito por Maniatis *et al.* (1992). O plasmídeo pGBT-VP3 foi purificado por centrifugação num gradiente de cloreto de CsCl e cromatografia em coluna de Sephacryl S500 (Pharmacia).

Biblioteca de cDNA marcada com o domínio de activação GAL4

O vector de expressão pACT, contendo os cDNAs de células B humanas transformadas com o vírus Epstein-Barr fundidos com o domínio de activação da transcrição GAL4, foi usado para a detecção de proteínas associadas a apoptina. A biblioteca de cDNA em pACT foi obtida a partir da biblioteca de cDNA em lambda-ACT, como descrito por Durfee *et al.* 1933.

Estirpes bacterianas e de levedura

E. coli estirpe JM109 foi o recipiente de transformação para o plasmídeo pGBT9 e pGBT-VP3. A estirpe bacteriana Electromax/DH10B foi usado para a transformação necessária para a recuperação dos cDNAs associados a apoptina em pACT e foi adquirida à GIBCO-BRL, USA.

A estirpe de levedura Y90 foi usada para o

rastreio da biblioteca de cDNA e de todos os outros transformantes, que são parte do sistema de duplo híbrido de levedura usado.

Meios

Para as selecções com drogas, placas de Luria Broth (LB) para *E. coli* foram suplementadas com ampicilina (50 microgramas por ml). Os meios YPD e SC para leveduras foram preparados como descrito por Rose *et al.* (1990).

A transformação da estirpe de levedura competente Y190 com plasmídeo pGBT-VP3 e pACT-cDNA e rastreio da actividade de beta-galactosidase.

A estirpe de levedura Y190 foi tornada competente e transformada de acordo com os métodos descritos por Klebe *et al.*, (1983). As células de levedura foram primeiro transformadas com pGBT-VP3 e subsequentemente transformadas com pACT-cDNA e estas células de levedura transformadas foram crescidas em placas sem histidina, igualmente sem leucina e triptofano.

Filtros Hybond-N foram colocados sobre as colónias de levedura, as quais eram positivas para histidina e deixadas molhar completamente. Os filtros foram descolados e submersos em azoto líquido para permeabilizar as células de levedura. Os filtros foram descongelados e colocados com as colónias para cima sobre papel Whattman

3MM numa placa de petri com tampão Z (Por litro: 16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g de KCl e 0,246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) contendo 0,27% de beta-mercaptoetanol e 1 mg/ml de X-gal. Os filtros foram incubados durante pelo menos 15 minutos ou durante a noite.

Recuperação dos plasmídeos de levedura

DNA total derivado de células de levedura, que eram positivas para histidina e beta-galactosidase, foi preparado usando o método da glucosylase-lise alcalina como descrito por Hoffman e Wiston (1987) e usado para transformar bactérias Electromax/DH10B via electroporação usando um Gene Pulser da Bio-Rad de acordo com as especificações do fabricante.

Os transformantes foram semeados em meio LB contendo o antibiótico ampicilina.

Isolamento de clones pACT associados a apoptina

Através do ensaio de filtros com colónias, as colónias foram lisadas e hibridadas com o oligómero de 17-meros marcados radioactivamente, o qual é específico para pACT (ver também a secção de análise de sequências). O DNA de plasmídeo foi isolado a partir de clones de pACT e, por meio de digestão com XhoI, analisado relativamente à presença de um inserto de cDNA.

Análise de sequências

Os subclones contendo as sequências codificadoras de proteínas associadas a apoptina foram sequenciados usando NTPs didesoxi de acordo com o método de Sanger, a qual foi realizada pela Eurogentec, Seraing, Belgium). A sequência iniciadora usada na sequenciação foi um 17-meros específico de pACT compreendendo a sequência de DNA 5'-TACCACTACAATGGATG-3'.

As sequências dos cDNAs codificadores das proteína associada a apoptina foram comparadas com sequências de genes conhecidas presentes no EMBL/Genbank.

A construção de pMAL-AAP1 e pET22b-AAP1.

Para a construção dos plasmídeos que expressem proteína em grande quantidade, os quais permitem a produção e isolamento da proteína associada a apoptina, foram usados os plasmídeos pMALTB e pET22b.

Para a construção dos plasmídeos de expressão de grande quantidade de proteína, os quais permitem a produção e isolamento da proteína associada a apoptina, foram usados os plasmídeos pMALTB e pET22b. O plasmídeo pMALTB é um derivado de pMAL-C2 (New England Biolabs) em que o local do factor Xa foi substituído por um local de Trombina. O plasmídeo pMALTB foi tratado com BamHI e Sali e o fragmento de DNA de $\pm 7,0$ Kb foi isolado a partir de um gel de

agarose/TBE (kit QIAGEN de extracção a partir do gel). A sequência AAP-1 codificadora da grelha de leitura aberta completa foi obtida por uma reacção de PCR em pACT-AAP-1b com a sequência iniciadora directa:

5'AACGGGATCCGGCGGCATGGGCGACAAGAAGAGCCCGACC3' e a sequência iniciadora reversa:

5'AAAAGTCGACTCAGAAAGATTCATCATTGACTGCTGACAT3';

o fragmento de PCR de $\pm 7,0$ Kb foi digerido com Bam HI e Sal I e isolado num gel de agarose/TBE (kit QIAGEN de extracção a partir do gel). A construção final contendo uma fusão entre o gene MBP e o gene AAP1 sob a regulação do promotor tac induzível por IPTG foi designada pMAL-AAP1.

O plasmídeo pET22b (Novagen) foi tratado com NdeI e NotI e o fragmento de DNA de $\pm 5,5$ Kb foi isolado a partir do gel de agarose/TBE (kit QIAGEN de extracção a partir do gel). A sequência AAP1 codificadora da grelha de leitura aberta foi obtida através de uma reacção de PCR com pACT-AAP-1b usando a sequência iniciadora directa:

5'GGGAATTCCATATGGGCGACAAGAAGAGCCCGACC3' e a sequência iniciadora reversa:

5'AAGGAAGTACGCGGCCGCGAAAGATTCATCATTGACTGCTGACATGT3';

o produto de PCR foi tratado com NdeI e NotI e o

fragmento de $\pm 7,0$ Kb foi isolado a partir do gel de agarose/TBE (kit QIAGEN de extração a partir do gel). A construção final, contendo uma fusão entre o gene AAP1 e a cauda de (His)₆ sob a regulação do promotor T7lac induzível com IPTG, foi designada pET22b-AAP1.

Demonstrou-se que ambas as construções estavam correctas através da análise de restrição e sequenciação de DNA de acordo com o método de Sanger (1977).

Todos os passos de clonagem foram essencialmente realizados como descrito por Maniatis et al. (1992).

Estirpes bacterianas para a expressão em grande quantidade de MBP-AAP1-(His)₆

Para a produção de proteína com o plasmídeo pMAL-AAP1, foi usada a estirpe *E. coli* B834(λ DE3) e com o plasmídeo pET22b-AAP1 foi usada *E. coli* estirpe BL21(DE3). Ambas as estirpes foram adquiridas à Novagen.

Resultados e discussão

A apoptina induz especificamente apoptose em células transformadas, tais como as linhas celulares derivadas de tumores humanos. Para identificar os compostos essenciais nesta via de apoptose específica de células transformadas e/ou tumores, foi realizado um rastreio genético em leveduras. Usámos uma biblioteca de cDNA

humano, a qual se baseia no vector plasmídico pACT contendo as cópias completas de cDNA preparado a partir de células B humanas transformadas com vírus de Epstein Barr (Durfee et al., 1993).

Construção de um plasmídeo armadilha expressando um produto de fusão do domínio de ligação ao DNA GAL4 e apoptina

Para avaliar a existência de proteínas associadas a apoptina na biblioteca de cDNA de células transformadas/tumorigénicas, teve de se construir o chamado plasmídeo armadilha. Para este fim, a região completa codificadora de apoptina, flanqueada por cerca de 40 pares de bases a jusante do gene da apoptina, foi clonada no local de clonagem múltipla do plasmídeo pGBT9.

A construção final, designada pGBT-VP3, foi analisada por análise com enzimas de restrição e sequenciação da área de fusão então apoptina e o domínio de ligação ao DNA GAL4.

Um gene (fragmento) codificador de uma proteína associada a apoptina foi determinado através de transativação de um promotor que responde a GAL-4 em levedura.

O gene da apoptina foi fundido com o domínio de ligação a DNA GAL4 do plasmídeo pGBT-VP3, enquanto que todos os cDNAs derivados das células B humanas

transformadas foram fundidos com o domínio de activação GAL4 do plasmídeo pACT. Se uma das substâncias proteicas codificadas pelos referidos cDNAs se ligar à apoptina, o domínio de ligação a DNA GAL4 estará na vizinhança do domínio de activação GAL4 resultando na activação do promotor de resposta a GAL4, o qual regula os genes repórter HIS3 e LacZ.

Os clones de levedura contendo o plasmídeo que expressa apoptina e um plasmídeo que expressa um fragmento proteico associado a apoptina podem crescer num meio sem histidina e ficarão corados de azul num ensaio de beta-galactosidase. Subsequentemente, o plasmídeo com o inserto de cDNA codificador da proteína associada a apoptina poderá ser isolado e caracterizado.

Antes de o podermos fazer, no entanto, determinámos que a transformação de células de levedura com pGBT-VP3 sozinho ou em combinação com o vector pACT vazio, não resultou na activação do promotor de resposta a GAL-4.

Identificação de proteínas associadas a apoptina codificadas pelos cDNAs derivados de uma linha de células B humana.

Encontrámos duas colónias de levedura, as quais quando da transformação com pGBT-VP3 e pACT-cDNA foram capazes de crescer num meio sem histidina (igualmente sem leucina e triptofano) e coraram de azul num ensaio de beta-

galactosidase. Estes resultados indicam que as colónias de levedura observadas possuem, para além do plasmídeo armadilha pGBT-VP3, também um plasmídeo pACT codificador de uma potencial proteína associada a apoptina.

O DNA de plasmídeo foi isolado a partir da colónia de levedura positiva, o qual foi usado para transformar bactérias. Através de um ensaio de hibridação de filtros usando uma sonda de DNA marcada específica de pACT, puderam ser determinados os clones contendo o plasmídeo pACT. Subsequentemente, o DNA de pACT foi isolado e digerido com a enzima de restrição XhoI, a qual é indicadora da presença de um inserto de cDNA. Finalmente, os plasmídeos pACT contendo um inserto de cDNA foi sequenciado usando o método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Descrição das proteínas associadas a apoptina

O rastreio genético de leveduras relativamente a proteínas associadas a apoptina resultou na detecção de dois clones de cDNA, A e B, compreendendo um único tipo de proteína designada proteína associada a apoptina 1, abreviada AAP-1. O cDNA AAP-1b inclui a grelha de leitura aberta completa com um codão de iniciação ATG, enquanto que a sequência de cDNA AAP-1-a possui uma grelha de leitura aberta parcial de AAP-1, a qual é completamente homóloga da sequência de DNA AAP-1-b.

A sequência de DNA determinada para os clones de

cdNA AAP-1 e AAP-1-b está apresentada nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A sequência de aminoácidos, derivada da sequência de DNA detectada do clone AAP-1-b, que representa a sequência de aminoácidos completa de AAP-1, está apresentada na Figura 3.

Construção de um vector de expressão para a identificação da proteína AAP-1 em células de mamífero.

Para estudar se os cDNAs clonados AAP-1-a e AAP-1-b codificam de facto produtos proteicos (associados a apoptina), realizámos as experiências que se seguem.

O DNA do plasmídeo pMT2SM contem o principal promotor tardio (MLP) do adenovírus 5 e a origem de SV40, permitindo níveis elevados de expressão dos genes estranhos nas células de mamífero transformadas, como sejam células Cos transformadas com SV-40. Ainda, o vector pMT2SM possui uma marca Myc (aminoácidos: EQKLISEEDL) que está em grelha com o produto do gene estranho. Esta marca Myc permite o reconhecimento de e.g. proteínas associadas a apoptina através do anticorpo 9E10 específico da marca Myc.

Os vectores pMT2SM expressando cDNAs AAP-1-a ou AAP-1-b com marcas Myc foram construídos como se segue. Os clones de cDNA pACT-AAP-1-a e pACT-AAP-1-b foram digeridos com a enzima de restrição XhoI e os insertos de cDNA foram isolados. O vector de expressão pMT2SM foi digerido com XhoI e tratado com fosfatase alcalina de intestino de

vitela e ligado aos insertos de cDNA AAP-1 isolados. Através da análise de sequências, foram identificadas as construções pMT2SM contendo o cDNA AAP-1-a ou AAP-1-b na orientação correcta.

A síntese da proteína AAP-1 marcada com Myc foi analisada por transfecção de células Cos com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1-a ou pMT2SM-AAP-1-b. Como controlo negativo, as células Cos foram sujeitas a uma transfecção simulada. Dois dias após transfecção, as células foram lisadas e a análise de transferência Western foi realizada usando o anticorpo específico da marca Myc 9E10.

Demonstrou-se que as células Cos transfectadas com pMT2SM-AAP-1-a e pMT2SM-AAP-1-b sintetizam um produto AAP-1 marcado com Myc, com o tamanho esperado de aproximadamente 33 KDa (AAP-1-a) ou 35 KDa (AAP-1-b). Conforme esperado, os lisados das células Cos sujeitas a transfecção simulada não possuíam um produto proteico reactivo com os anticorpos específicos da marca Myc.

Estes resultados indicam que fomos capazes de isolar cDNAs capazes de produzir um produto proteico com capacidade para se associar à proteína apoptina indutora de apoptose.

Co-imunoprecipitação da proteína AAP-1 marcada com Myc e apoptina num sistema de células de mamífero transformadas.

Em seguida, analisámos a associação da apoptina e da proteína AAP-1 por meio de co-imunoprecipitações usando o anticorpo específico da marca Myc 9E10. Mostrou-se que os anticorpos 9E10 não se ligam directamente a apoptina, o que permite a utilização de 9E10 para a realização das co-imunoprecipitações com proteínas associadas a apoptina (marcadas com Myc) e apoptina.

Com este objectivo, células Cos foram cotransfectadas com o plasmídeo pCMV-VP3 codificador de apoptina e com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1-a. Como controlo negativo, as células foram transfectadas com pCMV-VP3 expressando apoptina e um plasmídeo pcDNA3.1.LacZ-myc/His-LacZ codificador da beta-galactosidase marcada com Myc, a qual não se associa a apoptina.

Dois dias após transfecção, as células foram lisadas num tampão consistindo em Tris 50 mM (7,5), NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, 0,1% Triton X100, 1 mg/ml de Na₄P₂O₇ e inibidores de protease adicionados de fresco, tais como PMSF, Inibidor da Tripsina, Leupeptina e Na₃VO₄. As proteínas específicas foram imunoprecipitadas como descrito por Noteborn et al. (1998) usando os anticorpos específicos da marca Myc 9E10 e analisados por transferência Western.

A coloração da transferência Western com anticorpos 9E10 e anticorpos 111.3, os quais são especificamente dirigidos contra a marca Myc e apoptina, respectivamente,

mostrou que os lisados de células totais continham apoptina e a proteína AAP-1 marcada com Myc ou o produto beta-galactosidase. A imunoprecipitação dos produtos AAP-1 marcados com Myc foi acompanhada da imunoprecipitação do produto apoptina de 16 KDa. Pelo contrário, a imunoprecipitação de beta-galactosidase marcada com Myc não resultou numa coprecipitação significativa da proteína Apoptina.

No total, foram realizadas três experiências independentes de imunoprecipitação, as quais mostraram todas a capacidade de associação da apoptina à proteína AAP-1.

Estes resultados indicam que a nova proteína AAP-1 determinada é capaz de especificamente se associar à apoptina não só no fundo de levedura, como também num sistema de células de mamífero transformadas.

Expressão em grande quantidade da nova proteína AAP-1 em células humanas transformadas induz o processo apoptótico.

Ainda, examinámos se AAP-1 é portadora de actividade apoptótica. Primeiro, analisámos a localização celular da nova proteína AAP-1 em células humanas transformadas. Com tal objectivo, células humanas Saos-2 derivadas de osteossarcoma foram transfectadas, como descrito por Danen-van Oorschot (1997), com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1-a ou pMT2SM-AAP-1-b codificador da proteína AAP-1-a ou AAP-1-b marcada com Myc, respectivamente.

Através de imunofluorescência indirecta usando o anticorpo específico da marca Myc 9E10 e DAPI, que cora o DNA nuclear, demonstrou-se que as proteínas AAP-1 parcial e completa se estão presentes no núcleo da célula. De facto, colocalizam-se com as estruturas de cromatina/DNA.

Finalmente observámos se a expressão (em grande quantidade) de ambos os cDNAs codificadores de proteína AAP-1 completa ou parcial resulta na indução de apoptose. Quatro dias após transfecção, a maioria das células positivas para AAP-1 foram aberrantemente coradas com DAPI, o que é indicativo da indução de apoptose (Telford, 1992, Danen-van Oorschot, 1997).

A co-expressão de apoptina e de ambas as proteínas AAP-1 em células de tumores humanas, tais como células Saos-2, resulta num processo apoptótico mais rápido do que a expressão de apoptina ou proteína AAP-1 sozinha. Os resultados da actividade apoptótica da proteína AAP-1 completa estão apresentados na Figura 4. O facto de a proteína AAP-1 poder induzir apoptose em células Saos-2 sem p53 indica que AAP-1 pode induzir apoptose independente de p53. Estes resultados implicam que AAP-1 pode ser usada como agente anti-tumoral nos casos em que outros agentes (quimio)terapêuticos falham. Ainda, o facto de tanto a apoptina como AAP-1 induzirem uma via independente de p53 indica que AAP-1 se encaixa na via apoptótica induzida por apoptina.

Colocalização de apoptina e AAP-1 em células tumorais humanas.

Para estabelecer a possível colocalização de Apoptina e AAP-1 nas células humanas transformadas, plasmídeos codificadores de Apoptina e AAP-1 foram usados para transfectar células Saos-2. A expressão de AAP-1 e Apoptina foi controlada por imunofluorescência indirecta através de uma microscopia confocal de varrimento com laser, usando anticorpos mAbs específicos de Myc 9E10 contra a marca Myc em AAP-1 e pAB VP3-c contra o extremo C de Apoptina.

As células cotransfectadas com um plasmídeo codificador de AAP-1 e um plasmídeo codificador de Apoptina expressaram estas proteínas predominantemente no núcleo. Tanto apoptina como AAP-1 possuem estruturas granulares e as estruturas características atrás descritas. Através de microscopia confocal de varrimento com laser, foi claramente demonstrada colocalização parcial de AAP-1 e Apoptina nestas estruturas nucleares.

Concluindo, identificámos uma proteína associada a apoptina, designadamente a nova proteína AAP-1, que está presente no núcleo e é capaz de induzir apoptose (independente de p53) em células humanas tumorais. Ainda, quando AAP-1 e apoptina são expressas na mesma célula, as duas proteínas indutoras de apoptose estão colocalizadas no núcleo de células tumorais humanas.

AAP-1 localiza-se em células diplóides normais humanas em estruturas citoplasmáticas.

Em seguida, examinámos se AAP-1 se comporta de forma semelhante em células diplóides humanas não transformadas como foi encontrado para AAP-1 em células tumorais humanas.

Com este objectivo, fibroblastos diplóides humanos VH10 (Danen-Van Oorschot, 1997) foram transfectados, usando Eugene de acordo com o protocolo do fornecedor (Roche, Almere, The Netherlands), com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1b codificador da proteína AAP completa marcada com Myc. Paralelamente, células humanas derivadas de tumor Saos-2 foram igualmente transfectadas com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1b.

Por imunofluorescência indirecta, usando o anticorpo específico da marca Myc 9E10, demonstrou-se que em fibroblastos diplóides normais VH10 a proteína está situada no citoplasma. Conforme esperado, nas células humanas de tumor Saos-2, AAP-1 está situada no núcleo.

Ainda, examinámos o efeito da co-expressão de AAP-1 e de apoptina em fibroblastos humanos VH10 na localização celular de AAP-1, como descrito para células que expressam AAP-1 sozinho. Os dados de imunofluorescência mostram que a apoptina e AAP-1 estão situadas em estruturas

citoplasmáticas. Estes resultados indicam que a expressão de AAP-1 e/ou apoptina não resulta na localização nuclear de uma ou outra em células diplóides (humanas) normais.

Colocalização de apoptina e AAP-1 em fibroblastos humanos.

Para estabelecer a possível colocalização de apoptina e de AAP-1 nas células não transformadas, plasmídeos codificadores de Apoptina e AAP-1 foram usados para transfectar células VH10. A expressão de AAP-1 e de apoptina foi controlada por imunofluorescência indirecta através de microscopia confocal de varrimento com laser usando anticorpos mAb específicos myc 9E10 contra a marca Myc em AAP-1 e pAb VP3-c contra o extremo C de apoptina. As células foram avaliadas relativamente à (co)-localização de apoptina e AAP-1 e quanto à indução de apoptose por coloração nuclear com DAPI.

As células cotransfectadas com um plasmídeo codificador de AAP-1 e um plasmídeo codificador de apoptina expressaram estas proteínas predominantemente no citoplasma. A apoptina e AAP-1 tiveram ambas uma estrutura fibrosa e por vezes granular. Através da microscopia confocal de varrimento com laser, a colocalização de AAP-1 e de Apoptina foi claramente demonstrado ocorrer nestas estruturas citoplasmáticas. Estruturas citoplasmáticas semelhantes foram observadas com AAP-1, quando expressa sozinha ou vice versa quando a apoptina foi expressa sozinha.

Assim, na presença ou ausência de apoptina, AAP-1 possui uma localização citoplasmática e nas estruturas fibrosas agregadas em fibroblastos humanos não transformados.

Em conclusão, identificámos uma proteína associada a apoptina, designada AAP-1, a qual se localiza diferencialmente em células diplóides humanas não transformadas *versus* células tumorigénicas humanas. Estes resultados mostram que AAP-1 funciona numa forma diferente nas células diplóides normais e nas células tumorigénicas. Ainda, quando AAP-1 e apoptina são expressas na mesma célula normal não transformada, as duas proteínas indutoras de apoptose colocalizam-se no citoplasma.

Efeito na indução da ligação covalente de um sinal de localização nuclear do antígeno T grande de SV40 à proteína apoptina.

Nas experiências que se seguem, examinámos se a expressão de uma proteína quimérica consistindo em apoptina e sinal de localização nuclear do antígeno LT de SV40 (aminoácidos extremo N-Prolina-Prolina-Lisina-Lisina-Lisina-Arginina-Lisina-Valina-extremo C do antígeno T grande de SV40 ligado covalentemente ao extremo N de apoptina) resulta na indução de apoptose em células humanas não transformadas e transformadas. A proteína quimérica é designada NLS-apoptina.

Com este objectivo, fibroblastos humanos não transformados VH10 e células humanas transformadas Saos-2 derivadas de osteossarcoma (Danen-van Oorschot et al., 1997) foram transfectadas com um plasmídeo codificador da proteína quimérica NLS-apoptina. Nas células humanas transformadas, a expressão de NLS-apoptina resultou na localização nuclear de apoptina e na indução de apoptose. A expressão de NLS-apoptina em fibroblastos humanos normais, no entanto, resultou na localização nuclear de apoptina, mas não na indução de apoptose. Isto indica que o "forçar" do transporte de apoptina para o núcleo não resulta na sua actividade apoptótica per se. A apoptina parece requerer um evento adicional relacionado com tumorigénese.

Efeito da expressão de NLS-apoptina em AAP-1 em fibroblastos humanos normais.

Em seguida, examinámos se a expressão de NLS-apoptina pode influenciar a localização celular de AAP-1 e/ou a sua actividade apoptótica em fibroblastos humanos normais. Com este objectivo, células VH10 foram cotransfectadas com plasmídeos codificadores de NLS-apoptina ou AAP-1. Através de imunofluorescência indirecta e coloração com DAPI usando microscopia de fluorescência, foi claramente estabelecido que NLS-apoptina e AAP-1 estavam situadas no núcleo sem indução de apoptose. Isto indica que o "forçar" do transporte de AAP-1 através de NLS-apoptina para o núcleo não resulta na actividade apoptótica de AAP-1 per

se. A apoptina tal como AAP-1 parece requerer um acontecimento adicional relacionado com tumorigénese para se tornar apoptótica no núcleo de células transformadas.

AAP-1 não induz apoptose em células humanas diplóides não transformadas.

Nas experiências que se seguem, examinámos se AAP-1 sozinha ou em combinação com apoptina é também capaz de induzir apoptose em fibroblastos humanos diplóides não transformados tal como observado para células tumorigénicas/transformadas humanas.

Com este objectivo, células VH10 foram transfectadas com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1b como descrito atrás. As células transfectadas foram analisadas por imunofluorescência indirecta usando os anticorpos específicos da marca Myc e/ou específicos de apoptina e coloração DAPI. DAPI cora DNA intacto de forma diferente relativamente ao DNA apoptótico (Telford *et al.*, 1992). A análise mostra claramente que os fibroblasts VH10 contendo a proteína AAP-1 sozinha ou AAP-1 e apoptina não sofrem apoptose.

Os resultados obtidos mostram que as proteínas relacionadas com apoptina tais como AAP-1 devem comportar-se de forma diferente nas células "saudáveis" comparativamente com as células tumorais.

Ensaio de diagnóstico para células cancerosas.

Baseado na presente descrição, concluímos que a localização celular de AAP-1 é diferente em células humanas tumorigênicas/transformadas comparativamente com células humanas normais não transformadas. Ainda, a acumulação de AAP-1 no núcleo está correlacionada com a indução de apoptose, enquanto que a localização citoplasmática está correlacionada com a viabilidade celular e capacidade proliferativa normal. Assim, somos capazes de desenvolver um ensaio de diagnóstico para a identificação de células cancerosas (humanas) *versus* células não transformadas "saudáveis".

O ensaio consiste na transfecção de células (humanas) "suspeitas", por exemplo de origem humana, com um plasmídeo codificador de AAP-1, ou infecção das células com vectores virais expressando AAP-1. subseqüentemente, as células serão examinadas, 1) relativamente à capacidade de sofrer apoptose através da expressão excessiva do gene AAP-1 e 2) relativamente à alteração na localização de AAP-1 do citoplasma para o núcleo.

A localização intracelular de AAP-1 pode ser determinada, usando um ensaio de imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos de AAP-1 e/ou específicos de uma marca ligada a AAP-1, como seja a marca Myc aqui descrita. Se a percentagem de apoptose e/ou a localização nuclear de AAP-1 nas células analisadas expressando AAP-1 for significativamente superior ao controlo positivo

AAP-1 de células "saudáveis", pode-se concluir que as células analisadas se tornaram tumorigênicas/transformadas. Como controlo positivo conhecido, as células humanas tumorigênicas serão usadas para a expressão de AAP-1.

Co-expressão do antigénio T grande de SV40 e de AAP-1 resulta na translocação de AAP-1 e indução de apoptose.

Examinámos o efeito da expressão de genes transformantes na apoptose induzida por AAP-1 em células humanas normais derivadas de indivíduos saudáveis. Com este objectivo, fibroblastos humanos diplóides VH10 foram transitivamente cotransfectados com o plasmídeo pMT2SM-AAP-1b codificador da proteína AAP-1 completa e com o plasmídeo pR-s884 codificador do antigénio T grande de SV40 ou o plasmídeo control negativo pCMV-neo (Notelborn and Zhang, 1998).

Através de imunofluorescência indirecta, as células foram analisadas relativamente a apoptose induzida por AAP-1. As células VH10 normais não sofreram apoptose quando AAP-1 foi transfectada com o plasmídeo controlo negativo. Os resultados mostram, conforme esperado, que a expressão de AAP-1 não é capaz de induzir apoptose em células humanas diplóides normais, confirmando os dados referidos atrás. No entanto, os fibroblastos humanos diplóides normais expressando AAP-1 e antigénio T grande de SV40 sofreram apoptose induzida por AAP-1.

A transição de células humanas normais, da resistência a AAP-1 para susceptibilidade a AAP-1, pode provavelmente ser explicada pelo facto de a proteína AAP-1 translocar-se de uma localização citoplasmática para uma localização nuclear. Esta transição torna-se aparente logo 2 dias após transfecção dos plasmídeos codificadores da proteína transformante antigénio T grande do SV40. Pode-se concluir que ocorre um evento, neste exemplo devido à expressão de um produto transformante derivado de um vírus tumorigénico de DNA, o qual resulta na translocação de AAP-1 expressa em grande quantidade do citoplasma para o núcleo, o que é seguido da indução de apoptose.

Ensaio de diagnóstico para genes indutores de cancro, agentes e predisposição para cancro baseado na apoptose induzida por Aap-1.

Baseado na presente descrição, fomos capazes de desenvolver um ensaio de diagnóstico para a identificação de agentes ou genes indutores de cancro e/ou transformantes.

Um primeiro tipo de ensaio consiste na transfecção de células "normais", por exemplo de origem humana, com um plasmídeo codificador de AAP-1, ou infecção das células com vectores virais expressando AAP-1, juntamente com um plasmídeo codificador de um gene putativo transformante/indutor de cancro. Subsequentemente, as células serão

examinadas, 1) relativamente à capacidade de sofrer apoptose através da expressão excessiva do gene AAP-1 e 2) relativamente à alteração na localização de AAP-1 do citoplasma para o núcleo.

A localização intracelular de AAP-1 pode ser determinada, usando um ensaio de imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos de AAP-1 e/ou específicos de uma marca ligada a AAP-1, como seja a marca Myc aqui descrita. Se a percentagem de apoptose e/ou a localização nuclear de AAP-1 nas células normais co-expressando AAP-1 e o gene putativo transformante/indutor de cancro for significativamente superior ao controlo positivo AAP-1 de células que expressam um plasmídeo controlo, pode-se concluir que o gene analisado possui de facto actividade transformante/indutora de cancro.

Um segundo exemplo de um teste de diagnóstico, baseia-se no tratamento de células diplóides normais em cultura com um agente carcinogénico putativo. O agente pode ser adicionado, por exemplo, ao meio de cultura durante diferentes períodos de tempo. Subsequentemente as células são transfectadas com um plasmídeo codificador de AAP-1. Esta abordagem pode também ser realizada transfectando/infectando primeiro as células diplóides normais e depois tratando as células com o agente a ser testado.

Os passos subsequentes do ensaio são os mesmos descritos nesta secção para o primeiro tipo de ensaio de

diagnóstico. Se a percentagem de apoptose e/ou localização nuclear de AAP-1 nas células normais expressando AAP-1 e o agente carcinogénico putativo for significativamente superior ao das células do controlo positivo APP-1 expressando um agente de controlo, pode-se concluir que o agente analisado tem de facto actividade transformante/indutora de cancro.

Um terceiro exemplo de um teste de diagnóstico baseia-se no tratamento de células diplóides normais em cultura derivadas de uma biópsia do pé do indivíduo com predisposição para cancro a ser testado e cultivadas em meio adequado. Em seguida, as células são irradiadas com UV e subsequentemente transfectadas com um plasmídeo codificador de AAP-1, ou infectadas com um vector viral expressando AAP-1, ou as células são primeiro transfectadas/infectadas e depois irradiadas. Paralelamente, células diplóides derivadas de um indivíduo saudável serão usadas como controlo.

Os passos subsequentes do ensaio são os mesmos descritos nesta secção para o primeiro tipo de ensaio de diagnóstico. Se após o tratamento com UV, a percentagem de apoptose e/ou localização nuclear de AAP-1 nas células diplóides derivadas do potencial indivíduo com predisposição para cancro for significativamente superior ao das células do controlo positivo APP-1 tratadas com UV, pode-se concluir que o indivíduo analisado tem de facto predisposição para cancro.

AAP-1 e YY1 associam-se uma à outra nas células transformadas.

O homólogo de ratinho de AAP-1, RYBP (Garcia et al., 1999) pode interagir com YY1. YY1 pode activar ou reprimir a transcrição de proteínas celulares e virais.

As interacções proteína-proteína podem influenciar a actividade de YY1. AAP-1 deverá interagir com YY1. A interacção entre AAP-1 e YY1 poderá influenciar a actividade de YY1, resultando na repressão ou activação da transcrição. A transcrição de genes poderá ser importante para a actividade apoptótica de Apoptina e/ou AAP-1.

Para estabelecer se AAP-1 forma um complexo com YY1 *in vitro*, plasmídeos codificadores de AAP-1 e YY1 (pCMV-HAVY-1; gentil oferta do Dr Yang Shi, Harvard Medical School, Boston, USA) foram cotransfectadas em células Cos. Como controlo negativo, YY-1 foi co-expresso com LacZ. As células foram lisadas e um ensaio de imunoprecipitação foi realizado com a utilização de anticorpos específicos contra a marca Myc de AAP-1 (ou LacZ), anti-Myc 9E10 e contra YY1, anti-YY1. Os complexos resultantes foram analisados por técnicas de transferência Western. Nos lisados celulares, AAP-1 e/ou YY1 e/ou LacZ foram detectados conforme esperado.

Nas células transfectadas com AAP-1 e YY1 foi

claramente visível que quando realizávamos a imunoprecipitação com anticorpos específicos para YY1 marcado com Myc, tanto AAP-1 como YY1 foram detectáveis. A transferência mostrou uma banda de 32 KD (AAP-1) e uma banda de 67 KD (YY1). Ainda, realizámos uma imunoprecipitação usando anticorpos específicos para YY1. Novamente, tanto YY1 como AAP-1 foram detectáveis na transferência Western.

Nas células transfectadas com um plasmídeo expressando apenas AAP-1, apenas AAP-1 poderá ser detectada. As células transfectadas com um plasmídeo codificador de YY1 mostraram expressão de YY1, AAP-1 não foi detectado. Para excluir uma ligação específica de AAP-1 com YY1, as células foram transfectadas com AAP-1 e LacZ e foram realizadas imunoprecipitações com anticorpos específicos de LacZ. Se bem que a proteína LacZ, fosse claramente visível na transferência Western, não foi visível proteína AAP-1.

Assim, os resultados obtidos mostraram que AAP-1 se liga especificamente ao factor de transcrição YY1.

Produção e isolamento de MBP-AAP1 e AAP-1(His)6

Para examinar a possibilidade de produção das proteínas de fusão MBP-AAP1 e AAP1-(His)6, o ácido nucleico AAP1 codificador da grelha de leitura aberta foi clonado em cassetes para expressão em grande quantidade de proteína, pMALTB e pET22b. A indução de células *E. coli* de acordo com

as instruções do fabricante (Novagen) leva à produção de proteína de fusão solúvel.

O isolamento da proteína de fusão MBP-AAP1 via cromatografia de afinidade (resina de amilose, New England Biolabs) e cromatografia de permuta iónica (High-S, Biorad) leva à obtenção de proteína de tamanho completo 90 a 95% pura. A cromatografia de exclusão por tamanho (Pharmacia Superose 6HR 10/30) desta proteína mostra que uma parte substancial da preparação de MBP-AAP11 parece comportar-se como uma espécie distinta, um homotrímero ou homotetrâmero. Este resultado sugerirá que AAP-1 recombinante (na forma de uma proteína de fusão com MBP) seja capaz de assumir um enrolamento correcto e de ser biologicamente activa.

O isolamento da proteína AAP1-(His)6 com cromatografia de afinidade em metal (Ni^{2+} -NTA, QIAGEN) conduz a um lote de proteína $\pm 80\%$ pura.

Concluindo, a fusão de AAP1 com MBP resulta em AAP1 solúvel correctamente enrolada que é provavelmente biologicamente activa.

Produção de anticorpos policlonais dirigidos contra as proteínas AAP-1.

Para a produção de anticorpos policlonais contra proteínas AAP-1, sintetizou-se um peptídeo putativo imunogénico (o peptídeo de AAP-1 consiste nos aminoácidos

do extremo N-CTKTSETNHTSRPRLK-extremo C; EuroGentec SA, Belgium). Subsequentemente, foram injectados coelhos com peptídeos específicos de acordo com procedimentos convencionais do fabricante.

O soro derivado dos coelhos injectados com o peptídeo AAP-1 mostrou-se ser específico dos produtos AAP-1 atrás descritos por meio de ELISA e ensaios de transferências Western. Estes resultados implicam que gerámos anticorpos específicos, os quais podem ser usados para a detecção da proteína de associação a apoptina AAP-1.

Concluindo, proporcionámos evidência de que a interferência de factores específicos com a função das proteínas AAP-1 resulta na indução de apoptose. As terapias baseadas na indução de apoptose (independente de p53) são possíveis usando a interferência com a função das proteínas AAP-1. Um exemplo de tal factor interferente é a apoptina. Uma outra proteína derivada de CAV, que se sabe induzir a apoptose e aumentar a actividade de apoptina é VP2 (Noteborn *et al.*, 1997).

Descrição das Figuras

Figura 1 mostra a sequência parcial do vector PMT2SM-AAP-1-a. A sequência de DNA do cDNA de AAP-1-a é apresentada a negrito.

Figura 2 mostra a sequência parcial do vector

pMT2SM-AAP-1-b. A sequência de DNA do cDNA de AAP-1-b é apresentada a negrito.

Figura 3 mostra a sequência de aminoácidos da região analisada do clone associado a apoptina AAP-1-b (negrito). Ainda, os três aminoácidos do extremo C H-E-G do local de clonagem múltipla de pACT estão apresentados para ilustrar que a sequência de aminoácidos de AAP-1 está na mesma grelha de leitura do domínio de activação GAL4. Esta característica prova que a região AAP-1 é de facto sintetizada em células de levedura. Note-se que na figura 3 a posição de aminoácido 23 corresponde ao primeiro aminoácido de uma proteína do tipo AAP-1. Domínios funcionais ou fragmentos presentes podem, por exemplo, ser identificados como domínio de ligação do factor de transcrição desde a posição 1 (=23 na figura 3) a cerca de 54; um motivo em dedo de zinco, domínio de interacção proteína-proteína e/ou a interacção proteína-ácido nucleico desde aproximadamente a posição de aminoácido 25 (=47 na figura 3) a cerca de 42; uma região associada a apoptose indo desde a posição de aminoácido 32 até à 226; um sinal de localização nuclear estendendo-se desde a posição de aminoácido 74 até à 81; e um sinal de localização nuclear estendendo-se desde a posição de aminoácido 102 até à 108, ou em posições equivalente numa outra proteína tipo AAP-1.

Figura 4 mostra a actividade apoptótica da proteína AAP-1-b em células Saos-2-, quando expressa sozinha (quadrado a cheio) ou em combinação com apoptina

(quadrado aberto). A percentagem de apoptose induzida por apoptina está também indicada (triângulo a cheio).

REFERÊNCIAS

1. Bellamy, C.O.C., Malcomson, R.D.G., Harrison, D.J., and Wyllie, H. 1995. Cell death and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* 6, 3-12.
2. Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Fischer, D.F., Grimbergen, J.M., Klein, B., Zhuang, S.-M., Falkenburg, J.H.F., Backendorf, C., Quax, P.H.A., Van der Eb, J.A., and Noteborn, M.H.M. (1997). Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings National Academy Sciences, USA*: 94, 5843-5847.
3. Danen-Van Oorschot, A.A.A.M, Den Hollander, A., Takayama, S., Reed, J., Van der Eb, A.J. and Noteborn, M.H.M. (1997a). BAG-1 inhibits p53-induced but not apoptin-induced apoptosis. *Apoptosis* 2, 395-402.
4. Duke, R.C., Ocjius, D.M., Young, J, D-E. (1996). Cell suicide in health and disease. *Scientific American* December 1996, 48-55.

5. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.-H., and Elledge, S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphate type I catalytic subunit. *Genes and Development* 7, 555-569.
6. Earnshaw, W.C., 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 337-343.
7. Fields, S. and Song, O.K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
8. Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., Del Mar Lorente, M., Moreno, J.C., and Vidal, M. RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian polycomb complex, and with the transcription factor YY1. (1999). *EMBO Journal* 18, 3404-3418.
9. Hockenberry, D.M. (1994). Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *Journal of Cell Science*, Supplement 18, 51-55.
10. Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.

11. Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994). Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
12. Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D., and Douglas, M.G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25, 333-341.
13. Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
14. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York, USA.
15. McDonnell T.J., Meyn, R.E., Robertson, L.E. (1995). Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 6, 53-60.
16. Noteborn, M.H.M. (1996). PCT application WO 96/41191. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells as essential characteristic for the development of an anti-tumor therapy.
17. Noteborn, M.H.M., and De Boer, G.F. (1996). Patent USA/no. 030, 335.

18. Noteborn, M.H.M., De Boer, G.F., Van Roozelaar, D., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J., Jeurissen, S., Zantema, A., Hoeben, R., Koch, G., Van Ormondt, H., and Van der Eb, A.J. (1991). Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology* 65, 3131-3139.
19. Noteborn, M.H.M., and Pietersen, A. (1998). A gene delivery vehicle expressing the apoptosis-inducing proteins VP2 and/or apoptin. PCT Application no. PCT/NL98/00213.
20. Noteborn, M.H.M., Todd, D., Verschueren, C.A.J., De Gauw, H.W.F.M., Curran, W.L., Veldkamp, S., Douglas, A.J., McNulty, M.S., Van der Eb, A.J., and Koch, G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology* 68, 346-351.
21. Noteborn, M.H.M., Verschueren, C.A.J., Koch, G., and Van der Eb, A.J. (1998). Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *Journal General Virology*, 79, 3073-3077.

22. Noteborn, M.H.M., and Zhang, Y. (1998). Methods and means for determining the transforming capability of agents, for determining the predisposition of cells to become transformed and prophylactic treatment of cancer using apoptin-like activity. PCT Application no. PCT/NL98/00457.
23. Noteborn, M.H.M., Danen-van Oorschot, A.A.A.M., Van der Eb, A.J. (1998a). Chicken anemia virus: Induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus. *Seminars in Virology* 8, 497-504.
24. Paulovich, A.G., Toczyski, D., Hartwell, H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
25. Pietersen, A.M., Van der Eb, M.M., Rademaker, H.J., Van den Wollenberg, D.J.M., Rabelink, M.J.W.E., Kuppen, P.J.K., Van Dierendonck, J.H., Van Ormondt, H., Masman, D., Van de Velde, C.J.H., Van der Eb, Hoeben, R.C., and Noteborn, M.H.M. (1998). Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Therapy* 6, 882-892.
26. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

27. Sachs, L. and Lotem, J. (1993). Control of programmed cell death in normal and leukemia cells: New implications for therapy. *Blood* 82, 15-21.
28. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings National Academic Sciences USA* 74, 5463-5467.
29. Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
30. Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J. (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 13, 137-143.
31. Teodoro, J.G. and Branton, P.E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* 71, 1739-1746.
32. Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
33. White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes and development* 10, 1-15.

34. Wyllie, A.H. (1995). The genetic regulation of apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development* 5, 97-104.
35. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68, 251-306.
36. Yang, X., Hubbard, E.J.A., and Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257, 680-682.
37. Zhuang, S.-M., Landegent, J.E., Verschueren, C.A.J., Falkenburg, J.H.F., Van Ormondt, H., Van der Eb, A.J., Noteborn, M.H.M. (1995). Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces cell death in various human hematologic malignant cells in vitro. *Leukemia* 9 S1, 118-120.
38. Zhuang, S.-M., Shvarts, A., Van Ormondt, H., Jochemsen, A.-G., Van der Eb, A.J., Noteborn, M.H.M. (1995). Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces a p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Research* 55, 486-489.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Leadd B.V.

<120> Proteína associada a apoptina

<130> P50664EP10

<140> 00203042.7

<141> 2000-09-01

<150> 99202858.9

<151> 1999-09-02

<150> 99203465.2

<151> 1999-10-21

<160> 10

<170> Pantent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> /nota="Sequência iniciadora 17 meros específica de pACT"

<400> 1

taccactaca atggatg 17

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora directa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<400> 2

aacgggatcc ggcggcatgg ggcacaagaa gagcccgacc 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora reversa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<400> 3

aaaagtcgac icagaaagat tcaicattga ctgcigacat 40

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora directa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<400> 4

gggaattcca tatggcgcac aagaagagcc cgacc 35

<210> 5

<211> 47

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora reversa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(47)

<400> 5

aaggaagtac gccgccgca aagattcaic attgactgct gacatgt 47

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Marca Myc

<220>

<221> LIGAÇÃO

<222> (1)..(10)

<223> /nota="Marca Myc"

<400> 6

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Marca Myc

<220>

<221> CADEIA

<222> (1)..(16)

<223> /nota="Imunogénio"

<400> 7

Cys Thr Lys Thr Ser Glu Thr Asn His Thr Ser Arg Pro Arg Leu Lys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 947

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(947)

<223> /nota="ácido nucleico de AAP-1-a em que N pode ser A, C, G ou T"

<400> 8

```

accanaccca aaaaaagaga tctggaattc ggatcctcga gcccacgaag gccgaaacag 60
tgcTgaagcc tttaaatgca gcatctgca tctgaggaan ggcacctcca ccaganaacc 120
tggatcaat tctcagctgg tggcnaaca agtggcaca cagtatgca cccccacc 180
ccctaaaaag gagaagaag agaaagttga aaagcaggac aaagagaaac ctgagaaaga 240
caaggaaatt agtcttagtg ttaccaagaa aaataccaac aagaaaacca aaccaaagtc 300
tgacattctg aaagatctc ctagtgaagc aaacagcata cagtctgca atgtacaac 360
aaagaccagc gaaacaaatc acacctcaag gccccgctg aaaaacgtgg acaggagcac 420
tgcacagcag ttggcagtaa ctgtgggcaa cgtcaccgtc attatcacag actttaagga 480
aaagactcgc tctcatcga catctcctc cacagtacc tccagtgcag ggtcagaaca 540
gcagaaccag ascagctcgg ggteagagag cacagaaag ggctcctccc gttcctccac 600
gccaaagggc gacatgtcag cagtcaatga tgaatcttc tgaattgca catggaattg 660
tgaaaactat gaatcagggt atgaaatca aaacctccac ctgccatgc tcttgcate 720
cctggagaat cttctgtgga cctgacctc ttagtatgc tgcaggata attctgott 780
gccatgggca tctggccacc aaggaattc gcacctgac gattactctt gacacitita 840
tgtattccat tgttttatat gatttctca acaatcattt ataattggat gtctctciga 900
atctactttt tataaaaaaa gccttygtgg cctcagagaga totatga 947

```

<210> 9
<211> 1131
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1131)
<223> /nota= "ácido nucleico de AAP-1-b"

<400> 9

```
tataactatc tattegatga tgaagatacc ccaccaaac caaaaaaga gatciggaat 60
tcggatcctc gagggcacga aggcctttct cctccgagcg gcgcgggtt cggctgggg 120
ggggcggggt acagcccatc catgaccatg ggcgacaaga agagcccgac caggccaana 180
agacaagcga aacctgcgc agacgaaggg ttitgggati gtagegtctg caccttcaga 240
aacagtctg aagccttaa atgcagatc tgcgatgtga ggaaaggeac ctccaccaga 300
aaacctogga tcaatttca gctgggtgca caacaagtgg cacaacagta tgcacccca 360
ccaccccta aaaaggagaa gaaggagaaa gttgaaaagc aggacaaaga gaaacctgag 420
aaagacaagg aaattagtcc tagtgtacc aagaaaaata ccaacaagaa aaccaacca 480
aagctgaca ttctgaaaga tctcctagt gaagcaaca gcatacagc tgcacatgt 540
acaacaaaga ccagcgaac aaatcacacc tcaaggcccc ggctgaaaaa cgtggacagg 600
agcactgcac agcagttggc agtaactgtg ggcaactca cgtcattat cacagactt 660
aaggaaaaga ctgcctctc atgcacatcc tcatccacag tgacctccag tgcaggtea 720
gaacagcaga accagagcag ctggggtea gagagcacag acaagggtc ctccgttcc 780
tccacgcaa agggcgacat gtcagcagc aatgatgaat ctctcigaaa ttgcacatg 840
aatttgaaa actatgaatc agggatgaa attcaaac tccacctgcc catgctgctt 900
gcacccctgg agaattctt gttgacatg acctcttagt gatgctgcca ggataattt 960
tgettgcac gggcatctg ccaccaagga atttgcacc ctgacgatta ctcttgacac 1020
ttttatgat tccattgtt tatatgatt tctaacaat cattataat tggatgtct 1080
ctgaatcta cttttataa aaaggcttc gtggctega gagatctatg a      1131
```

<210> 10
<211> 352
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CADEIA
<222> (1)..(352)
<223> /nota="Sequência de aminoácidos (parcial) de AAP-1b em que X
significa um resíduo de aminoácido desconhecido"

<400> 10

His Glu Gly Leu Ser Pro Pro Ser Gly Ala Gly Phe Gly Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Tyr Ser Pro Ser Met Thr Met Gly Asp Lys Lys Ser Pro Thr
 20 25 30

Arg Pro Lys Arg Gln Ala Lys Pro Ala Ala Asp Glu Gly Phe Trp Asp
 35 40 45

Cys Ser Val Cys Thr Phe Arg Asn Ser Ala Glu Ala Phe Lys Cys Ser
 50 55 60

Ile Cys Asp Val Arg Lys Gly Thr Ser Thr Arg Lys Pro Arg Ile Asn
 65 70 75 80

Ser Gln Leu Val Ala Gln Gln Val Ala Gln Gln Tyr Ala Thr Pro Pro
 85 90 95

Pro Pro Lys Lys Glu Lys Lys Glu Lys Val Glu Lys Gln Asp Lys Glu
 100 105 110

Lys Pro Glu Lys Asp Lys Glu Ile Ser Pro Ser Val Thr Lys Lys Asn
 115 120 125

Thr Asn Lys Lys Thr Lys Pro Lys Ser Asp Ile Leu Lys Asp Pro Pro
 130 135 140

Ser Glu Ala Asn Ser Ile Gln Ser Ala Asn Ala Thr Thr Lys Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Thr Asn His Thr Ser Arg Pro Arg Leu Lys Asn Val Asp Arg Ser
 165 170 175

Thr Ala Gln Gln Leu Ala Val Thr Val Gly Asn Val Thr Val Ile Ile
 180 185 190

Thr Asp Phe Lys Glu Lys Thr Arg Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr
 195 200 205

Val Thr Ser Ser Ala Gly Ser Glu Gln Gln Asn Gln Ser Ser Ser Gly
 210 215 220

Ser Glu Ser Thr Asp Lys Gly Ser Ser Arg Ser Ser Thr Pro Lys Gly
 225 230 235 240

Asp Met Ser Ala Val Asn Asp Glu Ser Phe Xaa Asn Cys Thr Trp Asn
 245 250 255

Cys Glu Asn Tyr Glu Ser Gly Tyr Glu Ile Gln Asn Leu His Leu Pro
 260 265 270

Met Leu Leu Ala Ser Leu Glu Asn Leu Leu Trp Thr Ser Thr Ser Xaa
 275 280 285

Xaa Cys Cys Gln Asp Asn Phe Cys Leu Pro Trp Ala Ser Gly His Gln
 290 295 300

Gly Ile Ser His Pro Asp Asp Tyr Ser Xaa His Phe Tyr Val Phe His
 305 310 315 320

Cys Phe Ile Xaa Phe Ser Xaa Gln Ser Phe Ile Ile Gly Cys Ala Pro
 325 330 335

Glu Ser Thr Phe Tyr Lys Lys Ala Phe Val Ala Ser Arg Asp Leu Xaa
 340 345 350

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Leadd B.V.

<120> Proteína associada a apoptina

<130> P50664EP10

<140> 00203042.7

<141> 2000-09-01

<150> 99202858.9

<151> 1999-09-02

<150> 99203465.2

<151> 1999-10-21

<160> 10

<170> Pantent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> /nota="Sequência iniciadora 17 meros específica de pACT"

<400> 1

taccactaca atggatg 17

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora directa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<400> 2

aacgggatcc ggcggcatgg gcgacaagaa gagcccgacc 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora reversa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<400> 3

aaaagtcgac tcagaaagat tcatcattga ctgctgacat 40

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora directa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<400> 4

gggaattcca tatgggcgac aagaagagcc cgacc 35

<210> 5
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora reversa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(47)

<400> 5

aaggaagtac gggccgcga aagattcaic attgactgct gacatgt 47

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Marca Myc

<220>
 <221> LIGAÇÃO
 <222> (1)..(10)
 <223> /nota="Marca Myc"

<400> 6

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Marca Myc

<220>
 <221> CADEIA
 <222> (1)..(16)
 <223> /nota="Imunogénio"

<400> 7

Cys Thr Lys Thr Ser Glu Thr Asn His Thr Ser Arg Pro Arg Leu Lys
 1 5 10 15

<210> 8

<211> 947

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(947)

<223> /nota="ácido nucleico de AAP-1-a em que N pode ser A, C, G ou T"

<400> 8

```
accanacca aaaaaagaga tctggaattc ggatcctcga ggccacgaag gccgaaacag 60
tctgaagcc tttaaatgca gcatctgca tgtaggaaa ggcaccteca ccagaaaacc 120
tcggatcaat tctcagctgg tggcncaaca agtggcaca cagtatgcca ccccaceacc 180
ccctaaaaag gagaagaagg agaaagtga aaagcaggac aaagagaaac ctgagaaaga 240
caaggaaatt agtctagtgt ttaccaagaa aaataccaac aagaaaacca aaccaagtc 300
tgacattctg aaagatctct ctagtgaagc aacagcata cagtctgcaa atgtacaac 360
aaagaccage gaaacaaate acacctcaag gccccggctg aaaaacgtgg acaggagcac 420
tgcacagcag ttggcagtaa ctgtgggcaa cgtcacctgc attatcacag actttaagga 480
aaagactcgc tctcctcga catctcctc cacagtacc tccagtgcag ggtcagaaca 540
gcagaaccag ascagctcgg ggtcagagag cacagacaag ggctctctcc gttctctcac 600
gccaaagggc gacatgtcag cagtcaatga tgaatcttc tgaattgca catggaattg 660
tgaaaactat gaatcagggc atgaaattca aaacctccac ctgcccctgc tgcttgctc 720
cctggagaat ctctgtgga catgacctc ttagtatgc tgccaggata atttctgctt 780
gccatgggca tctggccacc aaggaatttc gcacctgac gattactctt gacacttta 840
tgtattccat tgttttatat gattttctca acaatcattt ataattggat gtgctctga 900
atctactttt tataaaaaaa gccctygtgg cctcagagaga tctatga          947
```

<210> 9

<211> 1131

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1131)

<223> /nota="ácido nucleico de AAP-1-b"

<400> 9

tataactatc tattgatga tgaagatacc ccaccaaac ccacaaaaga gatctggaat 60
tcggatcctc gaggccacga aggcctttct cctccgagcg ggcgccggtt cggettgggg 120
gggggggggt acagcccatc catgacctg ggcgacaaga agagcccgac caggccaaa 180
agacaagcga aacctgccgc agacgaaggg tttgggatt gtagcgtctg caccttcaga 240
aacagtctg aagcctttaa atgcagcatc tccgatgtga ggaaaggcac ctccaccaga 300
aaacctcga tcaattctca gctgggtggc caacaagtgg cacaacagta tgcaccca 360
ccaccocca aaaaggagaa gaaggagaaa gttgaaaagc aggacaaaga gaaacctgag 420
aaagacaagg aaattagtc tagtgttacc aagaaaaata ccaacaagaa aaccaacca 480
aagtctgaca tctgaaaga tctcctagt gaagcaaca gcatacagtc tcaaatgct 540
acaacaaaga ccagcgaac aaatcacacc tcaaggcccc ggctgaaaaa cgtggacagg 600
agcactcac agcagttgc agtaactgt ggcaactca cctcattat cacagactt 660
aaggaaaaga ctctctctc atcgacatc tcatccacag tgacctccag tgcagggtca 720
gaacagcaga accagagcag ctgggggtca gagagcacag acaaggctc ctccgttc 780
tccagccaa agggcgacat gtcagcagtc aatgatgaat cttctgaaa tgcacatgg 840
aatttgaaa actatgaatc agggatgaa attcaaac ccacctgcc catgctgctt 900
gcctcctgg agaattctt gggacatcg acctcttagt gatgctgcca ggataattc 960
tgcttccat ggcatctgg ccaccaagga attcgcacc ctgacgatta ctctgacac 1020
ttttatgat tccattgtt tatatgatt tctaacaat cattataat tggatgtct 1080
cctgaateta cttttataa aaagccttc gggcctoga gagatctatg a 1131

<210> 10

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CADEIA

<222> (1)..(352)

<223> /nota="Sequência de aminoácidos (parcial) de AAP-1b em que X significa um resíduo de aminoácido desconhecido"

<400> 10

His Glu Gly Leu Ser Pro Pro Ser Gly Ala Gly Phe Gly Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Tyr Ser Pro Ser Met Thr Met Gly Asp Lys Lys Ser Pro Thr
 20 25 30

Arg Pro Lys Arg Gln Ala Lys Pro Ala Ala Asp Glu Gly Phe Trp Asp
 35 40 45

Cys Ser Val Cys Thr Phe Arg Asn Ser Ala Glu Ala Phe Lys Cys Ser
 50 55 60

Ile Cys Asp Val Arg Lys Gly Thr Ser Thr Arg Lys Pro Arg Ile Asn
 65 70 75 80

Ser Gln Leu Val Ala Gln Gln Val Ala Gln Gln Tyr Ala Thr Pro Pro
 85 90 95

Pro Pro Lys Lys Glu Lys Lys Glu Lys Val Glu Lys Gln Asp Lys Glu
 100 105 110

Lys Pro Glu Lys Asp Lys Glu Ile Ser Pro Ser Val Thr Lys Lys Asn
 115 120 125

Thr Asn Lys Lys Thr Lys Pro Lys Ser Asp Ile Leu Lys Asp Pro Pro
 130 135 140

Ser Glu Ala Asn Ser Ile Gln Ser Ala Asn Ala Thr Thr Lys Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Thr Asn His Thr Ser Arg Pro Arg Leu Lys Asn Val Asp Arg Ser
 165 170 175

Thr Ala Gln Gln Leu Ala Val Thr Val Gly Asn Val Thr Val Ile Ile
 180 185 190

Thr Asp Phe Lys Glu Lys Thr Arg Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr
 195 200 205

Val Thr Ser Ser Ala Gly Ser Glu Gln Gln Asn Gln Ser Ser Ser Gly
 210 215 220

Ser Glu Ser Thr Asp Lys Gly Ser Ser Arg Ser Ser Thr Pro Lys Gly
 225 230 235 240

Asp Met Ser Ala Val Asn Asp Glu Ser Phe Xaa Asn Cys Thr Trp Asn
 245 250 255

Cys Glu Asn Tyr Glu Ser Gly Tyr Glu Ile Gln Asn Leu His Leu Pro
 260 265 270

Met Leu Leu Ala Ser Leu Glu Asn Leu Leu Trp Thr Ser Thr Ser Xaa
275 280 285

Xaa Cys Cys Gln Asp Asn Phe Cys Leu Pro Trp Ala Ser Gly His Gln
290 295 300

Gly Ile Ser His Pro Asp Asp Tyr Ser Xaa His Phe Tyr Val Phe His
305 310 315 320

Cys Phe Ile Xaa Phe Ser Xaa Gln Ser Phe Ile Ile Gly Cys Ala Pro
325 330 335

Glu Ser Thr Phe Tyr Lys Lys Ala Phe Val Ala Ser Arg Asp Leu Xaa
340 345 350

Lisboa, 6 de Março de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Um ácido nucleico codificador de apoptina e AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose.

2. Um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que o referido ácido nucleico codificador de AAP-1 compreende na Figura 2 (SEQ ID NO:9) os ácidos nucleicos 142 a 829, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose.

3. Uma composição proteica compreendendo apoptina recombinante e AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose.

4. Um vector compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2.

5. Um veículo de introdução de genes compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou um vector de acordo com a reivindicação 4.

6. Uma célula hospedeira transfectada com um ácido nucleico codificador de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID

NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose e em que a célula hospedeira é ainda transfectada com um ácido nucleico codificador de apoptina.

7. Um método para a produção de uma composição proteica de acordo com a reivindicação 3 compreendendo a introdução numa célula hospedeira de um ácido nucleico codificador de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose e ainda introdução na referida célula hospedeira de um ácido nucleico codificador de apoptina, crescimento da referida célula hospedeira e recuperação da referida composição proteica.

8. Um método para a indução de apoptose *in vitro* em células, nas quais é observado o aumento da proliferação celular ou decréscimo da morte celular, compreendendo a introdução nas referidas células de uma sequência de ácido nucleico codificadora de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose.

9. Um método para a indução de apoptose *in vitro* em células, nas quais é observado o aumento da proliferação celular ou decréscimo da morte celular , compreendendo a introdução nas referidas células de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250

da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose.

10. Um método de acordo com a reivindicação 8 ou 9 compreendendo ainda o fornecimento da proteína apoptina ou de um ácido nucleico codificador de apoptina.

11. Um método de acordo com a reivindicação 10, em que as referidas células são dotadas com um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou uma composição proteica de acordo com a reivindicação 3.

12. Um método de acordo com a reivindicação 8 ou 10, em que o referido ácido nucleico codificador de AAP-1 compreende na Figura 2 (SEQ ID NO:9) os ácidos nucleicos 142 a 829, ou um seu fragmento funcional que codifica a referida AAP-1 e que é capaz de induzir apoptose.

13. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, em que as referidas células são células cancerosas ou células envolvidas numa doença auto-imune.

14. Utilização de um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou uma composição proteica de acordo com a reivindicação 3 como fármaco.

15. Utilização de uma sequência de ácido nucleico codificadora de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10,

ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose na preparação de um medicamento para o tratamento de cancro ou doença auto-imune, em que o referido tratamento ainda compreende a administração da proteína apoptina ou um ácido nucleico codificador de apoptina.

16. Utilização de AAP-1, em que a referida AAP-1 compreende os aminoácidos 23 a 250 da Figura 3 ou SEQ ID NO:10, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose na preparação de um medicamento para o tratamento de cancro ou doença auto-imune, em que o referido tratamento ainda compreende a administração da proteína apoptina ou um ácido nucleico codificador de apoptina.

17. Utilização de acordo com a reivindicação 15 ou 16 compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou uma composição proteica de acordo com a reivindicação 3 ou um vector de acordo com a reivindicação 4.

18. Utilização de acordo com a reivindicação 15 ou 16, em que o referido ácido nucleico codificador de AAP-1 compreende na Figura 2 (SEQ ID NO:9) os ácidos nucleicos 142 a 829, ou um seu fragmento funcional que é capaz de induzir apoptose.

XhoI

1 ACCANACCCRAAAAAGAGRTCTGGATTCGGATTCCTCAGGCCACGAGGCCGGAACAG
61 TCCYGAAGCCCTTAAATGCRDCACTCCGCAATGTEAGGAAGGCCACTTCCACCGAAACG
121 TCGGATCAATTCACACTGCTGCTCCCAACCAAGTCCACACACACTATGCCACCCCGCCACC
181 CCTTAAAGGCGACGAGGAGCAAGTTTCAAAAGCTGGGCAACGACMACTTGTGAAAG
241 CAGGAAATGATGCTGATGTTTACCAAGAAAATACCAACAGAAAACCAACCGAACTC
301 TGACATTCGTAAAGATGCTCCTGATGAGCAACAGGCAATCACTTCTGCAATGCTACAC
361 AAAGACCCAGCGAACAATCACAACCTCAGGCCCGCCGCTGAAAACGTTGGACGATGAC
421 TGCACAGCACTTGGCAGTAACTGTGGCCACGTCACCTCATATATCACGACTTGAAGTA
481 AAAGATCCCTCTCTCATGGACATCCTCATCCACACTGACTTCCACTGCCAGGCTGAGAAC
541 GCAGACCGAGAGCAGCTCGGGGTACAGAGGACAGACAGGGCTTCTTCCCGTTCTCCAC
601 GCCAAGGGCCACATGTCAGGACTCAATGATGAAATCTTTTCTGAAATGGCACATGGAATG
661 TGAAACTATGAAATCAGGCTATGAAATTCAAAACCTCCACTTCCCGATGCTGCTGCAATC
721 CCTGGACATCTTCTGTGGACATGCACTCTEATGATGCTGCTCAGGAAATTTCTGCTT
781 GCCATGGCCATCTGSCCACCAGGAATTTCCGACCCCGACCAATCACTCTGACACTTTTA
841 TGAATTCGATGTTTTAAATGATTTTCCCAACAATCAATTAATAAATGGATGTGCTCTGA

XhoI
901 ATCTACTTTTTATAAAAAAAGCCTTGTGGCCCTCGAGAGATCTATGA

Figura 1


```
I      HEGLSPERSGA  GFGLGGAGYS  PSMGMDGDKS  PTHHRQAKP
41     AADSGFNDCS  VCTPNSIARA  HRCSTICDVRK  GTSTHRGRLN
81     SOLVAQQVAA  QIDAFPPHKK  KGGKQVLSDD  KKKPKKDKET
121    SPSVTKKNTN  KTKRPSDILL  KDPKSKANST  QSANAZKTS
161    EKHITSPRL  KQVDRSTQQ  LAVTVGNVTV  LIIDFKKIR
201    SSSTSSTVT  SSAGSKQINQ  SSSGSESTDK  GSSRSSTNG
241    EMSAVNDESF  *NCTWNCENY  ESGYEIQNLH  LPHLLASLN
281    LLWTSTS**C  CQDNFCLPWA  SGRQGISHPD  DYS*HFTVFB
321    CFI*FS*QSF  IIGCAPESTF  YKKAFFVASRD  L*
```

Figura 3

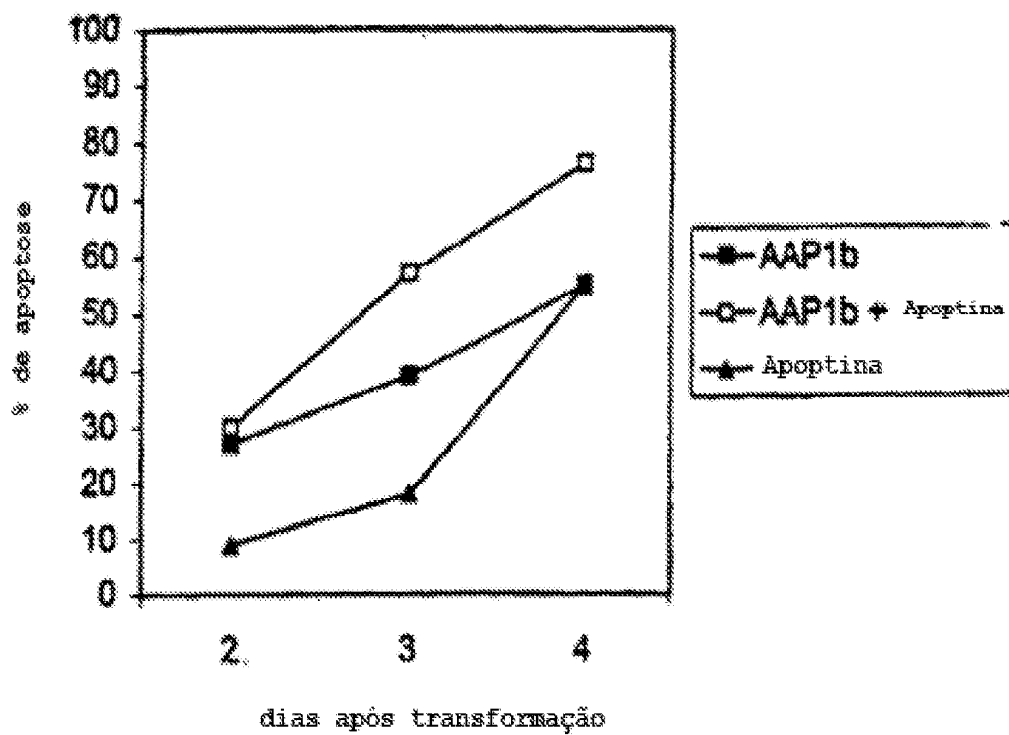


Figura 4