



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102001900900352
Data Deposito	10/01/2001
Data Pubblicazione	10/07/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

SEQUENZA NUCLEOTIDICA E CORRISPONDENTE PROTEINA IN GRADO DI REGOLARE
L'APOPTOSI.



Descrizione della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal titolo: "Sequenza nucleotidica e corrispondente proteina in grado di regolare l'apoptosi".

a nome di Università degli Studi di Napoli FEDERICO II

con sede in Napoli

e

a nome di Università degli Studi di Catanzaro MAGNA GRAECIA

con sede in Catanzaro

Inventori designati: Rita BISOGNI, Annalisa LAMBERTI, Antonello PETRELLA, Maria Fiammetta ROMANO, Maria Caterina TURCO, Salvatore VENUTA.

Depositata il

con il n.

Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa ad una sequenza nucleotidica e corrispondente proteina in grado di regolare l'apoptosi.

Più in particolare l'invenzione si riferisce all'utilizzo di detta sequenza o di detta proteina o parti di esse come regolatrici dell'apoptosi.

Arte nota

E' noto che le nostre cellule producono, a partire dal loro DNA, RNA messengeri (mRNA) e corrispondenti proteine, dei quali molti sono conosciuti e molti non ancora noti, attraverso cui vengono regolate le attività biologiche. Studiando tali mRNA e costruendo corrispondenti cDNA (DNA complementari), è possibile trovare nuove molecole e nuove



utilizzazioni per regolare le attività biologiche delle cellule ed incidere sulle loro alterazioni patologiche.

La morte cellulare programmata, o apoptosi (ref. 1 della bibliografia), è un processo fondamentale per la regolazione di molti fenomeni biologici.

Infatti, sia nei processi differenziativi che nei tessuti maturi, l'equilibrio dei compartimenti cellulari è determinato dal rapporto fra la proliferazione cellulare e la morte programmata. Alterazioni, sia nel senso di una deregolata stimolazione che in quello di un deficitario funzionamento dell'apoptosi sono alla base di molte malattie. Malattie degenerative dei tessuti (nel tessuto cerebrale, come in varie forme di demenza, ed in vari altri tessuti) oppure conseguenti a danni acuti nei tessuti (come negli infarti del miocardio, del distretto cerebrale e di altre sedi) o ad eccessivi e/o deregolati processi infiammatori coinvolgono l'apoptosi. Trovare elementi e presidi che regolino l'apoptosi è importante in quanto può significare, in questi casi, poter bloccare il processo di morte cellulare alla base della malattia. In altre patologie, invece, come quelle autoimmunitarie, la deregolazione dell'apoptosi conduce all'aberrante espansione di cellule, che aggrediscono il nostro organismo. Elementi che regolino l'apoptosi possono, in questo caso, riequilibrare il processo di morte in queste cellule e curare la malattia. In altre malattie, incluse e prime fra tutte le neoplasie, vi è nelle cellule una ridotta sensibilità all'apoptosi, e ciò ha due valenze: una nella patogenesi, poiché la ridotta sensibilità all'apoptosi è alla base dell'espansione del clone neoplastico; ed una nella terapia, perché tale ridotta sensibilità determina la



resistenza delle cellule neoplastiche alle terapie (chemio- e radioterapie, terapie con modificatori biologici, eccetera) che dovrebbero determinarne la morte. Trovare elementi che regolino l'apoptosi significa perciò sia poter combattere l'insorgenza della neoplasia che poter determinare terapeuticamente la morte delle cellule neoplastiche. Questo è infatti un approccio fondamentale, oggi, nella ricerca in campo oncologico. Infine, in altre situazioni, come nell'invecchiamento, o in alterazioni iperplastiche o displastiche come le mielodisplasie ed altre, l'apoptosi gioca un ruolo di primo piano e poter incidere su di essa significa poter intervenire nel processo.

Sono noti vari elementi che regolano l'apoptosi: le caspasi, enzimi intracellulari che possono provocare la morte della cellula, ed alcuni loro inibitori o attivatori; proteine del mitocondrio, una sede cellulare in cui si svolgono fondamentali processi di regolazione dell'apoptosi; ed altre molecole. Tuttavia, le evidenze in letteratura indicano che vi sono ancora altri elementi, fino ad ora non caratterizzati, che regolano l'apoptosi (1). Ad esempio l'apoptosi può essere regolata dall'attività dei fattori trascrizionali NF-kB/Rel (Ref. 6). E' tuttavia ancora poco noto quali siano tutti i geni su cui tali fattori trascrizionali agiscono per regolare l'apoptosi. Ci siamo dunque proposti di identificare, attraverso la manipolazione dei fattori NF-kB/Rel, nuove sequenze che potessero modulare l'apoptosi.

Sommario dell'invenzione

E' stata ora trovata, e costituisce oggetto della presente invenzione, una sequenza nucleotidica e corrispondente proteina in grado di regolare



l'apoptosi. E' stato trovato che anche parti di esse sono in grado di fungere da regolatori.

Altro oggetto dell'invenzione è l'impiego di dette sequenze a DNA e amminioacidiche a scopo terapeutico per trattare tutte quelle affezioni che dipendono o sono coinvolte nel meccanismo dell'apoptosi, in particolare: malattie degenerative dei tessuti (nel tessuto cerebrale, come in varie forme di demenza, ed in vari altri tessuti), oppure conseguenti a danni acuti nei tessuti (come negli infarti del miocardio, del distretto cerebrale e di altre sedi), o ad eccessivi e/o deregolati processi infiammatori; patologie autoimmunitarie, che comportano l'aberrante espansione di cellule che aggrediscono l'organismo; neoplasie, poiché la ridotta sensibilità all'apoptosi è alla base dell'espansione del clone neoplastico e perché tale ridotta sensibilità determina la resistenza delle cellule neoplastiche alle terapie (chemio- e radioterapie, terapie con modificatori biologici, eccetera) che dovrebbero determinarne la morte; invecchiamento, o alterazioni iperplastiche o displastiche, come le mielodisplasie ed altre.

Ulteriori oggetti dell'invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata dell'invenzione.

Breve descrizione delle Figure

Fig. 1 - Sequenza nucleotidica ottenuta come descritto nel testo. E' evidenziata in neretto la regione codificante.

Fig. 2 - Espressione della sequenza di fig. 1 in cellule umane. La fig. 2A si riferisce all'espressione, evidenziata per Northern blot, della nostra

sequenza in cellule Jurkat non stimulate (T0) o stimulate con l'anticorpo anti-Fas CH-11 per vari tempi. L'espressione del gene GAPDH viene mostrata per controllo. La figura 2B si riferisce all'espressione, evidenziata per Northern blot, della nostra sequenza in cellule SH-SY5Y non stimulate (-) o stimulate con dietilmaleato (DEM) (+). L'espressione del gene GAPDH viene mostrata per controllo.

Fig. 3 – Proteina codificata dalla sequenza di fig. 1. La figura 3A mostra la nostra proteina immunoprecipitata con anticorpi (preparazione anticorpale specifica) da cellule Jurkat non stimulate o stimulate con l'anticorpo anti-Fas CH-11. La figura 3B riporta la sequenza amminoacidica della proteina.

Fig. 4 – Inibizione dell'apoptosi con oligo antisense in cellule SH-SY5Y. La figura 4A è il grafico di controllo; la figura 4B è il grafico di DEM (dietilmaleato); la figura 4C è il grafico di DEM+oligo antisense; la figura 4D è il grafico di DEM+ oligo di controllo.

Fig. 5 - Effetto dell'oligo antisense in cinetica sull'apoptosi di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y.

Fig. 6 - Effetto dell'oligo antisense sull'apoptosi di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, indotta da dietilmaleato (DEM) alla concentrazione di 2mM.

Fig. 7 - Effetto dell'oligo antisense sull'apoptosi di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, indotta da dietilmaleato (DEM) alla concentrazione di 6mM.



Fig. 8 – Espressione intracitoplasmatica della proteina in cellule di leucemia linfatica cronica primaria. La figura 8A si riferisce a cellule non stimulate, mentre la figura 8B si riferisce a cellule stimulate con DEM.

Fig. 9 - Espressione intracitoplasmatica della proteina in cellule di leucemia linfatica cronica primaria. La figura 9A si riferisce a cellule non stimulate, mentre la figura 9B si riferisce a cellule stimulate con DEM e la figura 9C si riferisce a cellule stimulate con il farmaco 2-metossiestradiolo (2ME).

Fig. 10 - Espressione intracitoplasmatica della proteina in cellule di leucemia linfatica cronica primaria. La figura 10A si riferisce a cellule non stimulate, mentre la figura 10B si riferisce a cellule stimulate con DEM e la figura 10C si riferisce a cellule stimulate con il farmaco 2ME.

Fig. 11 - Effetto di due oligo antisenso sull'apoptosi di cellule di leucemia acuta mieloide primaria, indotta da topotecan, un inibitore dell'enzima topoisomerasi, alla concentrazione di 50 ng/ml.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Secondo la presente invenzione è stato trovato che la sequenza nucleotidica, riportata nella fig.1 e indicata come SEQ ID NO: 1, intera o nelle sue parti; in particolare, la porzione codificante in neretto indicata come SEQ ID NO: 2, come cDNA o corrispondente mRNA, e la proteina, riportata in fig. 3B e indicata come SEQ ID NO: 3, e le sequenze amminocidiche parziali corrispondenti a dette sequenze nucleotidiche, possono essere utilizzate per modulare l'apoptosi o altri tipi di morte cellulare e/o la proliferazione e/o l'equilibrio di un compartimento



cellulare, intendendosi per compartimento cellulare il numero di cellule di un tessuto.

In particolare un oligo antisense da noi disegnato e funzionalmente attivo è quello indicato come SEQ ID NO: 4 e corrispondente alle seguenti 27 basi: CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC. Tale oligo è sufficiente a bloccare l'apoptosi. Tuttavia è del tutto possibile che altri oligo, di altre lunghezze e/o corrispondenti ad altre porzioni, abbiano lo stesso effetto. Ad esempio è stato anche provato l'oligo antisense corrispondente alle seguenti 25 basi: CTT TCT ATC TTC ATT TTA TTT TTC C e indicato come SEQ ID NO: 5.

Il metodo per identificare il cDNA è il differential display, ed è illustrato nella ref. 3. Il metodo per determinare la sequenza del cDNA identificato è illustrato nella ref. 4. Anche i metodi per costruire i vettori e le cellule ed i metodi per ottenere la proteina secondo l'invenzione sono illustrati nella ref. 4.

Rientrano nell'ambito della presente invenzione:

- gli oligonucleotidi antisense in grado di ibridarsi con la sequenza di mRNA corrispondente al cDNA che codifica per la proteina avente la sequenza indicata in fig. 3B;
- plasmidi e vettori comprendenti in tutto o in parte la sequenza di fig. 1, particolarmente preferiti sono i vettori che consentono l'espressione della sequenza in eucarioti;
- cellule modificate con tali vettori in grado di esprimere in tutto o in parte la sequenza amminoacidica illustrata in fig. 3B, particolarmente



preferite sono le cellule in grado di dare una funzionale espressione della proteina o di sue parti;

- organismi pluricellulari superiori, escluso l'uomo, che contengono dette cellule modificate;

- anticorpi contro la proteina descritta in fig. 3. Peptidi utilizzati per la produzione di anticorpi verso la proteina sono ad es. i seguenti: SEQ ID NO: 6 NSQNNFRNQYINNLEIKS, SEQ ID NO: 7 KFYEKYRLDKIAETIYA, SEQ ID NO: 8 NLKEEFEGKNLYPDAKD.

L'utilizzazione della sequenza e/o proteina (tutte o parti di esse) può riguardare:

reagenti e/o procedure per modulare l'apoptosi, nella terapia di stati patologici che coinvolgano il processo apoptotico, quali ad esempio:

- neoplasie;
- malattie degenerative in generale, tutte quelle affezioni, cioè, che comportano perdita parziale o totale dei caratteri morfologici e funzionali tipici di una cellula, di un tessuto o di un organo in modo tale da risultarne impedito lo svolgimento delle funzioni vitali; ad es.: malattie degenerative del sistema nervoso come il morbo di Parkinson e le forme di demenza; malattie degenerative del muscolo scheletrico come le distrofie muscolari, del muscolo cardiaco come la miocardiopatia dilatativa, di altri organi e tessuti;
- stati patologici conseguenti a danni ischemici acuti e cronici nei tessuti;



- patologie legate ad eccessiva o deregolata infiammazione, malattie autoimmunitarie, sclerosi multipla, psoriasi, rigetto di trapianto e reazione di trapianto contro l'ospite;
- iperplasie (es. neoproliferazione intinale dopo angioplastica), displasie e malattie similari;
- AIDS, tubercolosi o altre malattie infettive in cui sia implicata l'apoptosi;

- altre patologie in cui sia implicata l'apoptosi;

reagenti e/o procedure per modulare l'apoptosi nell'invecchiamento;

reagenti e/o procedure per preservare o ricostituire: compartimenti cellulari e/o tessuti, come nel caso di colture di cellule progenitrici e/o staminali di impiego in ematologia, oncologia, medicina dei trapianti ed altri campi della medicina; cellule e tessuti di impiego in chirurgia plastica e/o ricostruttiva, in tecniche di trapianti, eccetera;

reagenti e/o procedure per favorire l'attecchimento dei trapianti;

reagenti e/o procedure per modulare la sopravvivenza e/o le dimensioni di sistemi cellulari di impiego nel lavoro di laboratorio, nella ricerca scientifica e/o nella diagnostica.

I reagenti e le procedure per modulare l'apoptosi possono anche essere sotto forma di kit diagnostici (a scopo di diagnosi e preventivo) comprendenti le relative istruzioni per l'uso.

I metodi per il trattamento delle affezioni sopra indicate si basano sulla somministrazione di dosi farmacologicamente efficaci di DNA o proteina corrispondente, o parti di essi, oppure anticorpi specifici, oligonucleotidi,

enzimi od altri reattivi specificamente disegnati sulla base della sequenza nucleotidica e/o amminoacidica, unitamente a carriers, vettori e/o additivi noti nell'arte secondo le terapie utilizzate (ad es. tradizionale, genica, antisenso). Le concentrazioni e i dosaggi varieranno in funzione del tipo di affezione, della composizione farmaceutica e del protocollo di somministrazione.

I risultati da noi ottenuti sono indipendenti dalle tecniche qui descritte per l'ottenimento del DNA e della proteina corrispondente. Inoltre, i risultati funzionali da noi ottenuti possono essere riprodotti anche con sequenze nucleotidiche e/o proteiche aventi un grado di omologia del 40% o superiore, preferibilmente del 60% o superiore, più preferibilmente dell'80% o superiore, ancor più preferibilmente del 90% o superiore rispetto alle sequenze qui indicate.

Gli effetti funzionali sull'apoptosi, che noi abbiamo dimostrato, potrebbero essere ottenuti con altre cellule e/o con altri stimoli; inoltre, potrebbe essere ottenuta una modulazione della proliferazione, che è un programma a cui l'apoptosi è collegata. Abbiamo cioè fornito solo alcuni esempi dell'attività della sequenza e/o proteina (cioè modulatrice dell'apoptosi) ma potrebbero essercene degli altri, riconducibili a quelli da noi illustrati che rientrano nell'ambito dell'invenzione.

La presente invenzione verrà ora descritta in relazione ad esempi illustrativi ma non limitativi della portata della medesima, facendo riferimento alle figure allegate.

Esempi



Identificazione della nuova sequenza - Per trovare nuovi elementi regolatori dell'apoptosi, ci siamo basati su un sistema di trasfettanti delle linee cellulari Jurkat. Tali cellule sono state trasfettate stabilmente con un vettore plasmidico (pRC/CMV-lkBalfa), esprimente un inibitore (lkBalfa) dei fattori trascrizionali NF- κ B; infatti, è noto che tale inibitore, bloccando l'attività NF- κ B, aumenta nelle cellule la risposta apoptotica, attraverso meccanismi soltanto parzialmente noti. Cellule di controllo sono state trasfettate con il vettore vuoto (pRC/CMV). I trasfettanti stabili sono stati ottenuti per selezione con geneticina (G418) a 500 microg/ml. In questo modo, abbiamo ottenuto due varianti di una stessa cellula, delle quali una (lkBalfa+) presentava un blocco nell'attivazione di NF- κ B. Tale blocco è stato evidenziato sia per saggio di mobilità elettroforetica (EMSA) che per analisi dell'espressione di un gene reporter (CAT). Per il saggio di mobilità elettroforetica, le cellule sono state lavate in PBS e il pellet risospeso in buffer per estratti (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 10 mM KCl; 10% glicerolo). Ogni volume di pellet, pari a circa 10 μ l, è stato risospeso in 100-200 μ l di buffer. Per ottenere i nuclei, la sospensione è stata frammentata con una siringa da insulina e sottoposta a centrifugazione; il pellet è stato risospeso in una soluzione ipertonica, in modo da ottenere, per rilascio dai nuclei, le proteine intranucleari. Negli estratti nucleari così ottenuti, sono state dosate le proteine. Su tali proteine sono stati poi eseguiti i saggi elettroforetici, utilizzando sia un oligonucleotide



che lega i fattori NF- κ B, che un oligonucleotide di controllo, che non lega tale fattore.

Ogni oligonucleotide (oligonucleotide NF- κ B: 5'-CAACGGCAGGGGAAATCTCCCTCTCCTT-3'; oligonucleotide di controllo) è stato utilizzato come DNA a doppio filamento e marcato terminalmente con [γ - 32 P]ATP (Amersham Corp.) usando l'enzima polinucleotide chinasi (New England Biolabs, Beverly, MA). 5 microgrammi di estratti proteici nucleari sono stati incubati in binding buffer (10 mM Hepes pH 7,8, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10% glicerolo, 0,7 mM PMSF, 2 microgrammi di poly[d(I-C)], in presenza o in assenza di un eccesso molare di oligonucleotidi non marcati, per 15 minuti a 4°C. Successivamente alla miscela di reazione è stato aggiunto l'oligonucleotide radioattivo e, dopo un'incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente, la miscela è stata sottoposta a migrazione elettroforetica su un gel al 6% di acrilamide/bis-acrilamide (30:1), in un tampone di corsa costituito da 0,25X Tris borato, in condizioni non denaturanti. A fine corsa il gel è stato seccato sotto vuoto ad 80°C ed esposto per autoradiografia. Questi esperimenti hanno evidenziato la modulazione negativa dei livelli nucleari di fattore NF- κ B, in cellule IkB α fa+ stimulate con TNF o acido okadaico, rispetto alle cellule Jurkat wild type o di controllo. Per l'analisi funzionale di NF- κ B, cellule in fase di crescita esponenziale sono state lavate in una soluzione isotonica (PBS) e risospese alla concentrazione di 10⁶/ml in RPMI- 20% FCS, in presenza di 50 microgrammi/ml di un plasmide recante un gene



reporter (CAT) sotto il controllo di un enhancer contenente sequenze consensus NF- κ B; dopo dieci minuti d'incubazione in ghiaccio, le cellule sono state sottoposte ad un doppio impulso elettrico (0,2 KV, 960 microF), usando un apparato Bio-rad, e poi raccolte, diluite e coltivate in RPMI- 10% FCS. Il successivo saggio enzimatico CAT sugli estratti cellulari ha consentito di valutare l'attività NF- κ B delle cellule, e dunque di verificare che cellule I κ Balfa+ stimulate con TNF o acido okadaico mostravano, rispetto alle cellule Jurkat wild type o di controllo, una modulazione negativa dell'attività NF- κ B. Grazie al blocco di NF- κ B, le cellule I κ Balfa+ mostravano, rispetto alle cellule wild type o di controllo, una maggiore sensibilità all'apoptosi. Ciò è stato verificato attraverso analisi dell'apoptosi. L'apoptosi delle cellule è stata determinata in citofluorimetria, secondo il metodo riportato nella ref. 2 della bibliografia, utilizzando lo ioduro di propidio (PI) come marcatore del DNA. 5×10^5 cellule sono state lavate in soluzione salina tamponata (PBS) e risospese in una soluzione contenente 0,1% di sodio citrato, 0,1% di Triton X-100, 50 microgrammi di ioduro di propidio e 0,2 mg/ml di RNasi A. Dopo 30' di incubazione a 4°C al buio il contenuto di DNA è stato analizzato utilizzando il programma Lysis 1 del citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson). I detriti cellulari sono stati eliminati dall'analisi tramite una soglia sul forward side scatter (FSC) ed il contenuto di DNA è stato registrato su scala logaritmica; successivamente è stata calcolata la percentuale di cellule a contenuto di DNA ipodiploide. L'analisi dell'apoptosi nelle cellule Jurkat wild type e nei vari trasfettanti ha



consentito di determinare che, in seguito alla stimolazione con TNF o con acido okadaico, le cellule lkBalfa+ presentavano livelli di apoptosi più alti rispetto alle cellule wild type o alle cellule di controllo.

Abbiamo stimolato i due tipi cellulari con un induttore di apoptosi: acido okadaico, estratto gli mRNA dai due tipi cellulari, costruito i corrispondenti cDNA e li abbiamo comparati attraverso la metodica del differential display (ref, 3 della bibliografia). In particolare, cellule lkBalfa+ e cellule di controllo (pRC/CMV) sono state trattate con acido okadaico (Sigma) a 70 ng/ml per 8 ore. Dopo tale periodo da tali cellule è stato estratto l'RNA totale (metodo della guanidina isotiocianato).

Prima di procedere alla sintesi del cDNA, l'RNA è stato trattato con DNasi I per una completa rimozione di DNA contaminante (Message Clean, GenHunter Corporation). Una volta controllata l'integrità dell'RNA mediante gel di agarosio, si è proceduti alla sintesi del cDNA utilizzando 1-2 nanogrammi di RNA mediante trascrittasi inversa usando come oligo HT11-G dove H è la sequenza di restrizione per Hind III (AAGCTT).

Il cDNA è stato poi amplificato mediante PCR utilizzando come primo oligo HT11-G e come secondo oligo H-AP7 (5'AAGCTTAACGAGG3') in presenza di alpha 32PdATP secondo il protocollo indicato dalla GenHunter Corporation (RNA Image, GenHunter Corporation). I prodotti dell'amplificazione sono stati quindi caricati su gel di poliacrilammide al 6% denaturante. Il gel è stato poi trasferito su carta 3M, essiccato ed esposto per 72 ore a -80°C. Dopo lo sviluppo l'autoradiogramma è stato orientato sul gel e la banda di interesse presente solo in cellule lkBalfa+



e di circa 500bp è stata punzonata attraverso la lastra ai quattro angoli.

In questo modo è stato possibile recuperare il frammento di gel sottostante contenente la banda di interesse. Tale frammento è stato immerso in 100 microlitri di acqua, lasciato per 10 minuti e poi fatto bollire per 15 minuti. Dopo centrifugazione è stato recuperato il sopranatante e precipitato in presenza di glicogeno. Il pellet di DNA è stato risospeso in 10 microlitri di acqua e 4 microlitri sono stati riamplicati utilizzando sempre la stessa coppia di oligo descritta precedentemente. Il prodotto dell'amplicazione è stato poi visualizzato su gel di agarosio per verificare la grandezza del frammento e l'assenza di bande contaminanti. Tale prodotto di PCR è stato poi clonato in pGEM-Teasy per poterne determinare la sequenza ed è stato utilizzato come sonda in esperimenti di Northern blot.

In questo modo, abbiamo potuto selezionare un cDNA, da noi costruito, corrispondente ad un mRNA, che era espresso solo in uno dei due tipi cellulari, e cioè in quello trasfettato con lkBalfa.

Il cDNA, da noi costruito e selezionato, rappresentava quindi soltanto un frammento del corrispondente mRNA.

Per avere il cDNA completo ("full-length"), abbiamo costruito, dalle cellule trasfettate con lkBalfa e stimulate con acido okadaico, una libreria di cDNA nel vettore Uni-ZAP XR e l'abbiamo analizzata con il cDNA in nostro possesso (4). In questo modo, abbiamo ottenuto il cDNA "full-length", del quale abbiamo determinato la sequenza SEQ ID NO: 1, che si riporta in fig. 1.

**Determinazione dell'espressione della sequenza in cellule umane -**

Esperimenti successivi sono stati eseguiti per Northern blot (eseguiti secondo la tecnica descritta nella ref. 5). 30×10^6 cellule sono state lavate ed il pellet risospeso in 3 ml di Trizol reagent (Life Technologies). L'RNA è stato purificato mediante estrazione con fenolo-cloroformio, successivamente è stato precipitato in alcool isopropilico ed infine lavato in etanolo al 70%. La quantizzazione dell'RNA è stata calcolata utilizzando l'assorbimento a 260 nm e la verifica di normalizzazione è stata ottenuta attraverso elettroforesi su gel di agarosio. 30 microgrammi di RNA sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1% con formaldeide 2,2 M e quindi trasferiti su filtro di nylon (Hybond, Amersham). I filtri sono stati UV-crosslinked ed ibridati con la sonda corrispondente alla sequenza SEQ ID NO: 1 della figura 1. La sonda è stata marcata con [alfa- 32 P]ATP per random priming (attività specifica $1-5 \times 10^6$ cpm/ml). I filtri ibridati sono stati sottoposti ad autoradiografia. Questi esperimenti hanno dimostrato che il cDNA da noi ottenuto lega specificamente un mRNA, che si esprime nelle cellule dopo stimolazione con agenti che inducono apoptosi. Infatti, come si vede in fig. 2, tale mRNA viene indotto in cellule Jurkat dalla stimolazione via Fas.

Inoltre, in cellule (SH-SY5Y) di neuroblastoma, il mRNA identificato con il nostro cDNA non è espresso, o è espresso molto poco, in condizioni basali, mentre è espresso significativamente in seguito alla stimolazione con dietilmaleato (DEM), che induce apoptosi (fig. 2). L'espressione di questo mRNA può essere regolata dall'attività dei fattori NF- κ B.



La Fig. 2 mostra l'espressione della sequenza in cellule umane. A) Attraverso esperimenti di Northern blot, è stata determinata l'espressione della sequenza, come mRNA, in cellule Jurkat, non stimulate (T0) oppure stimulate con l'anticorpo anti-Fas CH-11 per 1h, 3h, 6h o 12h. B). Sempre attraverso esperimenti di Northern blot, è stata determinata l'espressione della sequenza in cellule della linea di neuroblastoma SH-SY5Y, non stimulate (-) o stimulate con DEM (+). L'espressione del gene GAPDH viene riportata come controllo.

Nuova proteina, codificata dalla sequenza - Sulla base della sequenza del cDNA da noi identificato, abbiamo scelto putativi epitopi (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8) della proteina corrispondente, ed inoltre abbiamo ottenuto, mediante clonaggio dello stesso cDNA nel vettore di espressione PET22 (ref. 4 della bibliografia), la proteina ricombinante. In accordo a metodologie note all'esperto del ramo abbiamo ottenuto specifici anticorpi di coniglio con i quali abbiamo eseguito esperimenti di immunoprecipitazione utilizzando cellule della linea leucemica T Jurkat trattate e non con anticorpo anti-Fas. 3×10^6 cellule sono state starvate in mezzo di coltura cisteina metionina-free per 2 ore. Successivamente tali cellule sono state trattate con anti-Fas (50 ng/ml) e nel mezzo di coltura è stata aggiunta metionina marcata con ^{35}S (100 microCi) per 12 ore. Dopo tale periodo di incubazione, dalle cellule Jurkat sono stati estratti estratti proteici totali risospendendo il pellet in un buffer di lisi costituito da 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8, incubando 30' a 4°C e



centrifugando. Negli estratti totali così ottenuti sono state dosate le proteine. Per l'immunoprecipitazione sono stati utilizzati 500 microgrammi di estratto proteico e portati ad un volume finale di 500 μ l con buffer di lisi. Ai campioni così preparati è stato aggiunto l'anticorpo specifico per la proteina in esame, diluito 1:100, e le miscele sono state incubate a 4°C in agitazione. Dopo tale periodo di incubazione, ai campioni contenenti l'immunocomplesso è stata aggiunta Proteina A-Sepharose (LKB-Pharmacia) e le miscele sono state lasciate 45' a 4°C in agitazione. Al termine dell'incubazione l'immunocomplesso associato alla Proteina A-Sepharose è stato recuperato mediante centrifugazione e caricato su gel di poliacrilammide al 14% per SDS-PAGE. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato essiccato ad 80°C sotto vuoto ed esposto per autoradiografia.

E' stato possibile così evidenziare la proteina nativa, che risulta essere di circa 20 kD (fig. 3).

Secondo quanto illustrato in Fig. 3A, la presenza della proteina è stata determinata, attraverso immunoprecipitazione con l'anticorpo specifico descritto sopra, in estratti di: cellule Jurkat non stimulate (-); cellule Jurkat stimulate con l'anticorpo anti- Fas CH-11 (+). La sequenza aminoacidica SEQ ID NO: 3 della proteina viene riportata in figura 3B.

Modulazione dell'apoptosi - Abbiamo ricercato se il cDNA e la proteina da noi identificati siano in grado di modulare l'apoptosi. Per fare ciò, abbiamo stimolato l'apoptosi in cellule SH-SY5Y ed abbiamo aggiunto un oligonucleotide antisense, da noi costruito sulla base del cDNA in nostro



possesso, e dunque diretto a bloccare l'espressione dello specifico mRNA corrispondente e la sintesi della proteina. L'antisense era in grado di modulare l'apoptosi, e cioè, in questo caso, di bloccarla (fig. 4, 5, 6 e 7). Ciò dimostra che: 1) il mRNA e la proteina da noi identificati regolano l'apoptosi; 2) agendo su di essi, nel caso specifico attraverso i nostri cDNA ed antisense, ma anche con un altro eventuale reagente basato sulla sequenza e/o sulla proteina da noi identificate e di cui abbiamo trovato una specifica funzione ed attività, è possibile modulare l'apoptosi, dunque effettuare un utilizzo per la modulazione della morte programmata.

Fig. 4 – Inibizione dell'apoptosi con oligo antisense in cellule SH-SY5Y: immagini citofluorimetriche. 3×10^5 cellule di neuroblastoma sono state incubate a 37°C in un'atmosfera di CO_2 al 5%, in presenza di dietilmaleato alla concentrazione di 2mM, in presenza o in assenza dell'oligo antisense SEQ ID NO: 4 (CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC) (7 microm) e di quello nonsense SEQ ID NO: 9 (TTA TAT TCT ATT ATA TTT ATG AAC TCC) (7 microm). Dopo 16h, l'apoptosi è stata analizzata in citofluorimetria, come descritto nel testo.

Fig. 5 - Effetto dell'oligo antisense in cinetica sull'apoptosi di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. 3×10^5 cellule di neuroblastoma sono state incubate a 37°C in un'atmosfera di CO_2 al 5%, in presenza di dietilmaleato alla concentrazione di 2mM, in presenza o in assenza dell'oligo antisense SEQ ID NO: 4 (CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC) (7 microm) e di quello nonsense SEQ ID NO: 9 (TTA TAT



TCT ATT ATA TTT ATG AAC TCC) (7 microm). Dopo 12 e 16 ore le cellule sono state raccolte ed incubate nella soluzione di ioduro di propidio per 30' a 4°C ed analizzate al citofluorimetro FACScan per la presenza di popolazione a contenuto ipodiploide di DNA.

Fig. 6 - Effetto dell'oligo antisense sull'apoptosi di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, indotta da dietilmaleato alla concentrazione di 2mM. 3×10^5 cellule di neuroblastoma sono state incubate a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5%, con dietilmaleato alla concentrazione di 2mM, in presenza o in assenza dell'oligo antisense SEQ ID NO: 4 (CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC) (7 microm) e di quello nonsenso SEQ ID NO: 9 (TTA TAT TCT ATT ATA TTT ATG AAC TCC) (7 microm). Dopo 16 ore le cellule sono state raccolte ed incubate nella soluzione di ioduro di propidio per 30' a 4°C ed analizzate al citofluorimetro FACScan per la presenza di popolazione a contenuto ipodiploide di DNA.

Fig. 7 - Effetto dell'oligo antisense sull'apoptosi di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, indotta da dietilmaleato alla concentrazione di 6mM. 3×10^5 cellule di neuroblastoma sono state incubate a 37° C in un'atmosfera di CO₂ al 5%, con dietilmaleato alla concentrazione di 6mM, in presenza o in assenza dell'oligo antisense SEQ ID NO: 4 (CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC) (7 microm) e di quello nonsenso SEQ ID NO: 9 (TTA TAT TCT ATT ATA TTT ATG AAC TCC) (7 microm). Dopo 16 ore le cellule sono state raccolte ed incubate nella soluzione di ioduro di propidio per 30' a 4°C ed analizzate al



citofluorimetro FACScan per la presenza di popolazione a contenuto ipodiploide di DNA.

Presenza della proteina in cellule primarie ex vivo - Abbiamo ricercato se la proteina da noi studiata fosse presente in cellule primarie umane *ex vivo*. A questo scopo, abbiamo analizzato tre campioni di cellule di leucemia linfatica cronica (B-CLL), in quanto tali cellule costituiscono la controparte primaria della linea cellulare da noi inizialmente studiata. Per individuare la proteina, abbiamo compiuto esperimenti di immunofluorescenza intracitoplasmatica. La tecnica utilizzata è basata sul seguente protocollo. 10^6 cellule sono state fissate ed impermeabilizzate con 250 microlitri di soluzione cytofix/cytoperm (Pharmlngen) e sottoposte ad immunofluorescenza indiretta, tramite una prima incubazione con l'anticorpo specifico preparato come detto in precedenza o con l'anticorpo di controllo, ed una seconda incubazione, previo lavaggio con la soluzione Perm/Wash (Pharmlngen), con un anticorpo anti-coniglio marcato con isotiocianato di fluoresceina. Le cellule sono state lavate e risospese nella soluzione Perm/Wash e, quindi, analizzate al citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) utilizzando il software Lysis 1; la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con l'anticorpo specifico è stata paragonata a quella emessa dalle cellule incubate con l'anticorpo non specifico.

In questo modo, abbiamo potuto evidenziare, con gli specifici anticorpi contro la nostra proteina, la presenza della proteina stessa, in tutti e tre i campioni di leucemia analizzati (figure 8, 9 e 10).



Fig. 8 - Espressione intracitoplasmatica della proteina in cellule di leucemia linfatica cronica primaria. 2×10^6 /ml sono state incubate con dietilmaleato 2mM. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in un'atmosfera di CO_2 al 5%, le cellule sono state raccolte, fissate ed impermeabilizzate con 250 microlitri di soluzione cytofix/cytoperm (Pharmingen) e sottoposte ad immunofluorescenza indiretta tramite una prima incubazione con l'anticorpo specifico o con l'anticorpo di controllo, ed una seconda incubazione, previo lavaggio con la soluzione Perm/Wash con un anticorpo anti-coniglio marcato con isotiocianato di fluoresceina. Le cellule sono state lavate e risospese nella soluzione Perm/Wash e, quindi, analizzate al citofluorimetro FACSscan (Becton Dickinson) utilizzando il software Lysis 1; la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con l'anticorpo specifico è stata paragonata a quella emessa dalle cellule incubate con l'anticorpo non specifico. Basalmente le cellule esprimono la proteina nella percentuale del 33,8%, l'espressione appare aumentata in cellule coltivate con DEM (47,6%).

Fig. 9 - Espressione intracitoplasmatica della proteina in cellule di leucemia linfatica cronica primaria. 2×10^6 /ml sono state incubate con dietilmaleato 2mM e con 2-metossiestradiolo (2ME) (Sigma) 20microm. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in un'atmosfera di CO_2 al 5%, le cellule sono state raccolte, fissate ed impermeabilizzate con 250 microlitri di soluzione cytofix/cytoperm (Pharmingen) e sottoposte ad immunofluorescenza indiretta tramite una prima incubazione con l'anticorpo specifico o con l'anticorpo di controllo, ed una seconda



incubazione, previo lavaggio con la soluzione Perm/Wash con un anticorpo anti-coniglio marcato con isotiocianato di fluoresceina. Le cellule sono state lavate e risospese nella soluzione Perm/Wash e, quindi, analizzate al citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) utilizzando il software Lysis 1; la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con l'anticorpo specifico è stata paragonata a quella emessa dalle cellule incubate con l'anticorpo non specifico. Basalmente le cellule esprimono la proteina nella percentuale del 17,3%, l'espressione aumenta in presenza di DEM (55,5%) e di 2ME (53,1%).

Fig. 10 - Espressione intracitoplasmatica della proteina in cellule di leucemia linfatica cronica primaria. 2×10^6 /ml sono state incubate con dietilmaleato 2mM e con 2-metossiestradiolo (2ME) (Sigma) 20micromM. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5%, le cellule sono state raccolte, fissate ed impermeabilizzate con 250 microlitri di soluzione cytofix/cytoperm (Pharmingen) e sottoposte ad immunofluorescenza indiretta tramite una prima incubazione con l'anticorpo specifico o con l'anticorpo di controllo, ed una seconda incubazione, previo lavaggio con la soluzione Perm/Wash con un anticorpo anti-coniglio marcato con isotiocianato di fluoresceina. Le cellule sono state lavate e risospese nella soluzione Perm/Wash e, quindi, analizzate al citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) utilizzando il software Lysis 1; la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con l'anticorpo specifico è stata paragonata a quella emessa dalle cellule incubate con l'anticorpo non specifico. Basalmente le cellule



esprimono la proteina nella percentuale del 27,2%, l'espressione non appare regolata da DEM (28,3%) o da 2ME (23,1%).

I tre campioni saggiati nelle figure 8, 9 e 10 erano tre campioni di leucemia biologicamente differenti, ottenuti cioè da tre pazienti diversi affetti dalla stessa patologia.

Modulazione dell'apoptosi in cellule primarie ex vivo – Per determinare se la nostra proteina moduli l'apoptosi in cellule primarie *ex vivo*, abbiamo analizzato l'effetto di due specifici oligonucleotidi antisenso, che ne bloccano l'espressione. Due oligo nonsenso sono stati usati come controllo. Tale effetto è stato analizzato in cellule di leucemia acuta mieloide, ottenute dal sangue periferico del paziente ed incubate con uno specifico farmaco, che si usa nei protocolli terapeutici di questo tipo di leucemia: il topotecan, un inibitore delle topoisomerasi che induce apoptosi. Mentre gli oligonucleotidi nonsenso di controllo non avevano alcun effetto, gli oligonucleotidi specifici, che bloccano l'espressione della nostra proteina, inibiscono fortemente l'apoptosi, come illustrato nella fig. 11. Ciò indica che la nostra proteina entra in un circuito di regolazione dell'apoptosi in cellule umane primarie *ex vivo*, e che agendo su di essa è possibile modulare l'apoptosi.

Fig. 11 - Effetto di due oligo antisenso sull'apoptosi di cellule di leucemia acuta mieloide primaria, indotta da topotecan, un inibitore dell'enzima topoisomerasi, alla concentrazione di 50ng/ml. 1×10^6 /ml cellule di leucemia sono state incubate a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5%, con topotecan, in presenza o in assenza dell'oligo antisenso 1 SEQ ID NO: 4



(CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC) (7 microm), dell'oligo antisenso 2 SEQ ID NO: 5 (CTT TCT ATC TTC ATT TTA TTT TTC C), dell'oligo nonsenso 1 SEQ ID NO: 9 (TTA TAT TCT ATT ATA TTT ATG AAC TCC) (7 microm) e dell'oligo nonsenso 2 SEQ ID NO: 10 (TTT TTC TTC ATT AAA TAA CTA AGG) (7 microm). Dopo 5 giorni le cellule sono state raccolte ed incubate nella soluzione di ioduro di propidio per 30' a 4°C ed analizzate al citofluorimetro FACScan per la presenza di popolazione a contenuto ipodiploide di DNA.

Bibliografia

1. Green DR, Cell 102: 1, 2000.
2. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Ricciardi CA. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry: J. Immunol Methods 139: 271, 1991.
3. Liang P, Pardee AB, Methods Mol. Biol. 85: 3, 1997.
4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second E. CSH Laboratory Press, CSH, New York, N.Y., 1989.
5. Granelli-Piperno A, Nolan P: J.Immunol. 147: 2734, 1991.
6. Lamberti et al., Apoptosis 4: 179, 1999.

ELENCO SEQUENZE

SEQ ID NO: 1

5- GAGTAGAAGA ATCAAGCACA ATTAAAGATG CTAATTAT TAGACCTATA
AAATATTGA ACGCACACAGA AAAAGATGAA TATTATTTA ACGTTCTAA
ATATAGCGAA ATAGAATAG ACAATTGAA AAAAGATATA ATAAATTAT
ATAACATAA CAATTAAGT CTCTTAAT CTCAAATGT TATCGCTTT
AATACTGAA CGAAAAACAC CGAGACATT GAAATATTA TCAATGAATC
AGTAGGTAA GAAAAAAT TAACTAGCT GGAATTGCT AAATAACAA
AAAAAAGC TTGAATTGAT GTGATGAA TAGTAAATCA TTGAGCGCA
AAGCAATTG ATTTAATAA TGATGAGGAT TGGGTGGCA AATTGATTA
TGTAATATA GGAGATTCAA TATGAATACC TTCTAAACA GATACTGAT
TTACTAAATC CCTCTTAA TTAATTGATA AATTAAAA TAATTATTAT
TCAAGTATTC CAATTTGAA AAAAGATAAT AATTATGTT CTATCCTAT
CGATCAATTA GAAAAAGATA ATAAAGAAAT ATATATATA ACATTCTAG
ATAAATCAT TAATCTGAA AATGCTGACT TATTGTTAG CGACAAGMA
ATCAATGAAT TAACAAAT TTACATTTTA TTTATGCAG AAGAAITTA
AGTAAAAAC AATTAACT TTGAAAAA AAATGAAGAT TTAATAATA
AATCTATAC GAGTTTAAAT GTTAAATCCA AAAAGTGT ATACCTAGT
TATTTAATGA AGAAAAATA CGATGATATG AAAAAATAG AGAAAAATA
TTTATATAG TTGTAAATA ATGGTAGAGA ATATTATTT TTGAATAAG
ACAAAGCAAG ACAATACATA ATAAATAGTT TTTACAAAT AAAAGCAAT
AAATATTAT TAAATCGAA AACTACTAC TACTATGACA ATAAGGAAT
TCAAGCAAT TTGAATTGA ATAAATATAT AATTAAAA AGAGGGGAA
AATAAATGA AGATAGAAG AAAATTATTT TTAATACAA CGATTTTGG
ATCTCTAT ATCATTTGCT CCACATCTG TGCCAATAAT GAACACACAG
AAGTAAAGA TAAITTAATA AATATAATA CACGTGTAA AATCAACA
TTTTTACG TAGATATAGA TAATAAATA TATGATTA AAATGTTGA
TGATTCGTA AATAGTTTG ATTACAATA AAAATCGAA AAATTATAG
CAGTTGGAGA TGATTAATA AATGATGAA AAAATATCT TTAATATG
AAAACTAG TTTATCGAA AATGAAAA ATTTAATA AATGATAAG
ACTAAGTATA ACGAGGATG GCGGAATCA GAAGATGCAT ATATTCATA
ICTGAAGAT TAGCTTGA TTAAATA TTTGCTCA AATAAGGAT
TCGACAGTAG TGAAGATGCA AAACATATA ATCTGATA AATAAAAA
GGCACACAT TATTTTATA TTATAAAC GAAGAGAAAT TATTAATCC
AATGAGTTG AATTCGAA ATAAITTAG AAACAGTAG ATTAATAIC
TAAAGAAAT AAGTCAIT TATAITTC AATATTTTA CTITTAAT
AATAAGATG TTAAAAAA CGAAATACT ATAAATTT ACGAAAAATA
TAGATTAGAC AAAATAGCAG AAACAATTA TCAACGATA TTAATACAA
TTTTTACGA AACAGCAAT AATTAAAA AGAATTCGA AGTAATAAT
TACCTAATC CTGATGCAG AGATGATATA GGTATCAAT TTACTCAA
TCCTGAAT AAATTAAG GTTGAGACTA TAAGGGAAC AATCAATA
TATACAAAA ATGAAAGCT AGAGAATGAA ACAATTCAT AGAAATATA
AACGAAAA ATGAAAAAGA GCTTTTAGA AGTCTGTAG ACAATTTGA
GCTAATGAT GAGTTGTTA AACATTTTG AACATTTAC GTACACTTT
TAGGAACAA AATTAAGGA TTAATGATT TAAAGATTT GGAATATA
ACAAATAAT TTGTTATGA CAATATTAC GATTGATGC AATGTTGT
AAGAAATAT GAACAAGAT CTGCTTTTT TATTGAAGT AATTCTTA
ATGAGCTGA TGGGTTAGA ATAAATACAA AAATGTTAG ATTTCTGA
ATAATAATG AGAACATTT GGACGGACA GAATTTGAA TTAAAAAA
TATAGAACA CATTTAAGTA AATTGGTGA AAAAATAAAA CAATAGTTA
ATCAAAATGA ACTAGATTTG TTAGCATTAT ATGACAAATT TTATGAAA

ATCAATGCGA AAGAAAAAT TCAAAAAA GATACATC TCATTGAGG
 TTGACTAAA AATTATAAAA AATTGCTAAG TATAATAAAA AATGAATAA
 TTGTTTTCT AATAATATGTA ATTGATGAAA CTTTGAATT TTATCGGAAA
 GTTACACATTA ACAATATAAA AATGCTAGTA AAAGAAAAAA ACACAAAAAA
 TCATTTTTTA TTTTAAATA AAGAAACGT CTCATTTTAT GATTAAAA
 ATAATGTCAA AGAAAAATTT TTAATAAGA AAATTATAAA AAAGATGAA
 AAAATACTG AAAATAATTT CGGAGAAITTA GTAATTAAG AGGAAGAAAG
 AAATTTTTTA ACATTTGTTT ATTTTATTT AAAGAAACA AAATCCATTA
 ATAAAGAGTT AGATTTATGC GAGCCATTTT GAATTGAAA CGACAAATAT
 AAATTGTATA AAAATATTTG TTGTTAGAA GATTTAAGAA CTTTTGAAA
 AAAAGAAACA ATTAACCTTT TTAATCATGC CTCAAAAGAA GAATTTCAA
 AAAATAATAG AGATTTTAT AATAACAAAT TTGTCCTTC AAAAAATAT
 AAAATTGTTA TTCCAATAG AACCCAGAA ATATTTTTTA ATCGAAAGA
 ACTTTTGTTA GCAATTTTAT ATACTACCT TAAATAAAA AATTCACCTA
 ATATATTAAT AAATAATAAA AGTCTAAAA AACCTACAA TTAAATTTT
 TTTAATGTT ATAGATTTAA AATTAATGAA AAAATTATG ATTTAAAA
 TTTAATGAT ATAGTGACAT TTTTAAATA TTTTGTTG CAAATGCAA
 AAATTGAATA TTAAGGAGGA AAAGTAATGA AAAAATCAAA AATGAAAA
 ATTTTACAT CTATTATAGG AATTTTACCT TTAACCTACTA TTTGGTTTC
 TTGCAAAAAA AAAAAAAAAA AA -3'

SEQ ID NO: 2

ATGTATAAGA CTAAGTATAA CGAGGATGTG GCGAACTCAG
 AAGATGCAAT TAATTCATAT CTGAAGATT ATGCTTTGAT TTAAAAATAT
 TTGCTTCAA ATAAGGATT CGACAGTAGT GAAGATGCAA AACAAATATA
 TCTTGATAAA ATAAAAAAG GCACAACATT ATTTTCATAT TATAAAAAAG
 AAGAGAAGTT ATTAATCCA ATGAGTTTGA ATTCCTAAAA TAATTTAGA
 AACCAGTACA TTAATAATCT AAAAGAAATA AAGTCATTTG ATAAATTTCAA
 ATATTTTAC TTTTAAATA ATAAAGATGT TTTAAAAAAC GAAATACTA
 TAAAAATTTA CGAAAAATAT AGATTAGACA AAATAGCAGA AACAAATTTAT
 GCAACACATAT TAAATACAAT TTTTACGAA ACAGCAATTA ATTTAAAGA
 AGAATTCGAA GGTAAAAATT ACCTATATCC TGATGCAAAA GATGATATAG
 GGTATCAAT TATACTCAAT CCTGAATTTA AATTAAAAGG TTGA

SEQ ID NO: 3

MYKTKYNEDV	ANSEDAVNSY	LEDYALIKY	FASNKGFDSS	EDAKQYNLDK
IKKGTTLEFSY	YKNEEKLFP	MSLNSQNNFR	NGYINNIKEI	KSFDNFKYFY
FLNNKDVLN	ENTIKFYEKY	RLDKIAETIY	ANILNTIFYE	TAINLKEEFE
GKNLYPDAK	DDIGYQFILN	PEFKLKG		

SEQ ID NO: 4

CTT AGT CTT ATA CAT TTT TTT AAA ATC

SEQ ID NO: 5

CTT TCT ATC TTC ATT TTA TTT TTC C

SEQ ID NO: 6

NSQNNFRNQYINNIKEIKS

2648PT1T

Notarbartolo & Gervasi SpA



SEQ ID NO: 7
KFEKYRLDKIAETIYA

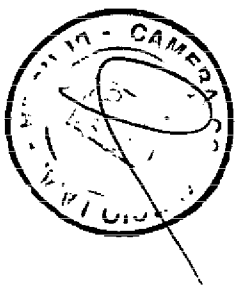
SEQ ID NO: 8
NLKEEFEGKNLYPDAKD

SEQ ID NO: 9
TTATAT TCT ATT AIA TTT ATG AAC TCC

SEQ ID NO: 10
TTT TTC TTC ATT AAA TAA CTA AGG

SEQ ID NO: 11

5'AAGCTTAACGAGG3'





RIVENDICAZIONI

RM 2 0 0 1 A 0 0 0 0 0 5

- 1) Sequenza nucleotidica isolata indicata come SEQ ID NO: 1.
- 2) Sequenza nucleotidica che codifica per un polipeptide o peptide compreso nella sequenza amminoacidica indicata come SEQ ID NO: 3.
- 3) Sequenza nucleotidica complementare alla sequenza secondo le riv. 1 e 2.
- 4) Polinucleotide od oligonucleotide isolato comprendente porzioni della sequenza nucleotidica indicata come SEQ ID NO: 1.
- 5) Polinucleotide od oligonucleotide isolato comprendente porzioni della sequenza nucleotidica indicata come SEQ ID NO: 2.
- 6) Polinucleotide od oligonucleotide complementare al polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4 e 5.
- 7) Polinucleotide od oligonucleotide omologo al 40% o superiore rispetto al polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-6.
- 8) Polinucleotide od oligonucleotide omologo al 60% o superiore rispetto al polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-6.
- 9) Polinucleotide od oligonucleotide omologo all'80% o superiore rispetto al polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-6.
- 10) Sequenza amminoacidica isolata indicata come SEQ ID NO: 3.
- 11) Polipeptide o peptide isolato comprendente porzioni della sequenza amminoacidica SEQ ID NO: 3.
- 12) Polipeptide o peptide omologo al 40% o superiore rispetto al polipeptide secondo la riv. 11.



- 13) Polipeptide o peptide omologo al 60% o superiore rispetto al polipeptide secondo la riv. 11.
- 14) Polipeptide o peptide omologo all'80% o superiore rispetto al polipeptide secondo la riv. 11.
- 15) Oligonucleotide antisense in grado di ibridarsi con la sequenza di mRNA derivata dal cDNA che codifica per la proteina avente la sequenza indicata in SEQ ID NO: 3.
- 16) cDNA secondo la riv. 15 ottenuto per amplificazione PCR mediante utilizzo di un primo oligo HT11-G e un secondo oligo H-AP7: 5'AAGCTTAACGAGG3'.
- 17) Oligonucleotide antisense scelto fra quelli aventi la sequenza: SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5.
- 18) Sequenza polinucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 1-17 da usare in campo medico.
- 19) Plasmide comprendente il polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-9.
- 20) Plasmide secondo la riv. 19 da impiegare come vettore di clonaggio e di espressione.
- 21) Vettore contenente il polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-9.
- 22) Vettore Uni-ZAP XR contenente il polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-9.
- 23) Vettore PET-22 contenente il polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 4-9.



- 24) Cellula modificata con il plasmide secondo le riv. 19-20.
- 25) Cellula modificata secondo la riv. 24 in grado di esprimere la proteina indicata come SEQ ID NO: 3 o suoi frammenti o suoi omologhi al 40% di omologia o superiore.
- 26) Organismo pluricellulare, escluso l'uomo, comprendente cellule modificate secondo le riv. 24-25.
- 27) Anticorpi contro la proteina indicata come SEQ ID NO: 3.
- 28) Composizioni farmaceutiche comprendenti una sequenza polinucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 1-17 da usare in campo medico.
- 29) Composizioni farmaceutiche comprendenti una sequenza polinucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 1-17 da usare per modulare l'apoptosi o altri tipi di morte cellulare e/o la proliferazione e/o l'equilibrio di un compartimento cellulare.
- 30) Composizioni farmaceutiche secondo le riv. 28-29 comprendenti ulteriormente uno o più componenti scelti fra: anticorpi, enzimi, carriers, vettori.
- 31) Composizioni farmaceutiche comprendenti il vettore secondo le riv. 21-23.
- 32) Composizioni secondo le riv. 28-31 da impiegare nel trattamento di una patologia scelta nel gruppo seguente:
- a) neoplasie;
- b) malattie degenerative: del sistema nervoso come il morbo di Parkinson, alcune forme di demenza ed altre; del muscolo scheletrico



come le distrofie muscolari ed altre; del muscolo cardiaco come la miocardiopatia dilatativa ed altre; di altri organi e tessuti;

c) stati patologici conseguenti a danni ischemici acuti e cronici nei tessuti;

d) patologie legate ad eccessiva o deregolata infiammazione, malattie autoimmunitarie, sclerosi multipla, psoriasi, rigetto di trapianto e reazione di trapianto contro l'ospite;

e) iperplasie, displasie e malattie similari;

f) AIDS, tubercolosi o altre malattie infettive in cui sia implicata l'apoptosi;

g) altre patologie in cui sia implicata l'apoptosi;

33. Kit per la determinazione dell'apoptosi comprendente una sequenza polinucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 1-17.

34. Kit secondo la riv. 33 comprendente ulteriormente uno o più componenti scelti fra: anticorpi, enzimi, carriers, vettori, reagenti specifici, e altresì comprendente spiegazioni per l'utilizzo di detto kit.

35. Kit secondo le riv. 33-34 da impiegare per una fra le seguenti procedure: nell'invecchiamento; per preservare o ricostituire compartimenti cellulari e/o tessuti, come nel caso di colture di cellule progenitrici e/o staminali di impiego in ematologia, oncologia, medicina dei trapianti ed altri campi della medicina, cellule e tessuti di impiego in chirurgia plastica e/o ricostruttiva, in tecniche di trapianti; per favorire l'attecchimento dei trapianti; per modulare la



sopravvivenza e/o le dimensioni di sistemi cellulari di impiego nel lavoro di laboratorio, nella ricerca scientifica e/o nella diagnostica.

36. Impiego di una sequenza nucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 1-17, o di parti di detta sequenza/e, per preparare farmaci che modulino l'apoptosi o altri tipi di morte cellulare e/o la proliferazione e/o l'equilibrio di un compartimento cellulare.

37. Impiego di una sequenza nucleotidica o polipeptidica, o di parti di detta sequenza/e, secondo le riv. 1-17 per kit diagnostici.

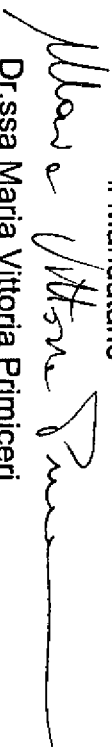
Roma, - 9 GEN. 2001

/PV

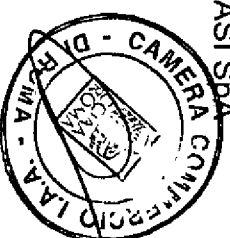
Per Università degli Studi di Napoli FEDERICO II

e per Università degli Studi di Catanzaro MAGNA GRAECIA

il Mandatario


Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA

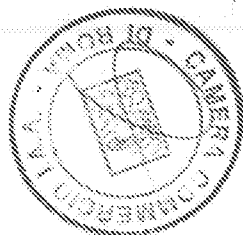


TAV. 1/9

RM 2001 A 000005

5'- GAGTAGAAGA ATCAAGCACA ATTAAAGATG CTAAATTTAT TAGACCTATA AAATATTTGA ACGCACAAGA AAAAGATGAA TATTATTTTA ACGGTTCTAA
 ATATACCGAA ATAGAAATAG ACAAATTGAA AAAAGATATA ATAAATTATT ATAAACATAA CAATTTAAGT CTCTTTATTT TATCGCTTTT
 AATACTTGAA CGAAAAACAC CGAAGACATT GAAAATATTA TCAATGAATC AGTAGGTAAG GAAAAAAAT TAAGTAGCTC GGAATTGTCT AAAATAACAA
 AAAATAAAGC TTGAATTGAT GTTGATGAAA TAGTAAATCA JTGAGCGCAA AAAGAATTTG ATTTTAATAA TGATGAGGAT TGGGTTGGCA AATTGTATTA
 TGTAATAAA GGAGATTCAA TATGAATACC TTCTAAAAA GATACTGATT TTACTAAATC CCTTCTTAAA TTAATTGATA AATTTAAAAA TAATTATTAT
 TCAAGTATTC CAATTTTGAA AAAAGATAAT AATTATGTTT CTTATCCTAT CGATCAATTA GAAAAAGATA ATAAAGAAAT ATATAATAAA ACATTTCTAG
 ATAAATCAT TAATCTGAA AATGCTGACT TATTGTTTAG CGACAAGGAA ATCAATGAAT TAACAAATTT TAACATTTTA TTTTATGCAG AAGAATTTAA
 AGTAAAAAAC AATTTAACTT TTTGAAAAA AAATGAAGAT TTAATAAATA AATTCTATAC GAGTTTAAAT GTTAAATCCA AAAAAGTGTC ATACCTTAGT
 TATTTAATGA AGAAAAATA CGATCATATG AAAAAATAG TTTTACAAAT TTTATATAAG TTTGTAAATA ATGGTAGAGA ATATTATTTT TTGAATAAAG
 ACAAAGCAAG ACAATACATA ATAAATAGTT TTTTACAAAT AAAAAAGCAAT AAATATTTAT TAAAATCGAA AACTTACTAC TACTATGACA ATAAGGAATT
 TCAAAGCATT TTAGAATTGA ATAAATATAT AATTAATAAAG AGAGGGGAAA AATAAAATGA AATATAAATA AAAATTATTT TTAATACAA CGATTTTGG
 ATCTTCTATT ATCATTGCT CCACATCTTG TGCCAATAAT GAAACACAAG AAGTAAAGA TAATTTAAAA AATATAAATA CACGTGGTAA AAATCAAACA
 TTTTTACGT TAGATATAGA TAATAAAAAA TATAGATTTA AAAATGTTGA TGATTTCTGA AATAGTTTTG ATTACAATAA AAAAATCGAA AAATTTATAG
 CAGTTGGAGA TGATTTAATA AATGATGAAA AAAATATCTT TTAATAATG AAAACTATAG TTTTATCGAA AATGAAAAAG ATTTTAAAAA AATGTATAAG
 ACTAAGTATA ACGAGGATGT GCGGAATCTA GAAGATGCAT ATAATTCATA TCTTGAAGAT TATGCTTTGA TTTTAAAAA TTTTGTCTCA AATAAGGGAT
 TCGACAGTAG TGAAGATGCA AAACAATATA ATCTTGATAA AATAAAAAA GGCACAACAT TATTTTCATA TTATAAAAAA GAAGAGAAGT TATTTAATCC
 AATGAGTTTG AATTCTCAAA ATAATTTTAG AAACAGTAGC ATTAATAATC TAAAAAGAAAT AAAGTCATTI GATAATTTCA AATATTTTIA CTTTTAAAT
 AATAAGATG TTTTAAAAA CGAAAAACT ATAAAAATTT ACGAAAAATA TAGATTAGAC AAAATAGCAG AAACAATTTA TGCAACATA TTAATACAA
 TTTTACGA AACAGCAAT AATTIAAAG AAGAATTCGA AGGTAAAAAT TACCTATATC CTGATGCAAA AGATGATATA GGCTATCAAT TTATCTCAA
 TCTGAAATTT AAATTIAAAG GTTGAGACTA TAAGGGGAACG AAATCAATAA TATACAAAAA ATGAAAAGCT AGAGAATGAA ACAATTTTAT AGAAAAATAA
 AACGAAAAA ATGAAAAAGA GCTTTTITAG AGTTCTGTAG ACAATTTTGA GCCTAATGAT GAGGTTGTTA AACATTTTIG AACATTTAAC GTACACTTTT
 TAGGAACAAA AATTAAAGGAA TTATTGGATT TAAAAGATTT GGAATAAAAA ACAATAAAT TTGTTTATGA CAAATATTAC GATTGATGGC AATGATTGGT
 AAGAAATTAT GAAACAAGAT CTGCTTTTTT TATTGGAAGT AAATTTCTTA ATGAGTCTGA TGGGTTAGGA ATAAATACAA AAATTGTTAG ATTTTCTGAA
 ATAAATAATG AGAACATTTT GGACGGACAA GAATTTGAAA TTAATAAAAA TATAGAACCA CATTAAAGTA AATTGGTTGA AAAAAATAA CAAATAGTTA
 ATCAAAATGA ACTAGATTTG TTTAGCATT AATGACAATT TATGGAAAAA ATCAATGGCA AAGAAAAAT TTCAAAAAA GATACTAATC TCATTTCCAGG
 TTTGACTAAA AATTATAAAA AATTGCTAAG TATAATAAAA AATGAAATAA TTGTTTTTCT AAATAATGTA ATTGATGAAA CTTTGAATT TTATCCGAAA
 GTTAACATTA ACAATATAAA AATGCTAGTA AAAGAAAAAA ACACAAAAAA TCATTTTTTA TTTTAAATA AAGAAAACTG CTCATTTTAT GATTTAAAAA
 ATAATGTCAA AGAAAAATTT TTAATAAAGA AAATTATAAA AAAAGATGAA AAAATAACTG AAAATAATTT GTAAATAAAG AGGAAGAAAG
 AAATTTTTA ACATTTGTTT ATTTTATTT AAAAGAAACA AAATCCATTA ATAAAGAGTT AGATTTATGC AGATTTATTT GAATTTGAAA CGACAAATAT
 AAATTGTATA AAAAAATTG TTTGTTAGAA GATTTAAGAA CTTTTTGAAA AAAAATAAT TTTTAAATA GAGCCATTTT GAGCCATTTT GAATTTGAAA
 AAATAATAAC AGATTTTAT AATAACAAAT TTGTTCTTTC AAAAAATAT AAAAATAAT ATTATATTAT AAATAATAA AAACCACGAA ATATTTTITA
 ACTTTTGTTA GCAATTTTAT ATAACCTACCT TAAAATAAAA AATTCAACTA ATTATAATG TTTTAAATAA AGTTCTAAAA AAACCTACAA TTTTAAATTT
 TTTAATGTTT ATAGATTTAA AATTAATGAA AAAATTTATG ATTTTAAAAA TTTTAATGAT ATAGTGACAT TTTTAAATA TTTTGTGTTG CAAAATGCAA
 AAATTGATAA TTAAGGAGGA AAAGTAATGA AAAAAATCAA AATGAAAAA ATTTTACAT CTATTATAGG AATTTTACCT TTAACCTACTA TTTTGGTTTC
 TTGCAAAAAA AAAAAAAA AA -3'

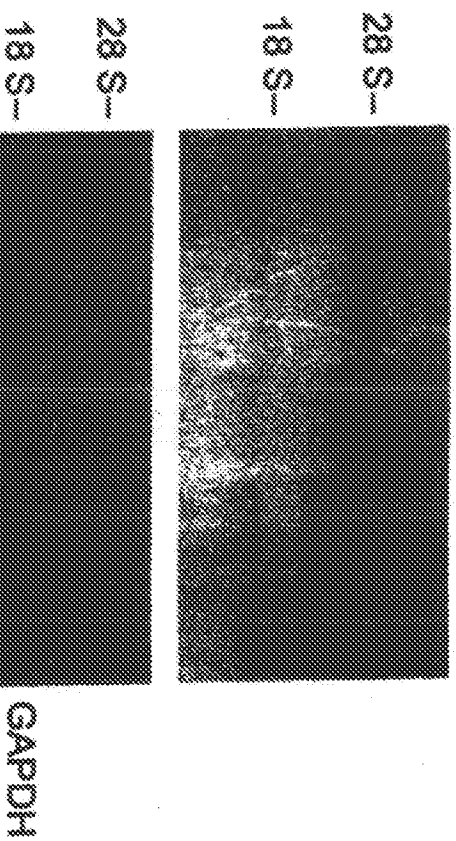
Fig. 1



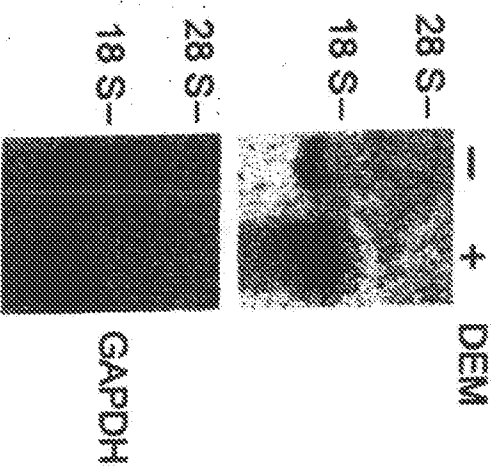
PM 2001 A 000005

34. 29

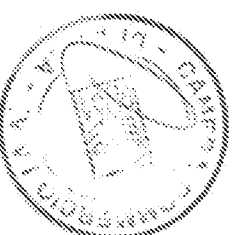
10 h 3h 6h 12h



23



28



TAV. 3/9

PM 2001 A.000005

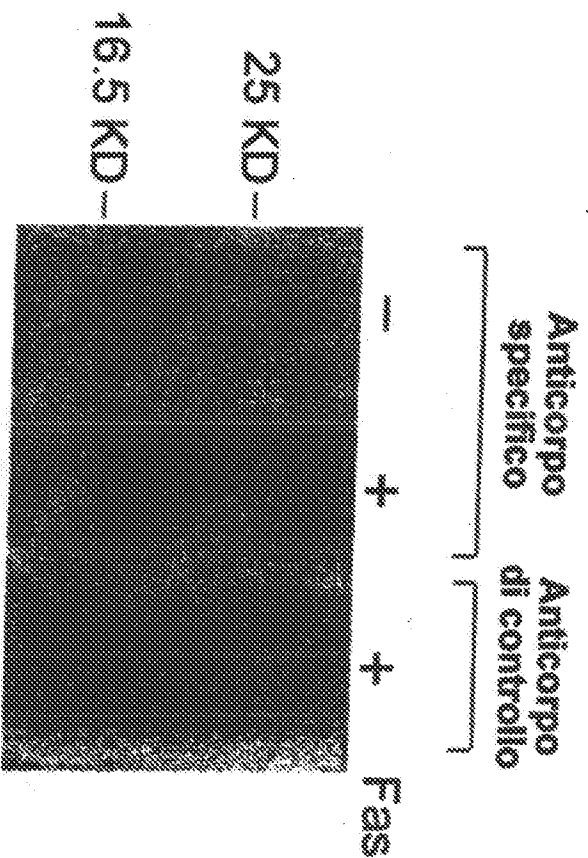
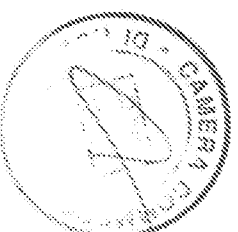


Fig. 3A

1 MYKIKNEOV ANSEDAVNSY L.EDYALIKY FASNGKIDSS EDARQYNLDK
 51 IKKGTILSY YKNEEKL.FNE MSLSNÖNNER NÖYINNIKEI KSDNFKYFY
 101 FLANKOVLAN ENTIKEFYENY KIDKIAETIY ANIINTIIFYE TAINIKKEFE
 151 GRNYLYPDAR DDIGYÖFIIN PEFKING

Fig. 3B



TAV. 4/9

PM 2001 A 000005

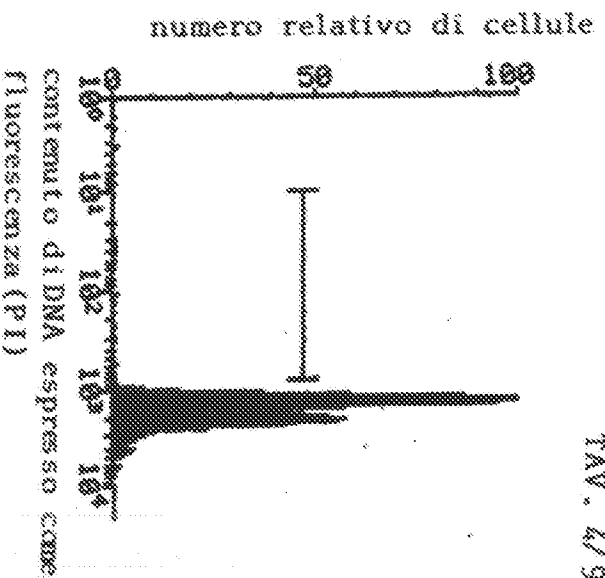


Fig. 4A

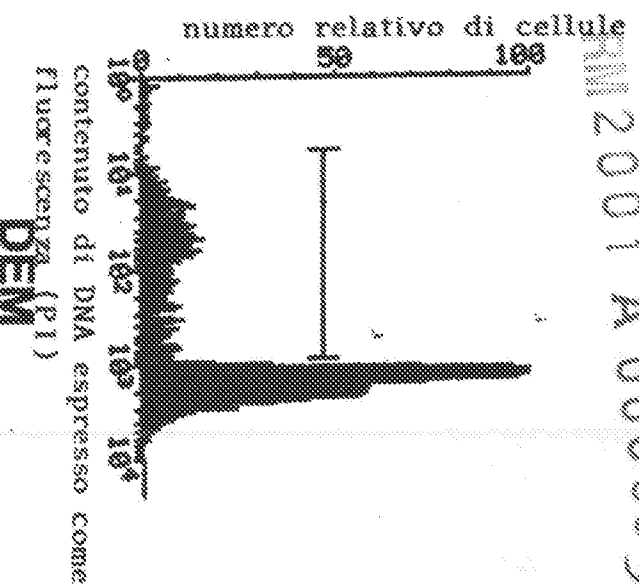


Fig. 4B

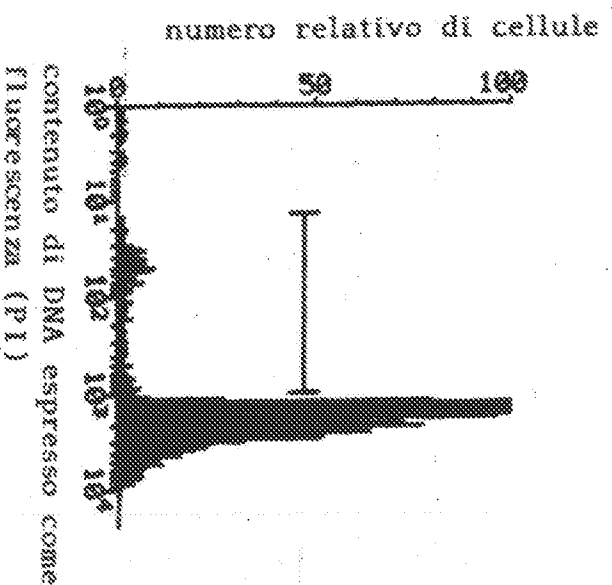


Fig. 4C

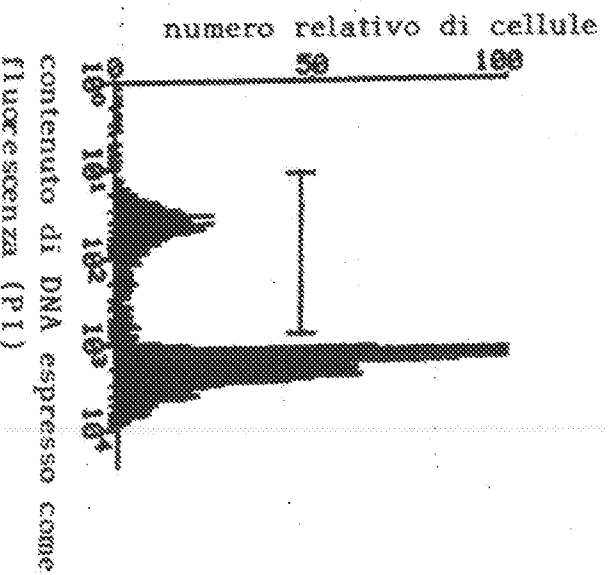
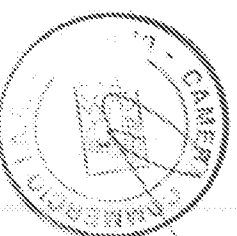


Fig. 4D



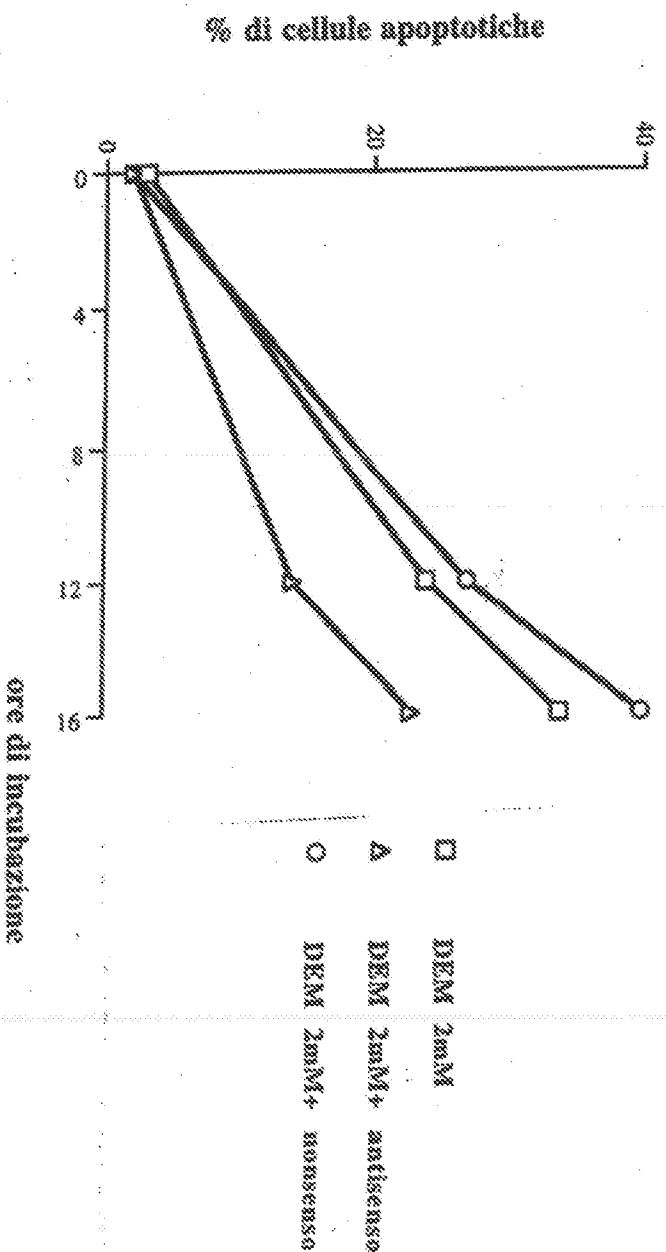
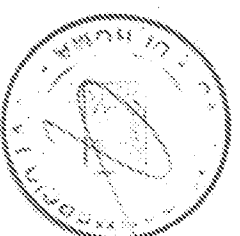


Fig. 5



RM 2001 A 000005

PM 2001 A 000005

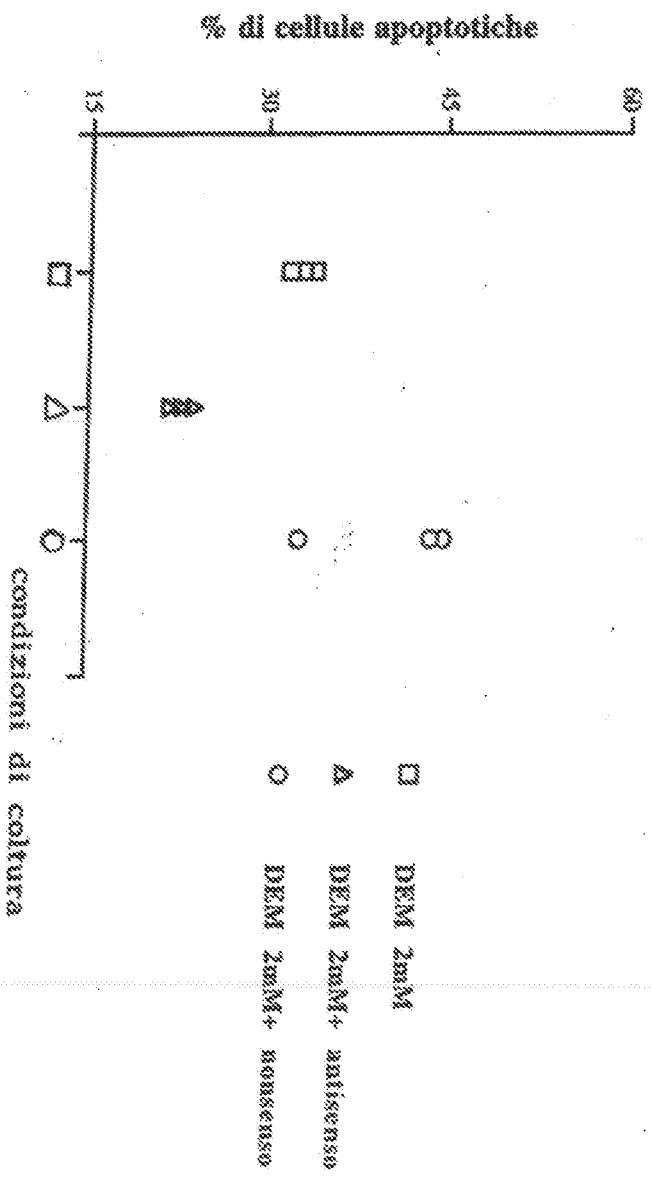
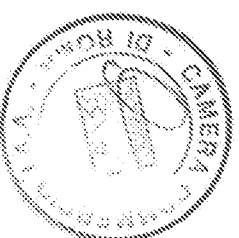


Fig. 6



Manfredi
 NOTAREPARTOLO & GERIASI S.p.A.

2648PT1T

TAV. 7/9

PM2001A000005

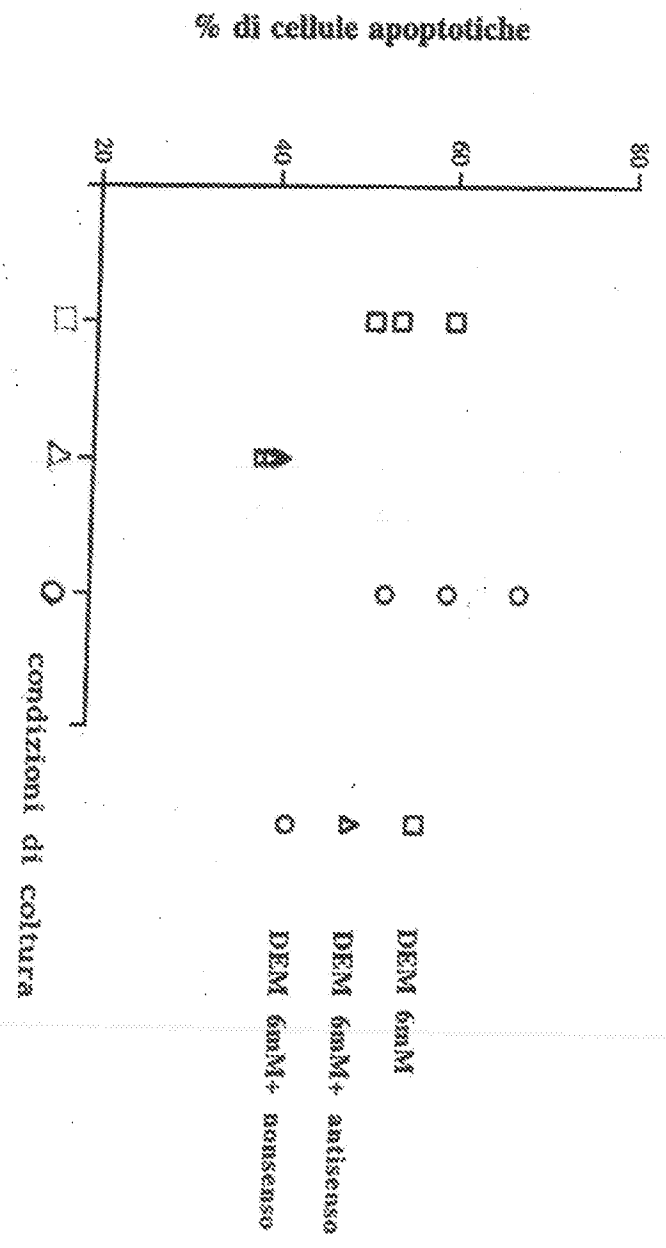
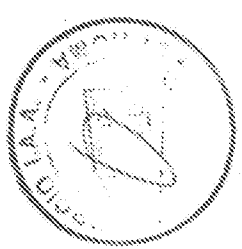


Fig. 7



PM 2001 A 000005

DEM

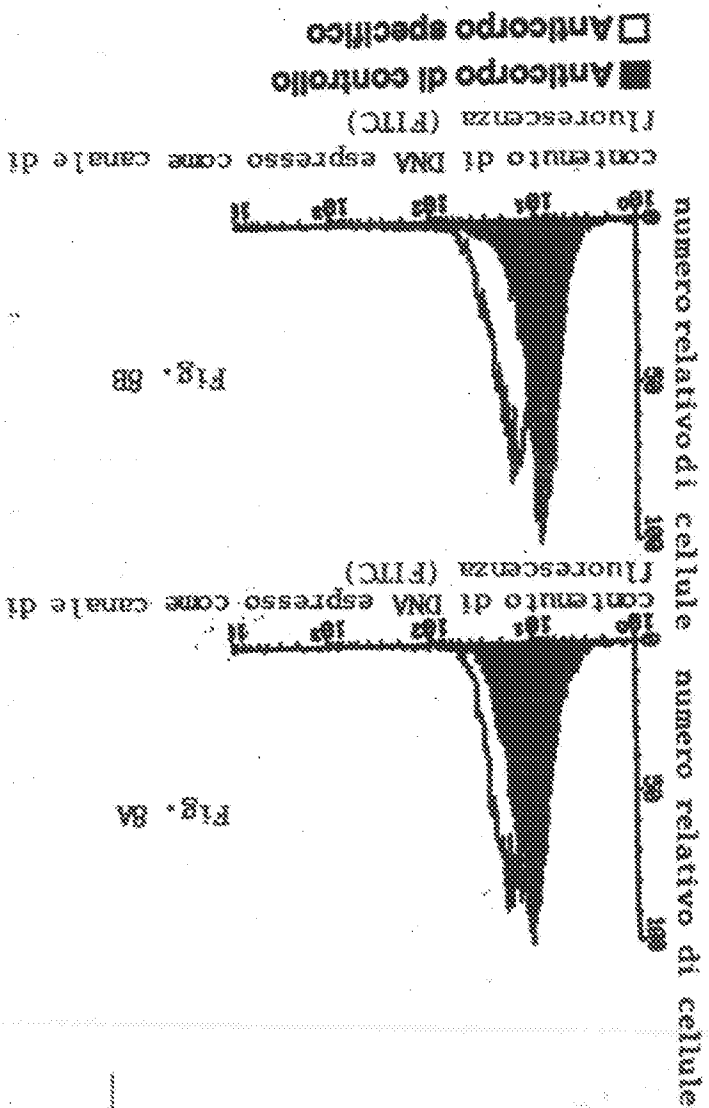
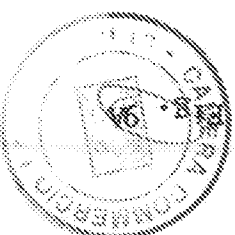
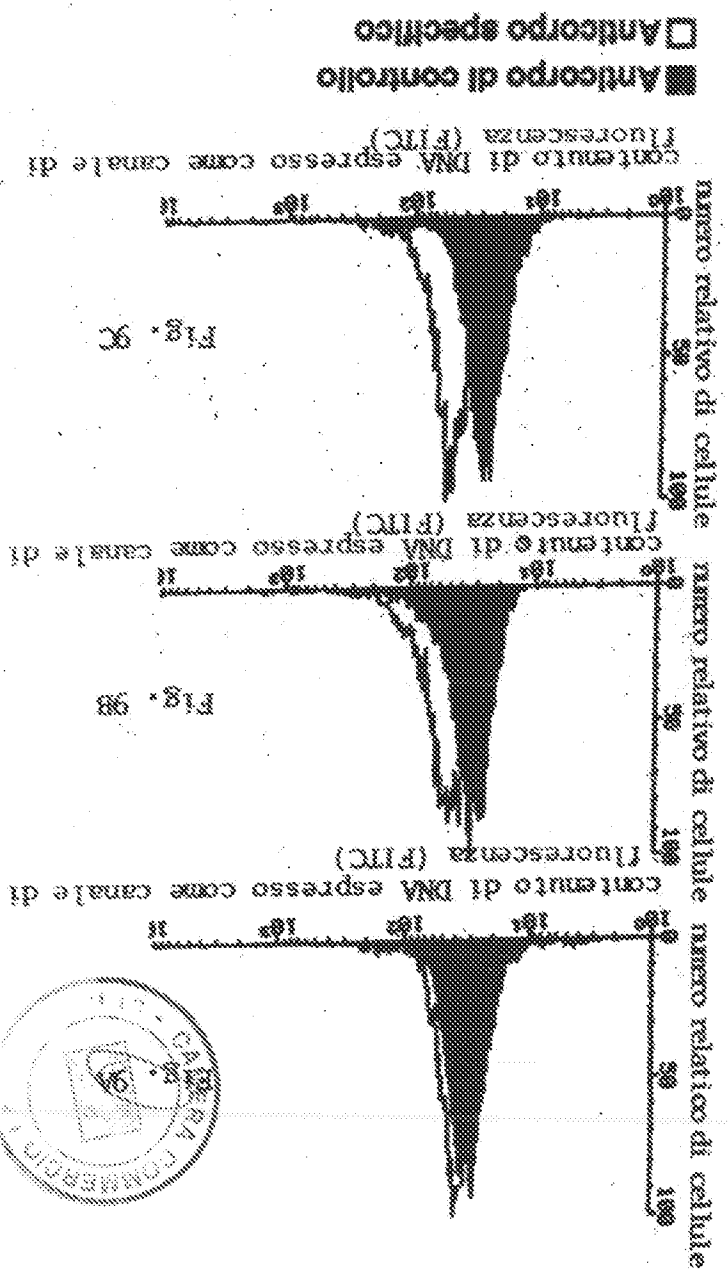


Fig. 8B

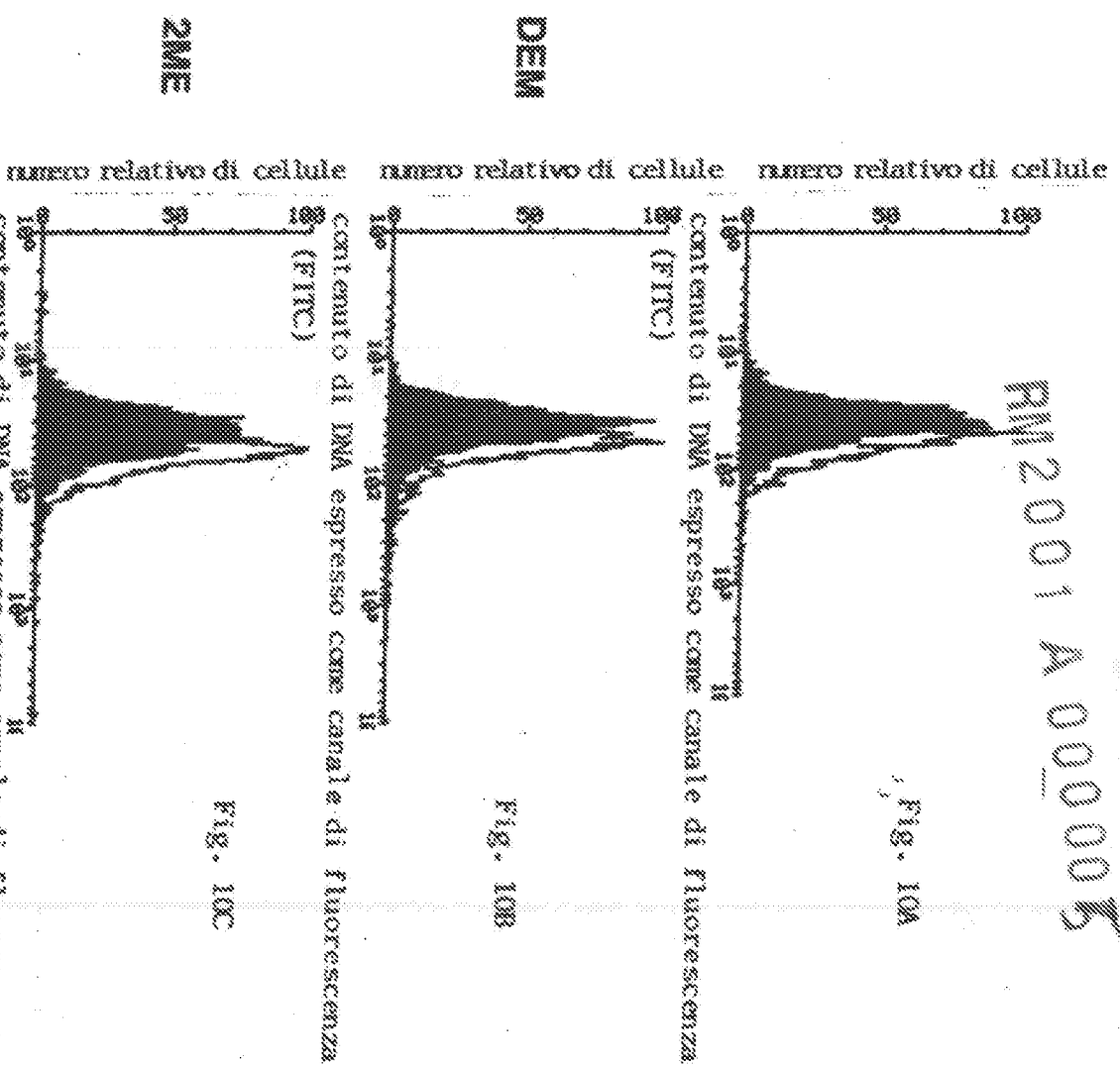
2ME

DEM



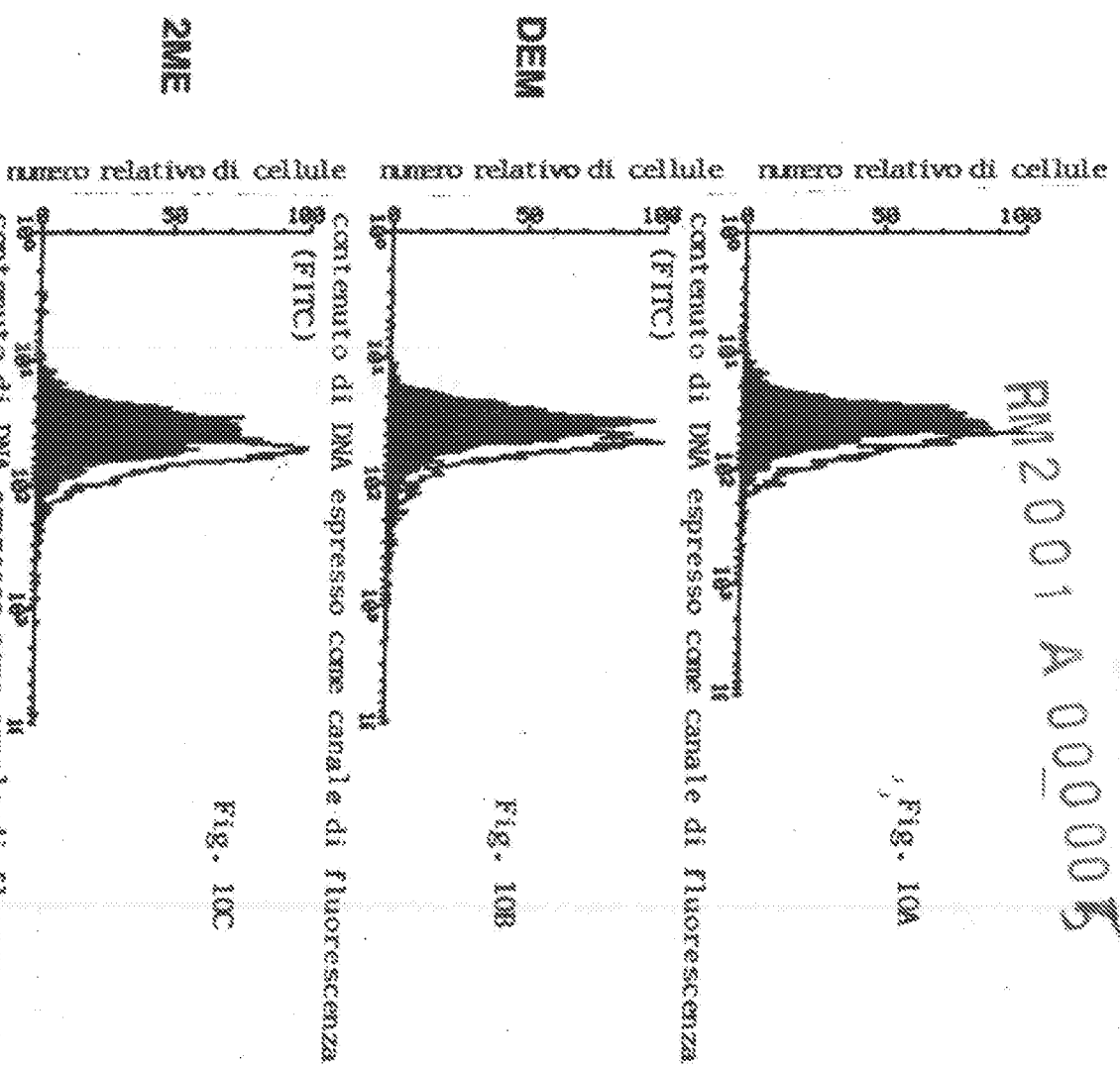
PM 2001 A 000005

Fig. 10A



DEM

Fig. 10B



2ME

Fig. 10C

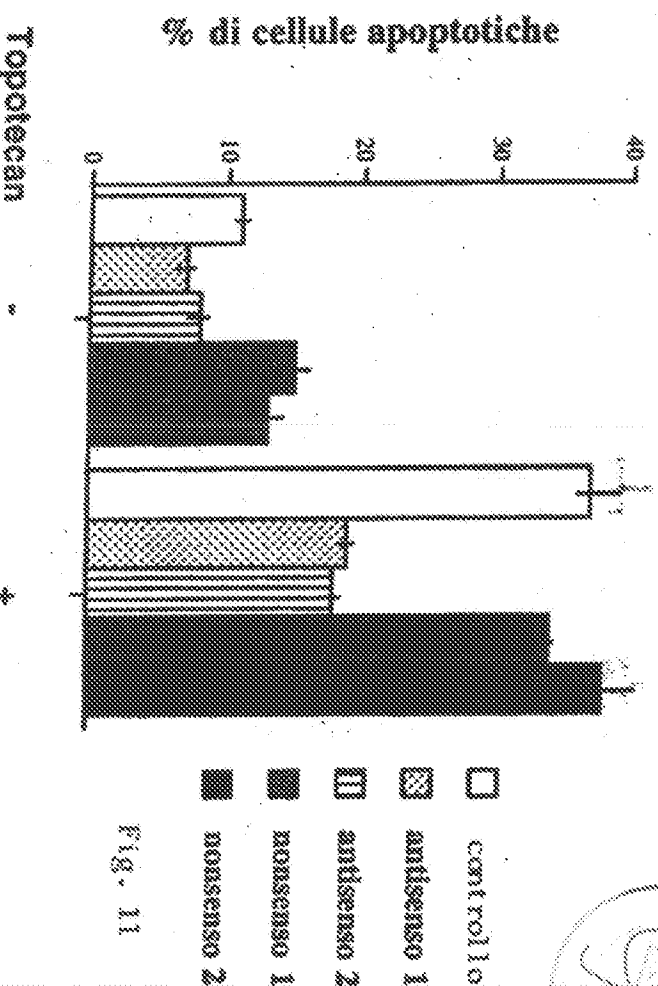
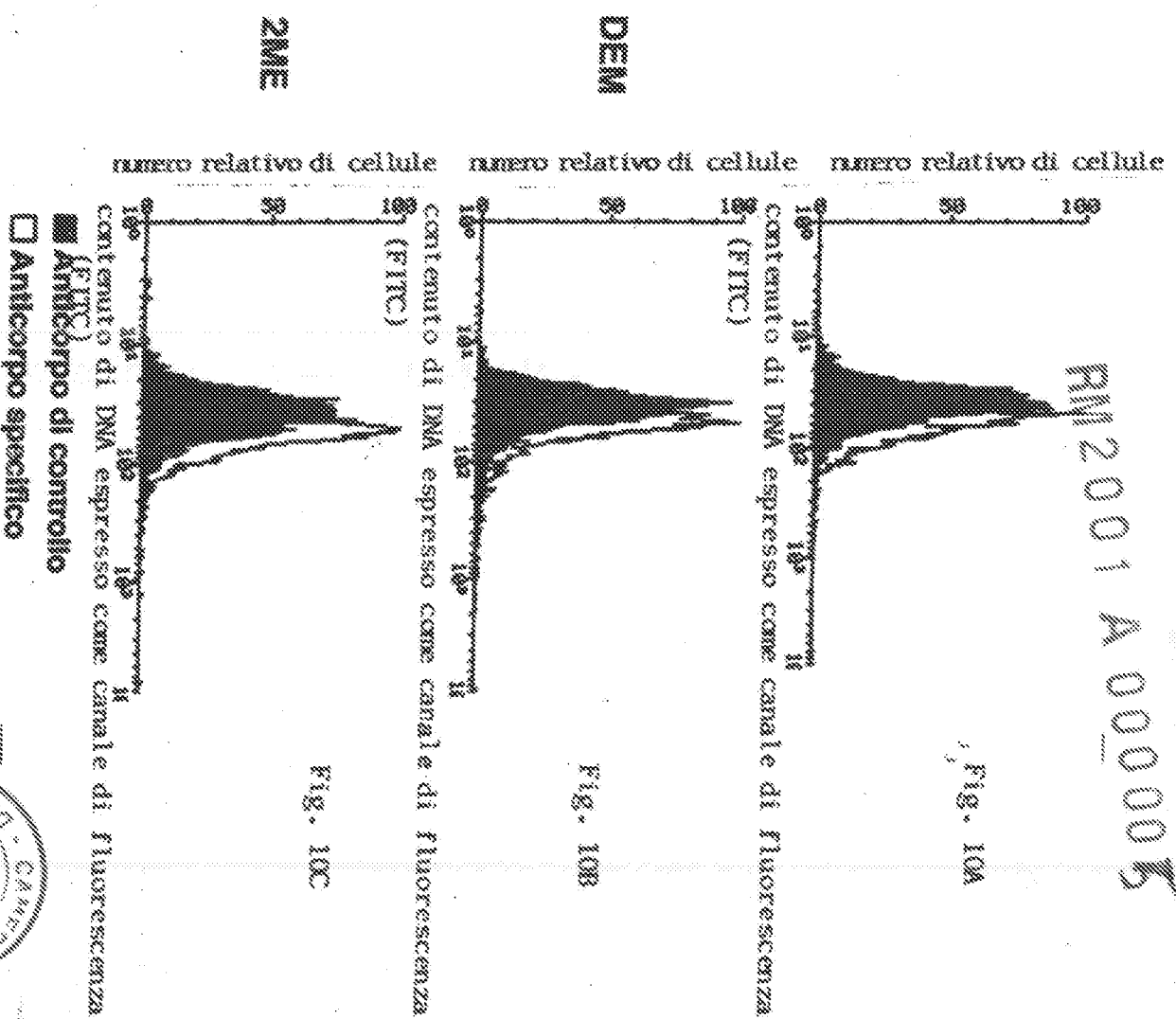


Fig. 11

