



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 00988**

(22) Data de depozit: **18.10.2010**

(41) Data publicării cererii:  
**30.04.2012** BOPI nr. **4/2012**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL DE BIOCHIMIE,**  
*SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,*  
*SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:  
• **MARIN MARIOARA, STR. CERNAVODĂ**  
*NR.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;*

• **GHENEA SIMONA, STR.DUNEI NR.17,**  
*SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*  
• **PETRESCU ȘTEFANA MARIA,**  
*STR.POSTĂVARUL NR.5, BL.C5, SC.7,*  
*ET.4, AP.85, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,*  
*RO*

(54) **ANTICORPI POLICLONALI ANTI-EDEM1**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la anticorpi policlonali anti-EDEM1, destinați diagnosticării stresului celular la nivelul reticulului endoplasmic, prezentând specificitate ridicată față de EDEM1 de șoarece și umană, cu capacitate redusă de interacție cu alte proteine din familia EDEM.

Revendicări: 3  
Figuri: 6

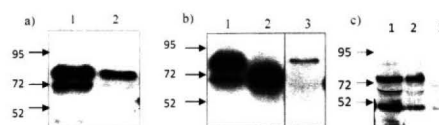


Fig. 5



## Anticorpi policlonali anti-EDEM 1

Invenția se referă la produsul anticorpi policlonali față de proteina EDEM1 (ER-egradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase like protein), destinați identificării proteinei în celule de mamifere în special de om și șoarece.

În afecțiunile neurodegenerative și cele cauzate de stresul reticulului endoplasmic cum ar fi boala Parkinson, sindromul Alzheimer, diabetul de tip 2 și multe altele, modificările majore care au loc la nivel celular sunt legate de: acumularea proteinelor în reticulul endoplasmic și blocarea funcționării normale a celulei în vederea depășirii stării de stres. Acumularea proteinelor în reticulul endoplasmic are loc datorită funcționării defectuoase a mașinării de degradare a proteinelor care asigură îndepărtarea și degradarea proteinelor incorect pliate din reticulul endoplasmic, în acest caz celula nu mai poate funcționa normal și toate procesele celulare normale sunt atenuate.

Dintre componentele mașinării de degradare a proteinelor, proteina EDEM 1 este una din proteinele a caror expresie crescută are ca efect accelerarea degradării proteinelor incorect pliate.

Proteina EDEM1 este o proteina exprimată constitutiv în toate celulele mamaliene și este supraexprimată în condiții de stres. Din punct de vedere structural, EDEM 1 este o glicoproteină care conține un domeniu omolog cu manozidaza, enzimă care hidrolizează resturile de manoză ale glicanilor oligomanozidici. Identificarea acestei proteine este favorizată de recunoașterea specifică prin intermediul anticorpilor policlonali.

Anticorpii policlonali sunt produși de celulele B ca răspuns la patrunderea în organism a unui antigen care declanșează activarea sistemului imun. Acești anticorpi pot fi utilizați într-o gamă largă de tehnici biochimice ca reactiv de diagnostic.

Problema pe care o rezolvă aceasta invenție este obținerea unui produs cu proprietatea de a reacționa ca anticorp cu antigenele de tipul EDEM1.

Avantajele aplicării acestei invenții sunt următoarele:

- Anticorpii descriși în invenție recunosc proteina EDEM1 forma *wild type* cât și mutantele acesteia
- Anticorpii folosiți în invenție pot fi utilizați pentru detecția EDEM1 prin Western blot, imunoprecipitare și imunofluorescență
- Anticorpii descriși în invenție pot fi folosiți în diagnosticul stărilor de stres la nivel celular

Anticorpii, conform invenției pot fi obținuți folosind ca imunogen proteina EDEM1 fără secvența semnal, obținută prin expresie în celule bacteriene și purificare prin cromatografie de afinitate. Pentru obținerea anticorpilor policlonali se pot utiliza metodele convenționale care implică imunizarea animalelor cu proteina recombinantă obținută în bacterii și colectarea serului animalelor imunizate care conține anticorpii de interes.

Anticorpii descriși în aceasta invenție pot fi folosiți pentru detecția proteinei EDEM1 din celule sau extracte celulare ca reactiv de analiză în vederea identificării proteinei în diferite linii celulare. Rezultatele obținute indică o specificitate ridicată a anticorpilor față de proteina EDEM1 supraexprimată, acești anticorpi fiind validați în comparație cu anticorpi comerciali față de secvența HA adăugată la proteina EDEM1 și cu alți anticorpi produși față de proteina EDEM1 descriși în literatură. Anticorpii obținuți pot fi folosiți pentru evidențierea proteinei prin metode biochimice: Western blot, imunoprecipitare, imunofluorescență, cu rezultate mai bune față de anticorpii comerciali.

Anticorpii conform invenției au următoarele proprietăți:

- specificitate înaltă pentru EDEM1, în condiții reductoare și nereductoare;
- capacitate redusă sau absentă de interacție cu celelalte proteine din familia EDEM

Se dau în continuare cinci exemple de realizare a invenției, în legătură și cu figurile 1-6, care reprezintă:

- fig. 1. secvența de nucleotide (secvența 1) și aminoacizi (secvența 2) a proteinei EDEM1;
- fig. 2. secvența de nucleotide a primerilor folosiți pentru clonarea EDEM1 în vectorul pHAT2;

- fig. 3. expresia și purificarea proteinei EDEM1 din bacterii: a) Expresia proteinei EDEM1 în sistem bacterian: 1-standard de masă moleculară, 2-lizat celular neindus cu IPTG (supernatant), 3-lizat celular neindus cu IPTG (sediment), 4-lizat celular indus cu IPTG (supernatant), 5-lizat celular indus cu IPTG (sediment); b) Purificarea proteinei EDEM1: 1-standard de masă moleculară, 2-solubilizarea corpurilor de incluziune, 3-proteina solubilizată legată de rășină, 4-proteina solubilizată nelegată de coloană, 5-eluție 1 a proteinei de pe coloană cu tampon fosfat cu imidazol, 6-eluție 2 a proteinei de pe coloană cu tampon fosfat cu imidazol; c) Randamentul de purificare al proteinei de interes: 1-standard de masă moleculară, 2-EDEM1- proteina purificată prin cromatografie de afinitate, 3-BSA 2mg/ml, 4-BSA 1.5mg/ml, 5-BSA 1mg/ml,

- fig. 4. utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 1 prin Western blotting: a) Verificarea specificității anticorpilor produși comparativ cu anticorpii descriși în literatură: 1, 2-EDEM1 transfectat în celule HEK293T (celule embrionare de rinichi uman) – și respectiv + digestie cu EndoH- WB anticorpi policlonali față de EDEM1; 3,4-aceleași probe ca mai sus- WB anticorpi policlonali Stephen High, descriși anterior în literatură; b) Specificitatea anticorpilor produși folosiți la diferite concentrații în Western blotting: 1,3- lizat celule HEK 293T care supraexprimă EDEM 1; 2,4- lizat celule transfectate cu EDEM 1 digerate cu EndoH- WB  $\alpha$ -EDEM1 diluție 1:700 godeurile 1 și 2, 1:500 godeurile 3,4; c) Verificarea specificității anticorpilor în condiții reductoare și nereductoare și reacția nespecifică între anticorpii produși și proteina EDEM 2: 1-HEK 293T control redus, 2-HEK 293T+EDEM1 redus, 3-HEK 293 T+EDEM1 neredus, 4-HEK 293 T+EDEM 2 redus- WB  $\alpha$ -EDEM1 diluție 1:700.

- fig. 5. Utilizarea anticorpilor pentru imunoprecipitarea proteinei EDEM 1: a) Specificitatea anticorpilor produși comparativ cu anticorpii comerciali: celule HEK 293T transfectate cu EDEM 1: 1-

IP  $\alpha$ -EDEM 1, 2-IP  $\alpha$ -HA; b) verificarea specificității anticorpului atât pentru forma glicozilată a proteinei cât și pentru forma polipeptidului deglicozilată: 1-celule HEK 293T control, 2-HEK 293T transfectate cu EDEM1, 3- digestie cu EndoH pentru proteina supraexprimată- IP EDEM1; c) verificarea specificității anticorpilor in conditii reductoare si nereductoare si reactia nespecifica intre anticorpii produsi si proteina EDEM 2: 1. HEK 293T+EDEM 1 redus, 2. HEK 293 T+EDEM 1 neredus, 3. HEK 293 T+EDEM 2 redus

-fig. 6. utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 1 prin imunofluorescență.

### **Exemplul 1. Clonarea proteinei EDEM 1 recombinante**

Pentru expresia proteinei de interes în sistem bacterian secvența ADN-ului complementar (secvența 1, Fig. 1) care codifică EDEM1 (secvența 2, Fig. 1) a fost clonată în vectorul de expresie pHAT-2. Acest lucru s-a realizat trecând printr-o etapă intermediară de subclonare în vectorul pGEM-T easy. Astfel, ADN-ul complementar de EDEM1 a fost amplificat prin PCR folosind Taq ADN polimeraza și primeri specifici (oIB-47 și oIB-48) cărora li s-au adăugat la capatul 5'-terminal situsurile de recunoaștere ale enzimelor de restricție *NcoI* și respectiv, *SphI* (Fig. 2). Sub-clonarea în vectorul pGEM-T easy s-a realizat folosind kitul pGEM-T Easy Vector System urmând instrucțiunile din manualul de utilizare. În etapa următoare, plasmidul pGEM-T recombinant a fost supus unor digestii secvențiale cu enzimele de restricție *NcoI* și *NotI*, iar insertul, reprezentând ADN-ul de EDEM1 a fost introdus printr-o reacție de ligare catalizată de enzima T4 DNA ligaza în vectorul pHAT-2 liniarizat cu enzimele *NcoI* și *NotI*. Verificarea eficienței clonării și a integrității ADN-ului complementar a fost realizată prin secvențierea întregului insert din plasmidul pHAT-2 recombinant.

### **Exemplul 2. Obținerea proteinei recombinante**

Pentru obținerea proteinei recombinante, celulele bacteriene *E. coli* tulpina BL21 (DE3) RIL, au fost transformate astfel încât să exprime în cantitate mare proteina recombinantă. Am utilizat tulpina de celule BL21 (DE3) RIL deoarece acestea conțin ARN de transfer pentru aminoacizi rari, iar proteina EDEM1 conține un procent ridicat de aminoacizi rari. ADN-ul recombinant a fost introdus în celule prin permeabilizarea peretelui celular cu clorura de calciu și apoi au fost crescute în mediu de cultura lichid pentru multiplicare suplimentat cu antibioticul de selecție, în acest caz ampicilina. Pentru a obține o cultură cât mai omogenă care conține preponderent bacterii care au încorporat plasmidul de interes, creșterea celulelor se face în mediu de cultură cu antibiotic. Expresia proteinei a fost indusă la o densitate optică la 600 nm a celulelor bacteriene de 0.6-0.8 prin adăugarea de isopropil- $\alpha$ -beta D tiogalactopiranozidă (IPTG), urmată de creșterea celulelor la temperaturi de 20-25°C timp de 3-6 ore. IPTG-ul se leagă la represorul operonului *lac* și astfel induce expresia genelor reglate de operonul *lac*, în acest caz proteina EDEM1 în vectorul pHAT 2 care conține operonul *lac*.

Celulele care exprimă proteina EDEM1 (celule induse) cât și celulele control, crescute în aceleași condiții, dar fără adaos de IPTG (celule neinduse), au fost centrifugate. Sedimentul obținut a fost supus lizei prin sonicare în tampon fosfat suplimentat cu DN-ază (0,05 mg/ml). RN-ază



18-09-2010

mg/ml), lizozim (1mg/mL) și cocktail de inhibitori de proteaze fără EDTA, pe gheață, pentru a evita degradarea proteinei. Tamponul de liză a fost ales astfel încât să nu interfereze în etapa de legare a proteinei pe coloană. Supernatantul și sedimentul obținute în urma centrifugării lizatului celular au fost separate prin electroforeza SDS-PAGE, și a fost stabilită localizarea exclusivă a proteinei EDEM1 în corpii de incluziune. Solubilizarea proteinei din corpii de incluziune a fost făcută cu tampon fosfat la care a fost adăugată uree în concentrație finală 6-8 M. (Figura 3 a,b)

În etapa de clonare, proteinei de interes i s-a atașat un motiv de 6 histidine (His-tag) care prezintă afinitate micromolară pentru ioni de nichel sau cobalt. Pe baza acestei proprietăți pentru purificarea proteinei recombinante care include secvența de 6 histidine s-a folosit rașina cu nichel. Proteina recombinantă a fost purificată prin cromatografie de afinitate pe coloana Ni-NTA (Ni-nitroacetic acid), acidul nitracetic având 4 situsuri de legare a ionilor metalici, este atașat covalent de suportul solid și are rol de chelator pentru ionii de nichel. Legarea proteinei pe coloana s-a efectuat la 4°C, timp de 1-3 h, după care proteinele legate nespecific au fost îndepărtate prin spălare cu tampon de liză. Eluția proteinei de interes a fost făcută cu tampon de liză suplimentat cu imidazol 100-300mM. Proteina purificată a fost vizualizată prin colorare cu Comassie-Blue în gel de poliacrilamidă în paralel cu o proteină standard în concentrație cunoscută. (Fig 3 c)

### **Exemplul 3: Obținerea anticorpilor anti-EDEM 1**

Pentru producerea anticorpilor față de proteina EDEM 1, proteina purificată a fost injectată la iepure împreună cu adjuvant Freud raport 1:1 (v/v). Pentru imunizare a fost injectată o cantitate de 250-1000 μg proteină, la interval de 2-4 săptămâni. Am testat specificitatea de recunoaștere a anticorpilor prin WB pentru proteina endogenă și recombinantă exprimată în celule mamaliene. După obținerea unor anticorpi care recunosc proteina recombinantă au fost recoltați câte 5-7ml de ser de la iepure după fiecare imunizare. În continuare serul obținut a fost folosit pentru a testa anticorpul prin diferite metode.

### **Exemplul 4: Utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 1 prin Western blot**

Pentru a determina specificitatea anticorpilor am efectuat un experiment de Western blot în care a fost verificată specificitatea anticorpilor pentru proteina EDEM 1 recombinantă exprimată în celule mamaliene. Celulele HEK 293T, au fost transfectate pentru a exprima tranzient proteina EDEM 1 și la 24 de ore după transfecție au fost folosite pentru experiment. Lizatele celulare au fost separate prin SDS-PAGE și proteinele au fost transferate pe membrană de nitroceluloză și în continuare au fost probate cu anticorpul descriși în invenție. Drept control pentru anticorpul obținut am folosit un lot de anticorpi primit cadou de la Stephen High, descriși anterior în literatură. În figura a,b, se poate observa că anticorpul produs recunosc proteina EDEM1 în probele menționate mai



la diferite diluții ale anticorpilor. Prin digestie cu EndoH, enzimă care taie glicanii atașați proteinelor în compartimentul RE, se observă că proteina recunoscută de anticorpi este complet sensibilă la EndoH, deci este o proteină rezidentă în reticulul endoplasmic care nu achiziționează structuri complexe caracteristice pentru aparatul Golgi.

Deoarece proteinele EDEM prezintă un domeniu extins de omologie am efectuat un experiment pentru a determina reacția nespecifică a anticorpilor obținuți cu proteina EDEM2. Am migrat în gel de poliacrilamidă lizatele celulelor care exprimă endogen sau supraexprimă proteina EDEM2 sau proteina EDEM1. Membranele au fost imunoblotate cu anticorpii policlonali pentru proteina EDEM1. Se observă că anticorpii policlonali recunosc specific proteina EDEM1, atât în condiții reducătoare (+DTT-ditiotreitol) cât și nereducătoare (-DTT) și nu reacționează nespecific cu proteina EDEM2. (Figura 4 c)

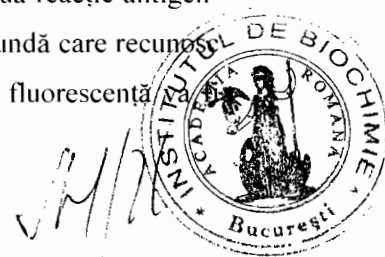
**Exemplul 5:** *Imunoprecipitarea proteinei EDEM1 din celule mamaliene utilizând anticorpii policlonali obținuți*

Tehnica de marcarea metabolică a proteinelor este folosită pentru studierea biosintezei, procesării și degradării acestor proteine în celule. Proteinele marcate sunt recunoscute de anticorpi care interacționează specific cu proteina A cuplată pe rașina de sefaroză. Pe baza acestor reacții specifice proteinele de interes pot fi separate din lizate celulare totale. Astfel pentru testarea specificității anticorpilor policlonali anti-EDEM1, celulele au fost însămânțate și apoi au fost sau nu transfectate cu ADN-ul plasmidial ce codifică pentru proteina EDEM1 recombinantă. La 24 de ore de la transfecție celulele au fost marcate folosind o soluție de aminoacizi cu sulf radioactiv ce sunt încorporați în proteinele nou sintetizate. După marcarea celulele au fost spalate cu PBS și apoi lizate pe gheață timp de 30 de minute.

Lizatele celulare au fost imunoprecipitate folosind anticorpii obținuți care leaga specific proteina de interes, iar complexe antigen anticorp au fost precipitate pe rașină cuplată cu proteina A. Se observă din figura 5 că anticorpii recunosc specific proteina EDEM1 transfectată și proteina endogenă în celulele HEK293T, în condiții reducătoare.

**Exemplul 6:** *Identificarea proteinei EDEM1 prin imunofluorescență folosind anticorpii policlonali anti-EDEM1*

Prin imunofluorescență se poate determina localizarea intracelulară a proteinelor utilizând anticorpi specifici pentru proteina respectivă în paralel cu o proteina marker pentru un anumit compartiment celular. Pentru a identifica fluorescent aceste proteine se aplică a doua reacție antigen-anticorp. Sunt utilizați anticorpi cuplați cu fluorofori ce emit la diferite lungimi de undă care recunosc specific anticorpii primari ce s-au cuplat cu proteina de interes. Astfel emisie de fluorescență



detectată doar în zonele unde sunt exprimate proteinele folosite pentru colocalizare și de care s-au legat specific anticorpilor.

Pentru a determina specificitatea anticorpilor policlonali pentru proteina EDEM1 am utilizat pentru experiment doua linii celulare. A375, linie de melanom uman nepigmentat si HEK 293T, linie de celule embrionare de rinichi uman. Celulele au fost însămânțate și crescute 24 de ore pe lamele de sticlă, după care au fost sau nu transfectate cu ADN plasmidial să exprime proteina recombinantă. Celulele au fost menținute în prezența amestecului de transfecție timp de 24 de ore, apoi au fost fixate cu paraformaldehida 4% (PFA) și în continuare prelucrate pentru experimentul de fluorescență. Pentru a determina localizarea intracelulară a proteinei EDEM1 am efectuat un experiment de colocalizare cu doi markeri pentru compartimentele reticul endoplasmic și lizozom.

Din experimentele de imunofluorescență se poate observa ca anticorpilor policlonali obținuți de noi recunosc cu mare specificitate proteina recombinantă supraexprimată în celule HEK 293T și A375. Anticorpilor obținuți recunosc de asemenea și proteina exprimată endogen, dar cu specificitate mai mică. Localizarea intracelulară a proteinei este preponderent perinucleară și colocalizează cu markerul de reticul endoplasmic calnexina și colocalizează parțial cu proteina Lamp2, un marker pentru lizozom. (Figura 6)



Handwritten signature or initials.

### Revendicări

1. Anticorpi policlonali anti EDEM1 caracterizați prin aceea că au specificitate față de regiunea EDEM2 cu secvența de aminoacizi din figura 1, secvența numărul 2.
2. Anticorpi policlonali anti EDEM1 conform revendicării 1, caracterizați prin aceea că se utilizează pentru diagnosticul stării de stres la nivel celular.
3. Anticorpi policlonali anti EDEM1 conform revendicării 1, caracterizați prin aceea că se utilizează pentru identificarea EDEM1 uman și de șoarece.





FIGURA 1, secv. nr. 1

```

1      atgcaatggc gagcgttgr cctggggctg gtgctgctgc gcctcggcct ccacgcggtg
61     ctctgggttg tottcgggct ggggcccagc atgggcttct acccagcgggt tccgctcagc
121    ttccgcttcc agcgtttgag ggacccccag ggtcgggggc cagttgggtcc gccccggaggc
181    ccggccttgc ttcctcggcc aaggcgcgga accggaggggc ggcttgagac cccgccagag
241    ccgggaccga ccgcgggacg gggcgtgtgc ggcccggcgc actggggcta tgccttgggc
301    ggcggtggct gggcccggga ccagtaocgag ccggcgtaca gcggcgcctt cccgcgcgag
361    ctgctgcccc agatgcgcga cctggcgcgg ggcatgttcg tottcggcta tgacaactac
421    atgggcacag cctttccgca ggacgagctc aaccocatct actgcgcggg ccgggggctt
481    gaccgcggag acccttccaa tctgaacatc aatgatgtcc tagggaatta ctctctgact
541    ctgggtgatg ccttgatata attggcaata atgggaaatt catccaggtt ccagaaggca
601    gtcaagttag tgatcaacac tgtttcattt gacaaagatt ccacagtcca ggtcttcgaa
661    gctacgataa gggttctggg aagcctcctt totgctcaca gaataataac tgattccaaa
721    cagccctttg gtgacatgac aattgaggat tatgataatg aattgttgta catggcccat
781    gacttggctg tgcggctcct tccagccttt gaaaacacca agacagggat cccctatcct
841    ccgggtgaatc tgaagacagg tgttctctct gacagcaata atgagacctg cacagcgggg
901    gccggttctc tccgtgtgga atttgggatt ctgagccgac tgcctggggga ttcactttt
961    gagtgggttg ccagacgagc tgtgaaagcc ctctggaact tgcggagcaa cgatacagga
1021   ttattaggca atgtttgtaa catccagaca ggcattggg ttggaaagca gagtggcttg
1081   ggtgctgggc tggattcctt ctatgagtac ctcttgaat ctacattct ttttggagaa
1141   aaagaagatc tagagatgtt taatgctggg taccagagca tccagagcta cctgcgaaga
1201   ggcggggaag cctgcaatga aggagaagga gaccaccgc tctacgtcaa cgtgaacatg
1261   ttcagtgggc agctcatgaa cacttgattt gactcctgct aggttttctt ccttggaactg
1321   caggttctga taggggatg ggaagatgct atctgctac acccttcta ctatgcata
1381   tggaaagcgt accgggccc cctgagcgc tataactgga aactccagc cctgatgtt
1441   ctctctacc ctctgagac agagctagt gactccat atctctcta ccaggcaacc
1501   aagaatcctt tctacctca tgtaggaatg gacattctgc agagtctga aaaatacaca
1561   aaagtcaaat gtggatagc tacgctgcat caagtcatag acaagtctaa agaagaccg
1621   atggaaagct tctttctcag ccgagacttc aaataactgt atctgctatt tgatgaagag
1681   aatccagtac acaaactctg aaccagatac atgtttaca ctgagggcca taccatctt
1741   ggggacaaac gtcttcggga attgccttgg aaggattctt tctctgaaga tggggagcgg
1801   gaccaagagg aaaagtctg acacagacct aagtctcagg agctcagagt cattaactcc
1861   agttctaatt gtaatcgtg tctgatgag aggagatact ccttgcctt aaagagcatc
1921   tacatgcgcc agatcgacca gatggttggc ttgatttga
  
```

secv. nr. 2

10	20	30	40	50	60
MQWRALVLGL	VLLRLGLHAV	LWLVFGLGPS	MGFYQRFPLS	FGFQRLRDPD	GSGPVGPPGG
70	80	90	100	110	120
PAWLHRPRRG	TEGRLETPPE	PGPTPGPGVC	GPAHWGYALG	GGGCGPDEYE	RRYSGAFPQ
130	140	150	160	170	180
LRAQMRDLAR	GMFVFGYDNY	MAHAFFQDEL	NPIYCRGRGP	DRGDPSNLNI	NDVLGNYSLT
190	200	210	220	230	240
LVDALDTLAI	MGNSSEFQKA	VKLVINVSF	DKDSTVQVFE	ATIRVLGSLI	SAHRIITDSK
250	260	270	280	290	300
QPFQDMTIED	YDNELLYMAH	DLAVRLLPAF	ENTKTGIPYP	RVNLKTGVPP	DSNNETCTAG
310	320	330	340	350	360
AGSLLVEFGI	LSRLLGDSTF	EWVARRAVKA	LWNLRSNDTG	LLGNVNIQT	GHWVGKQSGI
370	380	390	400	410	420
GAGLDSFYEY	LLKSYILFGE	KEDLEMFNAA	YQSIQSYLRR	GREACNEGEG	DPPLYVNVNM
430	440	450	460	470	480
FSGQLMNIWI	DSLQAFFPGL	QVLIGDVEDA	ICLHAFYYAI	WKRYGALPER	YNWQLQAPDV
490	500	510	520	530	540
LFYPLRPELV	ESTYLLYQAT	KNPFYLVHGM	DILQSLEKYT	KVKCGYATLH	HVIDKSKEDR
550	560	570	580	590	600
MESFFLSETC	KYLYLLFDEE	NPVHKSQTRY	MFTTEGHIIS	VDKRLREL PW	KEFFSEDGER
610	620	630	640	650	
DQEEKFVHRP	KSQELRVINS	SSNCRVPDE	RRYSLPLKSI	YMRQIDQVMG	LI



FIGURA 2

Ser.s: 5'-GATTCCATGGGCTTCGGCTTCCAGCGCTTGAG (NcoI)  
Antisens: 5'-GATTGCATGCTCAAATCAAGCCAACCATCTGGTCTG (SphI)

FIGURA 3

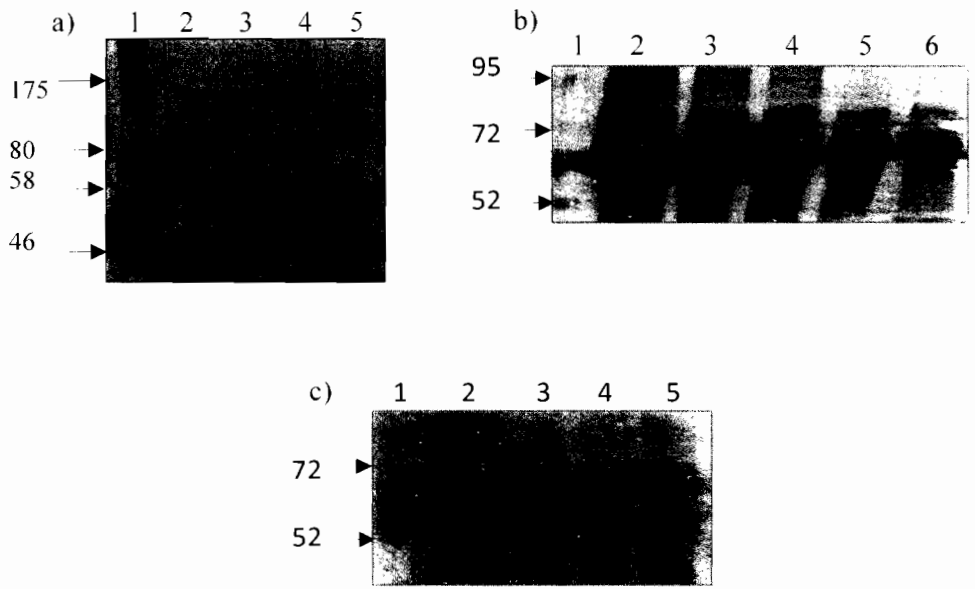


FIGURA 4

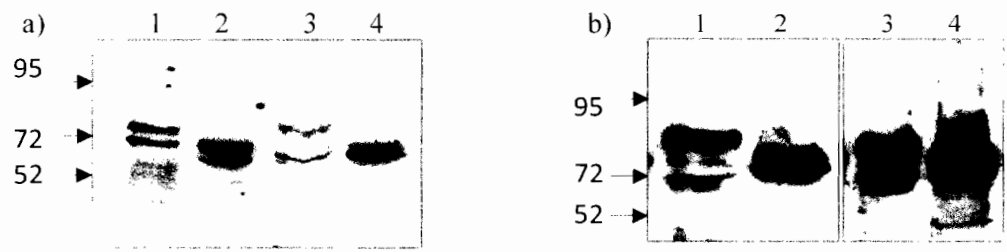
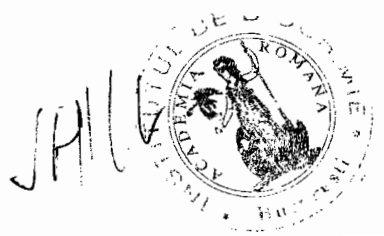
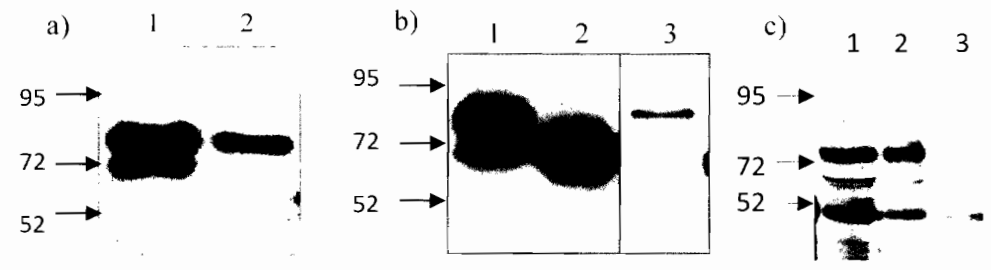


FIGURA 5



18-09-2010

FIGURA 6

**Celule HEK 293T control**

Celule HEK 293T control. colocalizare EDEM 1 endogen cu CNX



Celule HEK 293T control. colocalizare EDEM1 endogen cu Lamp2



**Celule HEK 293T transfectate cu EDEM 1**

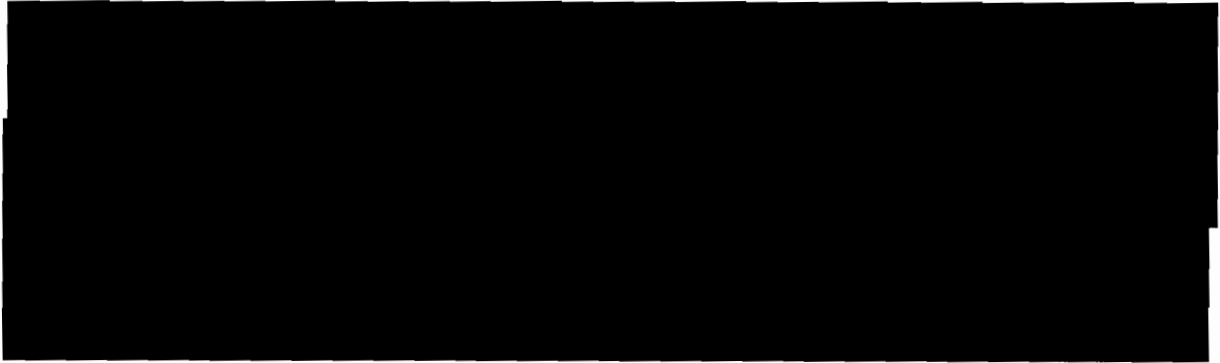
Celule HEK 293T transfectate cu EDEM 1 colocalizare cu CNX



Celule HEK 293T transfectate cu EDEM 1 colocalizare cu Lamp2

**Celule A375 control**

Celule A375 control, colocalizare EDEM 1 endogen cu CNX



Celule A375 control, colocalizare EDEM1 endogen cu Lamp2



**Celule A375 transfectate cu EDEM 1**

Celule A375 transfectate cu EDEM 1 colocalizare cu CNX



Celule A375 transfectate cu EDEM 1 colocalizare cu Lamp 2

