



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 00989**

(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:
• **CHIRÎTOIU GABRIELA,**
STR. CĂRNAVODĂ 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-EDEM2**

(57) Rezumat:

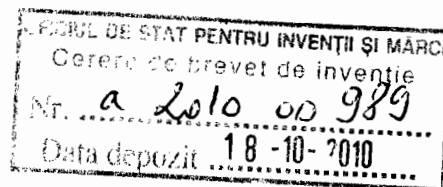
Prezenta invenție se referă la anticorpi policlonali anti-EDEM2, destinați diagnosticării stresului celular la nivelul reticulului endoplasmic, prezentând specificitate ridicată față de EDEM2 umană și capacitate redusă de

interacție cu alte proteină din familia EDEM.

Revendicări: 3

Figuri: 6





Anticorpi policonali anti-EDEM 2

Invenția se referă la anticorpi policonali față de proteina EDEM2 umană, utilizați pentru identificarea proteinei în celule de mamifere, în special celule umane.

În celulele de mamifere proteinele secretorii și membranare încorsetate din lumenul reticulului endoplasmic duc la generarea unei stări permanente de stres care declanșează o serie de evenimente ce au ca finalitate moartea celulei. Sunt exportate în calea secretorie doar proteinele corect pliate, iar cele nepliate sau încorsetate suferă un proces de repliere asistat de chaperonele rezidente în reticulul endoplasmic. Dacă proteinele nu reușesc să adopte conformația corectă acestea sunt retrotranslocate în citoplasmă unde sunt degradate de proteazom. Calea prin care proteinele sunt exportate din reticulul endoplasmic este o cale dependentă de ubiquitină cunoscută sub numele de degradare asociată reticulului endoplasmic (ERAD-ER associated degradation pathway).

Importanța studierii căii de degradare a proteinelor și mecanismul prin care componentele reticulului endoplasmic discriminează între proteinele corect și respectiv încorsetate este subliniată de numeroasele boli corelate cu stresul asociat reticulului endoplasmic cum sunt: diabetul, boala Alzheimer, boala Parkinson, boala Huntington și bolile bazate pe prion.

EDEM2 este o proteină implicată în procesul de degradare asociată reticulului endoplasmic care ajută la menținerea echilibrului dintre degradarea și plierea proteinelor. Această proteină prezintă 4 situsuri potențiale de glicozilare, nu prezintă activitate enzimatică și este o proteină solubilă rezidentă în reticulul endoplasmic.

Anticorpii descriși în această invenție pot fi folosiți pentru detectarea proteinei EDEM2 în celule de mamifere sau extracte celulare ca reactivi de analiză în diferite metode biochimice. În urma analizării rezultatelor s-a constatat că anticorpii produși recunosc specific proteina EDEM2, iar pentru validarea rezultatelor au fost utilizați în paralel anticorpii comerciali anti-EDEM2. Experimental s-a demonstrat că anticorpii policonali produși de noi au o specificitate mult mai mare pentru proteina EDEM2 decât anticorpii comerciali.



1

Problema pe care o rezolvă invenția de față este deținerea unui produs cu proprietatea de a reacționa ca anticorp cu antigene de tipul EDEM2. Anticorpul pot fi obținuți folosind ca imunogen proteina EDEM2 umană fără secvența semnal care conține epitopii necesari recunoașterii proteinei EDEM2. ADN-ul corepunzător proteinei EDEM2 poate fi introdus într-un vector de expresie pentru celule bacteriene, proteina poate fi exprimată și purificată, iar pentru obținerea anticorpilor se pot folosi metodele clasice de imunizare a animalelor cu proteina recombinantă și recuperarea anticorpilor din serul animalelor imunizate.

Anticorpul, conform invenției au următoarele proprietăți:

- specificitate ridicată pentru proteina EDEM2 în condiții reductoare și nereductoare

- nu reacționează nespecific cu celelalte proteine din familia EDEM

Avantajele aplicării acestei invenții sunt următoarele:

1. anticorpul descriși în invenție recunosc proteina EDEM2 forma *wild type*
2. anticorpul descriși în invenție pot fi folosiți pentru detecția EDEM2 prin Western blot, imunoprecipitare și imunofluorescență
3. anticorpul descriși în invenție pot fi folosiți în diagnosticul stării de stres la nivel celular

Se dau, în continuare, 6 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 EDEM2

- fig. 2, secvența de nucleotide a primerilor folosiți pentru clonarea EDEM2 în vectorul pHAT2

- fig. 3, expresia și purificarea proteinei EDEM2 din bacterii a) Expresia proteinei EDEM2 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 EDEM2: 1-standard de masă moleculară, 2-solubilizarea proteinei din corpii de incluziune, 3-proteina solubilizată legată de rășină, 4-proteina solubilizată nelegată de rășină, 5-cantitatea de proteină eluată de pe rășină în urma spălării efectuată pentru



[Handwritten signature]

îndepărtarea proteinelor legate nespecific, 6-eluția proteinei de pe rășină cu tampon fosfat cu imidazol, c) Randamentul de purificare și puritatea proteinei EDEM2 din bacterii: 1-standard de masă moleculară, 2,3-EDEM2, proteina purificată prin cromatografie de afinitate, 4-BSA 1.5mg/ml, 5-BSA 1mg/ml, 6-BSA 0.75mg/ml, 7-0.5mg/mL.

- fig. 4, utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 2 prin Western blotting: a) Verificarea specificității anticorpilor produși la diferite concentrații comparativ cu anticorpii comerciali: 1, 2- EDEM2 transfectat în celule HEK293T -, + EndoH - blotare cu anticorpi policlonali față de EDEM2 diluție 1:500; 3,4- EDEM2 transfectat în celulele HEK293T -, + EndoH - blotare cu anticorpi policlonali față de EDEM2 diluție 1:200; 5,6-EDEM2 transfectat în celule HEK293T -, + EndoH-blotare cu anticorpi comerciali față de EDEM2 diluție 1:200, b) Verificarea specificității anticorpilor în condiții reducătoare și nereducătoare și reacția nespecifică între anticorpii produși și proteina EDEM1: 1-HEK293T control redus, 2-HEK293T+EDEM2 redus, 3-HEK293T+EDEM2 neredus, 4-HEK293T+EDEM1 redus- blotare cu anticorp policlonal anti EDEM2 1:500.

- fig. 5, Utilizarea anticorpilor pentru imunoprecipitarea proteinei EDEM2; specificitatea anticorpilor produși comparativ cu anticorpii comerciali: 1,2- EDEM2 supraexprimat în celulele HEK293T -, + digestie cu EndoH - imunoprecipitare cu anticorpii comerciali; 3,4- EDEM2 supraexprimat în celulele HEK293T -, + EndoH- imunoprecipitare cu anticorpii policlonali descriși în invenție.

- fig. 6, utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM2 prin imunofluorescență.

Exemplul 1: Clonarea proteinei EDEM 2 recombinante

Obținerea antigenului necesar producerii anticorpilor policlonali anti-EDEM2 uman a fost realizată în sistem bacterian. Pentru aceasta, ADN-ul complementar al proteinei de interes ce prezintă potențial antigenic (EDEM2 uman, secvența 1 și 2, Fig.1) a fost clonat în vectorul de expresie bacterian pHAT-2 care conține promotorul inductibil T7 și un TAG de 6 histidine repetate în tandem la capatul N-terminal într-o primă etapă,



ADN-ul complementar a fost amplificat prin PCR folosind Taq ADN polimeraza și primeri specifici cărora li s-au adăugat la capătul 5'-terminal situsurile de recunoaștere ale enzimelor de restricție *Sall* și respectiv, *HindIII* (Fig. 2).

Atât produsul de PCR cât și vectorul au fost supuși digestiei secvențiale cu enzimele de restricție *Sall* și *HindIII*, urmată de o nouă purificare folosind kitul DNA Gel extraction. Clonarea insertului în vector a fost realizată printr-o reacție de ligare catalizată de T4 DNA ligaza, urmată de transformare în bacteriile *E. coli* DH5α. Întregul insert a fost secvențiat pentru verificarea eficienței clonării și a fidelității reacției de PCR.

Exemplul 2: Obținerea proteinei recombinante

ADN-ul recombinant a fost introdus în tulpina bacteriană de *E. Coli* BL21(DE3)RIL pentru a exprima proteina EDEM2 prin transformare chimică pe bază de CaCl_2 . Ionii Ca^{2+} permeabilizează peretele celular, asigură legarea ADN-ului de membrana celulară și neutralizează sarcina negativă a ADN-ului. Încorporarea ADN-ului în celulele permeabilizate este realizată printr-un curent termic produs prin șoc termic la 42°C.

Celulele competente BL21(DE3)RIL transformate pentru a exprima proteina EDEM 2 au fost folosite deoarece acestea exprimă la nivel înalt proteinele care utilizează promoterul T7 ARN polimerazei și conțin ARN-ul de transfer pentru codonii rari: arginină (R), izoleucină (I) și leucină (L), care ajută la expresia proteinelor care sunt codificate de secvențe genomice bogate în GC, în această categorie fiind inclusă și proteina EDEM2.

Celulele care au încorporat plasmidul care codifică pentru proteina EDEM2 și care exprimă gena de rezistență la antibiotic au fost selectate în mediu agar cu antibiotic și cultivate pentru expansiune în mediu de cultură lichid cu adaos de antibiotic.

Expresia proteinei a fost indusă cu isopropil-β-D-tiogalactopiranozidă (IPTG), analog de lactoză ce induce activarea operonului *lac* și respectiv induce expresia proteinei EDEM2. Bacteriile au fost cultivate până la o densitate optică la 600 nm de 0.5-0.8, apoi expresia proteinei a fost indusă cu IPTG și celulele au fost crescute la 25-30°C timp de 14-16 ore. În paralel cu probele induse au fost crescute în aceleași condiții celule



18-10-2010

bacteriene la care nu a fost adăugat IPTG (celule neinduse). Atât probele induse cât și probele neinduse au fost centrifugate la 6000 rpm, 10 minute, 4°C.

Sedimentul celular obținut în urma centrifugării a fost lizat în tampon fosfat cu adaos de DN-ază (0,05 mg/ml), RN-ază (0,05 mg/ml), lizozim (1mg/mL) și cocktail de inhibitori de proteaze fără EDTA, prin incubare 30-60 min pe gheață, urmată de 10 -15 cicluri de sonicare. Cele două fracții obținute în urma centrifugării lizatului celular au fost migrate în gel de poliacrilamidă, unde s-a observat că proteina EDEM2 se exprimă exclusiv în corpii de incluziune (sediment) (Fig 3.a). Proteina a fost solubilizată din corpii de incluziune cu tampon fosfat cu adaos de uree de la 6 până la 8 M prin trecerea succesivă a lizatului prin acul unei seringi tip insulină (Fig 3.b).

Proteina recombinantă EDEM2 a fost obținută prin cromatografie de afinitate pe coloana Ni²⁺ (Fig3.c).

Proteina EDEM2 conține un motiv de 6 histidine care are afinitate pentru ionii metalici, în acest caz Ni²⁺ principiu pe baza căruia are loc purificarea proteinei din lizatul total. Ionul de nichel este fixat de rășină prin intermediul acidului nitroacetic, legat covalent de suportul solid cu rol de chelator pentru ionii metalici.

Lizatul obținut în urma solubilizării corpiilor de incluziune cu uree, a fost incubat cu rășina Ni-NTA la 4°C, timp de 1-3 h. Ulterior, proteinele legate nespecific pe coloana Ni-NTA au fost îndepărtate prin spălare cu tampon de liză. Proteina EDEM2 a fost eluată de pe rășină cu tampon de liză suplimentat cu imidazol 100-300mM.

Exemplul 3: Obținerea anticorpilor anti-EDEM 2

Anticorpii față de proteina EDEM2 au fost obținuți prin injectarea proteinei recombinante purificate în amestec cu adjuvant Freud în raport de 1/1 (v/v) la iepure. Pe tot parcursul procesului de producere a anticorpilor au fost realizate 7 imunizări cu diferite concentrații de proteină: 250 ug-1000ug proteină, la intervale de 2-3 săptămâni.

Specificitatea anticorpilor obținuți a fost determinată prin Western blot.



Exemplul 4: *Utilizarea anticorpilor pentru recunoașterea proteinei EDEM 2 utilizând tehnica Western blot*

Specificitatea anticorpilor produși în laborator față de proteina EDEM2 supraexprimată în celulele mamaliene a fost verificată prin tehnica Western blot, având drept control anticorpi comerciali față de proteina EDEM2. În acest sens proteina EDEM 2 a fost supraexprimată, prin transfecție tranzientă în celulele HEK293T (Human Embryonic Kidney cells) o linie celulară embrionară de rinichi uman, după 24 h de la transfecție celulele au fost recoltate și lizate în tampon de liză Hepes Chaps cu adaos de inhibitori de proteaze. Lizatele obținute au fost separate în gel de poliacrilamidă, transferate pe membrană de nitroceluloză și ulterior blotate cu anticorpi împotriva proteinei de interes, EDEM2. Prin această tehnică au fost testate loturile de anticorpi produse cât și câteva diluții la care pot fi folosiți.

Pentru a ne asigura că anticorpii produși recunosc proteina EDEM2 specific, lizatele celulare au fost digerate cu endoglicozidaza H (EndoH). Deoarece EDEM 2 este o glicoproteină, cu 4 situsuri potențiale de glicozilare, este sensibilă la digestie cu enzime care taie glicanii atașați proteinelor, în acest caz EndoH o enzimă care clivează glicanii complecși atașați proteinelor în reticulul endoplasmic. Se observă din figură că anticorpii policlonali recunosc specific polipeptidul digerat cu enzima (Fig 4.a).

Un alt experiment a fost realizat pentru a determina specificitatea anticorpilor produși față de proteina redusă sau nativă. Lizatele celulare au fost separate în gel de poliacrilamidă atât în condiții reducătoare (încărcarea în gel a lizatelor a fost făcută cu tampon de încărcare cu adaos de agent reductor DTT) cât și nereducătoare (fără adaos de DTT), apoi proteinele au fost transferate pe membrana de nitroceluloză și blotate cu anticorpii pentru EDEM2. Deoarece este cunoscut faptul că proteinele EDEM au o omologie structurală relativ mare, în acest experiment a fost verificată și specificitatea anticorpului produs pentru proteina EDEM2 prin incubarea lizatului obținut din celulele HEK293T transfectate cu proteina EDEM1. Se observă că anticorpii produși recunosc specific proteina EDEM2 și nu reacționează cu proteina EDEM1 (Fig4.b).



Exemplul 5: *Utilizarea anticorpilor pentru imunoprecipitarea proteinei EDEM2 din celule de mamifere*

Prin marcare metabolică cu aminoacizi radioactivi se poate urmări traficul și procesarea unor proteine în celulă, cât și interacția dintre proteine, urmărind la diferite intervale de timp expresia proteinelor marcate, prin reacții de imunospecificitate. Pentru experimentele de imunoprecipitare am utilizat celule HEK293T aderente care au fost însămânțate, menținute în mediu de cultură timp de 24 ore și apoi au fost transfectate cu ADN-ul plasmidial ce codifică pentru proteina EDEM2 recombinantă. A doua zi după transfecție celulele au fost marcate radioactiv cu aminoacizi ce sunt încorporați în proteinele nou sintetizate. După marcare, a fost îndepărtat mediul cu aminoacizi radioactivi, celulele au fost spălate cu PBS și apoi lizate pe gheață timp de 30 de minute.

În continuare lizatele celulare au fost incubate cu anticorpii obținuți care leagă specific proteina EDEM2 și complexele antigen-anticorp formate au fost precipitate pe rașina cuplată cu proteina A. Se observă din Fig 5 că anticorpii recunosc specific proteina EDEM2 supraexprimată în condiții reduse în celulele HEK293T, în timp ce anticorpii comerciali recunosc slab proteina EDEM2 prelucrată în aceleași condiții.

Exemplul 6: *Utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM1 prin imunofluorescență*

Metoda de marcare imunofluorescentă permite localizarea intracelulară a proteinelor utilizând anticorpi specifici pentru proteina respectivă în paralel cu un marker pentru compartimentul celular respectiv. Proteinele țintă sunt recunoscute de anticorpi specifici pe baza reacției antigen-anticorp. Pentru a identifica fluorescent aceste proteine se aplică a doua reacție antigen-anticorp folosind anticorpi cuplați cu fluorofori care recunosc specific anticorpii primari ce s-au cuplat cu proteina de interes. Astfel emisia de fluorescență va fi detectată doar în zonele unde sunt exprimate proteinele folosite pentru colocalizare.

Pentru determinarea specificității anticorpilor policlonali pentru proteina EDEM2 am utilizat pentru experiment două linii celulare, A375, linie de melanom uman



nepigmentat și HEK293T, 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 paraformaldehidă 4% (PFA) și în continuare prelucrate pentru experimentul de imunofluorescență. Pentru a determina localizarea intracelulară a proteinei EDEM2 am efectuat un experiment de colocalizare cu doi markeri pentru compartimentele reticulul endoplasmic și lizozom.

Din experimentele de imunofluorescență se poate observa că anticorpii policlonali obținuți de noi recunosc cu mare specificitate proteina recombinantă EDEM2 supraexprimată în celule HEK293T și A375. Acești anticorpi 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 parțial cu proteina Lamp2, un marker pentru lizozom.(Fig 6)



Revendicări

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

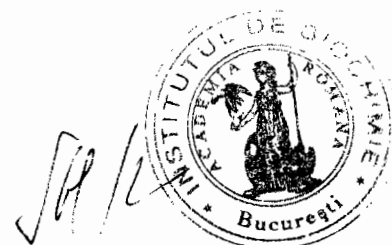


FIGURA 1, secv. nr. 1

1 ATGCCTTTCC GGCTGCTCAT CCCGCTCGGC CTCCTGTGCG CGCTGCTGCC TCAGCACCAT
61 GGTGCGCCAG GTCCCGACGG CTCCGCGCCA GATCCCGCCC ACTACAGGGA GCGAGTCAAG
121 GCCATGTTCT ACCACGCCTA CGACAGCTAC CTGGAGAATG CCTTTCCCTT CGATGAGCTG
181 CGACCTCTCA CCTGTGACGG GCACGACACC TGGGGCAGTT TCTCTCTGAC TCTAATTGAT
241 GCACTGGACA CCTTGCTGAT TTTGGGGAAT GTCTCAGAAAT FCCAAAGAGT GGTGGAAGTG
301 CTCCAGGACA GCGTGGACTT TGATATTGAT GTGAACGCCT CTGTGTTTGA AACAAACATT
361 CGAGTGGTAG GAGGACTCCT GTCTGCTCAT CTGCTCTCCA AGAAGGCTGG GGTGGAAGTA
421 GAGGCTGGAT GGCCCTGTTT CGGGCCTCTC CTGAGAATGG CTGAGGAGGC GGCCCCAAAA
481 CTCCTCCAG CCTTTCAGAC CCCACTGGC ATGCCATATG GAACAGTGAA CTTACTTCAT
541 GGGCTGAACC CAGGAGAGAC CCCTGTCACC TGTACGGCAG GGATTGGGAC CTTTATTGTT
601 GAAATTTGCCA CCCTGAGCAG CCTCACTGGT GACCCGGTGT TCGAAGATGT GGCCAGAGTG
661 GCTTTGATGC GCCTCTGGGA GAGCCGGTCA GATATCGGGC TGGTCGGCAA CCACATTGAT
721 GTGCTCACTG GCAAGTGGGT GGCCAGGAC GCAGGCATCG GGGCTGGCGT GGACTCCTAC
781 TTTGAGTACT TGGTGAAAGG AGCCATCCTG CTTCAGGATA AGAAGCTCAT GGCCATGTTC
841 CTAGAGTATA ACAAAGCCAT CCGGAACCTAC ACCCGCTTCG ATGACTGGTA CCTGTGGGTT
901 CAGATGTACA AGGGGACTGT GTCCATGCCA GTCTTCCAGT CCTTGGAGGC CTAAGTGGCT
961 GGTCTTCAGA GCCTCATTGG AGACATTGAC AATGCCATGA GGACCTTCTT CAACTACTAC
1021 ACTGTATGGA AGCAGTTTGG GGGGCTCCCG GAATTCTACA ACATTCTCTA GGGATACACA
1081 GTGGAGAAGC GAGAGGGCTA CCCACTTCGG CCAGAACTTA TTGAAAAGCGC AATGTACCTC
1141 TACCGTGCCA CGGGGGATCC CACCCTCCTA GAACTCGGAA GAGATGCTGT GGAATCCATT
1201 GAAAAAATCA GCAAGGTGGA GTGCGGATTT GCAACAATCA AAGATCTGCG AGACCACAAG
1261 CTGGACAACC GCATGGAGTC GTTCTTCCTG GCCGAGACTG TGAAATACCT CTACCTCCTG
1321 TTTGACCCAA CCAACTTCAT CCACAACAAT GGGTCCACCT TCGACACGGT GATCACCCCC
1381 TATGGGGAGT GCATCCTGGG GGCTGGGGGG TACATCTTCA ACACAGAAGC TCACCCCATC
1441 GACCCTGCCG CCCTGCACTG CTGCCAGAGG CTGAAGGAAG AGCAGTGGGA GGTGGAGGAC
1501 TTGATGAGGG AATTCTACTC TCTCAAACGG TGCAGGTCGA AATTTAGAAA AAACACTGTT
1561 AGTTCGGGGC CATGGGAACC TCCAGCAAGG CCAGGAACAC TCTTCTCACC AGAAAACCAT
1621 GACCAGGCAA GGGAGAGGAA GCCTGCCAAA CAGAAGGTCC CACTTCTCAG CTGCCCCAGT
1681 CAGCCCTTCA CCTCCAAGTT GGCATTACTG GGACAGGTTT TCCTAGACTC CTCATAA

secv. nr. 2

10	20	30	40	50	60
MPFRLLIPLG	LLCALLPQHH	GAPGPDGSAP	DPAHYRERVK	AMFYHAYDSY	LENAFPFDL
70	80	90	100	110	120
RPLTCDGHD	TWGSFSLTLID	ALDTLLILGN	VSEFQRVVEV	LQDSVDFDID	VNASVFETNI
130	140	150	160	170	180
RVVGGLLSAH	LLSKKAGVEV	EAGWPCSGPL	LRMAEEAARK	LLPAFQTPTG	MPYGTVNLH



190	200	210	220	230	240
GVNPGETPVT	CTAGIGTFIV	EFATLSSLTG	DPVFEDVARV	ALMRLWESRS	DIGLVGNHID
250	260	270	280	290	300
VLTGKWVAQD	AGIGAGVDSY	FEYLVKGAIL	LQDKKLMAMF	LEYNKAIRNY	TRFDDWYLWV
310	320	330	340	350	360
QMYKGTVSMF	VFQSLEAYWP	GLQSLIGDID	NAMRTFLNYY	TVWKQFGGLP	EFYNIPQGYT
370	380	390	400	410	420
VEKREGYPLR	PELIESAMYL	YRATGDPTLL	ELGRDAVESI	EKISKVECGF	ATIKDLRDHK
430	440	450	460	470	480
LDNRMESFFL	AETVKYLYLL	FDPTNFIHNN	GSTFDTVITP	YGECILGAGG	YIFNTEAHPI
490	500	510	520	530	540
DPAALHCCQR	LKEEQWEVED	LMREFYSLKR	CRSKFQKNTV	SSGPWEPPAR	PGTLFSPENH
550	560	570			
DQARERKPAK	QKVPLLSCPS	QPFTSKLALL	QQVFLDSS		

FIGURA 2

Sens: GATTGTCGACCACTACAGGGAGCGAGTCAAGG (SalI)

Antisens : GATTAAGCTTTTATGAGGAGTCTAGGAAAACCTGTCC (HindIII)



FIGURA 3

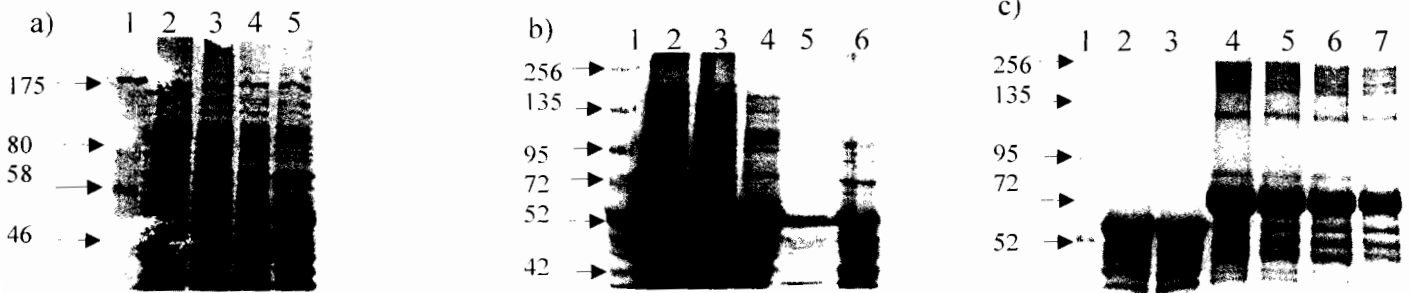


FIGURA 4



FIGURA 5

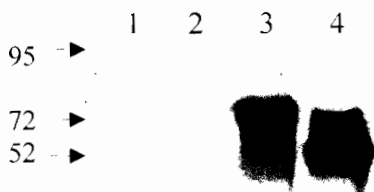


FIGURA 6

Celule HEK 293T control

Celule HEK 293T colocalizare EDEM 2 endogen/ CNX



Celule HEK 293T colocalizare EDEM2 endogen /Lamp2

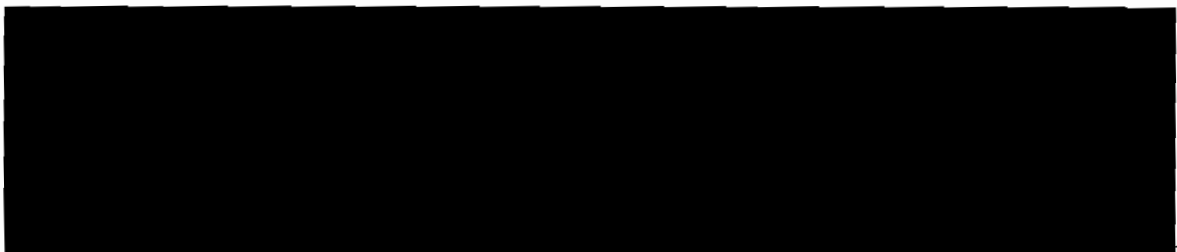


Celule HEK293T transfectate cu EDEM 2

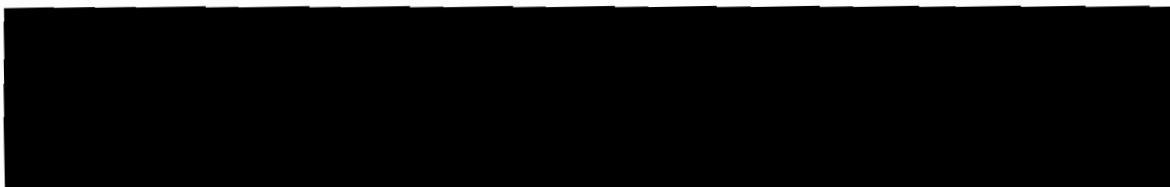
Celule HEK 293T transfectate cu EDEM 2 colocalizare cu CNX



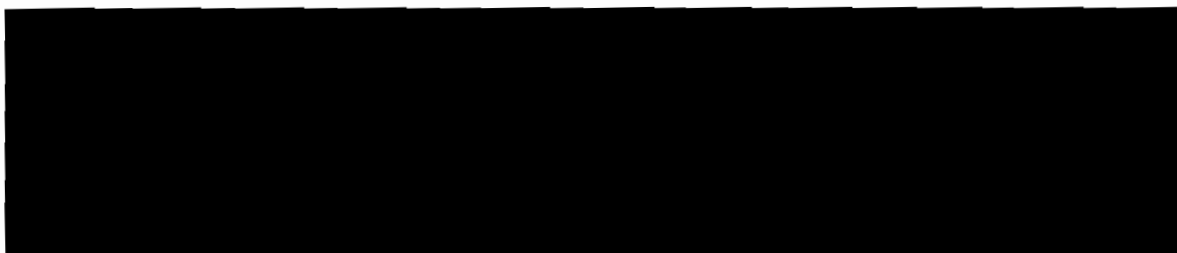
Celule HEK 293T transfectate cu EDEM 2 colocalizare cu Lamp2



Celule A375 colocalizare EDEM 2 endogen /CNX



Celule A375 colocalizare EDEM 2 endogen /Lamp 2



Celule A375 transfectate cu EDEM 2

Celule A375 transfectate cu EDEM 2 colocalizare cu CNX



Celule A375 transfectate cu EDEM 2 colocalizare cu Lamp 2

