



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 00990**

(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:
• **GHENEA SIMONA, STR.DUNEI NR.17,**
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• **ALEXANDRU PETRUȚA RAMONA,**
STR. UNIRII CENTRU, BL.18D, AP.23, ET.6,
BUZĂU, BZ, 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-EDEM3**

(57) **Rezumat:**

Prezenta invenție se referă la anticorpi policlonali anti-EDEM3, destinați diagnosticării stării de stres la nivel celular, prezentând specificitate ridicată față de EDEM3 umană și de șoarece, cu capacitate redusă de interacție cu alte proteine din familia EDEM.

Revendicări: 3
Figuri: 9



Fig. 7



Anticorpi policlonali anti-EDEM3

Invenția se referă la anticorpi policlonali anti EDEM3 (ER degradation-enhancing mannosidase-like protein), destinați diagnosticării stresului la nivel celular.

EDEM3 este o glicoproteină rezidentă în reticulul endoplasmatic (RE) implicată în calea de degradare asociată reticulului endoplasmatic. Ea face parte din familia glicozil hidrolazelor GH (47), care cuprinde α 1,2 RE manozidaza I, α 1,2 Golgi manozidaza IA, IB și IC și cele trei proteine rezidente în RE, EDEM1, EDEM2 și EDEM3. Rolul acestor proteine în reticulul endoplasmatic nu este pe deplin cunoscut.

Proteina EDEM3 diferă față de ceilalți 2 membri ai subfamiliei EDEM (EDEM1 și EDEM2) prin faptul că prezintă în plus un domeniu asociat proteazelor cu funcție necunoscută și un semnal de retenție KDEL.

Problema pe care o rezolvă această invenție este obținerea unui produs cu proprietatea de a reacționa ca anticorp cu antigene de tipul EDEM3, o proteină importantă în calea de degradare asociată reticulului endoplasmatic (ERAD).

Avantajele aplicării acestei invenții sunt:

- Anticorpii policlonali descriși în acest brevet de invenție recunosc specific proteina EDEM3, atât proteina transfectată cu plasmidul pTriEx-EDEM3 cât și cea endogenă.
- Anticorpii obținuți pot fi folosiți pentru evidențierea proteinei EDEM3 cu o specificitate mai mare față de cea a anticorpilor anti EDEM3 comerciali, prin faptul că aceștia nu recunosc nespecific și alte proteine din lizatele celulare folosite.
- Anticorpii descriși în acest brevet de invenție pot fi folosiți în diverse tehnici cum ar fi: Western blotting, imunoprecipitare, imunofluorescență.
- Folosirea anticorpilor descriși în acest brevet de invenție în tehnici de biologie celulară poate contribui la descoperirea unor noi parteneri de interacție ai proteinei EDEM3, iar aceasta poate duce la elucidarea mecanismelor prin care proteina EDEM3 participă la degradarea altor proteine depliate.

Anticorpii, conform invenției, pot fi obținuți folosind un fragment din cDNA acestei proteine (aa 47-225) clonat în vectorul de expresie pHAT-2 care a fost exprimat în

sistem procariot. Fragmentul din proteina EDEM3 recombinantă prezintă 6 histidine în capătul N-terminal ce pot fi folosite pentru purificarea proteinei prin cromatografie de afinitate pe rășină de Ni-NTA. Pentru obținerea acestor anticorpi se pot face imunizări repetate ale animalului cu proteina recombinantă 6His-EDEM3.

Anticorpii descriși în această invenție pot fi folosiți pentru identificarea proteinei EDEM3 supraexprimată în celule A375 (celule de melanom uman nepigmentat-amelanotice), HEK 293 T (celule embrionare de rinichi uman) și HUH7 (celule de hepatom uman), prin transfecția vectorului pTriEx-EDEM3 cât și proteina EDEM 3 exprimată constitutiv de aceste celule. Proteina poate fi identificată prin Western Blot, imunofluorescență și imunoprecipitare. Rezultatele obținute au arătat faptul că prin Western blot poate fi identificată atât proteina EDEM3 supraexprimată dar și cea endogenă ca o bandă distinctă la aproximativ 100 kDa care își modifică mobilitatea electroforetică în urma tratamentului cu endoglicozidază H (endoH). Prin imunofluorescență se poate identifica proteina EDEM3 supraexprimată cât și proteina EDEM3 endogenă. Acesta prezintă o distribuție clară în reticulul endoplasmatic, lucru demonstrat prin colocalizarea cu calreticulina și calnexina, proteine ce sunt folosite adesea ca marker de RE. Prin imunoprecipitare poate fi detectată proteina EDEM3 transfectată cât și cea exprimată constitutiv în celule cu o specificitate ridicată. Pentru validarea specificității anticorpilor, au fost testați prin comparație cu anticorpii comerciali anti-EDEM3 ce provin de la Sigma.

Anticorpii, conform invenției, au următoarele proprietăți:

- specificitate înaltă pentru EDEM3 glicozilat și neglicozilat
- capacitate redusă sau absentă de interacție cu celelalte proteine din familia EDEM, EDEM1 și EDEM2

Se dau, în continuare, nouă exemple de realizare a invenției, în legătură și cu figurile 1...9, care reprezintă:

Fig. 1, secvența de nucleotide (secv. nr.1) și aminoacizi (secv.nr.2) a proteinei recombinante pHAT-2-EDEM3

Fig. 2, secvența primerilor folosiți pentru clonarea proteinei recombinante pHAT-2-EDEM3



Fig. 3, analiza SDS-PAGE pentru verificarea expresie în sistem bacterian și purificarea prin cromatografie de afinitate a proteinei pHAT-2-EDEM3.

1 – Marker de masă moleculară, 2 – proteinele solubile din supernatant în urma sonicării; 3 – proteinele solubile care nu s-au legat de rășina de agaroză; 4-5 spălari, 6-7 eluatul ce conține proteina EDEM3 purificată, 8 – proteinele solubile care au rămas prinse de rășină în urma eluției de pe rășina de agaroză. Proteinele separate prin SDS-PAGE au fost colorate cu Coomassie blue. Analiza prin electroforeză în mediu denaturant indică prezenta proteinei EDEM 3 la masa corespunzătoare (aproximativ 30.7 kDa) în urma purificării proteinei prin cromatografie de afinitate.

Fig. 4, verificarea proteinei pure prin Western Blot cu anticorpi anti-His.

Analiza SDS-PAGE a proteinelor pHAT-2-EDEM3 și pHAT-2-EDEM1 în urma purificării prin cromatografie de afinitate. În liniile 1, 2 și 3 din fig 4 a fost încărcată în gel de poliacrilamidă proteina pHAT-2-EDEM3 în urma purificării, în liniile 2 și 3 au fost făcute 2 diluții ale proteinei, respectiv 1/5 și 1/15. În liniile 4 și 5 a fost încărcată proteina pHAT-2-EDEM1. Proteinele au fost separate prin SDS-PAGE și apoi transferate pe membrană de nitroceluloză și apoi detectate utilizând anticorpii anti-HIS în diluție 1/3000 (provin de la Sigma).

Fig. 5, analiza SDS-PAGE a proteinei EDEM3 în urma etapei de dializă în PBS

1-proteina purificată prin cromatografie de afinitate de pe rășina de agaroză, 2 – proteina purificată obținută în urma etapei de dializă în PBS.

Fig. 6, analiza SDS-PAGE a probelor prelevate în urma concentrării proteinei EDEM3 prin liofilizare. 1 – Marker de masă moleculară, 2-3 proteina obținută în urma eluțiilor 4-5 proteina obținută în urma eluțiilor și apoi supusă procesului de concentrare prin liofilizare.

Fig. 7, utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 3 prin tehnica Western Blotting. Pentru caracterizarea anticorpilor anti EDEM3 s-a făcut Wester blot în care s-au folosit anticorpii acestei invenții. Experimentul s-a realizat pe celule HEK293 (celule embrionare de rinichi uman) transfectate cu EDEM 3 și celule HEK293 care nu au fost transfectate. Apoi au fost digerate cu enzima endoglicozidază H (EndoH) pentru a urmări modificarea compoziției glucidice a proteinei EDEM3, atunci când trece din lumenul RE în aparatul Golgi. Proteinele prezente în lizatele celulare au fost separate prin

SDS-PAGE, apoi transferate pe membrane de nitroceluloză și detectate cu anticorpii prezentați în acest brevet de invenție.

Fig. 8, Marcarea radioactivă a proteinei EDEM 3 cu [³⁵S] metionină/cisteină

În acest experiment s-au folosit celule aderente HEH 293 T (celule embrionare de rinichi uman) care nu au fost transfectate, pentru a putea detecta proteina EDEM3 endogenă și celule HEH 293 T care au fost transfectate cu proteina pTriEx-EDEM3. În fig. 8a, este prezentată marcarea cu [³⁵S] a celulelor transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3 și imunoprecipitarea cu anticorpii descriși în acest brevet de invenție în trei diluții diferite. Analiza s-a realizat prin SDS-PAGE și autoradiografierea în condiții reductoare. În fig. 8b, este reprezentată marcarea cu [³⁵S] a celulelor transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3 (liniile 1 și 2), marcarea cu [³⁵S] a celulelor netransfectate (liniile 3 și 4) și imunoprecipitarea cu anticorpii anti-EDEM3 descriși în acest brevet. În fig. 8c, este reprezentată marcarea cu [³⁵S] a celulelor transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3 (liniile 1 și 2), marcarea cu [³⁵S] a celulelor netransfectate (liniile 3 și 4) și imunoprecipitarea cu anticorpii anti-EDEM3 produși de firma Sigma. Această comparație s-a realizat pentru a determina specificitatea anticorpilor descriși în acest brevet în comparație cu anticorpii existenți pe piață. În figură (8c.) se observă că anticorpii produși de firma Sigma recunosc nespecific proteine pe care anticorpii acestui brevet de invenție nu le recunosc (proteine marcate cu săgeată în fig 8c.). Scopul acestui experiment a fost de a analiza specificitatea anticorpilor descriși pe celule care au fost transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3 și pe celule care exprimă constitutiv această proteină. Din figura 8b, se observă că, anticorpii acestei invenții recunosc specific atât proteina transfectată în celule cât și proteina endogenă, diferența fiind dată de o recunoaștere mai slabă a proteinei endogene. Se mai poate observa că atât în celule transfectate cât și în celule netransfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3, anticorpii nu recunosc decât proteina de interes în comparație cu anticorpii comerciali (Sigma) care recunosc nespecific și alte proteine. În aceste trei experimente a fost realizată digestia cu endoglicozidază H (EndoH) deoarece, prin digestia cu această enzimă a părții glucidice a glicoproteinei a fost urmărită modificarea compoziției glucidice a proteinei EDEM3, atunci când acesta trece din lumenul reticulului endoplasmatic în aparatul Golgi. Acest lucru servește drept control



pozitiv pentru determinarea poziției de migrare electroforetică a polipeptidului deglicozilat.

Exemplul 9. Utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 3 prin imunofluorescență.

Fig 9 a. Colocalizarea intracelulară a proteinei EDEM 3 cu calreticulina (Crt) în celule A375 transfectate cu plasmidul pTriExEDEM3.

Celule A375 transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3 au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-Calregulină – marker de RE. Anticorpilor secundari folosiți: Alexa Fluor 488 (EDEM3) și Alexa Fluor 594 (Crt). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI.

Fig. 9b, 9c, Colocalizarea intracelulară a proteinei EDEM3 cu calnexina (CNX) în celule HUH7 (fig 9b.) și celule HUH7 transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3 (9c.).

În fig. 9b, celulele HUH7 au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anti-calnexină. Anticorpilor secundari folosiți au fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (CNX). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI.

În fig. 9c, celulele HUH7 transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3, au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-calnexină. Anticorpilor secundari folosiți au fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (CNX). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI. În aceste două figuri se observă că proteina EDEM3 colocalizează cu calnexina, fapt care demonstrează că localizarea intracelulară a proteinei este în reticulul endoplasmatic. Anticorpilor descriși în acest brevet de invenție recunosc specific atât proteina transfectată cât și proteina endogenă.

În fig. 9d, celulele HUH7 transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3, au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-EEA1 (Early Endosome Marker). Anticorpilor secundari folosiți au fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (EEA1). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI. Se observă în această figură că proteina EDEM3 nu colocalizează cu EEA1, așa cum era de aștept datorită localizării intracelulare diferite.

În fig. 9e, celulele HUH7 transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3, au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti RAB7. Anticorpilor



secundari folosiți au fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (RAB7). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI. Se observă în această figură că proteina EDEM3 nu colocalizează cu RAB7, așa cum era de aștept datorită localizării intracelulare diferită. În fig. 9f, celulele HUH7 transfectate cu plasmidul pTriEx-EDEM3, au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-LAMP2 (Lysosome Marker). Anticorpii secundari folosiți au fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (LAMP2). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI. Se observă în această figură că proteina EDEM3 nu colocalizează cu LAMP2, așa cum era de aștept datorită localizării intracelulare diferită.

Exemplul 1: Clonarea EDEM3 recombinant

ADN-ul complementar (secvența 1 Fig. 1) utilizat pentru realizarea expresiei proteinei EDEM3 (secvența 2, Fig. 1) în sistem bacterian a fost clonat în vectorul pHAT-2. În urma activării promoterului inductibil T7 din vector este sintetizată proteina recombinantă EDEM-3 care conține la capătul N terminal șase histidine. Astfel, ADN-ul complementar a fost amplificat prin PCR folosind Taq ADN polimeraza (New England Biolabs) folosind primeri specifici cărora li s-au adăugat la capătul 5'-terminal situsurile de recunoaștere ale enzimelor de restricție *Bam*HI și respectiv, *Not*I (Fig. 2). Ampliconul a fost supus digestiei cu enzimele *Bam*HI și *Not*I, urmată de o nouă purificare folosind kitul DNA Gel extraction (Qiagen). Clonarea în vectorul pHAT2 liniarizat prin digestia cu aceleași enzime de restricție s-a realizat printr-o reacție de ligare, urmată de transformare în bacteriile *E. coli* XL1-Blue. ADN-ul extras din clonă pozitivă a fost în continuare supus digestiei enzimatică cu enzima *Bsr*GI urmată de electroforeză. Fragmentul de ADN care conține vectorul, primele 676 perechi de bază și ultimele 161pb din EDEM3 a fost purificat prin extracție din gel și recircularizat prin reacția de ligare, urmată de transformare în bacteriile *E. coli* XL1-Blue. Întregul insert a fost secvențiat pentru verificarea fidelității reacției de PCR și a cadrului de citire.

Exemplul 2. Obținerea expresiei proteinei EDEM3 recombinante în sistem procariot



Pentru obținerea proteinei recombinante au fost parcurse două etape: expresia și purificarea proteinei EDEM 3 recombinante.

Proteina utilizată în acest studiu a fost proteina pHAT-2-EDEM3 și reprezintă secvența de aminoacizi 47-225 din gena EDEM3. Strategia de clonare a genei ce codifică pentru EDEM 3 este prezentată la exemplul 1.

Testele de optimizare a expresiei au vizat principalii parametri care influențează expresia proteinelor în sistem procariot: temperatura, timpul de inducție, tipul celulelor și concentrația de inductor, β -D-izopropil-tiogalactozid (IPTG). Condițiile optime de expresie au fost creșterea celulelor BL21(DE3) (a fost aleasă această linie celulară deoarece conține gena pentru T7 ARN polimezara) la temperaturi cuprinse între 30 și 37°C și 150-250 rpm până la densitatea optică cuprinsă între 0.5 și 0.7 nm. Celulele au fost induse cu IPTG în concentrații cuprinse între 0.4 și 0.8 mM timp de 4-6 h. Celulele obținute au fost resuspendate în tampon de extracție care conține: tampon fosfat de potasiu 50mM, NaCl 300 mM, și 20 mM imidazol, pH 7. În acest tampon s-au adăugat inhibitori de proteaze, DNA-ză (50 μ g/ml) și lizozim (1mg/ml) și au fost incubate 30 minute pe gheață. Celulele resuspendate în vederea eliberării conținutului celular au fost supuse lizei cu ajutorul unui aparat (sonicator Bandelin Electronic) 10 s, putere 70%; 7 cicluri. Omogenatul obținut din aceste celule a fost centrifugat la 14000x g, 30 de minute, la 4°C. În urma acestei centrifugări s-a separat extractul conținând proteinele solubile. Proteina EDEM3 a fost vizualizată prin SDS-PAGE în fracția solubilă, fracție care a fost folosită ulterior la etapa de purificare prin cromatografie de afinitate. Proteinele exprimate în vectorul de expresie pHAT-2 sunt fuzionate cu o oligopeptidă formată din 6 resturi de histidină la capătul N-terminal al proteinei și pot fi astfel purificate aproape omogen prin cromatografie de afinitate pe rasiță chelată cu Ni²⁺. În Fig.3 se prezintă etapele purificării. Datele finale optime pentru expresia și purificarea proteinei EDEM3 au fost folosite în continuare pentru obținerea unor cantități mai mari de proteină purificată.

Exemplul 3. Verificarea proteinei pure prin tehnica Western Blot folosind anticorpi anti-His



Proteina purificată a fost verificată prin tehnica Western Blot folosind anticorpi anti His (Sigma), deoarece proteina EDEM 3 a fost clonată în vectorul de expresie pHAT-2 (fig 4).

Această verificare s-a făcut prin migrarea probele prelevate pe parcursul etapelor de expresie și purificare și anume: supernatantul în urma sonicării (neindus cu IPTG – luat drept control negativ), fracția insolubilă obținută în urma sonicării (fără IPTG), fracția solubilă obținută în urma sonicării (indus cu IPTG,) și în urma purificării proteinei (proteinele din fracția solubilă care au rămas nelegate de rășină, eluatul obținut în urma eluției cu diferite diluții de IPTG și proteină pHAT-2-EDEMI purificată (drept control pozitiv) în diluție 1/5, proteina pHAT-2- EDEMI purificată (drept control pozitiv) în diluție 1/15. Detecția proteinelor s-a realizat cu ajutorul anticorpilor anti-HIS (care provin de la Sigma). Din figura 4 se observă că anticorpii anti-His se leagă specific de cele două proteine EDEM3 și EDEM 1. Din acest experiment rezultă că proteina obținută în urma purificării prin cromatografie de afinitate este proteina 6His - EDEM3.

Exemplul 4. Dializa proteinei în tampon fosfat salin (PBS)

Proteina pHAT2-EDEM3 a fost dializată față de tampon fosfat salin cu pH 7.4 pentru îndepărtarea imidazolului adăugat la eluarea proteinei de pe rășină de agaroză și a sărurilor. Dializa s-a realizat în pahar erlenmeyer de 3 litri care a fost umplut cu soluție PBS. Proteina a fost mutată în saci de dializă, în membrane impermeabile pentru proteine dar permeabile pentru substanțe neproteice. Dializa se poate face la temperaturi de 4-10°C, cu schimb la fiecare ora. Proteina obținută în urma dializei a fost analizată prin metoda Bradford, de determinare a proteinei totale și vizualizată prin SDS-PAGE în fig 5.

Exemplul 5. Concentrarea proteinei recombinante prin liofilizare

Fracțiile de eluat culese la etapa de purificare prin cromatografie de afinitate au fost analizate pentru determinarea concentrație de proteină prin citirea absorbanței la 595 nm prin metoda Bradfourd. Această analiză a fost necesară datorită faptului că, pentru obținerea anticorpilor policlonali anti-EDEM3 a fost nevoie de o concentrație a proteinei de 2 mg/ml.

JH 11



Proteina a fost stocată în prealabil în tuburi Eppendorf de 1.5 ml la -85°C și transferată rapid în aparatul de liofilizare unde a fost lăsată aproximativ 2 ore. Metoda presupune transformarea directă din gheață în vapori și se realizează la temperatură mică (-50°C . - 55°C) și vid. Scopul folosirii acestei metode a fost de a obține produși ușor solubili în apa care să aibă aceleași caracteristici ca produsul original după aditia apei. După expirarea timpului de incubare, tuburile au fost scoase și proteina a fost resuspendată în apă pură pentru a ajunge la volumul de 2 mg proteină/500 μl .

Proteina a fost vizualizată prin SDS-PAGE pentru a verifica proteina în urma etapei de concentrare prin liofilizare (reprezentat în figura 6. liniile 1 și 2).

Exemplul 6. Obținerea anticorpilor anti-EDEM3

Dupa obținerea proteinei recombinante pure s-au realizat 1-8 imunizări. primele 3 imunizări au fost făcute cu 1 mg de proteină pură și următoarele imunizări cu 500 μg de proteină EDEM 3 pură. Pentru un răspuns imun cât mai bun s-a folosit adjuvant Freund incomplet pentru prima imunizare și adjuvant Freund complet pentru următoarele imunizări. Volumul final al amestecului a fost de 1 ml pentru primele trei imunizări 500 μl proteină + 500 μl adjuvant (1 mg proteină) și următoarele 4 imunizări din 250 μl proteină + 250 μl adjuvant (500 μg proteină). Amestecul de imunizare a fost injectat subcutanat la iepure în urma recoltării serului pre-imun folosit drept control negativ. Dupa fiecare imunizare s-a recoltat sânge pentru verificarea răspunsului imun și pentru testarea titlului anticorpilor (fig 7). Dupa obținerea unui titru constant de anticorpi iepurele a fost sângerat și serul obținut în urma centrifugării, a fost alicotat în tuburi eppendorf de 1.5 ml sterile și păstrate la -85°C . Verificarea serului a fost realizată prin tehnica Western blot, imunofluorescentă și imunoprecipitare. Și în comparație cu anticorpii comerciali existenți anti-EDEM3 (ce provin de la Sigma).

Exemplul 7. Utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM 3 prin tehnica Western Blotting

Tehnica western blot (sau imunoblot) este o analiză folosită pentru detecția unei anumite proteine dintr-un amestec de proteine provenind de la o probă de țesut sau un lizat celular. Proteinele separate prin electroforeză sunt transferate din gel pe o membrană

JH/11



de nitroceluloză sau poliviniliden fluorid (PVDF) unde sunt detectate cu ajutorul anticorpilor specifici.

Pentru identificarea proteinelor de interes (EDEM 3) cu anticorpi specifici, gelurile au fost transferate pe membrane de nitroceluloză. Transferul pe suport lichid al proteinelor din extractele celulare separate prin SDS-PAGE este o metodă care permite evidentierea și caracterizarea lor ulterioară cu anticorpi marcați chimic.

Detecția proteinelor de interes s-a făcut după cum urmează:

membranele au fost incubate cu soluții de anticorpi primari anti EDEM3 în 5 % lapte degresat în PBS timp de o oră, cu agitare. A urmat etapa de spălare a excesului de anticorpi cu soluție PBS + Tween 20 0.2 % (6 spălări timp de 10 minute).

Anticorpii secundari au fost folosiți în mod similar: anticorp secundar anti iepure conjugat cu HRP diluție 1:10000 sau 1:30000. Membranele au fost spălate și incubate 1 minut cu reactivii ECL din kit, învelite în folie și puse în contact cu filmul fotografie pentru detecție.

Exemplul 8. Marcarea radioactivă a proteinei EDEM 3 cu [³⁵S] metionină/cisteină

Marcarea metabolică a celulelor în scopul de a identifica calea pe care o urmează în celulă proteina EDEM3 care a fost marcată la intervalul de 20 de minute. Prin încorporarea aminoacizilor cu cisteină și metionină care conțin un atom de [³⁵S], polipeptidul în curs de sinteză devine "marcat" radioactiv și poate fi vizualizat prin autoradiografie.

S-au folosit celule HEK 293 T (celule embrionare de rinichi uman) care au fost cultivate în mediu RPMI 1640 suplimentat cu ser fetal de vitel 10%, 50 U/mL penicilină și 50 mg/mL streptomycină și menținute la 37°C cu 5% CO₂. Celulele HEK 293 T au fost transfectate folosind polietilenimină (PEI) ca reactiv de transfecție. La 24 de ore după transfecție celulele au fost resuspendate în mediu RPMI 1640 fără cisteină și metionină, conținând 1 % ser fetal inactivat, timp de o ora, la 37°C. Apoi, s-a realizat marcarea proteinelor în curs de sinteză (pulse) cu [³⁵S] metionină/cisteină, timp de 20 de minute, la 37°C. Imediat după pulse celulele au fost spălate cu PBS rece și apoi lizate în tampon HEPES/CHAPS (50 mM HEPES, pH=7.5, 2% CHAPS, 200 mM NaCl și 0.5% inhibitori de proteaze) timp de 30 de minute pe gheață. Lizatele celulelor marcate radioactiv au fost



transfecție celulele au fost resuspendate în mediu RPMI 1640 fără cisteină și metionină, conținând 1 % ser fetal inactivat, timp de o ora, la 37°C. Apoi, s-a realizat marcarea proteinelor în curs de sinteză (pulse) cu [³⁵S] metionină/cisteină, timp de 20 de minute, la 37°C. Imediat după pulse celulele au fost spălate cu PBS rece și apoi lizate în tampon HEPES/CHAPS (50 mM HEPES, pH=7.5, 2% CHAPS, 200 mM NaCl și 0.5% inhibitori de proteaze) timp de 30 de minute pe gheață. Lizatele celulelor marcate radioactiv au fost centrifugate și supernatatele au fost incubate peste noapte, la 4°C cu agitare cu anticorpii anti-EDEM 3 descriși în această invenție sau anticorpii anti-EDEM3 (Sigma) (fig 8b. Liniile 1, 2, 3, 4) și 30 μl proteină A Sepharose în suspensie. Proteina EDEM3 a fost eluată în tampon de încărcare al probelor ce conține SDS 2% și 0.5 M DTT (condiții reductoare). Probele au fost migrate în gel de poli-acrilamidă 12% și analizate prin autoradiografie. Anticorpii anti-EDEM3 au fost folosiți în diluția 1/50, 1/100 și 1/500. S-au folosit și celule netransfectate pentru detecția proteinei EDEM3 endogenă atât în cazul incubării cu anticorpii descriși în acest brevet de invenție cât și în cazul folosirii anticorpilor comerciali.

Exemplul 9. Localizarea intracelulară a proteinei EDEM 3 prin microscopie de imunofluorescență.

Celulele utilizate în experiment sunt celule aderente ce cresc în monostrat la suprafața de creștere a recipientilor de cultură. Celulele au fost lăsate în incubator peste noapte pentru a permite atașarea lor de suprafața. A doua zi celulele au fost transfectate cu proteinele pTriEx-EDEM3 și pTriEx-EDEM1 și în aceeași placă am schimbat mediul celulelor netransfectate, apoi celulele au fost incubate până ziua următoare. La finalul timpilor de incubare celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 4% (PFA), 15 min și permeabilizate cu Triton X-100. Celulele au fost incubate cu anticorpii primari (iepure anti EDEM3 (descriși în acest brevet, folosiți în diluția de 1/100), capra anti Calnexină (Santa Cruz), șoarece anti LAMP2 (Santa Cruz), șoarece anti EEA1 (BD Biosciences), capră anti RAB7 (Santa Cruz), capră anti Calregulină (Santa Cruz), diluați în PBS 1/200), apoi incubate cu anticorpii secundari. La final celulele au fost spălate și montate în mediu de vizualizare cu DAPI. Vizualizarea celulelor în fluorescență a fost realizată la microscopul Nikon Eclipse E600.

JML



18-10-2010

Revendicări

1. Anticorpul policlonal anti-EDEM3, caracterizat prin aceea că are specificitate față de regiunea trunată solubilă a proteinei EDEM3 cu secvența de aminoacizi din fig.1, secv.nr.2.
2. Anticorpul policlonal anti-EDEM3, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se utilizează pentru diagnosticul stării de stres la nivel celular.
3. Anticorpul policlonal anti-EDEM3, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se utilizează pentru identificarea EDEM3 uman și de soarece.

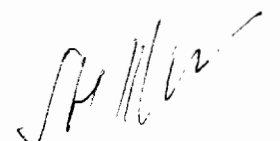


Fig. 1 secvența 1

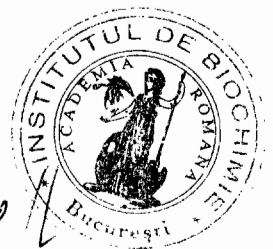
EDEM3 cDNA

```

1      ATGAGCAAAG CCGCGGGCTG CCGGGGCTGT GGGTGCCGGG TCCCCAGCG AGCGTCATGG
61     AGCCTGGTGG CAGCGACGGC CGCGCTCTGT CTGGTGTGG CCACGTCCGT GTGCACGGCA
121    GGGGCCGCGC CCATGAGTAG GGAAGAGAAG CAGAAGCTTG GAAATCAAGT CCTGGAAATG
181    TTGATCATG CTTATGGCAA CTATATGGAA CATGCCTACC CAGCTGATGA GCTCATGCCT
241    TTAACCTGCC GGGGCCGTGT CAGAGGCCAG GAGCCCAGCC GGGGCGATGT GGATGACGCC
301    TEGGAAAAGT TTTCCCTAAC ACTGATTGAT TCTTTGGACA CTCTTGTGGT ATTAACAAA
361    ACTAAGGAAT TTGAAGATGC TGTGAGAAAA GTTTTAAGGG ATGTTAATTT AGATAATGAT
421    TTAGTTGTTT CAGTCTTTGA AACAAACATC AGAGTCTTG GGGTCTTTT GGGCGACAC
481    TCGCTGGCCA TCATGCTGAA GGAGAAAAGC GAGCACATGC AGTGGTACAA TGACGAGCTC
541    CTCCACATGG CAAAGCAGCT GGGTTACAAG CTCCTGCCAG CTTTCAACAC CACCAGCGGC
601    CTCCGTACC CCAGGATIAA TTTAAAGTTT GGCATCAGAA AACCAGAAGC CAGGACGGGA
661    ACTGAGACAG ACACCTGTAC AGCCTGTGCA GGCACCTTGA TCCTCGAGTT TGCTGCACTG
721    AGTCGATTCA CAGGAGCGAC GATATTTGAG GAATATGCAA GAAAAGCTCI TGATTTTCTC
781    TGGGAGAAAA GACAGCGAAG TAGCAATTTA GTAGGCGTGA CTATCAATAI TCATACTGGA
841    GACTGGGTAC GCAAAGATAG TGGAGTTGGA GCGGGGATCG ACTCCTATTA TGAGTATCTG
901    TTGAAAGCCT ATGCTTCTCT TGGAGATGAC AGTTTCTTGG AAAGATTTAA TACACATTAC
961    GATGCCATAA TGAGGTATAT AAGCCAGCCA CCTCTCCTAC TTGATGTGCA TATCCACAAA
1021   CCAATGTCTA ACGCTCGGAC CTGGATGGAT GCATGTCTG CTTTTTTTCC AGGTTTGCAG
1081   GTTTTAAAGG GTGATATTAG ACCTGCTATT GAAACTCAG AAATGTTATA CCAGTTGATT
1141   AAAAAACACA ATTTTCTACC AGAGGCATTT ACTACAGATT TCAGGGTTCA TTGGGCTCAG
1201   CATCCTTIAA GGCCAGAGTT TGCAGAAAGT ACCTACTTCT TATAAAGGC TACAGGAGAC
1261   CCTTACTACC TTGAAGTAGG GAAAACACTT ATTGAAAATT TGAATAAGTA TGCTCGAGTG
1321   CCTTGGGGGT TTGCTGCCAT GAAGGATGTT CGCACTGGGA GTCATGAGGA CAGAATGGAT
1381   TCGTTCTTCT TGGCTGAAAT GTTTAAATAC CTGTACCTGT TAITTGTCTA TAAAGAGGAC
1441   ATCATTTTGT ACATAGAAGA CTATATCTTT ACAACAGAAG CTCATCTGTI ACCGCTTTGG
1501   CTTTCCACCA CAAACCGAAG CATCTCAAAG AAGAACACAA CCTCAGAAAT CACAGAACTG
1561   GATGATAGTA ATTTTGAATG GACTTGTCCA AACACTCAGA TTCTTTTTTCC TAATGATCCA
1621   TTGTATGCTC AGAGCATCCG TGAACCCTTG AAAAACGTGG TGGATAAGAG CTGTCCGAGA
1681   GGCATCATCA GAGTAGAGGA GAGTTTCAGA AGTGGAGCTA AGCCTCCTCT GAGAGCCAGA
1741   GATTTTATGG CCACTAATCC TGAACATTTA GAAATCCTGA AGAAGATGGG GTTGAGTTTG
1801   ATTCAACTCA AAGATGGTCG AGTCCAGCTG GTCCAACATG CAATCCAAGC TCTAGTTCA
1861   ATFGATGCTG AAGATGGGTT ACGSTTCATG CAGGAGATGA TAGAGCTGTC CAGTCAGCAA
1921   CAGAAGGAGC AGCAGCTGCC TCCACGAGCT GTCCAGATTA TCTCCACCC GTTTTTTGGC
1981   AGGTCGTCT TAACTGCTGG ACCAGCTCAG TTTGGGCTGG ATCTATCTAA ACACAAAGAG
2041   ACACGAGGAT TTGTTGCAAG CAGTAAACCA TATAATGGTT GTTCAGAGCT CACTAACCCT
2101   GAGCCAGTGA TGGGAAAAAT TGCTTGATA CAAAGAGGAC AGTGCATGTT TGCAGAAAAG
2161   GCACGCAACA TTCAGAAATG TGGCGCCATC GGTGGCATTG TGATCGATGA CAACGAGGGG
2221   AGCAGTAGCG ACACGGCTCC CCTGTTCCAG ATGGCCGGCG ATGGGAAGGA CACAGACGAC
2281   ATCAAGATCC CCATGCTCTI CCTGTTCCAG AAGGAAGGCA GCATCATCCT GGACGCCATC
2341   CGCGAGCACA AGCAGETGGA GGTGCTCCTT TCTGACAAAG CGAGAGACAG AGATCCCGAA
2401   ATGGAAAATG AAGACCAACC ATCTTCTGAA AATGATCTC AGAATCAGG CSCAGAGCAG
2461   ATGCTCTCGC TTTCTCAGAC AGTCGACTTG ECTGATAAGG AGAGCCCTGA ACACCCTGCA
2521   GATCTCTACT CAGAGGCATC TCCATCGGAC AGTGAAGAGG CTGCTGGCTT TGCCCCCTCT
2581   GAACAGATAT CTGGGTCCAC CGAAAACCAC GAGACTACAA GCCTTGATGG TGAATGTACA
2641   GACTTAGATA ACCAAGTCCA AGAACAATCA GAAACTGAGG AAGATTCCAG TCTAATGTC
2701   AGCTGGGGTA CAAAGGCCCA GCCTATAGAC TCCATATTAG CAGACTGGAA TGAAGACATA
2761   GAAGCATTTG AAATGATGGA GAAGGATGAA CTATGA 2796

```

secvența 2:



10	20	30	40	50	60
MSKAGGCRGC	GCRVPQRASW	SLVAATAALC	LVLATSVCTA	GAAPMSREEK	QKLGNOVLEM
70	80	90	100	110	120
FDHAYGNYME	HAYPADELMP	LTCRGRVRGQ	EPSRGDVDDA	LGKFSLTLID	SLDTLVVLNK
130	140	150	160	170	180
TKEFEDAVRK	VLRDVNLDND	VVVSVPETNI	RVLGGLLGGH	SLAIMLKEKG	EHMOWYNDEL
190	200	210	220	230	240
LHMAKQLGYK	LLPAFNTTSG	LPYPRINLKF	GIRKPEARTG	TETDTCTACA	GTLILEFAAL
250	260	270	280	290	300
SRFTGATIFE	EYARKALDFL	WEKRQRSSNL	VGVTINIHTG	DWVRKDSGVG	AGIDSYYEYL
310	320	330	340	350	360
LKAYVLLGDD	SFLERFNTHY	DAIMRYISQP	PLLLDVHIHK	PMLNARTWMD	ALLAFFPGLQ
370	380	390	400	410	420
VLKGDIRPAI	ETHEMLYQVI	KKENFLPEAF	TTDFRVHWAQ	HPLRPEFAES	TYFLYKATGD
430	440	450	460	470	480
PYYLEVGTKL	IENLNKYARV	PCGFAMKDV	RTGSHEDRMD	SFFLAEMFKY	LYLLFADKED
490	500	510	520	530	540
IIFDIEDYIF	TTEAHLPLW	LSTTNRSISK	KNTTSEYTEL	DDSNFDWTCP	NTQILEPNDF
550	560	570	580	590	600
LYAQSIREPL	KNVVDKSCPR	GIIRVEESFR	SGAKPPLRAR	DFMATNPEHL	EILKKMGVSL
610	620	630	640	650	660
IHLKDGRVQL	VQHAIQAASS	IDAEDGLRFM	QEMIELSSQQ	QKEQQLPPRA	VQIISHPFFG
670	680	690	700	710	720
RVVLTAGPAQ	FGLDLSKHKE	TRGFVASSKP	YNGCSELTNP	EAVMGKIALI	QRGQCMFAEK
730	740	750	760	770	780
ARNIQNAGAI	GGIVIDDNEG	SSSDTAPLFQ	MAGDGKDTDD	IKIPMLFLFS	KEGSIILDAI
790	800	810	820	830	840
REHKQVEVLL	SDKARDRDPE	MENEDQPSSE	NDSQNQSAEQ	MLSLSQTVDL	ADKESPEHPA
850	860	870	880	890	900
DSHSEASPSD	SEEAAGFAPS	EQTSGSTENH	ETTSLDGECT	DLDNQVQEQS	ETEEDSSPNV
910	920	930			
SWGTKAQPID	SILADWNEDI	EAFEMMEKDE	L		

Fig. 2 Primeri:

Sens: 5'-GATTGGATCCATGAGGGAAGAGAAGCAGAAGCTTGG (*Bam*HI)

Antisens: 5'-GATTGCGGCCGCTCATAGTTCATCCTTCTCCATCATTTTC (*Not*I)



Figura 3.

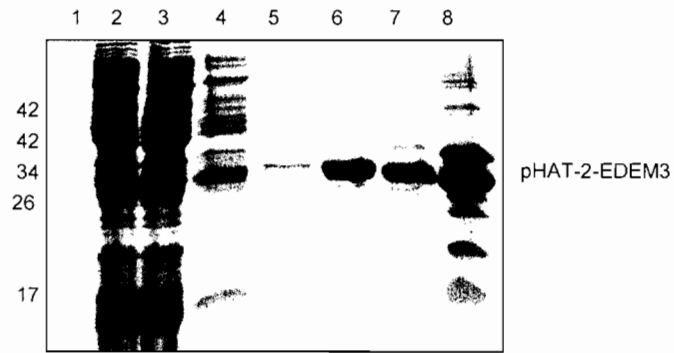


Figura 4.

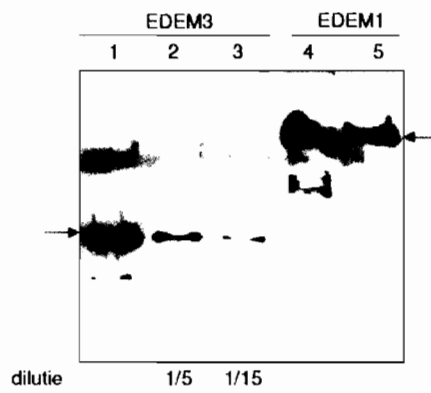
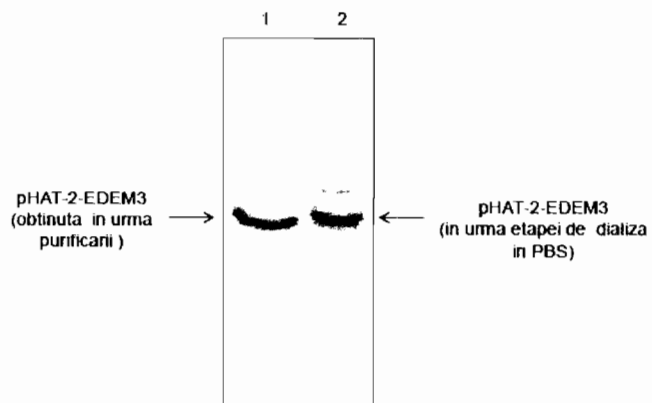


Figura 5.



JML

5

Figura 6.

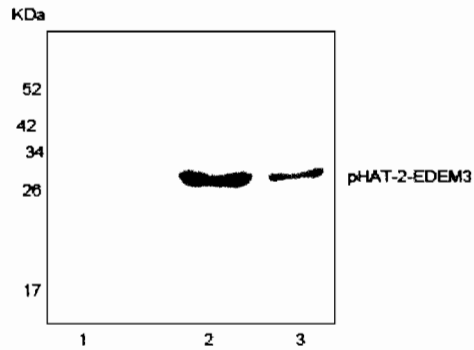


Figura 7.



Fig. 8a.

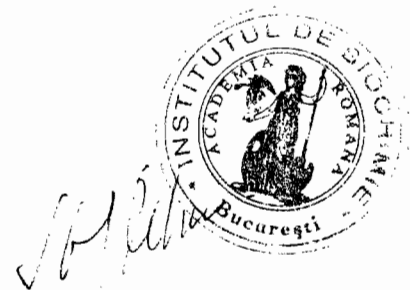
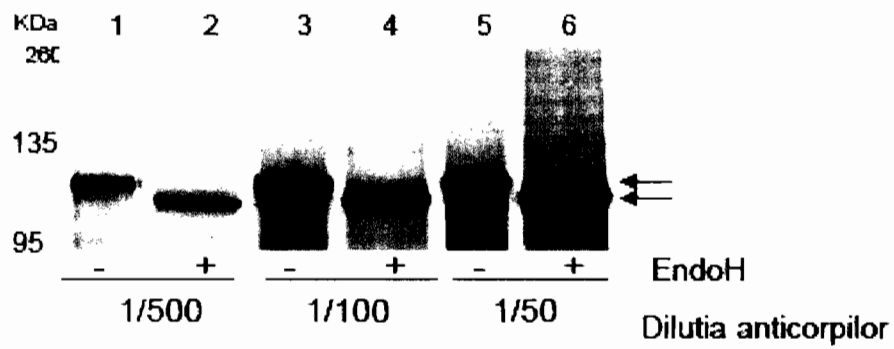


Fig 8b.

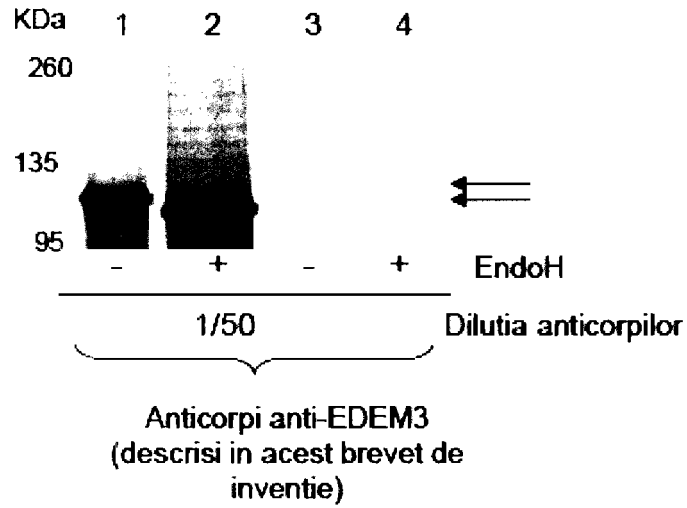


Fig 8c.

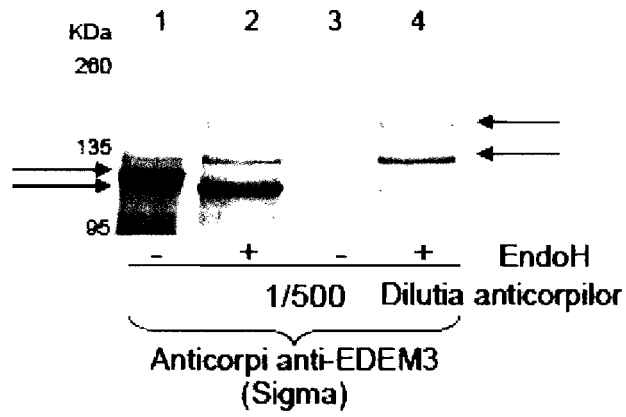


Fig 9.a.

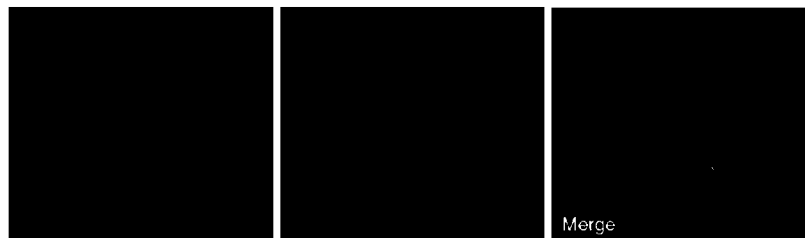


Fig 9.b.

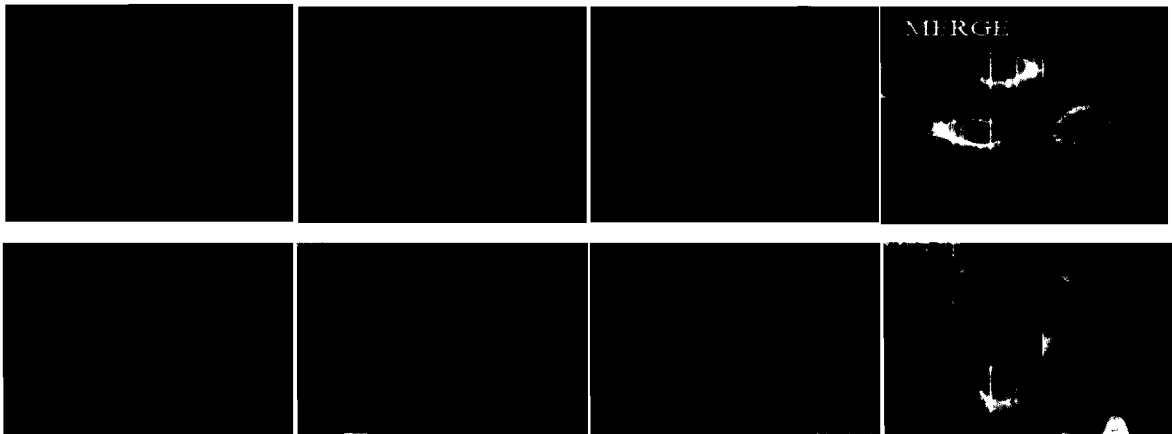


Fig 9.c.

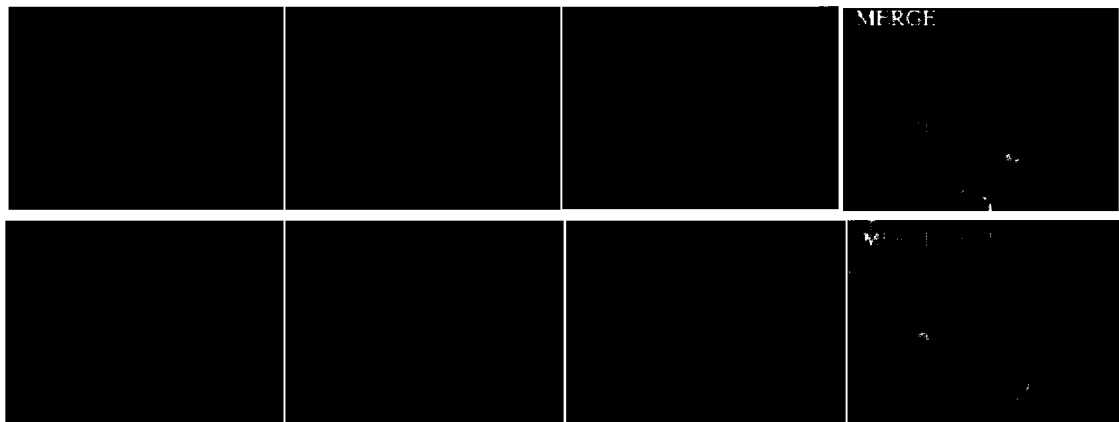


Fig 9.d.

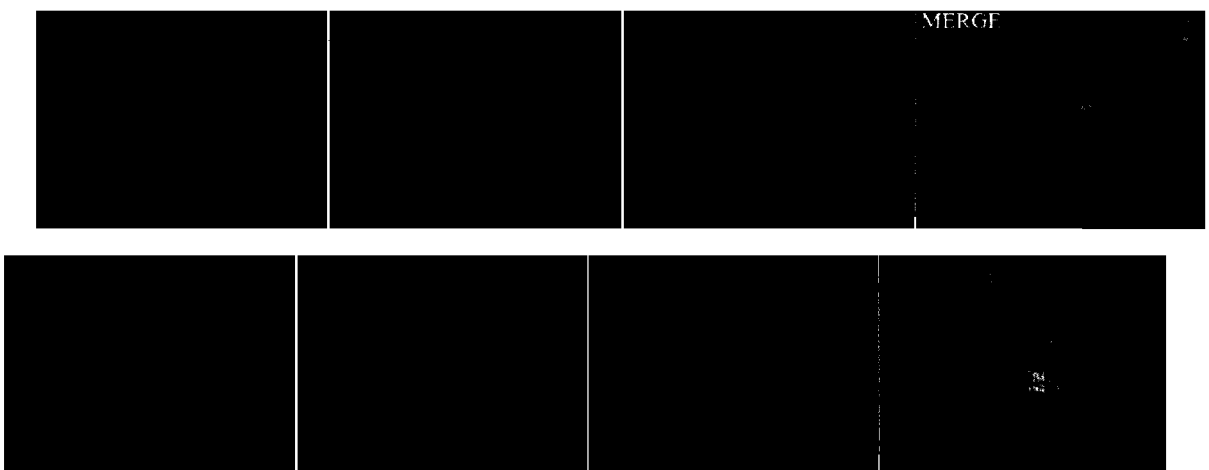


Fig 9.e.

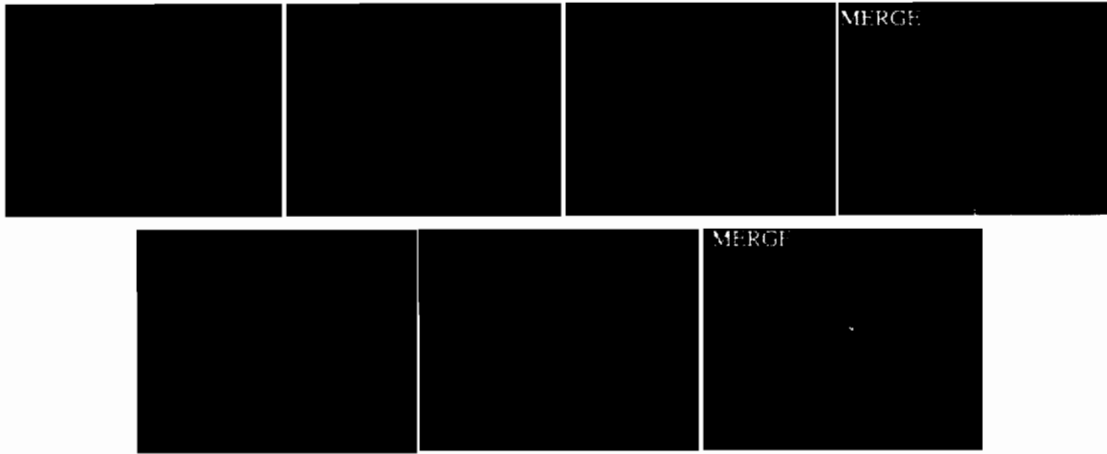


Fig 9.f.

