



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2014** BOPI nr. **5/2014**

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

(73) Titular:
• **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.18 D, ET.6, AP.23,
BUZĂU, BZ, RO;

• **PETRESCU ȘTEFANA-MARIA,**
STR.POSTĂVARUL NR.5, BL.C 5, SC.7,
ET.4, AP.85, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
PAGINILE DE PREZENTARE ALE FIRMEI
SIGMA-ALDRICH; KAZUYOSHI HIRAO ȘI
COLAB., "EDEM3, A SOLUBLE EDEM
HOMOLOG, ENHANCES GLYCOPROTEIN
ENDOPLASMIC RETICULUM-
ASSOCIATED DEGRADATION AND
MANNOSE TRIMMING", THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.281,
NO.14, PP.9650-9658, APRIL 7, 2006

(54) **ANTICORPI POLICLONALI ANTI-EDEM3**



RO 127273 B1

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

3 EDEM3 este o glicoproteină rezidentă în reticulul endoplasmatic (RE), implicată în
5 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
7 în reticulul endoplasmatic nu este pe deplin cunoscut.

9 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.

11 În domeniu sunt cunoscuți anticorpii comerciali anti-EDEM3 ce provin de la Sigma-
Adrich având secvența imunogenă corespunzătoare secvenței de aminoacizi 470-485, 869-
13 882 și 869-8825 de EDEM3 uman (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/E8906/lang=en®ion=RO>).

15 În documentul *a Soluble EDEM Homolog, Enhances Glycoprotein Endoplasmic Reticulum associated Degradation and Mannose Trimming** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL
17 CHEMISTRY VOL. 281, NO. 14, pp. 9650–9658, April 7, 2006, Kazuyoshi Hirao¹ și colab.
(<http://www.uniprot.org/uniprot/Q92611>), se descrie faptul că acest control al calității în reticulului
19 endoplasmatic garantează că numai proteinele pliate sunt reținute în celule prin intermediul
unor mecanisme ce recunosc și îndepărtează proteinele pliate eronat sau neasamblate, într-un
21 proces denumit degradarea reticulului endoplasmatic - asociate (ERAD). Anterior, s-a clonat
EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein) și s-a arătat că accelerează
23 ERAD a glicoproteinelor pliate eronat.

 Problema pe care o rezolvă invenție este de a obține anticorpi policlonali anti-EDEM3.

25 Anticorpii policlonali anti-EDEM3 înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că au
specificitate față de regiunea trunchiată solubilă a proteinei EDEM3 cu secvența de amino-
27 acizi din fig. 1, Secv. Nr. 2.

 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

29 - anticorpii policlonali descriși în acest brevet de invenție recunosc specific proteina
EDEM3, atât proteina transfectată cu plasmida pTriEx-EDEM3, cât și cea endogenă;

31 - anticorpii obținuți pot fi folosiți pentru evidențierea proteinei EDEM3 cu o specifi-
citate mai mare față de cea a anticorpilor anti EDEM3 comerciali, prin faptul că aceștia nu
33 recunosc nespecific și alte proteine din lizatele celulare folosite;

35 - anticorpii descriși în acest brevet de invenție pot fi folosiți în diverse tehnici cum ar
fi: Western blotting, imunoprecipitare, imunofluorescență;

37 - 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
39 degradarea altor proteine depliate.

41 Anticorpii conform invenției pot fi obținuți folosind un fragment din ADNc al acestei
proteine (aa 47-225), donat în vectorul de expresie pHAT-2 care a fost exprimat în sistem
procariot. Fragmentul din proteina EDEM3 recombinantă prezintă 6 histidine în capătul N-ter-
43 minal 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
45 cu proteina recombinantă 6His-EDEM3.

47 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

RO 127273 B1

transfecția vectorului pTriEx-EDEM3, cât și proteina EDEM3 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, cât 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. Aceasta 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.

În continuare se prezintă 9 exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...9, ce 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 donarea proteinei recombinante pHAT-2-EDEM3;

- fig. 3 - analiza SDS-PAGE pentru verificarea expresiei 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 - spălări; 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 EDEM3 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, 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 EDEM3 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

RO 127273 B1

1 embrionare de rinichi uman) transfectate cu EDEM3, și celule HEK293 care nu au fost
2 transfectate. Apoi au fost digerate cu enzima endoglicozidază H (EndoH) pentru a urmări
3 modificarea compoziției glucidice a proteinei EDEM3, atunci când trece din lumenul RE în
4 aparatul Golgi. Proteinele prezente în lizatele celulare au fost separate prin SDS-PAGE, apoi
5 transferate pe membrane de nitroceluloză și detectate cu anticorpii prezentați în acest brevet
de invenție;

7 - fig. 8 - marcarea radioactivă a proteinei EDEM3 cu [³⁵S] metionină/cisteină.

8 În acest experiment s-au folosit celule aderente HEH 293 T (celule embrionare de
9 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.

11 În fig. 8a este prezentată marcarea cu [³⁵S] a celulelor transfectate cu plasmida
pTriEx-EDEM3, și imunoprecipitarea cu anticorpii descriși în acest brevet de invenție în trei
13 diluții diferite. Analiza s-a realizat prin SDS-PAGE și autoradiografierea în condiții
reducătoare.

15 În fig. 8b este reprezentată marcarea cu [³⁵S] a celulelor transfectate cu plasmida
pTriEx-EDEM3 (liniile 1 și 2), marcarea cu [³⁵S] a celulelor netransfectate (liniile 3 și 4) și
17 imunoprecipitarea cu anticorpii anti-EDEM3 descriși în acest brevet.

19 În fig. 8c este reprezentată marcarea cu [³⁵S] a celulelor transfectate cu plasmida
pTriEx-EDEM3 (liniile 1 și 2), marcarea cu [³⁵S] a celulelor netransfectate (liniile 3 și 4) și
21 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.

23 În fig. 8c, se observă că anticorpii produși de firma Sigma recunosc nespecific
25 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 plasmida pTriEx-EDEM3 și pe celule care
27 exprimă constitutiv această proteină. Din fig. 8b se observă că anticorpii acestei invenții
recunosc specific atât proteina transfectată în celule, cât și proteina endogenă, diferența fiind
29 dată de o recunoaștere mai slabă a proteinei endogene. Se mai poate observa că atât în
celule transfectate, cât și în celule netransfectate cu plasmida pTriEx-EDEM3, anticorpii nu
31 recunosc decât proteina de interes în comparație cu anticorpii comerciali (Sigma) ce
recunosc nespecific și alte proteine. În aceste trei experimente a fost realizată digestia cu
33 endoglicozidază H (EndoH) deoarece, prin digestia cu această enzimă a părții glucidice a
glicoproteinei, a fost urmărită modificarea compoziției glucidice a proteinei EDEM3, atunci
35 când aceasta trece din lumenul reticulului endoplasmatic în aparatul Golgi. Acest lucru
servește drept control pozitiv pentru determinarea poziției de migrare electroforetică a
37 polipeptidului deglicozilat;

39 - fig. 9 - utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM3 prin imuno-
fluorescență;

41 - fig. 9a - colocalizarea intracelulară a proteinei EDEM3 cu calreticulină (Crt) în celule
A375 transfectate cu plasmida pTriExEDEM3.

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

47 - fig. 9b, 9c - colocalizarea intracelulară a proteinei EDEM3 cu calnexină (CNX) în
celule HUH7 (fig. 9b) și celule HUH7 transfectate cu plasmida pTriEx-EDEM3 (fig. 9c).

În fig. 9b, celulele HUH7 au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anti-calnexină. Anticorpul secundar folosit a fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (CNX). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI. 1
3

În fig. 9c, celulele HUH7 transfectate cu plasmida pTriEx-EDEM3 au fost fixate, permeabilizate apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-calnexină. Anticorpul secundar folosit a 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. Anticorpul descriși în acest brevet de invenție recunosc specific atât proteina transfectată, cât și proteina endogenă. 5
7
9

În fig. 9d, celulele HUH7 transfectate cu plasmida pTriEx-EDEM au fost fixate, permeabilizate, apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-EEAI (Early Endosome Marker). Anticorpul secundar folosit a fost AlexaFluor 488 (EDEM3) și AlexaFluor 594 (EEAI). Pentru vizualizarea nucleilor s-a folosit DAPI. Se observă în această figură că proteina EDEM3 nu colocalizează cu EEA1, așa cum era de așteptat datorită localizării intracelulare diferite. 11
13
15

În fig. 9e, celulele HUH7 transfectate cu plasmida pTriEx-EDEM3 au fost fixate, permeabilizate, apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-RAB7. Anticorpul secundar folosit a 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 așteptat, datorită localizării intracelulare diferite. 17
19
21

În fig. 9f, celulele HUH7 transfectate cu plasmida pTriEx-EDEM3 au fost fixate, permeabilizate, apoi marcate cu anticorpi anti-EDEM3 și anticorpi anti-LAMP2 (Lysosome Marker). Anticorpul secundar folosit a 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 așteptat, datorită localizării intracelulare diferite. 23
25
27

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 EDEM3 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 BamHI și, respectiv, NotI (fig. 2). Ampliconul a fost supus digestiei cu enzimele BamHI și NotI, 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 clona pozitivă a fost în continuare supus digestiei enzimatice cu enzima BsrGI, urmată de electroforeză. Fragmentul de ADN care conține vectorul, primele 676 de perechi de bază și ultimele 161 pb 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. 29
31
33
35
37
39
41
43

Exemplul 2. Obținerea expresiei proteinei EDEM3 recombinante în sistem procariot

Pentru obținerea proteinei recombinante au fost parcurse două etape: expresia și purificarea proteinei EDEM3 recombinante. 45

Proteina utilizată în acest studiu a fost proteina pHAT-2-EDEM3, și reprezintă secvența de aminoacizi 47-225 din gena EDEM3. Strategia de donare a genei ce codifică pentru EDEM3 este prezentată la exemplul 1. 47
49

1 Testele de optimizare a expresiei au vizat principalii parametri care influențează
2 expresia proteinelor în sistem procariot: temperatura, timpul de inducție, tipul celulelor și
3 concentrația de inductor, β -D-izopropil-tiogalactozid (IPTG). Condițiile optime de expresie
4 au fost creșterea celulelor BL21(DE3) (a fost aleasă această linie celulară deoarece conține
5 gena pentru T7 ARN polimeraza) la temperaturi cuprinse între 30 și 37°C, și 150...250 rpm,
6 până la densitatea optică ce este cuprinsă între 0,5 și 0,7 nm. Celulele au fost induse cu IPTG
7 în concentrații cuprinse între 0,4 și 0,8 mM, timp de 4...6 h. Celulele obținute au fost resuspen-
8 date în tampon de extracție care conține: tampon fosfat de potasiu 50 mM, NaCl 300 mM,
9 și 20 mM imidazol, pH 7. În acest tampon s-au adăugat inhibitori de proteaze, DNA-ză
10 (50 μ g/ml) și lizozim (1 mg/ml), și au fost incubate 30 min pe gheață. Celulele resuspendate
11 în vederea eliberării conținutului celular au fost supuse lizei cu ajutorul unui aparat (sonicator
12 Bandelin Electronic) 10 s, putere 70%, 7 cicluri. Omogenatul obținut din aceste celule a fost
13 centrifugat la 14000 x g, 30 min, la 4°C. În urma acestei centrifugări s-a separat extractul
14 conținând proteinele solubile. Proteina EDEM3 a fost vizualizată prin SDS-PAGE în fracția
15 solubilă, fracție care a fost folosită ulterior la etapa de purificare prin cromatografie de afinitate.
16 Proteinele exprimate în vectorul de expresie pHAT-2 sunt fuzionate cu o oligopeptidă formată
17 din 6 resturi de histidină la capătul N-terminal al proteinei, și pot fi astfel purificate aproape
18 omogen prin cromatografie de afinitate pe rășină chelată cu Ni²⁺. În fig. 3 se prezintă etapele
19 purificării. Datele finale optime pentru expresia și purificarea proteinei EDEM3 au fost folosite
20 în continuare pentru obținerea unor cantități mai mari de proteină purificată.

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

23 Proteina purificată a fost verificată prin tehnica Western Blot folosind anticorpi anti
24 His (Sigma), deoarece proteina EDEM3 a fost clonată în vectorul de expresie pHAT-2 (fig. 4).

25 Această verificare s-a făcut prin migrarea probele prelevate pe parcursul etapelor de
26 expresie și purificare, și anume: supernatantul în urma sonicării (neindus cu IPTG - luat drept
27 control negativ), fracția insolubilă obținută în urma sonicării (fără IPTG), fracția solubilă
28 obținută în urma sonicării (indus cu IPTG), și în urma purificării proteinei (proteinele din
29 fracția solubilă care au rămas nelegate de rășină), eluatul obținut în urma eluției cu diferite
30 diluții de IPTG și proteină pHAT-2-EDEMI purificată (drept control pozitiv) în diluție 1/5,
31 proteina pHAT-2- EDEM1 purificată (drept control pozitiv) în diluție 1/15. Detecția proteinelor
32 s-a realizat cu ajutorul anticorpilor anti-HIS (care provin de la Sigma). Din fig. 4 se observă
33 că anticorpii anti-His se leagă specific de cele două proteine EDEM3 și EDEM1. Din acest
34 experiment rezultă că proteina obținută în urma purificării prin cromatografie de afinitate este
35 proteina 6His - EDEM3.

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

37 Proteina pHAT2-EDEM3 a fost dializată față de tampon fosfat salin cu pH 7,4, pentru
38 îndepărtarea imidazolului adăugat la eluarea proteinei de pe rășină de agaroză și a sărurilor.
39 Dializa s-a realizat în pahar erlenmeyer de 3 l, care a fost umplut cu soluție PBS. Proteina
40 a fost mutată în saci de dializă, în membrane impermeabile pentru proteine, dar permeabile
41 pentru substanțe neproteice. Dializa se poate face la temperaturi de 4...10°C, cu schimb la
42 fiecare oră. Proteina obținută în urma dializei a fost analizată prin metoda Bradford, de
43 determinare a proteinei totale, și vizualizată prin SDS-PAGE în fig. 5.

44 **Exemplul 5. Concentrarea proteinei recombinante prin liofilizare**

45 Frațiile de eluat culese la etapa de purificare prin cromatografie de afinitate au fost
46 analizate pentru determinarea concentrației de proteină prin citirea absorbantei la 595 nm
47 prin metoda Bradford. Acesta 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.

RO 127273 B1

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 h. Metoda presupune transformarea directă din gheață în vapori, și se realizează la temperatură mică (-50... -55°C) și vid. Scopul folosirii acestei metode a fost de a obține produși ușor solubili în apă, care să aibă aceleași caracteristici ca produsul original după adăugarea 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 fig. 6, liniile 1 și 2).

Exemplul 6. Obținerea anticorpilor anti-EDEM3

După 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 EDEM3 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 preimun folosit drept control negativ. După fiecare imunizare s-a recoltat sânge pentru verificarea răspunsului imun și pentru testarea titlului anticorpilor (fig. 7). După 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, imunofluorescență și imunoprecipitare, și în comparație cu anticorpii comerciali existenți anti-EDEM3 (ce provin de la Sigma).

Exemplul 7. Utilizarea anticorpilor pentru identificarea proteinei EDEM3 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 de nitroceluloză sau poliviniliden fluorid (PVDF), unde sunt detectate cu ajutorul anticorpilor specifici.

Pentru identificarea proteinelor de interes (EDEM3) 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 evidențierea 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 1 h, cu agitare. A urmat etapa de spălare a excesului de anticorpi cu soluție PBS + Tween 20 0,2% (6 spălări timp de 10 min).

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

Exemplul 8. Marcarea radioactivă a proteinei EDEM3 cu [³⁵S] metionină/cisteină

Marcarea metabolică a celulelor s-a făcut cu scopul de a identifica apoi calea pe care o urmează în celulă proteina EDEM3 care a fost marcată la intervalul de 20 de min. 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.

RO 127273 B1

1 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 vitei 10%, 50 U/mL penicilină și 50 mg/mL
3 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 h după transfecție celulele au
5 fost resuspendate în mediu RPMI 1640 fără cisteină și metionină, conținând 1% ser fetal
inactivat, timp de 1 h, la 37°C. Apoi s-a realizat marcarea proteinelor în curs de sinteză (puise)
7 cu [³⁵S] metionină/cisteină, timp de 20 min, la 37°C. Imediat după puise, celulele au fost
spălate cu PBS rece, și apoi lizate în tampon HEPES/CHAPS (50 mM HEPES, pH=7,5, 2%
9 CHAPS, 200 mM NaCl și 0,5% inhibitori de proteaze), timp de 30 min, pe gheață. Lizatele
celulelor marcate radioactiv au fost transfectate, celulele au fost resuspendate în mediu RPMI
11 1640 fără cisteină și metionină, conținând 1% ser fetal inactivat, timp de 1 h, la 37°C. Apoi
s-a realizat marcarea proteinelor în curs de sinteză (puise) cu [³⁵S] metionină/cisteină, timp
13 de 20 min, la 37°C. Imediat după puise, 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%
15 inhibitori de proteaze), timp de 30 min, pe gheață. Lizatele celulelor marcate radioactiv au
fost centrifugate și supernatantele au fost incubate peste noapte, la 4°C, cu agitare cu anti-
17 corpilor anti-EDEM3 descriși în această invenție, sau anticorpilor anti-EDEM3 (Sigma) (fig. 8b,
Liniile 1, 2, 3, 4) și 30 μl proteină A Sepharose în suspensie. Proteina EDEM3 a fost eluată
19 în tampon de încărcare al probelor ce conține SDS 2% și 0,5 M DTT (condiții reducătoare).
Probele au fost migrate în gel de poli(acrilamidă) 12% și analizate prin autoradiografie. Anticorpilor
21 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 anticorpilor descriși în acest
23 brevet de invenție, cât și în cazul folosirii anticorpilor comerciali.

25 **Exemplul 9. Localizarea intracelulară a proteinei EDEM3 prin microscopie de
imunofluorescență**

27 Celulele utilizate în experiment sunt celule aderente ce cresc în monostrat la supra-
fața de creștere a recipientelor de cultură. Celulele au fost lăsate în incubator peste noapte,
pentru a permite atașarea lor de suprafață. A doua zi celulele au fost transfectate cu
29 proteinele pTriEx-EDEM3 și pTriEx-EDEMI și, în aceeași placă, am schimbat mediul celulelor
netransfectate, apoi celulele au fost incubate până ziua următoare. La finalul timpilor de incu-
31 bare, celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 4% (PFA), 15 min, și permeabilizare cu
Triton X-100. Celulele au fost incubate cu anticorpilor primari (iepure anti EDEM3, descriși în
33 acest brevet, folosiți în diluția de 1/100), capră anti Calnexina (Santa Cruz), șoarece anti
LAMP2 (Santa Cruz), șoarece anti EEAI (BD Biosciences), capră anti RAB7 (Santa Cruz),
35 capră anti Calregulină (Santa Cruz, diluați în PBS 1/200), apoi incubate cu anticorpilor secun-
darii. La final celulele au fost spălate și montate în mediu de vizualizare cu DAPI. Vizualizarea
37 celulelor în fluorescență a fost realizată la microscopul Nikon Eclipse E600.

RO 127273 B1

Revendicări

- | | |
|---|--------|
| | 1 |
| 1. Anticorpi policlonali anti-EDEM3, caracterizați prin aceea că au specificitate față de regiunea truncată, solubilă, a proteinei EDEM3, cu secvența de aminoacizi din fig. 1, Secv. Nr. 2. | 3
5 |
| 2. Anticorpi policlonali anti-EDEM3, conform revendicării 1, caracterizați prin aceea că se utilizează pentru diagnosticul stării de stres la nivel celular. | 7 |
| 3. Anticorpi policlonali anti-EDEM3, conform revendicării 1, caracterizați prin aceea că se utilizează pentru identificarea EDEM3 uman și de șoarece. | 9 |

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01),
A61K 38/47 (2006.01),
C07K 16/28 (2006.01)

secvența I

EDEM3 cDNA

```

1   ATGAGCAAAG CCGGGGGCTG CCGGGGGCTGT GGGTGCCGGG TCCCCCAGCG AGCGTCATGG
61  AGCCTGGTGG CAGCGACGGC CGCGCTCTGT CTGGTGTTGG CCACGTCCGT GTGCACGGCA
121 GGGGCCGCGC CCATGAGTAG GGAAGAGAAG CAGAAGCTTG GAAATCAAGT CCTGGAAATG
181 TTTGATCATG CTTATGGCAA CTATATGGAA CATGCCCTACC CAGCTGATGA GCTCATGCCT
241 TTAACCTGCC GGGGCCGTGT CAGAGGCCAG GAGCCCAGCC GGGGCGATGT GGATGACGCC
301 TTGGGAAAGT TTTCCCTAAC ACTGATTGAT TCTTTGGACA CTCTTGTTGG ATTTAAACAAA
361 ACTAAGGAAT TTGAAGATGC TGTGAGAAAA GTTTTAAGGG ATGTTAATTT AGATAATGAT
421 GTAGTTGTTT CAGTCTTCGA AACAAACATC AGAGTTCTTG GGGGTCTTTT GGGCGGACAC
481 TCGCTGGCCA TCATGCTGAA GGAGAAAGGC GAGCACATGC AGTGGTACAA TGACGAGCTC
541 CTCCACATGG CAAAGCAGCT GGGTTACAAG CTCCTGCCAG CTTTCAACAC CACCAGCGGC
601 CTTCCTGACC CCAGGATTAA TTTAAAGTTT GGCAFCAGAA AACCAGAAGC CAGGACGGGA
661 ACTGAGACAG ACACCTGTAC AGCCTGTGCA GGCACCTTGA TCCTCGAGTT TGCTGCCTG
721 AGTOGATTC AAGAGCGAC GATATTTGAG GAATATGCAA GAAAAGCTCT TGATTTTCTC
781 TGGGAGAAAA GACAGCGAAG TAGCAATTTA GTAGGCGTGA CTATCAATAT TCATACTGGA
841 GACTGGGTAC GCAAAGATAG TGGAGTTGGA GCGGGGATCG ACTCCTATTA TGAGTATCTG
901 TTGAAAGCCT ATGTCTTGCT TGGAGATGAC AGTTTCTTGG AAAGATTTAA TACACATTAC
961 GATGCCATAA TGAGGTATAT AAGCCAGCCA CCTCTCCTAC TTGATGTGCA TATCCACAAA
1021 CCAATGCTGA ACGCTCGGAC CTGGATGGAT GCATTGCTTG CCTTTTTTCC AGGTTTGCAG
1081 GTTTTAAAGG GTGATATTAG ACCTGCCTAT GAAACTCAG AAATGTTATA CCAGGTGATT
1141 AAAAAACACA ATTTTCTACC AGAGGCATTT ACTACAGATT TCAGGGTTCA TTGGGCTCAG
1201 CATCCTTTAA GGCCAGAGTT TGCAGAAAGT ACCTACTTCT TATATAAGGC TACAGGAGAC
1261 CCTTACTACC TTGAAGTAGG GAAAACACTT ATTGAAAATT TGAATAAGTA TGCTCGAGTG
1321 CCTTGGGGGT TTGCTGCCAT GAAGGATGTT CGCACTGGGA GTCATGAGGA CAGAATGGAT
1381 TCGTCTTCTT TGGTGAATAT GTTTAAATAC CTGTACTTGT TATTTGCTGA TAAAGGACTC
1441 ATCATTTTTG ACATAGAAGA CTATATCTTT ACAACAGAAG CTCATCTGTT ACCGCTTTGG
1501 CTTTCCACCA CAAACCGAAG CATCTCAAAG AAGAACACAA CCTCAGAATA CACAGAACTG
1561 GATGATAGTA ATTTTACTG GACTTGTCCA AACACTCAGA TTCTTTTTTCC TAATGATCCA
1621 TTGTATGCTC AGAGCATCCG TGAACCCTTG AAAAACGTGG TGGATAAGAG CTGTCCGAGA
1681 GGCATCATCA GAGTAGAGGA GAGTTTCAGA AGTGGAGCTA AGCCTCCTCT GAGAGCCAGA
1741 GATTTTATGG CCACTAACCC TGAACATTTA GAAATCCTGA AGAAGATGGG GGTGAGTTTG
1801 ATTCACCTCA AAGATGGGCG AGTCCAGCTG GTCCAACATG CAATCCAAGC TGCTAGTTCA
1861 ATTGATGCTG AAGATGGGTT ACGGTTCTAT CAGGAGATGA TAGAGCTGTC CAGTCAGCAA
1921 CAGAAGGAGC AGCAGCTGCC TCCACGAGCT GTCCAGATTA TCTCCCACCC GTTTTTTTGGC
1981 AGGGTCGTCT TAACTGCTGG ACCAGCTCAG TTTGGGCTGG ATCTATCTAA ACACAAAGAG
2041 ACACGAGGAT TTGTTGCAAG CAGTAAACCA TATAATGGTT GTTCAGAGCT CACTAACCTT
2101 GAGGCAGTGA TGGGAAAAAT TGCCTTGATA CAAAGAGGAC AGTGCATGTT TGCAGAAAAG
2161 GCACGCAACA TTCAGAATGC TGGCGCCATC GGTGGCATTG TGATCGATGA CAACGAGGGG
2221 AGCAGTAGCG ACACGGCCCC CCTGTTCCAG ATGGCCGGCG ATGGGAAGGA CACAGACGAC
2281 ATCAAGATCC CCATGCTGTT CCTGTTCCAG AAGGAAGGCA GCATCATCCT GGACGCCATC
2341 CGCGAGCACA AGCAGGTGGA GGTGCTCCTT TCTGACAAAAG CGAGAGACCG AGATCCCGAA
2401 ATGGAAAATG AAGACCAGCC ATCTTCTGAA AATGATTCTC AGAATCAGAG CGCAGAGCAG
2461 ATGCTCTCGC TTTCTCAGAC AGTGCAGTTG GCTGATAAGG AGAGCCCTGA ACACCCTGCA
2521 GATTCTCACT CAGAGGCATC TCCATCGGAC AGTGAAGAGG CTGCTGGCTT TGCCCCCTCT
2581 GAACAGATAT CTGGGTCCAC CGAAAACCAC GAGACTACAA GCCTTGATGG TGAATGTACA
2641 GACTTAGATA ACCAAGTTCA AGAACAATCA GAAACTGAGG AAGATTCCAG TCCTAATGTC
2701 AGCTGGGGTA CAAAGGCCCA GCCTATAGAC TCCATATTAG CAGACTGGAA TGAAGACATA
2761 GAAGCATTTG AAATGATGGA GAAGGATGAA CTATGA 2796

```

Fig. 1

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);

A61K 38/47 (2006.01);

C07K 16/28 (2006.01)

secvența 2:

```

10          20          30          40          50          60
MSKAGGCRGC GCRVPQRASW SLVAATAALC LVLATSVCTA GAAPMSREEK QKLGNOVLEM

70          80          90          100         110         120
FDHAYGNyme HAYPADELMP LTCRGRVVRGQ 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 VGVTTINIHTG DWVRKDSGVG AGIDSYYEYL

310         320         330         340         350         360
LKAYVLLGDD SFLERFNTHY DAIMRYISQP PLLLDVHIHK PMLNARTWMD ALLAFFPGLQ

370         380         390         400         410         420
VLKGDIRPAI ETHEMLYQVI KKHNFLEPAF TDFRVHWAQ HPLRPEFAES TYFLYKATGD

430         440         450         460         470         480
PYYLEVGKTL IENLNKYARV PCGFAAMKDV RTGSHEDRMD SFFLAEMFKY LYLLFADKED

490         500         510         520         530         540
IIFDIEDYIF TTEAHLPLW LSTTNRSISK KNTTSEYTEL DDSNFDWTCP NTQILFPNDP

550         560         570         580         590         600
LYAQSIREFPL KNVVDKSCPR GIIRVEESFR SGAKPPLRAR DFMATNPEHL EILKKMGVSL

610         620         630         640         650         660
IHLKDRVQL VQHAIQAASS IDAEDGLRFM QEMIELSSQQ QKEQQLPPRA VQIISHPPFG

670         680         690         700         710         720
RVVLTAGPAQ FGLDLSKHKE TRGPFVASSKP YNGCSELTNP EAVMGKIALI QRGQCMFAEK

730         740         750         760         770         780
ARNIQNAGAI GGIVIDDNEG SSSDTAPLFQ MAGDGKDTDD IKIPMLFLFS KEGSIILDAI

790         800         810         820         830         840
REHKQVEVLL SDKARDRDP MENEDQPSSE NDSQNQSAEQ MLSLSQTVDL ADKESPEHPA

850         860         870         880         890         900
DSHSEASPSD SEEAAGFAPS EQISGSTENH ETTSLDGECT DLNQVQEQS ETEEDSSPNV

910         920         930
SWGTKAQPID SILADWNEDI EAFEMMEKDE L

```

Fig. 1 (continuare)

Primeri:

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

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

Fig. 2

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01),
A61K 38/47 (2006.01),
C07K 16/28 (2006.01)

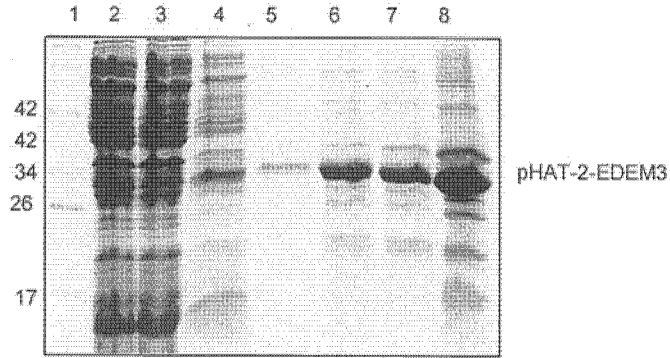


Fig. 3

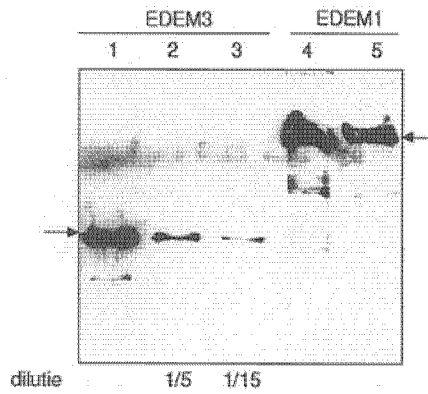


Fig. 4

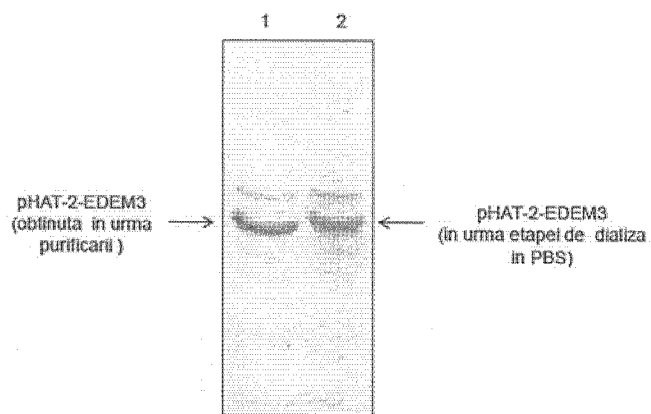


Fig. 5

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01);
A61K 38/47 (2006.01);
C07K 16/28 (2006.01)

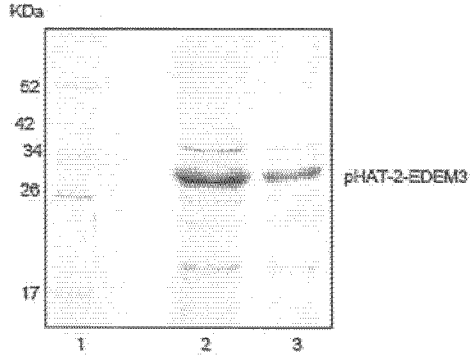


Fig. 6

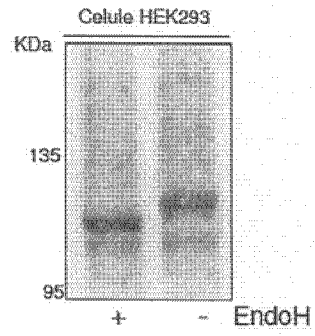
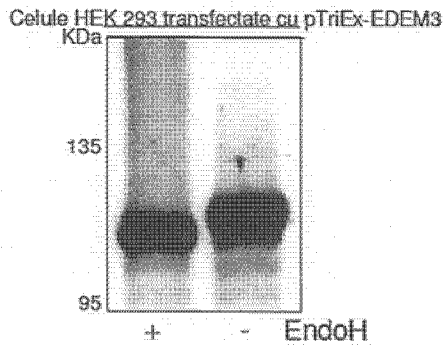


Fig. 7

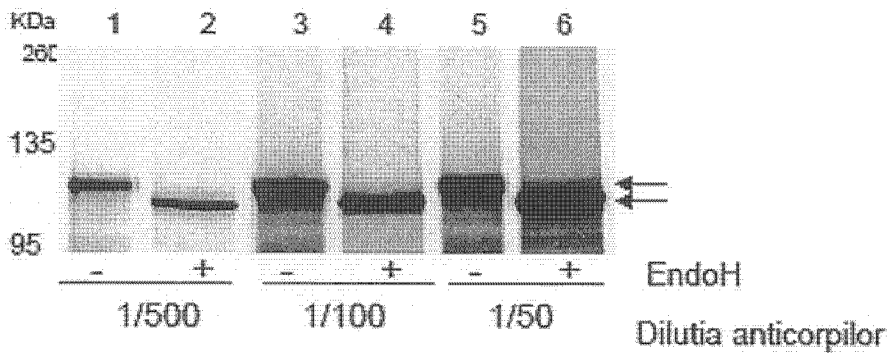


Fig. 8a

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01),
A61K 38/47 (2006.01),
C07K 16/28 (2006.01)

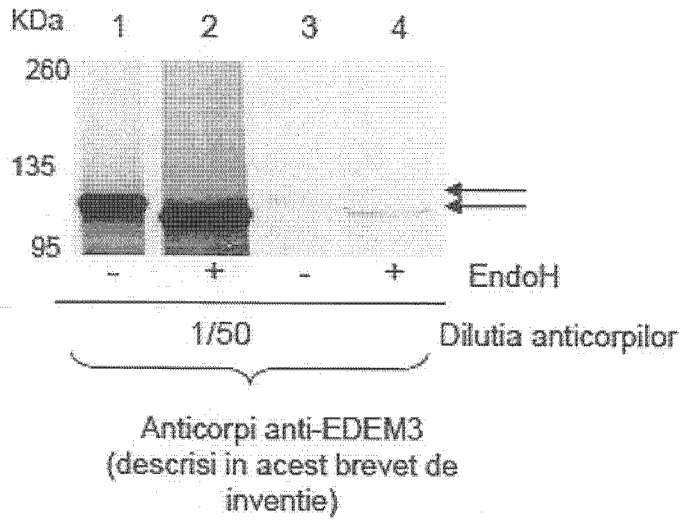


Fig. 8b

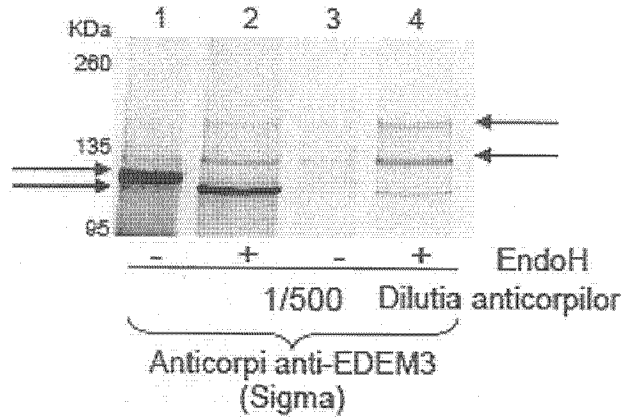


Fig. 8c

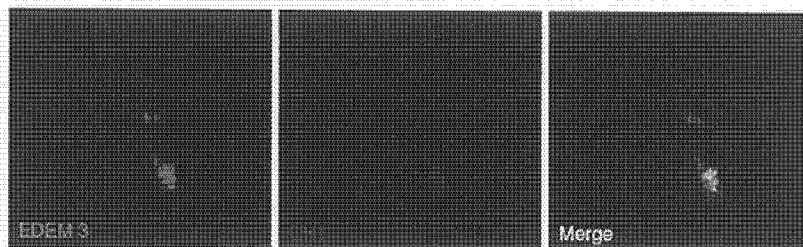


Fig. 9a

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01);
A61K 38/47 (2006.01);
C07K 16/28 (2006.01)

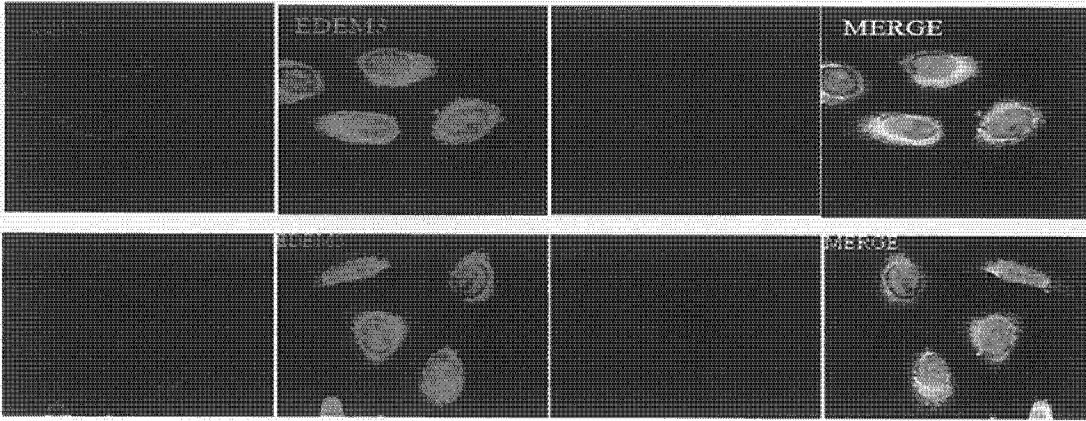


Fig. 9b

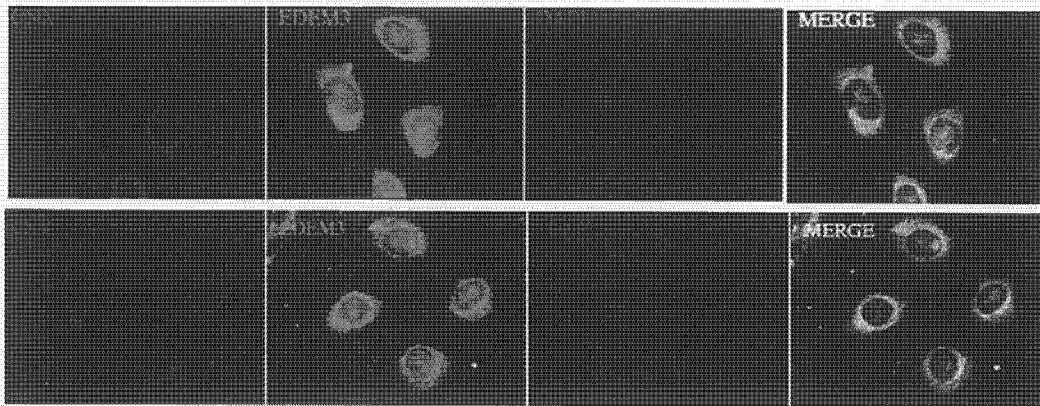


Fig. 9c

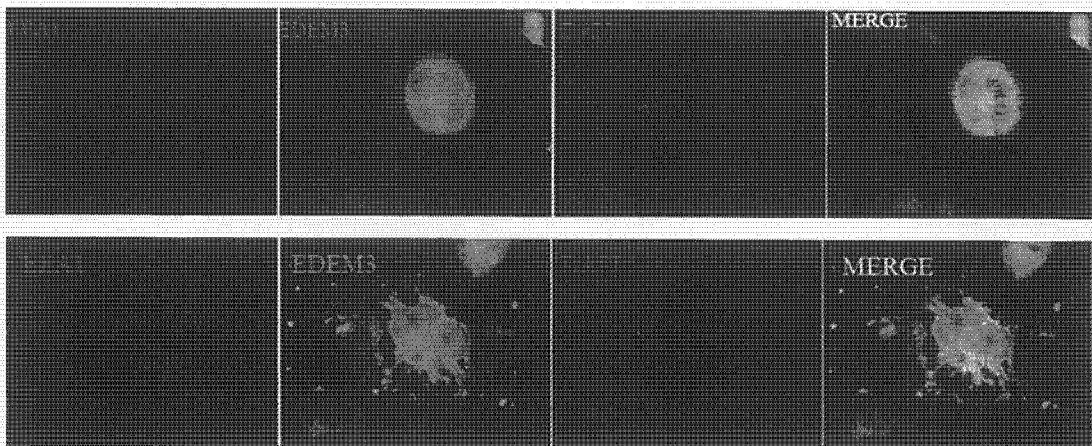


Fig. 9d

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01),
A61K 38/47 (2006.01),
C07K 16/28 (2006.01)

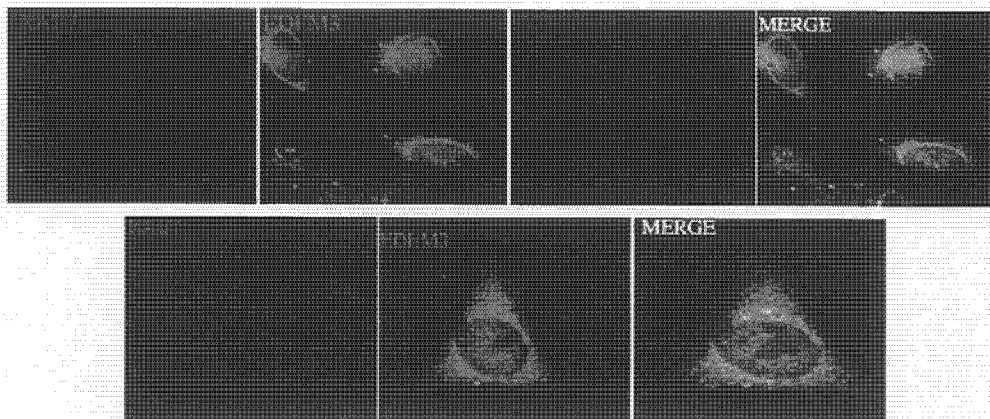


Fig. 9e

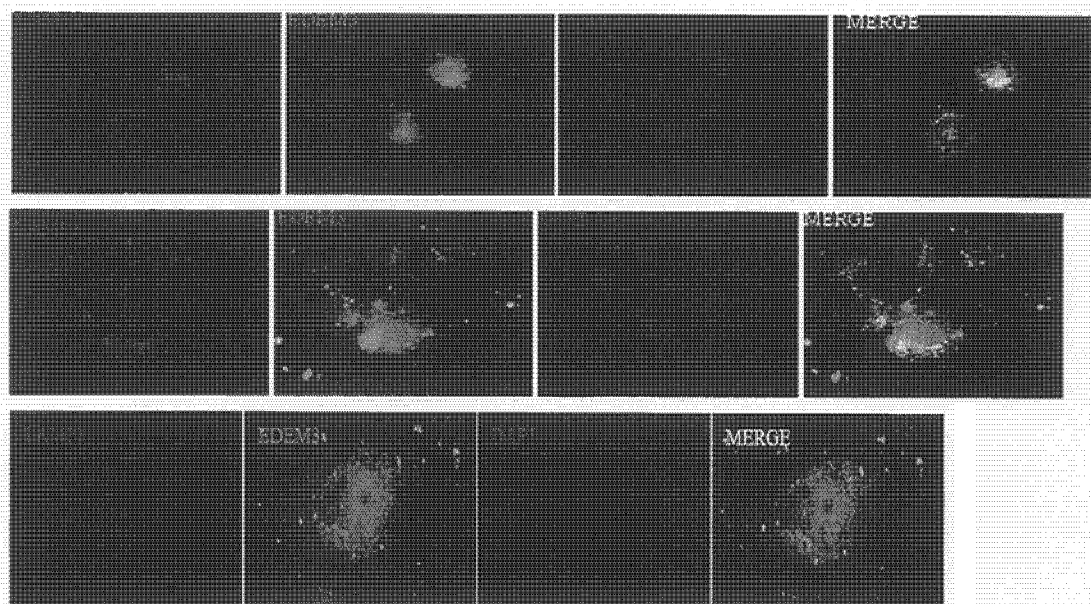


Fig. 9f

