

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 479**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05819055 .4**
96 Fecha de presentación: **18.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1814909**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **USO DE AIMP2DX2 PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:
24.11.2004 KR 20040097164
10.05.2005 KR 20050039073

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
NEOMICS CO., LTD.
NO. 307 105-1 DONG SEOUL NATIONAL
UNIVERSITY SAN 56-1 SHILLIM-DONG KWANAK-
GU
SEOUL 151-742, KR

72 Inventor/es:
KIM, Sunghoon

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 479 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de AIMP2DX2 para el diagnóstico y tratamiento del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una variante de AIMP2 que carece de exón 2, denominada como AIMP2DX2, que se expresa específicamente en las células cancerosas y su uso para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Descripción de la técnica relacionada

La tasa de mortalidad debida al cáncer continúa creciendo en el mundo. A pesar de los estudios colectivos acerca del cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo.

10 Se necesita un procedimiento capaz de diagnosticar cáncer en forma simple y rápida para aumentar los efectos de los procedimientos de tratamiento tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia o terapia convencional.

15 Se requiere el desarrollo de marcadores específicos para determinados cánceres a fin de diagnosticar cáncer así como también aplicar una terapia efectiva para el cáncer específico. La terapia citotóxica se ha usado ampliamente para tratar los cánceres durante los últimos 50 años tras haber sido usada en primer lugar como un agente anticáncer. La terapia tiene efectos secundarios serios, por ejemplo, ya que actúa en forma inespecífica en las células de otro órgano que tiene una velocidad de división celular rápida en comparación con las células cancerosas, lo que produce fuerte toxicidad. Para superar los efectos secundarios y la tolerancia de tales agentes anticáncer conocidos, se han realizado varios estudios para desarrollar medicamentos anticáncer que se activen específicamente en las células tumorales con el marcador específico de cáncer que se forma en la tumorigénesis de la célula normal al cáncer. En muy importante hallar genes específicos para las células cancerosas en la terapia dirigida al cáncer que se representa como un procedimiento para minimizar la toxicidad del agente anticáncer.

20 En tales circunstancias, los presentes inventores han realizado una investigación intensiva para desarrollar una nueva especie molecular específica del cáncer y como resultado, descubrieron que una variante de AIMP2 que carece del exón 2, AIMP2DX2 se expresa específicamente en las células cancerosas y se puede usar como un marcador para diagnosticar cáncer que proporciona resultados más confiables. Además, los presentes inventores han descubierto que el anticuerpo específico para la proteína de AIMP2DX2, o ARNs y oligonucleótido antisentido específico para el ARNm de AIMP2DX2 se puede aplicar para un procedimiento de tratamiento específico para las células cancerosas.

Descripción de la invención

30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de AIMP2DX2 que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de AIMP2 en la que está suprimida la región del exón 2 de la secuencia de aminoácidos de AIMP2, en la que AIMP2 tiene la secuencia:

```

1 mpmvqvkpyh gggaplrvel ptcmyrlpnh hgrsygpapg aghvqeesnl siqaalesrd
61 dilkrlyeik aavdglskmi qtpdadldvt niiqadeptt lttналdlns vlgkdygalk
121 divinanpas ppisllvlhr lcehfrvls tvhthssvks vpenllkcfg eqnkkqprqd
181 yqlgftliwk nvpktqmkfs iqtmcpiege gnlarflfsl fgqkhnava tlidswvdia
241 lfqlkegssk ekaavfrsmn salgkspwla gneltvadvv lswvlqqigg csvtvpanva
301 rwmrscenla pf.

```

o (b) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

35 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto. La molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector recombinante, que comprende una molécula de ácido nucleico del segundo aspecto.

40 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que se transforma con el vector recombinante del tercer aspecto, en el que la célula es una célula no humana o es una célula humana aislada que no es una célula madre embrionaria humana.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir la proteína de AIMP2DX2

del primer aspecto, que comprende cultivar la célula del cuarto aspecto.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo específico para la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto.

5 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un kit diagnóstico para cáncer, que comprende un anticuerpo del sexto aspecto.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar la proteína de AIMP2DX2 como un marcador de cáncer, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una muestra para analizar; y

10 (b) detectar en dicha expresión de la muestra de una molécula de ácido nucleico del segundo aspecto, en la que la detección de la expresión de la molécula de ácido nucleico es indicativa de cáncer. La detección en la etapa (b) se puede llevar a cabo por el contacto de dicha muestra con un anticuerpo del sexto aspecto. En forma alternativa, la detección en la etapa (b) se puede llevar a cabo por una reacción de amplificación o una reacción de hibridación. La reacción de amplificación se puede llevar a cabo por RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa – transcripción inversa) mediante un cebador capaz de diferenciar un ARNm de AIMP2DX2 del primer aspecto de un ARNm de
15 AIMP2. La reacción de hibridación se puede llevar a cabo por medio de una sonda capaz de diferenciar un ARNm del AIMP2DX2 del primer aspecto a partir de un ARNm de AIMP2, en el que AIMP2 tiene la secuencia:

```

1 mpmvqvkpyh gggaplrvel ptcmvrlpnh hgrsygpapg aghvqeesnl siqalesrqd
61 dilkryelk aavdglskmi qtpdadldvt niqadeptt lttaldlns vlgkdygalk
121 divinanpas ppisllvlhr lcehfrvls tvthssvks vpenllkcfg eqnkkqprqd
181 yqlgftliwk nvpktqmkfs iqtmcpiege gnlarflfsl fgqkhnava tlidswvdia
241 lfqlkegssk ekaavfrsmn salgkspwla gneltvadvv lwsvlqqigg csvtvpavva
301 rwmrscenla pf.

```

20 La secuencia del cebador puede comprender las SEQ ID Nos.5 y 6, 7 y 8 o 16 y 6. La secuencia de la sonda puede comprender las SEQ ID No. 8 o 16.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No.3. 4, 5, 6, 7, 8 o 16.

25 En un décimo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de ARNsi específica para el ARNm de la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto, en el que dicha molécula de ácido nucleico de los ARNsi comprende ARN sentido y antisentido que codifica la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10, SEQ ID Nos. 11 y 12 o SEQ ID Nos. 13 y 14.

En un undécimo aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido que es complementario con una región de unión entre los exones 1 y 3 de un ARNm de la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto.

30 En un duodécimo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar cáncer que comprende la molécula de ácido nucleico de ARNsi del décimo aspecto, o el oligonucleótido antisentido del undécimo aspecto.

En un decimotercero aspecto, la presente invención proporciona la molécula de ácido nucleico de los ARNsi del décimo aspecto, o el oligonucleótido antisentido del undécimo aspecto para su uso en el tratamiento del cáncer.

35 En un decimocuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de la molécula de ácido nucleico de ARNsi del décimo aspecto, o el oligonucleótido antisentido del undécimo aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un decimoquinto aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar un agente anticáncer que inhibe la formación de un heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto y la proteína de AIMP2, que comprende las etapas de:

40 (a) poner en contacto una sustancia de ensayo con una composición que comprende la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto y la proteína de AIMP2; y

(b) determinar si la sustancia de ensayo inhibe la formación de heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto y la proteína de AIMP2,

en el que la sustancia de ensayo para inhibir la formación de heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto y la proteína de AIMP2 se evalúa como un agente anticáncer, y en el que AIMP2 tiene la secuencia:

1 mpmvqvkpyh gggaplrvel ptcmyrlpvn hgrsygpapg aghvqeesnl slqalesrkd
 61 dilkriyelk aavdglskmi qtpdadldvt niqadeptt ltnaldlns vlgkdygalk
 121 divinanpas pplsllvlhr lcehfrvls tvthssvks vpenllkcfg eqnkkqprqd
 181 yqlgftllwk nvpktqmkfs iqtmcpiege gnlarflsl fgqkhnvna tlidswvdia
 241 ifqlkegssk ekaavfrsmn salgkspwla gneltvadvv lswvlqqigg csvtvpanva
 5 301 rwmrscenla pf.

El procedimiento se puede realizar por un ensayo doble híbrido en levadura o ensayo de interacción in vitro.

En un decimosexto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de seleccionar un agente anticáncer que inhibe la expresión del gen que codifica la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto, o promueve la alteración de la proteína de AIMP2DX2 del primer aspecto, que comprende las etapas de:

- 10 (a) poner en contacto una sustancia de ensayo con las células que expresan el gen de AIMP2DX2; y
 (b) determinar si la sustancia de ensayo inhibe la expresión del gen AIMP2DX2 o promueve la alteración de la proteína de AIMP2DX2,

en el que la sustancia de ensayo para inhibir la expresión del gen de AIMP2DX2 se evalúa como un agente anticáncer. El procedimiento se puede realizar por RT-PCR o transferencia Western.

15 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figs. 1a-1e representan la importancia funcional del AIM2 en la señalización del TGF-β y su interacción con Smad2/3. AIMP2^{+/+} y AIMP2/-MEF se compararon en el efecto de TGF-β sobre la proliferación celular (Fig. 1a), formación de colonia (Fig. 1b), progresión del ciclo celular (Fig. 1c), y translocación nuclear de Smad2 y Smad3 (Fig. 1d). En la Fig. 1a, las células se incubaron con las concentraciones indicadas (0, 2 y 4 ng/ml) de TGF-β1 durante 6
 20 horas. La incorporación de timidina en las células no tratadas se tomó como 1 y los valores son los promedios de cuatro experimentos independientes. En la Fig. 1b, AIMP2^{+/+} y AIMP2/-MEF (14,5 días) se cultivaron en presencia de TGF-β (2 ng/ml) durante 4 días, se fijaron con paraformaldehído, y las colonias se visualizaron con coloración de Giemsa. En la Fig. 1c, los MEF se trataron con TGF-β durante 24 horas y la porción de las células en fase G0/G1 se determinó por citometría de flujo. En la Fig. 1d, MEF se trataron con TGF-β (2 ng/ml) durante 1 hora. Smad2 y Smad3 se hicieron reaccionar con sus anticuerpos específicos y se visualizaron con anticuerpo conjugado con FITC
 25 (verde). Los núcleos se tiñeron con PI (rojo). En la Fig. 1e, las interacciones de AIMP2 con Smad2 y Smad3 analizaron por co-inmunoprecipitación con anticuerpos contra Smad2 y Smad3.

Las Fig. 2a-2f representan el mecanismo de acción de AIMP2 en la señalización de TGF-β. En la Fig. 2a, las células A549 se recolectaron en los tiempos indicados después del tratamiento de TGF-β (2 ng/ml) y las proteínas extraídas se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Smad2 o Smad3, y la coprecipitación de AIMP2 se determinó con anticuerpo anti-AIMP2. WCL representa las transferencias Western de las proteínas de los lisados celulares completos. En la Fig. 2b, la expresión de los genes blanco de TGF-β, p15, p21 y -PAI=I se determinó por RT-PCR en el control y DU145 transfectado por AIMP2. La Fig. 2c demuestra el efecto de AIMP2 sobre la fosforilación de Smad2 en AIMP2/-MEF. En la Fig. 2d, los diferentes dominios de Smad2 (Mad-dominio de homología, MH1, MH2 y ligador)
 35 se expresaron como proteínas de fusión LexA y se analizaron para determinar la interacción con AIMP2 fusionado con B42 por la formación de colonias azules en el medio de levaduras que contiene X-gal. En la Fig. 2e, la interacción dependiente de TGF-β de Smad2 con el receptor de TGF-β se determinó por coimmunoprecipitación. Los MEF se trataron con TGF-β a 37°C y se incubaron 8°C antes de la inmunoprecipitación. La asociación de receptor de TGF-β con Smad2 se controló por la inmunotransferencia con anticuerpo anti-TPRI. La Fig. 2f muestra el curso del tiempo del Smad2 total, niveles de Smad2 (p-Smad2) y AIMP2 fosforilados en AIMP2^{+/+} y AIMP2/- MEFs después del tratamiento con TGF.

Las Fig. 3a-3f representan la expresión diferencial de AIMP2 y la generación de su forma con supresión del exón 2. Los niveles de AIMP2 se compararon en varias líneas de células cancerosas por el análisis de transferencia Western (Fig. 3a) y citometría de flujo (Fig. 3b). A549, NCI-H460, -H322, y H290 son líneas celulares de cáncer de pulmón mientras que DU145 y HCT116 son líneas celulares de cáncer de próstata y colon, respectivamente. En la Fig. 3b, "negativo" indica que DU145 solo se trató con anticuerpo secundario. Se analizaron 2000 células para cada línea
 45

celular. En la Fig. 3c, el nivel de transcripto de AIMP2 se comparó por RT-PCR con diferentes pares de cebadores. Los exones que abarcan los transcritos 3-4 y 1-3 fueron generados con los pares de cebadores de 6/7 y 1/5 (ver Fig. 8b), respectivamente. GAPDH es un control de carga. Se observa la generación de un transcripto menor de AIMP2 desde el par cebador para el transcripto del exón -1-3. Este transcripto más pequeño es la forma de empalme alternativo de AIMP2 que carece del exón 2 (AIMP2DX2). Este transcripto se produjo solamente a partir de las líneas celulares AIMP2 bajas por RT-PCR con el cebador DX2-F y el otro específico para la secuencia de unión entre el exón 1 y 3 (DX2-B) (ver Fig. 8b). En la Fig. 3d, la inducción dependiente de TGF- β y la translocación nuclear de AIMP2 se examinaron por tinción con inmunofluorescencia después de la incubación con TGF- β durante 2 horas. En la Fig. 3e, el efecto de TGF- β se comparó con la proliferación de las células indicadas por incorporación de timidina [^3H] (n=9). En la Fig. 3f, la inducción dependiente de TGF- β de los genes blanco, p21 y PAI-1, se comparó por RT-PCR después de la incubación con TGF- β durante 2 horas.

Las Fig 4a-4h demostraron el efecto de AIMP2DX2 sobre la estabilidad celular del AIMP2. En la Fig. 4a, DX2 se transfectó en DU145 no tratado o tratado con TGF- β durante 2 horas y el nivel de AIMP2 se determinó por transferencia Western. La expresión de c-Myc, DX2 y GAPDH (control) se controló por RT-PCR. En la Fig. 4b, DX2 o el vector vacío se transfectó en DU145, y su efecto sobre la inhibición del crecimiento celular dependiente de TGF- β se controló por incorporación de timidina (n=4). En la Fig. 4c, la interacción entre AIMP2F y -DX2 se determinó por el ensayo de doble híbrido en levadura que se describió previamente (Rho, S.B. et al., PNAS. USA, 96:4488-93(1999)). En la Fig. 4d, AIMP2F y -DX2 se sintetizaron por la traducción in vitro en presencia de [^{35}S]metionina, mezclada con GST-AIMP2F o -CDK2 (control), y se precipitó con glutation-Sefarosa. Las proteínas precipitadas se separaron por SDS-PAGE y se detectaron por autorradiografía. En la Fig. 4e, la interacción of AIMP2F o -DX2 con proteína de unión a FUSE (FBP; Kim, M.J. et al., Nat. Genet. 34:330-336:2003)) y Smad2 se determinó by ensayo de doble híbrido en levadura. En la Fig. 4f, ele efecto del inhibidor de proteasoma, ALLN (50 μM durante 4 horas) sobre los niveles de (F) de longitud completa y DX2 de AIMP2 se controló en las células H322 generadoras de DX2 por transferencia Western con anticuerpo anti-AIMP2. La forma DX2 se confirmó por su comigración en gel con su contraparte sintetizada in vitro. En la Fig. 4g, el aumento de AIMP2 por el tratamiento of ALLN (20 μM durante 2 horas) también se demostró por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-AIMP2 en las células H322. En la Fig. 4h, DX2 marcada con myc se transfectó a DU145 que se trató con ALLN. Posteriormente, AIMP2 inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-AIMP2, y las moléculas de AIMP2 ubiquitinadas se controlaron por inmunotransferencia con anticuerpo anti-ubiquitina (Ubi).

Las Fig. 5a a 5e representan el efecto disruptivo de AIMP2DX2 sobre el control del crecimiento celular y la señalización de TGF- β . En la Fig. 5a, DX2 (o vector vacío) se transfectó en los MEFs y se controló su efecto sobre el crecimiento celular. Las células y colonias se visualizaron por microbio a la luz (parte superior) y coloración de Giemsa (parte inferior), respectivamente. La Fig 5b muestra las secuencias de nucleótidos que codifican los ARNsi específicos para DX2. En la Fig 5c, cada uno de los vectores que expresan 3 de los ARNsi se construyeron, transfectaron a las líneas celulares H322 y H460, y se evaluó su efecto sobre el nivel de AIMP2 y fosforilación de smad2. En la Fig 5d, ARNsi de No4 o No5 se transfectó a H322, y se midió su efecto sobre la muerte celular (izquierda) y detención del ciclo celular (derecha) por el TGF- β . En la Fig. 5e, se introdujo ARNsi dirigido a AIMP2DX2 (si-DX2) en H322 y se determinó su efecto supresor sobre el transcripto de DX2 por RT-PCR (parte superior). El si-DX2 no afectó el transcripto de AIMP2 de longitud completa mostrado por RT-PCR del transcripto para el exón 3-4. El efecto de si-DX2 sobre la fosforilación de Smad2 y la expresión de AIMP2 también se determinó por transferencia Western (parte inferior). El efecto de si-DX2 sobre la restauración de la señalización de TGF- β también se determinó por tinción con inmunofluorescencia de p-Smad2 (Fig. 5f), Ensayo indicador dependiente de TGF- β bajo el promotor 3TP (Fig. 5g) y detención del crecimiento (Fig. 5h) por medio de las células H322. En la Fig. 5f, p-Smad2 y los núcleos se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde) y PI (rojo), respectivamente, 30 min después del tratamiento TGF-#. Cabe mencionar que p-Smad2 estaba aumentada y localizado en el núcleo por la transfección de si-DX2.

Las Figs. 6a a 6f representan la asociación de AIMP2 con la formación de cáncer de pulmón. En la Fig. 6a, la formación del tumor pulmonar se controló en intervalos de tiempo después de la administración intraperitoneal de benzo(α)pireno en los ratones AIMP2 +/- y AIMP2 +/--. "N" significa el número de ratones sacrificados. En la Fig. 6b, los ARN totales se aislaron de las regiones normales y tumorales del paciente con cáncer de pulmón, y se sometieron a RT-PCR con el cebador específico de DX2. Los tejidos normales y tumorales de los mismos pacientes (indicados por el número de código) se sometieron a RT-PCR por medio de anticuerpo anti-AIMP2 (Fig. 6c). La Fig. 7 representa la determinación del dominio de Smad2 involucrado en la interacción con AIMP2. Nosotros ligamos los ADNc que codifican AIMP2 o CDK2 a los sitios EcoRI y XhoI del pGEX4T-1 para expresarlos en E. coli BL21 (DE3) como las proteínas de fusión de GST y se los purifica siguiendo la instrucción del fabricante. Los diferentes fragmentos de supresión de Smad2 se sintetizaron por traducción in vitro en presencia de [^{35}S] metionina por medio del kit de traducción acoplado a TNT (Promega). Las proteínas de fusión de GST unidas a las perlas de glutatión Sefarosa se incubaron con los fragmentos de Smad2 marcados con metionina [^{35}S] en el buffer de unión del buffer PBS (pH 7.4) que contiene 0,5 mM de EDTA, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), y 1% de Triton X-100. La mezcla de unión se incubó toda la noche a 4°C con rotación y se lavó cuatro veces con el buffer de unión que contiene 0,5% de Triton X-100. Después de la adición del buffer de muestra SDS, las proteínas unidas se eluyeron por ebullición y se separaron por electroforesis en gel SDS. La presencia de los fragmentos de Smad2 se determinó por autorradiografía.

Las Fig. 8a y 8b muestran la disposición del exón del gen de AIMP2 humano y las ubicaciones del cebador en el ADNc de AIMP2. En la Fig. 8a, el gen de AIMP2 está compuesto de cuatro exones que codifican los polipéptidos del tamaño indicado. La Fig. 8b es la representación esquemática para las ubicaciones de los cebadores usados para generar los ADNC que abarcan regiones diferentes de AIMP2 y sus secuencias.

5 Las Fig. 9a a 9d demuestran la reducción de expresión de AIMP2, y la generación de AIMP2DX2 en las líneas de células cancerosas. En la Fig. 9a, para comparar los niveles de AIMP2 entre las células positivas DX2 y negativas, nosotros cultivamos células DU145 y H460 en una placa, y realizamos la tinción con inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-AIMP2 (verde). Las dos líneas celulares se distinguieron por la tinción con inmunofluorescencia de p53 (rojo) ya que las células DU145 expresan p53 a alto nivel debido a su mutación, mientras que las células H460
10 que contienen el p53 tipo salvaje lo mantienen en nivel bajo. Las células se trataron con TGF- β durante 2 horas, y se fijaron con metanol. En la Fig. 9b, para dirigir el efecto de AIMP2DX2 sobre la expresión de AIMP2, el nivel de AIMP2 se controló por citometría de flujo. Se transfectoron 2 μ g/ml de vector vacío o DX2 en las células DU145, y se incubaron durante 24 horas. Las células posteriormente se fijaron con 70% de etanol y reaccionaron con el anticuerpo anti-AIMP2, y posteriormente el anticuerpo secundario conjugado con FITC. En la Fig. 9c, el efecto de AIMP2DX2 sobre la detención del ciclo celular dependiente de TGF- β se comparó por citometría de flujo. Si bien la porción de las células de la fase G0/G1 se aumentó en las células DU145 transfectadas con el vector vacío, pero no en las células transfectadas en DX2. Las líneas negras y azules indicaron las células no tratadas y tratadas con TGF- β , respectivamente. En la Fig. 9d, nosotros comparamos los niveles de AIMP2 en las células H460 no tratadas (control) o tratadas con 10 μ M de ALLN durante 2 horas. "Negativo" indica las células incubadas solo con anticuerpo secundario conjugado con FITC.
20

Las Fig. 10a y 10b muestran la generación de AIMP2DX2 y la supresión de AIMP2 en tejidos del cáncer de pulmón. En la Fig. 10a, los pulmones se aislaron de ratones AIMP2^{+/+} y AIMP2^{+/-} inyectados con benzopireno y los ARN se aislaron de cada pulmón para RT-PCR para determinar la generación de AIMP2DX2. Todos los pulmones que generan DX2 mostraron la formación del tumor en el pulmón (marcado +).

25 Las Fig. 11a y 11b representan la expresión de AIMP2DX2 en varios tejidos cancerosos y líneas de células cancerosas. En la Fig 11a, se realizó la RT-PCR para determinar la expresión de AIMP2DX2 en tejidos de cáncer hepático. La Fig. 11b muestra la expresión de AIMP2DX2 en varias líneas de células cancerosas.

La Fig.12 muestra una indicación de cáncer en ratones deficientes (AIMP2^{+/-}) en comparación con un ratón salvaje que expresa normalmente AIMP2. Fig. 12a, la mutación en el gen de AIMP2 se determinó por transferencia Southern y análisis de PCR. El fragmento de PCR de 1223 pb se generó de la región del intrón I del gen de ratón de AIMP2 con los cebadores f3 y r2, y se usaron como una sonda para la hibridación de los fragmentos Sacl de ADN genómico de ratón. La mezcla de los cebadores, f6, r6 y pKof2, se usó para el análisis PCR. El alelo tipo salvaje y mutado genera aproximadamente productos de PCR de 1,2 y 1,9 kb, respectivamente. El efecto de la mutación sobre la expresión de p AIMP2 se determinó por transferencia Northern con la sonda de ADNc de AIMP2 y la transferencia Western con anticuerpo de conejo policlonal originado contra AIMP2 purificado humano. La misma cantidad de actina se detectó en cada calle de la transferencia Northern (datos no mostrados). ^{+/+}, ^{+/-} y ^{-/-} representan los ratones tipo salvaje, heterocigota y homocigota. La ubicación de la inserción de la trampa del gen se determinó por la secuenciación del ADN genómico del alelo mutado. La Fig 12b muestra la velocidad de formación del tumor en ratones AIMP2^{+/-} y ratones tipo salvaje. La Fig. 12c muestra el número promedio de tumores por ratón AIMP2^{+/-} y ratón tipo salvaje. La Fig 12d muestra papilomas desarrollados en ratones AIMP2^{+/-} y ratones tipo salvaje.
30
35
40

La Fig. 13 muestra el vector de expresión que porta el gen AIMP2DX2. En la Fig. 13, las abreviaturas, pCMV, BGH pA, f1 ori, neomicina, ampicilina, SV40, SV40 pA, Co1E1, T7, y Sp6 indican el promotor inmediato-temprano citomegalovirus humano, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, origen de replicación f1, gen de resistencia a neomicina, origen de replicación SV40 del gen de resistencia a ampicilina, señal de poliadenilación de SV40, origen de replicación ColE1, promotor viral T7 y promotor viral Sp6, respectivamente.
45

Descripción detallada de la invención

La AIMP2 (proteína multifuncional 2 que interactúa con ARS), denominada como AIMP2/JTV-1 o AIMP-2 es una de las proteínas relacionadas con la formación de aminoacil-ARNt sintetasa.

50 Los presentes inventores dilucidaron que la alteración genética de AIMP2 para inducir la sobreexpresión de c-myc causa letalidad neonatal en los ratones mediante la sobreproliferación de las células epiteliales alveolares y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) induce la expresión de AIMP2 y promueve su translocación en los núcleos para la regulación por disminución de c-myc (M. J. Kim, et al., Nat. Genet. 34:330-336(2003)).

Después de la investigación previa, los presentes inventores han revelado que AIMP2 es un nuevo supresor de tumor, que cumple una función única en la señalización de TGF- β por medio de la interacción directa con Smad2/3. Además, nosotros hemos descubierto que la variante aberrante de AIMP2 que carece del exón II (AIMP2DX2) se expresa específicamente en las líneas de células y tejidos cancerosos. La existencia de AIMP2 que carece de exón II (AIMP2DX2) se verificó por RT-PCR por medio de combinaciones de cebadores específicos de AIMP2. Cuando los
55

cebadores se usaron para generar ADNc de AIMP2 que abarca el exón 3 y 4, no se observó la disminución del transcripto de AIMP2 en las células que muestran la reducción del nivel de AIMP2 en el análisis de transferencia Western. Cuando nosotros usamos los cebadores que generan el transcripto del exón 1 a 3, nosotros obtuvimos no solo el transcripto del tamaño esperado, sino también uno más pequeño. El análisis de secuenciación de este transcripto pequeño reveló que carece del exón 2 que codifica 69 residuos de aminoácidos de AIMP2. El análisis de RT-PCR por medio del cebador que se dirige a la secuencia de unión del exón 1 y 3 mostró que las líneas celulares que expresan menor nivel de AIMP2 generaron el transcripto menor, lo que confirma la generación de AIMP2DX2 como variante de AIMP2.

Además, los inventores observaron que el nivel de AIMP2 se redujo drásticamente independientemente del TGF- β en la célula transformada con AIMP2DX2, que demuestra que la generación de AIMP2DX2 produce pérdida de la actividad de AIMP2. Además de esto, la introducción de AIMP2DX2 en una célula elevó la expresión de c-myc y redujo el la detención del crecimiento por TGF- β . Nosotros hallamos que AIMP2DX2 forma un heterodímero inactivado con AIMP2 y está estrechamente asociado con tumorigénesis por la inducción de la disminución del nivel de AIMP2. Los estudios in vivo proporcionan evidencia adicional para verificar que AIMP2DX2 está fuertemente relacionada también con el cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de mamas, cáncer renal y osteosarcoma.

La proteína de AIMP2DX2 es una variante de supresión de AIMP2 que carece del exón 2. La secuencia de aminoácidos de la proteína de AIMP2 se halla en varias bases de datos (versión 312aa: Núm de acceso. AAC50391.1 o GI:1215669; versión 320aa: Núm de acceso. AAH13630.1, GI: 15489023 y BC013630.1 disponibles en GenBank) y publicaciones (versión 312aa: Nicolaidis, N.C., Kinzler, K.W. y Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, *Genomics* 29 (2):329-334 (1995); versión 320 aa: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26): 16899-16903(2002)). La secuencia de aminoácidos de la proteína de AIMP2DX2 comprende, preferentemente, consiste en AIMP2 que carece de la región del exón 2 como las secuencias conocidas descritas anteriormente. La solicitud de patente de Corea. No. 10-2004-0078035 desvela la eficacia de la terapia del cáncer de la proteína de AIMP2.

La proteína de AIMP2DX2 incluye variantes con exón 2 suprimido de los equivalentes de AIMP2, por ejemplo, equivalentes funcionales provenientes de la sustitución, supresión, inserción o sus combinaciones de AIMP2 que exhiben actividad sustancialmente idéntica a la de AIMP2 tipo salvaje, o derivados funcionales con modificaciones para alterar las propiedades físicas y/o bioquímicas de AIMP2 tipo salvaje que exhiben actividad sustancialmente idéntica a la de AIMP2 tipo salvaje.

La supresión del exón 2 en AIMP2 como se describe en la presente significa que la secuencia de aminoácidos que abarca la región del exón 2 en AIMP2 (correspondiente a los aminoácidos 46-114) está suprimida en forma parcial o completa para generar una variante por supresión de AIMP2 capaz de formar un heterodímero con AIMP2 para inhibir la función normal de AIMP2 y promover la degradación de AIMP2. Por consiguiente, la proteína de AIMP2DX2 de la presente invención puede incluir cualquier variante de AIMP2 con supresión total o parcial del exón 2 en la que el exón 1, 3 y/o 4 es natural o modificado por sustitución, supresión o inserción de aminoácidos, siempre que la variante sea capaz de formar un heterodímero con AIMP2 para inhibir la función normal de AIMP2. Preferentemente, la proteína de AIMP2DX2 comprende una supresión completa del exón 2 y exón 1, 3 y 4 intactos. Más preferentemente, la proteína de AIMP2DX2 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

La proteína de AIMP2DX2 puede comprender sus secuencias de aminoácidos naturales y variantes que tienen secuencias modificadas también, siempre que las variantes retengan la actividad de la proteína de AIMP2DX2 descrita anteriormente. Las variantes de la proteína de AIMP2DX2 se refieren a proteínas que tienen secuencias diferentes de su secuencia de aminoácidos natural preparadas por la supresión, inserción, sustitución no conservador o conservadora o sus combinaciones. La alteración silente de los residuos de aminoácidos que no altera sustancialmente su actividad proteica es bien conocida por los expertos en la técnica (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Tal alteración de aminoácidos incluye Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, pero no se limita a esto.

Además, la proteína de AIMP2DX2 puede comprender modificaciones pos-traduccionales tales como fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación y farnesilación.

La proteína de AIMP2DX2 y sus variantes se pueden obtener por el aislamiento de las fuentes naturales, síntesis (Merrifield, J, *Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-2156(1963)) o tecnología de ADN recombinante (Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)). Cuando se aplica una tecnología de ADN recombinante, las células huésped se transforman con un vector de expresión que porta una molécula de ácido nucleico que codifica AIMP2DX2 y posteriormente se cultiva, seguido por la recuperación del AIMP2DX2 expresado.

Como se describió previamente, la proteína de AIMP2DX2 de la presente invención se expresa específicamente en una variedad de células cancerosas que incluyen cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer

sanguíneo, cáncer de piel, cáncer renal y osteosarcoma, lo que demuestra que la proteína de AIMP2DX2 puede actuar como un marcador diagnóstico de cáncer.

5 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2 descrita anteriormente. La secuencia de nucleótidos anterior que codifica la proteína de AIMP2DX2 incluye variante con exón 2 suprimido de los equivalentes de AIMP2, por ejemplo, equivalentes funcionales resultantes de la sustitución, supresión, inserción o sus combinaciones de AIMP2 que exhibe actividad sustancialmente idéntica a la de AIMP2 tipo salvaje. La proteína de AIMP2DX2 de la SEQ ID NO: 2 preferentemente está codificada por la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1. La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede ser ADN de cadena simple o doble (ADNc y ADNg) o ARN de cadena simple (ARNm).

La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de AIMP2DX2 se puede preparar por el aislamiento de fuentes naturales, síntesis o tecnología de ADN recombinante. La molécula de ácido nucleico de AIMP2DX2 se puede incluir en un vector adecuado para proporcionar la proteína de AIMP2DX2.

15 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un vector recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2.

El término "vector recombinante" que se usa en la presente se refiere a un portador genético para expresar una proteína o ARN de interés en una célula huésped adecuada, que comprende una correspondiente secuencia extraña unida operativamente a una secuencia control de expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, secuencia señal y matriz de los sitios de unión del factor de transcripción).

20 El término "operativamente unido" usado en la presente se refiere a una unión funcional entre una secuencia control de expresión del ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico de interés, en que la secuencia control de expresión afecta la transcripción y/o traducción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia. El vector de la presente invención se puede construir de acuerdo con la tecnología de ADN recombinante convencional en que se realizan la escisión y el ligamiento de ADN específico del sitio por medio de las enzimas disponibles en el comercio.

25 Los vectores de la presente invención incluyen plásmido, cósmido, bacteriófago y vectores virales, pero sin limitación a estos. El vector puede comprender los elementos de control de expresión tal como promotor, operador, codones de inicio y detención, señal de poliadenilación y potenciador así como secuencias señal o líder para el direccionamiento o secreción de la membrana. El promotor usado en los vectores pueden ser constitutivos o inducibles. Además, el vector puede portar un marcador de selección para seleccionar células huésped que albergan el vector y un origen de replicación.

30 La secuencia señal del vector incluye, pero sin limitación, las secuencias señal PhoA y OmpA para las células huésped de Escherichia, secuencias señal de α -amilasa y subtilisina para las células huésped de Bacillus, secuencias señal de MF α y SUC2 secuencia para las células huésped de levaduras, e insulina, secuencias señal de interferón α y molécula de anticuerpo para las células huésped de animales.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula huésped aislada que se transforma con el vector recombinante de la presente invención descrita anteriormente.

40 La transformación se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier procedimiento conocido para transformar las moléculas de ácido nucleico en el organismo, célula, tejido u órgano, que incluye, pero sin limitación electroporación, fusión protoplasmática, precipitación con CaPO₄, precipitación con CaCl₂, agitación mediante fibra de carbamida de silicio, transformación mediada por Agrobacterium, PEG, sulfato de dextrano y lipofectamina. Un procedimiento de transformación adecuado se puede seleccionar sobre la base del tipo de célula huésped.

45 Una célula huésped adecuada se decide generalmente en consideración del nivel de expresión y modificación post-traducción. Las células huésped incluye, pero sin limitación, células procarióticas tales como Escherichia coli, Bacillus subtilis, Streptomyces, Pseudomonas, Proteus mirabilis y Staphylococcus, hongos (por ejemplo, Aspergillus), levaduras (por ejemplo, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces y Neurospora crassa), células de insectos, células vegetales y células de mamíferos.

50 En otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar la proteína de AIMP2DX2 por el cultivo de las células huésped descritas previamente. El cultivo de las células huésped se lleva a cabo por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica en condiciones adecuadas para expresar la proteína de AIMP2DX2 de interés.

55 La proteína de AIMP2DX2 expresada se puede purificar por procedimientos convencionales, por ejemplo, precipitación (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio y fosfato de sodio), precipitación con solvente (por ejemplo, fraccionamiento de proteína por medio de acetona o etanol), diálisis, filtración en gel, cromatografía en columna de fase inversa, intercambio iónico, ultrafiltración o sus combinaciones (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook et al., Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001); y Deutscher, M., Guide to Protein Purificación Procedimientos, Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990)).

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo específico para la proteína de AIMP2DX2.

5 El término "anticuerpo" usado en la presente significa una molécula proteína dirigida específicamente hacia un sitio antigénico. El anticuerpo de la presente invención se refiere a los anticuerpos para reconocer específicamente AIMP2DX2 y discriminar de AIMP2, que incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales.

Los anticuerpos contra la nueva proteína, AIMP2DX2, se pueden preparar de acuerdo con tecnologías convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

10 Los anticuerpos policlonales se pueden preparar de acuerdo con procesos conocidos en que la proteína de AIMP2DX2 se inyecta como inmunógeno en los animales y posteriormente se recolecta antisuero. Los animales inmunizados incluyen, pero sin limitación, cabra, conejo, oveja, mono, caballo, cerdo, ganado vacuno y perro.

15 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar de acuerdo con un procedimiento de fusión (Kohler y Milstein, European Journal of Immunology, 6 ; 511-519(1976)), un procedimiento de ADN recombinante (USP 4,816,567) o una biblioteca de anticuerpo del fago (Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991); y Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991)).

Los anticuerpos contra la proteína de AIMP2DX2 pueden ser una molécula de inmunoglobulina intacta que tiene dos cadenas livianas de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa o sus fragmentos que contienen el sitio de unión al antígeno tal como F(v), Fab, Fab' y F(ab')₂.

20 Los anticuerpos específicos para AIMP2DX2 de acuerdo con la presente invención se pueden usar para diagnosticar y tratar cáncer por la supresión de la actividad de AIMP2DX2. Cuando se usan los anticuerpos como un agente terapéutico, se pueden acoplar a los agentes terapéuticos convencionales de manera directa o indirecta (a través de un ligador).

25 El agente terapéutico acoplado a los anticuerpos de la presente invención incluye, pero sin limitación, radionúclidos (por ejemplo, 131I, 90Y, 105Rh, 47Sc, 67Cu, 212Bi, 211At, 67Ga, 125I, 186Re, 188Re, 177Lu, 153Sm, 123I y 111In), fármaco (por ejemplo, metotrexato y adriamicina), linfoquina (interferón), toxina (ricina, abrina y difteria) y anticuerpo heterofuncional que forma un complejo con otro anticuerpo para poseer una capacidad de unión bifuncional para las células cancerosas y células efectoras (por ejemplo, células citolítica T).

El anticuerpo de la presente invención se puede administrar per se o en la forma de una composición farmacéutica.

30 La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo se puede formular con un portador farmacéuticamente aceptable. La forma de la composición farmacéutica varía de acuerdo con el modo de administración. Normalmente, la composición comprende uno de los tensioactivos para facilitar la administración de transmembrana. Tal tensioactivo incluye los compuestos derivados de esteroides, lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), hemisuccinato de colesterol y fosfatidil glicerol.

35 La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención se administra en una cantidad farmacéuticamente efectiva para tratar cáncer o prevenir la metástasis del cáncer. La composición farmacéutica se puede administrar en un régimen de dosis única o múltiple. El modo de administración de la composición farmacéutica incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, y local. La administración parenteral incluye inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intrabursa, intrasternal, intratecal e intraperitoneal. La composición farmacéutica se formula generalmente en un intervalo de pH de 4-8 para estabilidad (estabilidad química y física) y seguridad del anticuerpo. Además, la composición farmacéutica se puede formular en una forma de dosis oral. La dosis típica se optimiza por medio de técnicas clínicas estándares.

Además, el anticuerpo de la presente invención se puede administrar en una forma de la molécula de ácido nucleico para inducir en la producción del anticuerpo in vivo (WO 96/07321).

45 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un kit diagnóstico para el cáncer, que comprende un anticuerpo específico para la proteína de AIMP2DX2.

50 El kit del diagnóstico del cáncer de la presente invención puede comprender el anticuerpo específico para AIMP2DX2 así como instrumentos y reactivos generales para el inmunoensayo que incluye portador, marca generadora de señal detectable, agente de disolución, agente de lavado, buffer y estabilizador. Cuando se usa una enzima como una marca, se pueden incluir su sustrato y activador de la reacción. Los ejemplos no limitantes del portador incluye portadores sólidos, por ejemplo, buffer fisiológicamente aceptable conocido en la técnica (por ejemplo PBS), portadores insolubles, por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, poliácilonitrilo, resina de flúor, dextrano reticulado, polisacáridos, polímeros tales como micropartículas magnéticas hechas de látex recubierto con un metal, papel, vidrio, metales, agarosa y sus combinaciones.

Los ejemplos no limitantes del sistema de ensayo útil en el kit de diagnóstico de cáncer de la presente invención incluyen placas de ELISA, dispositivos de tiras reactivas, tiras de prueba inmunocromatográfica y dispositivos de inmunoensayo de partición radial y dispositivos de flujo continuo.

5 El término "marcador de cáncer" usado en la presente se refiere a una sustancia que proporciona información para evaluar la probabilidad, aparición o desarrollo del cáncer por el examen cuantitativo o cualitativo de su expresión en tejidos o células. Preferentemente, el término significa una biomolécula orgánica (por ejemplo, proteína, ADN y ARN) que se expresa en las células cancerosas en un diferente patrón de las células normales. El gen o proteína de AIMP2DX2 de la presente invención se expresa específicamente en las células cancerosas pero no en células normales, lo que permite diagnosticar con precisión el cáncer. Preferentemente, el diagnóstico del cáncer por medio de la expresión de AIMP2DX2 se realiza en el nivel de ARNm y/o proteína. Los anticuerpos de la presente invención son útiles para diagnosticar cáncer tal como cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mamas, cáncer de piel, cáncer renal y osteosarcoma.

10 En el aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para seleccionar la proteína de AIMP2DX2 como un marcador diagnóstico de cáncer, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra para ensayar; y (b) detectar en la muestra una expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2, en la que la detección de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2 es indicativa de cáncer.

15 La expresión 'muestra para ensayar' usada en la presente invención incluye cualquier muestra biológica tal como tejido, célula, sangre entera, suero, plasma, saliva, semen, orina, líquido sinovial y espinal se puede pretratar para el ensayo.

20 En la presente invención, una expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2 en la muestra se puede llevar a cabo en el nivel de la proteína o ARNm. Cuando el procedimiento se realiza para detectar la proteína de AIMP2DX2, se usan anticuerpos para reconocer específicamente la proteína de AIMP2DX2 y la detección se lleva a cabo por el contacto de la muestra con el anticuerpo específico para la proteína de AIMP2DX2 y la evaluación de la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

25 La expresión "complejo antígeno-anticuerpo" usada en la presente invención se refiere a una combinación entre la proteína de AIMP2DX2 y un anticuerpo específico para este en una muestra biológica. La evaluación de la formación del complejo antígeno-anticuerpo se puede realizar por medio de tinción inmunohistoquímica, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), transferencia Western, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de inmunodifusión, ensayo de fijación del complemento, FACS y ensayo del chip de proteína. La evaluación de la formación del complejo antígeno-anticuerpo se puede realizar en forma cualitativa o cuantitativa, en particular, por la medición de una señal de una marca de detección.

30 La marca para generar una señal medible para la formación del complejo antígeno-anticuerpo incluye, pero sin limitación, enzimas, fluoróforos, ligando, luminóforo, micropartículas, moléculas redox y radioisótopos. La marca enzimática incluye, pero sin limitación, [β -glucuronidasa, [β -D-glucosidasa, [β -D-galactosidasa, ureasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa, hexoquinasa, GDPasa, ARNasa, luciferasa, fosfofructoquinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa, fosfoenolpiruvato decarboxilasa, β -lactamasa. La marca fluorescente incluye, pero sin limitación, fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalato y fluorescamina. El ligando que actúa como una marca incluye, pero sin limitación, los derivados de biotina. Los ejemplos no limitantes de la marca luminiscente incluyen éster de acridinio, luciferina y luciferasa. Las micropartículas como marca incluyen oro coloidal y látex coloreado, pero no se limitan a estos. Las moléculas redox para marcación incluyen pero sin limitación, ferroceno, compuesto complejo de lutenio, viológeno, quinona, ion Ti, ion Cs, diimida, 1,4-benzoquinona, hidroquinona, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ y $[Mo(CN)_8]^{4-}$. Los radioisótopos incluyen 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I y ^{186}Re , pero no se limitan a estos.

35 Cuando el presente procedimiento se realiza para detectar el ARNm de AIMP2DX2, la etapa de detección se puede llevar a cabo por una reacción de amplificación o una reacción de hibridación bien conocida en la técnica.

40 La frase "detección del ARNm de AIMP2DX2" que se usa en la presente se refiere a analizar la existencia o cantidad del ARNm de AIMP2DX2 como un marcador diagnóstico del cáncer en las células por el uso de un cebador o sonda que se hibrida específicamente con el ARNm de AIMP2DX2.

45 El término "cebador" usado en la presente significa un oligonucleótido que tiene un grupo hidroxilo 3' libre, ya sea producido en forma natural como en un digesto de restricción purificado o producido en forma sintética, que es capaz de formar pares de bases con un molde complementario, y que actúa como un punto de iniciación de la síntesis, cuando se coloca en condiciones en las cuales se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario con una cadena de ácido nucleico. El término "sonda" usado en la presente se refiere a un oligómero lineal de monómeros o uniones naturales o modificados, que incluyen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y similares, que es capaz de hibridarse específicamente con una secuencia de nucleótidos blanco, sea natural o producida sintéticamente. La sonda usada en el presente procedimiento se puede preparar en la forma

de sonda de oligonucleótido, sonda de ADN de cadena simple, sonda de ADN de cadena doble y sonda de ARN. Se puede marcar con biotina, FITC, rodamina, DIG y radioisótopos. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 8 o 16 se puede usar como sonda.

5 El procedimiento para detectar el ARNm de AIMP2DX2 por medio del uso de un cebador o sonda incluye, pero sin limitación, secuenciación de ADN, RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa –transcripción inversa), procedimiento de extensión del cebador (Nikiforov, T.T. et al., Nucl Acids Res 22, 4167-4175(1994)), análisis del ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (Nickerson, D.A. et al., Pro Nat Acad Sci USA, 87, 8923-8927(1990)), PCR específico del alelo (Rust, S. et al., Nucl Acids Res, 6, 3623-3629 (1993)), escisión de error de apareamiento de RNasa (Myers R.M. et al., Science, 230, 1242-1246(1985)), polimorfismo de la conformación de cadena simple- (SSCP; Orita M. et al., Pro Nat Acad Sci USA, 86, 2766-2770(1989)), análisis simultáneo de SSCP y heteroduplex (Lee et al., Mol Cells, 5:668-672(1995)), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE; Cariello NF. et al., Am J Hum Genet, 42, 726-734 (1988)) y cromatografía líquida de alto rendimiento de desnaturalización (D-HPLC, Underhill PA. et al., Genome Res, 7, 996-1005 (1997)).

15 Preferentemente, el procedimiento por la reacción de amplificación se lleva a cabo por RT-PCR por medio de un cebador capaz de diferenciar un ARNm de AIMP2DX2 de un ARNm de AIMP2. El proceso de RT-PCR sugerido por P. Seeburg (1986) para la investigación del ARN involucra la amplificación de PCR del ADNc obtenido de la transcripción inversa de ARNm. Para la amplificación, se usa un par cebador fusionado específicamente a AIMP2DX2. Preferentemente, el cebador se diseña para generar dos bandas de tamaño diferente en la electroforesis en la que una es específica para el ARNm de AIMP2 y la otra para el ARNm de AIMP2DX2. En forma
20 alternativa, el cebador se diseña para generar solo una banda de electroforesis específica para el ARNm de AIMP2DX2. El par cebador para generar dos bandas de tamaño diferente para el ARN de AIMP2 y ARNm de AIMP2DX2 se prepara para amplificar una región correspondiente al exón 2. La secuencia de nucleótidos de tales cebadores no está limitada; pero es, con máxima preferencia, un conjunto cebador que consiste en las SEQ ID NOs:5 y 6. Para observar solo una banda de electroforesis específica para el ARNm de AIMP2DX2, uno de los
25 cebadores se diseña para comprender la secuencia de unión entre C-terminal del exón 1 y N-terminal del exón 3. En los Ejemplos que se describen a continuación, para la RT-PCR el cebador de la SEQ ID NO:8 fusionado a la secuencia de unión se usa junto con el cebador de la SEQ ID NO:7 o el cebador de la SEQ ID NO:16 fusionado a la secuencia de unión se usa en conjunto con el cebador de la SEQ ID NO: 6. El análisis de RT-PCR es conveniente en el sentido que el diagnóstico del cáncer se logra por la observación del patrón de banda de electroforesis para
30 evaluar la expresión del ARNm de AIMP2DX2.

Los síntomas del cáncer que incluyen cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mamas, cáncer de piel, cáncer renal y osteosarcoma se pueden diagnosticar a partir de las diferencias significativas de la expresión de AIMP2DX2 entre una muestra y un control.

35 De acuerdo con un aspecto preferible de la presente invención, se proporciona una molécula de ARNsi (ARN de interferencia corto) específica para un ARNm de AIMP2DX2.

El término "ARNsi" usado en la presente se refiere a un dúplex de ARN corto para el fenómeno de ARNi (interferencia de ARN) a través de la escisión del ARNm. El ARNsi consiste en una cadena de ARN sentido correspondiente a un ARNm blanco y una cadena de ARN antisentido complementaria con un ARNm blanco. Los
40 ARNsi para inhibir la expresión de un gen blanco proporcionan el procedimiento de inactivación génica o procedimiento de terapia génicos efectivos.

El ARNsi de la presente invención no está restringido a un dúplex de ARN cuyas dos cadenas están completamente apareadas y pueden comprender una porción no apareada tal como porción mal apareada con bases no complementarias y masa sin bases opuestas. La longitud completa del ARNsi puede ser 10-100 nucleótidos, preferentemente, 15-80 nucleótidos, y más preferentemente, 20-70 nucleótidos. El ARNsi puede comprender tanto
45 un extremo como cohesivo siempre puede silenciar la expresión de AIMP2DX2 debido al efecto del ARNi. El extremo cohesivo se puede preparar con una estructura con proyección del extremo 3' o estructura con proyección del extremo 5'. Las bases de la proyección no tiene limitaciones en su longitud, por ejemplo, 1-8 nucleótidos, preferentemente, 2-6 nucleótidos. La longitud completa como se describe en la presente se expresa como el total de la longitud de la porción de doble cadena central y la porción de proyección de cadena simple terminal. Además,
50 siempre que el ARNsi de AIMP2DX2 sea capaz de mantener su efecto de silenciamiento génico sobre el gen blanco, puede contener un ARN de peso molecular bajo (que puede ser una molécula de ARN natural tal como ARNt, ARNr o ARN viral, o una molécula de ARN artificial), por ejemplo, en la porción de la proyección en cualquiera de sus extremos. No es necesario que ambos extremos del ARNsi de AIMP2DX2 tengan una estructura de escisión. El ARNsi de AIMP2DX2 de la presente invención puede comprender una estructura de horquilla en la que cualquier
55 extremo (cabeza o cola) está conectado por medio de un ligador. La longitud del ligador no está limitada a menos que altere el apareamiento de bases de la estructura del tallo.

El término "específico" usado en la presente tiene por objeto expresar la inhibición de la expresión del gen blanco son la influencia de otros genes. El ARNsi de la presente invención es específico para el gen de AIMP2DX2.

Se prefiere que el ARNsi de la presente invención comprenda una cadena sentido que contiene una secuencia correspondiente a una secuencia de unión entre los exones 1 y 3 y una cadena antisentido que contiene una secuencia complementaria.

5 La frase "inhibición de la expresión del gen" significa que el nivel de ARNm y/o proteína generado a partir del gen blanco está inactivado o reducido, que está inducido por la interferencia de ARN por medio de la existencia de la escisión del ARNm.

10 El ARNsi de la presente invención se puede sintetizar in vitro y posteriormente introducir en las células por medio de la transfección. Además, se puede transfectar en las células en la forma de un vector de expresión de ARNsi o un casete de expresión de ARNsi derivado de PCR. Los procedimientos de preparación y transfección adecuados se pueden determinar en consideración del objetivo del experimento y la función del gen blanco. Las secuencias y la longitud del ARNsi no están limitadas siempre que sean capaces de suprimir específicamente el ARNm de AIMP2DX2. Los vectores de expresión del ARNsi ilustrativo 3 para silenciar AIMP2DX2 se hallan en los Ejemplos que se describen a continuación, suprimen el nivel celular de AIMP2DX2 y restauran la función del AIMP2 y la transducción de la señal de TGF- β .

15 El ARNsi preferible de la presente invención comprende una secuencia correspondiente a la secuencia de unión entre los exones 1 y 3 del ARNm de AIMP2DX2. Más preferentemente, el ARNsi de la presente invención es un dúplex de ARN descrito como (i) ARNsi Núm.3 que consiste en dos moléculas de ARN expresadas a partir de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NOS: 9 y 10, (ii) ARNsi Núm. 4 que consiste en dos moléculas de ARN expresadas a partir de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID Núm:11 y 12, o (iii) ARNsi Núm. 5 que consiste
20 en dos moléculas de ARN expresadas a partir de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID Núm:13 y 14. El ARNsi que consiste en dos moléculas de ARN expresadas a partir de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID Núm:11 y 12 es el de máxima preferencia. Se puede usar el tipo único o mixto de las moléculas de ARNsi.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido antisentido que es complementario a una región de un ARNm de la proteína de AIMP2DX2.

25 El término "oligonucleótido antisentido" usado en la presente tiene por objeto referirse a los ácidos nucleicos, preferentemente, ADN, ARN o sus derivados, que son complementarios a las secuencias base de un ARNm blanco, caracterizado porque ellos se unen al ARNm blanco e interfiere en su traducción a la proteína. El oligonucleótido antisentido de la presente invención significa secuencias de ADN o ARN complementarias y unión al ARNm de AIMP2DX2, que sean capaces de inhibir la traducción, translocación, maduración u otras funciones biológicas del
30 ARNm de AIMP2DX2. El ácido nucleico antisentido es preferentemente 6-100, o preferentemente, 8-60, o más preferentemente, 10-40 nucleótidos de longitud.

35 El oligonucleótido antisentido puede tener al menos una modificación en su base, azúcar o esqueleto para su eficacia de inhibición más alta (De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55 (1995)). El esqueleto de ácidos nucleicos modificados comprende fosforotioato, fosfotriéster, fosfonato de metilo, alquilo de cadena corta o uniones interazúcar de cicloalquilo o uniones heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. El oligonucleótido antisentido también puede contener uno o más restos de azúcar sustituidos. El ácido nucleico antisentido pueden incluir una o más bases modificadas, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-me pirimidinas (en particular, 5-metilcitosina), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, 2-aminoadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N⁶(6-aminohehil)adenina y 2,6-diaminopurina. Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención involucra la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que aumentan la actividad o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen pero sin limitación restos lipídicos tales como un resto de colesterol, un resto de colesterilo, ácido cólico, tioéter, tiocolesterol, una cadena alifática, fosfolípido, poliamina, cadena de polietilenglicol, ácido adamantano acético, resto palmitilo, octadecilamina, resto hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos que
45 comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar tales oligonucleótidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, Patentes U.S. Pat. Nros. 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255. Las modificaciones descritas antes mejoran la estabilidad contra la degradación de la nucleasa y aumentan la afinidad del oligonucleótido antisentido hacia su ARNm blanco.

50 Se prefiere que el oligonucleótido antisentido específico para AIMP2DX2 comprenda una secuencia complementaria a una región de unión entre los exones 1 y 3 del ARNm de AIMP2DX2.

La molécula de ARN antisentido se sintetiza convencionalmente in vitro y posteriormente se transmite a las células. Además, se produce en forma intracelular por transcripción de la secuencia extraña. La síntesis in vitro involucra la ARN polimerasa I. La transcripción in vivo para preparar el ARN antisentido usa un vector que tiene un origen de la región de reconocimiento (MCS) en orientación opuesta. El ARN antisentido preferentemente comprende un codón de detención de traducción para la inhibir la traducción a un péptido.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar cáncer, que comprende (a) el oligonucleótido antisentido o ARNsi específico para ARNm de AIMP2DX2 como un ingrediente activo; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

También se describe en la presente un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende (a) el oligonucleótido antisentido o ARNsi específico para ARNm de AIMP2D X2 como un ingrediente activo; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

5 La composición farmacéutica que comprende al menos uno de los ARNsi de AIMP2DX2 u oligonucleótidos antisentido puede contener un agente adicional para suprimir la proliferación de células tumorales y para facilitar la transducción de ARNsi o ácido nucleico antisentido, por ejemplo, liposoma (Patentes U.S. Núm. 4.897.355, 4.394.448, 4.235.871, 4.231.877, 4.224.179, 4.753.788, 4.673.567, 4.247.411 y 4.814.270), o portador lipófilo que incluye esteroides tales como colesterol, colato y ácido deoxicólico. Además, el ARNsi o ácido nucleico antisentido se pueden conjugar a los péptidos que absorben células tales como hormonas peptídicas, antígenos y toxinas peptídicas (Haralambid et al, WO 89/03849; Lebleu et al., EP 0263740).

10 Cuando la composición farmacéutica se formula para la administración oral con un portador farmacéuticamente aceptable, puede contener aglutinante, lubricante, desintegrante, diluyente, solubilizante, agente dispersante, estabilizante, agente de suspensión, pigmento y edulcorante. Cuando la composición farmacéutica se formula para inyección, puede contener buffer, conservante, analgésico, solubilizante, agente de tonicidad y estabilizante. Para la administración tópica, la composición farmacéutica puede contener un sustrato, diluyente, lubricante y conservante. La formulación de la composición farmacéutica se puede preparar por la formulación con los portadores farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente. Para la administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de un comprimido, pastilla, cápsula, elixir, suspensión, jarabe y agua. La composición inyectable se puede formular en una amplia dosis unitaria o forma de dosis múltiple.

15 La dosis correcta de las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprende ARNsi de AIMP2DX2 u oligonucleótido antisentido variará de acuerdo con la formulación particular, el modo de aplicación, edad, peso corporal y sexo del paciente, dieta, tiempo de administración, condición del paciente, combinaciones farmacológicas, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. Se entiende que los médicos expertos podrán determinar y prescribir fácilmente una dosis correcta de las composiciones farmacéuticas.

20 El modo de administración de la composición farmacéutica incluye oral y parenteral tal como inyecciones subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intrabursa, intraesternal, intratecal e intraperitoneal.

25 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento de seleccionar un agente anticáncer que inhibe la formación de un heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 de acuerdo con la reivindicación 1 y proteína de AIMP2, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sustancia de ensayo con una composición que comprende la proteína de AIMP2DX2 y la proteína de AIMP2; y (b) determinar si la sustancia de ensayo inhibe la formación de heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 y la proteína de AIMP2, en el que la sustancia de ensayo para inhibir la formación del heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 y proteína de AIMP2 se evalúa como un agente anticáncer.

30 La formación del heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 y la proteína de AIMP2 se asocia con cáncer como se demuestra en los Ejemplos que se describen a continuación en la presente. En consecuencia, una sustancia capaz de inhibir la formación de heterodímero se evalúa como un candidato para el agente anticáncer.

Un procedimiento de seleccionar una formación de un heterodímero incluye, por ejemplo un ensayo de doble híbrido de levadura y un ensayo de interacción in vitro.

35 En una ensayo de doble híbrido de levadura desarrollado en primer lugar por Field & Song (1989), la proteína de AIMP2DX2 y la proteína de AIMP2 se pueden usar como "cebo" o "presa" (ver, por ejemplo, Patente U.S. 5.283.317; Zervos et al., Cell 72, 223-232(1993); Madura et al., J. Biol. Chem. 268, 12046-12054(1993); Bartel et al., BioTechniques 14, 920-924(1993); Iwabuchi et al., Oncogene 8,1693-1696(1993); y Brent WO 94/10300), para identificar las sustancias que inhiben la interacción de AIMP2DX2 con AIMP2 para formar un heterodímero. El sistema de doble híbrido se basa en la naturaleza modular de más factores de transcripción, que consisten en dominios de unión de ADN y activación separables. En breves palabras, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. Por ejemplo, en un constructo, un polinucleótido que codifica la proteína de AIMP2DX2 se puede fusionar a un polinucleótido que codifica el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo Lex). En otro constructo una secuencia de ADN que codifica la proteína de AIMP2 se puede fusionar a un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido (por ejemplo B42). Si la sustancia de ensayo que trata las células que expresan el sistema de doble híbrido es capaz de inhibir la interacción entre la proteína de AIMP2DX2 y proteína de AIMP2, los dominios de unión y activación del ADN del factor de transcripción no están en proximidad cercana. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo lac Z), que está unido operativamente a un sitio regulatorio de transcripción que responde al factor de transcripción. La expresión del gen indicador se puede detectar fácilmente.

40 En un formato de ensayo de interacción in vitro, el gen de AIMP2DX2 y gen de AIMP2 se pueden usar como cebo o presa. Por ejemplo, en un constructo para el cebo, la proteína de AIMP2 se fusiona a una proteína que permite que la proteína de AIMP2 se una a un soporte sólido. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutation-S-transferasa

(GST) se pueden adsorber en las perlas de sefarosa glutatión o placas de microtitulación derivado de glutatión. En el otro constructo para la presa, la proteína de AIMP2DX2 es sintetizada por un sistema de traducción in vitro (por ejemplo, lisado de reticulocitos) por medio de ³⁵S. La proteína de AIMP2DX2 radiactiva se añade a la GST-proteína de AIMP2 unida a perlas de sefarosa y glutatión junto con la adición de la sustancia de ensayo. La mezcla de reacción se lava y se eluyen las proteínas unidas a las perlas de Sefarosa, seguido por electroforesis.

Si la sustancia de ensayo añadida a la mezcla de reacción es capaz de inhibir la interacción entre la proteína de AIMP2DX2 y proteína de AIMP2, el resultado de la electroforesis no muestra banda.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento de selección para un agente anticáncer que inhibe la expresión del gen de AIMP2DX2, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sustancia de ensayo con las células que expresa el gen de AIMP2DX2; y (b) determinar si la sustancia de ensayo inhibe la expresión del gen de AIMP2DX2 o promueve la alteración de la proteína de AIMP2DX2, en la que la sustancia de ensayo inhibe la expresión del gen de AIMP2DX2 o promueve la alteración de la proteína de AIMP2DX2 se evalúa como un agente anticáncer.

En el presente procedimiento, la expresión del gen de AIMP2DX2 se evalúa en el nivel de ARNm o proteína. Cuando el presente procedimiento se lleva a cabo para detectar el ARNm de AIMP2DX2 expresado, preferentemente se realiza por RT-PCR mediante los cebadores específicos de AIMP2DX2 descritos anteriormente en la presente. Cuando el presente procedimiento se lleva a cabo para detectar la proteína de AIMP2DX2 expresada, preferentemente se realiza con una variedad de procesos de inmunoensayo tales como transferencia Western por medio de anticuerpos específicos de AIMP2DX2 como se describió anteriormente.

Los siguientes ejemplos específicos están destinados a ilustrar la invención y no se deben interpretar como limitación del alcance de la invención que se define con las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

Procedimientos

Cultivo celular, medición de productos químicos y ciclo celular

Las células se mantuvieron en RPMI-1640 que contiene 10% de FBS. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se aislaron de embriones de 12,5-14,5 días y se cultivaron en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) que contiene 20% de FBS. Para evaluar el efecto de TGF-β en el ciclo celular, las células se incubaron con 2 ng/ml de TGF-β en medio libre de suero o que contiene 1% de FBS durante 24 horas y se recolectó para el análisis de FACS. La proliferación celular también se determinó por incorporación de timidina [³H]. Las células se incubaron en medio libre de suero con o sin TGF-β durante 20 horas, y posteriormente en presencia de 1 μCi/ml de [³H] timidina durante 4 horas. La timidina incorporada se cuantificó por centelleo líquido como se describió previamente (Kim, M. J. et al., Nat. Genet. 34, 330-336(2003)). El TGF-β se adquirió del sistema R&D y los anticuerpos anti-Smad2 y anti-Smad4 de Santa Cruz. El anticuerpo anti-AIMP2 se preparó de la siguiente manera: 500 ug de la proteína de AIMP2 aislada mezclada con 500 ul de adyuvante completo (Sigma, 1 mg/ml) se inyectó por vía subcutánea en conejo (macho, Nueva Zelanda). Después de 7 días, 500 ug de la proteína de AIMP2 aislada mezclada con 500 ul de adyuvante completo (1 mg/ml) se inyectaron en conejo, y posteriormente se realizaron las pruebas de inyección 2 veces en un intervalo de 7 días. Después de 3 días, el Ab anti-AIMP2 se aisló de sangre del conejo.

Inmunotransferencia e inmunoprecipitación

Las células se trataron con TGF-β durante los tiempos indicados y se extrajeron las proteínas con el buffer RIPA que contiene proteasa, se separaron con 10-12% de SDS-PAGE, y se inmunotransfirieron con los anticuerpos específicos por medio del sistema ECL. Para la inmunoprecipitación, los lisados celulares se aclararon por la preincubación con IgG y proteína A conjugada con agarosa. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se incubaron con el anticuerpo específico, y la proteína A conjugada con agarosa durante 2 horas. Después del lavado con PBS frío en hielo y RIPA una vez, las proteínas unidas precipitaron el anticuerpo específico, eluyeron y se sometieron al análisis de transferencia Western.

RT-PCR

Los ARN totales se aislaron siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen). En breves palabras, los tejidos recién preparados (3 x 3 x 3 mm) se cortaron en trozos pequeños, se mezclaron con 350 μl de tampón de lisis y se homogenizaron por medio del homogenizador o jeringa. Después de añadir 350 μl de 70% de etanol, los lisados se invirtieron varias veces, se cargan en la columna, se centrifugaron a 13.000 RPM durante 15 sec. Después del lavado de la columna con el tampón de lavado dos veces, los ARN se eluyeron con 40 μl de DW libre de ARNasa. Para la transcripción inversa, se usó 1 μg del ARN aislado como molde con el cebador específico de AIMP2 (Fig. 8b). Después de la reacción, la mezcla se diluyó 3 veces con DW y 1 μl de su alícuota se usó para 30 μl de la reacción de PCR que contiene 0,5 μl de dNTP (2,5 mM cada uno), 0,5 μl de los cebadores indicados (cada uno 10 μM), 1,5 μl de DMSO y 0,1 μl Taq polimerasa (5 U/pl).

Supresión de AIMP2DX2 con ARN-si

Para suprimir la expresión de AIMP2DX2, se prepararon ARNsi contra AIMP2DX2. Se diseñó la secuencia que codifica ARNsi contra AIMP2DX2 u se clonó en el sitio Sall y XbaI del sistema del vector 16 IMG-700 (Imgenex), seguido por la secuenciación del ADN para confirmar la secuencia clonada. Las células H322 se transflectaron con 2 µg del vector de expresión si-DX2. Después de 3 horas de incubación con complejo de ADN-liposoma en 1 ml de medio libre de suero, las células H322 se trataron con 1 ml de RPMI-1640 que contiene 20% de FBS. Posteriormente, las células se incubaron en medio libre de suero con o sin TGF-β durante 20 horas.

Análisis de doble híbrido de levadura

Los ADNc que codifican AIMP2 y Smad2 humano (y sus fragmentos de supresión) se obtuvieron por PCR por medio de cebadores específicos. Los productos de PCR de Smad2 y AIMP2 se digirieron con EcoRI y XhoI, y se ligaron en los mismos sitios de pEG202 (LexA) y pJG4-5 (B42), respectivamente (Gyuris, J et al., a human G1 and S fase protein fosfatase that associates with Cdk2. Cell 75, 791-803(1993)). Las interacciones entre los fragmentos Lex-Smad2 y B42-AIMP2 se analizaron en cuanto a su capacidad para crecer en medio de levadura que contiene X-gal descripto previamente (Rho, S. B. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4488-93. (1999)).

15 Construcción de las células que generan en forma estable AIMP2DX2

Los MEF tipo salvaje se transflectaron con pcDNA-AIMP2DX2 o pcADN mismo y los transfectantes se seleccionaron en medio DMEM que contiene 400 µg/ml de G418. Después de eliminar las células no transfectadas, los transfectantes se cultivaron en el medio normal sin G418 durante 3 días, se fijaron con 2% de PFA y se tiñeron con Giemsa.

20 Inmunotinción y análisis histológico

Los portaobjetos con tejido congelado se fijaron con 2% de paraformaldehído y se lavaron co PBS frío en hielo. Después del bloqueo y la permeabilización con PBS que contiene 0,2% de Triton X-100 (PBST) y 1% de BSA, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anti-AIMP2 durante 2 horas. Después de lavar con PBS, también se incubaron con IgG-FITC de cabra anti-conejo y yoduro de propidio (50 µg/ml) durante 1 hora, se lavaron con PBS, se montaron y observaron bajo un microscopio confocal.

Construcción del vector de expresión de AIMP2DX2

Para construir el vector de expresión de AIMP2DX2, el ADNc de AIMP2DX2 se clonó en pcDNA3.1-myc. Primero, AIMP2DX2 del ADNc de H322 se amplificó por medio de los cebadores con el ligador para EcoRI y XhoI y se clonó en pcDNA3.1-myc (Invitrogen) por medio de EcoRI y XhoI. El vector de pcDNA3.1-myc/AIMP2DX2 para expresar AIMP2DX (Fig. 12) se introdujo en E. coli DH5a, que fue depositada el 25 de octubre de 2004 en la Autoridad de Depósito Internacional, la Korean Collection for Type Cultures (KCTC) y se le dio el número de acceso KCTC 10710BP.

Generación y caracterización de ratón deficiente

La mutación del ADN genómico de un ratón se generó por un procedimiento de captura génica (Zambrowicz et al, Nature, 9, 608-611, 1998). El vector de captura génica se usó para generar la biblioteca de mutantes aleatoria (OmniBank library, Lexicon Genetics, USA) de las células madre embrionarias derivadas de ratón 129/SvEvBrd. En la biblioteca, se identificaron los clones de OST7994 en los que se alteró el gen de AIMP2DX2. Por medio del uso del clon anterior, se generaron ratones heterocigotas C57/BL6 siguiendo el protocolo estándar de Lexicon Genetics. Los ratones heterocigotas posteriormente se cruzaron para obtener ratones mutantes homocigotos. Los embriones de ratón aislados de 13,5 días se cortaron con hoja de afeitar, se tripsinizaron y sembraron en placa de petri para el cultivo.

La mutación se confirmó por los análisis de transferencia Southern y PCR por medio de los ADN genómicos aislados de células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). La expresión de AIMP2 se determinó por los análisis de transferencia Northern y Western. La ubicación de la inserción de la trampa génica se determinó por la secuenciación del ADN genómico. Para la transferencia Southern, el ADN genómico se aisló de la cola del ratón y se digirió con SacI. Los fragmentos de ADN escindidos se separaron por la electroforesis en gel desnaturalizante y se hibridaron con el producto de PCR de 1,2 kb marcado radiactivamente del gen de AIMP2 con los cebadores, SEQ NOs 17 y 18. Las bandas hibridadas se detectaron por medio del analizador phosphorimage. El ADN genómico aislado también se usó para el análisis de PCR con los pares de cebadores específicos, SEQ NOs 19 y 20, SEQ NOs 20 y 21.

Para el análisis Northern, se preparó el ARN celular total de las células de fibroblastos embrionarios de ratón por medio del uso del kit RNeasy Midi (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARN aislados (30 µg) se separaron por electroforesis en geles de 1,2% de agarosa/2,2 M de formaldehído, se transfirieron a membranas Hybond N (Amersham) y posteriormente se fijaron en la membrana por irradiación UV. Los ARN de la membrana se hibridaron con las sondas específicas generadas por PCR del ADNc de AIMP2 por medio de la

solución de hibridación de ExpressHyb (CLONTECH). Las proteínas se extrajeron de las células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a transferencia Western con anticuerpo policlonal anti-AIMP2 descrito (Park et al, 274, 16673-16676, 1999; Kim et al, J Biol Chem, 275, 21768-21772, 2000).

5 Formación de cáncer de pulmón

Se usaron 32 ratones AIMP2^{+/-} (19 ratones macho y 13 hembras) y 25 ratones AIMP2^{+/+} (14 ratones macho y 11 hembras) para el experimento. Nosotros indujimos el cáncer de pulmón mediante la inyección intraperitoneal del carcinógeno químico, benzo-(α)-pireno (BP, 100 mg/kg) en ratones AIMP2^{+/+} y AIMP2^{+/-}, y se controló la formación del tumor en el pulmón. Como grupo control, se inyectaron 3 ratones AIMP2^{+/+} (2 macho y 1 hembra) y 5 ratones AIMP2^{+/-} (4 macho y 1 hembra) con solución bical (10% de DMSO y 35% de PEG 40 en solución salina).

Modelo de cáncer de piel por medio de ratón deficiente

33 ratones de tipo salvaje (WT) y deficientes en AIMP2 (KO) de ambos sexos se dividieron en los siguientes grupos: grupos de macho WT control (3), macho WT tratado (6), hembra WT control (2), hembra WT tratada (6), macho KO control (2), macho KO tratado (6), hembra KO control (3), y hembra KO tratada (5).

Se aplicó tópicamente una sola dosis (0,2 μmol/0,2 ml de acetona) de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) a los lomos afeitados de los ratones pertenecientes a los grupos tratados, mientras que los ratones de los grupos control se trataron con solo acetona. Después de una semana, los ratones iniciados con DMBA se trataron con 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA, 10 nmol/0,2 ml de acetona) dos veces por semana durante 21 semanas. Los animales control se trataron con acetona solo a lo largo del estudio. A partir de 1 semana del tratamiento con promotor, se contaron los tumores de al menos 1 mm de diámetro cada semana. Después de 21 semanas se sacrificaron los ratones y las muestras de tumor se corrigieron para el posterior análisis bioquímico.

Ejemplo 1

Importancia funcional y modo de trabajo de AIMP2 en la señalización de TGF-β

Para observar la importancia del AIMP2 en la señalización de TGF-β, comparamos las respuestas de AIMP2^{+/+} y AIMP2^{-/-}-MEF a la detención celular inducida por TGF-β, translocación nuclear de Smad2/3 e interacción de AIMP2 con Smad2/3. Si bien el crecimiento de las células tipo salvaje fue suprimido por TGF-β, las células deficientes AIMP2 no respondieron a la señal, determinado por la incorporación de timidina, formación de colonia y citometría de flujo (Fig. 1a, 1b y 1c, respectivamente). Cuando los MEF se trataron con TGF-β, Smad2 y Smad3 se translocaron al núcleo en las células normales, pero no en las células AIMP2^{-/-} (Fig. 1d). Todos estos resultados sugieren la importancia funcional de AIMP2 en la señalización de TGF-β por medio de Smad2 y Smad3. La posible interacción de AIMP2 con Smad2 y 3 se examinó por coimmunoprecipitación. AIMP2 mostró la interacción con Smad2/3 que fue aumentada por TGF-β (Fig. 1e). La interacción directa de AIMP2 con dos R-Smads también se confirmó con los ensayos de doble híbrido en levadura y de interacción in vitro (Figs. 2 y 7). La cantidad de AIMP2 unido a Smad2/3 aumentó de acuerdo con la inducción de AIMP2 por TGF-β (Fig. 2a) cuando el nivel de AIMP2 aumentó por transfección, la expresión de los genes blanco de TGF-β aumentó, lo que sugiere su papel estimulador en la señalización de TGF-β (Fig. 2b). Debido que AIMP2 se une a Smad2 y 3, nosotros esperamos que actúe en estos dos R-Smads de manera similar y de este modo se centre en su relación con Smad2 en más detalle. La fosforilación dependiente de TGF-β de Smad2 se suprimió en los MEF deficientes en AIMP2, pero se restauró cuando se introdujo AIMP2 en las células AIMP2^{-/-} (Fig. 2c). El dominio de Smad2 involucrado en la interacción con AIMP2 se determinó por el ensayo de híbrido doble de levadura (Fig. 2d) y de interacción in vitro (Fig. 7). Los dos experimentos revelaron que la interacción involucra el dominio MH2 del Smad2.

Para determinar el modo de acción de AIMP2 en la señalización de TGF-β, la asociación inducida por TGF-β de Smad2 con el receptor de TGF-β se comparó en las células normales y deficientes en AIMP2. Las células se trataron con TGF-β y la asociación de Smad2 y el receptor se controló por coimmunoprecipitación del receptor tipo I con Smad2 en intervalos de tiempo. Si bien se observó la unión de Smad2 inducida por TGF-β al receptor de TGF-β en un punto de tiempo temprano y disminuyó en las células de tipo salvaje, el receptor unido a Smad2 se acumuló en la etapa tardía después del tratamiento con TGF-β en las células deficientes en AIMP2 (Fig. 2e). En la fosforilación inducida por TGF-β de Smad2, el Smad2 fosforilado aumentó gradualmente en las células tipo salvaje, pero se suprimió severamente en las células AIMP2^{-/-} (Fig. 2f). Estos resultados demuestran que AIMP2 cumple un papel crítico en la fosforilación inducida por TGF-β de R-Smads por medio de su interacción directa con R-Smad2.

Ejemplo 2

Supresión de AIMP2 y generación de su variante por supresión en las células cancerosas

Para explorar la posible asociación de AIMP2 con la formación de cáncer, se observó la variación del nivel de AIMP2 en diferentes líneas de células cancerosas [A549 (carcinoma epitelial de pulmón), DU145 (carcinoma de próstata), HCT116 (carcinoma colorrectal humano), H460 (carcinoma pulmonar de células grandes), H322 (carcinoma bronquioalveolar de pulmón) y H290 (línea celular cancerosa de mesotelioma) disponibles en ATCC]. Tres de las

seis líneas celulares analizadas mostraron menor nivel de AIMP2 en los análisis de transferencia Western (Fig. 3a) y FACS (Fig. 3b). Todas las líneas celulares con bajo nivel de AIMP2 expresaron el nivel normal del receptor de TGF- β tipo II y retuvieron su actividad de quinasa, lo que implica que el nivel bajo de AIMP2 no proviene de la mala funcionalidad del receptor. Para determinar si la variación del nivel de AIMP2 provino de la diferencia de la transcripción, se realizó la RT-PCR con diferentes combinaciones de cebadores específicos de AIMP2. El gen de AIMP2 consiste en cuatro exones (Fig. 8a). Cuando los cebadores de las SEQ ID Nos. 3 y 4 se usaron para generar ADNc de AIMP2 que abarca el exón 3 y 4, la disminución del transcrito de AIMP2 no se observó en las células que muestran el nivel reducido del AMP2 (Fig. 3c, primera hilera), lo que sugiere que no resulta de la menor transcripción. Cuando se usaron los cebadores de las SEQ ID Nos. 5 y 6 que generan el transcrito del exón 1 a 3, se obtuvieron no solo el transcrito del tamaño esperado, sino también uno menor (Fig. 3c, segunda hilera). El análisis de secuenciación de este pequeño transcrito reveló que carece del exón 2 que codifica 69 aa del AIMP2 (Fig. 8b). Para confirmar la generación de este transcrito menor, se diseñó el cebador de la SEQ ID No.8 (Fig. 8b, cebador DX-B) se dirige a la secuencia de unión del exón 1 y 3 que se genera por la supresión del exón 2, y se realizó la RT-PCR con el cebador de la SEQ ID No.7. Las líneas celulares que expresan menor nivel de gen de AIMP2 generaron el transcrito menor (designado DX2, Fig. 3c, segunda y tercera hilera).

Los análisis de transferencia Western con el anticuerpo anti-AIMP2 detectaron solo AIMP2 de longitud completa, pero no DX2 (Fig. 2a), lo que implica que DX2 puede ser muy inestable en el nivel de proteína. La tinción con inmunofluorescencia también demostró el menor nivel de AIMP2 en H460, H322 y H290 (Fig. 3d). Para excluir la posibilidad de tefir artefacto, las células H460 y DU145 se cocultivaron en la misma placa y se tiñeron con AIMP2. Nuevamente, la intensidad de la tinción de AIMP2 en H460 fue mucho más débil que la de DU145 (Fig. 9a). Además, la localización nuclear dependiente de TGF- β de AIMP2 no se observó en las células con baja expresión de AIMP2 (Fig. 3d, hilera inferior). Para establecer la relación entre el nivel de AIMP2 y funcionalidad del TGF- β , medimos la supresión del crecimiento por TGF- β en estas líneas celulares. Si bien el crecimiento de las células A549 y DU145 fue suprimido por TGF- β , las células con bajo nivel de AIMP2 no respondieron a TGF- β (Fig. 3e). Este resultado es compatible con los informes previos de que A549 es sensible mientras que H460 es resistente a la señal TGF- β (Osada, H. et al. *Cancer Res.* 61, 8331-8339 (2001); Kim, T. K. et al., *Cáncer de pulmón* 31, 181-191(2001)). Además, los genes blanco se indujeron con TGF- β en A549 y DU145, pero no en H322 y otras dos líneas celulares con bajo AIMP2 (Fig. 3f).

Ejemplo 3

La variante por supresión inactiva forma un complejo con AIMP2 funcional

Para abarcar la relación causal de la generación de DX2 y la supresión de AIMP2, se examinó el cambio del nivel de AIMP2 después de la transfección de DX2 en DU145. AIMP2 se redujo en las células transfectadas con DX2, que se demuestra por análisis de transferencia Western (Fig. 4a, primera hilera) y FACS (Fig. 9b). Además, la expresión del blanco AIMP2, c-myc, se elevó por la introducción de DX2 (Fig. 4a, tercera hilera). DX2 también redujo la detención del crecimiento por TGF- β (Figs. 4b y 9c). Nosotros investigamos posteriormente cómo DX2 puede afectar el AIMP2 funcional (AIMP2F). Debido a AIMP2 tiene un potencial para formar un homodímero (Quevillon, S. et al., *J. Mol. Biol.* 285, 183-195(1999); y Kim, J. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7912-7916(2002)), examinamos si AIMP2 DX2 puede interactuar con AIMP2F con el ensayo de doble híbrido en levadura. AIMP2DX2 mostró la interacción con AIMP2F, pero no con sí mismo (Fig. 4c). En un ensayo de interacción in vitro, los AIMP2F y -DX2 sintetizados radiactivamente, peor no DX2, se co- purificaron con GST-AIMP2F (Fig. 4d), lo que demuestra la interacción directa entre AIMP2F y -DX2. Para observar si DX2 es activa en la señalización de TGF- β , analizamos su interacción con Smad2 con el ensayo de doble híbrido en levadura. Si bien AIMP2 interactuó con Smad2 así también como FBP que es el blanco conocido de AIMP2 (Kim, M. J. et al., *Nat. Genet.* 34, 330-336(2003)), DX2 no se unió a ninguna de estas proteínas, lo que sugiere que puede ser funcionalmente inactiva (Fig. 4e).

Para entender cómo la formación del heterodímero puede suprimir AIMP2, examinamos si el nivel de AIMP2 está controlado por el proceso de degradación dependiente del proteasoma. Las células H322 productoras de DX2 se trataron con el inhibidor del proteasoma, ALLN (Zhou, M., et al., *J. Biol. Chem.* 271, 29769-24775 (1996)) y se analizó si el nivel de AIMP2 aumenta con el bloqueo del proteasoma. El nivel de AIMP2 fue aumentado significativamente por el tratamiento de ALLN como se muestra por transferencia Western (Fig. 4f), tinción con inmunofluorescencia (Fig. 4g) y citometría de flujo (Fig. 9d), lo que sugiere que su nivel celular se puede controlar por la degradación dependiente del proteasoma. Además, también se detectó la forma AIMP2DX2 por la inhibición del proteasoma (Fig. 4f), lo que confirma la noción de que DX2 puede ser inestable debido a la rápida degradación dependiente del proteasoma. La baja intensidad de AIMP2DX2 parece resultar de su transcripción más baja en comparación con AIMP2 normal, demostrado por el análisis de RT-PCR (Fig. 3c) y/o reconocimiento menos eficiente por el anticuerpo anti-AIMP2. Debido a que la degradación de AIMP2 está mediada por el proteasoma, analizamos si su ubiquitinación está promovida por DX2. Cuando AIMP2 inmunoprecipitó del control y las células transfectadas con DX2 se trataron con ALLN y transfirieron con el anticuerpo anti-ubiquitina, se observó una mayor cantidad de AIMP2 ubiquitinada de las células transfectadas con DX2 en comparación con las células control (Fig. 4h). En conjunto, DX2 parece actuar como una mutante negativa dominante para formar un complejo inactivo con AIMP2 que es conducido rápidamente al proceso de degradación.

Ejemplo 4

AIMP2DX2 inactiva la señalización de TGF- β y promueve el crecimiento celular

DX2 se transfectó en los MEF y se controló su efecto sobre el crecimiento celular por el análisis microscópico y la formación de colonia. El crecimiento celular aumentó significativamente por la introducción del DX2 (Fig. 5a). Posteriormente introdujimos ARNsi (si-DX2) que suprime específicamente el transcrito de DX2 y se examina si puede restaurar el nivel normal de AIMP2 y la señalización de TGF- β en las células H322 que expresan DX2. Cuando la célula H322 se transfectó con el vector que expresa ARNsi de No.4 o No 5, la elevación de la muerte celular (izquierda) y la generación de la detención del ciclo celular (derecho) por el TGF- β se midieron por FACS (Fig. 5d). Para analizar si el nivel normal de AIMP2 y la señalización de TGF- β se pueden reparar con el ARNsi, el vector que genera el ARNsi (si-DX2) de No. 4 que suprime específicamente la expresión específica de DX2, se transfectó a las células H322 que expresan DX2. El si-DX2 cortó el transcrito de DX2 (Fig. 5e superior) y recuperó el nivel normal de AIMP2 y la fosforilación inducida por TGF- β de Smad2 (Fig. 5e inferior y Fig. 5f), localización nuclear de p-Smad2 (Fig. 5f), expresión del indicador dependiente de TGF- β (Fig. 5g) y detención celular (Fig. 5h). Todos estos resultados demuestran el efecto disruptivo de DX2 sobre la señalización de TGF- β y el control del crecimiento celular.

Ejemplo 5

Asociación de la variante por supresión de AIMP2 con el cáncer de pulmón humano

Debido a que la reducción del AIMP2 se detecta con frecuencia en diferentes líneas de células cancerosas (Figs. 3a, 3b y 3d), y la pérdida de AIMP2 lleva a la hiperproliferación de las células pulmonares (Kim, M. J. et al., Nat. Genet. 34, 330-336(2003)), examinamos la asociación de la anomalía de AIMP2 con la formación del cáncer de pulmón. Nosotros indujimos el tumor de pulmón a través de la inyección intraperitoneal del carcinógeno químico, benzo-(α)-pireno (BP, Wang, Y. et al., Cancer Res. 63, 4389-4395 (2003)) en ratones AIMP2^{+/+} y AIMP2^{+/-}, y se controló la formación tumoral en el pulmón. A partir de 6 semanas después de la administración de BP, se observaron tumores de pulmón con 50-70% de frecuencia en ratones AIMP2^{+/-}, y a aproximadamente 30% en los compañeros de camada tipo salvaje (Fig. 6a), lo que implica que los ratones heterocigotas son más sensibles a la tumorigénesis inducida por BP. Tres de cuatro pulmones aislados de ratones AIMP2^{+/-} mostraron tumores, mientras que solo uno desarrolló tumores entre estos tres ratones AIMP2^{+/+} y todos estos tumores generaron DX2 (Fig. 10), lo que respalda adicionalmente la relevancia de DX2 para la formación del tumor. Posteriormente comparamos el nivel de AIMP2 en los tejidos inflamatorios pero no tumorales y en los tejidos tumorales del pulmón humano. DX2 se generó solo en los tejidos tumorales (Fig. 6b). Para excluir la posibilidad de que el nivel de formación de AIMP2 y DX2 pueda variar según los diferentes individuos, realizamos los análisis de RT-PCR e inmunofluorescencia en los pares de tejido normal y tumoral aislados de los mismos pacientes. DX2 no se detectó en un caso que muestra el nivel normal de AIMP2 en la región del cáncer (Figs. 6e y 6f, paciente 22872).

Ejemplo 6

Asociación de AIMP2, AIMP2DX2 y su variante por supresión

La relación de AIMP2, AIMP2DX2 y su variante por supresión con cáncer se examinó en los tejidos humanos y líneas de células cancerosas.

La formación de AIMP2DX2 en tejido normal y cancerosos obtenidos del carcinoma hepatocelular se evaluó por RT-PCR. Asimismo, se examinó la formación de AIMP2DX2 en diferentes líneas de células cancerosas (Fig. 11a). Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 y se recolectaron 24 horas más tarde. Las células recolectadas se lisaron usando el buffer GSS, se mezclaron con 4% de alcohol isoamílico que contiene fenol ácido (pH 4,3) y cloroformo y posteriormente se centrifugaron. El sobrenadante obtenido por centrifugación se precipitó con isopropanol y se centrifugó nuevamente, y posteriormente se obtuvo el pellet. El pellet se lavó con etanol y se disolvió en DW. El ARN se transcribió en forma inversa a 42 °C durante 1 hora por medio de la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) y posteriormente se realizó la PCR con 38 ciclos de 95°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min por medio de los cebadores de las SEQ Nos. 16 y 17. AIMP2DX2 se expresaron en líneas celulares de cáncer de pulmón (H226, H460, H322 y H290), líneas celulares renales embrionarias (293), líneas celulares de osteosarcoma (SaOS2), líneas celulares de cáncer de piel (HaCAT), y líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) (Fig. 11b).

Ejemplo 7

Estudio de tumorigénesis usando ratones deficientes en AIMP2

Se observó la sensibilidad al tumor en ratones deficientes en AIMP2DX2 y ratones salvajes.

Como resultado, el número de ratones que tienen tumores en la piel y el número de tumores de ratones aumentó significativamente en ratones deficientes en AIMP2DX2. En detalle, cuando la tumorigénesis del ratón se indujo con DMBA y se promovió con TPA, la tasa de formación de tumores en los ratones hembra deficientes en AIMP2 aumentó aproximadamente 1,3 veces que en los ratones hembra control WT. Asimismo, la tasa de formación de tumor en ratones macho deficientes en AIMP2 aumentó aproximadamente 2 veces respecto del ratón macho control

WT (Fig 12b). El número de tumores formados en los ratones hembra deficientes en AIMP2 aumentó aproximadamente 4 veces respecto de los ratones hembra control WT. El número de tumores formados en los ratones macho deficientes en AIMP2 aumentó aproximadamente dos veces respecto del ratón macho control WT (Fig. 12c y Fig. 12d).

5

<110> Seoul National University Industry Foundation

<120> Uso de AIMP2DX2 para el diagnóstico y tratamiento del cáncer

<130> P42707EP-K

10

<140> EP 05819055.4

<141> 2005-11-18

<150> KR20040097164

15

<151> 2004-11-24

<150> KR20050039073

<151> 2005-05-10

20

<160> 21

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

25

<211> 756

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30

<221> CDS

<222> (1)..(753)

<223> secuencia de aminoácidos de p38DX2

<400> 1

35

ES 2 371 479 T3

atg ccg atg tac cag gta aag ccc tat cac ggg ggc ggc gcg cct ctc	48
Met Pro Met Tyr Glh Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu	
1 5 10 15	
cggtgtg gag ctt ccc acc tgc atg tac cgg ctc ccc aac gtg cac ggc	96
Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly	
20 25 30	
agg agc tac ggc cca gcg ccg ggc gct ggc cac gtg cag gat tac ggg	144
Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly	
35 40 45	
gcg ctg aaa gac atc gtg atc aac gca aac ccg gcc tcc cct ccc ctc	192
Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu	
50 55 60	
tcc ctg ctt gtg ctg cac agg ctg ctc tgt gag cac ttc agg gtc ctg	240
Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu	
65 70 75 80	
tcc acg gtg cac acg cac tcc tcg gtc aag agc gtg cct gaa aac ctt	288
Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu	
85 90 95	
ctc aag tgc ttt gga gaa cag aat aaa aaa cag ccc cgc caa gac tat	336
Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr	
100 105 110	
cag ctg gga ttc act tta att tgg aag aat gtg ccg aag acg cag atg	384
Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met	

ES 2 371 479 T3

115	120	125	
aaa ttc agc atc cag acg atg tgc ccc atc gaa ggc gaa ggg aac att			432
Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile			
130	135	140	
gca cgt ttc ttg ttc tct ctg ttt ggc cag aag cat aat gct gtc aac			480
Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn			
145	150	155	160
gca acc ctt ata gat agc tgg gta gat att gcg att ttt cag tta aaa			528
Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys			
165	170	175	
gag gga agc agt aaa gaa aaa gcc gct gtt ttc cgc tcc atg aac tct			576
Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser			
180	185	190	
gct ctt ggg aag agc cct tgg ctc gct ggg aat gaa ctc acc gta gca			624
Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala			
195	200	205	
gac gtg gtg ctg tgg tct gta ctc cag cag atc gga ggc tgc agt gtg			672
Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val			
210	215	220	
aca gtg cca gcc aat gtg cag agg tgg atg agg tct tgt gaa aac ctg			720
Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu			
225	230	235	240
gct cct ttt aac acg gcc ctc aag ctc ctt aag tga			756
Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys			
245	250		

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 371 479 T3

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15

Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
 20 25 30

Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly
 35 40 45

Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu
 50 55 60

Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80

Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu
 85 90 95

Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr
 100 105 110

Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met
 115 120 125

Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile
 130 135 140

Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys
 165 170 175

Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser
 180 185 190

Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala
 195 200 205

Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val
 210 215 220

Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu
 225 230 235 240

Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 245 250

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> cebador 6

<400> 3

10 agtgctttgg agaacagaat 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador 7

20 <400> 4

aagagcagag ttcattggagc 20

<210> 5

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador 1

30

<400> 5

tctgacgggt tctgacggt 20

<210> 6

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador 5

<400> 6

5 aagtgaatcc cagctgatag 20

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador DX2-F

15 <400> 7

tgctttgggt ctgccatgcc g 21

<210> 8

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador DX2-B

25

<400> 8

cgtaatcctg cacgtggcca g 21

<210> 9

30 <211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de ácidos nucleicos codificadora de si-DX2 #3

<400> 9

tgcaggccac gtgcaggta cgggagtagg ccgtaatcct gcacgtggcc tttt 54

<210> 10

<211> 55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos codificadora de si-DX2 #3

<400> 10

10 ctagaaaagg ccacgtgcag gattacggca gactcccgta atcctgcacg tggcc 55

<210> 11

<211> 58

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos codificadora de si-DX2 #4

20 <400> 11

tcgagctggc cacgtgcagg attacgagta ctggtaatcc tgcacgtggc cagctttt 58

<210> 12

<211> 58

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos codificadora de si-DX2 #4

30

<400> 12

ctagaaaagc tggccacgtg caggattacc agtactcgta atcctgcacg tggccagc 58

<210> 13

35 <211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos codificadora de si-DX2 #5

<400> 13

5 tcgacacgtg caggattacg gggcgagtac tggccccgta atcctgcacg tgtttt 56

<210> 14

<211> 56

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos codificadora de si-DX2 #5

<400> 14

15 ctagaaaaca cgtgcaggat tacggggcca gtactgccc cgtaatcctg cacgtg 56

<210> 15

<211> 15

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador RT

25 <400> 15

cagcaccacg tctgc 15

<210> 16

<211> 24

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador DX2-S2

35

<400> 16

ctggccacgt gcaggattac gggg 24

<210> 17

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador f3

<400> 17

10 gagcatctga gttgacccc tggaatctac 30

<210> 18

<211> 35

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador r2

20 <400> 18

ttgcaggatg ttggttacgt ccaagtctgc atctg 35

<210> 19

<211> 31

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador f6

30

<400> 19

gtcaccgaat gtaactgtgc tgcttcgaag 31

<210> 20

35 <211> 30

<212> ADN

<213> cebador pKOf2

ES 2 371 479 T3

<400> 20

gtaggtcca gactctcag agatcaagtc 30

5 <210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> cebador r6

10 <400> 21

ccataacca ggtgacggg ttagtgccc 30

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de AIMP2DX2 que comprende

(a) una secuencia de aminoácidos de AIMP2 en que se suprime la región del exón 2 de la secuencia de aminoácidos de AIMP2, en la que AIMP2 tiene la secuencia:

```

1 mpmvqvkyh gggaplrvel ptcmyrlpnh hgrsygpapg aghvveesnl siqalesrqd
61 dilkryelk aavdglskmi qtpdadldvt niiqadeptt lttaldlns vlgkdygalk
121 divinanpas ppislvlhr lcehfrvls tvhthssvks vpenllkcfg eqnkkqprqd
181 yqlgftliwk nvpktqmkfs iqtmcpiége gnlarflfsl fgqkhnava tlidswvdia
241 lfqlkegssk ekaavfrsmn salgkspwla gneltvadvv lswvlqqigg csvtvpavq
5 301 rwmrscenla pf.

```

o

(b) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 2.

2. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1.

10 3. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

4. Un vector recombinante, que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2 o reivindicación 3.

15 5. Una célula huésped que está transformada con el vector recombinante según la reivindicación 4, en la que la célula es una célula no humana o es una célula humana aislada que no es una célula madre embrionaria humana.

6. Un procedimiento para producir la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1, que comprende cultivar la célula según la reivindicación 5.

7. Un anticuerpo específico para la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1.

8. Un kit diagnóstico para cáncer, que comprende un anticuerpo según la reivindicación 7.

20 9. Un procedimiento para seleccionar la proteína de AIMP2DX2 como un marcador de cáncer, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una muestra por ensayar; y

(b) detectar en dicha muestra la expresión de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que la detección de la expresión de la molécula de ácido nucleico es indicativa de cáncer.

25 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha detección en la etapa (b) se lleva a cabo poniendo en contacto dicha muestra con un anticuerpo según la reivindicación 7.

11. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha detección en la etapa (b) se lleva a cabo por una reacción de amplificación o una reacción de hibridación.

30 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha reacción de amplificación se lleva a cabo por RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa-transcripción inversa) usando un cebador capaz de diferenciar un ARNm de AIMP2DX2 según la reivindicación 1 de un ARNm de AIMP2 o dicha reacción de hibridación se lleva a cabo por uso de una sonda capaz de diferenciar un ARNm de AIMP2DX2 según la reivindicación 1 de un ARNm de AIMP2, en el que AIMP2 tiene la secuencia:

1 mpmvqvkpyh gggaplrvel ptcmvrlpvn hgrsygpapg aghvqeesnl slqalesrqd
 61 dilkrlyelk aavdglskmi qtpdadldvt niiqadeptt lttaldlns vlgkdygalk
 121 divinanpas ppisllvlhr llcehfrvls tvhthssvks vpenllkcfg eqnkkqprqd
 181 yqlgftliwk nvpktqmkfs iqtmcpiège gnlarflfs! fgqkhnava tlidswvdia
 241 ifqlkegssk ekaavfrsmn salgspwla gneltvadvv lswvlqqigg csvtvpavq

301 rwmrscenla pf.

13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que la secuencia de dicho cebador comprende las SEQ ID Nos.5 y 6, 7 y 8 o 16 y 6; o la secuencia de dicha sonda comprende las SEQ ID No. 8 o 16.
- 5 14. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No.3, 4, 5, 6, 7, 8 o 16.
15. Una molécula de ácido nucleico de ARNsi específica para el ARNm de la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico de ARNsi comprende ARN sentido y antisentido que codifica la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10, SEQ ID Nos. 11 y 12 o SEQ ID Nos. 13 y 14.
- 10 16. Un oligonucleótido antisentido que es complementario con una región de unión entre los exones 1 y 3 de un ARNm de la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1.
17. Una composición farmacéutica para tratar cáncer que comprende la molécula de ácido nucleico de los ARNsi según la reivindicación 15, o el oligonucleótido antisentido según la reivindicación 16.
- 15 18. La molécula de ácido nucleico de los ARNsi según la reivindicación 15, o el oligonucleótido antisentido según la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento del cáncer.
19. El uso de la molécula de ácido nucleico de ARNsi según la reivindicación 15, o el oligonucleótido antisentido según la reivindicación 16 en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.
20. Un procedimiento de selección para un agente anticáncer que inhibe la formación de un heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1 y la proteína de AIMP2, que comprende las etapas de:
- 20 (a) poner en contacto una sustancia de ensayo con una composición que comprende la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1 y la proteína de AIMP2; y
- (b) determinar si la sustancia de ensayo inhibe la formación del heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1 y la proteína de AIMP2,
- 25 en el que la sustancia de ensayo para inhibir la formación del heterodímero entre la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1 y la proteína de AIMP2 se evalúa como un agente anticáncer, y en el que AIMP2 tiene la secuencia:

1 mpmvqvkpyh gggaplrvel ptcmvrlpvn hgrsygpapg aghvqeesnl slqalesrqd
 61 dilkrlyelk aavdglskmi qtpdadldvt niiqadeptt lttaldlns vlgkdygalk
 121 divinanpas ppisllvlhr llcehfrvls tvhthssvks vpenllkcfg eqnkkqprqd
 181 yqlgftliwk nvpktqmkfs iqtmcpiège gnlarflfs! fgqkhnava tlidswvdia
 241 ifqlkegssk ekaavfrsmn salgspwla gneltvadvv lswvlqqigg csvtvpavq

301 rwmrscenla pf.

21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que el procedimiento se realiza por un ensayo de doble híbrido en levadura o ensayo de interacción in vitro.
- 30 22. Un procedimiento de selección para un agente anticáncer que inhibe la expresión del gen que codifica la proteína de AIMP2DX2 según la reivindicación 1, o promueve la alteración de la proteína de AIMP2DX2 según la

reivindicación 1, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una sustancia de ensayo con las células que expresan el gen AIMP2DX2; y

(b) determinar si la sustancia de ensayo inhibe la expresión del gen AIMP2DX2 o promueve la alteración de la proteína de AIMP2DX2,

5 en el que la sustancia de ensayo para inhibir la expresión del gen de AIMP2DX2 se evalúa como un agente anticáncer.

23. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que el procedimiento se realiza por RT-PCR o transferencia Western.

10

Fig.1a

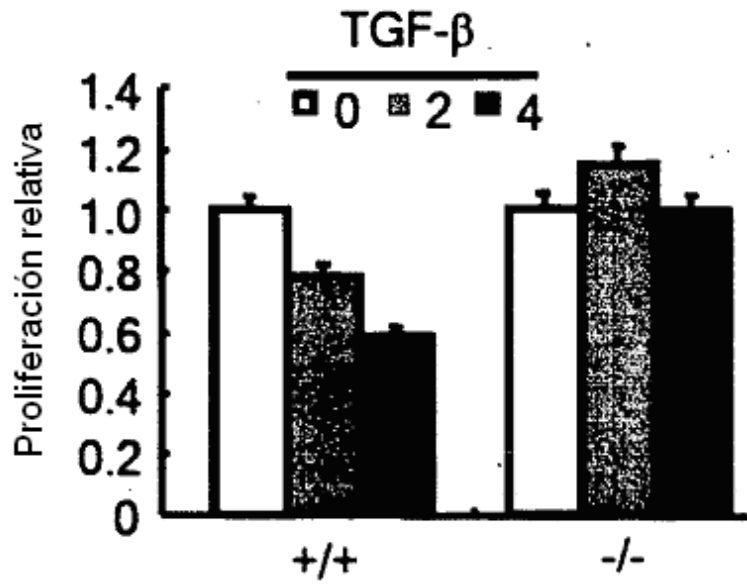


Fig.1b

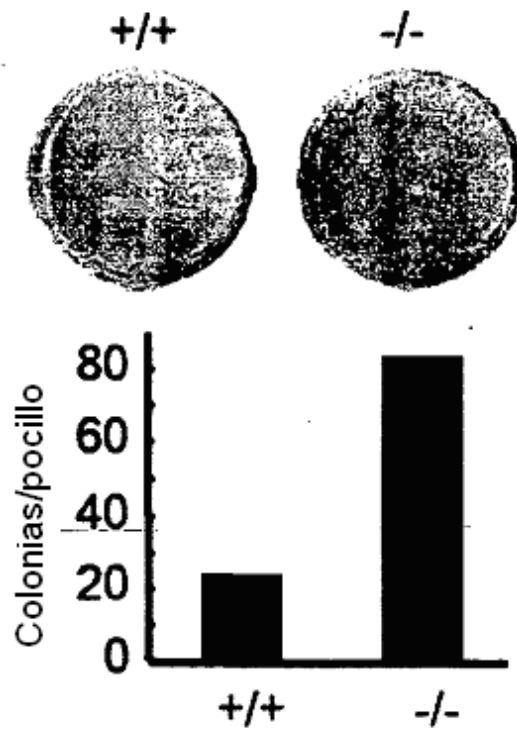


Fig.1c

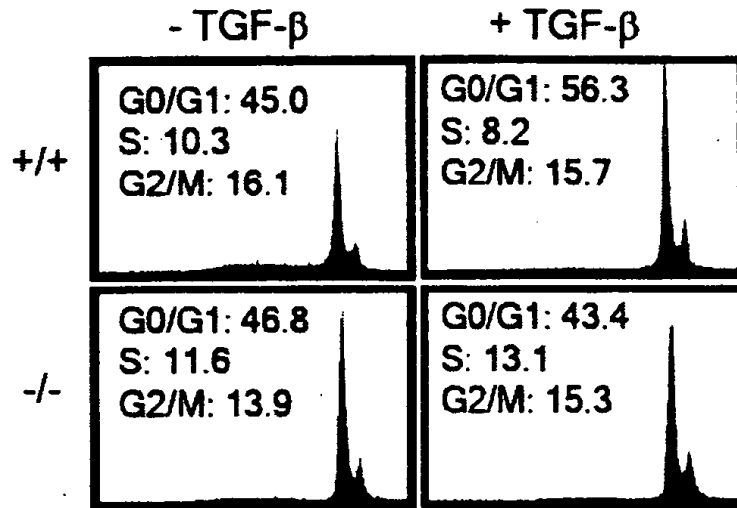


Fig.1d

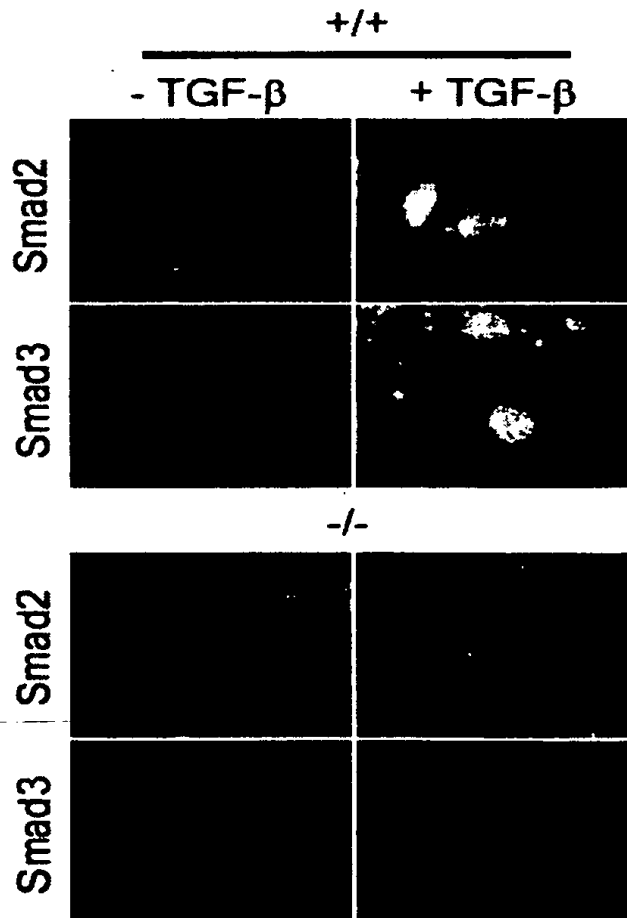


Fig.1e

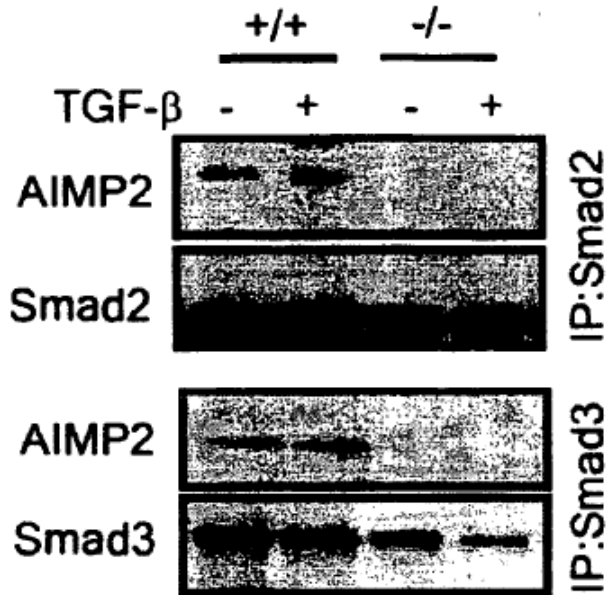


Fig.2a

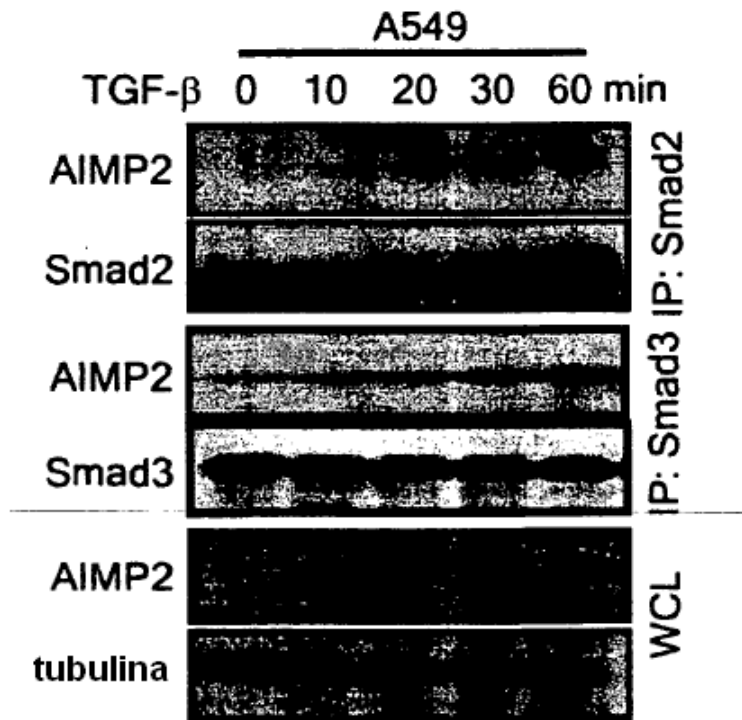


Fig.2b



Fig.2c

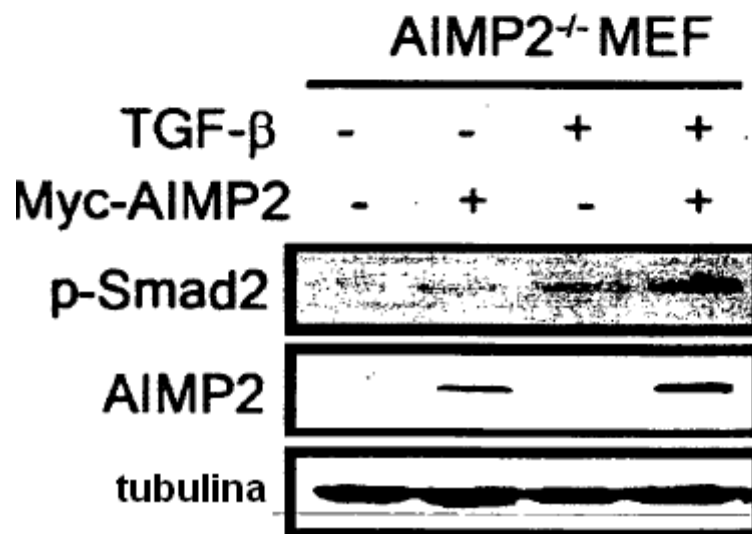


Fig.2d

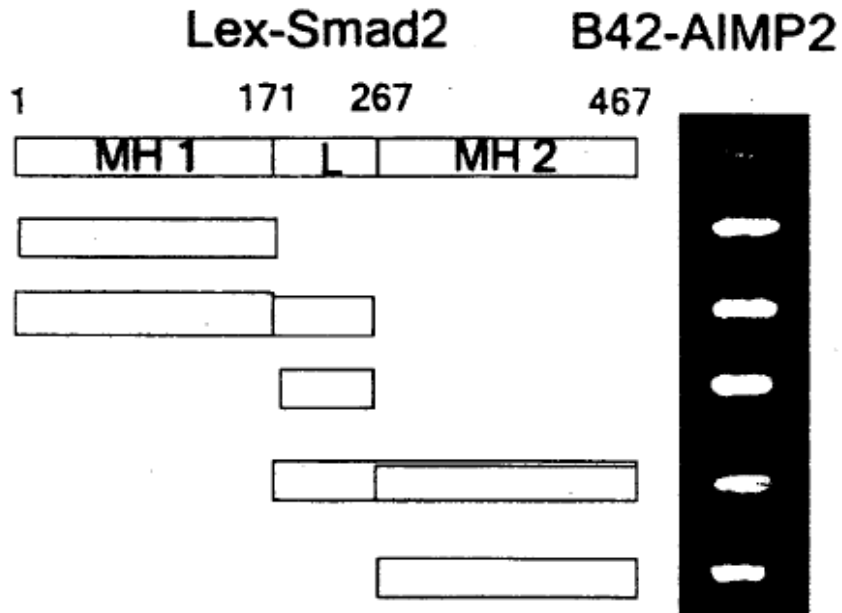


Fig.2e

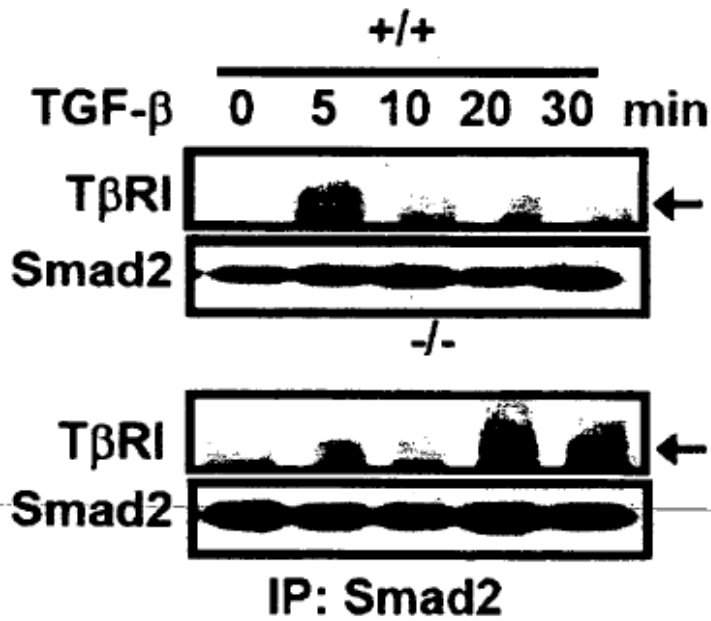


Fig.2f

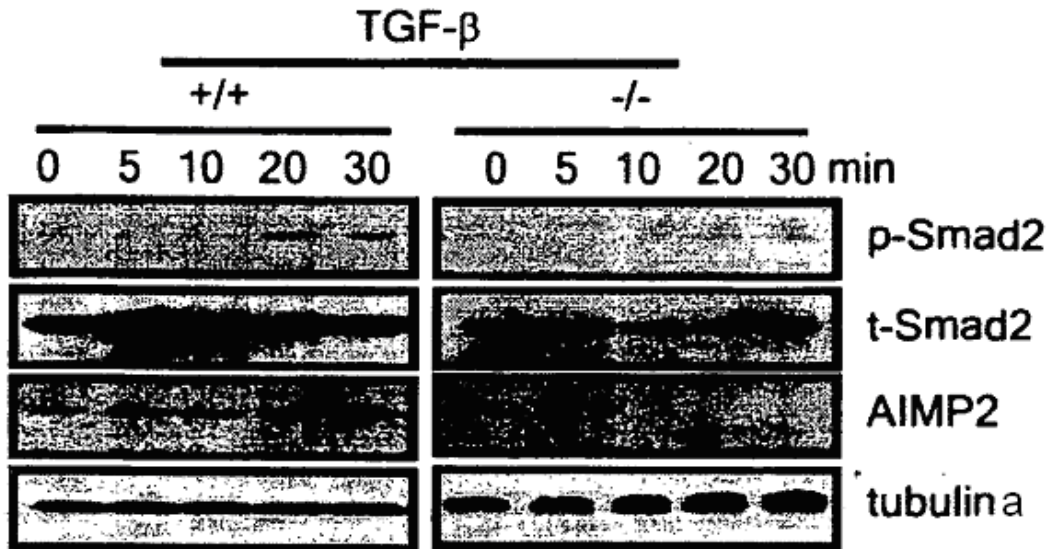


Fig.3a

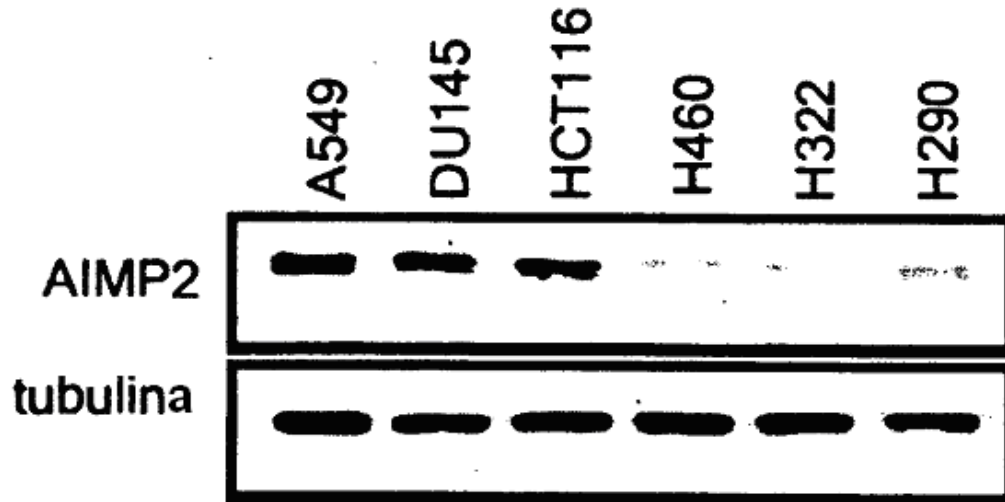


Fig.3b

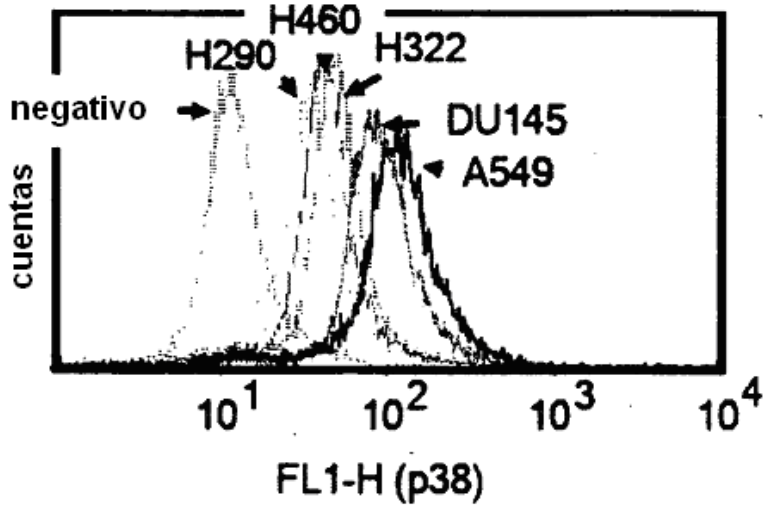


Fig.3c

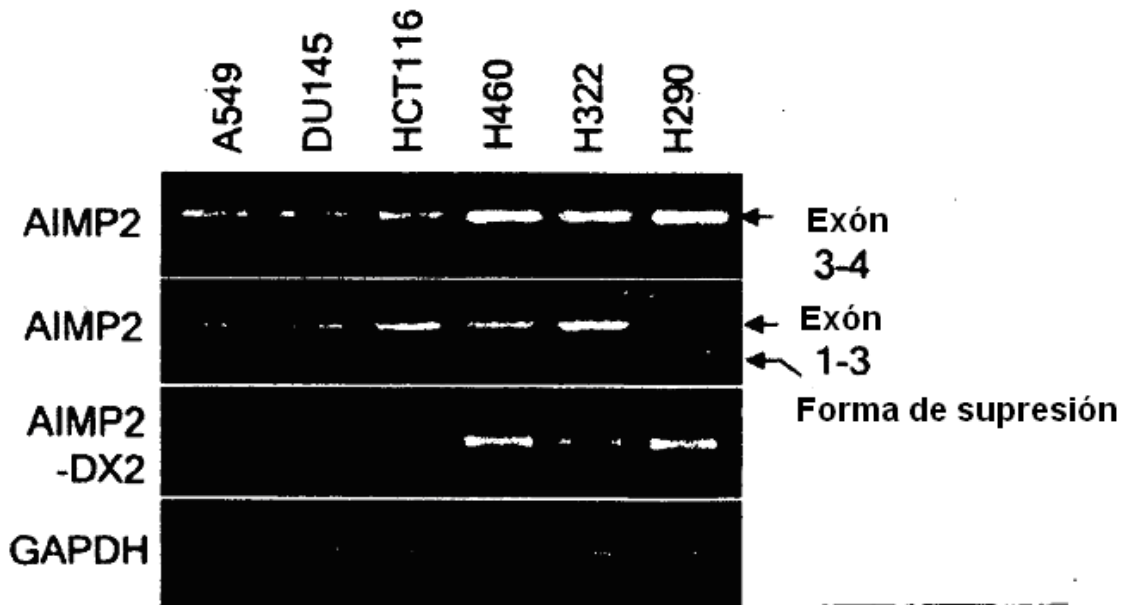


Fig.3d

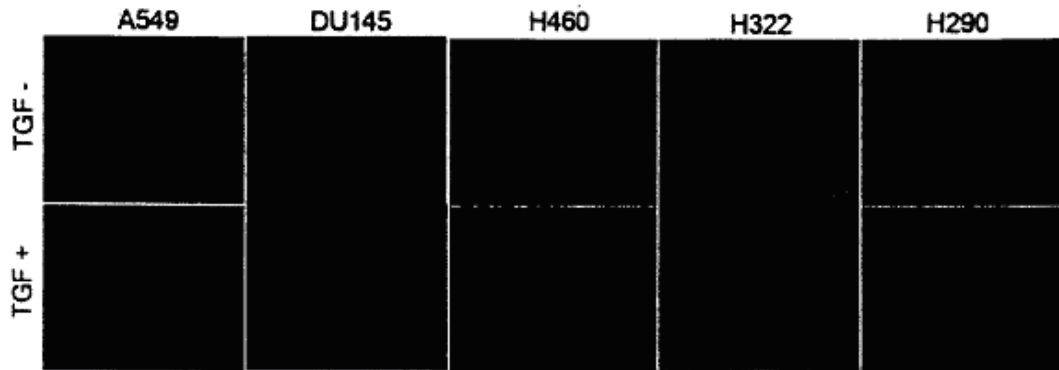


Fig.3e

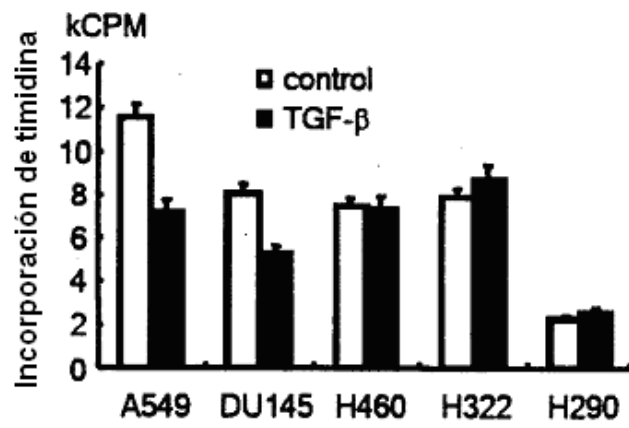


Fig.3f

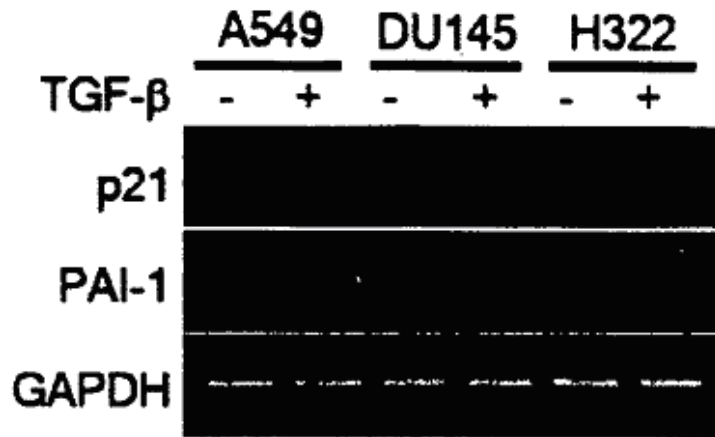


Fig.4a

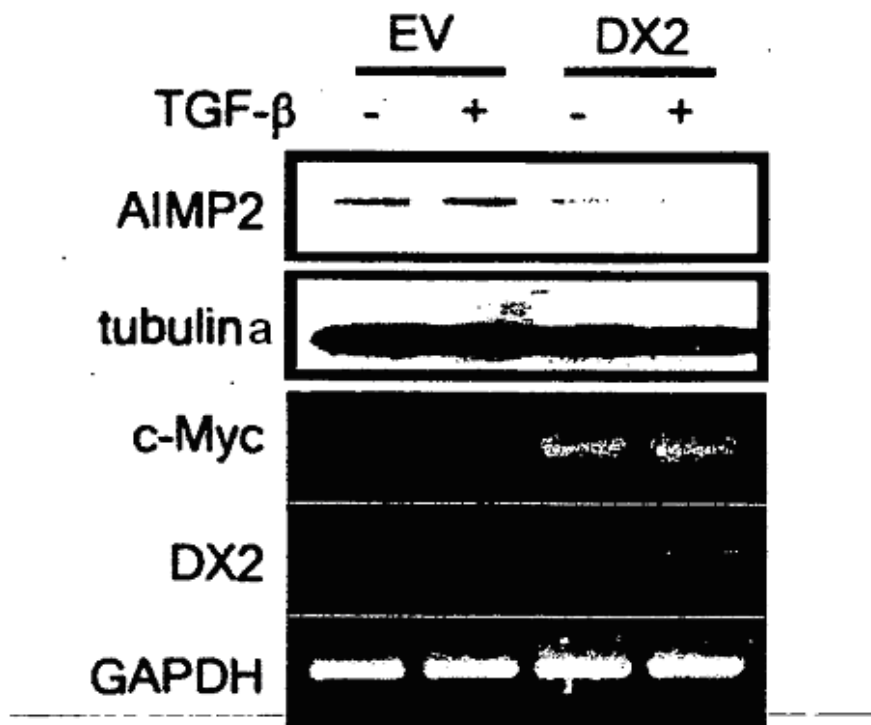


Fig.4b

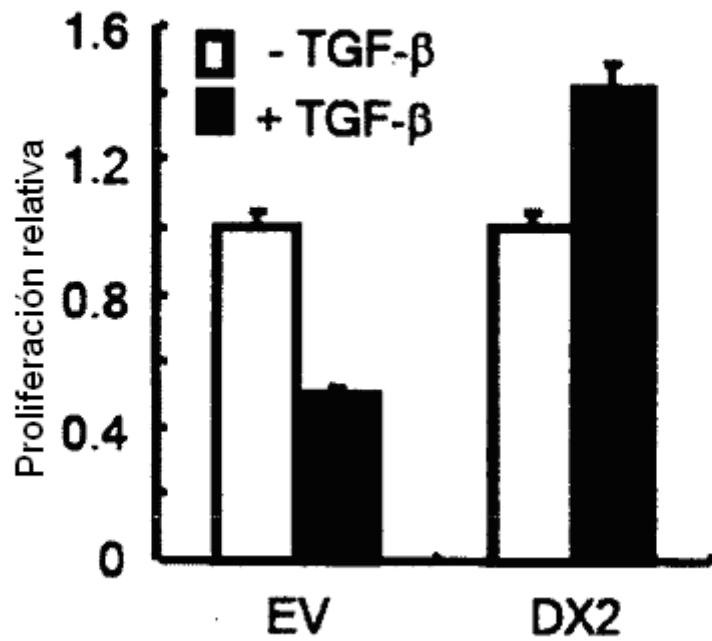


Fig.4c .

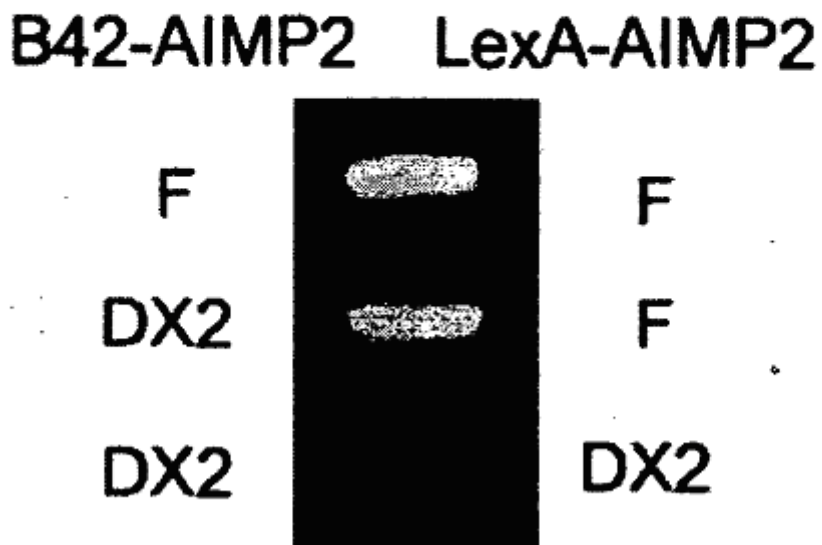


Fig.4d

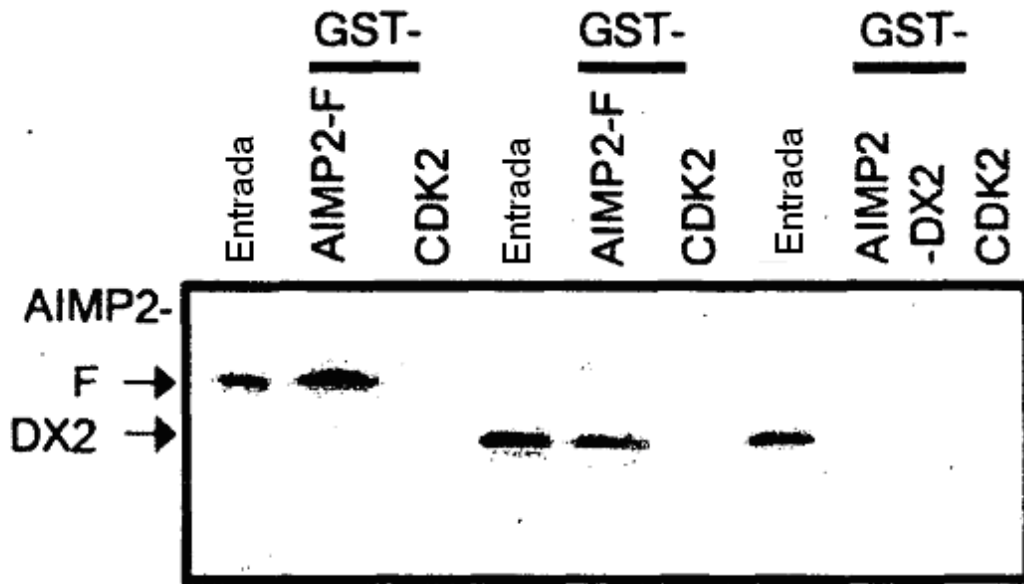


Fig.4e

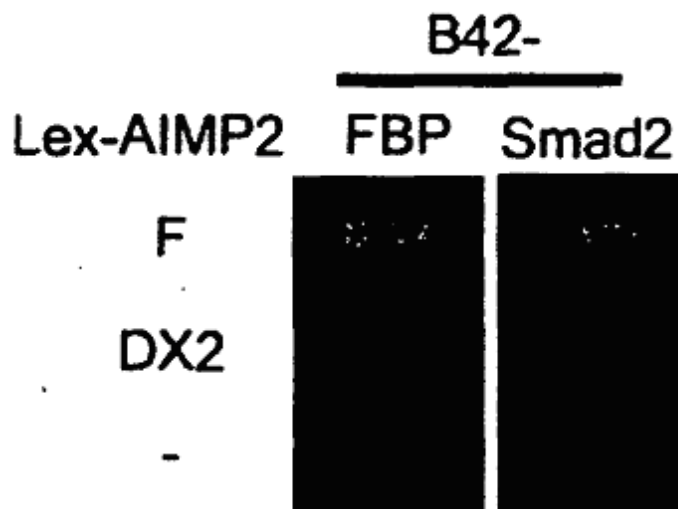


Fig.4f

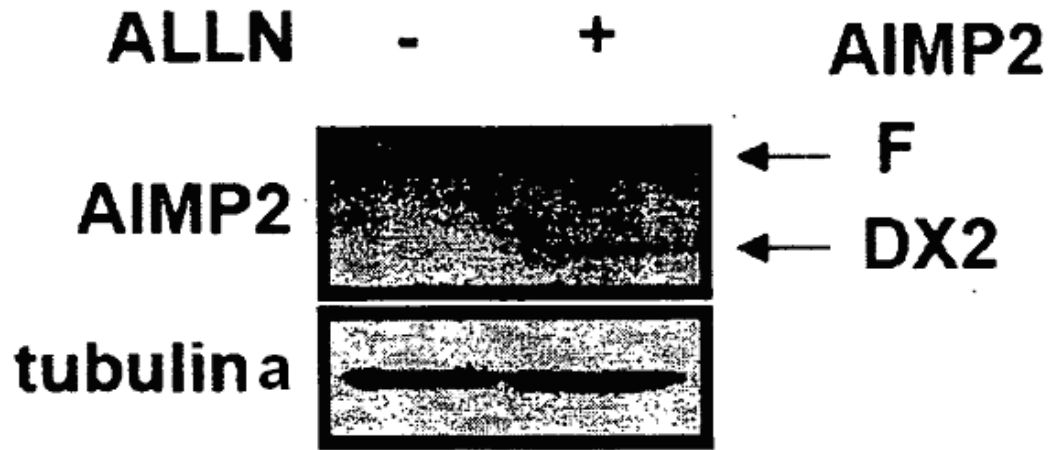


Fig.4g

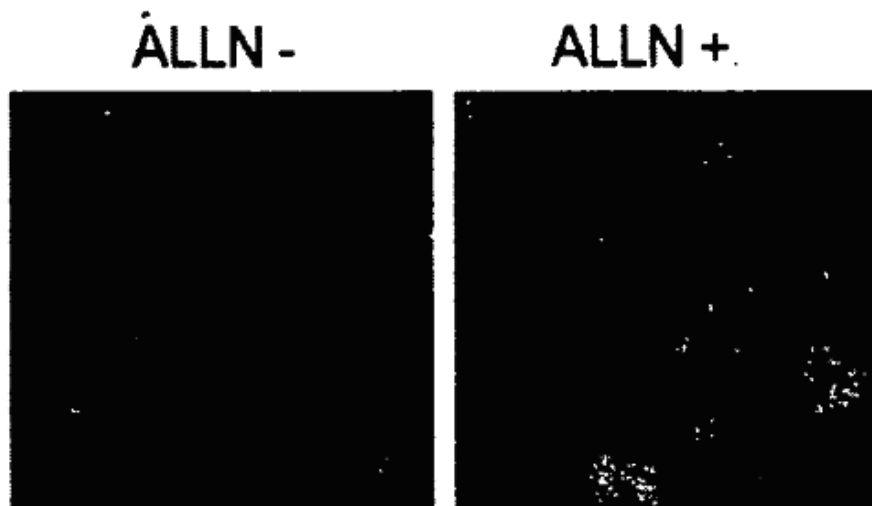


Fig.4h

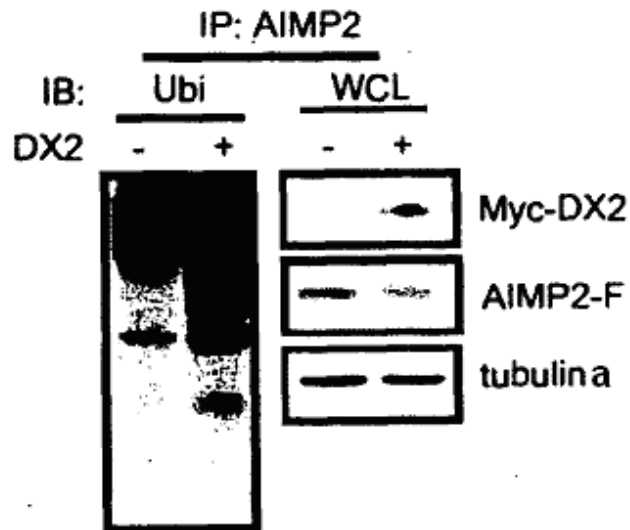


Fig.5a

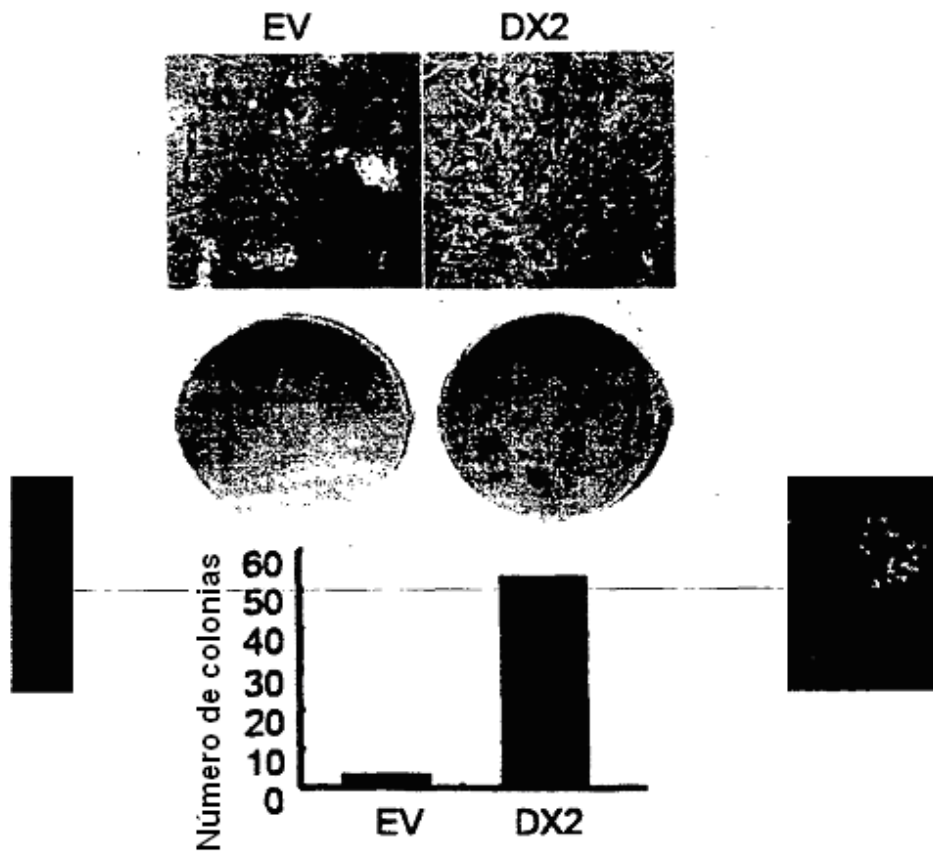


Fig.5b

si-DX2 #3 secuencia de ácidos nucleicos codificadora
 TCGAGGCCACGTGCAGGTTACGGGAGTAGGCCGTAATCCTGCACGTGGCCTTTT
 CCGGTGCACGTCCTAATGCCCTCAGACGGCATTAGGACGTGCACCGGAAAAGATC

si-DX2 #4 secuencia de ácidos nucleicos codificadora
 TCGAGCTGGCCACGTGCAGGATTACGAGTACTGGTAATCCTGCACGTGGCCAGCTTTT
 CGACCGGTGCACGTCCTAATGCTCATGACCATTAGGACGTGCACCGGTCGAAAAGATC

si-DX2 #5 secuencia de ácidos nucleicos codificadora
 TCGACACGTGCAGGATTACGGGGCGAGTACTGGCCCCGTAATCCTGCACGTGTTTT
 GTGCACGTCCTAATGCCCGCTCATGACCGGGGCATTAGGACGTGCACAAAAGATC

Fig.5c

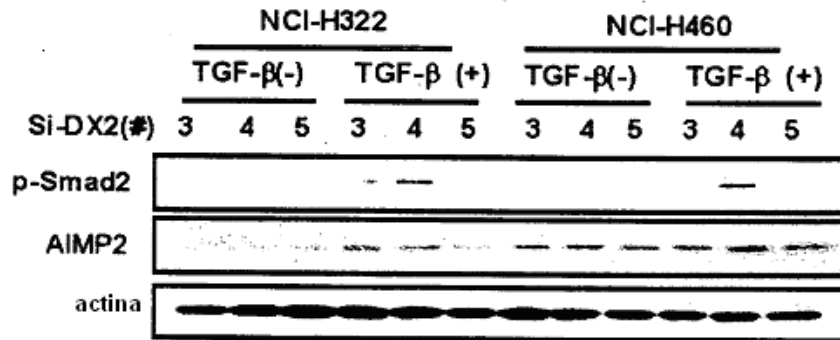


Fig.5d

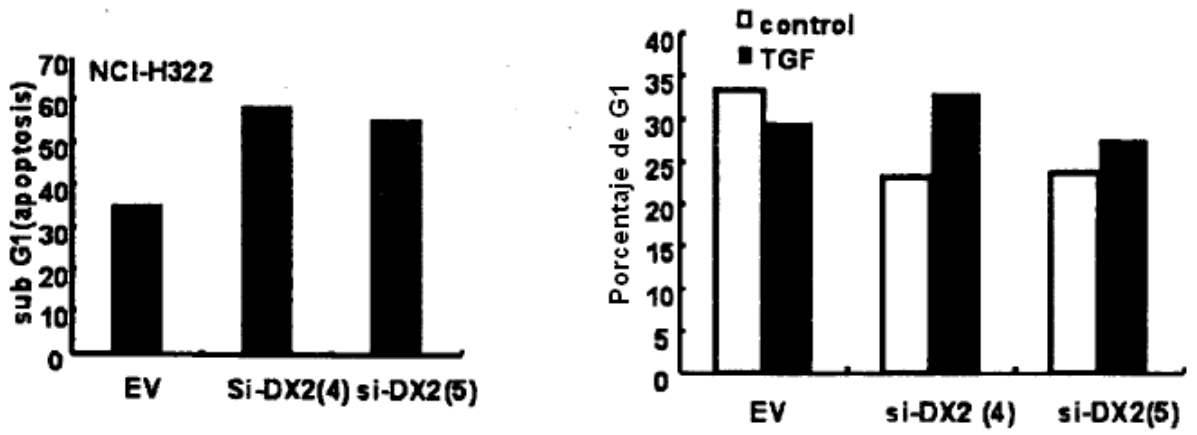


Fig.5e

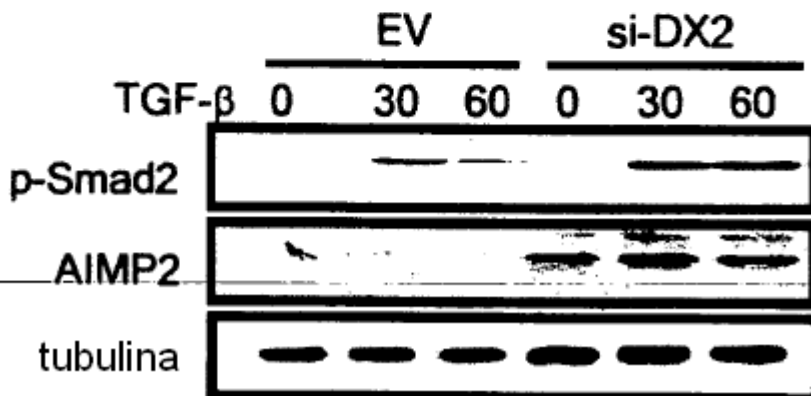
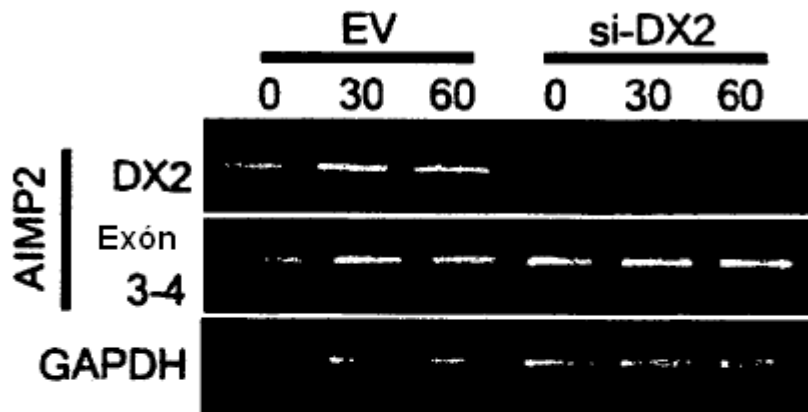


Fig.5f

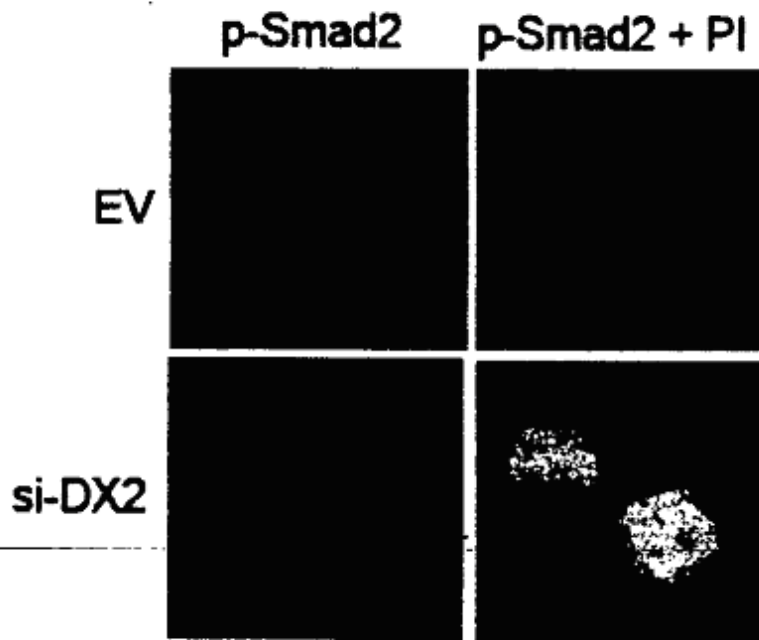


Fig.5g

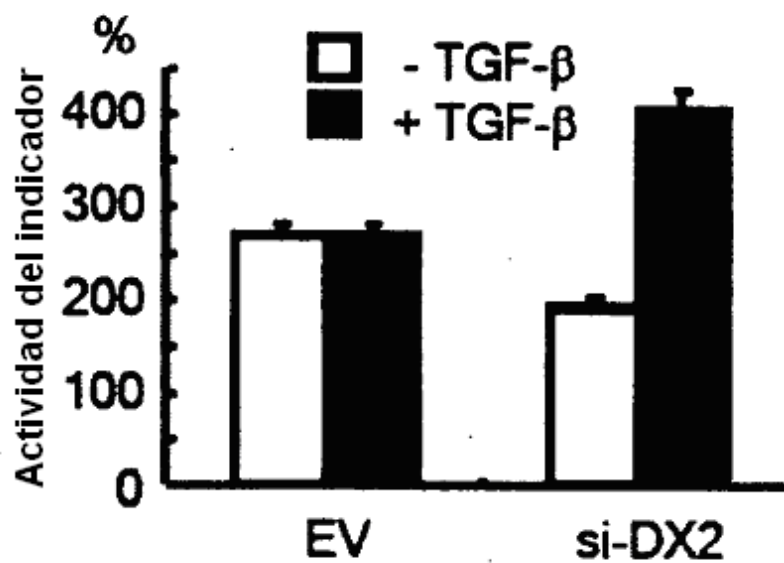


Fig.5h

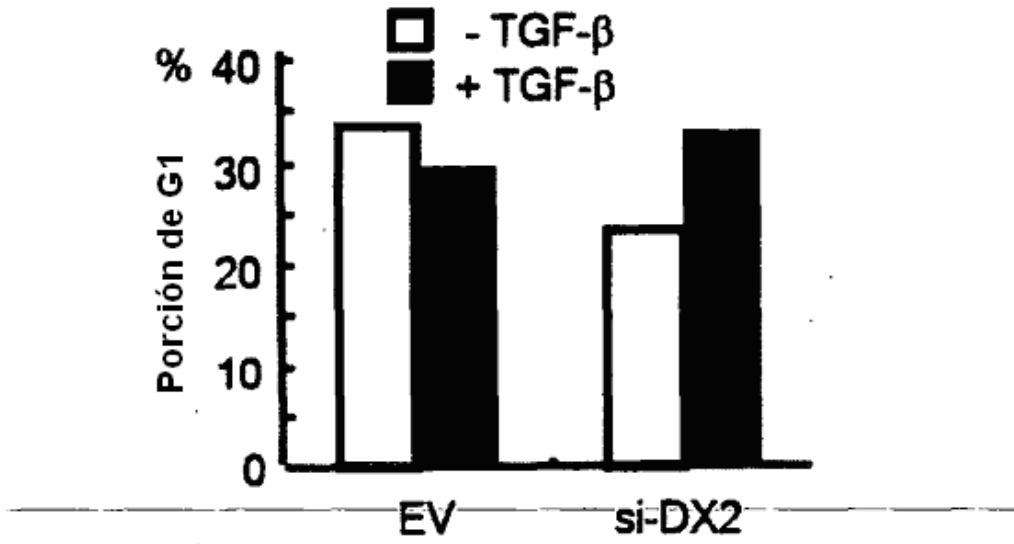


Fig.6a

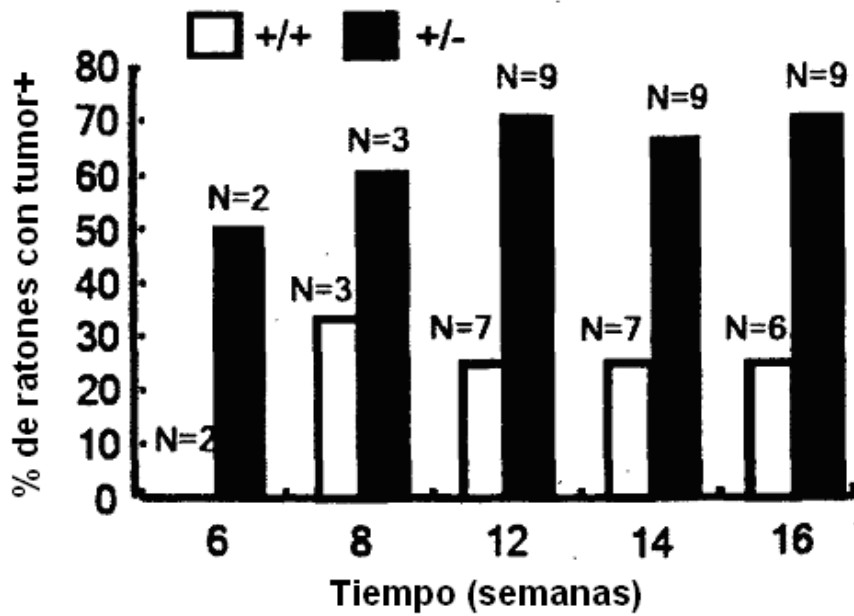


Fig.6b

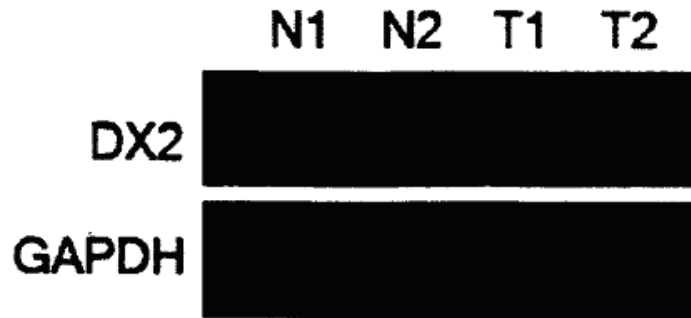


Fig.6c

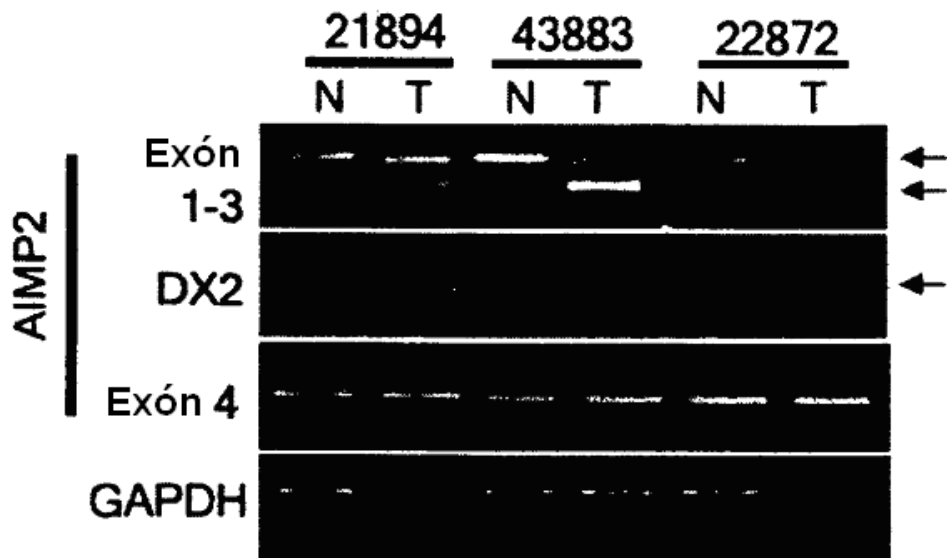


Fig.6b

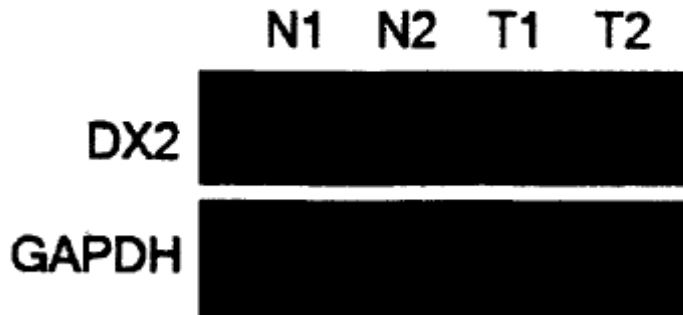


Fig.6c

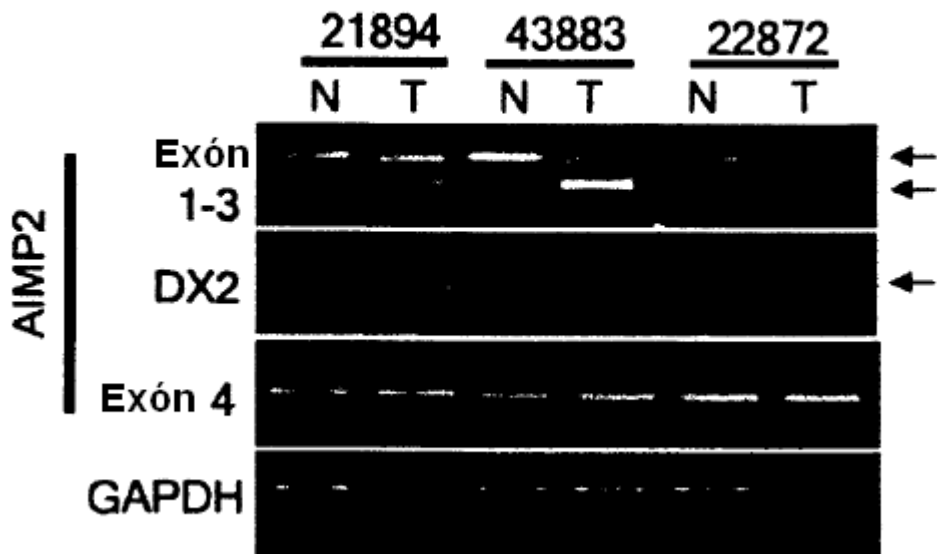


Fig.7

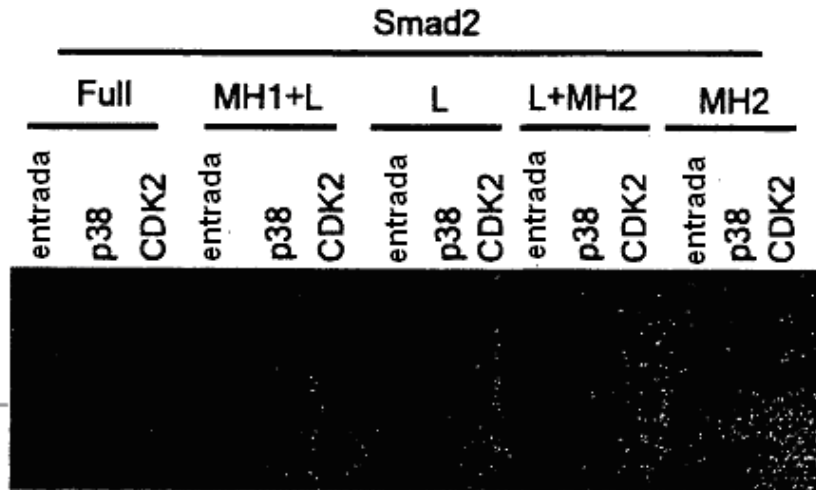


Fig.8a

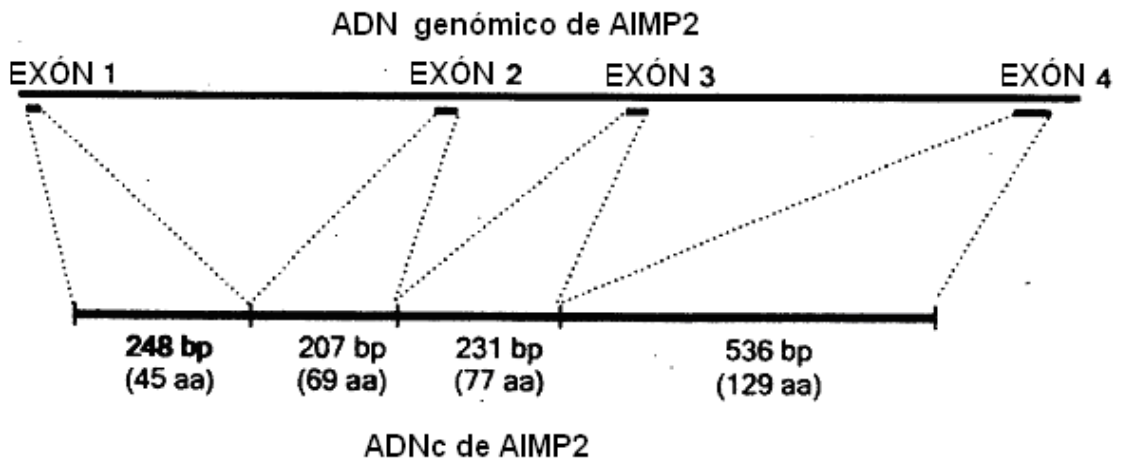
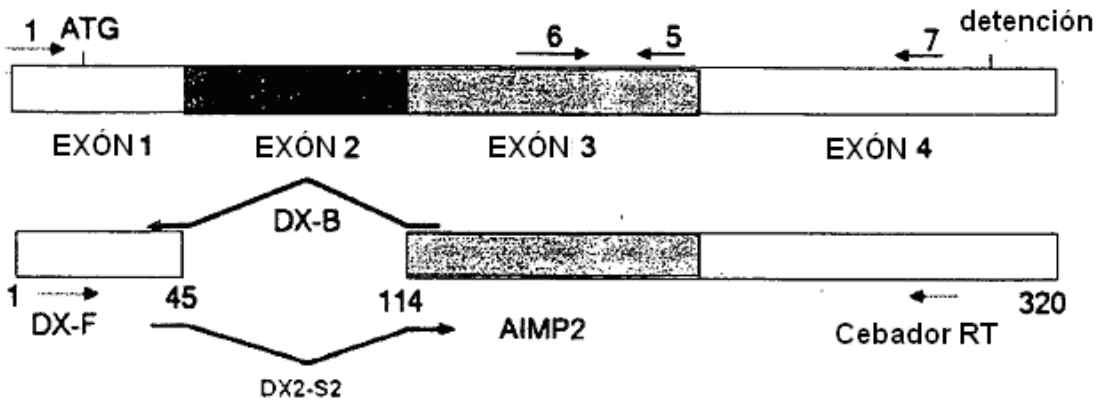


Fig.8b



Cebador RT : CAGCACCCACGTCTGC

Cebadores para PCR

1: TCTGACGGTTTCTGAGCGTT

5: AAGTGAATCCCAGCTGATAG

6: AGTGCTTTGGAGAACAGAAT

7: AAGAGCAGAGTTCATGGAGC

DX2-F: TGC TTT GGT TCT GCC ATG CCG

DX2-B: CGT AAT CCT GCA CGT GGC CAG

DX2-S2: CTG GCC ACG TGC AGG ATT ACG GGG

Fig.9a

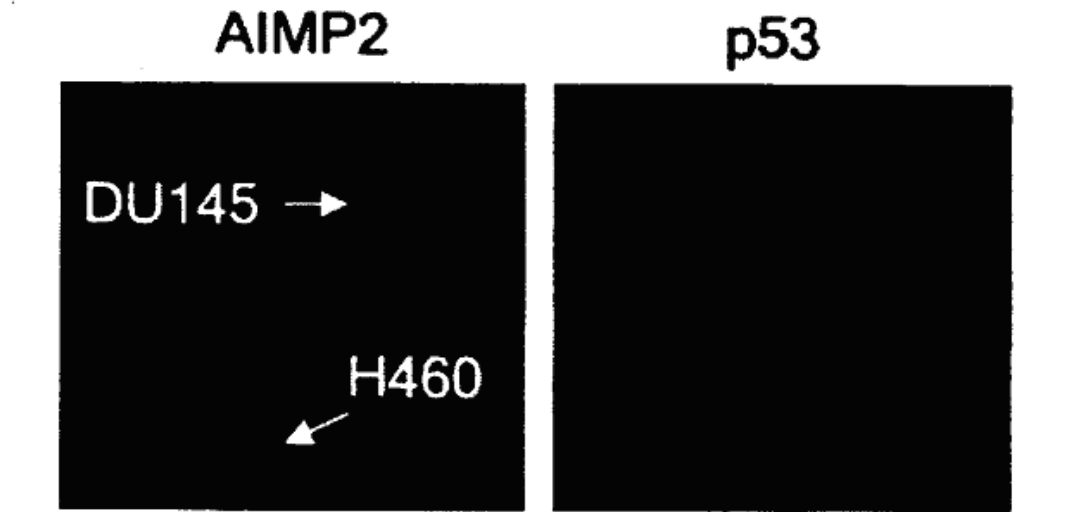


Fig.9b

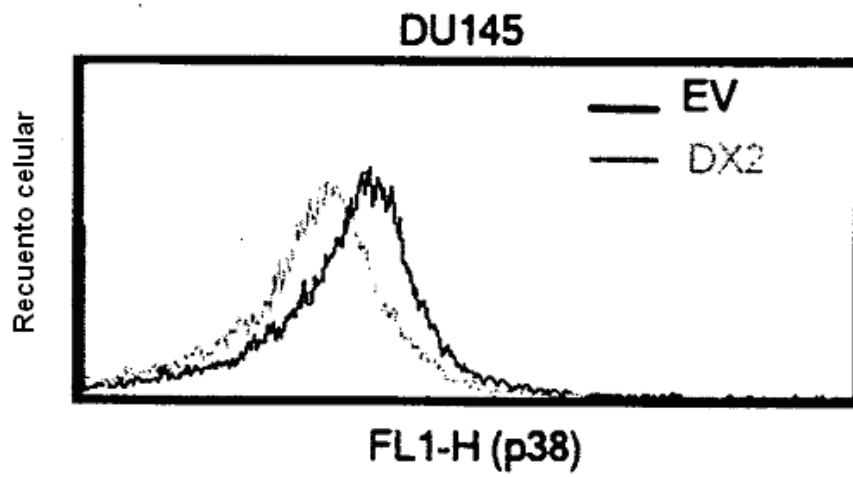


Fig.9c

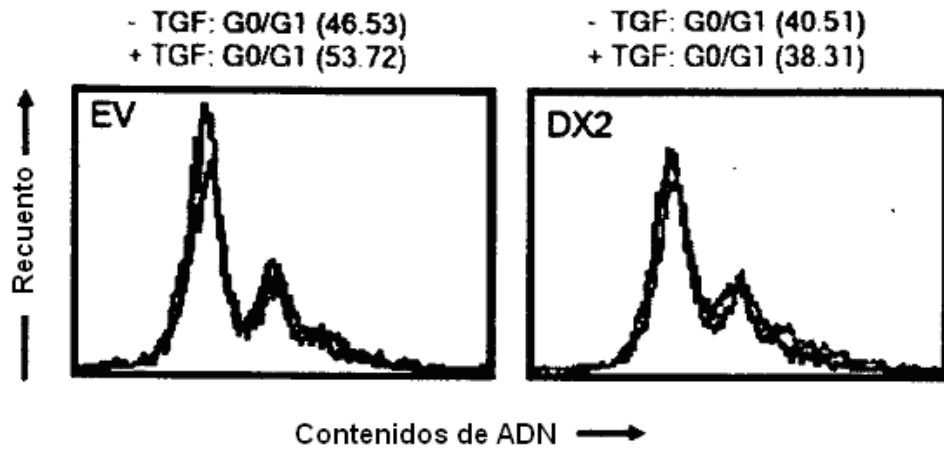


Fig.9d

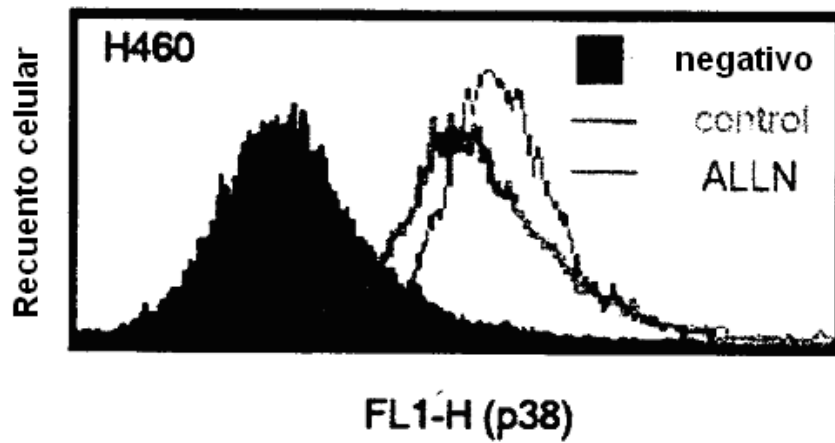


Fig.10

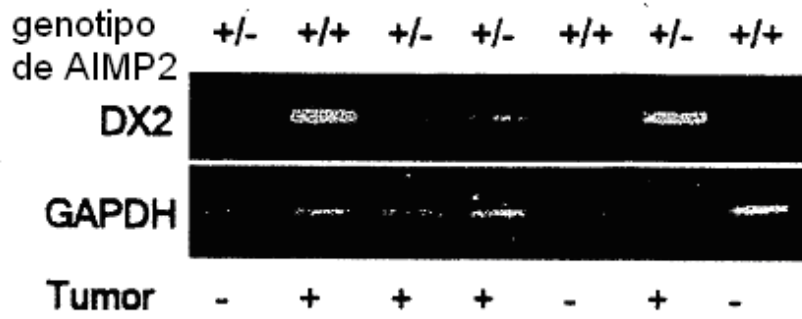


Fig.11a



Fig.11b

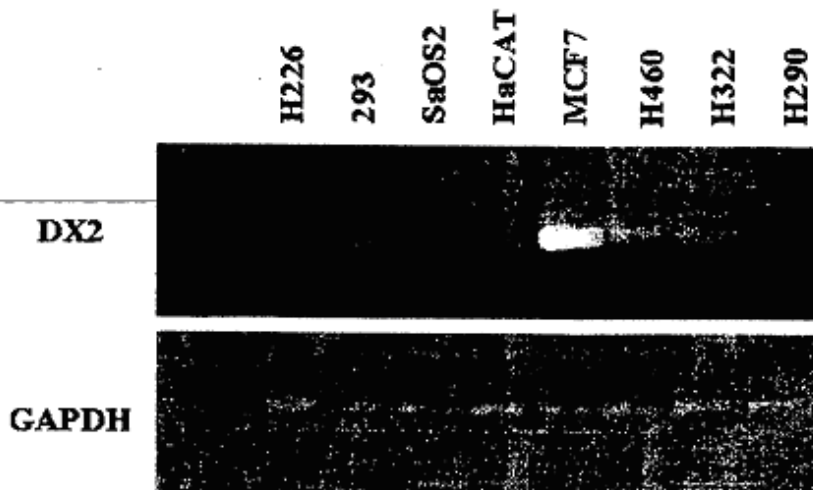
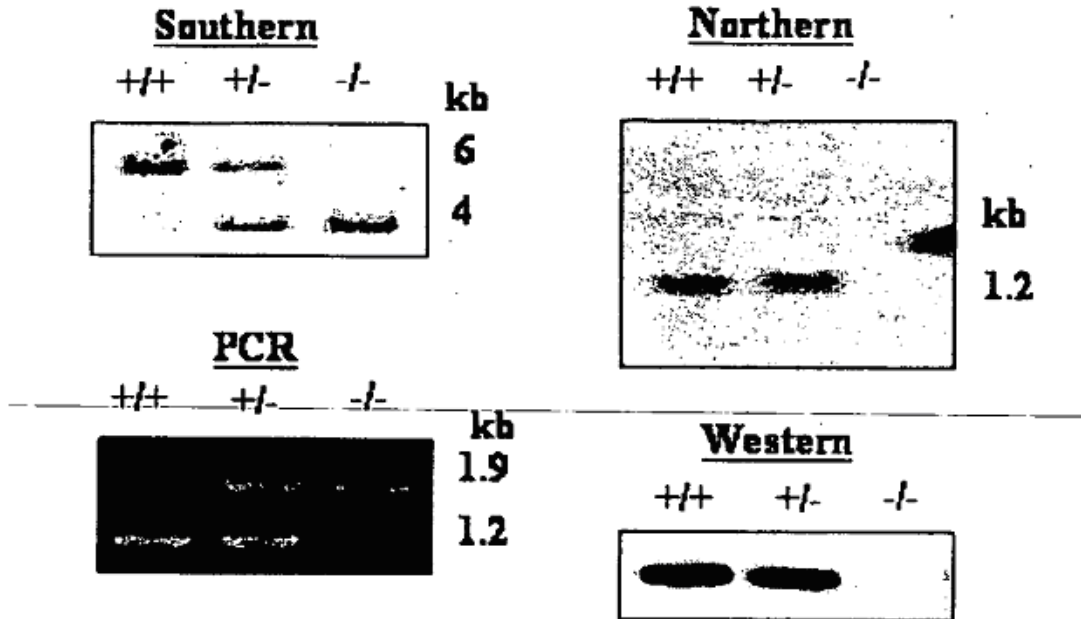


Fig.12a

A. Mutación y expresión de AIMP2



B. Inserción de la trampa génica en el gen de AIMP2

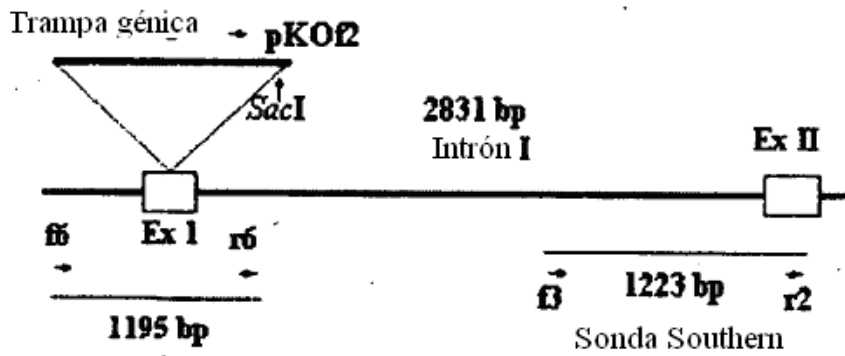
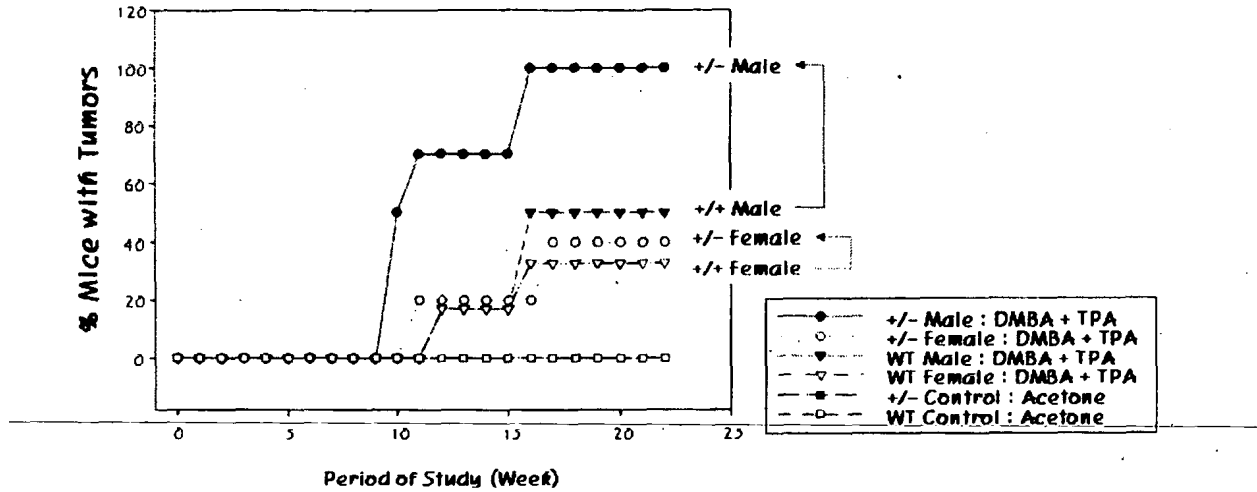


Fig.12b



DMBA: dimethylbenzoanthracene; TPA: 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate

Fig.12c

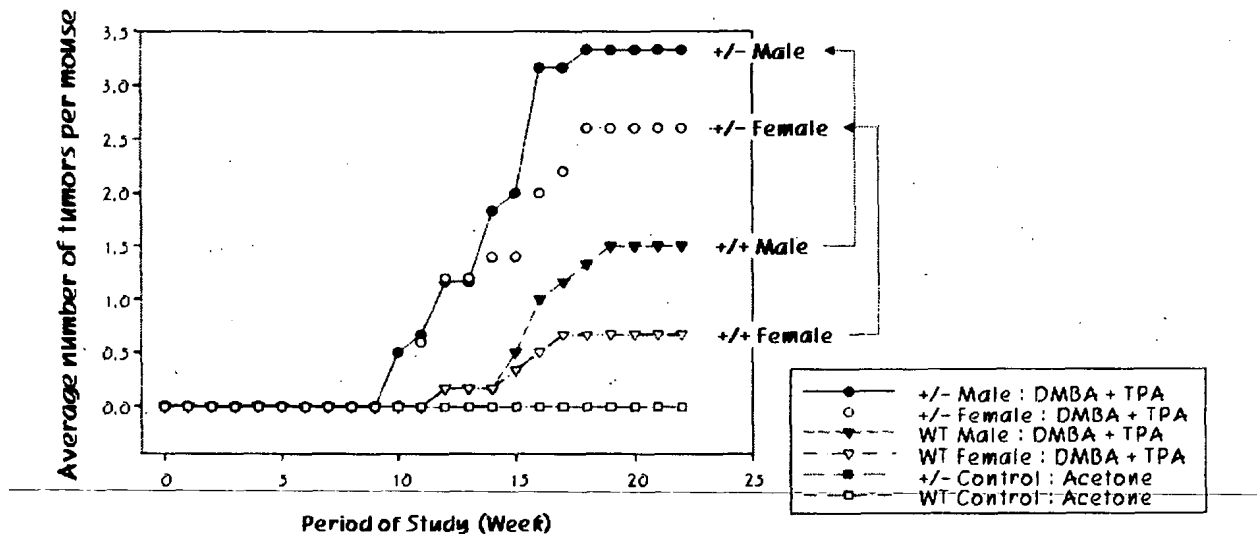


Fig.12d

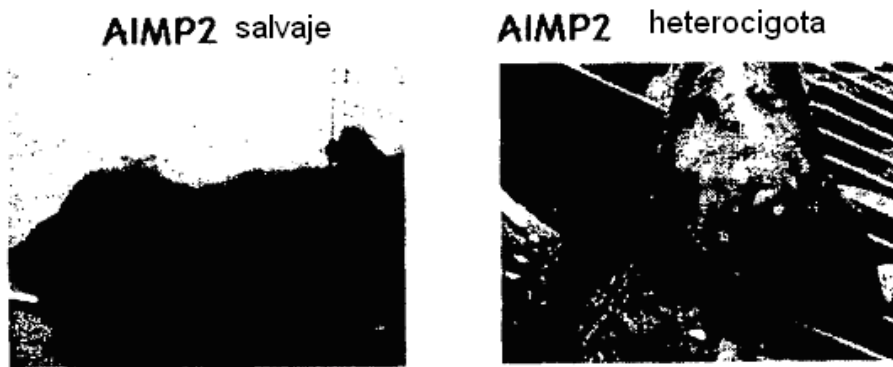


Fig.13

