



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 429**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98101338 .6**

96 Fecha de presentación : **27.01.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0861896**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.1998**

54 Título: **Quinasa humana h-sgk regulada por el volumen celular.**

30 Prioridad: **28.02.1997 DE 197 08 173**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.09.2009

73 Titular/es: **Florian Lang**
Im Rotbad 52
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es: **Lang, Florian y**
Waldegger, Siegfried

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Quinasa humana h-sgk regulada por el volumen celular.

5 La invención comprende el clonado y la caracterización de una quinasa de serina-treonina humana (h-sgk: serum and glucocorticoid dependent kinase). La invención comprende, además, reactivos para el diagnóstico de estados que son acompañados por una modificación en el volumen celular y/o el "macromolecular crowding" (o aglomeración macromolecular) en el cuerpo, por ejemplo, hipernatremia, hiponatremia, diabetes mellitus, insuficiencia renal, hipercatabolismo, encefalopatía hepática, inflamaciones e infecciones microbianas o virales. La presente invención
10 comprende, además, medicamentos que contienen la h-sgk, ácidos nucleicos, que codifican para la h-sgk, o receptores, especialmente, anticuerpos que enlazan, específicamente, con la h-sgk.

Incluso en el caso de osmolaridad extracelular constante, la constancia del volumen celular peligra constantemente por el transporte a través de membranas celulares y metabolismo celular, es decir, la formación y descomposición de
15 sustancias osmoticamente activas.

El crecimiento y la reducción celular interfieren en el entorno intracelular por disolución o concentración de macromoléculas celulares, que provocan perjuicios masivos de las funciones celulares. Por ello las células han desarrollado una gran cantidad de mecanismos de regulación de volumen celular. El crecimiento celular provoca, en la mayoría
20 de los tejidos, una emisión celular de iones debido a la activación de canales de iones y el cotransporte de KCl. La reducción celular provoca, a la inversa, la recepción de iones debido a la activación del cotransportador de NaCl/KCl y del intercambiador de Na⁺/H⁺.

Por otro lado, la reducción celular estimula la acumulación celular, y el crecimiento celular, la emisión de osmólitos, moléculas que se utilizan especialmente para la generación de osmolaridad intracelular [Burg, M. B. Am. J. Physiol. 268:F983-F996, 1995].
25

Finalmente, las modificaciones del volumen de las células hepáticas influyen en el metabolismo hepatocelular y la expresión de genes [Häussinger *et al.* (1994) Am. J. Physiol. 267, E343-E355]. El crecimiento celular actúa
30 como una señal anabólica que estimula síntesis de proteína y de glucógeno, asimismo, impide la descomposición de proteína y glucógeno. A la inversa, la reducción celular actúa como señal catabólica, estimulando la descomposición de glucógeno y proteínas e impidiendo la formación de proteínas y glucógeno [Häussinger *et al.* (1994) Am. J. Physiol. 267, E343-E355].

35 El volumen celular ha sido reconocido como un elemento decisivo en la regulación del metabolismo hepático a través de hormonas, asimilación celular de aminoácidos y estrés oxidativo.

Los mecanismos de señales que vinculan la función celular a las modificaciones del estado de hidratación celular son poco conocidos. Las modificaciones del volumen celular obtienen su efecto múltiple sobre la función celular, en
40 parte, a través de la estimulación o la supresión de la expresión de determinados genes cuyos productos influyen luego en la expresión o actividad de una gran cantidad de componentes celulares. Para descubrir genes que son transcritos mayormente durante el crecimiento celular, realizamos un estudio diferencial de huellas de ARNm en cADN de hepatocitos que habían sido expuestos a un líquido extracelular isotónico, o anisotónico. Se obtuvieron, a su vez, múltiples bandas que, utilizando diferentes cebadores, presentaron tasas diferenciales de expresión.

45 Sorprendentemente se descubrió que la expresión de una de estas bandas es estimulada en condiciones hipertónicas e inhibida en condiciones hipotónicas. La secuencia de cADN de esta banda influenciada de manera especial en su expresión por la modificación del volumen celular fue analizada con mayor precisión. A través de la comparación de secuencias se descubrió que no hay ninguna similitud con un gen humano ya conocido. El gen hallado, cuya
50 secuencia de nucleótidos está representada en la figura 1, codifica, sorprendentemente, para una quinasa, una quinasa putativa serina-treonina. Su secuencia está representada en la figura 2 así como en la figura 1. Presenta un alto grado de homología con la sgk de ratas conocida (serum and glucocorticoid dependent kinase), una quinasa cuya expresión es incrementada por suero y glucocorticoides. Pero no se ha descrito aún una dependencia del volumen celular de la sgk de ratas.

55 La entrada en el banco de datos Y10032 describe la secuencia de la quinasa humana regulada por el volumen celular h-sgk. Además se menciona que la h-sgk es regulada transcripcionalmente por la modificación de volumen celular. No se menciona una relación con enfermedades.

60 La presente invención comprende entonces un procedimiento para la comprobación diagnóstica de, al menos, una enfermedad del grupo de la insuficiencia renal, inflamaciones, especialmente, hepatitis, pancreatitis, Morbus Crohn o glomerulonefritis, diabetes mellitus, infección microbiana o viral, Morbus Alzheimer, hipercatabolismo, fibrosis pulmonar y cirrosis hepática, en el cual el procedimiento comprende la determinación del grado de expresión de la quinasa humana h-sgk regulada por el volumen celular o el grado de expresión de su transcripción, y en el cual están
65 exceptuados los procedimientos de diagnóstico practicado en el cuerpo animal o humano.

La expresión de la h-sgk depende, en gran medida, del volumen celular. El crecimiento celular inhibe la expresión de la h-sgk, mientras que la reducción celular estimula la expresión de la h-sgk. Además, la expresión de la h-sgk es

inhibida por la urea. La urea, como la modificación de volumen celular, reduce la estabilidad y, con ello, la función de proteínas celulares, es decir, la densidad de relleno de la macromolécula celular, el denominado macromolecular crowding o aglomeración macromolecular [Minton, A.P., Mol. Cell. Biochem. 55: 119-140, 1983]. La expresión de h-sgk es, por ello, una medida para el “macromolecular crowding” celular. Pero a diferencia de la skg de ratas, la transcripción de la h-sgk no es influenciada ni por corticoides ni por suero fetal bovino (FCS).

La h-sgk es transcrita en una gran cantidad de tejidos humanos, como el hígado, el corazón, el páncreas, músculos, riñones, pulmones, placenta, linfocitos y múltiples estructuras del cerebro (hipocampo, núcleo caudado, el cuerpo calloso, la sustancia negra, el núcleo subtalámico y el tálamo).

Se ha demostrado que en muchas enfermedades en las cuales las modificaciones del volumen celular juegan un papel patofisiológico importante, la h-sgk posee un potencial diagnóstico considerable. La expresión de la h-sgk puede ser demostrada a través de la comprobación y/o cuantificación del ARNm, mediante una prueba adecuada, por ejemplo, en el análisis Northern blot, o mediante hibridización *in situ*, y la h-sgk misma puede, por ejemplo, ser demostrada mediante el análisis Western blot o a través de inmunohistoquímica. Las muestras o anticuerpos adecuados ya han sido verificados exitosamente en cuanto a su utilidad.

La presente invención comprende, por ello, también la aplicación diagnóstica de la h-sgk, sus fragmentos o los respectivos ácidos nucleicos que codifican para ello. Las técnicas de diagnóstico que posiblemente pueden ser utilizadas son conocidas por el especialista. Pueden ser todos los formatos de estudios de inmunidad conocidos en el estado actual de la técnica, por ejemplo, el análisis Western blot o la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), pero también formatos de técnicas homogéneas no sujetas a fases sólidas. También se puede pensar en, por ejemplo, variantes de evaluación competitivas, pero también son posibles, sin más, evaluaciones indirectas o construcciones según el principio Sandwich. Igualmente pueden utilizarse técnicas de marcación conocidas por el especialista. También pueden utilizarse todos los tipos de técnicas de detección de ácidos nucleicos, por ejemplo, el análisis Southern blot, el análisis Northern blot y todas las variantes de técnicas de hibridización, inclusive la hibridización *in situ*.

La h-sgk puede ser detectada tanto en líquidos corporales, por ejemplo, sangre, plasma o suero, como así también en tejidos sólidos, por ejemplo, material de biopsias. La detección de la h-sgk se muestra en todos los lugares en el cuerpo en que se presentan las modificaciones del volumen celular, es decir, el “macromolecular crowdings”, como en el caso de la hipernatriemia, hiponatriemia, diabetes mellitus, insuficiencia renal, hipermetabolismo, encefalopatía hepática, inflamaciones e infecciones.

Por otro lado, una función perturbada de la h-sgk puede provocar una regulación perturbada del metabolismo hepático. Una detección de la h-sgk serviría para una clarificación diagnóstica de la intolerancia a la fructosa, de estados hiperglucémicos e hipoglucémicos.

Hipernatriemia: Esta es una disfunción que puede ser fatal, que se presenta, por ejemplo, en el caso de diuresis osmótica y diuresis acuosa por diabetes insipidus central o nefrogénica. Una diabetes central es la consecuencia de un defecto genético, trauma craneocerebral, daño de la neurona hipotalámica debido a inflamaciones, circulación sanguínea insuficiente, tumores, consumo de alcohol, opiáceos y algunos fármacos. Una diabetes insípida nefrogénica es la consecuencia de defectos genéticos, hipocaliemia, hipocalcemia, falta de proteínas, pielonefritis y tratamientos con diferentes fármacos, etc. Como ha sido demostrado en experimentos en células hepáticas y renales cultivadas, un incremento de la concentración extracelular Na⁺, que también está siempre vinculada a un incremento de la osmolaridad extracelular, provoca una expresión elevada de la h-sgk. La quinasa puede ser utilizada, por ello, como indicador para la medida de reducción celular y aplicada a la verificación de la terapia. Un control de ese tipo es significativo en el sentido que en una corrección rápida de una hipernatriemia puede presentarse un crecimiento celular letal pese a la hiperosmolaridad extracelular.

Hiponatriemia: En aproximadamente 1 - 2% de todos los pacientes hospitalizados se comprueba una hiponatriemia inferior a 130 mmol/l. Los motivos de esta disfunción que puede ser fatal son la diabetes mellitus, cetonuria, insuficiencia hepática, diuréticos, opiáceos, diferentes fármacos, *diuresis osmótica*, bicarbonaturia, insuficiencia renal secundaria, nefritis por pérdida de sal, síndrome nefrótico, eliminación incrementada de ADH y pérdidas de líquido isotónico (por ejemplo, diarreas) con reemplazo exclusivamente de agua. Si la hiponatriemia es la consecuencia de un incremento de otros osmolitos en la sangre, entonces el volumen celular y la expresión de la h-sgk permanecen normales. Sin embargo, si la hiponatriemia refleja una hipoosmolaridad con crecimiento celular, la expresión de la h-sgk se reduce. La medición de la h-sgk permite, con ello, deducir la presencia de un crecimiento celular y posibilita una decisión racional acerca del proceder terapéutico. Durante la terapia puede utilizarse la quinasa para el control de la evolución. La corrección demasiado rápida de una hiponatriemia puede provocar, eventualmente, una reducción celular letal.

Diabetes mellitus: En el caso de diabetes mellitus se produce una hiperglucemia que genera un incremento de la osmolaridad extracelular y con ello, una reducción celular. La glucosa filtrada glomerularmente supera la tasa máxima de transporte y obliga, de este modo, a una diuresis osmótica, en la cual se pierde Na⁺ y agua. Por ello se puede desarrollar una hiponatriemia. La elevada osmolaridad extracelular y la sobreoferta de glucosa estimulan la formación celular de sorbitol, que al descender la osmolaridad extracelular provoca un crecimiento celular. A la reducción celular y el crecimiento celular en el caso de mellitus se le asigna un significado decisivo en la patofisiología [McManus *et al.*, New England J. Med. 333: 1260-1266, Dermadash *et al.*, Kidney intern 50:2032:2040, 1996]. La medición de la

h-sgk en pacientes con diabetes mellitus permite una estimación de las modificaciones del volumen celular y de ese modo se obtiene una base sólida para una compensación de disfunciones electrolíticas. También en ese caso se puede evitar una observación de desarrollo de correcciones severas.

Insuficiencia renal: en el caso de la insuficiencia renal se produce un incremento masivo de la concentración de ureas hasta alcanzar valores que tienen un efecto desestabilizante en las proteínas, provoca la reducción de células y una disminución en la expresión de la h-sgk. El efecto desestabilizante de la urea es debilitado por la formación de trimetilaminas. En el caso de modificaciones rápidas en la concentración de urea, la acumulación de trimetilaminas no puede seguir su marcha y pueden esperarse fallas en el metabolismo celular por las modificaciones del volumen celular. La determinación de la h-sgk puede descubrir un desbalance entre la urea desestabilizadora y las trimetilaminas estabilizadoras. Eventualmente sería indicada la aplicación terapéutica de trimetilaminas en el caso de una h-sgk fuertemente reprimida.

Hipercatabolismo: En una serie de estados catabólicos, como sepsis, quemaduras, pancreatitis aguda, operaciones complejas se pudieron detectar modificaciones del volumen celular muscular, correlativas a la medida del hipercatabolismo. La reducción celular provoca el incremento de la proteólisis, y el crecimiento celular, la inhibición de la misma. La determinación de la h-sgk podría justificar, en casos particulares, la aplicación de medidas terapéuticas que son adecuadas para contrarrestar la reducción celular, como la aplicación de glutamina [Häussinger *et al.*, Lancet, 341: 1330-1332, 1993] o de osmolitos [Burg, M.B.:J. Exp. Zool. 268(2):171-5, 1994].

Encefalopatía hepática: Existen pruebas convincentes de que la encefalopatía hepática se origina por el crecimiento de células de glia [Norenberg, M.D., Exp. Neurol. 53(3): 213-220, 1994]. En la práctica, en el caso de enfermedades hepáticas se puede comprobar una reducción de osmolitos como inositol en el cerebro [Kreis *et al.*, NMR Biomed. 4: 109-116, 1991]. La desaparición completa coincide con el inicio de la encefalopatía. Gracias a la acción y la aplicación de sustratos más adecuados para la h-sgk, podría medirse la actividad de la h-sgk en el cerebro y ser contrarrestada ya antes de la aparición de la encefalopatía. Eventualmente también podría utilizarse la expresión de la h-sgk en tejidos con una mejor accesibilidad como indicador del cambio de volumen en las células de glia.

Enfermedad de Alzheimer: Nuevas indicaciones señalan un incremento del volumen de células periféricas en la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, el osmolito inositol está elevado en los pacientes con enfermedad de Alzheimer, pero no en el caso de demencia de otro origen. La expresión de la h-sgk puede entonces contribuir al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Infecciones/inflamaciones: En el caso de una sepsis se provoca una reducción celular masiva [Häussinger *et al.*, Lancet 1993, 341: 1330-1332] con el correspondiente surgimiento de hipercatabolismo. En la práctica, el volumen celular juega un papel importante en la relación patógeno-anfitrión. La expresión de la h-sgk podría ser un parámetro valioso para la estimación de la patofisiología de infecciones. Los experimentos de hibridización *in situ* muestran un notable aumento de la concentración de tejidos de la h-sgk en el caso de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, hepatitis, pancreatitis, Morbus Crohn o glomerulonefritis. Por otro lado, se incrementa la expresión h-sgk mediante TGF β , lo cual se relacionó con una fibrosis progresiva, por ejemplo, una cirrosis hepática, fibrosis pulmonar o insuficiencia renal progresiva. En la práctica se descubrió que la expresión de la h-sgk es más elevada en el caso de pacientes con insuficiencia renal crónica.

Hiperglucemia-hipoglucemia-lactacidosis: Una expresión y/o función reducida o elevada de la h-sgk podría provocar disfunciones en el metabolismo del hidrato de carbono, como se observa en la reducción celular o en el crecimiento celular [Lang *et al.*, Pflügers Arch. 413: 209-216, 1989]. Una función reducida tendría como consecuencia una amenaza de hiperglucemia. Una función incrementada podría acarrear consigo, por un lado, una hiperglucemia, por otro lado, una lactacidosis. En el caso de la aclaración diagnóstica de la hiperglucemia, hipoglucemia y lactacidosis de origen no claro también podría analizarse siempre, por ello, la expresión de la h-sgk.

La presente invención es explicada en mayor detalle en la descripción detallada, además es descrita en los ejemplos así como en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Materiales y métodos

Materiales: Se adquirió suero fetal bovino y DMEM (modificación simple del Medio Basal de Eagle) de GIBCO/BRL (Eggenstein, Alemania), enzimas de STRATAGENE (Heidelberg, Alemania) y BOEHRINGER MANNHEIM (Mannheim, Alemania), a-[35S]-dATP de ICN (Eschwege, Alemania), SuperScript® reverse Transcriptase de GIBCO/BRL. Se llevaron a cabo PCR® (reacciones en cadena de la polimerasa) en un ciclador térmico Crocodile® II (APPLIGENE ONCOR, Heidelberg, Alemania) mediante polímeros Prime Zyme® búfers de ADN y PCR de BIOMETRA (Göttingen, Alemania). Los cebadores RAP-PCR se adquirieron en STRATAGENE, el cebador de secuencia en MWG (Ebersberg, Alemania). La secuenciación manual se llevó a cabo en un aparato secuenciador S2 de GIBCO/BRL mediante el sistema de secuenciación de ADN de Fidelity® (APPLIGENE ONCOR).

Cultivo celular Las células humanas de hepatoma HepG2 se cultivaron en el medio DMEM con 5% de CO₂, 5 mM de glucosa, a 37°C, y pH 7.4, enriquecido con un 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (FCS). Antes del aislamiento de

ARN, las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 90% y fueron mantenidas durante 12 horas en un medio basal de Eagle (BME, GIBCO/BRL) sin suero fetal bovino. La osmolaridad extracelular se varió agregando o quitando cantidades definidas de sal común sin modificaciones de los demás componentes del medio BME. En experimentos en los que se verifica el efecto de los aminoácidos, las células se mantuvieron dos horas antes de agregar los aminoácidos, en una solución extracelular libre de aminoácidos.

RAP-PCR: Se llevó a cabo el PCR de las huellas de ARN (RAP-PCR) como descrito anteriormente [McClelland *et al.* 1994, Nucleic Acids Res. 22, 4419-4431]. Tras la electroforesis por un gel de poliacrilamida al 4% de acrilamida/7M de urea, se hicieron visibles los productos de PCR. Mediante tinte con plata [Sanguinetti *et al.*, Biotechniques 17, 914-921, 1994]. Todas las bandas que se hicieron visibles bajo en una condición (hipertónica o hipotónica), se confirmaron consecuentemente por transcripción reversa y PCR con ARN de nuevos cultivos. La RAP-PCR se llevó a cabo con cuatro diferentes pares de cebadores para la síntesis de cADN y la amplificación de PCR. Adicionalmente, se seleccionaron diferentes temperaturas entre 30°C y 40°C en la primera ronda de la amplificación. Junto con estas modificaciones se llevaron a cabo un total de pasos de 64 PCR.

La obtención de las bandas: Las bandas que muestran diferencias reproducibles fueron extraídas en condiciones estériles. El amplicon fue eluido durante la noche a 70°C en el búfer 100 μ l (50 mM KCl, 10 mM TRIS-Cl pH 9.0, 0.1% Triton X 100). La reamplificación a través de PCR se llevó a cabo con 3.0 μ l de eluato, con cebadores adecuados (250 nM), 200 μ M de dNTP, 1x de búfer pobre en sal (STRATAGENE) con 1.5 mM de MgCl₂ y 5 unidades de Taq+[®] ADN polimerasa (STRATAGENE) con los siguientes perfiles de ciclos de temperatura: Un ciclo a 95°C, por 60 seg, 30 ciclos a 95°C (15 seg), 55°C (15 seg), 72°C (60 seg) y finalmente, a 72°C, por 5 minutos. Tras confirmar, mediante PAGE, que sólo se había generado un amplicon definido con la longitud esperada, este amplicon fue utilizado directamente para la formación de la muestra.

Análisis Northern: Las pruebas acopladas a digoxigenina (DIG) fueron generadas mediante un etiquetado directo de PCR de los diferentes amplicones, mediante los cebadores adecuados y las condiciones descritas anteriormente, salvo que se utilizaron las siguientes concentraciones de dNTP: 200 μ M de dATP, 200 μ M de dCTP, 200 μ M de dGTP, 190 μ M de dTTP y 10 μ M de DIG-dUTP (BOEHRINGER). Los análisis Northern se efectuaron con 20 μ g de ARN total o con 2 μ g poli (A)-ARN, que habían sido separados electroforéticamente mediante geles de 1% de agarosas en presencia de 2.2M de formaldehído. Se evaluó una carga equivalente de muestras en el análisis de poli(A)-ARN, a través de coloración con bromuro de etidio de las bandas ribosomales de ARN o a través de la muestra de ARN antisentido etiquetado por DIG, contra la ribonucleoproteína nuclear humana heterogénea C1 como estándar interno. El tamaño del ARN se estimó con el marcador de peso molecular 1 con etiqueta DIG 1 (BOEHRINGER). Se aplicó blotting en vacío (APPLIGENE ONCOR Trans DNA Express Vacuum Blotter) para la transferencia a membranas de nylon con cargada positiva (BOEHRINGER) que luego fueron reticuladas por luz ultravioleta (STRATAGENE UV Stratatinker[®] 2400). La hibridización fue llevada a cabo durante la noche en DIGEasy-Hyb[®] (BOEHRINGER) con una concentración de la muestra de 25 ng/ml o 100 ng/ml a 50°C o 65°C para muestras de ADN o ARN. Las muestras que presentan diferente expresión, fueron subclonada con el pCR-Script SK(+) Cloning Kit (STRATAGENE) y verificadas en análisis Northern. Los siguientes análisis Northern fueron derivados de estos subclones.

Otros métodos: La secuenciación de ADN del clon de pCR fue llevada a cabo con el sistema de secuenciación Fidelity[®] DNA Sequencing System (APPLIGENE ONCOR). Los productos de secuenciación fueron marcados con a-[35S]-dATP y separados en un gel de secuenciación al 6% de poliacrilamidas/8M de urea. Los datos del banco de genes fueron revisados en busca de secuencias homólogas con el programa de ordenador FASTA [Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448]. La secuencia de la h-sgk cADN completa es obtenida mediante el I.M.A.G.E. Consortium Clone ID 42669 de los TIGR/ATCC Special Collection of Human cDNA Clones. Los datos de genes se analizaron, en la última edición de la base de datos de proteínas SwissProt, con la ayuda del European Molecular Biology Laboratory EMBL (Laboratorio molecular de biología europeo) (Heidelberg), el servicio de red BLAST y para las alineaciones de las proteínas, el servidor BLITZ.

Número de acceso de la secuencia de nucleótidos: La secuencia h-sgk cADN fue ingresada en la base de datos del banco de genes bajo el número de acceso Y10032 y fue bloqueada hasta el 1° de marzo de 1997.

Resultados

Expresión diferencial de genes en células HepG2 en líquido extracelular hipotónico, isotónico e hipertónico: El ARNm fue aislado de células HepG2, tratadas previamente durante 1 o 2 horas con un medio hipotónico (hipotónico I: menos 100 mosmol/l por extracción de 50 mM NaCl; hipotónico II: menos 50 mosmol/l por extracción de 25 mM NaCl en comparación con el medio de control isotónico), isotónico (con una osmolaridad total de 290 mosmol/l y una concentración de NaCl de 114 mM) o hipertónico (más 50 mosmol/l por adición de 50 mM de rafinosa). Los ARNm fueron utilizados como plantillas para RAP - PCR con cebadores arbitrarios. Los productos de RAP -PCR fueron aplicados sobre geles de poliacrilamidas denaturalizados y separados en bandas paralelas para su comparación. Varias bandas muestran una expresión diferencial en la utilización de múltiples cebadores. Se analizaron, además, cuatro bandas diferenciales de los geles RAPPCR: En el posterior análisis Northern blot se comprobó que dos eran falsos positivos, una banda fue incrementada por condiciones hipotónicas e hipertónicas, pero su secuencia no mostró semejanza alguna con un gen clonado ya conocido. Una banda de aproximadamente 500 pares de bases mostró una expresión creciente con una osmolaridad extracelular creciente (hipotónico I- hipotónico II - isotónico - hipertónico). Esta banda fue limpiada del gel y reamplificada mediante cebadores RAP-A4. Tras el marcado con digoxigenina a tra-

vés de PCR, se realizaron los análisis Northern con este amplicon, para confirmar la expresión diferencial en diferentes preparados celulares, tratados previamente, durante dos horas, con el medio hipotónico I, isotónico e hipertónico.

Una única transcripción de, aproximadamente, 2.6 kilobases fue influenciada en gran medida por las modificaciones de la osmolaridad extracelular (imagen 1). La cantidad de transcripción fue reducida con el descenso de la osmolaridad e incrementada al aumentar la osmolaridad.

Clonado y secuenciación del gen regulado diferencialmente h-sgk. El producto de PCR con una longitud de 500 pares de bases, fue subclonado en el vector PCR II y se generó una nueva prueba con este constructo, para establecer una identidad entre el fragmento de ADN original y el subclonado. La rehibridización de un análisis Northern blot con esta muestra arrojó los mismos resultados que la muestra original. Adicionalmente se realizó un análisis Southern blot con el nuevo constructo y se hibridizó con el constructo original. Una fuerte hibridización tras dos lavados muy astringentes confirmó la identidad de la secuencia.

Los análisis de secuencia en ambas direcciones muestran la presencia de los cebadores utilizados a ambos lados del amplicon. Una secuencia de aminoácidos, trasladada de un marco de lectura de la secuencia de nucleótidos, mostró una identidad del 95% con la secuencia de aminoácidos carboxiterminal de la sgk de ratas (serum and glucocorticoid regulated protein kinase), un nuevo componente de la familia de proteínas de la proteína quinasa de serina-treonina, clonada a partir de una línea celular de un tumor de glándula mamaria de ratas [Webster *et al.*, Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040, 1993a]. Debido a la elevada similitud se eligió la denominación h-sgk (la h por humano) para la nueva proteína.

En la base de datos del banco de genes se buscaron secuencias humanas similares, con el programa de ordenador FASTA. Múltiples EST (Expressed Sequence Tags o marcadores de secuencia expresada) de secuencias de ADN de la colección especial TIGR/ATCC, de clones de cADN humanos, mostraron 100% de coincidencia en las secuencias con partes de los fragmentos de cADN de la h-sgk. Tras múltiples alineaciones de 30 diferentes clones de cADN humanos TIGR/ATCC con la secuencia de sgkcADN de sgkc de ratas (número de acceso del banco de genes L01624) y con el fragmento de DANN de h-sgk, se presumió que el constructo de consorcio de I.M.A.G.E. con el ID de clon 42669 de una biblioteca de un cerebro infantil humano presenta la secuencia codificada completa de hsgk. El análisis de secuencia de este constructo con secuencias coincidentes en la dirección de sentido y antisentidos, arrojó un resultado una secuencia de cADN de, aproximadamente, 2.4 kilobases. Para comprobar la participación de la h-sgk completa, se subclonó el extremo 5' del clon (nucleótidos 1 - 285 de la secuencia codificada) en el vector pCR II y, de ese modo, se generó una nueva prueba con este constructo. La hibridización de un análisis Northern blot con esta muestra arrojó los mismos resultados que la muestra original (imagen 1). El marco de lectura más largo del clon analizado (1.3 kb) arrojó como resultado una proteína de aminoácidos 431 con una identidad de, en total, 98% con respecto de la proteína sgk de ratas.

Regulación de la expresión h-sgk a través de modificaciones de la osmolaridad extracelular: Para analizar la influencia de las modificaciones de la osmolaridad extracelular en las cantidades de transcripción de la h-sgk, se incubaron durante periodos diferentes las células HepG2 en un medio BME hipotónico (190 mol/l), isotónico (290 mosmol/l) e hipertónico (390 mosmol/l) sin FCS. Las concentraciones de ARNm de h-sgk se incrementaron fuertemente dentro de los 60 minutos en la solución hipertónica. El primer incremento se detectó a los 30 minutos, y alcanzó un máximo dentro de las dos horas. Por ello, la inducción de la h-sgk se lleva a cabo directamente tras la modificación de la osmolaridad. Las concentraciones de transcripciones continuaron aumentando entre las 4 y las 8 horas en el medio BME hipertónico extracelular y luego se redujeron lentamente dentro de las siguientes 16 a 24 horas, hasta alcanzar las concentraciones iniciales. Por otro lado, las concentraciones de transcripción de la h-sgk en una solución hipotónica extracelular se redujeron rápidamente, asimismo, el descenso ya fue reconocible tras 30 minutos y se alcanzó un máximo dentro de las dos horas.

Las diferentes osmolaridades (140, 190, 240, 290, 340, 390 y 440 mosmol/l) mostraron diferentes expresiones de la h-sgk dentro de las dos horas. En toda el área se pudo detectar una fuerte correlación de la expresión de h-sgk con la osmolaridad extracelular. Un incremento del 30% de la osmolaridad estuvo acompañada de, aproximadamente, la triplicación de la expresión de la quinasa. Un incremento de la osmolaridad de 290 a 340 mosmol/l, y una reducción de la concentración de 290 a 240 mosmol/l indujo modificaciones significativas de la expresión de h-sgk. Es decir que, aparentemente, el mecanismo de control transcripcional reacciona sensiblemente a modificaciones de la osmolaridad. La inducción del ARN de la h-sgk fue independiente de una síntesis proteica de novo. El incremento de la concentración de transcripción en el medio BME hipertónico es mayor en presencia del inhibidor de síntesis proteica cicloheximida (10 µg/ml) que en ausencia de la sustancia inhibidora.

La rápida reducción de la concentración de transcripción inmediatamente tras la reducción de la osmolaridad extracelular se aproxima a un período medio de espera breve del ARNm de la h-sgk. Para analizar la tasa de reducción de las concentraciones de transcripción de la h-sgk, se trataron células HepG2 durante dos horas con un medio hipertónico (390 mosmol/l), para obtener un incremento máximo de las concentraciones de transcripción de la h-sgk. Luego una parte de las células fue expuesta al inhibidor de ARN-polimerasa Actinomycin D (5 µg/ml), la otra parte de las células al medio hipotónico (190 mosmol/l). Tras diferentes momentos se preparó el ARN y se compararon las concentraciones de transcripción de ambos grupos de células. El tratamiento con Actinomycin D provocó una rápida caída de las concentraciones de transcripción de la h-sgk con un período medio de espera estimado de aproximadamente 30 minutos. El tratamiento de las células con el medio extracelular hipotónico provocó una caída similar de las concentraciones de transcripción.

Regulación de las concentraciones de transcripción de la h-sgk a través de modificaciones del volumen celular isotónico: Para poder distinguir entre los efectos de las modificaciones del volumen celular, de la intensidad de los iones y de la osmolaridad, se manipuló el volumen celular a través de dos diferentes métodos manteniendo una misma intensidad de iones y osmolaridad. En dos horas de reducción celular isotónica a través de la inhibición del cotransportador de NaCl/KCl y del intercambiador de Na⁺/H⁺ con bumetanida y 3-metilsulfonil-4-(1-piperidina)-benzoilguanidina (EP-0 416 499) la expresión de la h-sgk había aumentado, un efecto que se intensificó aun más por un incremento adicional de la osmolaridad extracelular. El crecimiento celular a través de la oferta de diferentes aminoácidos (mezcla de aminoácidos de aminoácidos 1x BME, GIBCO/BRL) provocó, inversamente, una caída de las concentraciones de transcripción de la h-sgk dentro de las dos horas. Es decir que el volumen celular y no la osmolaridad o la intensidad de iones regula la expresión de la h-sgk.

Para verificar si la expresión de la h-sgk en células HepG2 es regulada de manera similar a la de la sgk de ratas en las células tumorales de glándulas mamarias [Webster, M.K. (1993) Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040.], a través de glucocorticoides o suero fetal bovino (FCS), se incubaron células HepG2 con dexametasona (1μM) o con FCS (al 10%) durante dos a 12 horas. En los análisis Northern blot no se pudo hallar una influencia de glucocorticoides o FCS en las concentraciones de transcripción de h-sgk en células HepG2.

Regulación de las concentraciones de transcripción de la sgk a través de la osmolaridad extracelular en células MDCK (Madin Darby Canine Kidney, células de riñón de perro). Para verificar si la dependencia de volumen celular de la expresión de la hsgk es una particularidad de las células HepG2, las células epiteliales de riñón de perro MDCK fueron expuestas durante dos horas a un medio BME hipotónico (190 mosmol/l) e hipertónico (390 mosmol/l). Las transcripciones de h-sgk con una longitud de, aproximadamente, 2.6 kilobases también pudieron ser detectadas tras múltiples pasos de lavado muy astringentes con 0.5 x SSC (standard saline citrate) a 65°C, una indicación de un elevado grado de homología de secuencia de los genes de sgk entre diferentes especies. Las modificaciones de la osmolaridad extracelular ejercieron una influencia similar a la de las células HepG2 sobre las concentraciones de transcripción en las células MDCK.

Expresión específica del tejido de la h-sgk. Se analizó un Multiple Tissue Northern Blot (análisis Northern blot de múltiples tejidos) prefabricado (CLONTECH, Heidelberg, Alemania) con la muestra de ADN de la h-sgk. La expresión de la h-sgk muestra cierta especificidad de tejidos, con una expresión mayor en músculos del páncreas, hígado y corazón. Una expresión algo reducida se muestra en los músculos de la placenta, los pulmones y el esqueleto. En el cerebro y los riñones se encuentran expresiones reducidas pero reconocibles. En el tejido cerebral humano la expresión es más elevada en la sustancia negra y el cuerpo calloso, media en los cuerpos amigdalinos, el hipocampo, el núcleo caudado y el núcleo subtalámico, y en su manifestación más reducida, en el tálamo. Es interesante que se haya hallado una segunda transcripción de 7 kilobases en casi todos los tejidos, con una expresión máxima en el páncreas. Esta transcripción es, posiblemente, otro ARNm de h-sgk por splicing o empalme alternativo o un gen homólogo a h-sgk. La transcripción de 7 kilobases no ha sido hallada en estudios Northern blot de HepG2.

Regulación de la expresión h-sgk a través de urea: La expresión de la h-sgk es reprimida por la presencia de urea en el espacio extracelular. La expresión de h-sgk fue limitada moderadamente en el caso de 50 mmol/l de urea, con 100 mmol/l de urea fue limitada masivamente.

Discusión

La h-sgk, un gen humano cuya transcripción es regulada a través de modificaciones del volumen celular, codifica una proteína quinasa putativa de serina-treonina con un grado elevado de homología de secuencia con respecto a la sgk de ratas, que fue descrita hace poco tiempo como gen regulado por suero y glucocorticoide de células tumorales de glándulas mamarias de ratas, como gen inducido por lesiones tras lesiones en el sistema nervioso central, en el cerebro de ratas [Imaizumi *et al.*, Mol. Brain Res. 26, 189-196, 1994] y como gen inducido por la hormona que estimula la testosterona y los folículos en células de la granulosa del ovario de ratas [Richards *et al.*, Recent Prog. Horm. Res. 50, 223-254, 1995]. La proteína 49 kD h-sgk muestra una homología de aproximadamente un 98% con la proteína sgk de rata, con intercambios de aminoácidos bastante conservadores. Presenta una homología de, aproximadamente, un 50% en su dominio catalítico, con múltiples quinasas de la familia del "segundo mensajero", como la proteína quinasa, la proteína quinasa C, la proteína ribosomal S6 quinasa, y la proteína quinasa dependiente de cAMP [Webster *et al.*, (1993b) J. Biol. Chem. 268, 11482-11485, Webster *et al.*, (1993a) Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040].

El grado de expresión de la transcripción de 2.6 kilobases de h-sgk en células HepG2 es influenciada en gran medida por modificaciones de la osmolaridad extracelular. Las concentraciones elevadas de transcripción pudieron ser detectadas 30 minutos después del aumento de la osmolaridad extracelular. Esta inducción fue independiente de una síntesis proteica de novo. Las concentraciones de transcripción descienden dentro de los 30 minutos tras el descenso de la osmolaridad extracelular. La caída fue tan rápida como la caída tras la inhibición de la transcripción mediante actinomicina D.

Podemos decir entonces que las modificaciones del volumen celular influyen en la tasa de transcripción de h-sgk. La tasa de transcripción reducida de h-sgk tras el crecimiento celular osmótico y el periodo breve de espera medio garantizan una regulación rápida de las concentraciones de transcripción del ARN de h-sgk en células HepG2.

Las modificaciones isosmóticas del volumen celular influyen igualmente en la expresión de la h-sgk. La reducción celular se obtuvo mediante la inhibición de los mecanismos esenciales de transporte de iones, intercambiador de Na⁺/H⁺ y cotransportador de NaCl/KCl a través de su bloqueador específico 3-metilsulfonil-4-(1-piperidina)-benzoilguanidina (EP-0 416 499) y bumetanida. El crecimiento celular se provocó mediante la adición de aminoácidos y la siguiente acumulación hepatocelular de los aminoácidos a través de transportadores de aminoácidos dependientes de Na⁺, por ejemplo, el sistema A, N, y ASC. Las concentraciones de transcripción son correlativas con el volumen celular y no con la osmolaridad.

Tras una prolongada reducción celular osmótica las concentraciones de transcripción aumentaron fuertemente en la primera media hora y se mantuvieron elevadas durante 8 horas, antes de comenzar a reducirse nuevamente poco a poco. Este incremento prolongado parece estar en contradicción con el rápido paso del tiempo de la regulación del volumen celular. Pero las células hepáticas reducidas o aumentadas osmóticamente no regulan completamente su volumen celular, sino permanecen todavía moderadamente reducidas o aumentadas tras la fase rápida de regulación de volumen [Häussinger *et al.*, (1994) *Am. J. Physiol.* 267, E343-E355].

Las modificaciones del volumen celular restantes podrían ser responsables de la expresión modificada de la h-sgk.

Además del volumen celular mismo, la urea ejerce una influencia masiva en la expresión de la h-sgk. La urea tiene un efecto desestabilizante sobre las proteínas e imita, de esta manera, el efecto del crecimiento celular. La h-sgk sería entonces un sensor de la estabilidad proteica o de la densidad de relleno de la macromolécula celular. El efecto desestabilizante de la urea es debilitado por la formación de trimetilaminas, por lo cual probablemente se debilita el efecto de la urea en el caso de insuficiencia renal.

Los efectos celulares de la h-sgk aún no son seguros. No se puede comprobar con certeza, sobre todo, si el efecto de la h-sgk juega un papel en la regulación del volumen celular. Sin embargo, para una utilización de la h-sgk como diagnóstico el efecto de la h-sgk carece de importancia.

A pesar de la llamativa homología de secuencia con la sgk de ratas no se pudieron establecer paralelismos con la regulación de la sgk de ratas. Ni el suero (FCS) ni los glucocorticoides (dexametasona), que mostraron ambos una fuerte influencia sobre la transcripción de sgk en células tumorales de glándulas mamarias de ratas, influyeron en la expresión de la h-sgk en células HepG2. Por ello, en diferentes tipos celulares las diferentes secuencias de promoción de h-sgk parecen regular la expresión de la proteína. Por ello es pensable que la expresión de la h-sgk no es regulada exclusivamente por el volumen celular o el espesor de relleno. Una dependencia del volumen celular de la expresión de la h-sgk también pudo ser comprobada en células epiteliales de riñón (MDCK) y en macrófagos. La dependencia del volumen celular de la expresión de h-sgk no es pues una particularidad de las células HepG2. Las secuencias que flanquean la h-sgk 5' en las diferentes células podrían descubrir los elementos reguladores que son responsables de la expresión diferente de las transcripciones de la sgk. Como la expresión descrita anteriormente, inducida por glucocorticoide y suero, de la sgk en ratas, la expresión inducida por el volumen celular del ARN de la h-sgk sólo requiere de 30 minutos. El tiempo medio de espera de las transcripciones de la h-sgk en células HepG2 es, con 30 minutos, tan corta como el tiempo medio de espera en células tumorales de glándulas mamarias de ratas, como lo demuestran los experimentos con el inhibidor de ARN polimerasa, actinomycin D.

La transcripción de h-sgk es transcrita en todos los tejidos humanos analizados hasta ahora. La expresión es especialmente elevada en el páncreas y el hígado, posiblemente a causa de la función epitelial específica de estos tejidos.

La fosforilización proteica es un mecanismo rápido y reversible para convertir señales del espacio extracelular en modificaciones de una gran cantidad de funciones celulares. La proteína quinasa h-sgk podría accionar una parte de los mecanismos reguladores del volumen celular a través de la fosforilización de proteínas específicas, y conformar un elemento de enlace desconocido hasta ahora entre la hidratación celular y la función celular.

Ejemplos

1. Realización de hibridizaciones Northern

Se separaron por electroforesis 10-20 mg de ARN total, es decir, 1-2 mg de poli(A)-ARN, en un gel de agarosa al 1%, en presencia de 2.2M de formaldehído. La transferencia a una membrana de nylon con carga positiva se llevó a cabo mediante un blotter de vacío con 10x SSC como búfer de transferencia por un periodo de tiempo de dos horas. Posteriormente en la membrana se reticuló transversalmente el ARN mediante radiación UV, con una potencia controlada, de modo covalente. La hibridización de la sonda específica (25ng/ml) se llevó a cabo durante la noche, a 50°C, en un búfer desarrollado especialmente para el fin de la hibridización no radioactiva (DIG Easy Hyb, BOEHRINGER). La sonda utilizada para ello se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, a partir del extremo 3' de la secuencia codificante de la correspondiente h-sgk (nucleótido 980-1480) y, al mismo tiempo es marcada por la inclusión de DIG-dUTP en el búfer de reacción. Tras un doble lavado del análisis en 2x SSC, a temperatura ambiente y en 0.5x SSC a 65°C, se llevó a cabo la detección de la sonda marcada mediante un ELISA con un anticuerpo anti-digoxigenina, cuyo fosfatasa acoplado alcalino generó una reacción de quimioluminiscencia en un CDP-star (BOEHRINGER), que se retuvo autoradiográficamente (tiempo de exposición media: aproximadamente dos minutos).

2. Análisis Western blot

Detalles de la elaboración de anticuerpos: Para la inmunización del conejo se utilizaron dos péptidos de la secuencia de aminoácidos de la h-sgk: Pos.386-Pos.404 (DPEFTEEPVPNSIGKSPDS), Pos.416-Pos.431 (EAFLGFS-YAPPTDSFL). Ambos péptidos fueron conjugados con KLH, es decir, con MAP como portador, e inyectados por vía intracutánea junto con adyuvante completo o incompleto de Freund. El protocolo de inyección y sangrado se adecuó a las normativas estándar. Los sueros inmunes se limpiaron por cromatografía de afinidad, y las fracciones de anticuerpos se recogieron y utilizaron en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml.

Análisis por Immunoblot: Aproximadamente 60 mg de proteína total celular fueron fraccionados por electroforesis a través de un gel de poliacrilamidas SDS al 7,5% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas durante la noche en 3% BSA - 5% de leche seca - 0.06% Tween 20 en PBS. Se incubaron primarios (anti-h-sgk limpiados por afinidad) y secundarios (Peroxidasa de rábano conjugada de goat anti-rabbit - IgG, (IgG de conejo preparada en chivo) Bio-Rad) por una hora, a temperatura ambiente, en 3% de BSA y 0.06% de Tween en PBS. Para la detección de inmunidad se utilizó un kit de quimioluminiscencia ECL Plus (ECL, Amersham).

3. Hibridización *in situ*

15 mm de un corte congelado se fijaron durante 20 minutos en formaldehído al 4%, luego se llevaron a cabo dos pasos de lavado en 100 mM de búfer de fosfato pH 7.2 de, respectivamente, 5 minutos. A un tratamiento de proteinasa K (1 mg/100 ml) le siguió una incubación, durante 10 minutos, en 0.1 M de trietanolamina/0.225% ácido acético. Nuevamente se lavó con 100 mM de búfer de fosfato y los cortes se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol. La prehibridización se llevó a cabo a 50°C en el búfer de hibridización, la hibridización se llevó a cabo durante la noche. La sonda utilizada corresponde a la sonda descrita en el análisis Northern blot. La detección se llevó a cabo a través de una separación enzimática en una solución de X-fosfato, catalizada por una fosfatasa alcalina acoplada a un anticuerpo anti digoxigenina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la comprobación diagnóstica de, al menos, una enfermedad del grupo de la insuficiencia renal, inflamaciones, especialmente, hepatitis, pancreatitis, Morbus Crohn o glomerulonefritis, diabetes mellitus, infección microbiana o viral, Morbus Alzheimer, hipercatabolismo, fibrosis pulmonar y cirrosis hepática, en el cual el procedimiento comprende la determinación del grado de expresión de la quinasa humana h-sgk regulada por el volumen celular o el grado de expresión de su transcripción, y en el cual están exceptuados los procedimientos de diagnóstico practicado en el cuerpo animal o humano.
- 10 2. El procedimiento acorde a la reivindicación 1, en el cual la enfermedad es hepatitis, pancreatitis, Morbus Crohn o glomerulonefritis.
3. El procedimiento acorde a la reivindicación 1, en el cual la enfermedad es diabetes mellitus.
- 15 4. El procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual se determina el grado de expresión de un ácido nucleico o con un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en
 - 20 (a) ácido nucleico, que codifica para la quinasa humana h-sgk regulada por el volumen celular con la secuencia de aminoácidos acorde a SEQ ID NO: 2 o ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos acorde a SEQ ID NO: 1
 - (b) ácido nucleico, hibridizado en condiciones estrictas con el ácido nucleico acorde a (a), y que codifica para una quinasa funcionalmente activa regulada por el volumen celular, que no es idéntico al sgk de ratas,
 - 25 (c) muestra adecuada, sonda o cebadores de un ácido nucleico mencionado en (a) o (b).
5. El procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual se determina el grado de expresión con un anticuerpo que se enlaza específicamente con h-sgk.
- 30 6. El procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el grado de expresión es determinado con el método de Western blot, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), inmunohistoquímica, análisis Northern blot, o hibridización *in situ*.
- 35 7. La utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales orientados contra h-sgk para la comprobación diagnóstica de, al menos, una de las enfermedades del grupo de insuficiencia renal, inflamaciones, especialmente, hepatitis, pancreatitis, Morbus Crohn o glomerulonefritis, diabetes mellitus, infección microbiana o viral, Morbus Alzheimer, hipercatabolismo, fibrosis pulmonar y cirrosis hepática, exceptuando procedimientos de diagnóstico practicados en cuerpos de animales o de seres humanos.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

CAAGAGGGAG CGCTAACGTC TTCTGTCTC CCCGCGGTGG TG ATG ACG GTG AAA	54
Met Thr Val Lys	
1	
ACT GAG GCT GCT AAG GGC ACC CTC ACT TAC TCC AGG ATG AGG GGC ATG	102
Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met	
5 10 15 20	
GTG GCA ATT CTC ATC GCT TTC ATG AAG CAG AGG AGG ATG GGT CTG AAC	150
Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn	
25 30 35	
GAC TTT ATT CAG AAG ATT GCC AAT AAC TCC TAT GCA TGC AAA CAC CCT	198
Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro	
40 45 50	
GAA GTT CAG TCC ATC TTG AAG ATC TCC CAA CCT CAG GAG CCT GAG CTT	246
Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu	
55 60 65	
ATG AAT GCC AAC CCT TCT CCT CCA CCA AGT CCT TCT CAG CAA ATC AAC	294
Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn	
70 75 80	
CTT GGC CCG TCG TCC AAT CCT CAT GCT AAA CCA TCT GAC TTT CAC TTC	342
Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe	
85 90 95 100	
TTG AAA GTG ATC GGA AAG GGC AGT TTT GGA AAG GTT CTT CTA GCA AGA	390
Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg	
105 110 115	
CAC AAG GCA GAA GAA GTG TTC TAT GCA GTC AAA GTT TTA CAG AAG AAA	438
His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys	
120 125 130	
GCA ATC CTG AAA AAG AAA GAG GAG AAG CAT ATT ATG TCG GAG CGG AAT	486
Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn	
135 140 145	
GTT CTG TTG AAG AAT GTG AAG CAC CCT TTC CTG GTG GGC CTT CAC TTC	534
Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe	
150 155 160	
TCT TTC CAG ACT GCT GAC AAA TTG TAC TTT GTC CTA GAC TAC ATT AAT	582
Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn	
165 170 175 180	
GGT GGA GAG TTC TTC TAC CAT CTC CAG AGG GAA CGC TGC TTC CTG GAA	630
Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu	
185 190 195	

ES 2 325 429 T3

CCA CGG GCT CGT TTC TAT GCT GCT GAA ATA GCC AGT GCC TTG GGC TAC	678
Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr	
200 205 210	
CTG CAT TCA CTG AAC ATC GTT TAT AGA GAC TTA AAA CCA GAG AAT ATT	726
Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile	
215 220 225	
TTG CTA GAT TCA CAG GGA CAC ATT GTC CTT ACT GAT TTC GGA CTC TGC	774
Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys	
230 235 240	
AAG GAG AAC ATT GAA CAC AAC AGC ACA ACA TCC ACC TTC TGT GGC ACG	822
Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr	
245 250 255 260	
CCG GAG TAT CTC GCA CCT GAG GTG CTT CAT AAG CAG CCT TAT GAC AGG	870
Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln Pro Tyr Asp Arg	
265 270 275	
ACT GTG GAC TGG TGG TGC CTG GGA GCT GTC TTG TAT GAG ATG CTG TAT	918
Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr	
280 285 290	
GGC CTG CCG CCT TTT TAT AGC CGA AAC ACA GCT GAA ATG TAC GAC AAC	966
Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn	
295 300 305	
ATT CTG AAC AAG CCT CTC CAG CTG AAA CCA AAT ATT ACA AAT TCC GCA	1014
Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala	
310 315 320	
AGA CAC CTC CTG GAG GGC CTC CTG CAG AAG GAC AGG ACA AAG CCG CTC	1062
Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu	
325 330 335 340	
GGG GCC AAG GAT GAC TTC ATG GAG ATT AAG AGT CAT GTC TTC TTC TCC	1110
Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser	
345 350 355	
TTA ATT AAC TGG GAT GAT CTC ATT AAT AAG AAG ATT ACT CCC CCT TTT	1158
Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe	
360 365 370	
AAC CCA AAT GTG AGT GGG CCC AAC GAG CTA CGG CAC TTT GAC CCC GAG	1206
Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Glu Leu Arg His Phe Asp Pro Glu	
375 380 385	
TTT ACC GAA GAG CCT GTC CCC AAC TCC ATT GGC AAG TCC CCT GAC AGC	1254
Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser	
390 395 400	
GTC CTC GTC ACA GCC AGC GTC AAG GAA GCT GCC GAG GCT TTC CTA GGC	1302
Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly	
405 410 415 420	
TTT TCC TAT GCG CCT CCC ACG GAC TCT TTC CTC TGAACCTGT TAGGGCTTGG	1355
Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu	
425 430	

ES 2 325 429 T3

TTTTAAAGGA TTTTATGTGT GTTTCGAAT GTTTTAGTTA GCCTTTTGGT GGAGCCGCCA	1415
GCTGACAGGA CATCTTACAA GAGAATTTGC ACATCTCTGG AAGCTTAGCA ATCTTATTGC	1475
ACACTGTTGG CTGGAATTTT TTGAAGAGCA CATTCTCCTC AGTGAGCTCA TGAGGTTTTC	1535
ATTTTTATTG TTCCTTCCAA CGTGGTGCTA TCTCTGAAAC GAGCGTTAGA GTGCCGCCTT	1595
AGACGGAGGC AGGAGTTTCG TTAGAAAGCG GACCTGTTCT AAAAAAGGTC TCCTGCAGAT	1655
CTGTCTGGGC TGTGATGACG AATATTATGA AATGTGCCTT TTCTGAAGAG ATTGTGTTAG	1715
CTCCAAAGCT TTTCTATCG CAGTGTTCG GTTCTTTATT TTCCCTGTG GATATGCTGT	1775
GTGAACCGTC GTGTGAGTGT GGTATGCCTG ATCACAGATG GATTTTGTTA TAAGCATCAA	1835
TGTGACACTT GCAGGACACT ACAACGTGGG ACATTGTTTG TTTCTTCCAT ATTTGGAAGA	1895
TAAATTTATG TGTAGACTTT TTTGTAAGAT ACGGTTAATA ACTAAAATTT ATTGAAATGG	1955
TCTTGCAATG ACTCGTATTC AGATGCCTAA AGAAAGCATT GCTGCTACAA ATATTTCTAT	2015
TTTTAGAAAG GGTTTTTATG GACCAATGCC CCAGTTGTCA GTCAGAGCCG TTGGTGTTTT	2075
TCATTGTTTA AAATGTCACC TGTAAAATGG GCATTATTTA TGTTTTTTTTT TTTGCATTCC	2135
TGATAATTGT ATGTATTGTA TAAAGAACGT CTGTACATTG GGTATAACA CTAGTATATT	2195
TAAACTTACA GGCTTATTTG TAATGTAAAC CACCATTTTA ATGTACTGTA ATTAACATGG	2255
TTATAATACG TACAATCCTT CCCTCATCCC ATCACACAAC TTTTTTTGTG TGTGATAAAC	2315
TGATTTTGGT TTGCAATAAA ACCTTGAAAA ATAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	2370

Fig. 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg
 1           5           10           15

Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg
          20           25           30

Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala
          35           40           45

Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln
          50           55           60

Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser
65           70           75           80

Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser
          85           90           95

Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
          100          105          110

Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val
          115          120          125

Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met
          130          135          140

Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val
          145          150          155          160

Gly Leu His Phe Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu
          165          170          175

Asp Tyr Ile Asn Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg
          180          185          190

Cys Phe Leu Glu Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser
          195          200          205

Ala Leu Gly Tyr Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys
          210          215          220

Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp
          225          230          235          240

Phe Gly Leu Cys Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr
          245          250          255

Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln
          260          265          270

Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr
          275          280          285

```

ES 2 325 429 T3

Glu	Met	Leu	Tyr	Gly	Leu	Pro	Pro	Phe	Tyr	Ser	Arg	Asn	Thr	Ala	Glu	290	295	300	
Met	Tyr	Asp	Asn	Ile	Leu	Asn	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu	Lys	Pro	Asn	Ile	305	310	315	320
Thr	Asn	Ser	Ala	Arg	His	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	Arg	325	330	335	
Thr	Lys	Arg	Leu	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Phe	Met	Glu	Ile	Lys	Ser	His	340	345	350	
Val	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Asn	Trp	Asp	Asp	Leu	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile	355	360	365	
Thr	Pro	Pro	Phe	Asn	Pro	Asn	Val	Ser	Gly	Pro	Asn	Glu	Leu	Arg	His	370	375	380	
Phe	Asp	Pro	Glu	Phe	Thr	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Asn	Ser	Ile	Gly	Lys	385	390	395	400
Ser	Pro	Asp	Ser	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	405	410	415	
Ala	Phe	Leu	Gly	Phe	Ser	Tyr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Ser	Phe	Leu	420	425	430		

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INDICACIONES GENERALES

(i) DECLARANTE

(A) NOMBRE: Behring Diagnostics GmbH

(B) CALLE: Emil-von-Behring-Str. 76

(C) LOCALIDAD: Marburg

(E) PAÍS: ALEMANIA

(F) CÓDIGO POSTAL: 35041

(G) TELÉFONO: 06421-39-2332

(H) TELEFAX: 06421-39-4558

(ii) DENOMINACIÓN DE LA INVENCION: Quinasa humana h-sgk regulada por el volumen celular

(iii) CANTIDAD DE SECUENCIAS: 2

(iv) VERSIÓN LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) SOPORTE DE DATOS Floppy disk

(B) ORDENADOR compatible con PC de IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPA)

(2) INDICACIONES PARA EL NÚMERO DE ID DE SECUENCIA (SEQ ID NO): 1:

(i) IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2370 pares de bases

(B) ART: Nucleótido

(C) FORMA DE BARRA: Barra doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) ORIGEN PRIMARIO:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(B) RAMA: Caucásica

(vii) ORIGEN DIRECTO:

(B) CLON(ES): HSRNASTPK

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 43..1335

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

CACGAGGGAG CGCTAACGTC TTTCTGTCTC CCCGCGGTGG TG ATG ACG GTG AAA 54
Met Thr Val Lys
1

ACT GAG GCT GCT AAG GGC ACC CTC ACT TAC TCC AGG ATG AGG GGC ATG 102
Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met
5 10 15 20

GTG GCA ATT CTC ATC GCT TTC ATG AAG CAG AGG AGG ATG GGT CTG AAC 150
Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn
25 30 35

ES 2 325 429 T3

	GAC TTT ATT CAG AAG ATT GCC AAT AAC TCC TAT GCA TGC AAA CAC CCT	198
	Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro	
	40 45 50	
5	GAA GTT CAG TCC ATC TTG AAG ATC TCC CAA CCT CAG GAG CCT GAG CTT	246
	Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu	
	55 60 65	
10	ATG AAT GCC AAC CCT TCT CCT CCA CCA AGT CCT TCT CAG CAA ATC AAC	294
	Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn	
	70 75 80	
	CTT GGC CCG TCG TCC AAT CCT CAT GCT AAA CCA TCT GAC TTT CAC TTC	342
	Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe	
	85 90 95 100	
15	TTG AAA GTG ATC GGA AAG GGC AGT TTT GGA AAG GTT CTT CTA GCA AGA	390
	Leu Lys Val Ile Glu Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg	
	105 110 115	
20	CAC AAG GCA GAA GAA GTG TTC TAT GCA GTC AAA GTT TTA CAG AAG AAA	438
	His Lys Ala Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys	
	120 125 130	
	GCA ATC CTG AAA AAG AAA GAG GAG AAG CAT ATT ATG TCG GAG CGG AAT	486
	Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn	
	135 140 145	
25	GTT CTG TTG AAG AAT GTG AAG CAC CCT TTC CTG GTG GGC CTT CAC TTC	534
	Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe	
	150 155 160	
30	TCT TTC CAG ACT GCT GAC AAA TTG TAC TTT GTC CTA GAC TAC ATT AAT	582
	Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn	
	165 170 175 180	
	GGT GGA GAG TTG TTC TAC CAT CTC CAG AGG GAA CGC TGC TTC CTG GAA	630
	Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu	
	185 190 195	
35	CCA CGG GCT CGT TTC TAT GCT GCT GAA ATA GCC AGT GCC TTG GGC TAC	678
	Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr	
	200 205 210	
40	CTG CAT TCA CTG AAC ATC GTT TAT AGA GAC TTA AAA CCA GAG AAT ATT	726
	Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile	
	215 220 225	
	TTG CTA GAT TCA CAG GGA CAC ATT GTC CTT ACT GAT TTC GGA CTC TGC	774
	Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys	
	230 235 240	
45	AAG GAG AAC ATT GAA CAC AAC AGC ACA ACA TCC ACC TTC TGT GGC ACG	822
	Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr	
	245 250 255 260	
50	CCG GAG TAT CTC GCA CCT GAG GTG CTT CAT AAG CAG CCT TAT GAC AGG	870
	Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Lys Gln Pro Tyr Asp Arg	
	265 270 275	
55	ACT GTG GAC TGG TGG TGC CTG GGA GCT GTC TTG TAT GAG ATG CTG TAT	918
	Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr	
	280 285 290	

ES 2 325 429 T3

	GGC CTG CCG CCT TTT TAT AGC CGA AAC ACA GGT GAA ATG TAG GAC AAC Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn 295 300 305	966
5	ATT CTG AAC AAG CCT CTC CAG CTG AAA CCA AAT ATT ACA AAT TCC GCA Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala 310 315 320	1014
10	AGA CAC CTC CTG GAG GGC CTC CTG CAG AAG GAC AGG ACA AAG CGG CTC Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu 325 330 335 340	1062
	GGG GCC AAG GAT GAC TTC ATG GAG ATT AAG AGT CAT GTC TTC TTC TCC Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser 345 350 355	1110
15	TTA ATT AAC TGG GAT GAT CTC ATT AAT AAG AAG ATT ACT CCC CCT TTT Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe 360 365 370	1158
20	AAC CCA AAT GTG AGT GGG CCC AAC GAG CTA CGG CAC TTT GAC CCC GAG Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Glu Leu Arg His Phe Asp Pro Glu 375 380 385	1206
	TTT ACC GAA GAG CCT GTC CCC AAC TCC ATT GGC AAG TCC CCT GAC AGC Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser 390 395 400	1254
25	GTC CTC GTC ACA GCC AGC GTC AAG GAA GCT GCC GAG GCT TTC CTA GGC Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly 405 410 415 420	1302
30	TTT TCC TAT GCG CCT CCC ACG GAC TCT TTC CTC TGAACCTGT TAGGGCTTGG Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu 425 430	1355
	TTTTAAAGGA TTTTATGTGT GTTCCGAAT GTTTAGTTA GCCTTTTGGT GGAGCCGCCA GCTGACAGGA CATCTTACAA GAGAATTTGC ACATCTCTGG AAGCTTAGCA ATCTTATTGC 1415 1475	
35	ACACTGTTCTG CTGGAATTTT TTGAAGAGCA CATTCTCCTC AGTGAGCTCA TGAGGTTTTTC ATTTTTATTTC TTCCTTCCAA CGTGGTGCTA TCTCTGAAAC GAGCGTTAGA GTGCCGCCTT AGACGGAGGC AGGAGTTTCG TTAGAAAGCG GACCTGTTCT AAAAAAGGTC TCCTGCAGAT 1535 1595 1655	
40	CTGTCTGGGC TGTGATGACG AATATTATGA AATGTGCCTT TTCTGAAGAG ATTGTGTTAG CTCCAAAGCT TTTCCATCG CAGTGTTC A GTTCTTTATT TTCCCTGTG GATATGCTGT GTGAACCGTC GTGTGAGTGT GGTATGCCTG ATCACAGATG GATTTTGTTA TAAGCATCAA 1715 1775 1835	
45	TGTGACACTT GCAGGACACT ACAACGTGGG ACATTGTTTG TTTCTTCCAT ATTTGGAAGA TAAATTTATG TGTAAGACTTT TTTGTAAGAT ACGGTTAATA ACTAAAATTT ATTGAAATGG TCTTGCAATG ACTCGTATTC AGATGCCTAA AGAAAGCATT GCTGCTACAA ATATTTCTAT 1895 1955 2015	
50	TTTAGAAAG GGTTTTATG GACCAATGCC CCAGTTGTCA GTCAGAGCCG TTGGTGTTTT TCATTGTTTA AAATGTCACC TGTAAATGG GCATTATTTA TGTTTTTTTT TTTGCATTCC TGATAATTGT ATGTATTGTA TAAAGAACGT CTGTACATTG GGTATAACA CTAGTATATT 2075 2135 2195	
55	TAAACTTACA GGCTTATTTG TAATGTAAAC CACATTTTA TGTACTGTA TTAACATGG TTATAATACG TACAATCCTT CCCTCATCCC ATCACACAAC TTTTTTTGTG TGTGATAAAC TGATTTTGGT TTGCAATAAA ACCTTGAAAA ATAAAAAAA AAAAAAAA AAAAA 2255 2315 2370	

(2) INDICACIONES PARA EL NÚMERO DE ID DE SECUENCIA (SEQ ID NO): 2:

65 (i) IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 431 aminoácidos

ES 2 325 429 T3

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met	Thr	Val	Lys	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Arg	1	5	10	15
Met	Arg	Gly	Met	Val	Ala	Ile	Leu	Ile	Ala	Phe	Met	Lys	Gln	Arg	Arg	20	25	30	
Met	Gly	Leu	Asn	Asp	Phe	Ile	Gln	Lys	Ile	Ala	Asn	Asn	Ser	Tyr	Ala	35	40	45	
Cys	Lys	His	Pro	Glu	Val	Gln	Ser	Ile	Leu	Lys	Ile	Ser	Gln	Pro	Gln	50	55	60	
Glu	Pro	Glu	Leu	Met	Asn	Ala	Asn	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	65	70	75	80
Gln	Gln	Ile	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Asn	Pro	His	Ala	Lys	Pro	Ser	85	90	95	
Asp	Phe	His	Phe	Leu	Lys	Val	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Phe	Gly	Lys	Val	100	105	110	
Leu	Leu	Ala	Arg	His	Lys	Ala	Glu	Glu	Val	Phe	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	115	120	125	
Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Lys	His	Ile	Met	130	135	140	
Ser	Glu	Arg	Asn	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	His	Pro	Phe	Leu	Val	145	150	155	160
Gly	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Gln	Thr	Ala	Asp	Lys	Leu	Tyr	Phe	Val	Leu	165	170	175	
Asp	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Gln	Arg	Glu	Arg	180	185	190	
Cys	Phe	Leu	Glu	Pro	Arg	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Ile	Ala	Ser	195	200	205	
Ala	Leu	Gly	Tyr	Leu	His	Ser	Leu	Asn	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	210	215	220	
Pro	Glu	Asn	Ile	Leu	Leu	Asp	Ser	Gln	Gly	His	Ile	Val	Leu	Thr	Asp	225	230	235	240
Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Asn	Ile	Glu	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr				

ES 2 325 429 T3

	245	250	255
5	Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln 260 265 270		
10	Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr 275 280 285		
15	Glu Met Leu Tyr Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu 290 295 300		
20	Met Tyr Asp Asn Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile 305 310 315 320		
25	Thr Asn Ser Ala Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg 325 330 335		
30	Thr Lys Arg Leu Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His 340 345 350		
35	Val Phe Phe Ser Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile 355 360 365		
40	Thr Pro Pro Phe Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Glu Leu Arg His 370 375 380		
45	Phe Asp Pro Glu Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys 385 390 395 400		
50	Ser Pro Asp Ser Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu 405 410 415		
55	Ala Phe Leu Gly Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu 420 425 430		