



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 990**

51 Int. Cl.:
C07K 14/72 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04727840 .3**
96 Fecha de presentación : **16.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1622940**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **Análisis y uso de polimorfismos de PAR1 para evaluar riesgos de enfermedades cardiovasculares.**

30 Prioridad: **24.04.2003 DE 103 18 496**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es: **Kozian, Detlef;**
Czech, Joerg;
Siegler, Karl-Ernst;
Deleuze, Jean-Francois;
Ricard, Sylvain y
Mace, Sandrine

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 312 990 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).

ES 2 312 990 T3

DESCRIPCIÓN

Análisis y uso de polimorfismos de PAR1 para evaluar el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

5 La invención se refiere a secuencias de polinucleótidos que comprenden variaciones genéticas del gen PAR1 en las posiciones 3090 y/6 3329.

10 El receptor de proteasa activado 1 (PAR1) es un receptor de trombina que pertenece a la clase de los receptores acoplados a proteína G (GPCR = siglas en inglés). El gen para PAR1 está situado en el cromosoma 5q13, consiste en dos exones y cubre una región de aprox. 27 kb. PAR1 se expresa, entre otros, en células endoteliales, células de la musculatura lisa, fibroblastos, neuronas y plaquetas humanas. En plaquetas, PAR1 es un importante receptor de la transmisión de señales, el cual está implicado en el inicio de la agregación de plaquetas.

15 Los PARs se activan a través de la separación proteolítica de una parte del extremo N de los PARs, con lo que queda expuesta una nueva secuencia N-terminal la cual activa luego el receptor.

PAR1 y PAR4 juegan un papel central en la activación de plaquetas; la activación de estos receptores en plaquetas conduce a cambios morfológicos, a la liberación de ADP y a la agregación de las plaquetas.

20 No se confirmó una relación de enfermedades coronarias del corazón con polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNP - siglas en inglés) en la región del promotor de PAR1 en un grupo de pacientes coreanos. En otro estudio, se demostró que una variante del promotor de PAR1 tenía una acción protectora para el desarrollo de tromboembolias venosas.

25 La secuencia del gen PAR1 humano es conocida. A la secuencia de polinucleótidos de este gen se puede acceder bajo el número NM-001992 en la base de datos de nucleótidos NCBI. De igual modo, la secuencia de proteínas está disponible bajo el número NP-001983 en la base de datos de proteínas NCBI. NCBI es el Centro Nacional para Información de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information) (dirección postal: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, EE.UU.; dirección de la web: www.ncbi.nlm.nih.gov). La clonación del gen PAR1 ha sido descrita, entre otros, en "Schmidt *et al.*, J. Biol. Chem. 271, 9307-9312, 1996".

35 Existen diversos nuevos polimorfismos del gen PAR1, por medio de los cuales es posible determinar una fuerte disposición de un individuo a enfermedades del corazón coronarias. Los individuos afectados están, así, capacitados para contrarrestar a tiempo este factor de riesgo adaptando su estilo de vida de manera correspondiente, por ejemplo compensando a través de un control incrementado de otras influencias dañinas, tales como fumar, consumo de alcohol, alimentos ricos en colesterol, hipertensión sanguínea, etc.

40 Mecanismos preventivos relacionados con la salud de este tipo no serían posibles sin el conocimiento de los polimorfismos de PAR1 los cuales se explican con mayor detalle más abajo y el uso de los mismos en procedimientos correspondientes.

45 Variantes de una secuencia de nucleótidos particular con sustituciones en posiciones individuales son conocidas por el experto bajo el término SNP (= polimorfismo de nucleótidos sencillo - siglas en inglés).

50 La invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos aislada del gen PAR1, caracterizada porque en la posición 3090 de la secuencia de PAR1 de acuerdo con NM-001992, la cual, en calidad de técnica anterior, está públicamente disponible, se presenta una sustitución C por T. En una forma de realización preferida, la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, que tiene una sustitución T por C en la posición 3090, abarca una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 2 y, en una forma de realización particularmente preferida de dicha secuencia de polinucleótidos, esta última comprende una secuencia de SEQ ID N°: 2.

55 La invención se refiere, además, a una secuencia de polinucleótidos aislada del gen PAR1, caracterizada porque en la posición 3329 de la secuencia de PAR1 de acuerdo con NM-001992, la cual, en calidad de técnica anterior, está públicamente disponible, se presenta una sustitución C por A. En una forma de realización preferida, la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, que tiene una sustitución A por C en la posición 3329, abarca una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 3 y, en una forma de realización particularmente preferida de dicha secuencia de polinucleótidos, esta última comprende una secuencia de SEQ ID N°: 3.

60 La invención también se refiere a una secuencia de polinucleótidos aislada del gen PAR1, caracterizada porque en la posición 3090 de la secuencia PAR1 de acuerdo con NM-001992 está presente una sustitución C por T y, simultáneamente, en la posición 3329 de esta secuencia PAR1 está presente una sustitución V por A. En una forma de realización preferida, la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 que tiene una sustitución T por C en la posición 3090 y una sustitución simultánea A por C en la posición 3329 abarca una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 4 y, en una forma de realización particularmente preferida de dicha secuencia de polinucleótidos, esta última comprende una secuencia de SEQ ID N°: 4.

ES 2 312 990 T3

La invención también se refiere a una parte aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, la cual comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 5.

5 La invención también se refiere a una parte aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, secuencia que se distingue por una sustitución C por T en la posición 3090, basada en la secuencia PAR1 de acuerdo con NM-001992, parte que comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 6.

10 La invención también se refiere a una parte aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, secuencia que se distingue por una sustitución C por A en la posición 3329, basada en la secuencia PAR1 de acuerdo con NM-001992, parte que comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 7.

15 La invención también se refiere a una parte aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, secuencia que se distingue por una sustitución C por T en la posición 3090, basada en la secuencia PAR1 de acuerdo con NM-001992, y simultáneamente una sustitución C por A en la posición 3329 de la mencionada secuencia PAR1, parte que comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 8.

20 La invención comprende, además, la preparación de una secuencia de polinucleótidos de 3592 pares de bases del gen de ADNc de PAR1, secuencia que puede o no comprender los polimorfismos en las posiciones 3090 y 3329, según se define antes, individualmente o en combinación, caracterizada por las siguientes etapas de procedimiento:

- 25 a) proporcionar un ADN humano que contiene una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 2 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 3 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 4,
- b) proporcionar un par de cebadores con una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 9 y SEQ ID N°: 10,
- c) amplificar la secuencia de polinucleótidos de PAR1 mediante la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR - siglas en inglés),
- 30 d) aislar y/o purificar el fragmento con una longitud de 3,56 kb obtenido de c],
- e) secuenciar el fragmento de d].

35 La invención también se refiere a la preparación de una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8, preparación que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- 40 a) proporcionar ADN cromosómico humano que contiene una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 1 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 2 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 3 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 4
- b) proporcionar un par de cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12,
- c) amplificar el fragmento de la secuencia de polinucleótidos de PAR1 mediante la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),
- 45 d) aislar y/o purificar el fragmento obtenido de c],
- e) secuenciar el fragmento de d].

50 La invención se refiere, además, a un procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de C por T en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de C por A en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- 55 a) proporcionar material biológico que contiene células de un ser humano,
- b) obtener ADN cromosómico a partir del material de a],
- c) amplificar un fragmento de polinucleótido por medio de los cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12, utilizando una reacción PCR,
- 60 d) secuenciar el fragmento de polinucleótido procedente de c].

La invención se refiere, además, a un procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- a) proporcionar material biológico que contiene células de ser humano,

ES 2 312 990 T3

- b] obtener ARN a partir del material de a],
- c] transcribir dicho ARN en ADNc por medio de transcriptasa inversa,
- 5 d] eventualmente, amplificar un fragmento de polinucleótido por medio de los cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 10 y SEQ ID N°: 11, utilizando la reacción PCR,
- e] secuenciar el ADNc procedente de c] y/o el fragmento de polinucleótido procedente de d].

10 La invención también se refiere a un procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que contiene las siguientes etapas de procedimiento:

- 15 a] proporcionar material biológico que contiene células de ser humano,
- b] obtener ADN cromosómico a partir del material de a],
- c] realizar una transferencia Southern del ADN cromosómico procedente de b],
- 20 d] proporcionar una sonda de acuerdo con SEQ ID N°: 5 y/o SEQ ID N°: 6 y/o SEQ ID N°: 7 y/o SEQ ID N°: 8,
- e] hibridar el borrón de transferencia Southern procedente de c] con la sonda procedente de d] en condiciones de hibridación estrictas,
- 25 f] determinar la presencia o ausencia de una variación genética en el gen PAR1 en la posición 3090 y/o 3329 de acuerdo con NM-001992 comparando los resultados de la hibridación procedente de e].

30 La invención se refiere, además, a un procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- 35 a] proporcionar material biológico que contiene células de ser humano,
- b] obtener ARN a partir del material de a],
- c] realizar una transferencia Northern del ARN procedente de b],
- 40 d] proporcionar una sonda de acuerdo con SEQ ID N°: 5 y/o SEQ ID N°: 6 y/o SEQ ID N°: 7 y/o SEQ ID N°: 8,
- e] hibridar el borrón de transferencia Northern procedente de c] con la sonda procedente de d] en condiciones de hibridación estrictas,
- 45 f] determinar la presencia o ausencia de una variación genética en el gen PAR1 en la posición 3090 y/o 3329 de acuerdo con NM-001992 comparando los resultados de la hibridación.

50 La detección de las variaciones genéticas o polimorfismos en el gen PAR1 en las posiciones 3090 y/o 3329 se puede utilizar como (a) marcador genético para evaluar el riesgo de una fibrilación atrial, síndrome coronario agudo, cardiomiopatía y/o angina inestable, como (b) marcador para el tratamiento preventivo de una fibrilación atrial, síndrome coronario agudo, cardiomiopatía y/o angina inestable de los vehículos de las correspondientes variantes genéticas, como (c) marcador para ajustar la dosis de una sustancia farmacéuticamente activa a administrar para una fibrilación atrial, síndrome coronario agudo, cardiomiopatía y/o angina inestable, como (d) marcador para determinar la estrategia de rastreo de alto rendimiento para identificar una sustancia farmacéuticamente activa para una fibrilación atrial, síndrome coronario agudo, cardiomiopatía y/o angina inestable, como (e) marcador para identificar los individuos o pacientes relevantes para estudios clínicos con el fin de ensayar la tolerabilidad, seguridad y eficacia de una sustancia farmacéutica para una fibrilación atrial, síndrome coronario agudo, cardiomiopatía y/o angina inestable, y como (f) base para desarrollar sistemas de ensayo para analizar la variación genética en el gen PAR1 al nivel de ADN, ARN o proteína.

60 La invención también se refiere a una secuencia de polinucleótidos aislada con un número de 21 a 50 nucleótidos, caracterizada porque en ella está contenida una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 11. Dicha secuencia preferiblemente comprende la SEQ ID N°: 11. La invención se refiere, además, a una secuencia de polinucleótidos aislada con un número de 20 a 50 nucleótidos, la cual comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 12 o se compone de la misma, para aumentar un correspondiente fragmento del gen PAR1 por medio de la reacción de prolongación en cadena de la polimerasa (PCR). Este uso se refiere, preferiblemente, a la amplificación de un fragmento de un gen PAR1 que tiene una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o que tiene una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992.

ES 2 312 990 T3

Además, la invención comprende un kit de partes, que contiene

- a] una secuencia de polinucleótidos aislada de 21 a 50 nucleótidos de longitud, la cual abarca o se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 11,
- b] una secuencia de polinucleótidos aislada de 20 a 50 nucleótidos de longitud, la cual abarca o se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 12,
- c] al menos una enzima para llevar a cabo la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),
- d] eventualmente, sustancias y/o soluciones para llevar a cabo la reacción de extensión en cadena de la polimerasa,
- e] eventualmente, secuencias de polinucleótidos que abarcan el gen PAR1 con o sin la sustitución en la posición 3090 de la secuencia de PAR1 de acuerdo con NM-001992 y/o la posición 3329 de acuerdo con NM-001992 en su longitud completa y/o partes de las mismas,
- f] así como, eventualmente, reactivos para llevar a cabo la reacción de secuenciación.

Kit de partes aquí y en lo que sigue significa la combinación de los citados componentes que han sido combinados en una unidad funcional en yuxtaposición espacial uno con otro.

La invención se refiere, además, a la preparación del kit de partes antes descrito, que comprende

- a] proporcionar una secuencia de polinucleótidos aislada de 21 a 50 nucleótidos de longitud, la cual abarca o se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 11,
- b] proporcionar una secuencia de polinucleótidos aislada de 20 a 50 nucleótidos de longitud, la cual abarca o se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 12,
- c] proporcionar una enzima para llevar a cabo la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),
- d] proporcionar, eventualmente, reactivos para llevar a cabo la secuenciación,
- e] eventualmente, proporcionar sustancias y/o soluciones para llevar a cabo dicha reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),
- f] eventualmente, proporcionar secuencias de polinucleótidos que comprenden el gen PAR1 con o sin una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de PAR1 de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de acuerdo con NM-001992, en cada caso en su longitud completa, o partes de las mismas,
- g] introducir los componentes de a] a f], en cada caso por separado, en recipientes adecuados,
- h] combinar, eventualmente, los recipientes de g] en una o más unidades de envase.

El kit de partes antes mencionado se puede utilizar para amplificar un fragmento del gen PAR1.

Los aspectos técnicos de la invención se comentan con mayor detalle en las siguientes realizaciones.

Secuencias de polinucleótidos presentes aisladas del gen PAR1 se pueden preparar, por ejemplo, mediante amplificación por medio de la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR). Cebadores adecuados para este propósito se describen en la SEQ ID N°: 9 y SEQ ID N°: 10.

La PCR es una técnica *in-vitro* la cual se puede utilizar para duplicar selectivamente secciones de polinucleótidos que están flanqueadas por dos secuencias conocidas. Para la amplificación se requieren moléculas cortas de ADN de cadena sencilla, las cuales son complementarias a los extremos de una secuencia definida de un molde de ADN o ARN (cebadores). Una ADN polimerasa prolonga los cebadores, bajo las condiciones de reacción correctas y en presencia de desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs), a lo largo del molde de polinucleótidos de cadena sencilla y desnaturalizada y, así, sintetiza nuevas cadenas de ADN, cuya secuencia es complementaria a dicho molde. Durante este proceso, la temperatura se cambia periódicamente, de modo que, repetidamente, las cadenas de polinucleótidos se desnaturalizan y los cebadores se pueden fijar y extender. Se utilizan ADN polimerasas térmicamente estables, por ejemplo Taq polimerasa. Una típica tanda de reacción PCR contiene, aparte de un molde de polinucleótidos, dos nucleótidos de cebador adecuados, por ejemplo a concentraciones entre 0,2 y 2 μM , además dNTPs, por ejemplo a concentraciones de 200 μM por cada dNTP, además MgCl_2 que tiene una concentración de 1-2 mM, y 1-10 unidades de una ADN polimerasa térmicamente estable, tal como, por ejemplo, Taq polimerasa (polimerasa de *Thermus aquaticus*). ADN

ES 2 312 990 T3

polimerasa térmicamente estable así como los componentes para llevar a cabo la misma, y también protocolos, son suministrados en el comercio por numerosas compañías, tales como, por ejemplo, Roche Diagnostics, Clontech, Life Technologies, New England Biolabs, Promega Stratagene, etc.

5 El molde de polinucleótidos para amplificar la secuencia de polinucleótidos a aislar puede estar presente en forma de ARN o ADN. Si el molde de polinucleótidos es ARN, entonces este último se transcribe a ADN por medio de transcriptasa inversa, antes de la reacción PCR real. La cantidad de molde de polinucleótidos para llevar a cabo la reacción PCR puede ser de 0,01 a 20 ng, por ejemplo.

10 El molde de polinucleótidos se obtiene utilizando técnicas conocidas por el experto para obtener ADN y/o ARN a partir de material biológico. Material biológico debería incluir aquí, entre otros, las células de un tejido u órgano (p. ej. cerebro, sangre, hígado, bazo, riñones, corazón, vasos sanguíneos) de un vertebrado, incluidos seres humanos, o células procedentes de un cultivo de células eucarióticas (p. ej. células Hela, células CHO, células 3T3) o células que se componen de bacterias o levaduras, en las cuales la secuencia de ADN a aislar está presente en forma clonada.

15 Células de un conjunto de tejidos u órgano de un vertebrado, incluidos seres humanos, se pueden obtener tomando sangre, por punción del tejido o por técnicas quirúrgicas. A partir de ellas se puede obtener un molde de polinucleótidos, por ejemplo rompiendo las células, posiblemente concentrando organelas individuales, en particular el núcleo, y recuperando el ADN o ARN por precipitación y centrifugación.

20 Otro método para preparar secuencias de polinucleótidos aisladas del gen PAR1 comprende clonar el gen PAR1, subsiguientemente expresarlo en bacterias o levaduras y purificar el polinucleótido expresado. La reacción PCR previamente mencionada, por ejemplo, es adecuada para preparar un fragmento de polinucleótido que es clonable. Es ventajoso utilizar, para un fragmento a clonar, cebadores que portan la secuencia de reconocimiento de una enzima de la reacción en la posición 5' de la secuencia complementaria. Los dos cebadores pueden utilizar en cada caso las mismas o diferentes secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción.

25 Ejemplos de enzimas de restricción comunes son: BamHI (GGATCC), ClaI (ATCGAT), EcoRI (GAATTC), EcoRV (GATATC), HindIII (AAGCTT) NcoI (CCATGG) Sall (GTCGAC), XbaI (TCTAG1).

30 Para la clonación, un vector se trata con las enzimas de restricción que corresponden a las secuencias de reconocimiento fijadas a los cebadores. El fragmento está conectado al vector por medio de ligasa mediante aislamiento y tratamiento con las mismas enzimas de restricción. Vector significa una molécula de ADN, tal como, por ejemplo, un plásmido, bacteriófago o un cósmido, con cuya ayuda es posible clonar genes u otras secuencias de ADN e introducirlos en una célula bacteriana o eucariótica para la replicación. Ejemplos de vectores son moléculas de ADN, tales como pBR322, pUC18/19, pBluescript, pcDNA3.1. Vectores están disponibles en el comercio de compañías especializadas en material biológico, tales como Roche Diagnostics, New England Biolabs, Promega, Stratagene, etc.

35 Las instrucciones requeridas para llevar a cabo la reacción PCR, para proporcionar polinucleótidos o para llevar a cabo procesos de clonación se pueden encontrar por el experto en forma de recetas y protocolos en manuales estándares, tales como, por ejemplo, en a) "Current Protocols in Molecular Biology por Frederick M. Ausubel (Editor), Roger Brent (Editor), Robert E. Kingston (Editor), David D. Moore (Editor), J. G. Seidman (Editor), Kevin Struhl (Editor), edición de cuaderno, actualizada continuamente, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York o en b) Short Protocols in Molecular Biology, 5ª edición, por Frederick M. Ausubel (Editor), Roger Brent (Editor), Robert E. Kingston (Editor), David D. Moore (Editor), J. G. Seidman (Editor), John A. Smith (Editor), Kevin Struhl (Editor), Octubre de 2002, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York" o en c) "Molecular Cloning por J. Sambrock, E. F. Fritsch, T. Maniatis; Cold Spring Harbor Laboratory Press".

40 Se proporcionan secuencias de cebadores adecuadas, por ejemplo, a través de su síntesis química, la cual se puede llevar a cabo comercialmente por parte de compañías tales como MWG Biotech, y otras.

45 ADNc humano procedente de diferentes órganos está comercialmente disponible de compañías, tales como, por ejemplo, Promega, Stratagene u otras.

50 La secuenciación de un polinucleótido se lleva a cabo por medio de métodos rutinarios conocidos por el experto utilizando, por ejemplo, robots de laboratorio de compañías, tales como, por ejemplo, Life Technologies, Applied Biosystems, BioRad u otras.

55 También se pueden utilizar secuencias de polinucleótidos aisladas de la variante PAR1, así como fragmentos de las mismas para la hibridación a diferentes rigurosidades. La rigurosidad describe condiciones de reacción que influyen sobre la especificidad de la hibridación o la fijación de dos moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla. La rigurosidad y, así, también la especificidad de una reacción se pueden incrementar al aumentar la temperatura y reducir la fuerza iónica. Condiciones de rigurosidad baja están presentes, por ejemplo, si la hibridación se lleva a cabo a la temperatura ambiente en solución 2 x SSC. Condiciones de rigurosidad alta están presentes, por ejemplo, si la hibridación se lleva a cabo a 68°C en solución 0,1 x SSC/SDS al 0,1%.

ES 2 312 990 T3

Hibridación bajo condiciones de hibridación estrictas de acuerdo con la presente solicitud significa:

- 1] hibridar la sonda marcada con la muestra a estudiar a 65°C (o, en el caso de oligonucleótidos, 5°C por debajo de la temperatura de fusión) durante una noche a Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 1 N, SDS al 1%, sulfato de dextrano al 10%, 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado.
- 2] Lavar a la temperatura ambiente en 2 x SSC durante 10 min.
- 3] Lavar a 65°C (o, en el caso de oligonucleótidos, 5°C por debajo de la temperatura de fusión) en 1 x SSC/SDS al 1% durante 30 min.
- 4] Lavar a 65°C (o, en el caso de oligonucleótidos, 5°C por debajo de la temperatura de fusión) en 0.2 x SSC/SDS al 0,1% durante 30 min.
- 5] Lavar a 65°C (o, en el caso de oligonucleótidos, 5°C por debajo de la temperatura de fusión) en 0.1 x SSC/SDS al 0,1% durante 30 min.

Fragmentos de ADN de una longitud global de 20 nucleótidos se han de considerar nucleótidos para este propósito. La temperatura de fusión resulta de la fórmula

$$T_m = 2 (\text{número de A+T}) + 4 (\text{número de G+C})^\circ$$

Se prepara una solución 2 x SSC ó 0.1 x SSC diluyendo una solución 20 x SSC de manera correspondiente. La solución 20 x SSC comprende una solución NaCl 3M/citrato de sodio 0,3 M 2 H₂O. SDS es dodecilsulfato de sodio.

La hibridación se lleva a cabo transfiriendo los polinucleótidos a estudiar a una membrana de nailon o de nitrocelulosa (borrón Southern - ADN; borrón Northern - ARN), después de separación electroforética y subsiguiente desnaturalización. La hibridación se lleva a cabo utilizando una sonda que está marcada radiactivamente o que ha sido marcada de otra manera, por ejemplo con ayuda de colorantes fluorescentes. La sonda comprende una secuencia de polinucleótidos de ADN o ARN habitualmente de cadena sencilla y/o desnaturalizada la cual se une a la secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de polinucleótidos de ADN o ARN, de nuevo de cadena sencilla y/o desnaturalizada a estudiar.

Se pueden detectar polimorfismos de nucleótidos sencillos del gen PARI con ayuda de los cebadores de acuerdo con la invención, también mediante análisis SSCP. SSCP representa Single Stranded Conformation Polymorphism (Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla). Se trata en este caso de una técnica electroforética para identificar sustituciones de pares de bases individuales. Los polinucleótidos a investigar se amplifican mediante la reacción PCR por medio de cebadores marcados y, después de la desnaturalización en cadenas sencillas, se fraccionan en una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE - siglas en inglés). Si los fragmentos de ADN a investigar exhiben sustituciones de pares de bases individuales, entonces estos fragmentos poseen diferentes conformaciones y, así, migran en la PAGE a diferentes velocidades.

Ejemplos de sustancias para llevar a cabo la PCR son tampones, tales como Hepes o Tris, además dAPP, dGTP, dTTP, dCTP y Mg²⁺ y, posiblemente, iones divalentes o monovalentes adicionales. Soluciones contienen estas sustancias en forma disuelta.

Ejemplos

Amplificación de regiones genómicas del gen PARI

La sustitución de nucleótidos T por C en la posición 3090 y la sustitución de A por C en la posición 3329 en la secuencia de PARI se detectaron utilizando los siguientes cebadores:

Cebador 1: 5'-ACAGAGTGGAATAAGACAGAG-3' (SEQ ID N°: 11)

Cebador 2: 5'-ACAGAGTGGAATAAGACAGAG-3' (SEQ ID N°: 12)

Cebador 1 (SEQ ID N°: 11) corresponde a las posiciones 2767 a 2789 de la secuencia de referencia NM-001992. El cebador 2 se deriva del exón N° 1 del gen PARI.

ES 2 312 990 T3

Protocolo PCR para la amplificación

Los reactivos utilizados son de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.):

- 5 20 ng de ADN genómico; 1 unidad de TaqGold ADN polimerasa; tampón 1 x Taq polimerasa; 500 μ M de dNTPs; MgCl₂ 2,5 mM: 200 nM de cada par de cebadores de amplificación; H₂O hasta 5 μ l.

Programa de amplificación por PCR para hallar el genotipo

- 10 95°C durante 10 min x 1 ciclo;
- 95°C durante 30 s
- 15 70°C durante 30 s x 2 ciclos;
- 95°C durante 30 s
- 20 65°C durante 30 s x 2 ciclos;
- 95°C durante 30 s
- 25 60°C durante 30 s x 2 ciclos;
- 95°C durante 30 s
- 30 56°C durante 30 s
- 72°C durante 30 s x 40 ciclos;
- 35 72°C durante 10 min
- 4°C durante 30 s x 1 ciclo

40 *Identificación de SNPs*

Protocolo para la minisequenciación y detección de los SNPs

- 45 Todos los reactivos son de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.). 2 μ l de producto de PCR purificado, 1,5 μ L de kit de terminador BigDye, 200 nM de cebador de secuenciación; H₂O hasta 10 μ l.

Programa de amplificación para la secuenciación

- 50 96°C durante 2 min x 1 ciclo;
- 96°C durante 10 s
- 55 55°C durante 10 s
- 65°C durante 4 min x 30 ciclos;
- 60 72°C durante 7 min
- 4°C durante 30 s x 1 ciclo

65

ES 2 312 990 T3

Análisis de los productos de secuenciación

Las secuencias se analizaron primeramente utilizando el software de análisis de la secuencia (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.) para obtener datos en bruto, y luego se procesaron utilizando Phred, Phrap, Polyphred y Consed. Phred, Phrap, Polyphred y Consed son software escritos por Phil Green en la Universidad de Washington (<http://www.genome.washington.edu>).

Asignación de SNPs de PAR1 a trastornos coronarios

En un estudio clínico se estudiaron dos polimorfismos de PAR1 procedentes de la región 3'-no codificadora del gen para establecer una conexión con complicaciones trombóticas y cardiovasculares en un cohorte de pacientes.

En lo que sigue se utilizan las siguientes abreviaturas (todas las posiciones indicadas se refieren a las posiciones de los nucleótidos en la secuencia de referencia NM-001992).

T3090T de PAR1 describe el grupo de individuos, cuyos alelos del gen PAR1 tienen ambos una timidina (T) en la posición 3090. Estos individuos son homocigóticos con respecto a esta variante de PAR1.

T3090C de PAR1 describe el grupo de individuos, de los cuales un alelo del gen PAR1 tiene una citidina (C) en la posición 3090 y cuyo otro alelo del gen PAR1 tiene una timidina (T) en la posición 3090. Estos individuos son heterocigóticos con respecto a esta variante de PAR1.

C3090C de PAR1 describe el grupo de individuos, cuyos alelos del gen PAR1 tienen ambos una citidina (C) en la posición 3090. Estos individuos son homocigóticos con respecto a esta variante de PAR1.

A3329A de PAR1 describe el grupo de individuos, cuyos alelos del gen PAR1 tienen ambos una adenosina (A) en la posición 3329. Estos individuos son homocigóticos con respecto a esta variante de PAR1.

A3329C de PAR1 describe el grupo de individuos, de los cuales un alelo del gen PAR1 tiene una citidina (C) en la posición 3329 y cuyo otro alelo del gen PAR1 tiene una adenosina (A) en la posición 3329. Estos individuos son heterocigóticos con respecto a esta variante de PAR1.

C3329C de PAR1 describe el grupo de individuos, cuyos alelos del gen PAR1 tienen ambos una citidina (C) en la posición 3329. Estos individuos son homocigóticos con respecto a esta variante de PAR1.

En el grupo de pacientes analizado (Fig. 1) se observaron asociaciones estadísticamente significativas de los vehículos homocigóticos de la variante C3090C de PAR1 con una fibrilación atrial y cardiomiopatía. Después de llevar a cabo una regresión logística, se encontró un riesgo incrementado en 1,97 veces de fibrilación atrial y un riesgo incrementado 1,84 veces de cardiomiopatía en vehículos homocigóticos de la variante C3090C de PAR1 en comparación con vehículos de las variantes T3090/T3090T de PAR1 (Fig. 3).

Se demostró que para vehículos de la variante C3329C de PAR1, dicha variante está asociada con un riesgo incrementado en 2,35 veces de fibrilación atrial en comparación con vehículos de las variantes C3329A/A3329A de PAR1. En vehículos de la variante C3329C de PAR1, dicha variante parece, además, ser protectora con respecto a la aparición de síndrome coronario agudo y angina inestable. Vehículos de la variante C3329C de PAR1 tienen un riesgo reducido en 2,78 veces de la aparición de síndrome coronario agudo y/o angina inestable en comparación con vehículos de las variantes A3329C/A3329A de PAR1 (Fig. 4).

Por lo tanto, es posible, mediante un procedimiento de la invención y utilizando una secuencia de PAR1 aislada del tipo SNP particular o un fragmento de la misma, determinar si en individuos humanos existe como asignación un grupo de riesgo de acuerdo con los resultados presentados.

Preparación de ADN del plásmido

1 ml de un cultivo bacteriano de una noche se transfiere a un tubo Eppendorf y se centrifuga (5.000 rpm durante 5 min) en una Biofuga Heraeus. El sedimento de células bacterianas se ha de resuspender en 100 μ l de solución I enfriada y luego se ha de colocar en hielo durante 5 min.

Solución I: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glucosa 50 mM (filtrada en condiciones estériles) EDTA 10 mM 100 μ g/ml de Rnasa A.

Después de la adición de 200 μ l de solución II, toda la mezcla se combina bien. Se produce con ello una desnaturalización alcalina del ADN.

ES 2 312 990 T3

Solución II: NaOH 200 mM, SDS al 1%.

Después de subsiguiente incubación durante 5 min sobre hielo, se añaden a la mezcla 150 μ l de solución III. A esto le sigue la mezclado una vez más y la incubación en hielo durante otros 15 min.

Solución III: acetato de sodio 3 M (pH 4,8).

La centrifugación en la Biofuga Heraeus a 12.000 rpm durante 15 minutos separa el desecho celular, el ADN genómico y las proteínas desnaturalizadas. El sobrenadante producido, en el cual se encuentra el ADN del plásmido, se decanta en un segundo tubo Eppendorf y se mezcla con 1 ml de EtOH concentrado al 96% (ó 300 μ l de isopropanol). La tanda de precipitación se combina a fondo y se centrifuga de nuevo (15 min a 12.000 rpm en la Biofuga Heraeus). Esto resulta en la precipitación del ADN del plásmido. El ADN del plásmido sedimentado se lava con EtOH gélido concentrado al 70% y luego se seca al aire. Finalmente, el sedimento seco se recoge en 50 μ l de agua destilada estéril.

Precipitación con alcohol de ADN

Tanda de precipitación: solución de ADN, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,4), 2 a 3 volúmenes de EtOH al 96% (1 volumen de isopropanol).

La tanda se combina bien. Ésta se puede almacenar a -20°C, a pesar de que esto no aumenta el rendimiento de precipitación. El ADN del plásmido se sedimenta por centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos.

Con el fin de separar residuos del acetato de sodio utilizado, el ADN del plásmido se ha de lavar una vez más con 1 ml de EtOH concentrado al 70% después de la precipitación.

Extracción con fenol de ADN

Una solución de ADN se mezcla con el mismo volumen de fenol (Rotiphenol®, equilibrado frente a tampón TE, pH 7,6, Roth, Karlsruhe), se sacude durante 5 min y se centrifuga a 5000 rpm. La mayor parte de las proteínas, ahora desnaturalizadas, se acumula en la interfase. La fase acuosa superior contiene el ADN y se separa cuidadosamente por succión, y luego se combina con una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) con el fin de separar los residuos de fenol. A esto le sigue otra centrifugación, después de lo cual se separa el sobrenadante acuoso y el ADN se aísla de la solución mediante precipitación con alcohol.

Purificación de moléculas de ADN amplificadas

Amplicones de ADN se purifican utilizando un kit de purificación por PCR (Qiagen). Esto separa las moléculas de iniciador, nucleótidos (dNTPs), polimerasas y sales. Para este fin, la mezcla de la reacción PCR se combina con cinco veces el volumen de tampón PB, se mezcla bien y se aplica a la columna Qiaquick. El ADN amplificado se une entonces selectivamente al material de la columna, y los dNTPs se separan lavando dos veces con 750 μ l de tampón PE. El ADN amplificado se eluye luego con el volumen deseado de agua, siendo el mejor volumen el mismo que el del material de partida de la mezcla de reacción PCR.

Escisión de ADN con enzimas de restricción

Tanda: 3 μ l de ADN, 2 μ l de tampón de escisión 10 x, 2,5-5 U de enzima de restricción (p. ej. EcoRI, BamHI, Sall, XbaI, XhoI y otras), añadir agua destilada hasta un volumen de 20 μ l.

Dependiendo de la enzima de restricción, la reacción de escisión discurre a 25-55°C durante 1-2 h. Para el análisis, los fragmentos se fraccionan por electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida en paralelo con un patrón de longitud. Si la reacción es una escisión doble, entonces se añade primero una enzima a la tanda. Al cabo de una hora, se aplica una parte alícuota a un gel apropiado y, si se ha producido la escisión, se puede añadir la segunda enzima. Si la segunda enzima no se escinde en el mismo tampón de escisión, entonces se requiere primero una precipitación con alcohol.

Electroforesis en gel de agarosa de ADN

La agarosa (Roth) se disuelve en tampón 1 x agarosa a la concentración deseada y se hierve en un horno microondas hasta que se haya disuelto por completo la agarosa. La solución se vierte después en una cámara de gel de lecho plano de Plexiglas herméticamente cerrada.

ES 2 312 990 T3

Las muestras de ADN se mezclan con un 1/10 de volumen de azul de carga (glicerol al 50% v/v; EDTA 50 mM; BPB al 0,005% p/v [Merck, Darmstadt] xileno-cianol al 0,005%) y se pipetea en bolsas de gel que son generadas mediante un peine.

- 5 La electroforesis se lleva a cabo horizontalmente en tampón 1 x agarosa en calidad de tampón de corrida a un voltaje constante de 80-140 V, dependiendo del tamaño del gel y la distancia entre los electrodos.

tampón 1 x agarosa: Tris-HCl 40 mM (pH 7,8), acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM.

10

Electroforesis en gel de poliacrilamida de ADN

- 15 Solución en gel de poliacrilamida al 7,5%; 0,94 ml de solución patrón de acrilamida-bisacrilamida concentrada al 40%, 0,5 ml de tampón 10 x TBE (Tris-HCl 400 mM, pH 8,3; acetato de sodio 200 mM, EDTA 20 mM), 0,25 ml de AMPS al 1%, 10 μ l de TEMED, 3,33 ml de agua destilada.

Esta mezcla se vierte entre placas de vidrio verticales, bien limpias, montadas en aparatos verticales para la polimerización (aprox. 10-20 min). El gel se hace actuar en tampón 1 x TBE a un voltaje constante de 140 V.

20

Secuenciación de ADN

- 25 1-2 μ g de ADN se han de disolver en 81 μ l de H₂O destilada y se han de añadir 9 μ l de NaOH (2 N) para la desnaturalización. Después de incubación a la temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla se precipita, siendo importante un lavado a fondo del sedimento de ADN resultante con etanol gélido concentrado al 80% para las subsiguientes reacciones de secuenciación. Se han de añadir 2 μ l de tampón 5 x Sequenase (Tris-Cl 200 mM pH 7,5/MgCl₂ 100 mM/ NaCl 250 mM), 1 μ l de oligonucleótido (1 pM/ μ l) y, finalmente, H₂O destilada al sedimento hasta un volumen total de 10 μ l. Durante la subsiguiente incubación en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos, el oligonucleótido iniciador se hibrida al ADN.

30

Reactivos añadidos a la mezcla de hibridación para la reacción de secuenciación: 1,0 μ l de DTT (0,1 M), 2,0 μ l de mezcla de marcaje (diluida en la relación 1:5), 0,5 μ l de [α -³⁵S]dATP, 2 μ l de Sequenase® (13 U/ μ l, United States Biochemical), (diluida en la relación 1:8 con tampón de dilución enzimático).

- 35 Durante la subsiguiente incubación a la temperatura ambiente durante 5 minutos, se sintetiza la cadena antagonista, siendo el ADN sintético marcado por incorporación del dATP radiomarcado. A esto le sigue la adición en cada caso de 3,5 μ l de la tanda de marcaje hasta 2,5 μ l de las cuatro mezclas de terminación diferentes. Otra incubación a 37°C durante 5 minutos resulta en las reacciones de terminación distribuidas aleatoriamente de la síntesis de la cadena antagonista. Las reacciones se detienen al añadir 4 μ l de tampón de parada, después de lo cual las mezclas se desnaturalizan a 80-90°C y luego se aplican a un gel de secuenciación desnaturalizado concentrado al 6%. Después de cargar las muestras, la operación principal se lleva a cabo a 30-50 W y, respectivamente, 1300-1600 V durante 2-5 h. El gel se fija luego en un baño de ácido acético concentrado al 10% (15 min), se libera de residuos urea bajo agua corriente y luego se seca (durante 45 min, utilizando un cañón térmico, o durante 2 h, en una incubadora a 70°C). La subsiguiente autorradiografía se lleva a cabo a 4°C durante 16-24 h (película de rayos X Fuji Medical RX, 30 x 40; Kodak Scientific
- 40
- 45 Imaging Film X-omat AR).

Solución patrón de mezcla de marcaje: en cada caso dATP, dTTP, dGTP, dCTP 7,5 μ M

Mezclas de terminación: en cada caso dATP, dTTP, dGTP, dCTP 80 μ M y en cada caso 8 μ M del respectivo ddNTP

50

Tampón de dilución Sequenase: Tris/HCl 10 mM; pH 7,5, DTT 5 mM, 0,5 mg/ml de BSA

Tampón de parada: formamida al 95%, EDTA 20 mM, xileno-cianol FF al 0,005% (p/v)

55

Secuenciación automatizada de ADN

- 60 Tanda: 1 μ g de ADN del plásmido (en el caso de fragmentos de PCR, por ejemplo, 100 ng/500 nucleótidos), 3-5 pmol de molécula iniciadora (cebador de PCR, T_m de 55°C, si es posible), 4 μ l de Dye Terminator ready-mix (mezcla de FddNTPs-Ampli-TaqFS), añadir agua destilada hasta un volumen de 20 μ l.

La reacción PCR [25 x (15 s a 94°C, 15 s a 50°C, 4 min a 60°C)] se precipita con alcohol y se recoge en 4 μ l de tampón de carga. Las muestras se desnaturalizan luego a 95°C durante 3 min, se separan por centrifugación y se aplican a un gel de poliacrilamida vertical (34 cm de longitud, provisto de 24 pistas paralelas).

65

Después de la excitación mediante un haz de láser de argón a 488 nm, los colorantes emiten luz de diferentes longitudes de onda entre 525 nm y 605 nm la cual se separa en sus colores del espectro a través de una rejilla, un denominado "espectrógrafo". Los colores del espectro se detectan subsiguientemente de forma simultánea con

ES 2 312 990 T3

la ayuda del campo de pixeles de alta resolución de una cámara de CCD. Los datos se registran con la ayuda de un ordenador (Macintosh Quadra/650 MacIIcx Apple Share) y el correspondiente software de análisis de datos (PE Biosystems, Weiterstadt).

5 Gel de secuenciación: 30 g de urea (Sigma), 21,5 ml de H₂O destilada, 6 ml de 10 x TBE

La mezcla se disuelve en un matraz de boca ancha en un bloque calefactor a 50°C, añadiéndose lo siguiente: 9 ml de bisacrilamida al 40% (filtrada), 180 µl de APS al 10%, 24 µl de Temed.

10 *Reacción en cadena de la polimerasa (reacción PCR)*

Se pueden utilizar las siguientes ADN polimerasas:

15 Taq (Thermus aquaticus) ADN polimerasa (recombinante, Gibco/BRL) y tampón 10 x PCR

[Tris/HCl 200 mM (pH 8,4), KCl 500 mM]

20 Tfl (Thermus flavus) ADN polimerasa (Master Amp[®], Biozym, Oldendorf) y tampón 20 x PCR

[(NH₂)SO₄ 20 mM, Tris/HCl 1 M (pH 9,0)]

25 *Tanda de reacción PCR*

Componentes de la PCR	Cantidad
Molde de ADN	10-100 ng
Molécula iniciadora 1	25 µM
Molécula iniciadora 2	25 µM
Mezcla de nucleótidos (dNTPs)	20 mM (procedentes de una mezcla que contiene 10 mM de cada dNTP)
Tampón ADN polimerasa	1 x: 5,0 µl en el caso de tampón Taq ADN polimerasa 2,5 µl en el caso de tampón Tfl ADN polimerasa
MgCl ₂	75 mM
ADN polimerasa	2 U en el caso de Taq ADN polimerasa 1 U en el caso de Tfl ADN polimerasa
H ₂ O destilada	hasta 50 µl de volumen total

55 Aquí se aplica lo siguiente: 1 U cataliza la conversión de 10 nM de desoxirribonucleósido trifosfatos, a 74°C en el espacio de 30 min, a un producto de ADN insoluble en ácidos.

60 La reacción PCR comienza habitualmente con el denominado "inicio caliente": la tanda se incuba primero sin la polimerasa a 94°C con el fin de permitir que el ADN se desnaturalice por primera vez. Después que la temperatura ha alcanzado 80°C, la ADN polimerasa se añade a la mezcla con el fin de evitar una amplificación no específica a una temperatura todavía baja. Después, se lleva a cabo la reacción PCR real a lo largo de más de 25-35 ciclos.

65

ES 2 312 990 T3

Para cada ciclo se aplican las siguientes condiciones de reacción:

Reacción	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	30-60 s
Hibridación (reasociación)	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30-60 s
Extensión	72°C	1 min/1 kb

Finalmente y además, la extensión de la cadena se lleva a cabo a 72°C durante 10 min, seguido finalmente de enfriamiento.

20 *Aislamiento de ARN total*

Todas las etapas de centrifugación se llevan a cabo a 13.000 rpm y 16°C.

Las células se lisan con 600 μl de tampón de lisis (tampón 100 RLT: 1 mercaptoetanol). El lisado de células se aplica a una columna QiaSchredder y se separa por centrifugación durante 2 min. El material eluido se mezcla con 600 μl de etanol al 70%, se mezcla bien y el ADN se aplica a una columna RNaseasy mini spin y se centrifuga durante 15 s (unión de ARN a la matriz de sílice). La columna se lava tres veces (una vez con 700 μl de tampón RW1 y dos veces con 500 μl de tampón RPE). La columna se transfiere luego a un tubo Eppendorf de 1,5 ml de autoclave y el ARN se eluye con 15 μl de H₂O destilada. La concentración media de ARN total obtenida de esta manera es 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Separación de ARN a través de electroforesis en gel de agarosa

35 Gel de agarosa desnaturalizante:

1 g de agarosa, 37 ml de agua destilada, 10 ml de 10 x MOPS (MOPS 0,2 mM, EDTA 10 mM, NaAc 100 mM),

40 la mezcla se hierve y se enfría hasta 60°C

se añaden 16 ml de formaldehído concentrado al 37%.

Después de haber solidificado, el gel se incorpora con tampón de corrida en gel de ARN en el aparato de electroforesis. El ARN se aplica junto con un tampón de muestra especial.

45 Tampón de corrida en gel de ARN: 40 ml de 10 x MOPS, 65 ml de formaldehído concentrado al 37%, 295 ml de agua destilada.

50 Tampón de muestra de ARN: 1-5 μg de ARN, 5 μl de tampón RNA-NEW (7,5 μl de formaldehído concentrado al 37%, 4,5 μl de 10 x MOPS, 25,9 μl de formamida, 7,5 μl de agua destilada), 2 μl de marcador de colorante de formamida [glicerol al 50% (v/v), EDTA 1 mM (pH 8,0), azul bromofenol al 0,25% (v/v), xileno-cianol al 0,25% (v/v)].

55 El gel corre a 80 V durante aprox. 3 h. Dado que este trabajo utiliza únicamente aislados de ARN eucarióticos, las bandas dominantes visibles en el gel deberían ser las de ARNr de 28S y 18S.

Transcripción inversa con MMLV-RT (siglas en inglés)

60 (virus de la leucemia murina Moloney - Transcriptasa Inversa)

Tanda de la transcriptasa inversa: 5 μg de ARN, 100 μM de molécula iniciadora

65 El preparado de ARN y la molécula iniciadora se incuban a 75°C durante 10 min, con el fin de evitar una posible formación de estructuras secundarias en el molde de ARN en calidad de factores que interfieren con la transcriptasa. Sin embargo, incluso sin esta etapa, habitualmente tiene lugar una reacción de transcripción.

ES 2 312 990 T3

Mezcla de reacción de la transcriptasa inversa: 28 U de Rnasin® (Promega), dNTPs 25 mM, 5 µl de tampón 10 x transcriptasa inversa [Tris/HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3mM], 50 U de transcriptasa inversa (StrataScript®, Stratagene), hasta 50 µl con agua destilada.

- 5 La transcripción inversa se lleva a cabo incubando la tanda a 42°C durante 15 min y a 37°C durante 45 min. Se recomienda una incubación más larga de 2 h a 42°C con una interrupción de 30 segundos a 55°C para moldes de ARN relativamente largos. La subsiguiente incubación de la mezcla a 95°C durante 5 minutos resulta en la inactivación de dicha transcriptasa inversa. Subsiguientemente, se utilizan 5-20 µl de la mezcla de transcripción inversa para una reacción PCR.

10

Preparación de ADN genómico a partir de tejido

- 15 100 mg de tejido se desmenuzan en nitrógeno líquido para dar un polvo. El polvo de tejido se introduce en un tubo Falcon que contiene 6 ml de tampón de reacción (30 µl de proteinasa K [20 mg/ml] se añaden de nuevo al tampón) y se incuba con cuidadoso sacudimiento a 56°C durante una noche (12-18 horas). Después de la incubación, se añaden 100 µl de RNasa A (10 µg/µl) y la mezcla se incuba con sacudimiento adicional a 37°C durante una hora.

- 20 A continuación, se añaden 4 ml de fenol y el tubo se voltea manualmente boca abajo y de nuevo boca arriba durante aproximadamente 5 min. Se añaden inmediatamente 4 ml de CI (cloroformo/alcohol isoamílico) y el tubo se voltea de nuevo boca abajo y de nuevo boca arriba durante otros 5 minutos y después se centrifuga durante 15 min (3.000 rpm). El sobrenadante se separa cuidadosamente y se transfiere a tubos Falcon de 10 ml. Si el sobrenadante no es todavía transparente, debe repetirse la extracción con fenol, de otro modo se añaden otros 4 ml de CI y el tubo se voltea manualmente boca abajo y boca arriba durante 5 min y después se centrifuga durante 15 min (3.000 rpm).
- 25 El sobrenadante se separa cuidadosamente y se repite la extracción con CI. El sobrenadante final obtenido se mezcla con 1/10 de volumen de solución de acetato de sodio (3 M, pH 6) y 2,5 volúmenes de etanol (al 99,8%). El tubo se hace girar cuidadosamente hasta que el ADN precipite en forma de una maraña. Esta maraña de ADN se transfiere a aproximadamente 25 ml de etanol (al 70%) con la ayuda de una campana de vidrio y se deja reposar durante 3 min. El lavado se repite dos veces. El ADN se seca luego al aire y se disuelve en 0,5 ml de agua doblemente destilada a la
- 30 temperatura ambiente.

Borrón Southern

- 35 *Separación del ADN a través de un gel de agarosa*

Dejar el gel en UV de onda corta durante aprox. 5 min para que se produzcan roturas de la cadena en las moléculas de ADN mayores (> 6 kpb).

- 40 Inclinar continuamente el gel en solución desnaturizante durante 30 min para la desnaturización de ADN.

Inclinar continuamente el gel en solución naturalizante durante 30 min para la naturalización.

- 45 Construcción del borrón (desde la parte inferior a la superior): gel, membrana de nailon, papel de filtro seco, papel secante, placa, peso (aprox. 1 kg).

Transferencia con 20 x SSC durante una noche.

- 50 Lavar la membrana en 2 x SSC durante 10 min

Secar la membrana sobre papel de filtro

- 55 Fijar el ácido nucleico mediante cocción a 80°C durante 1 h o reticulación UV (p. ej. en "Stratalinker", posición automática). La membrana se puede luego almacenar hasta la hibridación.

Prehibridación de la membrana en solución de hibridación durante aprox. 1 - 2 h

Cubrición de sitios de unión no específicos en la membrana.

60

Solución de hibridación: 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque

- 65 Solución desnaturizante: NaOH 0,5 M (20 g), NaCl 1 M

Solución neutralizante: NaCl 1,5 M/Tris 0,5 M pH 7,4

ES 2 312 990 T3

20 x SSC es NaCl 3 M, citrato de Na 0,3 M: 175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrato de sodio X 2 H₂O, hasta 1 l con agua doblemente destilada, ajustar el pH a 7,0 con HCl.

5 50 x solución de Denhardt: 5 g de Ficoll 400, 5 g de PVP (polivinil-pirrolidona), 5 g de BSA, hasta 500 ml con agua bidestilada

Borrón Northern

10 *Separación del ARN utilizando un gel de formaldehído-agarosa*

Construcción del borrón (desde la parte inferior a la superior): gel, membrana de nailon, papel de filtro seco, papel secante, placa, peso (aprox. 1 kg).

15 Transferencia con 20 x SSC durante una noche.

Fijar ARN sobre un filtro mediante cocción a 80°C (1 h)

20 Introducir el filtro en Tris 20 mM en ebullición pH 8 para la desglioxilación de ADN y dejar enfriar hasta TA (temperatura ambiente).

Descripción de las figuras

25 Fig. 1

Características del grupo de estudio.

Fig. 2

30

Distribución de las variantes T3090C y A3329C de PAR1 en 1362 individuos analizados.

Fig. 3

35

Asociación de las variantes C3090C de PAR1 con fibrilación atrial y cardiomiopatía.

Fig. 4

40

Asociación de las variantes C3329C de PAR1 con la fibrilación atrial, síndrome coronario agudo y angina inestable.

Fig. 5

45

Secuencia de polinucleótidos del ADNc del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3'. La secuencia corresponde a la secuencia hecha pública por la Base de Datos de Nucleótidos NCBI bajo el número NM-001992. La secuencia preparada es idéntica a SEQ ID N°: 1.

Fig. 6

50

Secuencia de polinucleótidos del ADNc del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3' con un polimorfismo en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, con un polimorfismo que comprende una sustitución de T por C. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 2.

Fig. 7

55

Secuencia de polinucleótidos del ADNc del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3' con un polimorfismo en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, polimorfismo que comprende una sustitución de A por C. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 3.

Fig. 8

60

Secuencia de polinucleótidos del ADNc del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3' con un polimorfismo en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, polimorfismo que comprende una sustitución de T por C, y con un segundo polimorfismo simultáneo en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, polimorfismo que comprende una sustitución de A por C. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 4.

65

ES 2 312 990 T3

Fig. 9

Secuencia de polinucleótidos de un fragmento del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3'. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 5.

5

Fig. 10

Secuencia de polinucleótidos de un fragmento del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3' con un polimorfismo en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-01992, polimorfismo que comprende una sustitución de T por C. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 6.

10

Fig. 11

Secuencia de polinucleótidos de un fragmento del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3' con un polimorfismo en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, polimorfismo que comprende una sustitución de A por C. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 7.

15

Fig. 12

Secuencia de polinucleótidos de un fragmento del gen PAR1 humano en la orientación 5'/3' con un polimorfismo en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, polimorfismo que comprende una sustitución de T por C, y con un segundo polimorfismo simultáneo en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, polimorfismo que comprende una sustitución de A por C. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 8.

20

25 Fig. 13

Secuencia de polinucleótidos en la orientación 5'/3' del extremo 5' del ADNc del gen PAR1 humano. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 9.

30 Fig. 14

Secuencia de polinucleótidos en la orientación 5'/3' del extremo 3' del ADNc del gen PAR1 humano. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 10.

35 Fig. 15

Secuencia de polinucleótidos en la orientación 5'/3' del ADNc del gen PAR1 humano, relacionada con las posiciones 2767 a 2789 de acuerdo con NM-001992. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 11.

40 Fig. 16

Secuencia de polinucleótidos en la orientación 5'/3' del exón N° 1 del gen PAR1 humano. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 12.

45 Fig. 17

Secuencia de proteínas del receptor PAR1 humano. La secuencia corresponde a la secuencia hecha pública por la Base de Datos de Proteínas NCBI bajo el número NP-001983. La secuencia representada es idéntica a SEQ ID N°: 13.

50

55

60

65

ES 2 312 990 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada del gen PAR1, **caracterizada** porque está presente una sustitución de C por T en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992.
2. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 abarca una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 2.
- 10 3. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 2.
4. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada del gen PAR1, **caracterizada** porque está presente una sustitución de C por A en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992.
- 15 5. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada según la reivindicación 4, **caracterizada** porque la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 abarca una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 3.
6. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada según la reivindicación 4, **caracterizada** porque la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 3.
- 20 7. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada del gen PAR1, **caracterizada** porque, en cada caso referida a NM-001992, está presente una sustitución de C por T en la posición 3090 y una sustitución de C por A en la posición 3329.
- 25 8. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada según la reivindicación 7, **caracterizada** porque la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 abarca una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 4.
9. Secuencia de polinucleótidos que se presenta aislada según la reivindicación 7, **caracterizada** porque la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1 se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 4.
- 30 10. Parte que se presenta aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, que se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 5.
- 35 11. Parte que se presenta aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, que se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 6.
12. Parte que se presenta aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, que se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 7.
- 40 13. Parte que se presenta aislada de la secuencia de polinucleótidos del gen PAR1, que se compone de una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 8.
14. Preparación de una secuencia de polinucleótidos según una de las reivindicaciones 1 a 9 por medio de las siguientes etapas de procedimiento:
- 45 a) proporcionar un ADNc humano que contiene una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 2 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 3 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 4,
- 50 b) proporcionar un par de cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 9 y SEQ ID N°: 10.
- c) amplificar la secuencia de polinucleótidos de PAR1 mediante la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),
- 55 d) aislar y/o purificar el fragmento de 3,56 kb de longitud obtenido de c),
- e) secuenciar el fragmento de d).
- 60 15. Preparación de una secuencia de polinucleótidos según una de las reivindicaciones 10 a 13 por medio de las siguientes etapas de procedimiento:
- a) proporcionar ADN genómico humano que contiene una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 1 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 2 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 3 y/o una secuencia de PAR1 de acuerdo con SEQ ID N°: 4
- 65 b) proporcionar un par de cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12

ES 2 312 990 T3

- c] amplificar el fragmento de la secuencia de polinucleótidos de PAR1 mediante la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),
- d] aislar y/o purificar el fragmento obtenido de c],
- e] secuenciar el fragmento de d].

5

10

16. Procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- a] proporcionar material biológico que contiene células de un ser humano,
- b] obtener ADN cromosómico a partir del material de a],
- c] amplificar un fragmento de polinucleótido por medio de los cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12, utilizando una reacción PCR,
- d] secuenciar el fragmento de polinucleótido procedente de c].

15

20

17. Procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- a] proporcionar material biológico que contiene células de un ser humano,
- b] obtener ARN a partir del material de a],
- c] transcribir el ARN en ADNc por medio de transcriptasa inversa,
- d] eventualmente, amplificar un fragmento de polinucleótido por medio de los cebadores de acuerdo con SEQ ID N°: 10 y SEQ ID N°: 11, utilizando la reacción PCR,
- e] secuenciar el ADNc procedente de c] y/o el fragmento de polinucleótido procedente de d].

25

30

35

18. Procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- a] proporcionar material biológico que contiene células de un ser humano,
- b] obtener ADN cromosómico a partir del material de a],
- c] realizar una transferencia Southern del ADN cromosómico procedente de b],
- d] proporcionar una sonda de acuerdo con SEQ ID N°: 5 y/o SEQ ID N°: 6 y/o SEQ ID N°: 7 y/o SEQ ID N°: 8,
- e] hibridar el borrón de transferencia Southern procedente de c] con la sonda procedente de d] en condiciones de hibridación estrictas,
- f] determinar la presencia o ausencia de una variación genética en el gen PAR1 en la posición 3090 y/o 3329 de acuerdo con NM-001992 comparando los resultados de la hibridación procedente de e].

40

45

50

55

19. Procedimiento para detectar si existe o no en un gen PAR1 una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- a] proporcionar material biológico que contiene células de un ser humano,
- b] obtener ARN a partir del material de a],
- c] proporcionar una sonda de acuerdo con SEQ ID N°: 5 y/o SEQ ID N°: 6 y/o SEQ ID N°: 7 y/o SEQ ID N°: 8,
- e] hibridar el borrón de transferencia Northern procedente de c] con la sonda procedente de d] en condiciones de hibridación estrictas,

60

65

ES 2 312 990 T3

f] determinar la presencia o ausencia de una variación genética en el gen PAR1 en la posición 3090 y/ó 3329 de acuerdo con NM-001992 comparando los resultados de la hibridación.

5 20. Secuencia de polinucleótidos aislada con un número de 21 a 50 nucleótidos, **caracterizada** porque está contenida una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 11.

21. Secuencia de polinucleótidos aislada que se compone de SEQ ID N°: 11.

10 22. Secuencia de polinucleótidos aislada con un número de 21 a 50 nucleótidos, **caracterizada** porque está contenida una secuencia de acuerdo con SEQ ID N°: 12.

23. Secuencia de polinucleótidos aislada que se compone de SEQ ID N°: 12.

15 24. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada según la reivindicación 20 ó 21 en combinación con una secuencia de polinucleótidos aislada según la reivindicación 22 ó 23 para amplificar un fragmento del gen PAR1 por medio de la reacción PCR.

20 25. Uso según la reivindicación 24, **caracterizado** porque el gen PAR1 tiene una sustitución de T por C en la posición 3090 de la secuencia de acuerdo con NM-001992 y/o tiene una sustitución de A por C en la posición 3329 de la secuencia de acuerdo con NM-001992.

26. Un kit de partes, que contiene

25 a] una secuencia de polinucleótidos según la reivindicación 20 ó 21,

b] una secuencia de polinucleótidos según la reivindicación 22 ó 23,

c] al menos una enzima para llevar a cabo la reacción PCR,

30 d] así como, eventualmente, sustancias y/o soluciones para llevar a cabo la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),

35 e] así como, eventualmente, además, secuencias de polinucleótidos según una o más de las reivindicaciones 1 a 17,

f] así como, eventualmente, reactivos para llevar a cabo una secuenciación.

27. Preparación del kit de partes según la reivindicación 26, en la que

40 a] se prepara una secuencia de polinucleótidos según la reivindicación 20 ó 21,

b] se proporciona una secuencia de polinucleótidos según la reivindicación 22 ó 23,

45 c] se proporciona una enzima para llevar a cabo la reacción PCR,

d] se proporcionan, eventualmente, reactivos para llevar a cabo una secuenciación,

50 e] eventualmente, se proporcionan sustancias y/o soluciones para llevar a cabo la reacción de extensión en cadena de la polimerasa (PCR),

f] eventualmente, se proporcionan secuencias de polinucleótidos según una o más de las reivindicaciones 1 a 13,

55 g] se introducen los componentes de a] a e], en cada caso por separado, en recipientes adecuados,

h] se combinan, eventualmente, los recipientes de g] en una o más unidades de envase.

60 28. Uso del kit de partes según la reivindicación 26 ó 27 para amplificar un fragmento del gen PAR1 y, eventualmente, para el análisis ulterior en cuanto a si variaciones genéticas están presentes en el gen PAR1 en las posiciones 3090 y/ó 3329 de acuerdo con NM-001992.

65

Fig. 1

		n	%
Total		1404	
Sexo	Femenino	406	28,9
	Masculino	998	71,1
Edad		62,7 (30,0 – 90,7)	
BMI* (Body Mass Index Índice de Masa Corporal)		27,8 (16,7 – 57,1)	
Hipertensión		834	59,4
Fumador		923	65,7
Angina de pecho		210	62,7
Diabético (ADA)		445	31,7
Infarto de corazón		579	41,0
CAD (> 20% de estenosis)		1087	78,8
Apoplejía		106	7,5

* Medianas y cuartiles (Q1 – Q3)

Fig. 2

	C3329C de PAR1	C3329A de PAR1	A3329A de PAR1
T3090T de PAR1	1	0	724
/3090C de PAR1	0	371	160
C3090C de PAR1	51	47	8

Fig. 3

	razón de posibilidades	intervalo de confianza del 95%		valor p
		inferior	superior	
Fibrilación atrial	1,97	1,18	3,30	0,0101
Cardiomiopatía	1,84	1,04	3,24	0,0353

Fig. 4

	razón de posibilidades	intervalo de confianza del 95%		valor p
		inferior	superior	
Fibrilación atrial	2,35	1,18	4,68	0,0149
Cardiomiopatía	0,36	0,17	0,79	0,0107
Angina inestable	0,36	0,16	0,81	0,0142

ES 2 312 990 T3

Fig. 5

```

ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgaggac cgcggggagg
gggcgccgag cggctccagc gcagagactc tcaactgcacg ccggaggccc ctctctcgct
ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcccg ccccgccccg ctaaccgccc cagacacagc
gctcgccgag ggtcgcttg accctgatct taccctggg cacctcgcc tctgctgccc
gcaagaccg gctccccgac ccgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga
ggcggggcag cctcccggag cagcgcgcgc cagagcccgg gacaatgggg ccgcggcggc
tgctgctggt ggccgcctgc ttcagtctgt gcggcccgt gttgtctgcc cgcacccggg
cccgcaggcc agaatcaaaa gcaacaaatg ccaccttaga tcccgggtca tttcttctca
ggaaccccaa tgataaatat gaaccathtt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt
taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtcc tcttcaaaa caacttctg
cattcatctc agaagatgcc tccgatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc
catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctcccact aaacatcatg gccatogttg
tgttcatcct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgt gtacatgctg cacctggcca
cggcagatgt gctgtttgtg tctgtgctcc cctttaagat cagctattac ttttccggca
gtgattggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca
tgtacgcctc tatcttgctc atgacagtca taagcattga ccggtttctg gctgtggtgt
atcccatgca gtccctctcc tggcgtactc tgggaagggc ttccttcaact tgtctggcca
tctgggcttt ggccatcgca gggtagtgc ctctcgctcc caaggagcaa accatccagg
tgcccgggct caacatcact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaaccctg ctggaaggct
actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgccc ctgatcattt
ccacggctctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttccgcagtt gccaacgca
gcaagaagtc ccgggctttg ttccctgtcag ctgctgtttt ctgcatcttc atcatttctg
tcggaccac aaacgtcctc ctgattgcgc attactcatt cctttctcac acttccacca
cagaggctgc ctactttgcc tacctcctct gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca
tcgacccctt aatttactat tacgcttct ctgagtcca gaggtacgtc tacagtatct
tatgctgcaa agaaagttcc gatcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa
gtaaaatgga tacctgctct agtaacctga ataacagcat atacaaaaag ctgttaactt
aggaaaaggg actgctggga ggttaaaaag aaaagtttat aaaagtgaat aacctgagga
ttctattagt cccacccaa actttattga ttcacctctt aaaacaacag atgtacgact
tgcatacctg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtattt ttgtcaatta ccagaaagat
aacaggacga gatgacgggt ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataaatg
aatgtcactt ctggatatag ctaggtgaca tatacactac tacatgtgtg tatatgtaga
tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtatagaa taggcacttt aaaacactct

```

ES 2 312 990 T3

ttccccgcac cccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaaagt
ctaggttggt agagtttagc cctgaacatt tcatggtggt catcaacagt gagagactcc
atagtttggg cttgtaccac ttttgcaaat aagtgtatth tgaaattggt tgacggcaag
gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgthttc
aattttaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg
ttttgatatg ggtagthttt tttacattht acacactgta cacataagcc aaaactgagc
ataagtcctc tagtgaatgt aggctggctt tcagagtagg ctatcctga gagctgcatg
tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca
gattggccag aaaccttctc gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatthg
ctccatcctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttht tgagaaactg gcaaagcaga
atgtgatatc ctaggaggta atgaccatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg
aaagaaggca tggacttctg gatgcccac cactgggtgt aaacacatct agtagthgtt
ctgaaatgtc agthctgata tgggaagcacc cattatgctc tgtggccact ccaataggthg
ctgagthtac agagthgaat aagacagaga cctgccctca agagcaaagt agatcatgca
tagagthgta thtatthgta ataaattht ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agththgaaca ththggtht tathctthgt gthtataact ththgaaac aatgcatgac
aggacatata thththtaaa thagthctgat thaatthggc actaththt thcaaatgtht
thgctcaata gathgctcaa atcagththt thththtaaga thaatcatgt cagthctgctt
agaaataaca gaagaaata gaathgacat thgaaatctag gaaaththt ctataatht
caththactta agactthaat agactthaaa agcaththt aacctctaa gththcaagta
thgaaathct thcatggaath cacaaagth ththggaaath agththgaaac atathcttht
thththcgaaa aathggthg atththtaaca aaththgaaag ththcaaggca aathththt
thaaagagca ggccaggctc gthggctcac gctgthaat ccagcactth gthgggctga
gthgggthg thcacgagth aggagatcga gacctctg gthaacacgg thgaaacctg
ctctactaaa aathgaaaa aaththagct ggctgthgth caggcacctg thgthccagc
thctcgggag gctgagthg gagactgthg thgaaacctg aggctgacct thgagthgagc
cgagatcctc cactgthct ccagctgth caacagagca agctccatc th

Fig. 6

ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gctgagggg gctgagggac cgcggggagg
gggctccagc cggctccagc gcagagactc tctctgcaag ccggaggccc ctctctgct
ccgcccgcgc gaccgcgcgc ccagctccc cccgccccg ctaaccgccc cagacacagc
gctcgcagag gthctgctthg acctgathct thacctgthg caccctgctc
thctgctgccc

ES 2 312 990 T3

gcgaagaccg gctccccgac cgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga
 ggcggggcag cctccccgag cagcgccgcg cagagcccgg gacaatgggg ccgcgggcggc
 tgctgctggt ggccgcctgc ttcagtctgt gcggcccgct gttgtctgcc cgcaccccggg
 cccgcaggcc agaatcaaaa gcaacaaatg ccaccttaga tccccggtca tttcttctca
 ggaaccccaa tgataaatat gaaccattht gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt
 taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtcc tttcaaaaa caacttctg
 .cattcatctc agaagatgcc tccgatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc
 catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctcccact aaacatcatg gccatcgttg
 tgttcatcct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgg gtacatgctg cacctggcca
 cggcagatgt gctgtttgtg tctgtgctcc cctttaagat cagctattac tttccggca
 gtgattggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca
 tgtacgcctc tatcttgctc atgacagtca taagcattga ccggtttctg gctgtgggtg
 atcccatgca gtccctctcc tggcgtactc tgggaagggc ttccttactc tgtctggcca
 tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgc ctctcgtcct caaggagcaa accatccagg
 tgccccggct caacatcact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaaccctg ctogaaggct
 actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgccg ctgatcattt
 ccacggctctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttcgcagtt gccaacgcga
 gcaagaagtc ccgggctttg ttcctgtcag ctgctgtttt ctgcatctc atcatttgc
 tccgaccac aaacgtcctc ctgattgcgc attactcatt cctttctcac acttccacca
 cagaggctgc ctactttgcc tacctcctct gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca
 tcgacccct aatttactat taogcttct ctgagtgcc gaggtacgtc tacagtatct
 tatgctgcaa agaaagtcc gatcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa
 gtaaaatgga tacctgtctc agtaacctga ataacagcat atacaaaag ctgttaactt
 aggaaaagg actgctggga ggttaaaaaag aaaagttat aaaagtgaat aacctgagga
 ttctattagt cccccccaa actttattga ttcacctct aaaacaacag atgtacgact
 tgcatacctg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtattt ttgtcaatta ccagaaagat
 aacaggacga gatgacgggtg ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataaatg
 aatgtcactt ctggatatag ctagggtgaca tatacactact tacatgtgtg tatatgtaga
 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtatagaa taggcacttt aaaacactct
 tccccgcac cccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaaagt
 ctaggttggg agagtttagc cctgaacatt toatgggtgt catcaacagt gagagactcc
 atagtttggg cttgtaccac ttttgcaaat aagtgtattt tgaaattgtt tgacggcaag
 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgttttc
 aattttaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg
 ttttgatag ggtagtattt tttacattht acacactgta cacataagcc aaaactgagc
 ataagtcctc tagtgaatgt aggctggctt tcagagtagg ctattcctga gagctgcatg

ES 2 312 990 T3

tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca
gattggccag aaaccttctt gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatttg
ctccatctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttta tgagaaactg gcaaagcaga
atgtgatatc ctaggaggta atgacatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg
aaagaaggca tggacttctg gatgccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt
ctgaaatgtc agttctgata tggaaagcacc cattatgctc tgtggccact ccaataggtg
ctgagtgtac agagtggat aagacagaga cctgccctca agagcaaagt agatcatgca
tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agtttgaaca tttgggttac ttttcttgt ggttataact taatgaaaac aatgcagtac
aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatggtt
ttgctcaata gattgctcaa atcagggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
agaaataaca gaagaaaata gaattgacac tgaatctag gaaaattatt ctataatttc
catttactta agacttaatg agactttaaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta
tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta
tcttacgaaa aaatggtagc attttaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaccctg
cttactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccagg aggcgacct tgtagtgagc
cgagatcgcg ccaactgtct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc

Fig. 7

ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgagggac cgcggggagg
gggcgccgag eggctccagc gcagagactc tcaactgcaag ccggaggccc ctctctgct
ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcctc ccccgcccgc ctaaccgccc cagacacagc
gctcgccgag ggtcgcttgg accctgatct taccctggg caccctgcgc tctgctgcc
gcgaagaccg gctccccgac cgcgagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga
ggcggggcag cctcccggag cagcgcgcgc cagagcccgg gacaatgggg ccgcgccggc
tgetgctggt ggccgcctgc ttcagtctgt gcggcccgt gttgtctgcc cgcaccggg
cccgcaggcc agaatcaaaa gcaacaaatg ccacctaga tcccgggtca tttcttctca
ggaaccccaa tgataaatat gaaccatttt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt
taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtcc tcttcaaaaa caacttctg
cattcatctc agaagatgcc tccggatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc

ES 2 312 990 T3

catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctcccact aaacatcatg gccatcgttg
 tgttcatoct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtggt gtacatgctg cacctggcca
 cggcagatgt gctgtttggt tctgtgctcc cctttaagat cagctattac ttttccggca
 gtgattggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca
 tgtacgcctc tatcttgctc atgacagtca taagcattga cgggtttctg gctgtgggtg
 atccccatgca gtccctctcc tggcgtactc tgggaagggc ttccttcaact tgtctggcca
 tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgc ctctcgtcct caaggagcaa accatccagg
 tgccccgggt caacatcaact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaacctg ctogaaggct
 .actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgccg ctgatcattt
 ccacggctcg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttccgcagtt gccaacggca
 gcaagaagtc cgggctttg ttctgtcag ctgctgtttt ctgcatcttc atcatttgct
 tggaccac aaacgtcctc ctgattgctc attactcatt cctttctcac acttccacca
 cagaggtgc ctactttgcc tacctcctct gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca
 tgcacccct aatttactat tacgcttct ctgagtcca gaggtacgc tacagtatct
 tatgctgcaa agaaagtcc gatcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa
 gtaaaatgga tacctgctct agtaacctga ataacagcat atacaaaag ctgttaactt
 aggaaaagg actgctggga ggttaaaaag aaaagtttat aaaagtgaat aacctgagga
 ttctattagt cccacccaa actttattga ttcacctct aaaacaacag atgtacgact
 tgcatacctg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtattt ttgtcaatta ccagaaagat
 aacaggacga gatgacggtg ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataaatg
 aatgtcactt ctggatatag ctaggtgaca tatacatact tacatgtgtg tatatgtaga
 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtatagaa taggcacttt aaaacactct
 ttccccgac cccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaaagt
 ctaggttggt agagttagc cctgaacatt tcatgggtgt catcaacagt gagagactcc
 atagtttggg cttgtaccac ttttgcaaa: aagtgtattt tgaaattggt tgacggcaag
 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgttttc
 aattttaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg
 ttttgatatg ggtagtattt tttacatttt acacactgta cacataagcc azaactgagc
 ataagtcctc tagtgaatgt aggctggctt tcagagtagg ctattcctga gagctgcatg
 tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca
 gattggccag aaaccttct gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatttg
 ctccatcctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttta tgagaaactg gcaaagcaga
 atgtgatatc ctaggaggta atgaccatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg
 aaagaaggca tggacttctg gatgcccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt
 ctgaaatgtc agttctgata tggaaagcacc cattatgcgc tgtggccact ccaatagggtg
 ctgagtgtaac agagtggaat aagacagaga cctgcctca agagcaaagt agatcatgca

ES 2 312 990 T3

tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agtttgaaca tttgggttac tatttcttgt ggttataact taatgaaaac aatgcagtac
aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaaatggt
ttgctcaata gattgctcaa atcagggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
agaaataaca gaagaaaata gaattgacat tgaaatctag gaaaattatt ctataatttc
catttactta agacttaatg agactttaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta
tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta
tcttacgaaa aatggtagc attttaaca aatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctccc gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacaagg tgaaaccctg
ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccaggg aggcggacct tgtagtgagc
cgagatcgcg cactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc

Fig. 8

ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgagggac cgcggggagg
gggcgcccag cggctccagc gcagagactc tcaactgcac cgggaggccc ctctctcgct
ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcccg ccccgccccg ctaaccgccc cagacacagc
gctcgcagag ggtcgttgg accctgatct taccctggg caccctgcgc tctgctgccc
gccaagaccg gctccccgac ccgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga
ggcggggcag cctcccggag cagcgcgcgc cagagcccgg gacaatgggg ccgcggcggc
tgctgctggt ggccgcctgc ttcagtctgt gcggcccgcg gttgtctgcc cgcaccggg
cccgcaggcc agaatcaaaa gcaacaaatg ccaccttaga tccccgggca tttcttctca
ggaaccccaa tgataaatat gaaccatctt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt
taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtcc tcttcaaaaa caacttctg
cattcatctc agaagatgcc tccggatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc
catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctcccact aaacatcatg gccatcggtg
tgttcatcct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgt gtacatgctg cacctggcca
cggcagatgt gctgtttgtg tctgtgctcc cctttaagat cagctattac ttttccggca
gtgattggca gtttgggtct gaattgtgct gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca
tgtacgcctc tatcttgctc atgacagtca taagcattga ccggtttctg gctgtgggtg
atcccatgca gtcccctctc tggcgtactc tgggaagggc ttccttact tgtctggcca
tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgcc ctctcgtcct caaggagcaa accatccagg

ES 2 312 990 T3

tgccccgggct caacatcact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaaccctg ctggaaggct
 actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgccg ctgatcattt
 ccagggtctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttccgcagtt gccaacccgca
 gcaagaagtc ccgggctttg ttctgtcag ctgctgtttt ctgcatcttc atcatttgct
 tgggaccac aaacgtcctc ctgattgccc attactcatt cctttctcac acttccacca
 cagaggctgc ctactttgcc tacctcctct gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca
 .ctgacccccct aatttactat tacgcttctt ctgagtgcca gaggtacgtc tacagtatct
 tatgctgcaa agaaagtcc gatcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa
 gtaaaatgga tacctgctct agtaacctga ataacagcat atacaaaag ctgttaactt
 aggaaaaggg actgctggga ggttaaaaag aaaagtttat aaaagtgaat aacctgagga
 ttctattagt ccccacccaa actttattga ttcacctctt aaaacaacag atgtacgact
 tgcatacctg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtatth ttgtcaatta ccagaaagat
 aacaggacga gatgacggtg ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataaatg
 aatgtcactt ctggatatag ctaggtgaca tatacatact tacatgtgtg tatatgtaga
 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtatagaa taggcacttt aaaactctct
 ttccccgcac cccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaaagt
 ctagggtggg agagtttagc cctgaacatt tcatgggtgt catcaacagt gagagactcc
 atagtttggg cttgtaccac ttttgcaaat aagtgtatth tgaattggt tgacggcaag
 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgthttc
 aattttaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg
 ttttgatatg ggtagtatth tttacattht acacactgta cacataagcc aaaactgagc
 ataagtctc tagtgaatgt aggctggctt tcagagtagg ctattcctga gagctgcatg
 tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca
 gattggccag aaaccttctt gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatttg
 ctccatctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttht tgagaaactg gcaaagcaga
 atgtgatatc ctaggaggta atgaccatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg
 aaagaaggca tggacttctg gatgccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt
 ctgaaatgtc agttctgata tgggaagcacc cattatgccc tgtggccact ccaataggtg
 ctgagtgtag agagtggaat aagacagaga cctgccctca agagcaaagt agatcatgca
 tagagtgtga tgtatgtgta ataaatgtt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
 agtttgaaca tttgggttac ttttcttgt ggttataact taatgaaaac aatgagtagc
 aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatthatt tacaatgtht
 ttgctcaata gattgctcaa atcaggthtt cthtttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
 agaaataaca gaagaaaata gaattgacac tgaaatctag gaaaattatt ctataatthc
 catttactta agacttaatg agactthaaa agcaththtt aacctcctaa gtatcaagta
 tagaaaatct tcatggaatt caciaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta

ES 2 312 990 T3

tcttacgaaa aaatggtagc attttaaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctccc gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaaccctg
ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccacgg aggcggacct tgtagtgagc
cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc

Fig. 9

ac agagtggaat aagacagaga cctgcctca agagcaaagt agatcatgca
tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agtttgaaca tttgggttac ttttcttgt ggttataact taatgaaaac aatgcagtac
aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatggtt
ttgctcaata gattgctcaa atcagggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
agaaataaca gaagaaaata gaattgacat tgaatctag gaaaattatt ctataatttc
catttactta agacttaatg agactttaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta
tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta
tcttacgaaa aaatggtagc attttaaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaaccctg
ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccacgg aggcggacct tgtagtgagc
cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaata
aaaataaata aaaaataaaa aaataaaga gcaactatt tccaaatacc atagaataac
ttacataaaa gtaatataac tgtattgtaa gtagaagcta gcactgg

Fig. 10

ac agagtggaat aagacagaga cctgcctca agagcaaagt agatcatgca
tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agtttgaaca tttgggttac ttttcttgt ggttataact taatgaaaac aatgcagtac
aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatggtt
ttgctcaata gattgctcaa atcagggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
agaaataaca gaagaaaata gaattgacac tgaatctag gaaaattatt ctataatttc

ES 2 312 990 T3

catttactta agacttaatg agactttaaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta
tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta
tcttacgaaa aaatggtagc attttaaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaccctg
ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccagcagg aggcggacct tgtagtgagc
cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaata
aaaataaata aaaaaataaaa aaataaaaga gcaaactatt tccaaatacc atagaataac
ttacataaaa gtaatataac tgtattgtaa gtagaagcta gcactgg

Fig. 11

ac agagtggaat aagacagaga cctgccctca agagcaaagt agatcatgca
tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agtttgaaaca tttgggttac tatttcttgt gggtataact taatgaaaac aatgcagtac
aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatattatt taaaaatgtt
ttgctcaata gattgctcaa atcaggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
agaaataaca gaagaaaata gaattgacat tgaatctag gaaaattatt ctataatttc
catttactta agacttaatg agactttaaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta
tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta
tcttacgaaa aaatggtagc attttaaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctccc gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaccctg
ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccagcagg aggcggacct tgtagtgagc
cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaata
aaaataaata aaaaaataaaa aaataaaaga gcaaactatt tccaaatacc atagaataac
ttacataaaa gtaatataac tgtattgtaa gtagaagcta gcactgg

ES 2 312 990 T3

Fig. 12

ac agagtggaat aagacagaga cctgccctca agagcaaagt agatcatgca
tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga
agtttgaaca tttgggttac tatttcttgt ggttataact taatgaaaac aatgcagtac
aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatggtt
ttgctcaata gattgctcaa atcaggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt
agaaataaca gaagaaaata gaattgacac tgaaatctag gaaaattatt ctataatttc
catttactta agacttaatg agactttaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta
tagaaaatct tcatggaatt cacaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta
tcttacgaaa aatggtagc attttaaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt
taaaagagca ggccaggcgc ggtggctccc acctgtaatc ccagcacttt gggaggctga
ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaaccctg
ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagcgc ggctgtgtgg caggcacctg tagtcccagc
tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccacag aggcggacct tgtagtgagc
cgagatcgcg cactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaata
aaaataaata aaaaataaaa aaataaaaga gaaactatt tccaaatacc atagaataac
ttacataaaa gtaatataac tgtattgtaa gtagaagcta gcactgg

Fig. 13

ggcggggggc gcacagagcc

Fig. 14

gagatggagt cttgctctgt tg

Fig. 15

acagagtgga ataagacaga g

Fig. 16

ccagtgctag cttctactta c

Fig. 17

MGPRRLLLVAA CFSLCGPLLSARTRARRPESKATNATLDPRSFLLRNPNDKYEPFWED
EEKNESGLTEYRLV SINKSSPLQQLPAFISEDASGYLTSSWLT L FVPSVYTG V FVVS
LPLNIMAIWV FILKMKVKKPAVVYMLHLATADVLFVSVLPFKISYYFSGSDWQFGSEL
CRFVTA AFYCNMYASILLMTVISIDRFLAVVYPMQSLSWRTLGRASFTCLAIWALAIA
GWPLVLKEQTIQVPGLNITTCHDVLNETLLEGYYAYYFSAFSAVFFFVPLIISTVCY
VSIIRCLSSSAVANRSKKSRAFLSAAVFCIFIICFGPTNVLLIAHYSFLSHTSTTEA
AYFAYLLCVCVSSISSCIDPLIYYYASSECRQRYVYSILCCKESSDPSSYNSSGQLMAS
KMDTCSSNLNNSIYKLLT

ES 2 312 990 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

5 <120> Análisis y uso de polimorfismos de PAR1 para evaluar el riesgo de trastornos cardiovasculares.

<130> DEAV 2003/0030

10 <140>

<141>

<160> 13

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 3592

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

```
ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgagggac cgcggggagg 60
gggcgcgcgag cggctccagc gcagagactc tcactgcacg ccggaggccc ctccctcget 120
ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcocg ccccgcoccg ctaaccgccc cagacacagc 180
gctcgcgcgag ggtcgccttg accctgatct taccctggg caccctgocg tctgcctgcc 240
gcgaagaccg gctccccgac ccgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga 300
ggcggggcag cctccccggag cagcgcocgc cagagccocg gacaatgggg ccgcggcggc 360
tgctgctggt ggccgcctgc ttcagctctg gcggccocgt gttgtctgcc cgcacccggg 420
cccgraggcc agaatcaaaa gcaacaatg ccacctaga tcccgggtca tttctctca 480
ggaaccccaa tgataaatat gaaccatctt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt 540
taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtc tcttcaaaaa caacttcctg 600
cattcatctc agaagatgcc tccggatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc 660
catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gctccact aaacatcatg gccatcgtt 720
tgttcacctt gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgt gtacatgctg cactcggcca 780
cggcagatgt gctggttgtg tctgtgctcc cctttaagat cagctattac tttccggca 840
gtgatggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca 900
tgtacgcctc tatcttgctc atgacagtca taagcattga ccggtttctg gctgtggtgt 960
atcccattgca gtccctctcc tggcgtactc tgggaagggc ttccttcact tgtctggcca 1020
tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgc ctctcgtcct caaggagcaa accatccagg 1080
tgcccgggct caacatcact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaacctg ctcgaaggct 1140
actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgocg ctgatcattt 1200
ccacggctctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttccgcagtt gccaacgca 1260
gcaagaagtc ccgggctttg ttccctgtcag ctgctgtttt ctgcatcttc atcatttgc 1320
tcggaccacc aaacgtcctc ctgattgcgc attactcatt cctttctcac acttccacca 1380
cagaggctgc ctactttgce tacctctctc gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca 1440
tcgacccctt aatttactat tacgcttctc ctgagtgcca gaggtacgct tacagtatct 1500
tatgctgcaa agaaagtcc gatcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa 1560
```

65

ES 2 312 990 T3

5 gtaaaatgga tacctgctct agtaacctga ataacagcat atacaaaaag ctgttaactt 1620
 aggaaaaagg actgctggga ggtaaaaaag aaaagtttat aaaagtgaat aacctgagga 1680
 ttctattagt cccacccaa actttattga ttcacctctt aaaacaacag atgtacgact 1740
 tgcataacctg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtatct ttgtcaatta ccagaaagat 1800
 aacaggacga gatgacggtg ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataaatg 1860
 aatgtcactt ctggatatag ctaggtgaca tatacatact tacatgtgtg tatatgtaga 1920
 10 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtatagaa taggcacttt aaaacactct 1980
 ttccccgcac cccagcaatt atgaaaataa tctctgatcc cctgatttaa tatgcaaagt 2040
 ctaggttggt agagtcttagc cctgaacatt tcatgggtgt catcaacagt gagagactcc 2100
 atagtttggg cttgtaccac ttttgcaaat aagtgtatct tgaattgtt tgacggcaag 2160
 15 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtgaagttc tagtgttttc 2220
 aattttaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg 2280
 ttttgatatg ggtagtatct tttacatttt acacactgta cacataagcc aaaactgagc 2340
 ataagtcctc tagtgaatgt aggctggctt tcagagtagg ctattcctga gagctgcatg 2400
 20 tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca 2460
 gattggccag aaaccttctt gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatttg 2520
 ctccatectc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttta tgagaaactg gcaaagcaga 2580
 atgtgatatc ctaggaggta atgaccatga aagacttctc tacccatctt aaaaacaacg 2640
 25 aaagaaggca tggacttctg gatgccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt 2700
 ctgaaatgtc agttctgata tggaaagcacc cattatgogc tgtggccact ccaataggtg 2760
 ctgagtgtac agagtggaaat aagacagaga cctgccctca agagcaagt agatcatgca 2820
 30 tagagtgtga tgtatgtgta ataaatattt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga 2880
 agtttgaaca tttgggttac tatttcttgt ggtataact taatgaaac aatgcagtac 2940
 aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatgtt 3000
 ttgctcaata gattgctcma atcaggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt 3060
 35 agaaataaca gaagaaaata gaattgacat tgaatctag gaaaattatt ctataatttc 3120
 catttactta agacttaatg agactttaaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta 3180
 tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaatt aggttgaac atatctctta 3240
 40 tcttacgaaa aaatggtagc attttaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt 3300
 taaaagagca ggccaggcgc ggtggctcac gcctgtaac ccagcacttt gggaggctga 3360
 ggcgsgtggg tcacgaggtc aggagatcga gaccatctct gctaacacgg tgaaaccctg 3420
 ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc 3480
 45 tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccagg aggcggacct tgtagtgagc 3540
 cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc 3592

50 <210> 2
 <211> 3592
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 2

60 ggcgsgggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgagggac cgcggggagg 60
 gggcgccgag cggctccagc gcagagactc tcaactgcacg ccggaggccc ctctcctgct 120
 ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcctc ccccgcccgc ctaaccgccc cagacacagc 180
 gctcggccgag ggtcgtcttg accctgatct taccctggtg caccctgcgc tctgcctgcc 240
 65 gcgaagaccg gctccccgac ccgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga 300
 ggcgsgggcag cctccccgag cagcgcgcgc cagagcccgg gacaatgggg ccgcggcggc 360

ES 2 312 990 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

tgctgctggt ggccgcttgc ttcagctctgt gggcccgct gttgtctgcc cgcacccggg 420
 cccgcaggcc agaatacaaaa gcaacaaatg ccaccttaga tccccgggtca tttcttctca 480
 ggaaccccaa tgataaatat gaaccatttt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt 540
 taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtc tcttcaaaaa caacttcctg 600
 cattcatctc agaagatgcc tccggatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc 660
 catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctcccact aaacatcatg gccatogttg 720
 tgttcatcct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgt gtacatgctg cacctggcca 780
 cggcagatgt gctgtttgtg tctgtgtctc cctttaagat cagctattac ttttccggca 840
 gtgattggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca 900
 tgtargcctc tatcttgtct atgacagtc taagcattga cgggtttctg gctgtgggtg 960
 atcccatgca gtccctctcc tggcgtactc tgggaagggc ttccttcaact tgtctggcca 1020
 tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgc ctctcgctct caaggagcaa accatccagg 1080
 tgcccggtct caacatcact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaccctg ctogaaggct 1140
 actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgctg ctgatcattt 1200
 ccacgggtctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc tccgcagtt gccaaaccgca 1260
 gcaagaagtc cgggctttg ttctgtcag ctgtgtttt ctgcatcttc atcatttctt 1320
 tcggaccac aaacgtctc ctgattggc. attactcatt ccttctcac acttcacca 1380
 cagaggctgc ctactttgct tacctctct gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca 1440
 tcgacccctt aatttactat tacgttctct ctgagtggca gaggtagctc tacagtatct 1500
 tatgtctgca agaaagtcc galcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa 1560
 gtaaaatgga tacttctct agtaacctga ataacagcat atacaaaag ctgttaactt 1620
 aggaaaagg actgctggga ggttaaaaag aaaagttat aaaagtgaat acctgagga 1680
 ttctattagt cccacccaa actttattga ttcacctctt aaaacaacag atgtacgact 1740
 tgcatacctg ctttttatgg gagctgcaa gcatgtattt ttgtcaatta ccagaagat 1800
 aacaggacga gatgacggtg ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataatg 1860
 aatgtcactt ctggatatag ctaggtgaca tatacatact tacatgtgtg tatatgtaga 1920
 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtataga taggcacttt aaaacactct 1980
 tccccgcac ccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaaagt 2040
 ctaggttggg agagtttagc cctgaacatt tcatgggtgt catcaacagt gagagactcc 2100
 atagtttggg cttgtaccac ttttgcaat aagtgtattt tgaattgtt tgacggcaag 2160
 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgttttc 2220
 aattttaaac atatccaagt ttgaattctt aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg 2280
 ttttgaratg ggtagtattt tttacatttt acacactgta cacataagcc aaaactgagc 2340
 ataagtctc tagtgaatgt aggctggett tcagagtagg ctattctctga gagctgcatg 2400
 tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca 2460
 gattggccag aaaccttctt gctgagctc acagcagtga gactggggcc actacatttg 2520
 ctccatctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttta tgagaaactg gcaaagcaga 2580
 atgtgatatc ctaggaggta atgaccatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg 2640
 aaagaaggca tggacttctg gatgccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt 2700
 ctgaaatgct agttctgata tgggaagcacc cattatgctc tgtggccact ccaatagggtg 2760
 ctgagtgtac agagtgaat aagacagaga cctgccctca agagcaaagt agatcatgca 2820
 tagagtgtga tgtatgtgta ataaatagt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga 2880
 agtttgaaca tttgggttac tatttcttgt ggttataact taatgaaac aatgcagtac 2940
 aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatgtt 3000
 ttgctcaata gattgctcaa atcaggtttt cttttaagaa tcaatcaggt cagtctgett 3060
 agaaataaca gaagaaaata gaattgacac tgaatctag gaaaattatt ctataatttc 3120
 catttactta agacttaatg agactttaaa agcatttttt aacctctaa gtatcaagta 3180
 tagaaaatct tcatggaatt cacaagtaa tttggaaatt aggttgaac atatctctta 3240

ES 2 312 990 T3

tcttacgaaa aaatggtagc attttaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt 3300
 taaaagagca ggccaggcgc ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga 3360
 5 ggcgggtgga tcacgaggte aggagatcga gaccatcctg gctaaccacgg tgaaccctgt 3420
 ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc 3480
 tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccacgg aggcggacct tgtagtgagc 3540
 cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc 3592

<210> 3

<211> 3592

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

20 ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgagggac cgcggggagg 60
 gggcgccgag cggctccagc gcagagactc tcactgcacg ccggaggccc ctccctcgtc 120
 ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcctc ccccgccccg ctaaccgccc cagacacagc 180
 25 gctcgcgag ggtcgccttg accctgatct taccctggg caccctgcgc tctgcctgcc 240
 gogaagaccg gctccccgac ccgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga 300
 ggcggggcag cctcccggag cagcgcgcgc cagagccggg gacaatgggg ccgcggcggc 360
 tgctgctggt ggcgcctcgc ttcagtcctg gcggcccgt gttgtctgcc cgcaccggg 420
 30 cccgcaggcc agaatcaaaa gcaacaaatg ccacctaga tcccgggtca tttcttctca 480
 ggaaccccaa tgataaata gaaccatctt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt 540
 taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtc tcttcaaaaa caacttctc 600
 cattcatctc agaagatgcc tccggatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc 660
 35 catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctccact aaacatcatg gccatcgttg 720
 tgttcatcct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgt gtacatgctg cacctggcca 780
 cggcagatgt gctgtttgtg tctgtgctcc ccttaagat cagctattac ttttccggca 840
 40 gtgattggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca 900
 tgtacgcctc tatcttgcct atgacagtca taagcattga ccggtttctg gctgtggtgt 960
 atcccatgca gtccctctcc tggcgtaact tgggaagggc ttccttact tgtctggcca 1020
 tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgc ctctcgtcct caaggagcaa accatccagg 1080
 45 tgcccgggct caacatcact acctgtcatg atgtgctcaa tgaaccctg ctggaaggct 1140
 actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtctctt ttttgtgccc ctgatcattt 1200
 ccacggctctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttccgcagtt gccaacggca 1260
 gcaagaagtc ccgggctttg ttctgtcag ctgctgtttt ctgcatcttc atcatttgct 1320
 50 tcggaccac aaacgtctc ctgattgocg attactcatt cctttctcac acttccacca 1380
 cagaggctgc ctactttgcc tacctctct gtgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca 1440
 tcgacccct aatttactat tacgcttct ctgagtgcc aagggtacgtc tacagtatct 1500
 tatgctgcaa agaaagttcc gatcccagca gttataacag cagtgggcag ttgatggcaa 1560
 55 gtaaaatgga tacctgctct agtaacctga ataacagcat atacaaaag ctgttaactt 1620
 aggaaaaggg actgctggga ggttaaaaag aaaagttat aaaagtgaat aacctgagga 1680
 ttctattagt cccacccaa actttattga ttcacctct aaaacaacag atgtacgact 1740
 60 tgcatactg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtattt ttgtcaatta ccagaagat 1800
 aacaggacga gatgacggtg ttattccaag ggaatattgc caatgctaca gtaataaatg 1860
 aatgtcactt ctggatatag ctaggtgaca tatacatact tacatgtgtg tataatgtaga 1920
 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagtg cagtatagaa taggcacttt aaaacactct 1980
 65 ttccccgcac ccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaagat 2040

ES 2 312 990 T3

5 ctaggttggg agagtttagc cctgaacatt tcatgggtgtt catcaacagt gagagactcc 2100
 atagtttggg ctgtaccac ttttgcaaat aagtgtattt tgaattgtt tgacggcaag 2160
 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgttttc 2220
 aatthtaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aaacagatga aaagcctctg 2280
 ttttgatatg ggtagtattt tttacatttt acacactgta cacataagcc aaaactgagc 2340
 ataagtccte tagtgaatgt aggctggcct tcagagtagg ctattcctga gagctgcatg 2400
 10 tgtccgcccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca 2460
 gattggccag aaaccttctt gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatttg 2520
 ctccatcctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttta tgagaaactg gcaaagcaga 2580
 atgtgatatc ctaggaggta atgaccatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg 2640
 15 aaagaaggca tggacttctg gatgccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt 2700
 ctgaaatgac agttctgata tggaaagcacc cattatgccc tgtggccact ccaatagggtg 2760
 ctgagtgtac agagtggaaat aagacagaga cctgccctca agagcaaggt agatcatgca 2820
 tagagtgtga tgtatgtgta ataaatatgt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga 2880
 20 agtttgaaca tttgggttac tatttcttgt ggttataact taatgaaac aatgcagtac 2940
 aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatgtt 3000
 ttgctcaata gattgctcaa atcaggtttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt 3060
 agaataaca gaagaaaata gaattgacat tgaatctag gaaaattatt ctataatttc 3120
 25 catttactta agacttaatg agactttaa agcatttttt aacctcctaa gtatcaagta 3180
 tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaaatt aggttgaaac atatctctta 3240
 tcttacgaaa aaatggtagc attttaaaca aaatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt 3300
 taaaagagca ggcaggcgc ggtggctccc gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga 3360
 30 ggcgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacaoggy tgaaccocgt 3420
 ctctactaaa aatgcaaaaa aaattagccg ggcgtgtggy caggcacctg tagtcccagc 3480
 tactcgggag gctgaggcag gagactggcg tgaaccocag aggcggacct tgtagtgagc 3540
 35 cgagatcgcg ccactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc 3592

<210> 4

<211> 3592

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

45

ggcggggggc gcacagagcc agaggggctt gcgagcggcg gctgagggac cgcggggagg 60
 ggcgcggcag cggctccagc gcagagactc tcaactgacg ccggaggccc ctctctgct 120
 50 ccgcccgcgc gaccgcgcgc cccagtcccg ccccgcoccg ctaaccgccc cagacacagc 180
 gctcggcag ggtcgttgg accctgatct taccctggg caccctgcgc tctgcctgcc 240
 gcgaagaccg gctccccgac ccgcagaagt caggagagag ggtgaagcgg agcagcccga 300
 ggcggggcag cctcccggag cagcgcgcgc cagagcccg gacaatgggg ccgcggcggc 360
 55 tgetgctggt ggccgctgc ttcagtctgt gcggcccgtt gttgtctgcc cgcacccggg 420
 cccgcaggcc agaatacaaa gcaacaaatg ccacctaga tccccggtca tttctctca 480
 ggaaccccaa tgataaatat gaaccatttt gggaggatga ggagaaaaat gaaagtgggt 540
 taactgaata cagattagtc tccatcaata aaagcagtc tcttcaaaaa caacttctg 600
 60 cattcatctc agaagatgac tccggatatt tgaccagctc ctggctgaca ctctttgtcc 660
 catctgtgta caccggagtg tttgtagtca gcctcccact aaacatcatg gccatcgttg 720
 tgttcatcct gaaaatgaag gtcaagaagc cggcgggtgt gtacatgctg cacctggcca 780
 65 cggcagatgt gctgtttgtg tctgtgctcc cctttaagat cagctattac ttttccggca 840

ES 2 312 990 T3

5 gtgattggca gtttgggtct gaattgtgtc gcttcgtcac tgcagcattt tactgtaaca 900
 tgtacgcctc tatcttgctc atgacagtca taagcattga cgggtttctg gctgtgggtg 960
 atcccattgca gtccctctcc tggcgtactc tgggaagggc ttccttcaact tgtctggcca 1020
 tctgggcttt ggccatcgca ggggtagtgc ctctcgtect caaggagcaa accatccagg 1080
 tgcctgggct caacatcaact acctgtcatg atgtgtctca tgaaccctg ctggaaggct 1140
 actatgccta ctacttctca gccttctctg ctgtcttctt ttttgtgccc ctgatcattt 1200
 10 ccacggctctg ttatgtgtct atcattcgat gtcttagctc ttccgcagtt gccaacccga 1260
 gcaagaagtc cggggtttg ttcctgtcag ctgctgtttt ctgcatcttc atcatttgc 1320
 tcggaccac aaacgtctc ctgattgcgc attactcatt cctttctcac acttccacca 1380
 cagaggctgc ctactttgcc taectctct ctgtctgtgt cagcagcata agctcgtgca 1440
 15 tcgacccct aatttactat tacgcttct ctgagtcca gaggtacgtc tacagtatct 1500
 tatgtgcaa agaaagtcc gatcccagca gttataacag cagtgggag ttgatggcaa 1560
 gtaaaatgga tacctgtct agtaacctga ataacagcat atacaaaag ctgttaactt 1620
 20 aggaaaagg actgctggga ggttaaaaag aaaagtttat aaaagtgaat aacctgagga 1680
 ttctattagt cccacccaa actttattga ttacctctt aaacaacag atgtacgact 1740
 tgcatacctg ctttttatgg gagctgtcaa gcatgtattt ttgtcaatta ccagaaagt 1800
 aacaggacga gatgacggtg ttattccaag ggaatattgc caatgtaca gtaataatg 1860
 25 aatgtcactt ctggatatag ctagggtaca tatacatact tacatgtgtg tatatgtaga 1920
 tgtatgcaca cacatatatt atttgcagt cagtatagaa taggcactt aaacactct 1980
 ttccccgcac cccagcaatt atgaaaataa tctctgattc cctgatttaa tatgcaagt 2040
 ctaggttgg agagttagc cctgaacatt tcatgggtt catcaacagt gagagactcc 2100
 30 atagtttggg ctgtaccac ttttgcaaat aagtgtattt tgaattgtt tgacggcaag 2160
 gtttaagtta ttaagaggta agacttagta ctatctgtgc gtagaagttc tagtgttttc 2220
 aattttaaac atatccaagt ttgaattcct aaaattatgg aacagatga aaagcctctg 2280
 ttttgatatg ggtagtattt tttacattt acacactgta cacataagcc aaaactgac 2340
 35 ataagtcctc tagtgaatgt aggctggctt tcagagttag ctattcctga gagctgcatg 2400
 tgtccgccc cgatggagga ctccaggcag cagacacatg ccagggccat gtcagacaca 2460
 gattggccag aaaccttct gctgagcctc acagcagtga gactggggcc actacatttg 2520
 40 ctccatctc ctgggattgg ctgtgaactg atcatgttta tgagaaactg gcaaaagcaga 2580
 atgtgatata ctaggaggta atgaccatga aagacttctc taccatctt aaaaacaacg 2640
 aaagaaggca tggacttctg gatgccatc cactgggtgt aaacacatct agtagttgtt 2700
 ctgaaatgtc agttctgata tggaaagcacc cattatgcgc tgtggccact ccaatagggtg 2760
 45 ctgagtgtac agagtggaat aagacagaga cctgcctca agagcaaagt agatcatgca 2820
 tagagtgtga tgtatgtgta ataaatagt ttcacacaaa caaggcctgt cagctaaaga 2880
 agtrtgaaca tttgggttac ttttcttgt ggtataact taatgaaac aatgcagtac 2940
 aggacatata ttttttaaaa taagtctgat ttaattgggc actatttatt tacaatgtt 3000
 50 ttgctcaata gattgctcaa atcagggttt cttttaagaa tcaatcatgt cagtctgctt 3060
 agaaataaca gaagaaata gaattgacac tgaantctag gaaattatt ctataatttc 3120
 catttactta agacttaatg agactttaa agcattttt aacctctaa gtatcaagta 3180
 55 tagaaaatct tcatggaatt cacaaagtaa tttggaatt aggttgaac atatctctta 3240
 tcttacgaaa aatggtagc attttaaca aatagaaag ttgcaaggca aatgtttatt 3300
 taaaagagca ggccagggc ggtggctccc gcctgtaac ccagcacttt gggaggctga 3360
 ggccgggtgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatctg gctaacacgg tgaaccctg 3420
 60 ctctactaaa aatgcaaaa aatttagccg ggcgtgggtg caggcacctg tagtcccagc 3480
 tactcgggag gctgaggcag gagaactggc tgaaccagg aggcggacct tgtagtgagc 3540
 cgagatcgcg cactgtgct ccagcctggg caacagagca agactccatc tc 3592

ES 2 312 990 T3

<210> 5

<211> 939

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

10      acagagtgga ataagacaga gacctgccct caagagcaaa gtagatcatg catagagtgt 60
      gatgtatgtg taataaatat gtttcacaca aacaaggcct gtcagctaaa gaagtttgaa 120
      catttgggtt actatttctt gtggttataa cttaatgaaa acaatgcagt acaggacata 180
      tattttttaa aataagtctg atttaattgg gcaactattta ttacaaatg ttttgctcaa 240
15      tagattgctc aaatcagggt ttcttttaag aatcaatcat gtcagtctgc ttagaataaa 300
      cagaagaaaa tagaattgac attgaaatct aggaaaatta ttctataatt tccatttact 360
      taagacttaa tgagacttta aaagcatttt ttaacctcct aagtatcaag tatagaaaat 420
      ctatcatgaa ttcacaaagt aatttggaaa ttaggttgaa acatatctct tatcttacga 480
20      aaaaatggta gcatttttaa caaatagaa agttgcaagg caaatgttta tttaaaagag 540
      caggccaggc gcggtggctc acgcctgtaa tccagcact ttgggaggct gaggcgggtg 600
      gatcacgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaacc gtcttacta 660
      aaaatgcaaa aaaaattagc cgggcgtggt ggcaggcacc tgtagtcca gctactcggg 720
25      aggctgaggc aggagactgg cgtgaaccca ggaggcggac cttgtagtga gccgagatcg 780
      cgccactgtg ctccagcctg ggcaacagag caagactcca tctcaaaaa taaaaataaa 840
      taaaaataaa aaaaataaaa gagcaacta tttccaaata ccatagaata acttacataa 900
30      aagtaataa actgtattgt aagtagaagc tagcactgg 939
  
```

<210> 6

<211> 939

35 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

40      acagagtgga ataagacaga gacctgccct caagagcaaa gtagatcatg catagagtgt 60
      gatgtatgtg taataaatat gtttcacaca aacaaggcct gtcagctaaa gaagtttgaa 120
      catttgggtt actatttctt gtggttataa cttaatgaaa acaatgcagt acaggacata 180
      tattttttaa aataagtctg atttaattgg gcaactattta ttacaaatg ttttgctcaa 240
45      tagattgctc aaatcagggt ttcttttaag aatcaatcat gtcagtctgc ttagaataaa 300
      cagaagaaaa tagaattgac actgaaatct aggaaaatta ttctataatt tccatttact 360
      taagacttaa tgagacttta aaagcatttt ttaacctcct aagtatcaag tatagaaaat 420
      ctatcatgaa ttcacaaagt aatttggaaa ttaggttgaa acatatctct tatcttacga 480
50      aaaaatggta gcatttttaa caaatagaa agttgcaagg caaatgttta tttaaaagag 540
      caggccaggc gcggtggctc acgcctgtaa tccagcact ttgggaggct gaggcgggtg 600
      gatcacgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaacc gtcttacta 660
55      aaaatgcaaa aaaaattagc cgggcgtggt ggcaggcacc tgtagtcca gctactcggg 720
      aggctgaggc aggagactgg cgtgaaccca ggaggcggac cttgtagtga gccgagatcg 780
      cgccactgtg ctccagcctg ggcaacagag caagactcca tctcaaaaa taaaaataaa 840
60      taaaaataaa aaaaataaaa gagcaacta tttccaaata ccatagaata acttacataa 900
      aagtaataa actgtattgt aagtagaagc tagcactgg 939
  
```

<210> 7

<211> 939

65 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 312 990 T3

<400> 7

5 acagagtgga ataagacaga gacctgccct caagagcaaa gtagatcatg catagagtgt 60
gatgtatgtg taataaatat gtttcacaca aacaaggcct gtcagctaaa gaagtttgaa 120
catttgggtt actatctctt gtggttataa cttaatgaaa acaatgcagt acaggacata 180
tattttttaa aataagtctg atttaattgg gcactattta tttacaaatg ttttgctcaa 240
tagattgctc aaatcagggtt ttcttttaag aatcaatcat gtcagtctgc ttagaaataa 300
10 cagaagaaaa tagaattgac attgaaatct aggaaaatta ttctataatt tccatttact 360
taagacttaa tgagacttta aaagcatttt ttaacctcct aagtatcaag tatagaaaat 420
cttcatggaa ttcacaaagt aatttggaaa ttaggttgaa acatatctct tatcttacga 480
15 aaaaatggta gcatttttaa caaaatagaa agttgcaagg caaatgttta tttaaaagag 540
caggccaggc gcggtggctc ccgctgtaa tcccagcact ttgggaggct gaggcgggtg 600
gatcacgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc gtctctacta 660
20 aaaatgcaaa aaaaattagc cgggcgtggt ggcaggcacc tgtagtccca gctactcggg 720
aggctgaggc aggagactgg cgtgaaccca ggaggcggac ctgtagtga gccgagatcg 780
cgccactgtg ctccagcctg ggcaacagag caagactcca tctcaaaaaa taaaaataaa 840
taaaaaataa aaaaataaaa gagcaacta tttccaata ccatagaata acttacataa 900
25 aagtaataa actgtattgt aagtagaagc tagcactgg 939

<210> 8

<211> 939

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

35 acagagtgga ataagacaga gacctgccct caagagcaaa gtagatcatg catagagtgt 60
gatgtatgtg taataaatat gtttcacaca aacaaggcct gtcagctaaa gaagtttgaa 120
40 catttgggtt actatctctt gtggttataa cttaatgaaa acaatgcagt acaggacata 180
tattttttaa aataagtctg atttaattgg gcactattta tttacaaatg ttttgctcaa 240
tagattgctc aaatcagggtt ttcttttaag aatcaatcat gtcagtctgc ttagaaataa 300
cagaagaaaa tagaattgac actgaaatct aggaaaatta ttctataatt tccatttact 360
45 taagacttaa tgagacttta aaagcatttt ttaacctcct aagtatcaag tatagaaaat 420
cttcatggaa ttcacaaagt aatttggaaa ttaggttgaa acatatctct tatcttacga 480
aaaaatggta gcatttttaa caaaatagaa agttgcaagg caaatgttta tttaaaagag 540
caggccaggc gcggtggctc ccgctgtaa tcccagcact ttgggaggct gaggcgggtg 600
50 gatcacgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc gtctctacta 660
aaaatgcaaa aaaaattagc cgggcgtggt ggcaggcacc tgtagtccca gctactcggg 720
aggctgaggc aggagactgg cgtgaaccca ggaggcggac ctgtagtga gccgagatcg 780
55 cgccactgtg ctccagcctg ggcaacagag caagactcca tctcaaaaaa taaaaataaa 840
taaaaaataa aaaaataaaa gagcaacta tttccaata ccatagaata acttacataa 900
aagtaataa actgtattgt aagtagaagc tagcactgg 939

60 <210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 312 990 T3

<400> 9

ggcggggggc gcacagagcc

5

<210> 10

<211> 22

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

15

gagatggagt cttgctctgt tg

2

20 <210> 11

<211> 21

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

30

acagagtgga ataagacaga g

21

<210> 12

35 <211> 21

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 12

ccagtgctag cttctactta c

21

45

<210> 13

<211> 425

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

55

Met Gly Pro Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Ala Cys Phe Ser Leu Cys
1 5 10 15

60

Gly Pro Leu Leu Ser Ala Arg Thr Arg Ala Arg Arg Pro Glu Ser Lys
20 25 30

65

ES 2 312 990 T3

Ala Thr Asn Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro
 35 40 45

5
 Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser
 50 55 60

10
 Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile Asn Lys Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80

15
 Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu Asp Ala Ser Gly Tyr Leu
 85 90 95

20
 Thr Ser Ser Trp Leu Thr Leu Phe Val Pro Ser Val Tyr Thr Gly Val
 100 105 110

25
 Phe Val Val Ser Leu Pro Leu Asn Ile Met Ala Ile Val Val Phe Ile
 115 120 125

30
 Leu Lys Met Lys Val Lys Lys Pro Ala Val Val Tyr Met Leu His Leu
 130 135 140

35
 Ala Thr Ala Asp Val Leu Phe Val Ser Val Leu Pro Phe Lys Ile Ser
 145 150 155 160

40
 Tyr Tyr Phe Ser Gly Ser Asp Trp Gln Phe Gly Ser Glu Leu Cys Arg
 165 170 175

45
 Phe Val Thr Ala Ala Phe Tyr Cys Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu
 180 185 190

50
 Met Thr Val Ile Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala Val Val Tyr Pro Met
 195 200 205

ES 2 312 990 T3

Gln Ser Leu Ser Trp Arg Thr Leu Gly Arg Ala Ser Phe Thr Cys Leu
 210 215 220

5
 Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ile Ala Gly Val Val Pro Leu Val Leu Lys
 225 230 235 240

10
 Glu Gln Thr Ile Gln Val Pro Gly Leu Asn Ile Thr Thr Cys His Asp
 245 250 255

15
 Val Leu Asn Glu Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Tyr Ala Tyr Tyr Phe Ser
 260 265 270

20
 Ala Phe Ser Ala Val Phe Phe Phe Val Pro Leu Ile Ile Ser Thr Val
 275 280 285

25
 Cys Tyr Val Ser Ile Ile Arg Cys Leu Ser Ser Ser Ala Val Ala Asn
 290 295 300

30
 Arg Ser Lys Lys Ser Arg Ala Leu Phe Leu Ser Ala Ala Val Phe Cys
 305 310 315 320

35
 Ile Phe Ile Ile Cys Phe Gly Pro Thr Asn Val Leu Leu Ile Ala His
 325 330 335

40
 Tyr Ser Phe Leu Ser His Thr Ser Thr Thr Glu Ala Ala Tyr Phe Ala
 340 345 350

45
 Tyr Leu Leu Cys Val Cys Val Ser Ser Ile Ser Ser Cys Ile Asp Pro
 355 360 365

50
 Leu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Ser Ser Glu Cys Gln Arg Tyr Val Tyr Ser
 370 375 380

55
 Ile Leu Cys Cys Lys Glu Ser Ser Asp Pro Ser Ser Tyr Asn Ser Ser
 385 390 395 400

60
 Gly Gln Leu Met Ala Ser Lys Met Asp Thr Cys Ser Ser Asn Leu Asn
 405 410 415

65
 Asn Ser Ile Tyr Lys Lys Leu Leu Thr
 420 425