



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 264**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01) **C12N 15/12** (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01) **A01K 67/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02801900 .8**

96 Fecha de presentación : **18.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1436327**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Familia de proteínas EE3 y secuencias de ADN correspondientes.**

30 Prioridad: **18.10.2001 DE 101 51 511**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2010

73 Titular/es: **Sygnis Bioscience GmbH & Co. KG.**
Im Neuenheimer Feld 515
69120 Heidelberg, DE

72 Inventor/es: **Schneider, Armin;**
Maurer, Martin;
Kuschinsky, Wolfgang;
Grünwald, Sylvia y
Gassler, Nikolaus

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

ES 2 342 264 T3

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

DESCRIPCIÓN

Familia de proteínas EE3 y secuencias de ADN correspondientes.

La presente invención se relaciona con

- (i) secuencias de ADN,
- (ii) vectores de expresión, que contengan secuencias de ADN conformes a la invención,
- (iv) células huésped, que presenten vectores de expresión conformes a la invención,
- (v) productos génicos, codificados por secuencias conformes a la invención,
- (vi) animales transgénicos modificados en lo que se refiere a secuencias conformes a la invención,
- (vii) anticuerpos dirigidos contra productos génicos conformes a la invención,
- (viii) procedimientos para la expresión y/o aislamiento de productos génicos conformes a la invención,
- (ix) el empleo de secuencias de ADN y/o productos génicos conformes a la invención como fármaco,
- (x) y (xi) empleos no-terapéuticos de secuencias de ADN y/o productos génicos conformes a la invención.

Gracias al estado actual de la técnica se conocen numerosas proteínas, que pertenecen a la clase de los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs). Se trata además de la mayor familia de moléculas superficiales, involucradas en la transducción de señales. Son activadas por una gran variedad de ligandos y otros estímulos, por ejemplo, luz (rodopsina), olores (receptores de odorantes), calcio, aminoácidos o aminas biogénicas, nucleótidos, péptidos, - y derivados, y diferentes polipéptidos. En los mamíferos, se basa en que existen aprox. 1500 proteínas diferentes de la clase de las GPCRs, codificando aprox. 1200 para receptores de olor, de sabor o de olores nasales. El número total de GPCRs “huérfanos” (o sea receptores, a los que no podía asignarse hasta ahora ninguna funcionalidad) se estima en 200-500 (Howard AD, McAllister G, proteína-coupled receptors and natural ligand discovery. *Textoremoscias farmacol Sci* 22:132-140.). En la *Caenorhabditis elegans*, las secuencias de GPCR componen aprox. un 5% del genoma y codifican para aprox. 1000 proteínas GPCR (Bargmann CI (1998) *Neurobiology of the Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282:2028-2033 y Bargmann CI, Kaplan JM (1998) Señal transducción en the *Caenorhabditis elegans* nervous System. *Annu Rev Neurosci* 21: 279-308).

Para la *Drosophila melanogaster* hay conocimientos gracias al estado actual de la técnica de que existen aprox. 200 secuencias de GPCR (Brody T, Cravchik A (2000) *Drosophila melanogaster* G proteína-coupled receptors. *J Cell Biol* 150:83-88). Se parte del hecho de que este gran grupo de moléculas topológicamente similares se ha desarrollado convergentemente, es decir, con el fin del acoplamiento a proteínas G.

La clase de las GPCRs se subdivide en 3 ó 4 familias según el estado actual de la técnica. La familia A tiene además la gran mayoría de miembros, a ellos pertenecen por ejemplo, también los receptores de odorantes (Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular base for odor recognition. *Cell* 65:175-187.). A la familia B pertenecen los receptores para secretina, VIP, y calcitonina. La familia C consiste en receptores como los receptores metabotrópicos del glutamato, los receptores del calcio, los receptores del GABA-B, los receptores del sabor, y los receptores de la feromona. Casi todas las denominadas secuencias “huérfanas” de GPCR pertenecen, sin embargo, a la familia A.

Una característica de las familias de GPCR es su transducción de señales a través de las proteínas G. El enlace de un ligando extracelular induce la activación de una proteína G, que reexpide entonces la señal. Hay aprox. 200 proteínas G diferentes, y cada tipo de célula puede tener otra dotación. La forma activa de una proteína G es la ligada al GTP, en estado inactivo la proteína G está ligada al GDP. La propia proteína G conlleva además su inactivación tras el enlace al GTP, ya que representa una GTPasa. Por tanto, la transducción de señales a través de proteínas G es siempre un acontecimiento transiente. Cada proteína G consiste en 3 subunidades, alfa, beta y gamma. Además, la subunidad alfa puede ligar al GTP y puede controlar, por tanto, considerablemente las moléculas de señalización de la parte inferior de la cascada de señales (“second messenger” systems - sistemas de segundo mensajero). La proteína G Gs, por ejemplo, activa (estimula) la adenilato ciclasa y conlleva así un aumento de la concentración del mensajero intracelular cAMP. La proteína G Gi inhibe la adenilato ciclasa, y la Gq activa a la fosfolipasa C (“segundo mensajero”: inositol-trifosfato y diacilglicerol). Otros sistemas segundo mensajero frecuentemente empleados son, por ejemplo, calcio, K, cGMP, y otros. Hay también proteínas G quiméricas. Las subunidades G beta y gamma pueden conducir asimismo a una transducción de señales, después de que se hayan desacoplado del complejo proteico trimérico, por ejemplo, posiblemente durante la activación de las rutas de señal de la MAP quinasa. La especificidad del acoplamiento a la proteína G de un determinado GPCR representa una importante característica farmacológica, que puede aprovecharse, entre otros, para el desarrollo del ensayo, típicamente con determinación de las variaciones de la concentración de las moléculas de señalización de la parte inferior de la cascada de señales, por ejemplo, calcio, cAMP o inositoltrifosfato. Sólo recientemente se ha encontrado en la literatura, con los resultados preliminares, también la observación de las ru-

tas de señal de la MAP quinasa, que pueden transferir asimismo señales de GPCR (Marinissen MJ, Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci 22:368-376.).

Finalmente es también en principio posible una transducción de señales independiente de la proteína G. así por ejemplo, modula la interacción directa del receptor de beta-2-adrenérgicos con la proteína NHERF la actividad de un intercambiador de Na/H (Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Sustancials RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S, Lefkowitz RJ (1998) The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na+/H+-exchanger regulatory factor to control Na+/H+ exchange. Nature 392:626-630).

Otra característica, que se aplica a muchos, cuando no a todos, los receptores de GPCR- son las oligomerizaciones. Especialmente interesantes son, en este contexto, las heterodimerizaciones entre diferentes GPCRs, que pueden modificar el perfil farmacológico y la especificidad de los ligandos (Bouvier M (2001) oligomerización of G-proteína-coupled transcentror receptores. Nat Rev Neurosci 2:274-286). Así funciona por ejemplo, el receptor de GABA-B sólo como heterodímero entre GBR1 y GBR2 (Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Aquírohardt G, Bach A, Granoau HC (1999) Role of heteromer formation en GABAB receptor funcion. Science 283:74-77). Una heterodimerización de este tipo describiría entretanto para una serie completa de GPCRs, por ejemplo, el mGluR5, el receptor de delta-opioide, y otros. Sólo recientemente se ha documentado en el caso de la preclampsia, que la elevada expresión de un participante en un par de heterodímeros de GPCR puede conducir a una enfermedad. Aquí conlleva la elevada expresión del receptor de Bradykinin-II una formación reforzada de Heterodímeros receptores de BradykininII-AngiotensinaII, cuya respuesta farmacológica modificada puede aclarar el fenotipo hipertónico (AbdAlla, Lother, Massiery y Quitterer, Nat. Medicine (2001), 7, 1003-1009).

Finalmente, en el caso de las proteínas de la clase GPCR se trata de una molécula diana farmacológica preferente. En el caso de las proteínas de la clase GPCR se afectan farmacológicamente más del 25% de los 100 medicamentos superventas (Flower *et al.*, 1999, Biochim. Biofys. Acta, 1422, 207-234). Así son particularmente agonistas y antagonistas para los siguientes grupos de receptores de mayor importancia farmacológica: el grupo de los adrenoreceptores, del receptor de la angiotensina-II, receptores de la serotonina, receptores de la dopamina, receptores de la histamina, receptores del leucotrieno/prostaglandina. Los fármacos, que en influyen estos receptores, cubren un espectro terapéuticamente amplio de enfermedades, enfermedades psiquiátricas (esquizofrenias, depresiones), o bien a través de su influencia sobre la hipertensión sanguínea incluyendo los medicamentos de emergencia para los casos de parada cardíaca. Ejemplos conocidos de medicamentos habituales, que influyen sobre estos receptores, son, por ejemplo, agonistas alfa adrenoreceptores (norfenefrina), agonistas beta-adrenoreceptores (isoprenalina, fenoterol), alfa-bloqueadores de adrenoreceptores (prazosina), beta-bloqueadores de adrenoreceptores (propanolol), antagonistas de 5-HT(ciproheptadina), bloqueador de receptores de H2 (cimetidina), bloqueador de receptores de H1 (terfenadina), agonistas de la dopamina (bromocriptina) y otros.

A pesar de los intensivos esfuerzos de investigación son sin embargo, las rutas de transducción de las señales, que quedan afectadas por los receptores, aún insuficientemente aclaradas. Por otra parte, hace falta una absoluta comprensión de la estructura compleja la influencia mutua de los diferentes sistemas de GPCR y su efecto sobre los procesos intracelulares enlazados hacia la parte inferior de la cadena de procesos, particularmente también con vista hacia los estados fisiológicos externos.

Un objeto de la presente invención es identificar otros miembros de la clase de las proteínas GPCR y sus secuencias de nucleótidos correspondientes. Es posible proporcionar procedimientos basados en las proteínas identificadas, que permitan desarrollar sustancias terapéuticamente efectivas, que puedan intervenir terapéuticamente en una patofisiología, originada, por ejemplo, mediante control de errores de la expresión y/o expresión de las variantes infuncionales, pero que también puede aparecer en caso de expresión fisiológica.

La presente invención resuelve estos objetos mediante los objetos de las Reivindicaciones 1 a 16. Particularmente quedan comprendidos conforme al descubrimiento todos aquellos incluidos en las secuencias complementarias en la doble hélice.

En otro modo de ejecución preferente se muestran secuencias de ADN, cuyo producto génico se codifica para un polipéptido, tal y como se reproduce en una de las Figuras 13 ó q5A, para las secuencias con los números 5 y/o 7A excepto un ácido nucleico conforme a la SEC ID No:75 de la WO 01/98353. También se muestran secuencias de la hélice de ADN complementaria. Se prefieren además las secuencias de ácidos nucleicos, particularmente las secuencias de ADN, que codifican para una proteína, con las secuencias conformes a la presente numeración 5 y 7 excepto un ácido nucleico conforme a la SEC ID No. 75 de la WO 01/98353. Tras el aislamiento y secuenciación, las secuencias de nucleótidos conformes a la invención, por ejemplo, conformes a las Figuras 9 o 11A o su equivalente funcional o disfuncional, como por ejemplo, variantes alélicas o isoformas, pueden obtenerse comercialmente. En el sentido de la presente invención se entiende por variantes alélicas aquellos variantes, que presentan preferentemente del 90 al 100% de homología a nivel de aminoácido. Los variantes alélicos abarcan particularmente aquellos variantes funcionales, obtenibles por supresión, inserción o sustitución de nucleótidos de secuencias de ee3- nativas, por ejemplo, de secuencias representadas conforme a las Figuras 9 o 11A, conservándose al menos aún una de las importantes propiedades biológicas.

Las secuencias de ADN homólogas o afines a la secuencia se pueden aislar de todas las especies de mamíferos u otras especies, incluidos los humanos, por procedimientos habituales mediante cribado de homología mediante

hibridación con una muestra de las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención o partes de éstas. Por equivalentes funcionales han de entenderse también los homólogos de las secuencias de ee3 nativas, por ejemplo, de las secuencias representadas en las Fig. 9 u 11A, por ejemplo, sus homólogos de otros mamíferos, secuencias abreviadas, ADN monocatenario o ARN de la secuencia de ADN codificadora o no-codificadora excepto un ácido nucleico conforme a la SEC ID No. 75 de la WO 01/98353. Estos equivalentes funcionales se pueden aislar de otros vertebrados no mamíferos, por ejemplo, partiendo de las secuencias de ADN representadas en las Fig. 9 u 11A o partes de estas secuencias, por ejemplo, con procedimientos habituales de hibridación o la técnica de PCR.

Una estructura de ácidos nucleicos conforme a la invención o un ácido nucleico conforme a la invención puede expresarse también en forma terapéuticamente o diagnósticamente apropiada. Para la generación de las proteínas recombinantes se pueden emplear sistemas de vectores u oligonucleótidos, que prolonguen los ácidos nucleicos o la estructura de ácidos nucleicos una determinada secuencia de nucleótidos y codifican, por tanto, para polipéptidos modificados, que sirven por ejemplo, para una purificación más simple, en este contexto se atribuye particularmente también a la prolongación mediante las secuencias arriba descritas.

Se prefieren además las secuencias de ADN, que contengan o correspondan a (c) secuencias de ADN de secuencias genómicas de ADN conformes a la invención.

Se muestran además conforme a la invención preferentemente todas las secuencias de ADN, que codifican para una proteína, que corresponde esencialmente a la secuencia de aminoácidos de las proteínas conformes a la invención con los números de secuencia 5, y/o 7A, excepto un ácido nucleico conforme a la SEC ID No: 75 de la WO 01/98353. Estas secuencias de ADN conservan sólo un bajo número de modificaciones frente a las secuencias indicadas en las figuras citadas anteriormente; por ejemplo, puede tratarse de isoformas. El número de modificaciones de secuencia no será típicamente mayor de 10. Estas secuencias de ADN, esencialmente con las secuencias de ADN apropiadas, codificadoras para las proteínas con los números de secuencia 5, y/o 7A, , que codifican igualmente para una proteína biológica activa, pueden obtenerse por el procedimiento de mutagénesis generalmente conocido e identificarse la actividad biológica de las proteínas codificadas por los mutantes por el procedimiento de cribado (screening), por ejemplo, estudio de enlaces o la capacidad para el desarrollo de la función biológica, por ejemplo, en relación con procedimientos neuronales o la apoptosis. A los procedimientos apropiados de mutagénesis pertenecen la mutagénesis sitio-dirigida, que prevé la síntesis efectuada automáticamente de un imprimador con al menos una modificación de base. Tras la reacción de polimerización se transfiere el vector heteroduplex a un sistema celular apropiado (por ejemplo, *E. coli*) y se aíslan los clones correspondientemente transformados.

La funcionalidad de las secuencias conformes a la invención está, entre otros, en relación directa con la identificación de los elementos muy distales de la cascada de señales activada por las proteínas conformes a la invención. En este contexto se comprobó, que las MAP quinasas son estimuladas por los receptores conformes a la invención. Además del empleo de ensayos de informe apropiados (ver ejemplo de ejecución), para la identificación de las MAP quinasas se pueden emplear alternativamente para estos propósitos también kits prefabricados (por ejemplo, Mercury *in vivo* kinase ensayo kits, Fa. Clontech). Se expresa además el represor tet en fusión con el dominio transactivador de una diana de fosforilación (factores de transcripción, por ejemplo, Jun). La activación de una construcción de luciferasa bajo control de un elemento represor tet se verifica sólo cuando se lleva a cabo una fosforilación específica del dominio transactivador mediante una quinasa. De este modo es posible la clasificación de la actividad de un receptor conforme a la invención de la familia ee3 o de una variante conforme a la invención en una ruta celular de transducción de señales.

La identificación de las secuencias conformes a la invención se basa entre otros, también en el conocimiento funcional de que la alta regulación de los ee3_1_m múridos conformes a la invención en un modelo animal con elevada expresión de EPO señala una implicación patofisiológica de este receptor en los procedimientos, que afectan a la supervivencia o a la adaptación de células a este estado. En consecuencia, son los receptores, conformes a la invención, los que tienen especial importancia farmacológica para enfermedades que van acompañadas de un reducido suministro de oxígeno, particularmente de un reducido suministro cerebral de oxígeno.

Por otra parte, entran en consideración todos los métodos familiares para el experto para la fabricación, modificación y/o detección de secuencias de ADN conformes a la invención, que pueden desarrollarse *in vivo*, *in situ* o *in vitro* (PCR (Innis *et al.* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications) o síntesis química. Mediante el apropiado imprimador de PCR se pueden introducir, por ejemplo, nuevas funciones en una secuencia de ADN conforme a la invención, como por ejemplo, interfases de restricción y codones de terminación. De este modo se pueden proyectar correspondientemente secuencias conformes a la invención en vectores de clonación para la transferencia.

Otro objeto de la presente invención se relaciona con vectores de expresión o una estructura recombinante de ácidos nucleicos, que contenga una secuencia de ácidos nucleicos conforme a la invención, como la descrita anteriormente, típicamente una secuencia de ADN. Más favorablemente se combinan en este contexto funcionalmente las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención con al menos un elemento genético de regulación, como por ejemplo, señales de transcripción y traducción. Este enlace puede conducir, en función del empleo deseado a una tasa nativa de expresión o también a un aumento y/o reducción de la expresión genética nativa. Con los vectores de expresión elaborados en tal medida se pueden transformar, a continuación, organismos huésped y/o las células huésped, por ejemplo, cultivos celulares de células de mamíferos.

En el caso del vector de expresión conforme a la invención se emplea(n) típicamente el(los) elemento(s) de regulación nativo(s), es decir, la, por ejemplo, región promotora y/o potenciadora del gen para una proteína conforme a la invención de la familia ee3, particularmente para una proteína con el número de secuencia 5, ó 7A, por ejemplo, de mamíferos, de manera particularmente apropiada secuencias de regulación humanas. Dado el caso, estas secuencias de regulación nativas indicadas anteriormente pueden estar también genéticamente modificadas, para dar lugar a una intensidad de expresión modificada. Adicionalmente a estas secuencias de regulación nativas indicadas anteriormente o en su lugar se pueden acoplar para otros genes elementos de regulación nativos antes o después de las secuencias de ADN conformes a la invención (secuencias de regulación 5'- o 3'-) y, si fuera necesario, también estar genéticamente modificados, de forma que la regulación natural bajo el control de las secuencias de regulación nativas indicadas anteriormente esté deshabilitada y la expresión de los genes pueda elevarse o reducirse - a voluntad - de este modo.

Las secuencias de regulación favorables para el procedimiento conforme a la invención están contenidas, por ejemplo, en promotores como cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- o en el promotor l-PL-, que se emplean más favorablemente en bacterias Gram negativas.. Otras secuencias de regulación favorables están contenidas, por ejemplo, en los promotores Gram positivos como amy y SPO2, en los promotores de levadura como ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH o en promotores de mamíferos como CaM-Kinase II, CMV, nestina, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, beta-globina, GFAP, GAP43, tirosin hidroxilasa, subunidad I del receptor de cainato, subunidad B del receptor de glutamato. En principio, se pueden emplear todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación como los, por ejemplo, citados anteriormente, para un vector de expresión conforme a la invención.

Por otra parte, pueden emplearse también favorablemente promotores sintéticos. Estas secuencias reguladoras deberían posibilitar la expresión acertada de las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención. Esto puede significar, por ejemplo, en función de organismo huésped, que el gen se exprese o sobreexpresa sólo tras la inducción, o que se exprese y/o sobreexpresa inmediatamente. Las secuencias y/o factores reguladores pueden afectar además positivamente, de manera preferente, la expresión y/o elevarla de este modo. Así puede realizarse un refuerzo de los elementos reguladores más favorablemente a nivel de transcripción, mientras se empleen fuertes señales de transcripción como promotores y/o “potenciador”. Además, es también posible, sin embargo, un refuerzo de la traducción, a medida que se mejora, por ejemplo, la estabilidad del ARNm.

Se designan como secuencias de regulación todos los elementos familiares al experto, que pueden influir, a nivel de transcripción y/o de traducción, la expresión de las secuencias conformes a la invención. Particularmente han de destacarse además así las secuencias de promotores denominadas secuencias de “potenciadores”, que pueden originarse a través de una interacción mejorada entre la ARN-polimerasa y el ADN y una elevada expresión. Como otras secuencias de regulación han de citarse ejemplarmente las denominadas “Locus Control Regions”, “Silencer” o respectivas secuencias parciales de estas. Estas secuencias se pueden emplear favorablemente para una expresión específica del tejido. También las denominadas secuencias terminadoras se encuentran más favorablemente en un vector de expresión conforme a la invención y se subsuman conforme a la invención bajo el término “secuencia de regulación”.

Un modo de ejecución preferente de la presente invención es el enlace de la secuencia de ácidos nucleicos conforme a la invención con un promotor, hallándose el promotor típicamente 5' “hacia arriba” de una secuencia de ADN conforme a la invención. Otras señales de regulación, como por ejemplo, 3'- situados como terminador, las señales de poliadenilización o potenciador, pueden estar contenidas funcionalmente en el vector de expresión. Por otra parte, las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención, para las proteínas apropiadas, pueden localizarse en una o varias copias en una construcción génica, según la invención, o también, dado el caso, localizarse en construcciones génicas independientes.

Bajo el término “vector de expresión” encuentran tanto las estructuras recombinantes de ácidos nucleicos y/o construcciones génicas, tal y como se ha descrito anteriormente, como también las construcciones vectoriales completas, que, además de las secuencias de ADN conformes a la invención y posibles secuencias de regulación, típicamente también pueden ser otros elementos. Estas construcciones vectoriales o vectores se emplean para la expresión en un organismo huésped apropiado. Más favorablemente se inserta al menos una secuencia de ADN conforme a la invención, por ejemplo, gen humano de la familia ee3, particularmente ee3_1 o ee3_2, o por ejemplo, una secuencia parcial de un gen tal, en un vector específico del huésped, que posibilita una expresión óptima de los genes en el huésped seleccionado. Los vectores son bien conocidos por el experto y se pueden extraer, por ejemplo, de “Cloning Vectors” (Eds. Pouwels P. H. *et al.* Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Por vectores han de entenderse, además de los plásmidos, también todos los demás vectores conocidos por el experto, como por ejemplo: fagos, virus como SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, virus Sindbis, transposones, elementos IS-, fasmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse autónomamente en el organismo huésped o replicarse cromosómicamente. Para la integración en los mamíferos se emplea típicamente ADN lineal.

La expresión de las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención puede elevarse favorablemente aumentando el número de copias génicas y/o reforzando los factores reguladores, que influyen positivamente en la expresión génica. Así puede realizarse un refuerzo de los elementos reguladores preferentemente a nivel de transcripción, a medida que se empleen señales de transcripción más fuertes, como promotores y potenciadores. Además resulta también, sin embargo, posible un refuerzo de la traducción, a medida que se mejora, por ejemplo, la estabilidad del ARNm o la eficiencia de lectura de este ARN en los ribosomas. Para el aumento del número de copias génicas se pueden incorporar las secuencias de ácidos nucleicos o genes homólogos, por ejemplo, en un fragmento de ácido nucleico y/o

en un vector, que contenga preferentemente las secuencias de genes regulatorias asignadas a los respectivos genes, o actividad promotora que actúe de manera análoga. Se emplean particularmente aquellas secuencias regulatorias, que refuercen la expresión génica.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención se pueden clonar junto con las secuencias codificadoras para las proteínas interactuadoras o para las proteínas potencialmente interactuadoras en un vector individual y expresarse, a continuación, *in vitro* en una célula huésped o *in vivo* en un organismo huésped. Alternativamente puede llevarse también cada una de las secuencias de ácidos nucleicos potencialmente interactuadoras y las secuencias de la familia ee3 codificadoras conformes a la invención, cada una, a un vector individual y llevar este por separado al respectivo organismo a través de los métodos habituales, como por ejemplo, transformación, transfección, transducción, electroporación o partícula-cañón (técnica de biobalística).

10 En otro modo de ejecución favorable puede haber al menos un gen marcador (por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos y/o genes que codifiquen para una proteína fluorescente, particularmente GFP) en un conforme vector de expresión a la invención, particularmente una construcción vectorial completa.

Otro objeto de la presente invención se relaciona con las células huésped, transformadas con una secuencia de ADN conforme a la invención y/o un vector de expresión conforme a la invención, particularmente una construcción vectorial. Como células huésped son, en principio, apropiadas todas las células, que permitan una expresión de las secuencias de ADN conformes a la invención (incluyéndose como derivado, por ejemplo, también sus alelos o equivalentes funcionales) aislado o en conjunto con otras secuencias, particularmente secuencias de regulación. Como células huésped entran en consideración todas las células pro- o eucariotas, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o animales. Las células huésped preferentes son las bacterias, como *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacilo* o *Pseudomonas*, microorganismos eucariotas, como *Aspergillus* o *Saccharomyces cerevisiae* o las levaduras de panadero habituales (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39, (1997)). Particularmente, para poder elaborar mayores concentraciones de proteínas conformes a la invención, sirven más favorablemente las levaduras metilotrofas, particularmente *Pichia pastoris*. Los receptores se clonan para ello en vectores de expresión apropiados, que permitan, por ejemplo, también la expresión como proteína de fusión con secuencias con “marcador” apropiadas para la purificación. Tras la electroporación de las levaduras se seleccionan finalmente clones estables. Una buena descripción del método, así como todos los medios necesarios para ello son comercializados por la empresa Invitrogen. A consecuencia, se pueden caracterizar funcionalmente los productos de expresión y, dado el caso, emplearse para el procedimiento de cribado conforme a la invención.

En un modo de ejecución preferente se seleccionan, sin embargo, células de organismos multicelulares para la expresión de las secuencias de ADN conformes a la invención. Esto se realiza también ante los antecedentes de una glicosilación posiblemente necesaria (N- y/o O-se unen) de las proteínas codificadas. Esta función puede implementarse en células eucariotas mayores - en comparación con las células procariotas - de manera apropiada. En principio, cada cultivo celular eucariota mayor está disponible como célula huésped, cuando se prefieran también totalmente células de mamíferos, por ejemplo, monos, ratas, hamsters o seres humanos. El experto conoce un gran número de líneas celulares estables. En una enumeración nada definitiva se citan las siguientes líneas celulares: 293T (línea celular renal embrionaria), (Graham *et al.*, J. Gen. Virol., 36:59 (1997)), BHK (células renales de cría de hamster), CHO (células de los ovarios de hamster), (Urlaub y Chasin, P. N. A. S. (USA) 77:4216, (1980)), HeLa (células humanas de carcinoma de cervix) y otras líneas celulares - particularmente estables para el empleo en laboratorio, como por ejemplo, CHO-, HeLa-, HEK293-, Sf9- o células COS-. Se prefieren de manera totalmente especial las células humanas, particularmente las células del sistema inmunológico o células adultas de variedad, por ejemplo, células de variedad de la sangre formando sistemas (de la médula). Las células humanas transformadas conformes a la invención, particularmente células autólogas del paciente, sirven tras (sobre todo *ex vivo*) la transformación con secuencias de ADN conformes a la invención o vectores de expresión conformes a la invención, muy especialmente como fármaco para, por ejemplo, propósitos terapéuticos génicos, o sea, tras la ejecución de una extracción celular, dado el caso, expansión *ex vivo*, transformación, selección y retransplante terminal.

Las proteínas de la familia ee3 conformes a la invención se pueden elaborar heterológicamente en células de insectos para la caracterización funcional y para su empleo para procedimiento de cribado. Ya que la concentración de proteínas G endógenas en las células de insectos es relativamente baja, así no han de comprobarse, por ejemplo, las proteínas Gi en el “Western Blot”, y las células de insectos no expresan generalmente al receptor a analizar, son especialmente apropiadas para la reconstitución *in vivo* de las rutas de transducción de señales de los receptores de la familia ee3 conformes a la invención. Los receptores de la familia ee3 son expresados en este caso por medio del sistema de expresión de Baculovirus en diferentes líneas celulares de los insectos, por ejemplo, Sf9, Sf21, Tn 368 o Tn High Five, o células MB. Para ello se elabora, por ejemplo, Baculovirus recombinantes con el Kit Baculo-Gold de Pharmingen y se infectan las líneas celulares de los insectos citadas anteriormente. Para analizar, conforme a la invención, el acoplamiento a las proteínas G, se efectúan co-Infecciones. Para ello se infectan las células con el virus receptor y adicionalmente incluso con los virus que expresan a las tres subunidades de proteína G y se efectúan los ensayos apropiados, por ejemplo, ensayos cAMP. Así, puede estudiarse la influencia de diferentes subunidades de proteína G sobre la actividad del receptor. Las células de insectos expresan los receptores o sus membranas que se pueden emplear asimismo en ensayos de cribado (screening). Las células de insectos pueden proliferar fácilmente en grandes concentraciones tanto en fermentadores como también en pistones vibrantes y son, por tanto, material de partida apropiado, para proporcionar material recombinante celular o de membrana tanto para el procedimiento de cribado como también para purificación de receptores.

La combinación de una célula huésped y un vector de expresión conforme a la invención adaptado a las células huésped, como plásmidos, virus o fagos, como por ejemplo, plásmidos con el sistema ARN-polimerasa/promotor, los fagos 1, Mu u otros fagos temperados o transposones, y/u otras secuencias reguladoras favorables, forman una célula huésped conforme a la invención, que puede servir como sistema de expresión. Son sistemas de expresión preferentes conforme a la invención, los basados en las células huésped conformes a la invención, por ejemplo, la combinación de células de mamíferos, como por ejemplo, células CHO, y vectores, como por ejemplo, vector pcDNA3neo, o por ejemplo, células HEK293 y vector CMV, que son especialmente apropiados para las células de los mamíferos.

Otro aspecto de la presente invención son los productos génicos de las secuencias de ADN conformes a la invención. En el sentido de esta invención se conocen por productos génicos tanto los transcritos primarios, o sea ARN, preferentemente ARNm, como también las proteínas y/o polipéptidos, particularmente en forma purificada. Estas proteínas regulan o transporten particularmente señales apoptóticas o necróticas, dado el caso también señales inflamatorias o señales concernientes al crecimiento celular o a la plasticidad celular. Un producto génico purificado puede contener un alelo, fragmento, análogo o derivado, funcionalmente homólogo o inhibidor de la función (afuncional), de esta secuencia o consistir en una secuencia de aminoácidos tal. Homología funcional se define en el sentido de de la presente invención como que se conserva al menos aún una de las importantes propiedades funcionales de las proteínas representadas conforme a las Figuras 13 o 15a.

Se entienden por derivados además particularmente aquellas secuencias de AS, alterado mediante modificaciones de sus cadenas laterales. Por ejemplo, mediante conjugación de un anticuerpo derivado, enzima o receptor a una secuencia del aminoácidos conforme a la invención, se pueden pero también el acoplamiento de un azúcar (a través de un enlace N- u O-glicosídico) o radical-(ácido)-graso (por ejemplo, ácido mirístico), de uno o también de varios grupo(s) fosfato y/o cualquier modificación de una cadena lateral, particularmente de un grupo OH libre o grupo NH₂ o en el término N- o C- de un oligo- o polipéptido conforme a la invención. Por otra parte, el término “derivado” engloba también a las proteínas de fusión, en las que una secuencia de aminoácidos conforme a la invención está unida a cualquier oligo- o polipéptido.

Se denominan “análogos” a las secuencias que se distinguen por al menos una modificación de los aminoácidos frente a la secuencia nativa (inserción, sustitución). En el contexto de la presente invención se prefieren aquellas sustituciones conservativas, en las que se conserva el carácter físico-químico (propiedades de llenado, basicidad, hidrofobicidad, etc) del aminoácido sustituido (aminoácido polar, cadena alifática larga, cadena alifática corta, aminoácido cargado negativa- o positivamente, aminoácido con grupo aromático). Las sustituciones pueden producir secuencias biológicamente funcionales o biológicamente disfuncionales. Por ejemplo se pueden intercambiar radicales arginina por radicales lisina, radicales valina por radicales isoleucina o radicales ácido aspártico por radicales ácido glutámico. Sin embargo, también se pueden sustituir, agregar o eliminar uno o varios aminoácidos en su secuencia, o se pueden combinar varias de estas medidas. Las proteínas modificadas en tal modo frente a las proteínas ee3 nativas, conformes a las Figuras 13, o 15A, poseen típicamente al menos un 90% de identidad de secuencia respecto a las secuencias en la Figuras citadas anteriormente, calculada por el algoritmo de Altschul *et al.* (J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990). La proteína aislada y sus variantes funcionales pueden aislarse más favorablemente del cerebro de mamíferos como *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* o *Mus musculus*. También los homólogos de otros mamíferos han de entenderse por variantes funcionales.

Conforme a la invención se prefieren los análogos, cuando la estructura secundaria, tal y como aparece en la secuencia nativa, se conserva también en ellos. Además de las sustituciones conservativas se pueden emplear también menos variaciones conservativas de aminoácido conforme a la invención en la secuencia nativa. Además, conservan típicamente su función biológica, particularmente como transductor de una señal apoptótica o necrótica o de una señal para la proliferación celular, plasticidad celular o crecimiento celular. El efecto de unir sustitución o supresión puede comprobarse sin la menor dificultad mediante las investigaciones apropiadas, ensayos de enlace o, por ejemplo, exámenes citotóxicos.

A los productos génicos conformes a la invención (proteínas) pertenecen pero también todos aquellos productos génicos (proteínas), derivados tras la transcripción y traducción de derivados de ADN, fragmentos de ADN o alelos de ADN conformes a la invención de las secuencias de ADN indicadas en las Figuras.

Por otra parte, las proteínas conformes a la invención pueden estar químicamente modificadas. Así puede existir quizás un grupo protector en el término N. Puede haber grupos glicosílicos adjuntos a grupos hidroxílicos o grupos amino, los lípidos pueden enlazarse covalentemente con la proteína conforme a la invención, asimismo grupos fosfato o acetílicos y similares. También cualesquiera sustancias, compuestos o grupos químicos pueden combinarse a la proteína conforme a la invención por cualquier ruta de síntesis. También aminoácidos adicionales, por ejemplo, aminoácidos en forma individual o en forma de péptidos o dominios en forma de proteína y similares, pueden combinarse con el término N- y/o C- de una proteína conforme a la invención.

Aquí se prefieren particularmente las denominadas secuencias de señales o secuencias “leader” en el término N- de la secuencia de aminoácidos de una proteína conforme a la invención, que conduzcan al péptido co-translacionalmente o post-translacionalmente a un determinado orgánulo celular o al área extracelular (y/o el medio de cultivo). En el término N- o C- pueden existir también secuencias de aminoácidos, que permitan como antígeno el enlace de la secuencia de aminoácidos, conformes a la invención, al anticuerpo. Aquí hay que nombrar particularmente el péptido bandera, cuya secuencia se indica en el código de una letra: DYKDDDDK. O también una His-Tag (etiqueta de

Histidina) con al menos 3, preferentemente al menos 6 radicales histidina. Estas secuencias tienen fuertes propiedades anfígenas y permiten, por tanto, una rápida verificación y fácil purificación de la proteína recombinante. Los anticuerpos monoclonales, que ligan al péptido bandera, son comercializados por la empresa Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut. Las secuencias parciales de la proteína conforme a la invención, compuesta por al menos 20, más preferentemente al menos 30 y aún más preferentemente al menos 50 aminoácidos, comprendiendo secciones parciales de las secuencias de ee3 nativas se pueden sintetizar por procedimientos familiares al experto, por ejemplo, químicamente y se pueden emplear preferentemente como anígenos para la producción de anticuerpos. Estas secciones parciales y/o sus derivados, alelos o fragmentos se tratan preferentemente de secuencias mostradas, que forman en el modelo espacial aquellas regiones, que constituyen, o al menos parcialmente, la superficie de la proteína en las secuencias de ee3 nativas conformes a la invención. Las secuencias parciales preferentes de al menos 20 aminoácidos de longitud abarcan, al menos, la fracción citoplasmática de las proteínas de la familia ee3 conformes a la invención. Presentan particularmente una fracción parcial conforme a la invención de al menos 20 aminoácidos de longitud de un péptido de las secuencias conformes a la invención conforme a la Figura 8 entre la posición 600 y la posición 752 (conforme a la Figura 8), por ejemplo, el péptido WWFGIRKDFCQFLLEIFPFLRE (Posiciones 609 a 630, 21 de aminoácidos de longitud).

Las secuencias de aminoácidos, por ejemplo, las secuencias de las proteínas humanas ee3_1 o ee3_2, presentan por otra parte, motivos secuenciales específicos, que se encuentran de nuevo también en forma similar en otros representantes de la clase GPCR. Así aparece, por ejemplo, una secuencia típica firma-triplete por debajo del ercer dominio transmembranario en las proteínas de la clase GPCR (secuencia con la continuación de secuencia DRY (aminoácidos en el código de una letra).

En la ee3_1 conforme a la invención se encuentra la continuación de secuencia DRI (posición 103-105) por debajo de TM3 (83-102) (conforme a la Figura 15A). En los representantes de la clase GPCR conocidos según el estado actual de la técnica (receptor de galanina-2-, receptor de C5a- (ratas), BK-2 (humano) o CXCR-5 (humano)) se encuentra la continuación de secuencia DRY o DRF en posiciones apropiadas.

Los animales transgénicos no-humanos representan otro objeto de la presente invención. Los animales transgénicos conforme a la invención son animales, que se modifican genéticamente, a tal efecto que, expresan y/o contienen una cantidad de un producto génico conforme a la invención alterado en comparación con los animales normales, en al menos un tejido (por ejemplo, mediante modificación del rango del promotor de un gen conforme a la invención) o contienen o expresan un producto génico modificado (por ejemplo, un derivado conforme a la invención de una proteína de la familia ee3, por ejemplo, también un fragmento). En este contexto son conformes a la invención también aquellos animales, que presentan la secuencia de ADN conforme a la invención nativamente existente (a) en el plano genético o bien parcialmente o en absoluto o (b) aunque presentan las secuencias de ADN conformes a la invención en el plano genético, estas no pueden, sin embargo, transcribirse y/o reducirse y por tanto, no contienen más el producto génico. Por otra parte, en un animal transgénico puede añadirse a las secuencias nativas conformes a la invención al menos una secuencia de ADN conforme a la invención y/o sustituirse por al menos una secuencia de ADN conforme a la invención. Particularmente en el caso de la(s) secuencia(s) sustituida(s) y/o agregada(s) puede tratarse de secuencias conformes a la invención, de naturaleza no nativa.

La fabricación de animales transgénicos y/o “noqueados” respecto a las secuencias conformes a la invención, particularmente ratones, ratas, cerdos, ganado vacuno, ovejas, moscas de la fruta (*Drosophila*), *C. elegans* o peces cebra, se lleva a cabo de manera familiar al experto para ello se expresa, por ejemplo, una secuencia de ADNc conforme a la invención o variante nativa o no nativa en ratones transgénicos, por ejemplo, bajo un promotor de NSE en las neuronas, bajo un promotor de MBP en las oligodendrocitas, etc. Los animales genéticamente modificados pueden estudiarse posteriormente en diversos modelos de enfermedad (por ejemplo apoplejías originadas experimentalmente). La fabricación de animales noqueados puede suministrar además indicaciones del efecto o repercusiones de los inhibidores en los organismos completos, ya que un “modelo noqueado” corresponde siempre a la inhibición de secuencias nativas conformes a la invención. Siempre puede emplearse un procedimiento de este tipo en un examen preclínico de sustancias inhibitoras conformes a la invención, por ejemplo, péptidos conforme a la invención, análogos a péptidos u otros pequeños compuestos orgánicos.

Todos los organismos multicelulares se pueden ejecutar conforme a la invención transgénicamente, particularmente los mamíferos, por ejemplo, ratones, ratas, ovejas, vacuno o cerdos. También pueden concebirse, en principio, las plantas transgénicas. Los organismos transgénicos pueden tratarse también de los denominados animales “noqueados”. Además, los animales transgénicos pueden contener una secuencia de ácidos nucleicos funcional o no funcional conforme a la invención o una estructura de ácidos nucleicos funcional o no funcional, aislado o en combinación con una secuencia funcional o no funcional, que codifique para proteínas conformes a la invención.

Una ordenación más amplia conforme a la invención de los animales transgénicos no-humanos descritos anteriormente, son los animales transgénicos, en cuyas células embrionarias o la totalidad o una parte de las células somáticas, las secuencia(s) de nucleótidos nativas de la familia ee3 conformes a la invención, particularmente las secuencias con los números 1 a 4), se modificaron mediante procedimientos o se interrumpieron acoplado elementos de ADN. Otra posibilidad de empleo de una secuencia de nucleótidos conforme a la invención o partes de la misma es la fabricación de animales transgénicos o noqueados o condicional o específicamente noqueados por regiones o de mutaciones específicas en animales modificados genéticamente (Ausubel *et al.* (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York y Torres *et al.*, (eds.) 1997, Laboratory protocols for conditional gene targeting, Oxford

University Press, Oxford). Por otra parte, se pueden plantear asimismo determinadas mutaciones, por ejemplo, modificaciones de los promotores o inserción de potenciadores, para, por ejemplo, producir proteínas ee3 constitutivamente activas en los animales transgénicos animales “noqueados”). También estos animales se pueden emplear, por ejemplo, conforme a la invención para suministrar modelos análogos en los estudios preclínicos para antagonistas potenciales de la función proteica ee3.

Acerca de sobreexpresión transgénica o mutación genética (mutación cero o supresiones, inserciones o modificaciones específicas) mediante homólogos recombinación en células embrionarias de variedad pueden elaborarse modelos animales, que proporcionan otras informaciones valiosas acerca de la pato-fisiología de las secuencias conformes a la invención. Los modelos animales así elaborados pueden suponen sistemas de ensayo esenciales para la evaluación de las nuevas terapias, que afectan a la función biológica de las proteínas conformes a la invención, particularmente de las proteínas con una de las secuencias 5 para los procesos neuronales, inmunológicos, proliferativos u otros.

Otro objeto de la presente invención es un anticuerpo, que reconoce un epítipo en un producto génico ee3 conforme a la invención, particularmente una proteína conforme a la invención conforme a las Figuras 13, o derivados, fragmentos o isoformas o alelos, pero también puede estar dirigido contra, por ejemplo, ARNm conforme a la invención. Del término “anticuerpo” comprende de la presente invención tanto a los anticuerpos policlonales como también a los monoclonales, quiméricos, anti-idiotípicos (dirigidos contra los anticuerpos conformes a la invención), que se encuentran todos en forma combinada o disuelta y, dado el caso, pueden marcarse con “etiquetas”, así como también los fragmentos de los anticuerpos citados anteriormente. Además de los fragmentos de anticuerpos conformes a la invención aislados, los anticuerpos pueden aparecer conforme a la invención también en forma recombinante como proteínas de fusión con otros componentes (proteicos). Los fragmentos como tales o los fragmentos de anticuerpos conformes a la invención como componentes de proteínas de fusión se elaboran típicamente por los métodos de descomposición enzimática, de síntesis proteica o métodos de recombinación familiares al experto. Se designan como anticuerpos según la presente invención tanto los anticuerpos o fragmentos de estos que sean monocadena policlonales, monoclonales, humanos o humanizados o también los anticuerpos sintéticos.

Los anticuerpos policlonales son mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpo, elaboradas a partir de sueros de animales, inmunizadas con un antígeno. Al objeto de la invención pertenecen, sin embargo, también los anticuerpos policlonales monoespecíficos, obtenidos tras la purificación de los anticuerpos (por ejemplo, a través de una columna, cargada con péptidos de un epítipo específico). Un anticuerpo monoclonal contiene una población esencialmente homogénea de anticuerpos, dirigidos específicamente contra los antígenos, teniendo los anticuerpos esencialmente los mismos puntos de enlace del epítipo. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por los procedimientos conocidos en el estado actual de la técnica (por ejemplo, Köhler y Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US Patente 4,376,110; Ausubel *et al.*, Harlow y Lane “anticuerpo”: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Ausubel *et al.*, (eds), 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York). La descripción contenida en los impresos citados anteriormente se incluye como componente de la presente invención en la revelación de la presente invención.

Anticuerpos conformes a la invención genéticamente manipulados se pueden elaborar también por procedimientos como los descritos en los impresos citados anteriormente. De manera abreviada, se extraen para ello células productoras de anticuerpos y el ARNm se aísla de las células de manera conocida a suficiente densidad óptica de las células por medio de lisis celular con tiocianato de guanidinio, acidificación mediante acetato sódico, extracción con fenol, clooformo/isoamilalcohol, precipitación mediante isopropanol y lavado con etanol. A continuación, se sintetiza con ayuda de la ADNc transcriptasa inversa a partir del ARNm. el ADNc sintetizado puede insertarse directamente o tras manipulación genética por ejemplo, mediante “mutagénesis sitio-dirigida”, guía de inserciones, inversiones, supresiones o intercambios de bases en vectores animales, fúngicos, bacterianos o virales apropiados y expresarse en los organismos huésped apropiados. Se prefieren los vectores bacterianos o Hefe como pBR322, pUC18/19, pACYC184, Lambda o Hefe-mu-vectores para la clonación del gen y la expresión de una bacteria como *E. coli* y/o en fúngicos como *Saccharomyces cerevisiae*. Los anticuerpos específicos contra las proteínas conformes a la invención pueden servir tanto como reactivos diagnósticos como también como terapéuticos en enfermedades, en las que las proteínas de la familia ee3 tienen importancia patofisiológica.

Los anticuerpos conformes a la invención pertenecen a una de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IdD, IgM, IgE, IgA, GILD y, dado el caso, a una subclase de las clases citadas anteriormente, como las subclases de la IgG o sus mezclas. Se prefieren las IgG y sus subclases, como por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgGM. Se prefieren especialmente los subtipos de IgG: IgG1/k o IgG2b/k. un clon celular híbrido, que produce anticuerpos monoclonales conformes a la invención, puede cultivarse *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La elaboración de grandes títulos de anticuerpos monoclonales se lleva a cabo preferentemente *in vivo* o *in situ*.

Los anticuerpos quiméricos conformes a la invención son moléculas, que contienen diferentes componentes, derivando éstos de diferentes tipos de animales (por ejemplo, anticuerpos, con una región variable, derivada de un anticuerpo monoclonal de ratón, y una región constante de una inmunoglobulina humana). Los anticuerpos quiméricos se emplean preferentemente para, por una parte, reducir la inmunogenicidad en la aplicación y, por otro lado, elevar el rendimiento en la producción para, por ejemplo, producir anticuerpos muridos monoclonales de mayores volúmenes de producción a partir de líneas celulares híbridas, aunque conducen también a una mayor inmunogenicidad en el ser humano, de forma que los anticuerpos quiméricos humanos/muridos se emplean preferentemente. Los anticuerpos

quiméricos y los procedimientos para su fabricación se conocen gracias al estado actual de la técnica (Cabilly *et al.*, Porc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison *et al.* Porc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne *et al.* Nature 312 643-646 (1984); Cabilly *et al.*, EP-A-125023; Neuberger *et al.*, Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi *et al.*, EP-A-171496; Morrison *et al.*, EP-A-173494; Neuberger *et al.*, DONDE 86/01533; Kudo *et al.*, EP-A-184187; Sahagan *et al.*, J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson *et al.*, DONDE 87/02671; Liu *et al.*, Porc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun *et al.*, Porc. Natl. Acad. Sci USA 84:214218 (1987); Better *et al.*, Science 240: 1041-1043 (1988) y Harlow y Lane, anticuerpo: A Laboratory Manual, como se ha citado antes. Estas referencias se incluyen en la presente invención como pertenecientes a la revelación.

Se prefiere de manera totalmente especial un anticuerpo, conforme a la invención, tal sea contra una fracción extracelular en una proteína ee3 conforme a la invención, particularmente una proteína conforme a las Figuras 13, u orientada como epítipo. Los anticuerpos conformes a la invención, en todas las variaciones como se ha mostrado anteriormente, se pueden emplear para la inhibición de las proteínas de la familia ee3 conformes a la invención, por ejemplo, *in vitro* para estudios experimentales, *in situ* para, por ejemplo, propósitos de marcado o también *in vivo* para la aplicación terapéutica, en la que se inyectan, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraarterial o intramuscular.

Un anticuerpo anti-idiotípico conforme a la invención es un anticuerpo, que reconoce un determinante, asociado generalmente con la posición de enlace de los antígenos de un anticuerpo conforme a la invención. Un anticuerpo anti-idiotípico puede elaborarse mediante la inmunización de un animal de un mismo tipo y del mismo tipo genético (por ejemplo, de una variedad de ratón) como punto final para un anticuerpo monoclonal, contra el que se orienta un anticuerpo anti-idiotípico conforme a la invención. El animal inmunizado reconoce el determinante idiotípico del anticuerpo inmunizante mediante de producción de un anticuerpo, que se orienta contra el determinante idiotípico (o sea un anticuerpo anti-idiotípico conforme a la invención), (U.S. 4,699,880). Un anticuerpo anti-idiotípico conforme a la invención puede emplearse también como inmunogen, para estimular una respuesta inmune en otro animal para conducir entonces a la producción del denominado anticuerpo anti-anti-idiotípico. El anticuerpo anti-anti-idiotípico puede, pero no tiene que, ser idéntico al anticuerpo monoclonal original respecto a su estructura epitópica, que ha producido la reacción anti-idiotípica. De este modo se pueden identificar mediante el empleo de anticuerpos dirigidos contra determinantes idiotípicos de un anticuerpo monoclonal, otros clones que expresan los anticuerpos de idéntica especificidad.

Los anticuerpos monoclonales, dirigidos contra proteínas conformes a la invención, análogos, fragmentos o derivados de estas proteínas conformes a la invención, se pueden utilizar para inducir el enlace de anticuerpos anti-idiotípicos en los animales apropiados, como por ejemplo, el ratón BALB/c. Las células de un ratón así inmunizado se pueden emplear para producir líneas celulares híbridas anti-idiopáticas, que secretan anticuerpos monoclonales anti-idiopáticos. Además, los anticuerpos monoclonales anti-idiopáticos se pueden unir también un soporte (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") y emplearse entonces para inmunizar a otros ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones contienen entonces anticuerpos anti-idiotípicos, que tienen las propiedades del enlace del anticuerpo monoclonal original y son específicos para un epítipo de la proteína conforme a la invención o de un fragmento o derivado de los mismos. Los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos tienen de este modo sus propios epítopes idiotípicos o "I-idiotopos", estructuralmente similares al epítipo a analizar.

La designación "anticuerpo" debería abarcar tanto las moléculas intactas como también los fragmentos de las mismas. Como fragmentos han de citarse todos los fragmentos de anticuerpo abreviados o modificados con uno o dos puntos de enlace complementarios a los antígenos, como partes de anticuerpo con un punto de enlace apropiado al anticuerpo, formado por cadenas ligeras y más pesadas, como fragmentos Fv-, Fab- o F(ab')₂- o fragmentos de una cadena. Se prefieren los fragmentos abreviados de doble cadena como los fragmentos Fv-, Fab- o F(ab')₂. Fab y F(ab')₂- no cuentan con un fragmento Fc-, tal y como existen quizás en un anticuerpo intacto, de forma que se puedan transportar más rápidamente al circuito sanguíneo y tengan comparativamente menos enlaces de red no específicos que los anticuerpos intactos. En este contexto, debemos mencionar que los fragmentos Fab- y F(ab')₂- de los anticuerpos conformes a la invención, asimismo como estos mismos, pueden emplearse en la detección (cualitativa) y cuantificación de las proteínas conformes a la invención (dado el caso también para la detección de la actividad proteica (por ejemplo, fosforilaciones específicas) de las proteínas conformes a la invención), por cuyo motivo también procedimientos para la determinación cualitativa y cuantitativa y/o para la cuantificación de la actividad proteica de las proteínas conformes a la invención son objeto de la presente invención.

Estos fragmentos se elaboran típicamente mediante descomposición proteolítica, empleándose enzimas, como por ejemplo, papaína (para la fabricación de fragmentos Fab-) o pepsina (para la fabricación de fragmentos F(ab')₂), emplearse, u obteniéndose mediante oxidación química o mediante manipulación genética de los genes de anticuerpos.

Objeto de la presente invención son también las mezclas de anticuerpos en el sentido de la presente invención. Además de los anticuerpos se pueden emplear también mezclas de anticuerpos para todos los procedimientos o empleos descritos conforme a la presente invención. Tanto las fracciones purificadas de anticuerpos monoclonales, policlonales o mezclas de anticuerpos monoclonales se emplean como fármaco y en la fabricación de fármacos para el tratamiento de isquemias cerebrales (por ejemplo, apoplejías), enfermedades degenerativas, particularmente enfermedades neurodegenerativas, y enfermedades neurológicas, como por ejemplo, epilepsia.

Los anticuerpos conformes a la invención, incluyendo los fragmentos de estos anticuerpos, y/o sus mezclas se pueden emplear en una muestra para la detección cuantitativa o cualitativa de productos génicos conformes a la invención, particularmente proteínas conformes a las Figuras 13, o sus fragmentos o derivados, o también para la detección de células, que expresen y dado el caso, secreten las proteínas conformes a la invención. Siempre se muestra el empleo de anticuerpos conformes a la invención a modo de diagnóstico. Así puede determinarse aproximadamente a través de los anticuerpos conformes a la invención la cantidad de producto génico conforme a la invención y, entre otros, su actividad (por ejemplo, fosforilaciones específicas), por ejemplo, de las proteínas conformes a las Figuras 13. La detección puede efectuarse con ayuda de un procedimiento de inmunofluorescencia, de los anticuerpos marcados por la fluorescencia, en combinación con fotomicroscopía, flujocitometría o detección fluorométrica.

Los anticuerpos conformes a la invención (esto incluye los fragmentos de estos anticuerpos o también las mezclas de anticuerpos) sirven para las investigaciones histológicas, como por ejemplo, en el contexto de la inmunofluorescencia o inmunoespectrometría electrónica, para la detección *in situ* de una proteína conforme a la invención. La detección *in situ* puede realizarse tomando una muestra histológica de un paciente y añadiendo a esta muestra un anticuerpo marcado conforme a la invención. El anticuerpo (o un fragmento de este anticuerpo) se aplica en forma marcada a la muestra biológica. De este modo no es sólo posible determinar la presencia de proteínas conformes a la invención en la muestra, sino también la distribución de la proteína conforme a la invención en el tejido analizado. La muestra biológica puede ser un líquido biológico, un extracto de tejido, cultivos celulares, como por ejemplo, células inmunológicas o células musculares cardíacas o del hígado, o generalmente células, incubadas en un cultivo de tejido. La detección del anticuerpo marcado puede realizarse por procedimientos conocidos en el estado actual de la técnica (por ejemplo, por procedimientos de fluorescencia), a semejanza del marcado. La muestra biológica puede aplicarse, sin embargo, también sobre un soporte sólido, como por ejemplo, nitrocelulosa u otro material portador, de forma que las células, partes de células o proteínas solubles queden inmovilizadas. El soporte puede lavarse entonces con un tampón apropiado una o varias veces, tratándose a continuación con un anticuerpo marcado conforme a la presente invención. El soporte sólido puede lavarse entonces una segunda vez con el tampón para eliminar los anticuerpos no combinados. La cantidad de marcador combinado sobre el soporte sólido puede determinarse entonces por un procedimiento habitual.

Como soporte sirven particularmente vidrio, poliestirol, polipropileno, dextrano, nylon-amilasas, celulosas naturales o modificadas, poliacrilamidas y magnetita. El soporte puede tener carácter condicionalmente soluble o insoluble, para desempeñar las condiciones conformes a la presente invención. El material portador puede adoptar cualquier forma, por ejemplo, tener forma de bolitas ("beads"), o cilíndrica o esférica, prefiriéndose las bolitas de poliestirol como soporte.

Un marcado de anticuerpos detectable puede realizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, puede combinarse el anticuerpo a una enzima, pudiendo emplearse la enzima finalmente en un ensayo inmunológico (EIA). La enzima puede reaccionar entonces después con un sustrato apropiado, de forma que se origine un compuesto químico, que puede detectarse de una manera familiar al experto y, dado el caso, cuantificarse, por ejemplo, mediante espectrofotometría, fluorometría u otro procedimiento óptico. La enzima puede ser: malato-deshidrogenasa, estafilococos-nucleasa, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol-deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato-deshidrogenasa, triosa-fosfatoisomerasa, peroxidasa del rábano picante-, fosfatasa alcalina, aspariginasa, glucosa-oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, glucoamilasa o acetilcolinesterasa. La detección se posibilita entonces sobre un sustrato cromogéneo, específico para la enzima empleada para el marcado, y puede realizarse finalmente, por ejemplo, a través de comparación visual del sustrato transformado por la reacción enzimática, en comparación con los estándares de control.

La detección puede garantizarse mediante otros ensayos inmunológicos, por ejemplo, por marcado radiactivo de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (o sea mediante un ensayo radioinmunológico (RIA; Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T. *et al.* North Holland Publishing Company, New York (1978)). El isótopo radioactivo puede detectarse y cuantificarse además mediante el empleo de contadores de escintilación o mediante autoradiografía.

Los compuestos fluorescentes se pueden utilizar igualmente para el marcado, por ejemplo, compuestos como Fluorescina-isotiocianato, Rodamina-, fioeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. También pueden emplearse metales emisores de fluorescencia, como por ejemplo, 152E u otros metales del grupo de los lantánidos. Estos metales se acoplan a los anticuerpos por medio de grupos quelato, como por ejemplo, ácido dietilentriaminpentacético (ETPA) o EDTA. Además, el anticuerpo conforme a la invención puede acoplarse a través de un compuesto que actúa con ayuda de la quimiluminiscencia. La presencia del anticuerpo marcado por quimiluminiscencia se detecta entonces por medio de la luminiscencia originada en el transcurso de una reacción química. Ejemplos de estos compuestos son luminol, isoluminol, éster de acridinio, imidazol, sal de acridinio o éster de oxalato. Del mismo modo se pueden emplear también compuestos bioluminiscentes. La bioluminiscencia es un subtipo de quimiluminiscencia, que se encuentra previamente en los sistemas biológicos, reforzando una proteína catalítica la eficiencia de la reacción quimiluminiscente. La detección de la proteína bioluminiscente se lleva a cabo, por otra parte, por medio de la luminiscencia, entrando en consideración como compuesto bioluminiscente, por ejemplo, luciferina, luciferasa o aequorina.

Un anticuerpo conforme a la invención puede utilizarse para el empleo en un ensayo inmunométrico, también conocido como ensayo “two-site” o “sandwich”. Los sistemas típicos de ensayo inmunométrico abarcan los denominados ensayos “hacia delante”, que se distinguen porque los anticuerpos conformes a la invención están combinados con un sistema en fase sólida y porque los anticuerpos se ponen en contacto de este modo con la muestra que se analiza. De este modo se aísla el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo binario fase sólida-anticuerpo-antígeno. Tras un tiempo de incubación apropiado, se lava el soporte sólido, para eliminar los restos de líquidos remanentes, incluyendo el antígeno, dado el caso, no combinado, y se pone en contacto, acto seguido, con una disolución, que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo de detección marcado. El anticuerpo marcado sirve, en este contexto, como la denominada molécula informadora. Tras un segundo tiempo de incubación, que permite al anticuerpo marcado asociarse con el antígeno combinado a la fase sólida, se lava nuevamente el soporte sólido, para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

En una forma alternativa de ensayo puede emplearse también un ensayo denominado “sandwich” En este contexto puede bastar un único paso de incubación, cuando los anticuerpos combinados a la fase sólida y los anticuerpos marcados se apliquen simultáneamente sobre la muestra a examinar. Tras la conclusión de la incubación se lava el soporte sólido para eliminar los residuos de la muestra líquida y anticuerpos marcados no asociados. La presencia de anticuerpos marcados sobre el soporte sólido se determina exactamente, del mismo modo que en los ensayos sándwich “hacia delante” convencionales. En el denominado ensayo inverso se añade una disolución del anticuerpo marcado a la muestra líquida, seguido de la mezcla de anticuerpo no marcado, combinado a un soporte sólido, tras el transcurso de un tiempo de incubación apropiado. Tras un segundo paso de incubación se lava el soporte sólido de manera habitual, para liberarlo de sobrantes de muestra y de anticuerpo marcado que no haya reaccionado. La determinación del anticuerpo marcado, que ha reaccionado con el soporte sólido, se efectúa entonces, así como la descrita anteriormente.

Conforme a la presente invención se muestran además los procedimientos para la expresión de productos génicos de ee3 conformes a la invención, particularmente incluso de los polipéptidos conformes a las Figuras 13, o incluyendo a todos los derivados, análogos y fragmentos, transformándose para ello las células huésped con un vector de expresión conforme a la invención, excepto un polipéptido conforme a la SEC ID No:31 de la U0 01/98353.. Este procedimiento para la expresión de productos génicos, basados en una secuencia de ADN conforme a la invención, no sirve para concentrar y limpiar el producto génico apropiado, sino antes bien, para influir sobre el cambio de celulosa mediante la inserción de las secuencias de ADN conformes a la invención a través de la expresión del producto génico correspondiente. Aquí se hace particularmente referencia al empleo de las células huésped transformadas con la ayuda de los vectores de expresión como fármaco y/o para la fabricación de un fármaco, particularmente con el propósito del tratamiento de enfermedades, por ejemplo, de enfermedades tumorales, enfermedades neurológicas, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis múltiple, parkinson mórbido) isquemias cerebrales (por ejemplo, apoplejía). conforme a la invención, las células huésped se proporcionan generalmente en enfermedades, basadas en una regulación errónea de la aptosa, de la necrosis, del crecimiento celular, de la división celular, de la diferenciación celular o de la plasticidad celular. Las células huésped análogas o alogénas transformadas *ex vivo* de tal manera conforme a la invención pueden transplantarse entonces a los pacientes.

Conforme a otro aspecto de la presente invención se describe un procedimiento para el aislamiento de productos génicos con al menos uno con las secuencias de aminoácidos conformes a la invención, transformándose las células huésped con un vector de expresión conforme a la invención y cultivándose entonces en condiciones apropiadas, favorecedoras de la expresión, de forma que el producto génico pueda purificarse finalmente a partir del cultivo. El producto génico conforme a la invención de la secuencia de ADN conforme a la invención puede aislarse además, en función del sistema de expresión, a partir de un medio de cultivo o de extractos celulares. El experto puede distinguir sin la menor dificultad, que los respectivos métodos de aislamiento y el procedimiento durante la depuración de la proteína recombinante codificada por un ADN conforme a la invención dependen fuertemente del tipo de célula huésped o también de la condición de si la proteína se secreta en el medio. Por ejemplo, se pueden emplear sistemas de expresión que conlleven la secreción de la proteína recombinante desde la célula huésped. El medio de cultivo se tiene que concentrar en este caso mediante filtros de concentración proteica comerciales, por ejemplo, Amicon o Millipore Pelicon. Tras el paso de concentración puede realizarse un paso de purificación, por ejemplo, un paso de filtración en gel o una purificación con ayuda de métodos cromatográficos de columna. Alternativamente puede emplearse, sin embargo también un intercambiador aniónico, que tenga una matriz con DEAE.

Como matriz sirven además todos los materiales conocidos de la purificación proteica, por ejemplo, acrilamida o agarosa o dextrano o similares. Sin embargo, pueden emplearse también intercambiadores catiónicos, que contengan entonces típicamente grupos carboximetilo. Para la purificación ulterior de un polipéptido codificado por un ADN conforme a la invención pueden servir entonces pasos de HPLC. Puede tratarse de uno o varios pasos. Se emplea particularmente el método de “fase reversa”. Estos pasos sirven para la obtención de una proteína recombinante esencialmente homogénea de una secuencia de ADN conforme a la invención.

Además de los cultivos celulares bacterianos, para el aislamiento del producto génico se pueden emplear también células de levadura transformadas. En este caso puede secretarse la proteína traducida, de forma que se simplifique la purificación proteica. La proteína recombinante secretada puede obtenerse de una célula huésped de levadura mediante métodos, como los mostrados en Urdal *et al.* (J. Chromato. 296:171 (1994)) y que son componentes de la revelación de la presente invención.

Las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención, particularmente las secuencias de ADN conformes a la invención, y/o productos génicos conformes a la invención se pueden emplear como fármacos y/o para la fabricación de un fármaco. Estos se pueden administrar como tales (por ejemplo, oralmente, por vía intravenosa, oral, parenteral, nasal, subcutánea) o en combinación con otros aditivos activos, auxiliares o farmacológicamente típicos. El ácido nucleico conforme a la invención puede inyectarse como ácido nucleico desnudo, particularmente por vía intravenosa, o administrarse, por el contrario, al paciente con ayuda de vectores. Estos vectores pueden ser plásmidos como tales, pero también vectores virales, particularmente retrovirales o adenovirales, o también liposomas, que pueden presentar ADN desnudo conforme a la invención o un plásmido, que contenga ADN conforme a la invención.

El empleo de las secuencias conformes a la invención, y/o sus variantes, así como heterómeros proteicos conformes a la invención, así como reactivos conformes a la invención derivados de estos (oligonucleótidos, anticuerpos, péptidos) entra en consideración, por tanto, para la fabricación de un fármaco para propósitos terapéuticos, es decir, para el tratamiento de enfermedades. Se prefiere además de manera totalmente especial el empleo terapéutico para el tratamiento y/o para la fabricación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades o estados patofisiológicos, basados en la regulación erróneamente dirigida de la hemostasis de los acontecimientos de muerte celular y proliferación.

En este contexto resulta particularmente efectivo también el conocimiento conforme a la invención de que la EPO, cuyo efecto se atribuye a la modificación del comportamiento de transcripción de las células, induce de manera directa o indirecta la regulación transcripcionalmente alta de los receptores conformes a la invención, por ejemplo, ee3_1. Los receptores conformes a la invención procuran, por tanto, el efecto de la EPO y tienen, por tanto, también una importancia crítica para las enfermedades relacionadas con ello. Esto significa, entre otros, que los receptores conformes a la invención pueden influir selectivamente en determinados efectos de la EPO, por ejemplo, un efecto neuroprotector (por ejemplo, en enfermedades neurodegenerativas), siendo, por ejemplo, la activación del factor de transcripción NF-kappaB un paso importante en el efecto neuroprotector de la EPO), o un aumento del rendimiento cerebral, (por ejemplo, en demencias). Las investigaciones apropiadas en experimentos con animales pueden una adscripción funcional de los objetos conformes a la invención en modelos de enfermedades neurológicas como isquemias cerebrales, encefalomielitis experimentalmente inducidas o hemorragias subaracnoideas.

Esto es deseable para estos efectos parciales, ya que la dosis de EPO además del efecto neuroprotector, originaría un aumento del hematocrito, que contrarrestaría en parte el efecto neuroprotector, ya que se empeorarían las propiedades reológicas de la sangre, lo que repercute negativamente en la microcirculación, tal y como se ha mostrado en ratones con sobreexpresión de eritropoetina (Wiessner *et al.*, 2001, J Cereb Blood Flow Metab, 21, 857-64).

Por eso entra en consideración el empleo de objetos conformes a la invención, por ejemplo, secuencias de nucleótidos, oligo- o polipéptido, vectores de expresión, o las células huésped conformes a la invención particularmente para la fabricación de fármacos para el tratamiento neurológico, particularmente de enfermedades neurodegenerativas.

Mediante el empleo conforme a la invención se puede influir sobre los procesos de muerte celular, por ejemplo, cascadas que conduzcan a la apoptosis, o procesos que conlleven la necrosis, en todos los tipos de células, que expresen proteínas de la familia ee3 conformes a la invención o una variante nativa de las mismas, particularmente en células neuronales, por ejemplo, mediante modulación de las interacciones intercelulares, particularmente aquellas en las que intervengan proteínas unidas a su proteína G.

Las proteínas nativas conformes a la invención, particularmente las proteínas citadas en las reivindicaciones son, como los receptores, componente conforme a la invención de las rutas intracelulares de transducción de señales, típicamente como inicio de una cascada de señales, siendo su control de errores casual para un gran número de enfermedades. Si las proteínas conformes a la invención citadas anteriormente vuelven a encontrarse particularmente como componentes en los siguientes pasos celulares y presentan funciones celulares, por ejemplo, en: transducción de señales en general, con efecto sobre la diferenciación celular, división celular, crecimiento, plasticidad, regeneración, diferenciación celular, proliferación o muerte celular. Correspondientemente, puede activarse un estado patofisiológico típicamente mediante la infuncionalidad de ee3_1 o ee3_2, o mediante expresión infuncional o mediante sobreexpresión del mismo, que va acompañado de un control de errores, por ejemplo, de la diferenciación celular, del crecimiento celular, de la plasticidad celular o de la regeneración celular. Por otro lado, otros mecanismos pueden conllevar también estados patofisiológicos, por ejemplo, una afuncionalidad o una sobrefuncionalidad del/de los ligando/s nativo/s de receptores de ee3 conformes a la invención. En función del mecanismo molecular del trastorno patofisiológico, puede ser deseable para propósitos terapéuticos la dosis de proteínas funcionales conformes a la invención o al menos una mayor expresión del mismo o una inhibición de las proteínas afuncionales sobreexpresadas celularmente o expresadas. Se prefiere de manera totalmente especial el empleo de las secuencias conformes a la invención, particularmente de las secuencias con los números 1, 3, 5, en relación con su función en los casos de muerte celular, excitación y neurogénesis. de estos conocimientos conformes a la invención se deduce el empleo de las secuencias conformes a la invención (secuencias de nucleótidos y de aminoácidos), así como los derivados apropiados (por ejemplo, péptidos, oligonucleótidos o anticuerpos) para la fabricación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades tumorales y enfermedades neurológicas, particularmente estados isquémicos (apoplejía), esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo, parkinson mórbido, esclerosis lateral amiotrófica, ataxias heredo degenerativas, neuropatías, Huntington mórbido, epilepsias y Alzheimer mórbido. Debido a la alta regulación en el caso de la eleva-

da expresión de eritropoetina-, entra en consideración, por otra parte, el empleo de objetos conformes a la invención para todos los procesos patológicos, en los que la EPO tiene un papel (protector) (por ejemplo, la apoplejía, y todos los tipos de hipoxias agudas y crónicas).

5 Para llegar a otras indicaciones basadas en las relaciones moleculares, resultan apropiados los ensayos HTS de base celular para la activación funcional del receptor, medida mediante complementación enzimática, como. El ensayo se basa en el mecanismo general de regulación de GPCRs y mide la interacción entre el receptor activado y la beta-arrestina. Para ello se fusionan fragmentos inactivos de beta-galactosidasa complementarios al término C del receptor y a beta-arrestina. Mediante la activación del receptor se recluta beta-arrestina. De este modo se unen las dos mitades
10 de la, beta-galactosidasa, de forma que se forme una enzima de beta-galactosidasa funcional, que puede transformarse en los sustratos apropiados, que sirven como señal de medida (sistema ICAST). En principio, este ensayo puede efectuarse con todas las enzimas, que pueden expresarse como proteínas de fusión de dos mitades complementarias y realizar una reacción de sustrato comprobable mediante métodos habituales de medida.

15 En relación con el empleo terapéutico de las secuencias conformes a la invención, se emplea una secuencia de ácidos nucleicos o proteínas conforme a la invención para la genoterapia en mamíferos, por ejemplo, en seres humanos y/o también estos procedimientos genoterapéuticos. La genoterapia comprende además todas las formas de terapia, que aporten o bien secuencias conformes a la invención conformes a una de las Reivindicaciones 1 a 3 en el cuerpo o partes del mismo, por ejemplo, tejidos individuales, o afecten a la expresión de las secuencias conformes a la invención. Para
20 ello pueden emplearse todas las modificaciones familiares al experto en el contexto de la genoterapia, por ejemplo, oligonucleótidos, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido o híbrido-ARN-ADN, con cualquier modificación, que contenga las secuencias conformes a la invención. se pueden utilizar asimismo estructuras virales, conteniendo una secuencia conforme a la invención (esto abarca todas las variantes, como fragmentos, isoformas, alelos, derivados). También entran en consideración las secuencias de ADN desnudas apropiadas conformes a la invención, en el contexto de la genoterapia. Asimismo se pueden utilizar secuencias de ácidos nucleicos con actividad enzimática (por ejemplo, ribozimas) para propósitos genoterapéuticos.

Además de los empleos terapéuticos, entran también en consideración los empleos diagnósticos de ácidos nucleicos o polipéptidos conformes a la invención, heterómeros proteicos conformes a la invención, así como reactivos
30 derivados de estos conformes a la invención (oligonucleótidos, anticuerpos, péptidos), por ejemplo, para el diagnóstico de enfermedades humanas o de predisposiciones genéticas, por ejemplo, también en el contexto de las pruebas de embarazo. Estas enfermedades o predisposiciones son particularmente las enfermedades citadas anteriormente en relación con los usos terapéuticos, especialmente enfermedades neurológicas, inmunológicas o tumorales. Estos procedimientos diagnósticos se pueden ejecutar como procedimientos *in vivo*, aunque típicamente como procedimientos *ex vivo*. *Ex vivo* servirá un empleo típico de un procedimiento diagnóstico para la comprobación cuali- y/o cuantitativa
35 de un ácido nucleico conforme a la invención en una muestra biológica.

Junto a los propósitos terapéuticos y/o diagnósticos de empleo en el ámbito de la medicina y/o veterinaria, entra también en consideración el empleo de los ácidos nucleicos o polipéptidos conformes a la invención para el empleo
40 científico. Las secuencias conformes a la invención permiten identificar particularmente del modo conocido por el experto, por ejemplo, secuencias relacionadas mediante bibliotecas de ADNc en organismos uni- o pluricelulares o localizar secuencias vecinas en el genoma humano. Las secuencias de nucleótidos conformes a la invención, particularmente las secuencias con la numeración 1 y 3 (incluidas todas las variantes), pueden emplearse, por tanto, para codificar genes para mARNs, que codifican para estos ácidos nucleicos o sus equivalentes funcionales, homólogos o derivados, en los genomas, por ejemplo, muridos u otros genomas animales y en el genoma humano con métodos
45 habituales mediante cribado de homología aislar, hacer un croquis y correlacionar con marcadores para enfermedades hereditarias humanas. Este procedimiento permite, por ejemplo, la correlación casual de las posiciones cromosómicas de las secuencias de la familia ee3 en las seres humanos (cromosoma 2 (2q14.2); cromosoma X- (Xq28, LocusID: 84548); cromosoma 5, cromosoma 8, cromosoma 3; cromosoma 7) a determinadas enfermedades hereditarias conocidas, particularmente también enfermedades tumorales (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), lo que simplifica considerablemente su diagnóstico y posibilita nuevos juegos de terapias. Esto mismo es válido para las proteínas conformes a la invención.

Con ayuda de los ácidos nucleicos conformes a la invención se pueden diagnosticar, por tanto, particularmente
55 enfermedades hereditarias humanas, es decir, tanto enfermedades monogénicas como también poligénicas, por cuyo motivo se emplean como marcador, creciendo de aquí un procedimiento de diagnóstico conforme a la invención para enfermedades hereditarias.

Particularmente para el empleo científico se muestra un sistema de prueba, basado en secuencias de aminoácidos
60 y/o de nucleótidos conformes a la invención. En este contexto se pueden emplear el ADNc, el ADN genómico, los elementos reguladores de las secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención, como también el polipéptido, así como emplearse fragmentos parciales de estos en forma recombinante o no recombinante para la elaboración/gestación/desarrollo de un sistema de pruebas. Un sistema de prueba de este tipo es particularmente apropiado para medir la actividad del promotor o de la proteína en presencia de la sustancia de prueba. en este contexto se trata preferentemente de simples métodos de medición (colorimétrico, luminométrico, basado en la fluorescencia o radioactivo), que permitan la rápida medición de un gran número de sustancias de prueba Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Los sistemas de prueba descritos permiten el examen de bibliotecas químicas en busca de sustancias, que tengan efectos inhibidores o activadores sobre las proteínas conformes a la in-

vencción, particularmente de las secuencias 5 (y/o sus derivados o fragmentos). La identificación de tales sustancias representa el primer paso en el camino para la identificación de nuevos medicamentos, que actúen específicamente sobre la transducción de señales asociada a las ee3. En este contexto se proporcionan particularmente sistemas de prueba, que empleen las propiedades conocidas de las proteínas acopladas a la proteína G, por ejemplo, los sistemas de prueba mostrados posteriormente.

Una inhibición de la actividad biológica de las proteínas conformes a la invención, particularmente de proteínas conformes a la Figura 13, o típicamente de la actividad biológica en relación con la apoptosis, proliferación, regeneración, crecimiento celular, como son deseables, por ejemplo, en la apoplejía, el shock séptico, GvHD (graft *versus* host disease), enfermedades degenerativas, particularmente enfermedades neurodegenerativas, hepatitis aguda u otras indicaciones mostradas en la presente invención, puede también de este modo lograrse, mediante procedimientos familiares al experto, oligonucleótidos de típicamente al menos 10 nucleótidos de longitud, que codifican para un (un fragmento parcial de un) hilo(s) antisentido las secuencias nativas de las proteínas con el número de secuencia 7A, en las células afectadas. De este modo en las células correspondientemente transformadas, la traducción del ARNm nativo de las proteínas de la familia ee3 conformes a la invención, por ejemplo, ee3_1 o ee3_2 se bloquea, lo que como resultado preferentemente eleva la capacidad de supervivencia de las células transfectadas o actúa como modulador sobre el crecimiento celular, plasticidad celular, proliferación celular. También en este caso puede emplearse el procedimiento descrito anteriormente con ayuda de virus recombinante.

La apoptosis celular elevada, dado el caso, patológicamente, proliferación celular en enfermedades, basadas en un control apropiado de errores de las secuencias conformes a la invención (por ejemplo, en las indicaciones citadas anteriormente), puede tratarse terapéuticamente también mediante métodos de ribozima. Para ello se emplean ribozimas que pueden cortar un ARNm diana.

Además de las posibilidades citadas anteriormente para la modulación de la función biológica de los productos génicos conformes a la invención, particularmente de los productos génicos conformes a las Figuras 13, o típicamente para la modulación de la función los productos génicos conformes a la invención en la transducción apóptica o necrótica, proliferativa o indicadora del crecimiento de señales, estas posibilidades se pueden ejecutar también con ayuda de un compuesto químico. Un compuesto químico de este tipo modula, típicamente inhibe o también activa, particularmente la función intracelular de las proteínas conformes a la invención de la familia ee3, o secuencias de ADN conformes a la invención subyacentes, por ejemplo, mediante enlace al ADN (por ejemplo, el ámbito promotor) o mediante enlace a uno de los factores de transcripción controladores de un gen conforme a la invención, influir sobre la función biológica. Estos compuestos se ligan típicamente de manera específica a una proteína conforme a la invención y/o a una secuencia de ácidos nucleicos conforme a la invención y provocan, de este modo, un efecto farmacológico, particularmente neuroprotector o inmunomodulador antiapoptótico o antiproliferativo.

A través de análisis estructurales de una proteína conforme a la invención se pueden descubrir compuestos adecuados, que tengan una afinidad específica de enlace (Rationales Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Editorial, Heidelberg)). Aquí se determina la estructura o una estructura parcial, derivado, alelo, isoforma o una parte de uno de estos de las proteínas conformes a la invención a través de un procedimiento de RMN o cristalografía roentgen (tras la cristalización apropiada, por ejemplo, por el método de la “gota colgante”) o, mientras no exista una estructura sin una buena conformación tal, con ayuda de algoritmos de previsión estructural, se crea un modelo estructural de una proteína conforme a la invención, por ejemplo, también con ayuda de homólogos proteínas ya estructuralmente esclarecidas (por ejemplo, de rodopsina), y se utiliza para identificar compuestos con asistencia de programas de modelado molecular, que puedan actuar como agonistas o antagonistas, para los que pueda pronosticarse una alta afinidad hacia la proteína conforme a la invención. Dado el caso, los procedimientos anteriormente indicados pueden combinarse también para el esclarecimiento estructural. Se utilizan los campos de fuerza apropiados para la simulación de la afinidad de un compuesto potencialmente afín a una subestructura interesante de una proteína conforme a la invención, por ejemplo, el centro activo, un dominio tipo bolsillo (pocket) o una región “bisagra” (“finge”). Estas sustancias se sintetizan entonces y se analizan en procedimientos de prueba apropiados para determinar su capacidad de enlace y su aplicabilidad terapéutica. Estos procedimientos *in silico* para la identificación de principios activos potenciales, que desarrollen su efecto mediante enlace a las proteínas ee3 conformes a la invención, son igualmente objeto de la presente invención.

La información de la secuencia primaria de proteínas ee3 puede utilizarse para preparar estructuras recombinantes, que aprovechen las propiedades ya caracterizadas y GPCRs conocidos gracias al estado actual de la técnica. Así se pueden intercambiar, por ejemplo, determinados rangos de secuencia de las proteínas ee3 conformes a la invención, por determinados rangos de secuencia de un GPCR conocido bien caracterizado. La estructura resultante puede consultarse para con ligandos o agonistas conocidos, identificar el acoplamiento de la proteína G, y el sistema segundo mensajero empleado, o emplear acoplamientos conocidos de la proteína G para la ubicación de ligandos, agonistas o antagonistas. La fabricación de receptores quiméricos, por ejemplo, para los usos citados anteriormente puede efectuarse, por ejemplo, por un procedimiento, como los descritos por Kobilka *et al.* (Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Chimeric alfa 2-, beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. Science 240:1310-1316).

Además pueden emplearse mutantes receptores constitutivamente activos de la familia ee3 para la caracterización del efecto de estos receptores en rutas de transducción de las señales y para el cribado (“screening”) en busca de ligandos. Los receptores conformes a la invención como representantes de la clase proteica 7TM se pueden

mutar de determinada manera, para dar lugar a modificaciones del comportamiento fisiológico y farmacológico de estos receptores. Esto puede utilizarse, por ejemplo, para identificar rutas intracelulares de señales, cuando el ligando natural o un agonista son desconocidos. Particularmente son mutaciones apropiadas en la secuencia de proteínas consenso ee3 DRI, promover aquellas modificaciones, por ejemplo, la mutación de R en la secuencia DRY (Scheer A, Costa T, Fanelli F, De Benedetti PG, Mhaouty Kodja S, Abuin L, Nenniger-Tosato M, Cotecchia S (2000) mutacional analysis of the highly conserved arginine within the Glu/Asp- Arg-Tyr motif of the alfa(1b)-adrenergic receptor: effects on receptor isomerización and activación. Mol farmacol 57:219-231)) por Lys, His, Glu, Asp, Ala, Asn e Ile conlleva en el caso de mutación a Lys a un fuerte aumento de la activación estructural. La mutación a His o Asp conduce a un menor aumento de la activación estructural. La mutación a Arg conlleva de manera interesante un aumento de la afinidad de los agonistas, de forma que también mutantes son interesantes para las pruebas HTS.

De manera similar, una Arg conservada en el tercer dominio TM puede ser un posible lugar de mutación (Ballés-teros J, Kitanovic S, Guarnieri F, Davies P, Fromme BJ, Konvicka K, Chi L, Millar RP, Davidson JS, Weinstein H, Sealfon SC (1998) Functional microdomains in G-proteína-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormoderno receptor. J Biol Chem 273:10445.-10453).

Alternativamente, para la identificación de ligandos endógenos o subrogados pueden emplearse procedimientos basados en el empleo de los receptores funcionales inmovilizados conformes a la invención. Los receptores de la familia ee3 conformes a la invención se expresan en este contexto como proteínas de fusión con GST, el marcador bandera o el marcador TAP. Las células apropiadas se insertan, o se transforman en estructura de membranas por métodos habituales o se emplean directamente para la solubilización. Con los detergentes apropiados, por ejemplo, dodecilmaltósido, digitonina, colato o mezclas de detergentes se solubilizan los receptores y se combinan a las matrices de afinidad apropiadas como GST-sefarosa, Anti-Flag- M2-agarosa o IgG-sefarosa, etc. Tras el lavado de las matrices se incuban con extractos de tejidos o sobrenadantes celulares y se lavan de nuevo. Si el extracto contiene un ligando activo, por ejemplo, un péptido, éste se liga al receptor inmovilizado y puede identificarse tras elución mediante métodos analíticos, por ejemplo, por medio de espectrometría de masas.

Los ensayos denominados de internalización representan otro procedimiento para poder identificar ligandos naturales o particularmente ligandos sustitutos para los receptores conformes a la invención, por ejemplo, ee3_1. En este contexto se aprovechan asimismo las diversas propiedades de una proteína de la clase GPCR. Por ejemplo, pueda recurrirse al comportamiento de internalización de las proteínas de la clase GPCR. Esto ha de entenderse como mecanismo de regulación tras la activación del receptor. La ventaja de un método de cribado ("screening-method") basado en este comportamiento, es que no es necesaria una información exacta del respectivo receptor. Particularmente, no tiene que existir ninguna información acerca de las proteínas G conectoras, y las rutas de transducción de las señales empleadas.

Un ensayo de este tipo se describe, por ejemplo, en Lenkei *et al.* (2000, J Histochem Cytochem, 48, 1553-64) y puede emplearse de manera análoga en los receptores conformes a la invención. Para ello se elabora primero una estructura de fusión C-terminal de las proteínas conformes a la invención con EGFP. Posteriormente se elaboran células CHO estables por procedimientos estándar. Se seleccionan los clones estables con ayuda de una clasificadora FACS por fluorescencia EGFP. La selección final se efectúa con ayuda de evaluación microscópica de fluorescencia de la expresión superficial. Las células se incuban posteriormente con fracciones de HPLC de fragmentos de tejidos, y se determina la internalización con ayuda de un microscopio confocal. La evaluación se lleva a cabo con ayuda de software morfométrico (NIH Image) según el principio de la distancia de señales fluorescentes del punto medio celular. Una distribución de la frecuencia/distancia originó una buena discriminación para la internalización.

Para la situación de los ligandos desconocidos se efectúan sucesivos fraccionamientos, para aislar el péptido apropiado hasta la pureza, e identificarlo posteriormente por ejemplo, mediante secuenciación o MALDI-TOF. Otro empleo del, en principio, mismo procedimiento es descrito por Ghosh *et al.* (2000, Biotechniques, 29, 170-5; Conway *et al.*, 1999, J Biomol Screen, 4, 75-86), que son ambos componentes en todo su contenido de la presente revelación.

Pero también se puede recurrir a un ensayo aproximativo funcional para la identificación de ligandos y/o, dado el caso, también para la caracterización del receptor conforme a la invención. En este contexto, se aprovecha, que un gran número de receptores de 7TM- (receptores con 7 dominios transmembranarios), producidos en células HEK293, en células CHO u otras células, a través del acoplamiento a proteínas G de la clase Gq conducen a la activación del PLC y a la movilización de Ca intracelular. Para el caso de que tales receptores conformes a la invención no deban emparejarse a proteínas G de la clase Gq, éstos pueden forzarse mediante la expresión de Co- de las proteínas G quiméricas o las proteínas G emparejadas de manera relativamente inespecífica con receptores (G15 o G16) para la transducción de señales a través de PLC, es decir, para la liberación de Ca. Los receptores de la familia ee3 conformes a la invención se expresan típicamente en células HEK293 y CHO tanto de manera estable como también transiente aislado y junto a la proteína G quimérica Gqi5 y alternativamente con la proteína G Gq15. Las células se cargan entonces preferentemente con un colorante fluorescente de membrana permeable, por ejemplo, Fura-2 o Fluo-3 y/o -4 y tras el lavado de las células se mezcla con diferentes sustancias de prueba y simultáneamente se mide la liberación de Ca, por ejemplo, con un aparato FLIPR de la compañía Molecular Devices. Las sustancias de prueba que produzcan una

señal positiva se analizan finalmente preferentemente en Células de control (sólo transfectadas con el vector) y cuando la señal se manifiesta farmacológicamente como específica, es decir, caracterizada con curvas de concentración-respuesta.

- 5 Alternativamente puede medirse, sin embargo, la respuesta de Ca producida por un ligando también mediante otros detectores de Ca, por ejemplo, a través de AequeScreen de Euroscreen (Bruselas, Bélgica; véase, por ejemplo, <http://www.farmaceuticaltechnology.com/contractors/compoymen/euroscreen/>). Se emplean además células, que expresen el gen de la proteína apoaeuorina. Tras la carga de las células con coelenterazina, que se liga a la apoaeuorina, se forma aeueorina. Si mediante un ligando se libera Ca, el Ca activa la aeueorina para la oxidación de coelenterazina, liberándose intensidad de la emisión de luz es proporcional al aumento de la concentración intracelular de Ca y, por tanto, una medida de la actividad del ligando existente (teniendo en cuenta los controles apropiados).

- 15 Para identificar antagonistas, se estimulan los receptores en presencia de concentraciones satisfactoriamente altas de los más diversos ligandos con un agonista conocido. Una señal modificada frente a los controles (sólo agonista, sin otros ligandos), por ejemplo, una señal de Ca menor, denota un antagonista competitivo.

- Además, los ensayos cAMP pueden servir también para la caracterización de los receptores la familia ee3 conformes a la invención y para la identificación de los ligandos. El motivo de esta inserción para la caracterización farmacológica de los receptores de ee3 y/o para la identificación de los ligandos (agonistas o antagonistas) es la propiedad de los receptores de la clase de las GPCRs, por ejemplo, de las proteínas conformes a la invención, de poder actuar de manera estimulante o inhibitoria sobre las clases de adenilacilasas, generalmente mediante activación de las denominadas proteínas estimulantes Gs o inhibitoras Gin. En función del efecto de las sustancias de prueba, por ejemplo, en un cribado de alto rendimiento, puede estudiarse por medio de mediciones directas o indirectas la modificación relacionada con lo mencionado del nivel cAMP en las células. Los genes receptores se expresan en este contexto de manera estable o transiente en células mamarias (ver Ejemplo de ejecución 2). En las GPCRs, que activan las adenilacilasas, por lo que aumenta el nivel cAMP en la célula, se identifica un agonista potencial bajo las sustancias de prueba mediante una elevada concentración de cAMP frente a las células de control. Los antagonistas bajo las sustancias de prueba, por ejemplo, en una inserción de HTS, se identifican mediante su bloqueo del aumento de la concentración de cAMP producida por un agonista. En los receptores de ee3 conformes a la invención acoplados a Gi se estimula en la prueba la adenilacilasa o bien directamente con forskolina o mediante la activación de un receptor acoplado a Gs, por lo que aumenta el nivel cAMP acoplado a Gi que contrarresta este aumento. Para las mediciones directas de cAMP se puede emplear una serie de ensayos, como por ejemplo, el sistema de ensayo cAMP[3H] de la empresa Amersham, basado, por ejemplo, en el principio de la suplantación competitiva del cAMP formado endogénicamente por pcAMP marcado radiactivamente por (tritio) añadido. Las mediciones indirectas de cAMP se efectúan generalmente mediante ensayos de reporte. Para ello se expresan los receptores en líneas celulares, que contengan sistemas de reporte, por ejemplo, el sistema CRE-luciferasa. El cAMP activa la expresión de la luciferasa, cuya actividad se mide mediante la reacción de los sustratos apropiados y medición fotométrica de los productos. Los ensayos de reporte sirven muy especialmente para los métodos de cribado en tandem de masas.

- 40 Finalmente son posibles - junto a los ensayos descritos anteriormente - también los siguientes sistemas de ensayo para la caracterización de los sistemas second-messenger (segundo mensajero) conformes a la invención y/o para la identificación de los ligandos según los receptores de ee3 conformes a la invención, particularmente para la determinación de la actividad de la adenilacilasa en las células o las membranas según Salomon (Salomon *et al.*, (1979). Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 35-55), para la determinación de la concentración de inositol-3-fosfato o para la medición de una liberación de ácido araquídico modificada. Por ejemplo, puede sobreexpresarse ee3_1 en líneas celulares habituales, y tras la activación mediante fragmentos de tejidos puede determinarse la actividad del o.a. sistema segundo mensajero. Los ensayos para los sistemas segundo mensajero de la clase GPCR son bien conocidos individualmente por el experto y han de extraerse, en cada caso, de los impresos, por ejemplo, Signal Transduction: A practical approach, G. Milligan, Ed. Oxford University Press, Oxford, Estrechohland. Otros ensayos de informe para el cribado abarcan los sistemas MAP quinasa/luciferasa y NFAT- luciferasa.

- 55 En base al conocimiento conforme a la invención de que la transducción de señales del receptor de ee3 también se lleva a cabo a través de las rutas de transducción de las señales de la MAP quinasa, pueden emplearse también para ello los ensayos de cribado para establecer la búsqueda de ligandos o identificación de inhibidores, por ejemplo, a través de un sistema de informe NF-kB o sistema de luciferasa.

- Tal y como se ha citado anteriormente, la activación del segundo mensajero sirve también para la identificación de ligandos, agonistas o antagonistas, que se ligan a los receptores conformes a la invención y pueden desarrollar de tal manera su efecto agonista y/o antagonista para ciertos procesos celulares. Por ejemplo, se pueden emplear microfisiómetros para la identificación de ligandos, agonistas, o antagonistas. Mediante el enlace de ligandos a un receptor de la familia ee3, las señales activas representan procesos consumidores de energía. En consecuencia, estos procedimientos van acompañados siempre de bajas modificaciones metabólicas, entre otros, una baja desviación del pH. Estas pueden detectarse extracelularmente por, por ejemplo, un microfisiómetro (Cytosensor, Molecular Devices).

Tras la identificación de ligandos, agonistas o antagonistas con potencial de enlace a las proteínas conformes a la invención de la familia de receptores ee3 se pueden efectuar ensayos de enlace de ligandos para su caracteriza-

ción detallada. Los ensayos de enlace de ligandos facilitan directamente la farmacología de un receptor, es decir, poder medir la afinidad de los más diversos ligandos por este receptor. Para estudios de enlace, en este contexto, se marca típicamente manera radiactiva un ligando químicamente puro, identificado por uno de los procedimientos citados anteriormente o conocido de otro modo, con una alta actividad específica (30-2000 Ci/mmol), de forma que la marca radiactiva no reduzca la actividad del ligando respecto al receptor. Las condiciones de ensayo se optimizan, tanto para el empleo de las células que expresan al receptor como también de las membranas elaboradas a partir de aquellas respecto a la composición del tampón, sal, moduladores, como por ejemplo, nucleótidos o estabilizadores, como por ejemplo, glicerina; de forma que la medición origine una razón señal/trasfondo útil. Para este ensayo de enlace, se define el enlace específico del receptor como la diferencia de la radiactividad total asociada con la preparación del receptor (células o membranas), es decir, medida en presencia de sólo un enlace específico, o sea, del radioligando y de la radiactividad, medida en presencia tanto del radioligando como también de un exceso de ligando no marcado radiactivamente. Cuando sea posible, se emplean dos ligandos competitivos químicamente diferentes, para determinar el enlace no específico. Un enlace específico, que ascienda a al menos el 50% del enlace total, es óptimo. El ensayo de enlace se efectúa, o bien de manera no-homogénea como ensayo de filtración o de manera homogénea como ensayo "Scintillation Proximity Assay" (ensayo de escintilación por proximidad).

En el primer caso, se incuba la preparación que contiene el receptor (células o membranas) con los ligandos en una disolución tampón apropiada, hasta que se haya ajustado el equilibrio de enlace típicamente 1 h a RT o a 4°C toda la noche, y entonces se filtra a través de un filtro apropiado, por ejemplo, whatman o Schleicher&Schuell filtro de fibra de vidrio, pretratado, si fuera necesario, por ejemplo, con polietilenoimina, para separar los radioligandos no-combinados de los combinados. Tras el lavado del filtro, se seca o se mezcla en húmedo con un escintilador apropiado y tras la incubación eventualmente necesaria se mide la radiactividad contenida en el contador de escintilación. En el ensayo "Scintillation Proximity Assay" se incuban las bolitas de escintilación apropiadas, por ejemplo, bolitas de WGA, con los ligandos y las membranas que contienen receptor en una disolución tampón apropiada, hasta que se haya ajustado el equilibrio de enlace y entonces se mide la radiactividad en un contador de escintilación apropiado. Ambos ensayos de enlace pueden realizarse en el formato HTS.

Los receptores solubilizados o purificados se miden con el ensayo "Scintillation Proximity Assay" o con ensayos inhomogéneos habituales como el ensayo de filtración tras la precipitación del PEG, el ensayo de adsorción o el ensayo de filtración en gel (Hulme E, Birdsall N (1986) Distinctions in acetylcholine receptor activity. Nature 323:396-397).

En vez de un radioligando puede emplearse un ligando fluorescente, por ejemplo, un ligando que se haya combinado covalentemente a un colorante fluorescente como BODIPY. El enlace del ligando fluorescente al receptor se mide por medio de polarización de fluorescencia. El método sirve tanto para cribados primarios en formato HTS como también en ensayos secundarios.

Otro objeto de la presente invención se relaciona con procedimientos para la identificación de los participantes en la interacción celular de los polipéptidos de la familia ee3 conformes a la invención. De este modo pueden identificarse como participantes en la interacción las proteínas, que tengan afinidades específicas de enlace, o para la identificación de ácidos nucleicos, que codifiquen para proteínas, que tengan afinidades específicas de enlace respecto a la proteína conforme a la invención. Los participantes celulares en la interacción de proteínas de las proteínas ee3 conformes a la invención pueden ser, por ejemplo, otro GPCRs o canales iónicos.

Un procedimiento conforme a la invención de este tipo y/o el empleo de los polipéptidos conformes a la invención, secuencias de ácidos nucleicos conformes a la invención y/o estructuras de ácidos nucleicos conformes a la invención para la ejecución de este procedimiento se efectúa con ayuda de una compilación "Yeast-two-hybrid" ("cribados"-y2h) aislado o en combinación con otro procedimiento bioquímico (Fields and Song, 1989, Nature, 340, 245-6). Estos cribados se describen también en Van Aelst *et al.* (1993, Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 6213-7) y Vojtek *et al.* (1993, Cell, 74, 205-14). Típicamente se pueden emplear también sistemas basados en mamíferos, en vez de los sistemas de levadura, para la ejecución de un procedimiento conforme a la invención, por ejemplo, como los descritos en Luo *et al.* (1997, Biotechniques, 22, 350-2). Los enfoques experimentales apropiados citados anteriormente utilizan además las propiedades típicas de la clase de las proteínas GPCR, por ejemplo, la transducción de señales, por ejemplo, a través de proteínas G, o sea, por ejemplo, también los participantes en la interacción intracelular conocidos.

Para un cribado y2h se clona el marco abierto de lectura de las secuencias conformes a la invención, particularmente de las secuencias con los números 1 a 4, o una variante nativa, de manera totalmente especialmente preferente rangos intracelulares de las secuencias conformes a la invención, por ejemplo, en un denominado vector bait "in-frame" con el dominio de enlace GAL4 (por ejemplo, pGBT10 o pGBKT7, Fab. Clontech). Con esto puede examinarse preferentemente una denominada "pre-librería" en una variedad de levadura por el protocolo habitual en busca de las proteínas que interactúan.

Por otra parte, con los sistemas y2h pueden efectuarse también los denominados experimentos de mapeo para identificar dominios específicos de interacción.

De manera equivalente, se prefieren también los sistemas 2-híbridos, que emplean otros participantes en la fusión u otros sistemas celulares, por ejemplo, el sistema BacteroMatch, o el sistema CytoTrap, ambos del Fab. Stratagene. Alternativamente al procedimiento y2h, conforme a la invención pueden emplearse también sistemas apropiados de células de mamíferos, como los descritos, por ejemplo en Luo *et al.* (1997, Biotechniques, 22, 350-2) como componente de la presente revelación.

La alta regulación de por ejemplo, ee3_1 mediante EPO muestra, que por ejemplo, ee3_1 se relaciona con la supervivencia de las células, ya que la EPO tiene efectos neuroprotectores. Los polipéptidos conformes a la invención, particularmente las variantes nativas o también no-nativas, artificiales, cuya función biológica debería estudiarse, pueden emplearse, por tanto, en un ensayo de apoptosis y/o en un procedimiento para la investigación de la función y/o efectividad de los polipéptidos conformes a la invención en la inducción, transducción o inhibición de las señales de muerte celular u otros procesos fisiológicos celulares. La participación de las proteínas conformes a la invención de la familia ee3 o de las variantes conformes a la invención citadas anteriormente de, por ejemplo, cascadas apoptóticas puede estudiarse, mientras se transfecten las estructuras de expresión con las secuencias de ee3 conformes a la invención, particularmente con las secuencias con los números 1 y 3 o variantes en las células eucarióticas (por cuyo motivo se muestra también su empleo para estas investigaciones), y posteriormente puede analizarse la inducción de apoptosis. Esto puede ocurrir, por ejemplo, mediante tinción con anexina (Fab. Roche Diagnostics), mediante anticuerpos, que reconozcan la forma activa de caspasa-3 (Fab. New England Biolabs), o mediante ELISAs, que reconozcan fragmentos de ADN-histona (cell-death elisa, Roche Diagnostics). Esta inducción de apoptosis es, dado el caso, específica del tipo celular, por cuyo motivo conforme a la se analizan preferentemente varias líneas celulares y células primarias. La inducción de la apoptosis puede ser, dado el caso, también específica del estímulo. Por tanto, en un procedimiento de este tipo se aplican preferentemente varias situaciones de estrés, por ejemplo, golpes de calor, condiciones de hipoxia, tratamientos de citoquina (por ejemplo, IL-1, IL-6, TNF-alfa) o tratamiento de H₂O₂. como tipos de células típicos para un procedimiento de este tipo entran en consideración las líneas celulares habituales, por ejemplo, células Cos, células HEK, células PC12, células HP-1 o células primarias, como por ejemplo, neuronas, astrositos, así como otras líneas celulares inmortalizadas y primarias, según la necesidad.

En resumen, hay que constatar, que se identificó un receptor acoplado a una nueva familia de proteínas G membranas (GPCRs) en el sistema de los mamíferos, que puede separarse claramente de las familias conocidas gracias al estado actual de la técnica. La identificación de una nueva clase proteica y de las secuencias de ADN subyacentes tuvo lugar debido a una regulación diferencial de las mismas en el sistema nervioso central y permiten la aclaración y caracterización de un gran número de procesos fisiológicos y patofisiológicos.

La identificación se logra mediante la regulación transcripcional alta inducida por la EPO (directa o indirectamente) de la proteína ee3_1 conforme a la invención. Esto significa, que por ejemplo, los agonistas y antagonistas de la ee3_1 pueden reforzar o sustituir los efectos de la EPO, o antagonizar efectos no deseados. Posiblemente ha de influirse selectivamente sobre determinados efectos de la EPO, por ejemplo, un efecto neuroprotector (por ejemplo, en enfermedades neurodegenerativas), o un aumento del rendimiento cerebral, (por ejemplo, en demencias).

El gen reproducido es una nueva proteína 7-transmembranaria en los ratones y seres humanos, expresada v.a. en el cerebro. Se trata de un receptor acoplado a la proteína G, una búsqueda de homología en el banco de datos de secuencia EMBL resultó en una similaridad remota a las GPCRs de la familia A, particularmente receptores peptídicos.

Por otra parte, la ee3_1 no se regula o sólo de manera limitada mediante los siguientes modelos de enfermedades neurológicas: Kindling (Hippocampus, seizure stage 5, 2 h post seizure), apoplejía cortical (Cortex, 2.5 h occlusion y 2 y 6 h Reperfusion), isquemia global en ratas (cerebro completo, 3 y 6 h post isquemia). Esto muestra una alta especificidad de la regulación mediante EPO, en contraste, por ejemplo, con los genes "immediate early".

La presente invención se describe más a fondo mediante las siguientes Figuras:

La Fig 1. muestra una representación del análisis de transcripción en el cerebro de ratones EPO. La gráfica representa los datos del experimento de hibridación del ADN array. Se representa la señal en los animales EPO-transgénicos (eje y) frente a la señal en ratones salvajes (eje x). la señal es una señal de fluorescencia (relativa). Los puntos superiores a las diagonales representan productos génicos altamente regulados en el cerebro de animales EPO-transgénicos. Por encima de la diagonal 2 (doble sobreexpresión en el animal transgénico frente al salvaje) pueden observarse ocho señales positivas.

La Fig. 1b representa los resultados de los experimentos de microarray. Se trata de una aplicación del factor de inducción (rel.) de la ee3_1 de los ratones en el cerebro de ratones EPO-transgénicos (derecha) en relación con la inducción en el cerebro de animales salvajes, es decir, como valores medios de inducción de 2 experimentos de inducción independientes. Un factor de inducción de 1 corresponde a la concentración en el cerebro del animal de control de una camada. La expresión de una secuencia conforme a la invención obtiene casi el cuádruple del valor.

La Fig. 2 muestra los resultados de los experimentos con ratones consultados para la verificación de la elevada inducción de la ee3_1 conforme a la invención en animales EPO-transgénicos y del producto génico alfa-globina altamente regulado asimismo en el animal EPO-transgénico, es decir, con ayuda del PCR cuantitativo (LightCycler). Los datos representan muestras de ARN reunidos de 6 cerebros (transgénicos tg) o salvajes (wt). Sobre el eje y se representa la inducción relativa. Frente a la medición del control (inducción rel.=1), para la secuencia conforme a la invención se deduce un aumento 11 veces de la inducción.

La Figura 3 da la expresión de la ee3_1 conforme a la invención en el ratón (LightCycler) durante el desarrollo (embrión tras 7, 11, 15 y 17 días) y de nuevo en diferentes tejidos adultos (cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, músculo esquelético, bazo y testículo). Sobre el eje y se representa la abundancia relativa de trasuntos ee3. como resultado se muestra una expresión relativamente ubicua de ee3_1 en todos los estadios del desarrollo embrionario murín y en todos los tejidos analizados. La ee3_2 se expresa en el ratón según datos EST en carcinoma, tiñones, hígado, células B, pulmón, mamas y útero embrionarios.

La Fig. 4 muestra la expresión de ee3_1, ee3_2 y ee3_c5 humanas conformes a la invención en seres humanos en los tejidos adultos (corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculos esqueléticos, riñones, páncreas). Los datos proceden de experimentos de PCR cuantitativos (LightCycler). La aplicación sobre el eje y corresponde a la de la Figura 3. se muestra una expresión casi ubicua y paralela de los genes de la familia ee3 conforme a la invención en los tejidos analizados. Resulta especialmente sorprendente la fuerte expresión de la familia ee3 en los riñones y el páncreas, mientras que la expresión en el cerebro y esqueletomúsculo resulta baja. La expresión de ee3_1 y ee3_2 coincide considerablemente, de forma que, dado el caso, estas dos proteínas conformes a la invención se deducen de una función redundante. En las seres humanos se localizan ESTs con secuencias de ee3_1 en los siguientes órganos: cerebro, ojo, células embrionarias, corazón, riñón, pulmón, placenta, próstata, embrión completo, glándula suprarrenal, mamas, colon, estómagos, testículos. Esto se puede englobar en una expresión relativamente amplia. En las seres humanos hay ESTs de ee3_2 en cerebro, colon, corazón, riñón, pulmón, páncreas, paratiroides, próstata, testículos, útero, vejiga, mamas, piel.

La Figura 5 representa el resultado de un Northern-Blot, que la expresión de la ee3_1 humana conforme a la invención en diferentes líneas celulares tumorales humanas. Para la hibridación Northern-Blot (Fab. Clontech) se inserta una sonda de ratón, que comprende los ORF de la ee3_1 humana. Se muestra una expresión ubicua de un trasunto de ARN ee3_1 humano conforme a la invención.

La Figura 6 representa la expresión de ee3_1 en diferentes áreas del cerebro (rata). También aquí hay una distribución ubicua en diferentes áreas del cerebro, algo más espesa en el cerebelo y médula espinal sonda empleada: ratón ee3_1. por debajo se representa la imagen del gel coloreado con bromuro de etidio como control de carga.

La Figura 7 muestra un modelo de topología proteica de ee3_1_m en base al pronóstico estructural con especial consideración de los dominios transmembranarios. Se muestra una topología típica de las proteínas GPCR con 7 dominios transmembranarios (representados horizontalmente adyacentes, un corto término N intracelular (situado por encima del dominio TM 1) y un término C intracelular (representado por debajo del dominio TM 7). Los aminoácidos hidrófobos se caracterizan en verde.

La Figura 8 muestra una alineación (comparación de secuencia) de las proteínas ee3_1 conformes a la invención ("human pro"), ee3_2 y un fragmento de proteína de ee3_5 con diferentes proteínas GPCRn conocidas preliminarmente gracias al estado actual de la técnica (por ejemplo, dc32_bio, ccr5-human o dop21_human), y motivos de consenso de las familias de GPCR A, B y C conocidas gracias al estado actual de la técnica (en Figura 8 como cons fam A, cons fam B). "Pfam" significa "familia proteica" y describe un grupo de motivos de consenso, producidas a partir de las en agrupamiento de proteínas "Clustering". Los motivos especificados se extraen de los bancos de datos pfam. Se aclara que la familia de proteínas ee3 conforme a la invención tiene la similaridad más fuerte respecto a las proteínas GPCRn de la familia A. para la familia proteica conforme a la invención resultan especialmente características, frente a las proteínas GPCR conocidas preliminarmente, las (la siguiente numeración de aminoácidos corresponde a aquella de la Figura 8) siguientes secciones de secuencia para las ee3_1 y ee3_2 humanas: de aminoácidos 75-85, de aminoácidos 129-135 (particularmente glicina y serina en las posiciones 129 y/o 132, glicina en la posición 174, de aminoácidos 193-200 (particularmente glicina en la posición 198), de aminoácidos en las posiciones 260 y 261, de aminoácidos en la posición 308 (cis), de aminoácidos 334-340, de aminoácidos en la posición 539 (his), de aminoácidos en la pos 608 (his), de aminoácidos en la posición 611 (asp) y, finalmente la fracción completa de secuencia C-terminal a partir de la posición 637 (particularmente con el moivo ácido entre las pos 640 y 655, el motivo básico entre 666 y 670 y el motivo ren prolina entre las posiciones 680 y 685).deee3_c1 (ee3_1) del ratón (secuencia 1).

La Fig. 9A representa una secuencia de ADN conforme a la invención bajo la designación ee3_c1 (ee3_1) del ratón (secuencia 1), que comprende la zona traducida (versión en todas las secuencias representadas: recorrido de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, o sea, con continuación tras el final de línea en la siguiente línea inferior, a la izquierda). Los codones de inicio y parada en este rango de secuencia se destacan en negra.

La Figura 9B contiene otra secuencia conforme a la invención, que representa una zona inferior (zona no traducida en 3') de la secuencia conforme a la Figura 9a.

La Figura 10 representa, bajo la designación ee3_2, una secuencia de ADN conforme a la invención del ratón (secuencia 2), que comprende también el rango traducido.

Los codones de inicio y parada en este rango de secuencia se destacan en negrita.

La Figura 11A representa, bajo la designación ee3_1 una secuencia de ADN humano conforme a la invención (secuencia 3), que comprende también el rango traducido. Los codones de inicio y parada en este rango de secuencia se destacan en negrita. por otra parte, la señal de poliadenilización putativa se destaca en negrita y subrayado.

Las Figuras 11B y 11C representan formas de ajuste C-terminales alternativas, que codifican para una proteína C-terminal truncada conforme a la invención. Junto a los codones de inicio y parada destacados en negrita, en la Figura 11B se destaca adicionalmente la secuencia de consenso de la posición de ajuste.

La Figura 12 representa, bajo la designación ee3_2, una secuencia de ADN humano conforme a la invención (secuencia 4), que comprende también el rango traducido. Los codones de inicio y parada en este rango de secuencia se destacan en negrita (ATG y/o TAA). por otra parte, la señal de poliadenilización putativa se destaca en negrita. La secuencia inferior de la Figura 12 continúa la primera parte de secuencia (rango solapante de la primera y segunda partes en cursiva).

La Figura 13 representa una secuencia de aminoácidos múrido conforme a la invención, bajo la designación ee3_1 (secuencia 5), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 9).

La Figura 14 representa, bajo la designación ee3_2, una secuencia de aminoácidos múrido conforme a la invención (secuencia 6), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 10).

La Figura 15A representa, bajo la designación ee3_1, una secuencia de aminoácidos humana conforme a la invención (secuencia 7), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 11A).

La Figura 15B representa, bajo la designación ee3_1b_h, una secuencia de aminoácidos humana conforme a la invención (secuencia 7b), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 11B).

La Figura 15C representa, bajo la designación ee3_1b_h, una secuencia de aminoácidos humana conforme a la invención (secuencia 7b), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 11C).

Las secuencias conformes a las Figuras 15B y 15C son las secuencias de aminoácidos de los productos de ajuste alternativos de la secuencia de ADN representada conforme a la Figura 11A.

La Figura 16 representa, bajo la designación ee3_2, una secuencia de aminoácidos humana conforme a la invención (secuencia 8), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 12).

La Figura 17 representa, bajo la designación ee3_5, una secuencia de ADN humano conforme a la invención (secuencia 10), que comprende también el rango traducido. Los codones de inicio y parada en este rango de secuencia se destacan en negrita (ATG y/o TAA). por otra parte, la señal de poliadenilización putativa se destaca en negrita.

La Figura 18 representa, bajo la designación ee3_5, una secuencia de aminoácidos humana conforme a la invención (secuencia 11), es decir, recorrida desde el término N hasta el término C (ver también la secuencia de ADN subyacente conforme a la Figura 19).

La Figura 19 muestra el resultado de un PCR cuantitativo para ee3_1 en el cerebro de los ratones, tratado intraperitonealmente con 5000 U de eritropoetina (EPO)/kg de peso corporal, y se prefundieron posteriormente tras 6 o 24 horas y se analizaron. si-6-1, si-24-1: animales inyectados con sal común tras 6 y/o 24 horas. ei-6-1, ei-6-2 EPO tras 6 horas; ei-24-1, ei-24-2: animales inyectados con EPO tras 24 horas. Se muestra una elevada expresión de ARN ee3, que aumenta con el paso del tiempo. Los valores de los animales tratados con EPO son significativamente diferentes, estadísticamente hablando, de los tratados con sal común (ANOVA seguido de Newman-Keuls *post hoc* Test).

La Figura 20 muestra la figura de una hibridación *in situ* en un corte horizontal de un cerebro de ratón. Con la sonda radiactivamente marcada empleada (ee3_1.3as AACGAAGGGCCAGDÍACACAGAGAACAGCAGCAGA CAGGCADÍATGAGG) podía hacerse ver la expresión de ee3_1 en el cerebelo (ce), hipocampo (hc), circunvolu-

ES 2 342 264 T3

ción dentada (dg) y en el córtex (co), particularmente en el córtex entorhinal, en el bulbo olfatorio (olf). Un control sensorial apropiado (ee3_1.3s,CCTCATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTACTGGCCCTTCGTT) no produjo ninguna señal específica (no mostrado).

5 La Figura 21 ilustra la fabricación de un antisuero policlonal C-terminal contra la proteína ee3_1 (persona).

A: selección de un epítipo peptídico en el término carboxílico con alto potencial de antigenicidad (CLHHEDNEETEETPVPEP).

10 b: Immunoblot, que muestra la comprobación específica de ee3_1 en células HEK293 transfectadas trasientes. Se representaron, en cada caso, las mismas concentraciones de lisado de células HEK293, transfectadas con la estructura Exp.ee3-1-h-Nter-myc, lo que conlleva la producción de proteína ee3_1 con myc-tag fusionado N-terminal.

15 Huella 1: comprobación de la proteína ee3_1 con myc-tag fusionado N-terminalmente, a través de un anticuerpo myc-específico (Empresa Upstate Biotechnology (comercializados por Biomol Feinchemikalien GmbH), empleado en una dilución de 1:2000).

20 Huellas 2-8: comprobación de ee3_1 con diferentes diluciones del antisuero específico para la ee3_1 AS4163 (1:500 - 1:12000). El antisuero detecta específicamente y de manera altamente sensitiva la banda específica de la ee3_1 (aprox. 35 kDa).

Huella 9: el suero preinmune apropiado (PIS) no detecta ninguna banda en una dilución de 1:500.

25 La Figura 22 muestra la delección inmunohistoquímica de ee3_1 en diferentes tejidos por medio del antisuero AS4163.

A: tinción específica de las neuronas de la capa V en el córtex somatosensorial.

30 B: ampliación de A.

C: neurona en el córtex entorhinal.

35 D: expresión de ee3_1 en la circunvolución dentada y en la región CA3 del hipocampo.

E: ampliación de la región CA3 del hipocampo.

40 F: límite de la expresión de ee3_1 en el hipocampo entre CA3 y CA2.

G: cerebelo, tinción inmunohistoquímica específica en la capa de células de Purkinje y en los núcleos del cerebelo.

H: células de Purkinje en el cerebelo.

45 I: bulbo olfatorio.

J: ampliación, tinción de las células mitrales grandes.

50 K: retina, tinción de las células gangliales y de las células sensoriales de la retina.

L: ampliación de K. tinción de las células sensoriales de la retina.

M: expresión de ee3_1 en las grandes neuronas motoras del cuerno ventral de la médula espinal.

55 N: expresión de ee3_1 en el núcleo motor del Ncl. trigeminus.

O: tinción de la sustancia negra, parte reticulada

60 P: ampliación de Q. sustancia negra.

Q: ee3_1 se expresa extraneuralmente en el pulmón. Tinción de células basales en los bronquiolos. Tinción de arteriosos, ninguna tinción de venolos.

65 R: representación de la triada pulmonar típica bronquios, arterias y venas.

- S: ampliación de los bronquiolos. Expresión en células basales específicas, aún no definidas a fondo.
- T: ampliación con pared arteriolar (arriba a la izquierda) y pared bronquiolar (abajo a la derecha).
- 5 U: representación de un arterioso en el proceso. Tinción del endotelio y células musculares planas en la pared del recipiente.
- V: arterioso en sección transversal con coloración inmunohistoquímica de las células musculares planas y células endoteliales individuales.
- 10 W: intestino delgado con estructura de criptas y vellosidades, tinción de las proporciones basales de criptas por el anticuerpo contra ee3_1. en las vellosidades se colorean los nervios vegetativos individuales.
- X: ampliación de W.
- 15 Y: representación de las fibras nerviosas en la pared del intestino delgado, que pertenecen al plexo mioentérico vegetativo propio del intestino delgado.
- Z: sección transversal de un nervio periférico en los tejidos grasos/conjuntivos subcutáneos.
- 20 AA: músculo cardíaco con fibras nerviosas teñidas específicamente.
- BB: musculatura a rayas transversales (esqueletomúsculo). La coloración inmunohistoquímica en el centro de la imagen es muy compatible con una placa final motora. En el perimio, fibras nerviosas periféricas individuales (abajo derecha).
- 25

La Figura 23 muestra la posición frontal de una coloración inmunohistoquímica de ee3_1 en la médula espinal de un ratón salvaje (parte superior de la imagen) y de un ratón, que sobreexpresa eritropoetina transgénica[(tg6) parte inferior de la imagen]. En las mismas condiciones de coloración, se encuentra una señal claramente más fuerte en los ratones transgénicos. Este resultado se puede verificar en otros dos ratones.

30

La Figura 24 muestra una doble inmunofluorescencia para ee3_1 y map1b en el ratón. Estas dos proteínas se detectaron como participantes en la interacción en un sistema y2h. se encuentra una coincidencia asombrosa de la localización de ambas proteínas en el ZNS. Verde: coloración de ee3_1; rojo: coloración de map1b; amarillo: superposición electrónica de ambas señales. Se muestran ejemplos de la médula espinal (spinal cord; sc) y del cerebelo (cb).

35

La Figura 25 muestra las coloraciones inmunohistoquímicas de un mutante de ratón para el gen map1b (Meixner, *et al.* (2000), J Cell Biol, 151, 1169-78.). se muestra que en los homocigotos de map1b ko animales tan sólo han de justificarse trazas de ee3_1. a: hipocampo, b: córtex, c: cerebelo.

40

La Figura 26 muestra una PCR de ee3_1 en células madre neuronales adultas (nsc) del hipocampo de las ratas. No se puede comprobar ninguna señal en la huella negativa (N). ee3_1 es expresada por estas células madre neuronales.

45

La Figura 27 muestra el alineamiento proteico para proteínas ee3_1 de diferentes especies, considerando las secuencias de *X. laevis* y *D. rerio*.

50 La presente invención se describe más a fondo mediante el siguiente ejemplo de ejecución:

Ejemplo de ejecución 1

55 Identificación y clonación molecular de ee3_1_m y homólogos

(a) Identificación de ee3_1_m

El cerebro de los ratones sobreexpresores de eritropoetina se extrajo en anestesia tras perfusión transcardial y se congeló en nitrógeno líquido. El ARN se obtuvo por el método de Chomczynski y Sacchi (Anal Biochem (1987), 162, 156-9). Los experimentos de hibridación de 2 transgénicos y 2 controles de camada en un array de ADNc de ratón ("Chip") se efectuaron por el procedimiento de Incyte (s. [http://www.incyte.com/reagents/lifearray/lifearray service.shtml](http://www.incyte.com/reagents/lifearray/lifearray%20service.shtml)). En este contexto se efectúa una hibridación competitiva con ayuda de de dos muestras marcadas diferentes (marcadas con Cy5 y Cy3). El experimento de hibridación ofrece como resultado una serie de secuencias altamente reguladas.

60

65

Se identificó particularmente el clon de EST AA185432, altamente regulado en un experimento de repetición asimismo en los ratones EPO-transgénicos. En el factor relativo de inducción valió +3,9 0,1 frente a las camadas no transgénicas (Fig. 1). Esta alta regulación se convalidó con ayuda de un PCR cuantitativo con el sistema Lightcycler (Fig. 2, imprimador delantero: 5'-GGTGTGGGAGAAATGGCTTA-3', imprimador trasero: 5'-ATACCAGCAGAGCCTGGA GA- 3').

(b) *clonación de secuencias de ee3_*

La secuencia EST identificada podía prolongarse con ayuda de búsquedas de BLASTN en bancos de datos EST. De este Modo se identificó otra secuencia homóloga del ratón, ee3_2_m. Mediante el empleo de búsquedas de homología con empleo de los programas apropiados (BLAST, TBLASTN) podían identificarse homólogos humanos en los bancos de datos de EST y genómicos (ensembl).

Para la confirmación de las secuencias obtenidas se efectuaron compilaciones ("screens") con ayuda del procedimiento de clonación del PCR de Shepard (Shepard AR, Rae JL (1997) Magnetoic bead capture of cDNAs from double-stranded plasmid cDNA libraries. Nucleic Acids Res 25:3183-3185), es decir, en bancos secuenciales de ratones y humanos. La publicación citada anteriormente y el estado actual de la técnica allí citado es componente, en todo su contenido, la revelación para la presente invención. Este procedimiento se basa en la hibridación de moléculas de ADNc de una biblioteca de plásmidos a una secuencia de oligonucleótidos acoplada a la biotina, posterior extracción de los plásmidos con ayuda de perlas magnéticas acopladas a estreptavidina ("beads"). Control del resultado por medio de PCR diagnóstico y doble repetición de los pasos tras la retransformación de la fracción de plásmido obtenida, hasta la obtención del clon único. Se emplearon las siguientes combinaciones de imprimadores:

(1) oligonucleótidos, con los que se clonó la longitud total de la fracción de gen:

para ee3_1-h:

- ee3_1-5'biotin1-hs: AATTCCTCATCTATGCCTGTCTGCT

- ee3_1-3'bloque1-hs:

GCTGTTCTCTGTGCTGCTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATC

- ee3_1-5'bloque1-hs:

ATGAACCTGAGGGGCGCTCTTCCAGGACTTCAACCCGAGTA

- ee3_1-1s-hs: TGCTCCAATATGGCTGTGGA

- ee3_1_1as-hs: CTCdíATGACCTGTCATGTC

- ee3_1-2s-h: GACAGAGCTTAAGTGGACTG

- ee3_1-2as-h: TACAGTTCCTACTGACTGCC

- ee3_1-5'bloque2-h:

ACGCACTCTCTCCGCCTTCCTCTGCCCCCTCGTTCACCCC

- ee3_1-5'biotin2-h: GCAGACCAGAACCAGTACTGGAGCT

- ee3_1-3'bloque2-h:

GGGTCTCCAGGTACGTCCATCTCATGCCTTGTTTGCATCC

para ee3_1-m:

- ee3_1-5'biotin1-m: ATTCCTCATCTATGCCTGTCTGCTG

ES 2 342 264 T3

-ee3_1-3'bloque1-m:

CTGTTCTCTGTGCTACTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATCA

-ee3_1-5'bloque1-m:

TGAACCTGAGGGGCGCTCTTTCAGGACTTCAACCCGAGTAA

- ee3_1-1s-m: GGATGGCATCATTCAATGGAG

- ee3_1-1as-m: GAACAATGGCATGAAGACCAG

- ee3_1-2s-m: ACTGAGCTGGATGACCATTGT

- ee3_1-2as-m: TCCTCACTATCTTCATGGTGG

- ee3_1-5'biotin2-m: TCATCACCCAGAGCCCTGGCAAGTA

- ee3_1-5'bloque2-m:

CCTAAAATTGCACCTATGTTCCGCAAGAAGGCCAGGGDÍA

- ee3_1-3'bloque2-m:

TGTCCTTCCTCCACCCAACTAAATATTGAAATGCCAGAC

para ee3_2-h:

- ee3_c2-1as-h: TGAAGTGCAGGATGTTGACC

- ee3_c2-1s-h: TCATCCAATGGAGCTACTGG

- ee3_c2-5'bloque1-h:

ATGAACCCAGGGGCGCTGTTCCAGGACTTCAACCCAGTA

- ee3_c2-5'biotin1-h: AGTTTCTCATCTACACCTGCCTGCT

- ee3_c2-3'bloque1-h:

GCTCTTCTCGGTGCTGCTGCCCCTCCGCCTGGACGGCATC

para ee3_2-m:

- ee3_c2-3'bloque1-m:

ACTCTTCTCCGTGCTGCTGCCCCTGCGCCTGGACGGCATC

- ee3_c2-5'biotin1-m: AGTTCCTCATTTATGCCTGCTTGCT

- ee3_c2-1as-m: TGGATAATCCTGTCCAGCCT

- ee3_c2-1s-m: ATCATCCAGTGGAGCTACTG

- ee3_c2-5'bloque1-m:

ATGAACCCAGGGGCGCTGTTCCAGGACTTCAACCCAGTA

- ee3_c2-m-2s: TGTGGAAGCTCCTGGTCATCGT

- ee3_c2-m-2as: GATAATCCTGTCCAGCCTCAGG

- ee3_c2-5'bloque2-m:

ES 2 342 264 T3

GAAGCTCCTGGTCATCGTGGGCGCCTCGGTGGGTGCGGGC

- ee3_c2-5'biotin2-m: GTGTGGGCCCCGCAACCCACGCTACC

- ee3_c2-3'bloque2-m:

GTACAGAGGGGGAAGCCTGCGTGGAATTCAAAGCCATGCT

- ee3_c2-5'biotin3-m: ACAGAGCCCTGGGAAATATGTGCCT

- ee3_c2-3'bloque3-m:

CCACCTCCCAAGTTAAACATTGATATGCCAGACTAAACTC

- ee3_c2-5'bloque3-m:

TTGCTCCAATGTTTGGAAAGAAGGCGCGGGDÍATTATAAC

para ee3_c3-h :

- ee3_c3-5'bloquel-h:

CCACCTTGGGCACCTTGGTGTCTTTCAAAAGTGCCAGGCT

- ee3_c3-5'biotin1-h: CCTTCCTGCCTCAGGGCCTTTGCAC

- ee3_c3-3'bloquel-h:

TTGCTGCTCCCTCCGTTTGAAATACTGTATCCCAGAGAGT

- ee3_c3-1s-h: GGCACCTTGGTGTCTTTCAA

- ee3_c3-1as-h: CAGTCTGAATDÍAGAGCCAG

para ee3_c5-h :

- ee3_c5-1as-h: TCGGAGCTTCTGGAACCAAT

- ee3_c5-1s-h: CCATCAGCTGGATAACGACT

- ee3_c5-5'bloquel-h:

ACCATGGCCATCAGCTGGATAACGACTGTCATCGTGCCCC

- ee3_c5-5'biotin1-h: TGCTCACCTTTGAAGTCCTGCTGGT

- ee3_c5-3'bloquel-h:

TCACAGACTGGATGGCCGCAATACATTCTCCTGTATCTCC

para ee3_c8-h :

- ee3_c8-5'bloquel-h:

AATTTTGGTATATGGTGCAAAAAAAGGGGTCCAATTTCTT

- ee3_c8-5'biotin1-h: CTGCAACTGGCCAGCCAGTTATCTC

- ee3_c8-3'bloquel-h:

AGCATCATTAATTGAADÍAGGAATCCTTACCCCACTGATT

- ee3_c8-1s-h: AACTGGCCAGCCAGTTATCT

ES 2 342 264 T3

- ee3_c8-1as-h: AATGGATTGTTGGGTGCAGC
- ee3_c8-2s-h: CCAGCCAGTTATCTCAGCATCA
- ee3_c8-2as-h: ACCATGGCATGTGTATCCCAGA

(2) Por otra parte, se clonó la zona codificadora de las secuencias de ee3 en vectores compatibles con GATEWAY (tm), para poder efectuar análisis funcionales. Para ello se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

para ee3_1-h:

- ee3_1_h_B1:

GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TACCATGAACCTGAGGGGCTCTTCCA

- ee3_1_h_B2:

GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
CTAATCTGGCATTTCGATATTTAATTTGGGAGGT

- ee3_1-h-C-fus-B2:

GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
GCATTTTCGATATTTAATTTGGGAGGTGGGAG

para ee3_2-h :

- ee3_c2-h-B1:

GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCTACC
ATGAACCCCAGGGGCTGTTCC

- ee3_c2-h-B2:

GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
TTAATCTGGCATATCAATATTTAACTTGGGAGGG

- ee3_c2-h-c-fus-B2:

GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
ATCTGGCATATCAATATTTAACTTGGGAGGG

para ee3_c2-m :

- ee3_c2-m-B1:

GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TCTACCATGAACCCCAGGGGCTGTTCC

- ee3_c2-m-B2:

GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
TTAGTCTGGCATATCAATGTTTAACTTGGGAG

(c) Fabricación de la biblioteca de ADNc humano

Con el equipo de síntesis de ADNc del Fab. Stratagene (Amsterdam, Holanda) se fabricaron, partiendo de 2 µg de ARNm cerebral fetal humano (Fab. Clontech, Heidelberg, Alemania) y de 5 µg de ARNm de cerebro de ratón adulto, las bibliotecas apropiadas de ADNc. Además, se procedió esencialmente de manera correspondiente a las descripciones del fabricante. Para la síntesis del ADNc de cadena primaria se empleó un imprimador oligodT según las descripciones del fabricante. Los fragmentos de ADNc de doble cadena compatibles con la clonación (Eco-RI/XhoI) se seleccionaron por su tamaño (según las descripciones del fabricante/Fab. Stratagene) y se ligaron en el vector de plásmidos pBluescript SKII (Stratagene). La ligación se transformó mediante electroporación en *E. coli* (DH10B,

Gibco) y se amplificó sobre placas de agar LB-ampicilina. El ADN plásmido se aisló por medio de lisis alcalina y cromatografía de intercambiador de iones (QIAfilter-Kit, Fab. Qiagen, Hilden, Alemania).

La complejidad de clones simples ascendió, para el banco de ADNc cerebral humano, a 4 millones. De cada banco de ADNc se analizaron clones simples según el principio de Zusi según los tamaños de inserto, que mostraron una distribución de tamaños de 800 bp hasta 4.5 kB, la longitud media de los insertos de ADNc alcanzó, para el banco humano, aprox. 1,2 kB.

Ejemplo de ejecución 2

Regulación de ee3_1 mediante eritropoetina (EPO)

ee3_1 se identificó como producto génico altamente regulado en cerebros de ratones EPO-transgénicos (líneas-ratón tg6 y tg21).

Los ratones empleados para los experimentos conformes a la invención se caracterizaron primero repetidas veces en lo que a su constitución se refiere (Ruschitzka, *et al.*, 2000, *Porc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11609-13.; Wagner, *et al.*, 2001, *Blood*, 97, 536-42.; Comossner, *et al.*, 2001, *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 857-64.). Los ratones se fabricaron con una estructura transgénica por el procedimiento descrito por (Hergersberg *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 4, 359-366). Esta estructura consiste en un promotor de PDGF y la secuencia codificadora para eritropoetina. Se produjeron además varias líneas transgénicas, de las que se analizaron las tg6 y tg21 presentes. Sólo tg6 ofrecía una expresión de EPO sistemáticamente elevada, lo que se probó mediante investigaciones del suero por el método de Ruschitzka, *et al.* (2000, *Porc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11609-13). La línea tg21 no arrojó ningún nivel de EPO sistemáticamente elevado. De manera análoga a los resultados de Sasahara, *et al.* (1991, *Cell*, 64, 217-27.) puede partirse de la base de que el fragmento de promotor de PDGF empleado produce una expresión de la EPO transgénica, especialmente en las células neuronales.

En los ratones de la línea tg6, la elevada expresión sistemática de EPO conlleva un claro aumento de la eritropoesis, con la consecuencia de una poliglobulia hasta un hematocrito de 0.8 y un volumen sanguíneo claramente elevado (hasta 4.0 ml) (Wagner, *et al.*, 2001, *Blood*, 97, 536-42.).

La línea tg21 no presenta, en contraste, ninguna fuerte peculiaridad fenotípica.

Los productos de ARN, por ejemplo, del gen ee3_1 se expresaron de manera reforzada en el cerebro de ratones, que sobreexpresan la eritropoietina transgénica (líneas tg6 y tg21 (Ruschitzka, *et al.*, 2000, *Porc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11609-13., Wagner, *et al.*, 2001, *Blood*, 97, 536-42., Wiessner, *et al.*, 2001, *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 857-64.)), y se identificaron mediante un experimento de selección de ADN. La importancia fisiológica y patofisiológica de la regulación transcripcional de ee3_1 mediante la sobreexpresión de EPO se se probó mediante la situación de otro producto génico regulado, o sea la alfa-globina. Esta se encuentra asimismo regulada con ayuda de un análisis de transcripción con microselecciones en ambas líneas transgénicas. Esto podía comprobarse con ayuda del sistema Lightcycler (Fig. 2). El aumento se muestra, entre otros, en los arenales del hipocampo (hibridación *in situ*).

Ejemplo de ejecución 3

Expresión de las secuencias conformes a la invención en células de mamíferos y fabricación de líneas celulares estables

El esquema del marco abierto de lectura de los genes de la familia ee3 se clonó en un vector eucariota de expresión habitual de la serie de ADNpc de Clontech (Heidelberg, Alemania). Con los plásmidos de expresión así obtenidos se transfectaron células renales embrionarias humanas (HEK293) particularmente por el método del calciofosfato, células CHO y CHO-dhfr por medio de lipofectamina o células COS por medio de bolitas de DEAE-dextrano y se seleccionaron con 400-500 mg/ml de G418. Tres semanas después de la selección se seleccionaron clones individuales y se expandieron para el análisis ulterior. Se analizaron aprox. 30 clones mediante los procedimientos Northern-Blot y Western-Blot. Para la selección de las células CHO-dhfr transfectadas en medio libre de nucleótidos se clonó el esquema de lectura abierto de los genes de la familia ee3 en un vector de expresión eucariota con el gen de dihidrofoloreductasa como marcador de selección y se empleó el plásmido de expresión resultante para la transfección. Las células CHO-dhfr transfectadas, pero también otras células transfectadas de este modo, se pueden tratar con concentraciones crecientes de metotrexato y se trataron de esta manera, seleccionándose células que expresen elevadas concentraciones y, por tanto, también concentraciones elevadas de receptor.

Ejemplo de ejecución 4

Experimento Yeast-2-hybrid con una fracción carboxiterminal de ee3_1

En el sistema yeast-2-hybrid se clonó para la identificación de participantes potenciales en la interacción de la parte carboxiterminal de ee3_1 conforme a la invención en el vector "bait" pGBKT7 (Clontech).

ES 2 342 264 T3

La secuencia proteica empleada fue:

**KGGNHWWFGIRKDFCQELLEIFPFLREYGNISYDLHHEDNEETEETPVPEPPKIAPMFRK
KARVVITQSPGKYVLPPLNIEMPD,**

La correspondiente secuencia de ácidos nucleicos fue:

**AAGGGAGGAAACCACTGGTGGTTTGGTATCCGCAAAGATTTCTGTCAGTTTCTGCTTGAA
ATCTTCCCATTCTACGAGAATATGGAAACATTTCTATGATCTCCATCACGAAGATAAT
GAAGAAACCGAAGAGACCCAGTTCCGGAGCCCCCTAAAATCGCACCCATGTTTCGAAAG
AAGGCCAGGGTGGTCATTACCCAGAGCCCTGGGAAGTATGTGCTCCCACCTCCCAAATTA
AATATCGAAATGCCAGAT**

La búsqueda de los participantes en la interacción se efectuó con una biblioteca cerebral humana, es decir, por los procedimientos estándar familiares al experto (Mating procedimiento, Fab. Clontech). Se obtuvieron además 2 clones (clon 11 y 36), que contenían las secuencias solapantes.

La secuencia en el clon 11 identificado fue:

**GGGGACTCGGCCCTGAACGAGCAGGAGAAGGAGTTGCAGCGGCGGCTGAAGCGTCTNTAC
CCGGCCGTGGACNAACAAGAGACGCCGTTGCCTCGGTCCTGGAGCCCGAAGGACAAGTTC
AGCNTACATCGGCCTNTNTNAGAACAACCTGCGGGTGCCTACAAAGGTCATGGCAAAAC
CCCAAAAGATGCCGCGTCAGTTGAGCCACGCATCCAATACCAGCAGCCTGTGGGATTTA
TTATTTTGAAGTAAAAATTGTCAGTAAGGGAAGAGATGGTTNCATGGGAATTGGTCTTTC
TGCTCAAGGNGTGAACATGAATAGACTACCAGGTGGGATAAGCATTATGTTTACCA
TGGGGATGATGGACATTCGTTTTGTTCTTCTGGAACCTTATGGACCAACTTT
CACTACTGGTGATGTCATTGGCTGTTGTGTTAATCTTATCAACAATACCTGCTTTTACAC
CAAGAATGGACATAGTTTAGGTATTGCTTTTCACTGACCTACCGCCAAATTTGTATCCTAC
TGTGGGGCTTCAAACACCAGGAGAAGTGGTTCGATGCCAATTTTGGGCAACATCCTTTCGT
GTTTGATATAGAAGACTATNTGCGGGAGTGGAGAACCAGGCAATCCAGGCNCAGATAGATCG
ATT.**

El producto génico interactuante podía identificarse como RANBPM o RANBP9 (Nishitani H, Hirose E, Uchimura Y, Nakamura M, Umeda M, Nishii K, Mori N, Nishimoto T (2001) Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large proteína complex. Gene 272:25-33). Asimismo podían identificarse otras dos proteínas interactuantes, o sea, Map1a y Map1b. De manera interesante, en ambas proteínas, la parte carboxiterminal se identificó como interactuante. Allí se encuentra una zona homóloga en ambas proteínas. Se muestra una alineación de Map1a y Map1b en esta zona, representando la secuencia superior Map1a y la inferior Map1b (según datos de salida del software utilizado):

ALIGN calculates a global alignment of two sequences

version 2.0uPlease cite: Myers and Miller, CABIOS (1989) 4: 11-17

Sequence 1 212 aa vs.

Sequence 2 177 aa

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2

ES 2 342 264 T3

43.6% identity: Global alignment score: 614

```

5      10      20      30      40      50
/tmp/f REKVQGRVGRAPGKAKPASPARRLDLRGRSEPTPGKGPADRASRAPPRP--RSTTSQVT
Sequen -----KRESVEKAAPTTTPEVRAARGEER
                        10      20

10     60      70      80      90      100     110
/tmp/f PAEEKDGHSPMSKGLVNGLRAGPMALSSKGSS----GAPVYVDLAYIPNXCSGKTAOLDP
Sequen DKETKNAANASAKRSATATAGPGTTTKTKSSAVFPGLPVYLDLCYIPNHSNSKNVDVEF
      30      40      50      60      70      80

15     120     130     140     150     160     170
/tmp/f FRRVRASYVYVSGNDPANGXPRAVLDALEGRAGWGENLOVTLIPTHDEVTREWYQOT
Sequen FXRVRSSYYVSGNDPAEEFSPRAVLDALEGRAGWGSNMQVTLIPTHOSEVMREWYQET
20     90      100     110     120     130     140

      180     190     200     210
/tmp/f HEQQQDLNVLVLASTXTVVMQDESFPACKLSSEKPPSL
Sequen HEQQQDLNIMVLASSSTVVMQDESFPACKIEL-----
      150     160     170

```

Ejemplo de ejecución 5

Secuencias homólogas humanas de *ee3_1/ee3_2*

(a) para cromosoma 5q33.1

Con ayuda de blastos t se determinó otra secuencia homóloga en Cóntigos AC11406.00015 (según datos de salida del software utilizado):

>AC011406.00015

Length: 40,820

Minus StrandHSPs:

Score = 389 (136.9 bits), Expect = 1.3e-41, Sum P(3) = 1.3e-41

Identities = 72/303 (71%), Positives = 78/303 (77%), Frame = -1

```

Query: 224  LLTFEILLVHKLDGHNAFSCIPFVPLWL SLITLMATTFGQKGGNHHWFGIRKDFCQFLL 283
           LLTFE+LLVH+LDG N FSCI I VPLWL L+TLM TTF K GNHWWFGIR+DFCQFLL

```

Sbjct:14312

LLTFEVLLVHRLDGRNTFSCISISVPLWLLLLTLMTTTTFRPKRGNH WWFGIRRD CQFLL 14253

```

Query: 284  EIFPFLREYGNISYDLHHEONXXXXXXXXXXXXXKIAFMERK 324
           EIFPFLREYGNISYDLH ED+ KIAF+E K

```

Sbjct: 14252 EIFPFLREYGNISYDLHQEDSEGAETLVPEAPKIAPVFGK 14010

Score = 86 (30.3 bits), Expect = 1.3e-41, Sum P(3) = 1.3e-41

Identities = 15/51 (88%), Positives = 16/51 (94%), Frame = -3

```

Query: 334  PGKYVLPPPKNLNIEMPD 350
           PGKYV PPPKNLNI+MPD

```

ES 2 342 264 T3

Sbjct: 13992 PGKYVPPPPKLNIDMPD 13942 Score = 67 (23.6 bits), Expect = 1.3e-41, Sum P(3) = 1.3e-41
Identities - 12/57 (63%), Positives - 17/57 (89%), Frame = -2

Query: 206 QRRTHITMALSWM-TIVVP 223
Q RTH+TMA+SW+T ++VP

Sbjct: 14368 Q*RTHVTMAISWITTVIVP 14312

Podía obtenerse el ADNc apropiado, evidentemente la traducción se origina sólo en un fragmento carboxiterminal, homólogo a las proteínas ee3.

La comparación de las secuencias con ee3_1_m tuvo la siguiente apariencia (según datos de salida del software utilizado):

ALIGN calculates a global alignment of two sequences

version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989) 4:11-17

Sequence 1 350 aa vs.

Sequence 2 148 aa

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2

29.4% identity; Global alignment score: 649

10 20 30 40 50 60
/tmp/f MNLRLGLFQDFNPSKFLIYACLLLESVLLALRLDGI IQWSYWAVFAPFWLWKLMVIVGASV

Sequen -----

70 80 90 100 110 120
/tmp/f GTGWARNPQYRAEGETCVEFKAMLIAGVGIHLLLMFEVLVCDRIERGSHEFWLLVEMPLF

Sequen -----

130 140 150 160 170 180
/tmp/f FVSPVSAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDKIIHWPWLVCVPLWILMS

Sequen -----

190 200 210 220 230 240
/tmp/f FLCLVWLYIVWSVLFIRSMOVIAEQRRTHITMALSWM-TIVVPLLTTEILLVHKLDGHNA

Sequen -----MRTTRAV-KNTRDH-GHQLQ-NDCHRALITFEVLLVHRLDGRNT
10 20 30 40

250 260 270 280 290 300
/tmp/f FSCIPIFVPLWLSLITLMATTFGQKGNHWWFGIRKDFCQFLEIFPFLAEYGNISYDLK

Sequen FSCISISVPLWLLLLLTMTTTFPKRGNHWWFGIRADFCQFLEIFPFLAEYGNISYDLK
50 60 70 80 90 100

310 320 330 340 350
/tmp/f HEDSEETEETPVPEPPKIAPMFRKKARVVITQSPGKYVLPFPFKLNIEMPD

Sequen QEDSEGAETLVPEAPKIAPVF-GKTRVLI--PGKYVPPPPKLNIDMPD
110 120 130 140

ES 2 342 264 T3

La generación sólo de un fragmento de GPCR es segura, ya que las secuencias de ADNc obtenidas coinciden totalmente con los datos genómicos, y muestran la presencia de un codón de parada in-frame antes del ATG (véase secuencia) (según datos de salida del software utilizado):

Minus Strand HSPs:

Score = 6976 (1046.7 bits), Expect = 0.0, Sum P(2) = 0.0

Identities = 1396/1397 (100%), Positives - 1396/1397 (100%).

Strand = Minus/Plus.

Query:	2499	AGGTTTAGACCTTAAAATAATACCTGATTGTTGGCCACTTCTGGTTAAGGCCACTCTCTC	2440
Sbjct:	13048	AAGTTTAGACCTTAAAATAATACCTGATTGTTGGCCACTTCTGGTTAAGGCCACTCTCTC	13107
Query:	2439	CAGCTTTCAGTGACAGGTAATGCTTTACATTACACCAACTAATATTCTAAGATTCTTA	2380
Sbjct:	13108	CAGCTTTCAGTGACAGGTAATGCTTTACATTACACCAACTAATATTCTAAGATTCTTA	13167
Query:	2379	GAAATGGACAAACCACTTGTGCTTATTTTGATTGTTTCTGGACAGTTACTACCTGTGTG	2320
Sbjct:	13168	GAAATGGACAAACCACTTGTGCTTATTTTGATTGTTTCTGGACAGTTACTACCTGTGTG	13227
Query:	2319	GAAAAATTGAGGGTGCTAAACAACAGTGTCACCTTTATGGCCTGGTACTACACTAGAGCAT	2260
Sbjct:	13228	GAAAAATTGAGGGTGCTAAACAACAGTGTCACCTTTATGGCCTGGTACTACACTAGAGCAT	13287
Query:	2259	GTCACAAGTTGCGAAGGGCGGTGGCTGCTCCCTCTACTAACGATACTACCAGAGACCTT	2200
Sbjct:	13288	GTCACAAGTTGCGAAGGGCGGTGGCTGCTCCCTCTACTAACGATACTACCAGAGACCTT	13347
Query:	2199	CACACAGTGACAGACCTCGGTTACTAACACCTAAATATTAAACCCATGGGATTTCAGTC	2140
Sbjct:	13348	CACACAGTGACAGACCTCGGTTACTAACACCTAAATATTAAACCCATGGGATTTCAGTC	13407
Query:	2139	CCTATGTTTATGTCTAGTACTTGGGTAAGCTCCACACCAGGCACATATTGTTTTATGCAA	2080
Sbjct:	13408	CCTATGTTTATGTCTAGTACTTGGGTAAGCTCCACACCAGGCACATATTGTTTTATGCAA	13467
Query:	2079	TCTTTAAGACATCTGCAATAGACAATATGCAGTTTAAACAACTGTGAGGTTTATAAC	2020
Sbjct:	13468	TCTTTAAGACATCTGCAATAGACAATATGCAGTTTAAACAACTGTGAGGTTTATAAC	13527
Query:	2019	AGAGAATTCTTTACGTTTGCTATTATGTCTATAACAGGCACAATCTGAAATACAATTTGT	1960
Sbjct:	13528	AGAGAATTCTTTACGTTTGCTATTATGTCTATAACAGGCACAATCTGAAATACAATTTGT	13587
Query:	1959	ACTAGCAGTGTATAAAAATACTTTTAAACGATACTTTCGATAGGTACAGTAGCACCTTAA	1900

ES 2 342 264 T3

Sbjct: 13588 ACTAGCAGTGTATAAAATACTTTTAAACGATACTTTTCGATAGGTACAGTAGCACTTTAA 13647

Query: 1899 AGAAAACCACTGTGTAGTTATTCTTTTGAGGACCTACTAAAACAGTTCAACTTACTGCC 1840
 |||||

Sbjct: 13648 AGAAAACCACTGTGTAGTTATTCTTTTGAGGACCTACTAAAACAGTTCAACTTACTGCC 13707

Query: 1839 CCCAGCTACATCTAAAGCAGCAATGTGGAAAGCAAGTTCTCTTACCCAGGTACACACCAC 1790
 |||||

Sbjct: 13708 CCCAGCTACATCTAAAGCAGCAATGTGGAAAGCAAGTTCTCTTACCCAGGTACACACCAC 13767

Query: 1779 ACACACCCACATGCTGAAACAGTCTCCATTTATGATGCATGCTGATGAGGCATCAATCTC 1720
 |||||

Sbjct: 13768 ACACACCCACATGCTGAAACAGTCTCCATTTATGATGCATGCTGATGAGGCATCAATCTC 13827

Query: 1719 AAACAGGGTATGAGATGACAGTGTGGTGCCTGTTCCATTTCCAGGTTTGGTATGAAT 1660
 |||||

Sbjct: 13828 AAACAGGGTATGAGATGACAGTGTGGTGCCTGTTCCATTTCCAGGTTTGGTATGAAT 13887

Query: 1659 GAACAGAGGCAAGGCAAGGTGGAGTCTGTGTATGGGCCCTCTCTAGGAGTTTAATCTG 1600
 |||||

Sbjct: 13888 GAACAGAGGCAAGGCAAGGTGGAGTCTGTGTATGGGCCCTCTCTAGGAGTTTAATCTG 13947

Query: 1599 GCATATCAATATTTAACTTGGGAGGTGGGGGAACATATTTCCAGGGATTAAACTACCT 1540
 |||||

Sbjct: 13948 GCATATCAATATTTAACTTGGGAGGTGGGGGAACATATTTCCAGGGATTAAACTACCT 14007

Query: 1539 GGTCTTCCCAAACACTGGAGCAATTTTCGGAGCTTCTGGAACCAATGTTTCTTCAGCAC 1480
 |||||

Sbjct: 14008 GGTCTTCCCAAACACTGGAGCAATTTTCGGAGCTTCTGGAACCAATGTTTCTTCAGCAC 14067

Query: 1479 TTCGCTATCTTCTGATGGAGATCATATGAAATGTTCCCATATTCTCTTAAAAATGGGAA 1420
 |||||

Sbjct: 14068 TTCGCTATCTTCTGATGGAGATCATATGAAATGTTCCCATATTCTCTTAAAAATGGGAA 14127

Query: 1419 AATTTCAAGCAGAACTGGCAGAAGTCTCTGCGAATACCAAAACCACCAATGATTGCCCT 1360
 |||||

Sbjct: 14128 AATTTCAAGCAGAACTGGCAGAAGTCTCTGCGAATACCAAAACCACCAATGATTGCCCT 14187

Query: 1359 TTTTGGCCTAAATGTTGTGGTCATTAAAGTTAGTAACAAAAGCCAAAGGGGGACAGATAT 1300
 |||||

Sbjct: 14188 TTTTGGCCTAAATGTTGTGGTCATTAAAGTTAGTAACAAAAGCCAAAGGGGGACAGATAT 14247

Query: 1299 GGAGATACAGGAGAATGTATTGCGGCCATCCAGTCTGTGAACCAGCAGGACTTCAAAGGT 1240
 |||||

Sbjct: 14248 GGAGATACAGGAGAATGTATTGCGGCCATCCAGTCTGTGAACCAGCAGGACTTCAAAGGT 14307

Query: 1239 GAGCAGGGCAGATGACAGTCGTTATCCAGCTGATGGCCATCGTCACGTGTGTTCTTCAC 1180
 |||||

Sbjct: 14308 GAGCAGGGCAGATGACAGTCGTTATCCAGCTGATGGCCATCGTCACGTGTGTTCTTCAC 14367

Query: 1179 TGCCCTGGTAGTTCTCATTTGTTCTTTTCTAGTTTCTTAAGGTAGAAGCTGATGTCATT 1120
 |||||

Sbjct: 14368 TGCCCTGGTAGTTCTCATTTGTTCTTTTCTAGTTTCTTAAGGTAGAAGCTGATGTCATT 14427

Query: 1119 GATTCAAAACCTTTCTT 1103
 |||||

Sbjct: 14428 GATTCAAAACCTTTCTT 14444

(b) en el cromosoma 8q11.22

Se encuentra otra secuencia homóloga en cóntigos de Ensembl Ac034174.

La secuencia proteica de una fracción de nucleótido homóloga fue:

AATTTGGTATATGGTGCAAAAAAGGGGTCCAATTTCTCTGCAACTGGCCAGCCAGTTATCTCAGCATCATTAAATTGA
 ATAGGGAATCCTTACCCCACTGATTGTTTTGTGTCAGGTTTGTCAAAGATGAAATAGTTGTAGGTGTATGGTCTTATTCT
 GGGTTCCTCATCTGTTCCTGCTGATATGTGTCTGGTTTGAAGTGTGCTGCTGTTTGGTTACTATAGCCCTGTT
 TAAATCAAATGGAGTGATGCCGCCAGTTGTATTTATTTATTTTATTATTAAGTTCTGGGATACACATGCC
 ATGGTGGTTTGTGACCCCAACATCCATTATCTATGTTGTTTTCTC

ES 2 342 264 T3

(c) en el cromosoma 3p25.3

Se encuentra una secuencia homóloga en el cromosoma 3:

```
CCACCTTGGGCACCTTGGTGTCTTTCAAAAGTGCCAGGCTCCTTCCTGCCTCAGGGCCTTTGCACTTGCTGCTCCCTCCG
TTTGAAATACTGTATCCAGAGAGTCCCATTTCTGGCTCCTAATTCAGACTGA
```

(d) en el cromosoma Xp21.1 (según la salida del software utilizado)

>AC027722.00010 Length: 3,576 Minus Strand HSPs:

Score = 65 (22.9 bits), Expect = 4.1e+02, Sum P(2) = 1.0

Identities = 11/90 (37%), Positives = 19/90 (63%), Frame = -1

```
Query: 159  RLDKIIHWPVLVVCVPLWI-LMSFLCLVVL 187
           R+   ++W  L  C+P+W+  +SF CL+  L
```

Sbjct: 1848 RIMSSLNWDLSLTSCLPIWMTFISFSLIAL 1759

Score = 57 (20.1 bits), Expect = 4.1e+02, Sum P(2) = 1.0

Identities = 16/147 (33%), Positives = 24/147 (49%), Frame = -2

```
Query: 88  VGIHLLLLMFEVLVCDRIERG-SH-FWLLVFMPLFFVSPVSVAACVWGF 134
          +G   L++ F   V D++  G  H FW L  +PLF VS      C + +
```

Sbjct: 2507 IGCCFLIVCFVCFVEDQMYVGLQHYFWALYSVPLFCVSVFVPVPCSFSY 2361

Las secuencias de nucleótidos apropiadas para estas secciones de homología son:

```
ATCATGTATCTCTAAACTGGGATAGTTTGACTTCCTGTCTTCCTATTTGGATGACTTTTATTTCTTTCTCTTGCTGAT
TGCTCTGG
```

y

```
ATAGGGTGTGTGTTTCCTCATTTGTTTGTCTGCTTTGTGGAAGATCAGATGTATGTAGGTTTGCAGCATTATTTCTG
GGCTCTCTATTTCTGTTCCTTTGTTCTGTGTCTGTGTTGTACCAGTACCATGTTCTTTTAGTTACT
```

Evidentemente falta la secuencia de consenso DRI.

(d) Productos alternativos de empalme ee3_1b_h y ee3_1c_h

Se encuentra un producto de empalme alternativo al producto génico humano ee3_1_h, o sea ee3_1b_h (ver Fig. 11B, número de secuencia 3B). Este se obtiene a partir de un centro de donación de empalme de consenso en Exon 3, y conlleva un esquema de lectura abierto modificado ("open reading frame") con términos carboxílicos modificados, y parada más temprana de la traducción. De ello se obtiene una proteína (166 aminoácidos, Pm: 19,2 kD), que corta

según el cuarto dominio TM (ver Fig. 15B, número de secuencia 7B). Por otra parte, se identificó otro producto de empalme alternativo, o sea ee3_1c_h (ver la Fig. 11C, número de secuencia 3C) con la secuencia proteica perteneciente conforme a la Figura 15C (número de secuencia 7C), truncada tras el 2º dominio TM. Los productos de empalme podían identificarse en el curso de las clonaciones y secuenciaciones con ayuda del procedimiento de clonación de Shepard *et al.* (véase el Ejemplo 1).

Una previsión de las zonas TM para ee3_1b_h tiene el siguiente aspecto (según la salida del software utilizado):

```

----> STRONGLY preferred model: N-terminus outside
4 strong transmembrane helices, total score : 6315
#      from   to   length  score  orientation
1       15    33   (19)    2066   o-i         (o:outside, i: inside)
2       40    56   (17)    1143   i-o
3       83   102   (20)    1765   o-i
4      112   134   (23)    1341   i-o.

```

Este producto de empalme tiene una importancia funcional en la regulación de la función de los receptores Vollänge, compárese, por ejemplo, receptor de V2-Vasopresina- (Zhu y Wess, 1998, Biochemistry, 37, 15773-84; Schulz, *et al.*, 2000, J Biol Chem, 275, 2381-9)). Ya que las proteínas GPCR están sujetas a homo- o heterodimerizaciones (Bouvier, 2001, Nat Rev Neurosci, 2, 274-86.), estas formas truncadas de las secuencias conformes a la invención pueden desempeñar un papel predominantemente negativo.

Con ello se muestra conforme a la invención particularmente el empleo de estas formas de empalme (por ejemplo, como ADN desnudo, en un vector de expresión conforme a la invención, como secuencia de proteínas conformes a la invención, etc.) de las proteínas ee3 conformes a la invención, así como las variantes de estas formas de empalme para la fabricación de fármacos para el tratamiento de enfermedades, tal y como se he citado anteriormente. La revelación comprende asimismo también su empleo para la investigación de la influenciabilidad farmacológica de lo receptores de la familia ee3 conformes a la invención.

Ejemplo de ejecución 6

Datos topológicos proteicos de las proteínas de la familia ee3

Una búsqueda TM(Transmembranria) con el Programa TMPred origina un modelo muy favorecido (según salida del software utilizado):

(a) ee3_1

```

----> STRONGLY preferred model: N-terminus outside
7 strong transmembrane helices, total score : 11863
#      from   to   length  score  orientation
1       15    33   (19)    2066   o-i         FLIYACLLLFVLLALRLD
2       40    56   (17)    1143   i-o         YWAVFAPLWLWKLMLVIV
3       83   102   (20)    1765   o-i         AMLIAVGILHLLLMFEVLVC
4      112   134   (23)    1341   i-o         WLLVFMPLFFVSPVSVAACVWGF
5      168   191   (24)    2978   o-i         WLWCVPLWLMSFLCLWLYYIV
6      211   227   (17)    1070   i-o         ITMALSWMTIWPLLTFF
7      240   258   (19)    1500   o-i         AFSCIPIFVPLWLSLITLM

```

Las distancias de los segmentos entre los dominios TM ascienden a 15, 7, 27, 10, 34, 20, 13 AS, el radical intracelular tiene una longitud de 92 AS.

ES 2 342 264 T3

(b) para ee3_2 se origina una imagen idéntica (según salida del software utilizado).

5	----> STRONGLY preferred model: N-terminus outside					
	7 strong transmembrane helices, total score : 12351					
	#	from	to	length	score	orientation
	1	15	36	(22)	1811	o-i
10	2	32	50	(19)	1219	i-o
	3	83	102	(20)	1733	o-i
	4	112	134	(23)	1330	i-o
15	5	168	191	(24)	3068	o-i
	6	211	227	(17)	1239	i-o
	7	243	260	(18)	1951	o-i

20

Las distancias de los segmentos entre los dominios TM ascienden a 15, 0, 33, 10, 34, 20, 16 AS, el radical intracelular tiene una longitud de 90 AS.

25 (c) Como experimento de control sirve para la comparación la topología del receptor CCR-5 (pertenece asimismo a la clase de los receptores 7TM) gracias al estado actual de la técnica:

30	1	51	76	(26)	2895	o-i
	2	89	108	(20)	1155	i-o
	3	124	145	(22)	1163	o-i
35	4	163	187	(25)	1415	i-o
	5	220	239	(20)	2183	o-i
	6	260	281	(22)	1782	i-o
40	7	298	325	(28)	1325	o-i

45 Las distancias de los segmentos entre los dominios TM ascienden a 51, 13, 16, 18, 33, 21 y 17 AS, el radical intracelular tiene una longitud de 46 AS.

50 Una comparación de la topología general (se muestra el número de aminoácidos en las respectivas proporciones transmembranarias de las proteínas, es decir, término N y término C y las proporciones en bucle) de los receptores 7TM, Bradykinin-2, CXCR5, Galanina-2 y Anafiloxina C5a, vecinos extraídos origina la siguiente imagen, en comparación con la ee3_1 conforme a la invención:

	rezeptor	n-terminus	1	2	3	4	5	6	rest
55	C5a	39	12	14	22	28	16	20	45
	BK-2	63	13	14	20	27	26	24	56
	galanin2	28	10	17	19	24	25	1	105
60	cxcr-5	55	11	14	21	30	18	23	46
	mw	43.3	11.7	15.0	20.3	26.3	22.3	15.0	63.0
	ee3_1	15	7	27	10	34	20	13	92

65

Se encuentra una clara similitud de la topología general en estas proteínas.

Ejemplo de ejecución 7

Determinación de motivos y secuencias de señales en ee3_1

5 Con el empleo del programa Prosite (salida del software):

10 Matching pattern PS00006 CK2_PHOSPHO_SITE
AS 77: TCVE
Total matches: 1
Matching pattern PS00008 MYRISTYL
AS 57: GASVGT
15 AS 263: GQKGGN
Total matches: 2
Matching pattern PS00001 ASN_GLYCOSYLATION
20 AS 294: NISY
Total matches: 1

25 Por lo tanto, se encuentra una posición de fosforilación de CK2 en la posición 77, una posición de glicosilación de asparagina en la posición 294 y 2 puntos de miristilación en las posiciones 57 y 263 (numeración continua conforme a la Figura 7). No se encuentra ningún punto típico de fosforilación en el término carboxílico.

Ejemplo de ejecución 8

30

Inducción de ee3 mediante una única dosis de eritropoetina

35 Tal y como se mostró en la Fig. 19, ee3_1 se induce en la rata mediante una única inyección intraperitoneal de eritropoetina (Erypo, Janssen; 5000 U/kg Peso corporal) en el plano transcripcional. 6 y 24 h tras la inyección de eritropoetina, se narcotiza a la rata con inyección de rompun/ketanest terminal, y se extrae el cerebro con cuidado. Las ratas de control se trataron con sal común. Para la medición del ARN mensajero de ee3_1 en las ratas se empleó el PCR-RT semicuantitativo en el LightCycler (Roche, Mannheim, Germany). La cuantificación se efectuó mediante la comparación de la fluorescencia relativa de la muestra con una curva estándar par ciclofilina.

40 El ARN completo se aisló del cerebro anterior de las ratas (sin cerebelo y bulbo olfatorio) con el método de Chomczynski/Sacchi (extracción de fenol ácida) seguida de una purificación con el equipo de extracción RNeasy conforme a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Santa Clarita, CA., USA). La concentración de ARN se determinó fotométricamente y se valoró la calidad de todo el ARN mediante electroforesis en gel de la agarosa. El ARN se guardó hasta su uso a -80°C. Tras la transcripción inversa con Superscript II (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) se cuantificaron relativamente los productos de reacción mediante Real-time online PCR por medio de la tecnología LightCycler. Para ello, se emplearon muestras de ARN total del cerebro de tres ratones salvajes y tres ratones tg6 transgénicos. Las secuencias específicas de imprimador de oligonucleótidos significaban para la ciclofilina, 5'ACCCACCGTGTCTTCGAC-3' para el imprimador anterior y 5'CATTGCCATGGACAAGATG-3' para el imprimador posterior, a una temperatura de enlace de 60°C y para el imprimador anterior de ee3_1 de las ratas 5'-GGTGTGGGAGAAATGGCTTA-3', imprimador posterior 5'-ATACCAGCAGAGCCTGGAGA-3'.

55 Para la cuantificación se amplificaron diluciones de ADNc seriales de 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243 según el siguiente esquema: desnaturalización inicial durante 5 min a 94°C, amplificación a lo largo de 50 ciclos compuesta por 5s de desnaturalización a 94°C, 10s de enlace a 55 ó 60°C - en función del imprimador específico(s. o.) - y 30 s de extensión a 72°C. al final de cada ciclo se midió la fluorescencia de cada muestra a 80°C durante 10 s. La especificidad del producto de reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y análisis de la curva de fusión (no mostrado). Cada reacción del PCR produjo exactamente un producto de reacción.

60 Para la cuantificación se empleó la fase logarítmica de la reacción del PCR. Además, la curva apropiada dispuso una asíntota. Para la hemoglobina se obtuvo un aumento casi paralelo del haz de rectas, de forma que los aumentos de estas curvas podían acercarse, en comparación con las curvas estándar para la ciclofilina. Las desviaciones estándares de los valores medios para cada dilución de ADNc se determina a partir del producto normalizado del PCR. Las diferencias cuantitativas así obtenidas corresponden a modificaciones relativas de la expresión del ARN en animales transgénicos y salvajes. Todas las reacciones conllevan un único producto de reacción. El factor medio de inducción valió para ee3 tras 6 horas 1,35, y tras 24 h 1,44-avo.

65

Ejemplo de ejecución 9

Distribución de ARN de ee3_1 en el cerebro

Por medio de hibridación *in situ* con una oligosonda marcada radiactivamente se estudió la localización del transcriptor de ee3_1 en el ratón. Para ello se hicieron cortes cerebrales de 15 μ g de espesor con un criostato a -20°, se colocaron sobre un soporte de objetos recubierto de poli-L- lisina y se fijaron en un 4% de paraformaldehído en PBS (f 7.4). el oligonucleótido se marcó radiactivamente por medio de transferasa terminal (Roche Diagnostics, Mannheim) con α -35S-dATP. La marcación se efectuó como hibridación adyacente por un protocolo de Wisden & Morris (*in situ*-hibridization protocols for the brain, Academic Press 1994).

Con la sonda marcada radiactivamente empleada (ee3_1.3as AACGAAGGGCCAGDÍACACAGAGAACAGCAG CAGACAGGCADÍATGAGG) podía hacerse ver la expresión de ee3_1 en el cerebelo (Ce), hipocampo (Hc), giro dentado (dg), y en el córtex (co), particularmente en el córtex entorhinal (ent), en el bulbo olfatorio (olf). Un control sensorial apropiado (ee3_1.3s, CCTCATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTACTGGCCCTTCGTT) no originó ninguna señal específica (no mostrado) (Fig. 20).

Ejemplo de ejecución 10

Representación Immunohistoquímica de la Distribución de ee3_1 en los tejidos del ratón

Se cortaron tejidos embebidos en parafina (2 μ g), se colocaron sobre soportes de objetos pretratados (DAKO, Glostrup, Dinamarca), se dejaron secar al aire toda la noche y, a continuación, se desparefinaron (xilol y serie alcohólica decreciente). Tras un tratamiento de microondas en tampón de citrato a 500W durante 10 min se incubaron los cortes con antisuero de ee3_1 (AS4163) en una dilución de 1:500 durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. La reacción inmune se hizo visible mediante la técnica ABC con DAB como cromogen, correspondientemente a las descripciones del fabricante (DAKO, Glostrup, Denmark). Los controles negativos contienen igualmente cortes tratados, en los que, sin embargo, sólo se ha omitido el anticuerpo primero, así como cortes, en los que, en vez del primer anticuerpo, se empleó el serum preimmune apropiado.

Los resultados de las coloraciones inmunohistoquímicas se representan en la Fig. 22. En conjunto, se muestra una localización de ee3 considerablemente específica de las neuronas, a excepción de algunas estructuras en intestino y pulmón. Frecuentemente se expresa ee3 de neuronas con dianas integradoras (las grandes células piramidales de la capa cortical (Layer) V, células mitrales en el bulbo olfatorio, células de Purkinje en el cerebelo). Las imágenes A-C muestran localizaciones corticales de ee3 en la capa V, con clara tinción de las apófisis neuronales. En el córtex entorhinal puede verse una inmunocoloración más intensiva (C). desde el punto de vista fisiológico, del córtex entorhinal parten informaciones al hipocampo y contribuyen al aprendizaje y memoria.

Las alteraciones del córtex entorhinal se encuentran frecuentemente en pacientes con apoplejía, alzheimer o tras trauma craneoencefálico. Mediante alteraciones del córtex entorhinal pueden aparecer alteraciones comportamentales, que engloban procesamiento ausente de impresiones sensoriales y dificultades de aprendizaje. (Davis *et al.*, *Sólos Res* 50 (2) 77-85 (2001)). Las imágenes D-F muestran la muestra de distribución hipocampal de ee3. Además, es evidente el nítido límite entre la expresión en el sector CA3, y la expresión ausente en los sectores CA2 y CA1. Las neuronas de la región CA1 y, en menor medida, también de la región CA4 son especialmente sensibles a la necrosis y muerte celular libre de inflamación (apoptosis), particularmente cuando existe un daño nervioso central general (por ejemplo, (Hara, *et al.*, *Stroke*, 31, 236-8, (2000)). En contraste a esto, el giro dentado parece estar afectado más bien por un daño necrótico. El giro dentado se pone en contacto con la nueva formación de neuronas tras estímulo patológico (Takagi, *et al.*, *Brain Res*, 831, 283-7, (1999)) (parent, *et al.*, *J Neurosci*, 17, 3727-38, (1997)). En ámbitos de génesis no neocortical se encuentra asimismo ee3: en el cerebelo en las células de Purkinje (G,H), que actúan allí como neurona integradora, y en el bulbo olfatorio en las células de Mitral (I,J). una expresión intensiva de ee3 se encuentra en las células de los ganglio y en las células de los sentidos de la retina (K, L).

Brevemente se mostró el efecto neuroprotector de la eritropoetina en la retina (Junk *et al.*, Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemiareperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6; 99(16):10659-64.; Grimm *et al.*, HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneración. *Nat Med*. 2002 Jul; 8(7):718-24.) Estos dictámenes se basan en que existe un contexto entre la inducción de Eloy la expresión de ee3. ee3 es asimismo fuertemente expresada en las neuronas que pertenecen al sistema motor. Así se encuentra en la médula espinal una expresión específica en las grandes neuronas motoras del telencéfalo (Fig. 22 M) y en las neuronas funcionalmente equivalentes el núcleo motor del núcleo trigémino (Fig.. 22 N).

Esta distribución de ee3 en la médula puede aprovecharse posiblemente para la intervención terapéutica y diagnóstica en esclerosis lateral amiotrófica. La esclerosis lateral amiotrófica (WIE; Lou-Gehrig's disease; Charcot'sche Krankheit) es una enfermedad neurodegenerativa con una incidencia anual de 0.4 a 1.76 por 100.000 (Adams *et al.*, *Principles of neurology*, 6th ed., Nueva York, pág. 1090-1095). Es la forma más frecuente de enfermedades

de las neuronas motoras con manifestaciones típicas como fasciculaciones generalizadas, atrofia y debilitamiento progresivos de la musculatura esquelética, espasticidad y signos positivos del tracto piramidal, disartria, disfagia y disnea. La patología consiste principalmente en la pérdidas de células nerviosas en el cuerno anterior de la médula espinal y en los núcleos motores del tronco cerebral, aunque puede afectar también a las motoneuronas de primer orden en el córtex. La patogénesis de esta enfermedad es, en gran medida, desconocida, aunque el papel de las dismutaciones del superóxido se conocía muy bien en casos familiares. Hasta ahora se describieron más de 90 mutaciones en la proteína SOD1, que pueden disolver ALS (Cleveland and Rothstein (2001), *Nat Rev Neurosci*, 2, 806-19.). También los neurofilamentos parecen jugar un papel en esta enfermedad. La excitotoxicidad, un mecanismo activado por un exceso de glutamato, es otro factor patogénico, lo que puede justificarse mediante el efecto del aceite de ricino en los pacientes humanos. La activación de las caspasas y apoptosis parece ser el recorrido final de la patogénesis de las ALS (Ishigaki, *et al.* (2002), *J Neurochem*, 82, 576-84., Li, *et al.* (2000), *Science*, 288, 335-9.). La localización de la proteína ee3 en las neuronas afectadas por ALS muestra evidentemente la aplicabilidad terapéutica/diagnóstica potencial de los agonistas o antagonistas de ee3 en esta enfermedad.

La localización de ee3 en la sustancia negra del cerebro medio (Fig. 22 O,P) abre posiblemente posibilidades terapéuticas y diagnósticas en el parkinson mórbido. La enfermedad de Parkinson es la enfermedad motriz más frecuente (movement disorder) con más o menos 1 millón de pacientes en Norteamérica. Aprox. Un 1% de la población por encima de los 65 años está afectado. Los principales síntomas son rigor, temblor, aquinesia (Adams *et al.*, *Principles of neurology*, 6th ed., New York, pp 1090-1095). La causa de la enfermedad es desconocida. A pesar de todo, los análisis de tejidos *post-mortem* y de modelos animales remiten a un proceso progresivo de estrés oxidativo en la sustancia negra, que podría mantenerla neurodegeneración por dopamina. El estrés oxidativo, que puede producirse por las neurotoxinas como 6-hidroxidopamina y MPTP (N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), se emplea en modelos animales, para estudiar la operación de la neurodegeneración. Aunque exista una terapia sintomática (p.e. L-DOPA más un inhibidor de la descarboxilasa; bromocriptina, Pergolid como dopamina agonistas y sustancias anticolinérgicas como el trihexifenidil (Artane)), hay una clara necesidad de una terapia causal, es decir, neuroprotectora, que pueda detener el proceso de la enfermedad. Los mecanismos apoptóticos contribuyen evidentemente a la patogénesis en el modelo animal, así como en los seres humanos (Mochizuki, *et al.* (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98, 10918-23, Xu *et al.* (2002), *Nat. Med.*, 8, 600-6, Viswanath, *et al.* (2001), *J. Neurosci.*, 21, 9519-28, Duromann, *et al.* (2002), *Neurology*, 58, 308-10).

La localización de ee3 en el sistema nervioso resulta, en gran medida, evidente para un contexto entre la expresión de estas proteínas y la muerte celular neuronal, neurogénesis y plasticidad neuronal.

En el pulmón se encuentra ee3 en distintas estructuras (Fig. 22 Q-V). Se descubren células basales en los bronquiolos terminales, que expresan ee3. Posiblemente se trata además de células neuroendocrínicamente activas. Esta localización supone una importancia terapéutica para ee3 en enfermedades bronquiales. Hay asimismo una expresión de los endotelios y células musculares lisas de los arteriolos (Fig. 22 U, V). En contraste con esto, los venos no muestran ninguna expresión inmunohistoquímicamente comprensible de ee3 (Fig. 22 Q y R). La expresión de determinados receptores mediante células endoteliales es de mayor importancia farmacológica, ya que hay en la sangre contacto terapéutico inmediato con esta capa celular. Importantes medicamentos efectivos para la circulación sanguínea afectan a los arteriolos, particularmente del endotelio o de la musculatura lisa. En consecuencia, ee3 es una proteína diana muy atractiva para la influencia sobre enfermedades circulatorias, por ejemplo, la alta presión arterial.

En el intestino, se encuentra ee3 basal en las criptas (Fig. 22 W, X) y en células nerviosas que pertenecen presumiblemente al plexo intestinal (Fig. 22 Y). En la mayoría de órganos analizados histológicamente no se encuentra ninguna tinción específica de células organoespecíficas, sino sólo una clara tinción de nervios (véase, por ejemplo, en el músculo cardíaco Fig. 22 AA, o en el tejido conjuntivo Fig. 22 Z). Esta clara localización de ee3 en axonas predispone la molécula para el diagnóstico y terapia de enfermedades de los nervios periféricos (neuropatías), a las que pertenece, por ejemplo, la polineuropatía diabética ampliamente difundida. Asimismo podrían aprovecharse enfermedades hereditarias frecuentes del sistema nervioso periférico, por ejemplo, el grupo HMSN (hereditary motor-sensory neuropathies) de éste. En el esqueletomúsculo se encontró finalmente una muestra de expresión, que ha de compatibilizarse a placas motoras finales (Fig. 22 BB). Esto es potencialmente interesante para enfermedades de la placa final motora, por ejemplo, de la miastenia grave.

Ejemplo de ejecución 11

Ee3 se regula altamente en el plano proteico en ratones sobreexpresores de EPO

Mediante la inmunohistoquímica (antisuero AS) podía demostrarse también la claramente alta regulación de la proteína ee3 por eritropoetina (Fig. 23). Los cortes paralelamente tratados del ZNS presentan señales claramente reforzadas para ee3. Esto se puede mostrar, en total, en 3 ratones (salvajes y sobreexpresores de EPO (tg6)), que cegado, en cada caso, se colorearon frente al genotipo y se valoraron.

Ejemplo de ejecución 12

Relocalización de ee3 y map1b y Ausencia de expresión de ee3 en ratones deficientes en map1b

5 En un cribado yeast-two-hybrid con el término carboxílico de ee3_1 se identificaron las cadenas ligeras de map1a y map1b como proteínas interactuantes (véase ejemplos previos, Ejemplo de ejecución 4). La figura 24 muestra una inmunofluorescencia doble para ee3_1 y map1b en el ratón, y demuestra un solapamiento inesperado de la expresión de ee3_1 y map1b en el ratón.

10 Para coloraciones de inmunofluorescencia doble se incubaron cortes emparafinados tras el tratamiento por microondas (tampón de citrato, 500W, 10 min) simultáneamente con el anticuerpo de ee3_1 del caniche (AS4163) y un anticuerpo contra map1a de cabra (MAP-1B (C20): sc-8971; Santa Cruz; Santa Cruz, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras los apropiados pasos de lavado se incubó con una mezcla de anticuerpo secundario FITC anti-canichey TRITC anti-cabra durante 30 min (ambos anticuerpos, en cada caso, 1:30 diluido en PBS, relativo de Dianova, Hamburgo, Alemania). Tras el lavado renovado de los cortes con PBS se taparon los preparados con Histosafe y se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81, Olympus, Alemania) con empleo del filtro de barrera apropiado. Los solapamientos de señales se produjeron con ayuda del Software Analysis (soft imaging systems, Stuttgart, Alemania). Las coloraciones únicas de fluorescencia en paralelo muestran, en cada caso, la ausencia de señal en el otro canal, lo que engloba el fenómeno del “sobreirradiado” de señales en el, en cada caso, otro canal, por ejemplo, mediante insuficiencia del filtro. Se origina asimismo una doble coloración con cromóforos cambiados para el anticuerpo segundo la misma imagen (no mostrada).

La Figura 24 muestra una coincidencia sorprendente de la localización de ambas proteínas en el ZNS. verde: coloración de ee3_1; Rojo: coloración de Map1b; Amarillo: solapamiento electrónico de ambas señales. Se muestran ejemplos de la médula espinal (spinal cord; sc) y del cerebelo (cb).

Map1b es una importante proteína neuronal. Es una de las primeras “microtubules associated proteins” (maps)-proteínas asociadas a los microtúbulos “PAMTs”-, expresadas durante el desarrollo del sistema nervioso central de los mamíferos. Es probable una participación en la axonogénesis en las neuronas (Gonzalez-Billault, *et al.* (2001), Mol Biol Cell, 12, 2087-98., Gonzalez- Billault, *et al.* (2002), Brain Res, 943, 56-67.). Un papel funcionalmente importante de map1b para la interacción de las neuronas está amparada por los últimos estudios, que muestran que map1b está involucrada en la patogénesis del síndrome X frágil. Esto es la forma más frecuentemente heredable de retraso mental. el ARNm es controlado por la FMRP, una proteína, regulada directamente por el ARNm X frágil. En un trabajo en Drosophila se encontró un papel central para map1b (desaparecida en Drosophila) para el desarrollo del fenotipo análogo al X frágil (Sohn (2001), Science, 294, 1809., Zhang, *et al.* (2001), Cell, 107, 591-603.). map1b se liga asimismo a la gigaxonina, una proteína cuyo gen mutante es responsable de la enfermedad hereditaria recesiva Giant axonal neuropathy (GAN) (Ding, *et al.* (2002), J Cell Biol, 158, 427-33.). tras la lesión de los nervios periféricos se induce map1b de manera reforzada en las neuronas que maduran de los nervios mielinizados, y contribuye probablemente a la germinación axonal (Soares, *et al.* (2002), Eur J Neurosci, 16, 593-606.). Finalmente, map1b localiza probablemente al receptor de GABA-C en su localización sináptica (Pattnaik, *et al.* (2000), J Neurosci, 20, 6789-96.).

El gen Map1b se inactivó genéticamente en los ratones (knock-out). El mejor Knock-out disponible es el ratón descrito en Meixner *et al.* (Meixner, Haverkamp, Wassle, Fuhrer, Thalhammer, Kropf, Bittner, Lassmann, Wiche and Porpst (2000), J Cell Biol, 151, 1169-78.). Se estudió inmunohistoquímicamente la expresión de ee3 de ratones con inactivación homocigótica del gen. Se mostró una muy fuerte/muy débil coloreabilidad de ee3_1 (Figura 25), lo que indica una dependencia de la expresión o proteica de ee3_1 o estabilidad de la interacción con map1b. Un inhibidor de esta interacción tendría como consecuencia una expresión claramente reducida de ee3.

Ejemplo de ejecución 13

Fabricación de un antisuero para la comprobación de ee3_1

La secuencia proteica de la proteína ee3_1 humana se analizó con el programa parcial Protean del paquete de programas ADNStar (Lasergene) y correspondientemente a la previsión secundaria, así como alta probabilidad superficial citada previamente y alta antigenicidad el epítipo LHHEDNEETEETPVPEP colocada en el término C intracelular correspondientemente a los aminoácidos 299-315. Esta secuencia peptídica se sintetizó con cisteína adjunta N-terminalmente (CLHHEDNEETEETPVPEP), para facilitar un acoplamiento específico controlado a la proteína de soporte KLH (keyhole limpet hemocyanine). Con el conjugado péptido-KLH se inmunizaron dos caniches según un plan optimizado. La síntesis peptídica, el acoplamiento adyacente a KLH, así como la inmunización de dos caniches fueron aplicadas por la empresa BiotTrend Chemikalien GmbH. Antes de la inmunización única se examinó la reactividad cruzada del suero primario de varios caniches por análisis de WesternBlot de células transfectadas de pega y extractos cerebrales. Dos caniches con antecedentes negligibles contuvieron, 3 semanas tras la inmunización única, el imprimador y, otras 4 semanas más tarde, el segundo impulso. Una semana después se extrajeron 20 ml de sangre a los caniches y se examinaron los sueros en análisis de Western Blot y coloraciones inmunocitoquímicas de células transientemente transfectadas (HEK293, CHO-dhfr-).tras el 3º y/o 4º impulso se desangraron los caniches.

Los sueros de ambos caniches fueron positivos. Particularmente el antisuero AS4163 reconoció con ambos métodos muy específicamente en diferentes células la proteína ee3_1 humana transientemente expresada y podía emplearse en análisis de Western Blot. El antisuero AS4163 sirve también para la inmunoprecipitación de proteína ee3_1 y puede emplearse, por tanto, para la precipitación de ee3_1 y, por tanto, de proteínas interactuantes de células o tejidos nativos transfectados. El antisuero AS4163 reconoce particularmente el epítipo apropiado en la secuencia de ee3_1 del ratón, que sólo se distingue de la secuencia humana por un aminoácido, o sea la mutación de N304 a serina. El antisuero AS4163 sirve, por tanto, muy bien para el análisis inmunohistoquímico de la expresión proteica de ee3_1 en ratones salvajes, transgénicos knock-out, tal y como muestran las Figuras 22-24.

Ejemplo de ejecución 14

ee3_1 es expresada por células madres neuronales

Se aislaron células madres neuronales del hipocampo de ratas Wistar humanas de 4-6 semanas de edad, tal y como se ha descrito anteriormente (Ray *et al.*, 1993). Los protocolos satisfacen el derecho alemán. Los animales se intoxicaron con un 1% (v/v) de isoflurano, 70% de N₂O, 29% de oxígeno y murieron decapitados. Los cerebros se prepararon y lavaron en 50 mL de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline congelado (DPBS) con 4.5 g/L de glucosa (DPBS/Glc). El hipocampo se extrajo médicamente de 6 animales, se lavó en 10 mL de DPBS/Glc y se centrifugó durante 5 min a 1600 x g a 4°C. tras la reducción del exceso se homogenizó el tejido con tijeras y escalpelo. Los fragmentos de tejidos se lavaron con medio DPBS/Glc, se centrifugaron 5 min a 800 g, y se resuspendió el pellet en un 0.01% (w/v) de papaína, 0.1% (w/v) de Dispase II (proteasa neutra), 0.01% (w/v) de DNase I, y 12.4 mM de Sulfato de manganeso en Hank's Balanced Salt Solución (HBSS). El tejido se trituró con puntas de pipeta, y se incubaron 40 min a temperatura ambiente, con mezcla ocasional de la disolución (cada 10 min). La suspensión se centrifugó, a continuación, a 800 x g durante 5 min a 4°C, y se lavó el pellet tres veces en 10 mL de medio DMEM-Ham's F-12 con 2 mM de L-glutamina, 100 uds/mL de penicilina y 100 uds/mL de estreptomomicina. Posteriormente se resuspendieron las células en 1 mL de medio neurobasal con B27 (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA), 2 mM de L-glutamina, 100 uds/mL de penicilina y 100 uds/mL de estreptomomicina, 20 ng/mL de EGF, 20 ng/mL de FGF-2, y 2 µg/mL de heparina. Las células se diseminaron en condiciones estériles en placas de 6 orificios en una concentración de 25,000-100,000 células/mL. Las placas se incubaron a 37°C en un 5% de CO₂. el medio de cultivo celular se cambió una vez a la semana, recambiándose aprox. sólo 2/3 del medio. (Ref: Ray J, Peterson YA QUE, Schinstine M, Gage FH (1993) proliferation, diferenciación, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3602-6.).

A el ARN se le aisló según protocolos estándar (RNeasy kit, Qiagen) de células madre hipocámpales, que se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas, después de que se descongelaran de stocks congelados. El ADNc se sintetizó con empleo de imprimadores oligodT y Superscript II Reverser transcriptasa (Gibco) según protocolos estándar. El PCR se efectuó con los siguientes parámetros de reacción:

Desnaturalización 94°C 10 min, 30 ciclos hasta 94°C 30 s, 55°C 50 s, 72°C 60 s; 72°C 5 min 4°C con los siguientes pares de imprimadores: ee3_plus 5'-GGTGTGGGAGAAATGGCTTA-3' y ee3_minus 5'-ATACCAGCAGAGCCTG-GAGA-3'.

Durante los últimos años se reconoció la importancia de la neoformación de células nerviosas (neurogénesis) en el desarrollo de las enfermedades neurológicas. Al contrario de muchos otros tejidos, el cerebro maduro tiene limitadas capacidades regenerativas, y el inhabitualmente alto grado de especialización celular encierra las posibilidades de asumir la función del tejido destruido mediante el tejido que permanece sano. Las células nerviosas, producidas en el cerebro adulto a partir de precursores tienen, sin embargo, en principio, el potencial de asumir estas funciones.

La neurogénesis aparece en regiones discretas del cerebro adulto, (la zona facial subventricular (SVZ) del ventrículo facial y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado (DG). Muchos grupos muestran que la neurogénesis es inducida particularmente por daños neurológicos (por ejemplo, isquemia cerebral (Jin, *et al.* (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4710-5, Jiang, *et al.* (2001), *Stroke*, 32, 1201-7, Kee, *et al.* (2001), *Exp. Brain. Res.*, 136, 313-20, Profileva, *et al.* (2001), *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 21, 211-7)). La neurogénesis aparece también en las seres humanos (Eriksson, *et al.* (1998), *Nat Med*, 4, 1313-7.), y conlleva realmente neuronas funcionales (van Praag, *et al.* (2002), *Nature*, 415, 1030-4). Particularmente la zona subgranular del giro dentado y del hilo tienen el potencial de generar nuevas neuronas durante la vida adulta (Gage, *et al.* (1998), *J Neurobiol*, 36, 249-66). Resulta llamativo que ee3 pueda detectarse en células madre neuronales del hipocampo (Fig. 25). Esto implica una gran importancia de ee3 para la neurogénesis. Esta importancia en la neurogénesis significa otra demostración de la utilidad de ee3 para generalmente todas las enfermedades neurodegenerativas.

En comparación con el efecto de las células endógenas de variedad en el cerebro, se pueden terapéuticos, que interfieren con ee3 para la manipulación *in Vitro* de células de variedad (por ejemplo, diferenciación y proliferación *in vitro*). Las células de variedad se exploran en el momento para su empleabilidad en enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Parkinson y apoplejía. Es, por ejemplo, deseable, diferenciar las células *in vitro* para el trasplante en pacientes con Parkinson, y, para ello, compensar el déficit de dopamina tras la inyección ("replacement therapy") (Arenas (2002), *Brain Res. Bull*, 57, 795-808, Barker (2002), *Mov. Disord.*, 17, 233-41). Otra posibilidad para la inserción

ES 2 342 264 T3

de células de variedad son, por ejemplo, inyecciones intraarteriales o intravenosas en caso de apoplejía o conmoción cerebral (Mahmood, *et al.* (2001), Neurosurgery, 49, 1196-203; discussion 1203-4, Lu, *et al.* (2001), J Neurotrauma, 18, 813-9, Lu, *et al.* (2002), Cell Transplant, 11, 275-81, Li *et al.* (2002), Neurology, 59, 514-23). Otra posibilidad de empleo de ee3 en la terapia celular de variedad sería la fabricación de células, que secreten constantemente un agonista o antagonista para ee3.

Ejemplo de ejecución 15

Clonación adicional parentela de la familia de receptores de ee3 de *Xenopus laevis* y *Dario rerio*

Se podían clonar miembros adicionales de la familia de proteínas ee3, debido a los criterio de homología conformes a la invención. Con TBLASTN se examinaron bancos de datos EST con secuencias de proteínas de la proteína ee3_1 humana. Se encontraron además ESTs de *X. laevis* (rana africana de uñas) y de *D. rerio* (Zebrafisch). Estos ESTs se secuenciaron con procedimientos estándar, y se obtuvieron las siguientes secuencias (se muestra la salida del software utilizado):

secuencia de longitud total de xl_ee3 (*Xaenopus laevis*):

```

CCCCGGCACGTTACCGTATTGATGTTACTAGTAGCGCACAGAAACATCCTGGTCTAAGCAGTTGCAGCAGGTACTGCGTT
GTAGTGGCGGTAGTTACGACTCTGTAGGTTAGAGCGGAGGCCTTTGCTGAGCAATGTCCGCTAGTGAAGCTCGGAGAGG
TGCTCGCACCATGAATCTTAGGGGCTCTTCCAGGATTTTAAACCCAGTAAATTTCTCATCTACGCAITGTTTGTGCTCT
TTCTGTTCTCCTTTCCCTGCGACTGGATAATATATTTAGTGGAGTTACTGGGCGGTGTTTGCTCCAATATGCTTGTGG
AAACTAATGGTTATTGTGGGAGCCTCAGTTGGTACAGGTGTATGGGCAGTAACCC7CAATACAGGGCAGAGGTGAAC
ATGTGTGGAGTTCAAGGCCATGCTAATTTGCAAGTGGGAATTCATTTGCTGCTTCTTA7GTTTGAAGTCTTGTTCGGATC
GTATTGAAGAGGAAACCACTACTTCTGGTTGCTAGTCTTTATGCCCTTATTTCTTTGTGTCCTCCAGTATCCGTTCAGCT
TGCCTTTGGGGCTTTGCGCATGATCGATCATGGAAATTTGGTGGCTTGCCTCCGTCAATATTTCTGCACTTTATATTCAT
TGCCCTAAGACTTGACAGCATCATCACTTGGCCCTTGGCTTGTGGTATGTGTCCGCTGTGGATCCTTATGTCTTCTCTGT
GCCTAGTAGT7TCTGATTATATTTGTGTGGTCACTTCTGTTTCTGCGTTCAATGGATGTTATTGACAGAACAAAGGAGAACT
CATATTACTATGGCAGTCACTTGGATGGCTATAGTTGTACCGCTTCTGACATTCGAGATATTACTTGTTCATCGACTTGA
TGGCCACAACTCATTTATCGAATATCCCTATATTTGTTCGGCTTGGCTTCCCTTAATAACGTTGATGGCAACACCTTTG
GACAGAAAGGAGGCAATCACTTGGTGGTTTGGGATTCGTAAAGACTTCTGCCAGTTTCTGTTGGAGATTTTCCCTTTCTT
CGAGAATATGGCAATATCTCATATGATATTCACTCATGAACACAGTGAAGATGCTGAAGAAACACCTGTACCGGAGCCCC
CAAAATCGCACCAATGTTTCGAAAGAGACTTGGCGTTGTCTATCCAGAGCCAGGGAAATATATTGTTCTCTCTGTCTA
AACTTAACTACGACATGCGGATTAAAGTGAATTTGGTGGCTTGCAGGCACTTTTCTGTTTAACTAATCTCTGTAG
TAGTACACTATCAGGTGTATGGACTGAAGGGAAAAAAGACTACTGACCTCATTCTTTTGTATTCAATTTGTAATTT
TTTTTGTCTCTGCAATGGTATGTGTTTCCCATTCCTAATTCATGTATCATGTTACTCAAGATCAGGGAAGCTTCTTAA
GGGCAAGAAATGCTGCAATTTGTAGTTTATAATTTGTGGATGACTATAAATTTTACATCTGTTGCTTGGTAATGACTG
CAGTCTTGCAATCTGATTTCTAGTAACACAGAGATAGACCAGCTGTGGCCCTCAGATACCTAAGCTTAACAGCTTTGGGA
GACATCTCGGGAATCTTAGCAGCTCTGGGGCCACAGGTTGGACTTCTCAGCAGTAATAATTAAGTATAATGTTTATCTTAA
GTAAATGTCTTTGTGTGTGTTGTTATGCAATGCAGCTATTGTTTGATATCTTTACagcagaactctgtcatagaaattqaa
ttcaagttgtgagctgttttataccactctataaaataactcttAAAAAAAAAATCTGTTTAAAGGCTCAGCATTACCTTGG
GAAGTGATATTTGAGCAGAGGCTTATGGGATATATCTAATATACRCCTTCCCTTAGGAGTTACTACTCTCTCTCACTT
GTATAGTATTTATAGAACATTTTATCAATGTATATATTGTGTTCAAATTTATTTCTTATGTACAGTATAAATGGATAAA
TACAAAGTATTTTAAATAAAAGATGTAATAACATAAAGTTGTCAAAATTTTGTGTAATTTACATTTTAAATG
ATCTATGTGAATTTTACAATGAAAAAGATCTATACAATTTCAAAGCCAGTATGTCTTTTATATACTGACCATCTAC
ATATATGTGAAGATGTAAGCCAAACCAACATGACATGAATGTTAAGTTATTAGACTATGAATAAACATTGATTTTATT
TTATCTTGTAAAAAATAAAAAA

```

Marco abierto de lectura ("open reading frame") de xl_ee3:

```

ATGAATCTTAGGGGCTCTTCCAGGATTTTAAACCCAGTAAATTTCTCATCTACGCAITGTTTGTGCTCTTTTCTGTCTCT
CCTTTCCCTGCGACTGGATAATATTTTCACTGGAGTTACTGGGCGGTGTTTGCTCCAATATGGTTGTGGAACTAATCG
TTATTGTGGAGCCTCAGTTGGTACAGGTGTATGGGCAGTAACCC7CAATACAGGGCAGAGGTGAACATGTGTGGAG
TTCAAGGCCATGCTAATTTGCAAGTGGGAATTCATTTGCTGCTTCTTATGTTTGAAGTCTTGTTCGGATCCTATTGAAG
AGGAAACCACTACTTCTGGTTGCTAGTCTTTATGCTTATTTGTTGTCCTCCAGTATCCGTTCAGCTTGGCTTTGGG
GCCTTCCGCAATGATCGATCATTTGGAATTTGGAATCTTGTGCTCCGTCAATATTTCTGAGTTTATATTCTTCCCTAAGA
CTTGACAGCATCATCACTTGGCCTTGGCTTGTGGTATGTGTCCGCTGTGGATCCTTATGTCTTCTCTGTGCTTAGTAGT
TCTGTATTATATTGTGTGGTCACTTCTGTTCTCTGCGTTCAATGGATGTTATTGACAGAACAAAGGAGAACTCATATTACTA
TGGCATGAGTTGGATGGCTATAGTTGTAACCGCTTCTGATATCAGATATTACTTGTTCATCGACTTGTATGGGCACAA
CCATTTATCGAATATCCCTATATTTGTTCCGCTTGGCTTCTTAAATAACGTTGATGGCAACACCTTTGGACAGAAAGG
AGGCAATCACTGGTGGTTTGGGATTCGTAAAGACTTCTGCCAGTTTCTGTTGGAGATTTTCCCTTTCTTCCAGATATG
GCAATATCTCATATGATATTTCATCATGAAGACAGTGAAGATGCTGAAGAAACACCTGTACCGGAGCCCCCAAAATCGCA
CCAATTTTCGAAAGAGACTGGCGTTGTCTATACCCAGAGCCAGGGAATATATTGTTCTCTCTGTCTAAACTTAACAT
CGACATGCGCGATTAA

```

ES 2 342 264 T3

y la secuencia proteica de xl ee3:

HNLRGLFQDFNPSKFLIYACLLLSFVLSLRLONIOWSYWAVFAPITWLKLMVIVGASVGTGVWARNPQYRAEGETCVE
FRAMLIYAVGIHLLLMFEVLVCDRIERGNHYFWLLVFEMPLFFVSPVSVAAACVMGFRHORSLELEILCSVNILOQFIALR
LDSIITAPWLVVCVPLWILMSFLCLVVLVYIVMSVLFTRSMOVIAEORRTHITMAVSVMIVVPLLTFEJLLVHRLDGHN
PLSNIPITGVPLWLSLTILNATTFGORGGNHWWFGIRKDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDINHEDSEDREETFPVPEFPRIA
PMFRKKTGVVILQSPEGKIVVAPPAKLNDMPD

para *D. rerio* son estas secuencias (dr_ee3):

CTCAGCACTGTTGGCCCTACTGGGATGTGAGTGCCAGTCAGCTAGCCAGGCTCTCCTTTTCAGTTCATGTAACATGGTC
TCAAGGAAGAACCATGAATCTCCGAGGGCTTTTCCCAAGATTTCAACCCAGCAAGTTCCTGATCTACGGCATGTCTCGTGC
TCTTCTGTGCTGCTGTCTACTAGGCTGGATGGCATCTCCAGTGGAGCTACTGGGCGTGTTCGCGCCCATCTGCTCT
TGGAACTCATGGTCATCATCGGGGGCTCTGCGGGCACTGGAGTGTGGGCTCACAACCCGAGTACAGGGGCTGAAGGGGA
GACGTGTGTGGAGTTAAGGCGCATGTCAGTCCGAGTGGGAATCCACCTCTCTCTGCTACGTTCCGAGGTGCTGGTCTGCG
ACGGCTTGGAAAGCGGGCTTCGATCCCTCATGCTGCTCTGTTTCATGCGGCTCTGTCTGCTCTGCGGTGCTGAGTGGC

CGGTGTGTGTGGGAATTCAGACACGACCGCTCGCTGGAGCTGGAGATTCTGTGCTCTGTAATATCTTTCAGTTTATCTT
CATCGCTCTGAAACTGGACGGGATCATCAGCTGCCCGTGGCTGGTGTGTGTGCGCTCTGGATCTCATGTCTCTTCT
TGTGTCTGCTGGTCTCTCTATkAtAtctgtgtggtctctgtGCTGTTTCTGCGCTCCATGGATGTGATCGCGGACGCGCGC
ACACACTGCACATCGCCCATCGACTGAGTACTATAGTCTGTCGCTCTGCACTTTTGAGATTCTCTGCTGCCAACGCT
gATAATCATTATAGCCCCAACTACGTCTCCGGTGTTTGTTCTCTCTGGGTTTCTTTAGTGA CTCTAATGGTGACCACAT
TTGGCCAGAAAGGAGCGCAATCACTGGTGGTTTGGCATCCGTAAAGACTCTGCCAGCTTTCTGCTGGAGCTCTTCCTGCTT
CTCAGCGAATATGGCAACATCTACTATGACTTGCATACGAGGACTCAGACATGTCCGAGGAGTTGCCCATTCACGAGGT
GCCAAAATCCTACCATGTTTAgAACAAGACGGGGGTGGTATCACCCAAGGCCCTGGGAATACTTTGTGCGCCAC
CCAACTGTGCATCGACATGCCAGCTAAcATTGGAGCTCTCGTATACAGTATAGCACTATGCAATGGAATTCGCTTTGT
TACGTGCTGTGTAAGACGGCAACAACAATCCcATTAACTCGCGTCTTGTTTCTAAAAAAAATAGCTGCGCAACGGRC
CTGTTGACATGA

El marco abierto de lectura de dr_ee3 (“open reading frame”):

ATGAATCTCCGAGGCGT7TTTCCAAGATTTC AACCCAGTAAGTTCCTGATCTACGCATGCTGCTGCTCTTCTCTGTGCT
GCTGTCACTGGGCTGGATGAGCTCATCTGAGTGGAGCTACTGGGCCGTGTTTGCGCCCATCTGGCTCTGGAAAGCTCATGG
TCATCATCTGAGGCGCTCTGTGGCCATCGAGTGTGGGCTCACAAACCCAGTCAGGGCTGAAGGGGAGACAGTGTGTGAG
TTAAAGGCCATGCTGATGCGAGTGGGAATCCACCTGCCTGCTGCTCACCCTTCGAGTGCTGCTCTGCGAGCGCTGGAAAG
GGCTTCGATCCCTACTGGCTCTGGTGTTCATGCGCGCTCTTCTTCGCTCTCTCCGGTGTGAGTGGCAGCGTGTGTGTCGG
GATTCAGACAGCAGCCGCTCGCTGGAGCTGGAGATCTGTGCTCTGTAAATATTCCTCAAGTTATCTTCATCGCTCTGAAA
CTGGACGGGATCATCAAGCTGGCCGTGGTGGTGTCTGTGCTCCGCTCTGGATCTCATGCTCTTCTGTGCTTGGTGGT
cctctactatatcgtgtggtctgtGCTGTTTCTTCGCTGCCATGGATGTGATCGCGGAGCAGCGGCCACACACATACACCA
TGGCCATCAGCTGGATGACTATAGCTGCTGCCCTGCTCACTTCTTGAGATCTCTGCTGGTCACAAAGCTgGATATCATTA
AGCCCCAACTACGTCTCCGGTGTTTGTTCTCTCTGGTCTTTTAGTGACTCTAATGGTGCACACATCTGGCCAGAAAG
AGCCATCACTGGTGGTTGGCATCGTAAGAAGACTTCTGCCAGTTCTCTGCGAGCTCTCCCGTCTCTCAGGGAATATG
GCAACATCTACTATGACTGTCATcACGAGGACTCAGACATGTCCGAGGAGTTCGCCATTACGAGGTGCCCAAATCCCT
ACCATGT7TTAgCAAGAGAGACGGGGTGGTGAACCCAAAGCCCTGGGAAATACTTTGTGCCCCCAACCRAACTGTGCA
CGACATGCCAGATAA

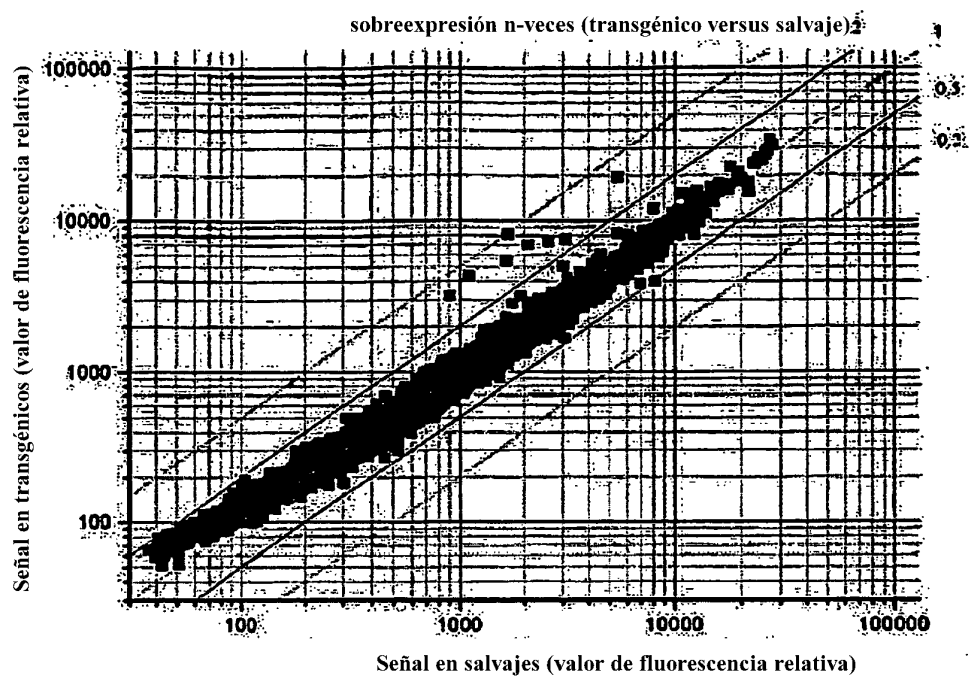
y la secuencia proteica de dr ee3:

MNLRGVFDENPSKFLIYACILLFVSLSLRLDGI IQWSYWAUVPAPITWLWKLMIIGASVGTGVWAHNPQYRAEGETCYE
 FKAMLIAGVGIHLLLTFFVLVCERVEASIPYNLVFMPLEFVSPVSVAACVWGPRHRSLELEILCSVNLIQOFFIALR
 LDGIISNFWLVVCVPLMIIMSEFLCLVLYYIVKSVLFLASNDVIAEQRRTHITMAISWMTIVVPLTFEILLVHKLDNHY
 SPNYVPVFPVPLWVSLTLMVITFGQKGGNNHWFGRKDKTQFLELFPFLREYQNIYYDLNHEDSMSSELPINEVPRIE
 TNSKIKTGVVITDSPGKYVFPFPEKLCIDMPO

La Figura 27 aclara una vez más la conservación altamente evolucionaria de la familia ee3 con ayuda de ambas proteínas de *X. laevis* y *D. rerio*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido nucleico, **caracterizado** porque se codifica para un polipéptido conforme a una de las Figuras 13 o 15A, o para variantes de éste, que tengan en el plano de aminoácidos al menos un 90% de la identidad respecto a un polipéptido conforme a una de las Figuras 13 o 15A, excepto un ácido nucleico conforme a la SEC ID NO:75 de la WO01/98353.
- 10 2. Ácido nucleico según la Reivindicación 1, **caracterizado** porque contiene una secuencia conforme a una de las Figuras 9A o 11 A para el dominio traducido (en mayúsculas).
3. Vector de expresión, **caracterizado** porque contiene una secuencia de ADN según al menos una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 15 4. Célula huésped, **caracterizada** por estar transformada con un vector de expresión según la Reivindicación 3.
5. Célula huésped según la Reivindicación 4, **caracterizada** por ser una célula mamaria, particularmente una célula humana.
- 20 6. Producto génico purificado, **caracterizado** porque se codifica mediante una secuencia de ADN según al menos una de las reivindicaciones 1 o 2, excepto un polipéptido conforme a la SEC ID NO:31 de la WO01/98353.
7. Producto génico purificado según la Reivindicación 6, **caracterizado** porque es un polipéptido.
- 25 8. Animal transgénico no-humano, **caracterizado** porque le falta su polipéptido ee3-1 nativo conforme a la Reivindicación 7 o partes del mismo.
9. Anticuerpo, **caracterizado** porque reconoce un epítipo de un producto génico según al menos una de las reivindicaciones 6 o 7.
- 30 10. Anticuerpo según la Reivindicación 9, **caracterizado** porque es monoclonal.
11. Anticuerpo según al menos una de las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado** porque está dirigido contra una fracción de secuencia del dominio extracelular como epítipo.
- 35 12. Procedimiento para la expresión de productos génicos según al menos una de las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado** porque las células huésped se transforman con un vector de expresión según la Reivindicación 3.
- 40 13. Procedimiento para el aislamiento de productos génicos según al menos una de las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado** porque las células huésped según la Reivindicación 4 o 5 se cultivan en condiciones apropiadas, favorecedoras de la expresión y el producto génico se limpia, a continuación, del cultivo.
14. Ácido nucleico según al menos una de las reivindicaciones 1 o 2 o un producto génico según al menos una de las reivindicaciones 6 o 7 como fármaco.
- 45 15. Ácido nucleico según al menos una de las reivindicaciones 1 o 2 o producto génico según al menos una de las reivindicaciones 6 o 7 para el tratamiento de enfermedades neurológicas.
- 50 16. Procedimiento para la identificación de un participante de la interacción celular de un polipéptido, codificado por un ácido nucleico según al menos una de las reivindicaciones 1 o 2, empleándose un denominado sistema "yeast-two-hybrid".



Experimento de Microarray

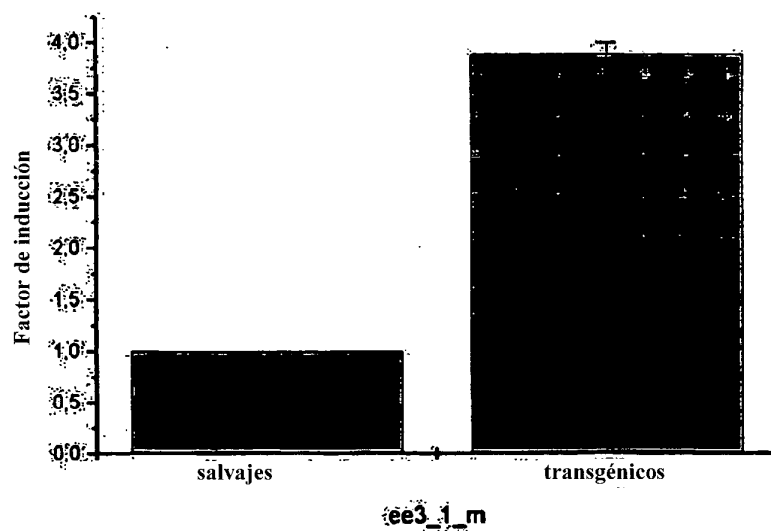


Fig. 1 a y b

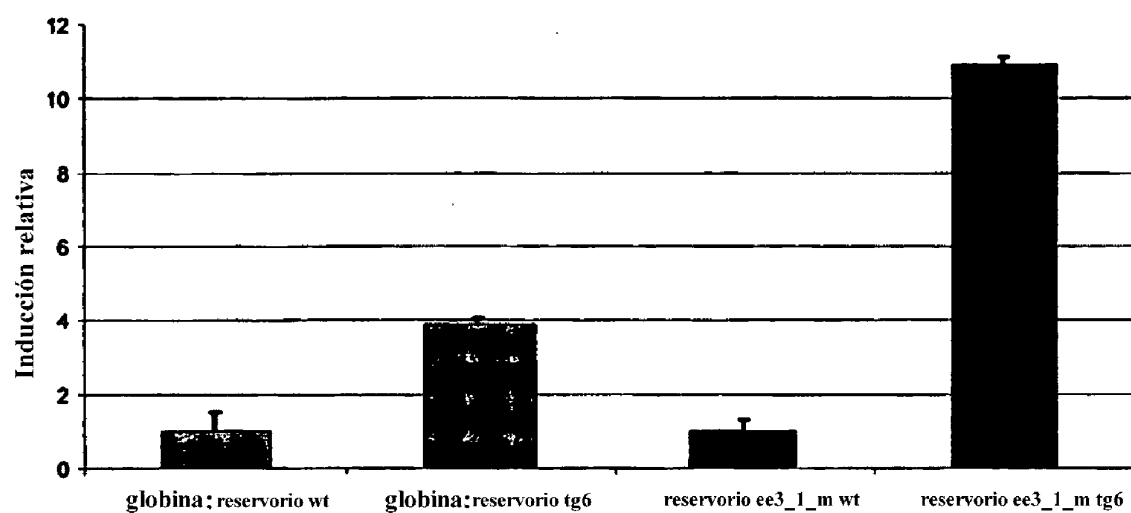


Figura 2

ee3_1_m en ratón

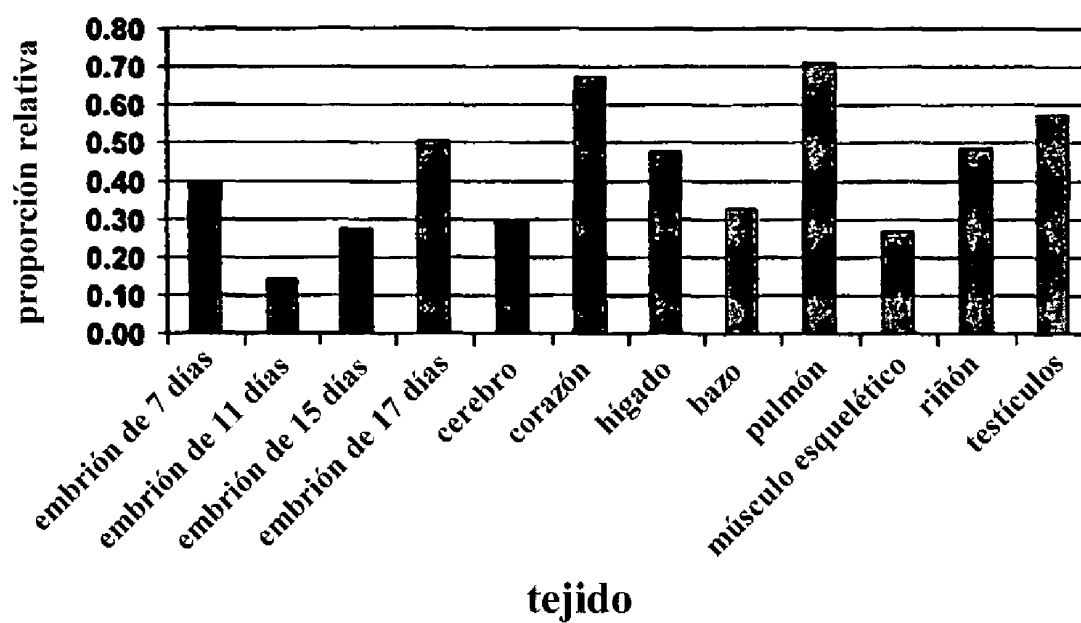


Figura 3

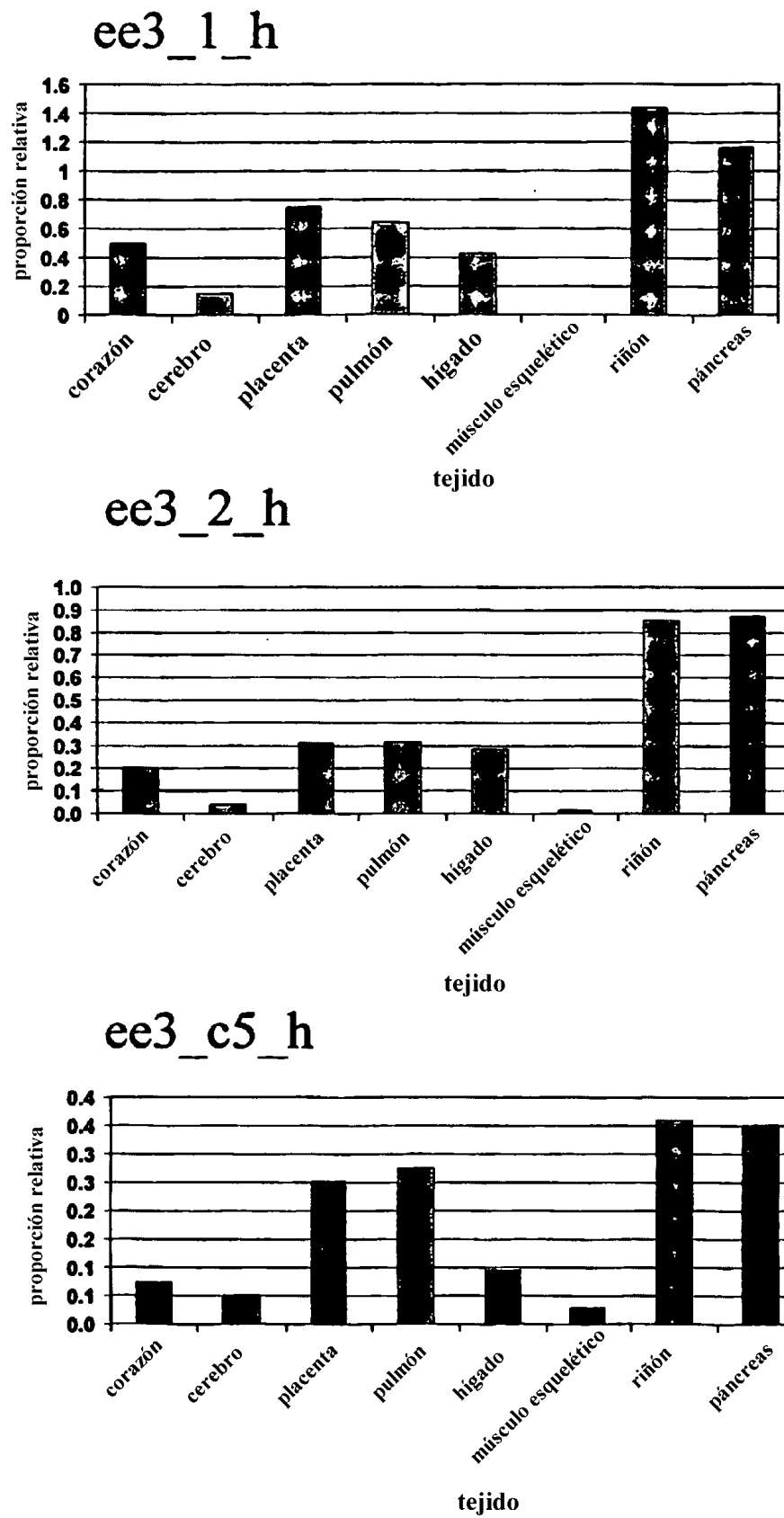


Figura 4

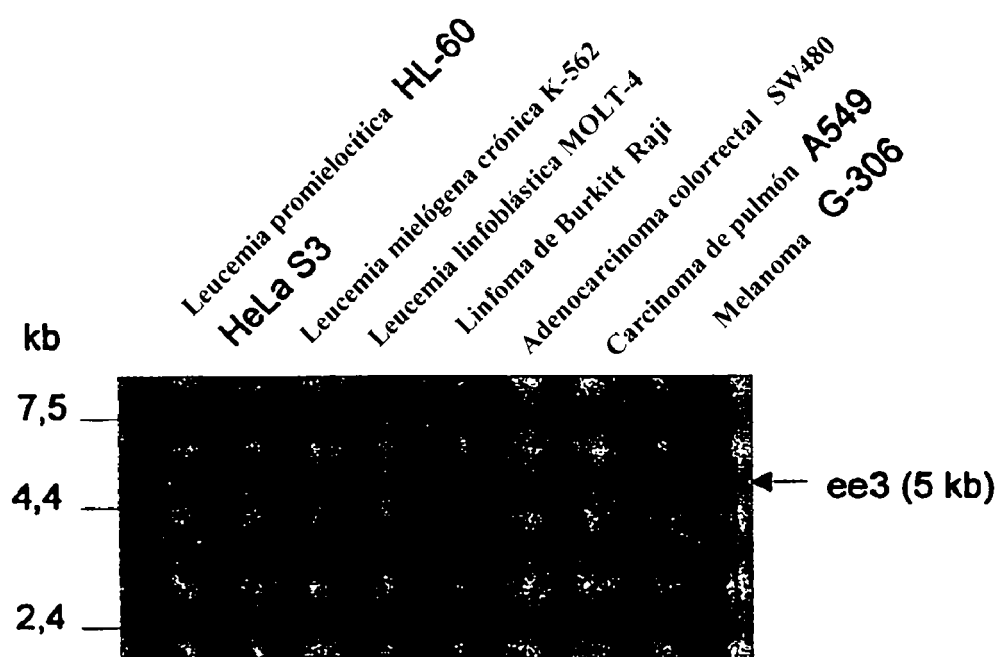


Figura 5

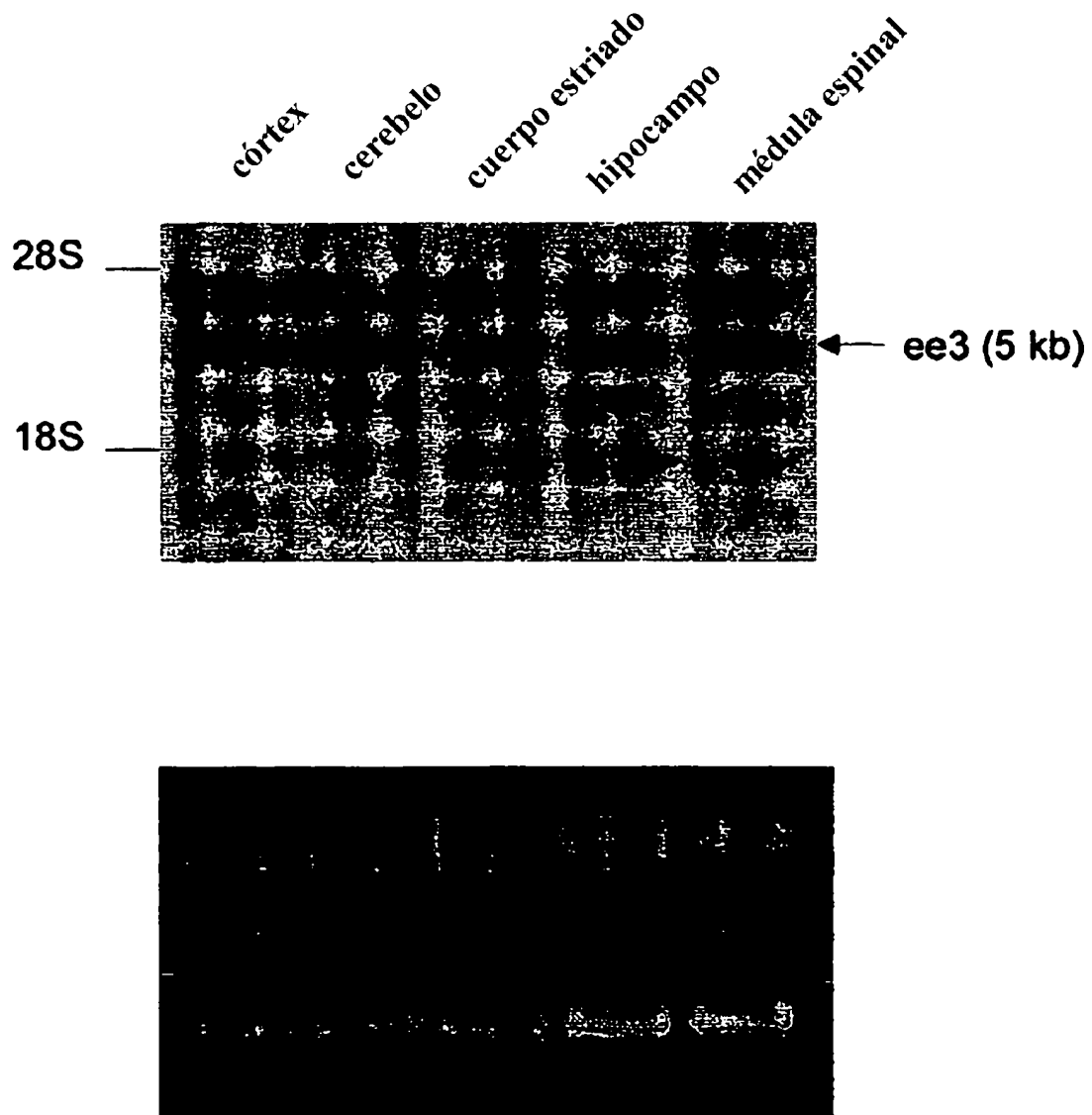


Figura 6

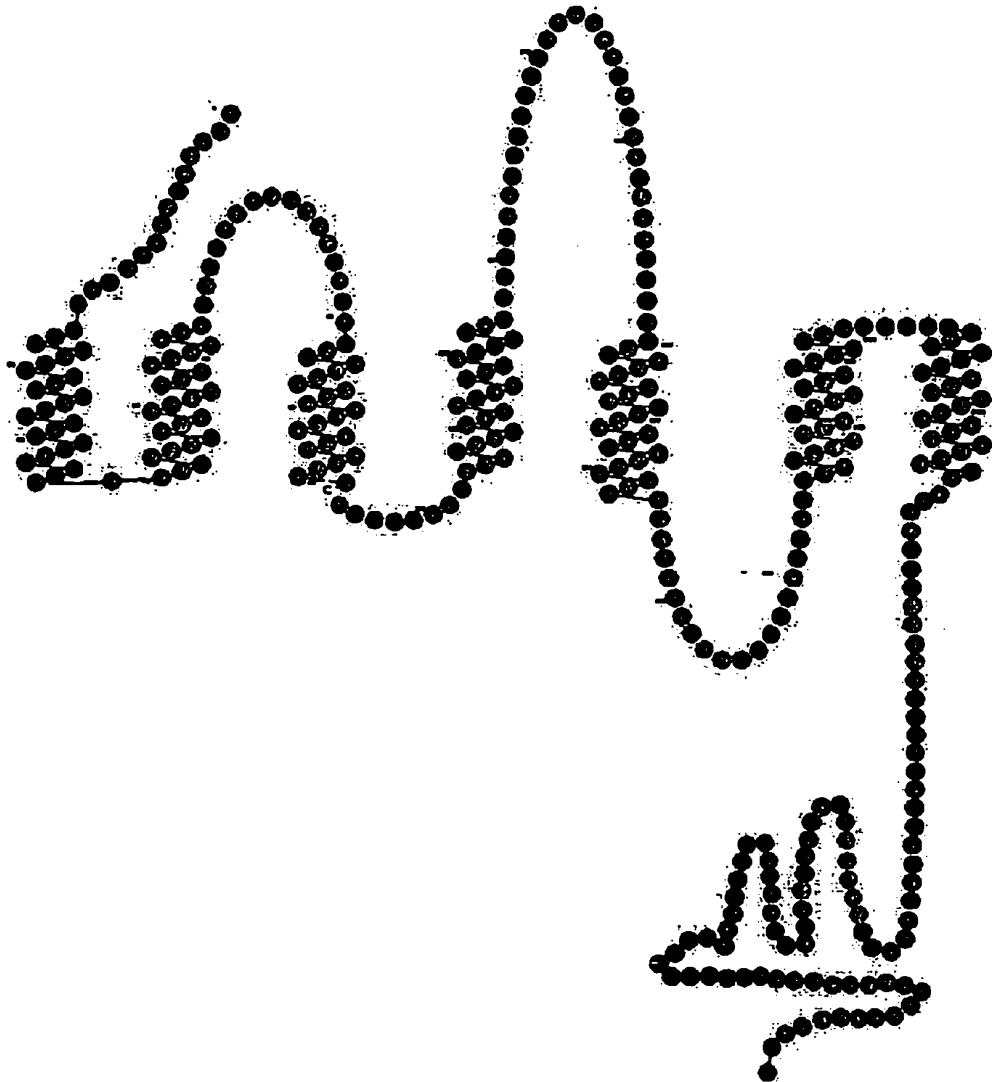


Fig. 7

```

          10      20      30      40      50      60
human_pro.  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h     MNLRGLFQDFNPSK.....
ee3_c5_h_e  MNPRGLFQDFNPSK.....
droso ee3   MNLESLEFRDENPCK.....
c.elegans   MVELSLGVFFRSFNASK.....
dc32_bio    MRMSIAQRV.....
ccr5_human  MNYPLTLEMDLENLEDFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPATEGPLMASFKAV.....
c5ar_human  MNSFNYTTPDYGHYDDKDTLDLNTFVDKTSNTRLRVPI.....
dop21_huma  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYN.....
cons famA   .....
pfam_famA   .....
cons famB   .....
pfam_famB   .....
pfam_famC   .....a
              70      80      90      100     110     120
human_pro.  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h     FLIYACLLLFVLLALRLDGI IQW.....S.....YWA VFAP IW
ee3_c5_h_e  FLIYTCLLLFSVLLPLRLDGI IQW.....S.....YWA VFAP IW
droso ee3   FIVHCSLFIFVTLFALRLDNYIDW.....P.....YWA IFTPLW
c.elegans   VILCACLIFLFTALFTLKLDGKVSF.....S.....YAFVFAPLW
dc32_bio    LLTWLFTLLFLIMLVLKLDKAPW.....NWF.....LIFIPVW
ccr5_human  FVPVAYSLIFLLGVIGNVLVLVIL.....ERHRQTRSSTET.....FLFHLAV
c5ar_human  LALVIFAVVFLVGVGNALVVVWT.....AFEAKRTIN.....AIWFLNLAV
dop21_huma  YYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMV.....SREKALQTTN.....YLIVSLAVA
cons famA   .....GNXLV.....
pfam_famA   .....GNILVilvil~~~~~rtkkrlrtptn~~~~~ifilNLAVa
cons famB   .....GQOKS.....
pfam_famB   1lLkviytVGyslSsLvcLllaiaifllf..RkLretRnyIHmN.....LflsfiLra
pfam_famC   givlvalAvlGLivltlflvlvvFv.....khrdTPiVKasnreLS.....YlLLiGli
          130     140     150     160     170     180
human_pro.  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h     LWKIANVIVGASVGTG.....VWARNPOYRAEGETCV.....EFKAMLI AVGIH LLL
ee3_c5_h_e  LWKLLVVAGASVGAG.....VWARNPRYRTEGEACV.....EFKAMLI AVGIH LLL
droso ee3   IWKCTAILGAIVGAI.....VVCRYPHYRLEGDAYT.....QFKAMLI SLALH LIL
c.elegans   ACNLLVFVGAIVGIC.....SFC SKPPSRNEIVMRV.....DFSAMLITATEHIFLT
dc32_bio    IFDTILLVLLIVQMA.....GRCKSGFDPRHGSHNIKKK...AWYLIAMLLKLAFCLALC
ccr5_human  ADLLLVFILPFAVA.....EGSVGWVLGTFLCK.....TVIALHKVNFYCSSL
c5ar_human  ADFLSCLALPILFT.....SIVQHWHWPFPGAACS.....ILPSLILLNMYASILL
dop21_huma  DLLVATLVMPWVYYL.....EVVGEWKFESRINC.....DIFVTLDVMMCTASIL
cons famA   .....
pfam_famA   DLLfl1tippwalyylyv~~~~~ggsedWpfGsalCk.....lvtaldvvnmyaSill
cons famB   .....
pfam_famB   1sfLigdavllnsg.....Ck.....vvavflhYfflaNFfW
pfam_famC   1cylcsflFI.....gkGtvekPstwsCilRr.....ilfGlgFtlcySallLa

```

Figura 8 parte 1

	190	200	210	220	230	240
human_pro.	DRIERGSH.....		FWLLVFMPLFFVSPVSVAAAC		
ee3_2_h	DRVERGTH.....		FWLLVFMPLFFVSPVSVAAAC		
ee3_c5_h_e					
dros0 ee3	MFELLAC.....	DKLTSDRH.....		LWVLVFIPLIFGSVVSVGAC		
c.elegans	FVSLVF.....	IKLEFDYLFEPG.....		YPLPWTIVFCPLFSLSILSIGIA		
dc32_bio	AKLEQFTTMNLSYVF.....		IPLWALLAGALTELGIN		
ccr5_human	LACIAV.....	DRYLAIVHAVHAYRHRLLSIH.....		ITCGTIWLVGFLLALPEILF		
c5ar_human	LATISA.....	DRFLLVFKPIWCQNFAGLA.....		WIACAVAWGLALLLTIPSFL		
dop21_huma	NLCAISI.....	DRYTAVAMFMYNTRYSSKRRV.....		TVMISIVWVLSFTISCPLLF		
cons_famA	~~~~~					
pfam_famA	LtaISi.....	DRYLAIVhPlryrrrrtsprrrAk.....		vvilllvWlalllslPpllf		
cons_famB	~~~~~					
pfam_famB	mLv.....	EGlYLytlLvvtvevffserkr.....		lwYlliGWGvPavfvtiwa		
pfam_famC	KTirVl.....	riFrgakkpgstqkpkfisp.....		waqvlivliltliQviicv		

	250	260	270	280	290	300
human_pro.					
ee3_2_h	VWGF....	RHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDKIIHW.....		PWLVCVPL		
ee3_c5_h_e	VWGF....	RHDSLELEILCSVNILQFIFIALKLDRIIHW.....		PWLVFVPL		
dros0 ee3					
c.elegans	VWAV....	KHDSFELELEFLAVNALQFVSLPLKLDREFYW.....		NWDVVFVPM		
dc32_bio	IWSL....	RHDKPFEFEFFYAINIVQLVFIAFKLDKQVDW.....		TWAVVFIPL		
ccr5_human	VFFV....	RD~				
c5ar_human	AKV....	SQGHNNLSLPRCTFSQENQAETHAWFTSR.....		FLYHVAG		
dop21_huma	YRVV....	REXYFPKVLGVDYSHDKRRER.....		AVAIIVRLVLG		
cons_famA	GLNN.....	ADQNECIAN.....		PAFVVYSIVS		
pfam_famA	~~~~~					
cons_famB	swvk....	tveegngtlnvntvClidfpeestasvst.....		wlrsyvlstlv		
pfam_famB	~~~~~					
pfam_famC	ivr....	pdkygpilaegpagygnegcCWlsndtnsg.....		fwWiikGPilli		
	iWlvv....	ePPrpdiidysekekeedeDvsiapiileCnkgs.....		vvaFlvvLgYdg		

	310	320	330	340	350	360
human_pro.					
ee3_2_h	WILMSFLCLVVLYYIV.....	WSVLFLRSMQVIAEQRRTH.....				
ee3_c5_h_e	WILMSFLCLVVLYYIV.....	WSLLFLRSLDVVAEQRRTH.....				
dros0 ee3			RTH.....		
c.elegans	WIVICLSLVSVLYNIIF.....	CGIMMRTPEVSLQKK.....				
dc32_bio	WVVLSLAAVGVLYALVL.....	SVVLIRSRHFIPAHRROH.....				
ccr5_human	FLLPMLVMCWCVGVV.....	HRLRQAQRRPQKQKAVR.....				
c5ar_human	FLWPLLTLTICYTFIL....	LRTWSRRATRSTKTLK.....				
dop21_huma	FYVPFIVTLLVYI.....	KIYIVLRRRRKRVTNKRSSRAFRAHLRAPLKGNCNTHPEDMK				
cons_famA	~~~~~					
pfam_famA	FllPlilvilvcYtrIl....	rtlrkaakt.....				
cons_famB	~~~~~					
pfam_famB	ilvNfiffinilriLv....	qKlridslspqtgetdgyrkkrlvks.....				
pfam_famC	lLavltlllAFltRnl....	PvdnFNEAKFtFS.....				

Figura 8 parte 2

	370	380	390	400	410	420
human_pro.					
ee3_2_h					
ee3_c5_h_e					
droso ee3					
c.elegans					
dc32_bio					
cor5_human					
c5ar_human					
dop21_huma	LCTVIMKSNGSFFVNRRRVEAARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSSHQLTLPDPS					
cons famA	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~					
pfam_famA					
cons famB	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~					
pfam_famB					
pfam_famC					
	430	440	450	460	470	480
human_pro.					
ee3_2_h					
ee3_c5_h_e					
droso ee3					
c.elegans					
dc32_bio					
cor5_human					
c5ar_human					
dop21_huma	HHGLHSTPDSAPKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMENGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKA					
cons famA	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~					
pfam_famA					
cons famB	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~					
pfam_famB					
pfam_famC					
	490	500	510	520	530	540
human_pro.					
ee3_2_h					
ee3_c5_h_e					
droso ee3					
c.elegans					
dc32_bio					
cor5_human					
c5ar_human					
dop21_huma	TQM.....					
cons famA	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~					
pfam_famA					
cons famB	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~					
pfam_famB					
pfam_famC					

Figura 8 parte 3

```

                    550      560      570      580      590      600
human_pro. ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h .....AFSCIPIFVPLWLSLITLM.ATTF.~.....
ee3_c5_h_e .....TFSYVSIFVPLWLSLLTLM.ATTF.~.....
droso ee3 .....TFSCISISVPLWLLLLLTLT. TTTF.~.....
c.elegans K.....FPYIVVFSPLLVSILALIVLSSSA~.....
dc32_bio .....WPDKGSVS.....ELSYTLAMAPLQVSFFFMAIMSAGF~...GGP
ccr5_human RLKAVDNTCKLNGSLFVAI.....TMCEFLGLAHCCCL~~~NPMLYTFA.~...GV
c5ar_human SPTFILLNKLD.....SLCVSFAYINCCI~~~NPITYVVA.~...GQ
dop21_huma .....VLYSAFTWLGYVNSAVNPITYTTF.~...NI
cons_famA .....~.....NPXIY~.....
pfam_famA liimsstCelervlp.....tallvtlwLayvNscINPiIY
cons_famB .....~.....QGXVQXQX~.....
pfam_famB G.....tllslvflylfliLnSfQGffVavly....Cf
pfam_famC saedykvq.....vaveifsilaSstvlLgclFaPK.....cY

                    610      620      630      640      650      660
human_pro. ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h .....GQKGGNHWWFGIRKDFCQELLEIFPFLREYGNISYDLHHEDN...EETEETPVPEPPK
ee3_c5_h_e .....RRKGGNHWWFGIRRDFCQELLEIFPFLREYGNISYDLHHEDS...EDAETSVPPEAPK
droso ee3 .....RPKRGNHWWFGIRRDFCQELLEIFPFLREYGNISYDLHQEDS...EGAETLVPEAPK
c.elegans ...KGGNMWWFGIRKSFSQFLLSAMPFLOEYGNISYHP...ETHSNAAQSMPLDAASSST
dc32_bio SSTPQTNIWWFGLRKPLCPFLEKCPSLRTYAN...PENGEEREAVIGEENEERDEADV
ccr5_human KFRSDLSRLLTGLCTGPASLCQLFPSWRRSSISESENATSLTTF
c5ar_human GFQGRLRKSLPSLLRNVLTEESVVRSEKSFTRSTVDTMAQKTQAV
dop21_huma EFRKAFLKILHC
cons_famA ~~~~~
pfam_famA ~~~~~
cons_famB ~~~~~
pfam_famB lNgEV
pfam_famC IILfkPekN

                    670      680      690      700      710      720
human_pro. ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h .....IAPMFRKKARVVITQSPGKYVLP...
ee3_c5_h_e .....IAPIFGKKARVVITQSPGKYVPP...
droso ee3 .....IAPVFGKTRVLI...PGKYVPP...
c.elegans SMAASEQLHEFHGDKKSKGAKNDIL.....
dc32_bio GAIVNGNERRRNQRDKGRGSGGSONSQEGGQNLYEKKYFFYIKNHKNSKFSPKIYNPSE
ccr5_human
c5ar_human
dop21_huma
cons_famA
pfam_famA
cons_famB
pfam_famB
pfam_famC

```

Figura 8 parte 4

	730	740	750
		
human_pro.KLNIEMPD	
ee3_2_hKLNIDMPD	
ee3_c5_h_eKLNIDMPD	
droso ee3KPVVPEV SIDLPD	
c.elegans	QIASSSAAIIRAMAQYRNE	FGYQWKGD	ISQPD
dc32_bio			
ccr5_human			
c5ar_human			
dop2l_huma			
cons famA			
pfam_famA			
cons famB			
pfam famB			
pfam_famC			

Figura 8 parte 5

Sec 1 ee3 c1 secuencia de ácido nucléico (ratón)

A
gcgggaaggagtggtgggagacagttggttgctctggtttctcctggcggcgggcgttagcgacgaagctgcctttggcagc
atgaaccgcgtgtgagggcgaggcttcggcgcgggggggcggggggaagaggaggaagcctcggcgaagtctctcgccA
TGAACCTGAGGGGCTCTTTCAGGACTTCAACCCGAGTAAATTCCTCATCTATGCTGTCTGCTGCTGTCTCTGTGCTA
CTGGCCCTTGGTTTGGATGGCACTCATTCAATGGAGCTACTGGGCTGTCTTTGCTCCAATATGGTTTGGGAAGTTAATGGT
CATTGTTGGCGCATCAGTTTGGAACTGGAGTTTGGGCGAGAAATCTCAGTATGACGACAGAGGAGAAACATGTGTGGAGT
TTAAAGCCATGTTAATTGCTGTGGGCATCCATTGCTCCTGCTGATGTTTGAAGTCTGGTCTGTGACAGGATTGAGAGA
GGAAGCCATTTCGTGCTTCTGGTCTTCATGCCATTGTTCTTTGTTTCCOCAGTGTCTGTGTCAGCATGTGTCTGGGGCTT
TCGACATGACAGGTCACAGCTAGAGCTAGAAATCCTGTGTTTCGGTCAACATCTTCAGTTTATATTCATTGCTTAAAGCTTG
ACAAGATATCCACTGGCCCTGGCTTGTGTGTGTGCTCCTCTGGTGGATTTCTCATGTCTCTTCTGTGCTGTGGTGTCTC
TATTACATCGTTTGGTGGTTCTGTCTCTGCGCTCTATGGATGTGATTGCAGAACAAOGCAGAACACATATAACCATGCC
ACTGAGCTGGATGACCAATTGTGCTGCTCTCTTACTTTTGTAGATCCTGCTGGTTCACAAACTGGATGGCCACAATGCTT
TCTCCTGTATTCCAATATTGTTCCOCTGTGGCTCTCATTTGATCACACTGATGGCAACAACATTGGACAGAAAGGAGGA
AACCATGGTGGTTTGGTATTGCGCAAGAGCTTCTCGAGTTTCTGCTTGAATATTCOOGTTTTGAGAGAGTATGGAA
CATTTCATATGATCTCCACATGAAGATAGTGAGGAAACAGAGAAACCCAGTTCCAGAACCTCTAAAATTGCACCTA
TGTTCCGCAAGAGGCCAGGGTAGTCATCACCCAGAGCCCTGGCAAGTATGTCTCTCTCCACCCAACTAAATATTGAA
ATGCCAGACTAAaggacgccaccaggggccgcggagtggtgtgtgcactgagacacactcctacttcccttgcctccca
cctagacctggaacctcgaccaccactctgaagcctcgttttgctaccagtgtaaccaggcactcagaacgaaacatagg
tggcagggactaagggtatcttatcaatgtggatgccaagtgaacatygagcaaaagaaacctatttcttctgtatgggtacc
tgaatgtgttctcatttctgtgatccccccagggtgactgctgctcctaggcccaagaaagcatctgtgtggtctgg
gcagattttctagtgtctaaaatttctatacaagttatgatgtgtggtcctctggacacttcatctgtgtctaaactggctg
ctatgtagcagaaggactataaagggtctgacacactgtgtgcagatcagcgccgctgttccctgtctctgtgtgac
agaaattagcttagccaggatgacagcagggttgaggggcctcatcagttagcccttcccaatggcatgttccatgcct
atatgtatttatcagctatttttagcactgttaataacagttcaaatcctagtctctgtacagcatttctctgttaaag
tatgtttttacaagcttctgtggagatggatgggttaagcctagggaagcagatagctcagactgtgtatctcagt
cagatgccccactcacttaccatgccactgataccctggaaattctgcccagcagctactacaatcaaggaagaagctc
tgtgcttttccaacatgggggtgtgggagaaatggcttaaaagcccaagaaatgcccccttgagaccaggacactagagaa
gggtgccaaggcaggccagaaatcagccaggaaactctgcgaagtcgagagcatttctgctcctcctgcagaagaacactgc
atactgggcatgcaggtaacacacactgtcaggcagttctcaggctctgtgtgtatagccagccagaaacccatcatc
cagaanaataaccttcagttctaatacaaatgatattcatgttcacctgcatcagtggtcctcagtcacacataaattgaagt
ctctaacccttagtcttaccacttggcagaggcctccagtgagcctgttctgtttcagaagaagggyagcaggttagcat
tttttgtttggtctcttcaaaaatgtggttaaatccactatttttggctcctgtagtccaataaagtggttcatatttcat
gtaaaaaanaaaaaa

El EST identificado originalmente en el array de ADN utilizado era ("epoest3"):

```
acaagcttctgtgctggagatggatgggttaagccatgggagaagcagatagctcagaactgctgtatctcagtcagatgccccac
ctcacttaccatgccactgtacccttggaaattctgccagcacagctactacaatcaaggaaaagctctgtgcttttccaaca
tggggtgtgggagaaaatggcttaaaagcccaagaaatgcccccttgagaccaggacactagagaaggttgccaaggcaggcca
gaatcagccaggaaactcctgcaaagtcgagagcattctgcctacctgcaagaagaacactgcatactgggcatgcaggtacca
ccaactgtccagcagtttctccaggctctgtggttatagccagccagaaccatcataccagaaaataaccttcagtcctaaat
caaatgatctcattcatgggtcaactgatcagtggttccagtc
```

y en la secuencia indicada se encuentra en el área 3'

Figura 9

sec 2: secuencia de ácido nucleico ee3_2 (ratón)

gtcgccgagtcgagcagcgccaggtcccactccgactccgcaegcaacgcgccgctcggtcggaatgaagg
cagacggcgtgagcatccactgaagcctgagctacggggttggggcagtggtcccgccgtaggcacccgtaccgttcgcg
ccagcgcaacgctgtgccctcggtcgcttcggcgccgggccaacgttjactgctcgcaagtggtccggccccctcgagctgcg
gtctggagcctctaacaegcagcgggcggtatgcccactctagaggcagtaacagccttcgcccATGAACCCAGGGGCTGT
CCAGGACTTCAACCCAGTAAGTTCTCATTATGCCTGCTTGTACTCTTCTCCGTGCTGCTGCCCTGCGCCTGGACG
GCATCATCCAGTGGAGCTACTGGGCAGTCTTGGCCCATCTGGCTGTGGAAGCTCCTGGTCATCGTGGGCGCCTCGGTG
GGTGGCGGCGTGTGGGCCCGCAACCCAGCTACOGTACAGAGGGGGAAGCCTGCGTGGAAATCAAAGCCATGCTTATCGC
CGTGGGCATCCACCTGCTACTACTCATGTTTGAGATACTAGTCTGCGACAGGGTGGAGAGGGGCACCCACTTATGGCTGC
TGGTCTTCATGCCACTCTTCTTCGTTTCCCTGTGTGCGTGGCGCCTGTGTCTGGGGCTTCOGACAOGACAGGTCTTG
GAACTGGAGATCCTGTGCTCTGTCAACATCTGCAAGTTCATCTTCATGCGCTGAGGCTGGACAGGATTATCCACTGGCC
GTGGCTAGTGGTGTTCGTGCCCTGTGGATCCTCATGTCACTTCTGCTGCTGGTAGTCTCTATTACATCGTGTGGTCC
TCCTATTCTGCGGTCCCTGGATGTGGTTGCAGAGCAGOGAAGAACAACATGTGACCATGGCCATCAGCTGGATCACCATT
GTGCTGCCCTGCTCATTTTGGAGGTCTGCTAGTTTACAGACTGGATGACCAATAOGTTCTCTTACATTTCCATTTT
CATCCCGCTTTGGCTCTCATTACTGACTTTGATGGCTACAAOGTTCAGGOGGAAAGGGGCAATCATTGGTGGTTTGGGA
TTGCGAGGGATTTCTGTCAAGTTTCTACTAGAAGTTTTCOGTTTAAAGAGAATATGGAAATATCTCTACGATCTCCAT
CAGGAAGACAGTGAAGATGCTGAAGACGATCGGTGTGAGAACTCCGAAAATTGCTCCAATGTTTGGAAAGAAGGOGG
GGTAGTTATAACACAGAGCCCTGGGAAATATGTGCTCCACCTCCCAAGTTAAACATTGATATGCCAGACTAAactcaca
ggctgggccccttcagtgaataagaaccatatacccttgaattccctttgttttttcttgtgttccatccagtcctgga
attggaaacaggtccccctcattttacatccacactgagacagaagtctcttcagtggtcattgtgtgcogtaggcaga
agggggaaactgtaggactgtggatgtgtacataatgtgcaagagaacttgccttcaggcccatcttctgagctag
ccaaagtggttaaatcgaattgtttctaggccttcaaaagacctgaaaactacatagctgtttgttttaagtgtactt
atgcctaccaaaagtattgttttaaaagtattttatacactgctagtctaaaattgtatttttagattgcacccattgtg
acaaaatggcaaatgtaccaaattgtccccctccactgttccttaaacctcattgttgggtgtttctagtgtcctactgt
tcaaatagttgttttctgtgggctttgcggaacacaggtctctagtattctaatagatgaattttctaattggagtgaatct
gcataatagttatttatatgaatgttttagcagtggttatctgtgttgattgttagttcttggcagtaattgtattgttta
aagtattttttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 10

sec 3: secuencia de ácido nucleico ee3 1 (humano)

gacgacgctggacgcggtctggcgtctggcgccatgaaccgcgtgtaaggctcaggtctgtcagcagcggggtgcgggggag
gaggaggaggaggagcgcgcggtgaaagtctccgccatgaacctgaggggocctcttccaggacttcaaccgagtaaat
cctcatctatgcctgtctgctgctgtctctctgtgctgctggcccttcgittggatggcatcatcagctggagttactggg
ctgtcttttggctccaattatggctgtggaagttaatggtcattgttggaagccttggaacttgagctggcgacogaaat
cctcaatatogacaggaagagaaacgtctgtgaggatttaaagccattgttgatgcagctgggcatccactgtctctgtt
gatgtttgaagttctgggtctgtgacagaatogagagaggaagocatttctggctcctgggtcttcatgcoogctgttctt
ttccocgggtgtctgttgacagctgtggtttggggctttgcacatgacaggtctagagttagaaraatcctgtgtctgtc
aacattctccagtttatattcattgoccttaagactggacaagatcatccactggccctggcttgtgtgtgtgtccogct
gtggaattctcatgtoccttctgtgocctgtgtgctctctactacattgtgtgtgctcgtctgtgtctgtgctctatgagatg
tgattgggagcagcagcagcagacacatataccatggccctgagctggatgacocatcgtgtgtgccccttcttacatttgag
attctgtctggttcaaaactggatggocacaaogccttctcctgcattccgatcttctgtccccccttggctctcgttgat
cagcctgatgccaaccacatttgacagcagggaggaacacactggtggtttggtatccgcaaaagatttctgtcagtttc
tgcttgaaattctccatttctacagagaatggaacatttctactatgctccatcaogaagattatgagaacacga
gagacccagtttccggagcccccctaaattgcgacccatgtttcgaaagagggccagggtggtcattaccagacccctgg
gaagtatgtgctcccaoctcccaattaaatatgaaatgoccatatgagtgccactccggggacagagcttaagtgga
ctgggaagcactctctccgccttccctctgcgccctcgttccaccgcagaccgaaaccgactaggagctgggtctccac
gtacgtccactctcatgctctgttctgcatccagcctcatgaccactcaccgagcgggacgggagctggcaggtgacg
gggtgtgtgtgcacagatcggtatgcaggaagaggtgtgagaacaggggtgggtatcagctgtctgtggagggtctcc
aggatccccctcttcccgtcagaccccactgggagatggctgcttgcaggccccagaaggaacatctgtctatcgggtg
ctgaatcccaatcaaaagtattgtttagaagtgtatttctccacagggctgacctctgtcagctcgtgtgagcactccca
ggctcctcagcactccccaggtcgtggctggggcagtcagtaggaactgttaactgtctctgtatgacccagctgttttagc
acagcagcactctttttctgttctactgttggagtaggttctcttgggcatgctgacagcaggttttctatgctcca
cggatgagccctttctacgggagtgactccatgcttgtatcacagagtatttatcaaatgttttagcatcttcatatgcy
gtgttaacccctagtctctgtacagcatattctgttcaagtatttttataaatactctgttcaagtdttttttacaaga
cttgtgtgtgagcactgccttctgccttgaactcgtgcaggtacgttagctgtctactgcacacagcggaacaccaa
cagaagagtgttccatgcttttctgacgttctcagaatagtggttagcttcaaacctgacaagcgctgcttgaagccgga
acactagagaattgttctgagagcagaacggccacgcgggtcagcactatgcgtgggaaagtctcaagcttccctcctg
ccagcaacaaagaggctttggagttaggcattgttttaacgtgtcgtgcgcttcttccaagcactggaggttccacag
tgtgtcagaggtgcaagttttaacctctcctcgtgaaacaaataggtccttgtctaaagagggtgaaaaaagagc
tttgatctctcagccaggagaaagaggtggtgttttcacgcgggcaactgctcgcgggcttactggggttaattcaag
cttctgtgcgacgcactccgccttggcactggcctcagcgaagccctgtctcttgggggtacaggggaacgggatgg
tttagactttctcgtcagtggtgtaaaaaatgtagctaaagccactattttgtctctcttaagctgttctaaacccg
tctctcattttaaaaaaanaaaaaaanaaaaaaanaaaaaa

atg, tag: codón de iniciación y terminación

**señal putativa de poliadenilización, atg= codón de iniciación;
tag= codón de terminación)**

Figura 11 A

Sec 3b: producto de empalme alternativo (splice) ee3_1b_h (humano)

gcagcagcgtggacgcggctggcgctggcgccatgaacccgctgtaaggcgagggctgtgcagcacgggggtgcgggggag
gaggaggaggacgccgcgggtgaagttctccgccATGAACCTGAGGGGGCTCTTCCAGGACTTCAACCCGAGTAAATTCCT
CATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTGCTGGCCCTTCGTTTGATGGCATCATACAGTGGAGTACTGGGCTG
TCTTTGCTCCAATATGGCTGTGGAAGTTAATGGTCATTGTTGGAGCCTCAGTTGGAAGTGGAGTCTGGGCAAGAAATCCT
CAATATCGAGCAGAAGGAGAAACGTGTGTGGAGTTTAAAGCCATGTTGATTGCAGTGGGCATCCACTTGTCTCTGTGAT
GTTTGAAGTTCTGGTCTGTGACAGAAATGAGAGAGGAAGCCATTTCTGGCTCCTGGTCTTCATGCOGCTGTTCTTTGTTT
CCCCGGTGTCTGTTCAGCTTCCGTTTGGGGCTTTGACATGACAGGTCACTAGAGGTGAGATTTATATATTTAAGAAT
GTTTTCCACTTTGGAGGTCAAGGCAGGTGGATCACTTGAGGTGAGGAGTTTGAaccagcctggccaacatgggtgaac
cccatctctacttaataatacaaaaaattagccgggtgtggtggcatgcgccagaatcccagcttctccggaggctgaggc
gggagaatctcttaaccaggaggcgagggttgagtgagccaagattgaaccattgcactccagcctgggtgacagaaf.
gaaactccgtcttaaaaaaaaaaaaaaaaaa

agGT: donante de empalme - sitio consenso

Fig. 11B

Sec 3b: producto de empalme alternativo (splice) ee3_1c_h (humano)

aacgctagcatggatctcgggccccaaataatgattttatgttgaactgatagtgacctgttcgttgcaacaaattgatga
 gcaatgctttttataatgccaaactttgtacaaaaagcaggctctaccATGAACCTGAGGGGCTCTTCCAGGACTTCA
 ACCCGAGTAAATTCCTCATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTGCTGGGCTTCTGTTGGATGGCATCATACAG
 TGGAGTTACTGGGCTGTCTTTGCTCCAATATGGCTGTGGAAGTTAAATGGTCATTGTTGGAGCCTCAGTTGGAACCTGGAGT
 CTGGGCACGAAATCCTCAATATGTTAGaaatectgtgttctgtcaacattctccagtttatattcattgccttaagact
 ggacaagatcatccactggccctggcttgtgtgtgtgtgccgtgtgtgattctcatgtcctttctgtgcctggtggtcc
 tctactacattgtgtggtccgtcttgttcttgcgtctctatggatgtgattgcggagcagcgcaggacacacataaccatg
 gccctgagctgaatgaccatcgctcgtgcccttcttacatttgagattctgctggttcacaaactggatggccacaaacgc
 cttctcctgcatcccgatcttctgtcccttctgtctcgttgatcacgctgatggcaaccacatttggacagaaggag
 gaaaccactggtggttggatccgcaaagattctgtcagtttctgcttgaatcttcccatctctacgagaatatgga
 aacatttcctatgatctccatcacgaagataatgaagaaaccgaagagacccagttccggagccccctaaaatcgcacc
 catgttctgaaagaaggccagggtggtcattacccagagccctgggaagtatgtgtccacctcccaaattaaatatcg
 aaatgccagattaggaaccagcttcttgtacaaagtggcattataagaaagcattgcttatcaatttgttgcacgaa
 caggtcactatcagtcaaaaataaaa

Figura 11 C

Sec. 4: secuencia de ácido nucleico ee3_2 (humano)

ggcacgaggcgctccgcccgaaggtcgcgggcggttggggagtcagcagcgcgccaggccccttcggggcccccacacgcatt
 aggtgccttcttgatgggtacggagtgaaacgcgggcggcgggaccgaggcagcgcccagtttgtaaccgdcgcgcgcg
 cccctgccccgcgcgcgcacacccccagcgcgcttccggccggggccacgtgaccgcgcgtgcacgtgttccggcctctccg
 cttegcgcgtccgaacctctctctggtcggtcccgccattcgteccacgcggagccggcttgggccccggggaggcggc
 ggccggagaagccgcggagacgcgagcgccgagcgctcgcgaggagcaggccccgggcaggcaagcggcgccctccgccAT
 GAACCCAGGGGCGCTGTTCCAGGACTTCAACCCAGTAAGTTTCTCATCTACACCTGCCTGCTCTTCTCGGTGCTGC
 TGCCCTCCGCTGGACGGCATCATCCAATGGAGCTACTGGGGCGTCTTTGCCCCCATATGGCTGTGGAAGCTTCTAGTC
 GTCGAGGCGCCTCGTGGGCGCGGGCGTTTGGGCCCGCAACCTCGCTACCGCACCGAGGGAGAGGCGCTGTGTGGAGTT
 CAAAGCCATGCTGATCGCTGTGGGCATCCACCTGCTGCTGCTCATGTTGGAAGTCTGGTCTGCGACAGGGTGGAGAGGG
 GCACCCACTTCTGGCTGCTGGTCTTTCATGCCCTCTCTTCTCGTGTCCCGGTGTCCTGGCTSCCTGCGTCTGGGGCTTT
 CGACACGATAGGTGCTGGAGCTGGAGATCCTGTGCTCGGTCAACATCCTGCAGTTTCATCTTCATCGCCCTAAAGCTGGA
 CAGGATTATTCACTGGCGGTGGCTGGTGGTGTGTGTGCCCTGTGGATCCTCATGTGCTTCTTGGCTGGTGGTCTCT
 ATTACATCGTCTGGTCCCTCCTGTTCTGCGGTCCCTGGATGTGGTTGCGAGCAGOGGAGAACACAOGTGACCATGGCT
 ATCAGTTGGATAACGATTGTGTCCTCTGCTCACTTTTGAGGTCTGCTGGTTTCACAGATTGGATGGCCACAATACATT
 CTCTACGTCTCCATATTTGTCCCTTTGGCTTTCTTACTAATTTAATGGCCACAACATTTAGGOGAAAGGGGGCA
 ATCATTGGTGGTTTGGCATTGCGAGAGACTTCTGTCACTTTCTGCTGAAATTTTCCATTTTAAAGAGAATATGGGAAC
 ATTTTCATATGATCTCCATCAGAGATAGTGAAGATGCTGAAGAAACATCAGTTCCAGAAGCTCOGAAAATTGCTCCAAT
 ATTTGGAAAGAAGGCCAGAGTAGTTATAACCCAGAGCCCTGGGAAATAOGTTCCCCCCCCCTCCAAGTTAAATATTGATA
 TGCCAGATTAAactcctagagaggacccaggcacacacagactccacctggccttcgcctcttgttcattcatcccaaac
 ctggaaatggaaacaggcttcaaacactcgtctcacgcccgtgtttgagatcacgcctcatcagtatgcatcatagatgg
 aggtggtttcagtatgtgggtgtgtgtgtgtgtacctgggtaagagacttgctttccagggttcgcactttcagggtgtag
 ctgggggcagtaagtcgaattgttttagtaggtcctcaaaaggaataaccacacagctgtttgtttaaatgctactgtac
 ctatcaaaactattgtttaaaaagtattttatacactgctaatactaaaattgtatttcagattgtgcctgtcataacaa
 tagcaaatgtaaaaagttctcttcccaccacttggtttataaacctcatagttgataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

de modo alternativo, se encuentra un segundo punto de poliadenilización
 dispuesto 3' más adelante (la "gat" cursiva indica la conexión con la secuencia anterior):

....gatatttttagtggttctactgttaaaatactctctccttgggctttgctgatactgggtctttaataattctgatagggtg
 aatttttctaattggaatgaacccatgcatatatagtttatatgaatatttttagcagtgtaatatgttgaattctagttctc
 tgcattaccattattacgttaaagtattttttaagcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

señal putativa de poliadenilización, atg= codón de iniciación;
 tag= codón de terminación

Figura 12

Sec. 5: ee3_1 secuencia de proteína (ratón)

**MDLRGLFQDFNPSEFLTYACLLFSEVLLALEIDGI IQWSYNAVYAPINLAEGLNVTVGASVCTGVNARNPQYRAEGETCVE
FIOMLIAVGTIELLLIMFEVLVCDRIERGSHFWLLVTMPLFFVSPVSVAACVNGFRHDSLELEILCSVNILOFTYIALRL
DKLDRFWLVVCVFLNIIIMSFCLVVLTYIVNSVLFILRSMDVIAEQRRTHITMALSNGTIVVPLTTEILLVERKLDGNA
FSCIPLEFVPLSLSLITLMATTTCQKGGNHWFGIRKDFCQFILEIFPFLREYGNISYDLNEDSEETETPVPEPPKLA
MFRKARVVITQSPGKTVLPPKLNIEPD**

Figura 13

Sec. 6: ee3_2 secuencia de proteína (ratón)

**HNFRGLFQDFNPSEPLIYACLLLFVLLFLRLDGI IQSYNAVTFAPINLSKLLVIVGASVGCAGVWARGPYRTEGZACVE
FYOMLIAVGIDILLIMFEILLVCDRVERGTHMLLVNMLFFVSFVSVAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFI FIALRL
DRIIDNPWL VVFVPLNI LMSFLCLVVLITTVWSLLFLRSLDVVAEQRRTHVTHAISWITIVVPLLIFEVLLVRLDDNT
FSTISIFIPILNLSLLTLMATTFRKGGNHNWFCIRRD FQFLLEVPFPLREYGNIGYDLHEDSEDAEDASVSEAPKIAP
MFCNKARVVITQSPGKYVPPPPKLNIDMFD**

Figura 14

Sec. 7a: ee3_1 secuencia de proteína (humano)

**MSLRGLFQDFNPSKFLITACLLLFSVLLALRLDGIITQWSYRAVFAPINLAKIAMVIVGASTGTGVHAKNPQYRAECETCVR
FXAMLIIVGIEHLLLIAMFEVLVCDRIERGSEHWLLVFMPLFFVSFVSVAACVNGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALRL
DKIIEHPWLVVCVPLNIIHSFLCLVVLYYIVNSVLFIRSMQVLAEQRRTHITMALSMTITVVPLLTFEILLVHRLDGHNA
FSCIPIFVPLHLSLITIAATTGQKGGHRRFGIRKDFCQFILEIFPFLREYGNISYDLHHEDNEETEETPVPEPPKIAP
MERKARVVITQSPGKIVLEPPKLNIEPD**

Figura 15 A

Sec. 7b: ee3_1b_h secuencia de proteína (humano)

**MDLRGLFQDFNPSEFLTYACLLFSVLLALRLDGIQRSTRAVEPAITFLSKLNVIVGASVCTGVNARNPQIRAEGETCVE
FTAMLIAVGIHLLLMFEVLVCDRIERGSEFWLLVIMPLFFVSFVSVAACVNGFREDRSLEVRFHIFKNVFEFGESRQVD
HLRSGV**

Figura 15 B

Sec. 7c: ee3_1c_h secuencia de proteína (humano)

MTLRGLEQDDFNPSKELTYACLLFSVLLALRLDGLIQNSYNAVEAPINLNKLMVIVGASVGTGWZARNPQYR

Figura 15 C

Sec. 8: ee3_2 secuencia de proteína (humano)

**MMPRGLFQDFNPSEKFLITYCILLFSVILLFLRLDGI IQNSTWAVFAPINLWKL LVVAGASYGAGVWARNPRYTEGEACVE
FRAMLIAVGIDILLIMEVLVCDRVERGTHFWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVNGFRHDSILELILCSVKILQFTFIALEL
DRIIDWFWLVVFVFLNILMSFLCLVVLITIVNSLLFLBSLDVVAEQRRTHVIMAI SWITIVVPLLTFEVLVVERLDGENT
FSYVSI PVFLWLSILLTINATTFRNGGSEHWFGIERDFCQELLEIFPFLREYGNISYDLRHED SEDALETSVFEAPKIAF
IFGKJARVVITQSPCKIVPPPPKLNIDMF**

Figura 16

Sec. 10: ee3 5 humano cADN

[illegible]

En negrita: codones de iniciación y terminación. Un codón de terminación in-frame (sin cambio de marco de lectura) delante del fragmento carboxiterminal está marcado adicionalmente, y excluye un marco de lectura más largo tras 5'. El extremo 3' de esta secuencia de cADN está incompleto.

Figura 17

Sec. 11: ee3_5 humano proteína

**MRTTRAVKNTIRDHGHQLDNDCHRALLTFEVLLVHRLDGRNTFSCISISVPLNLLLLLTMTTTFRPKRGNHWWFGI
RRDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHQEDSEGAEETLVPEAPKIAPVFGKTRVVLI PGKVPPPPKINIDMPD**

Figura 18

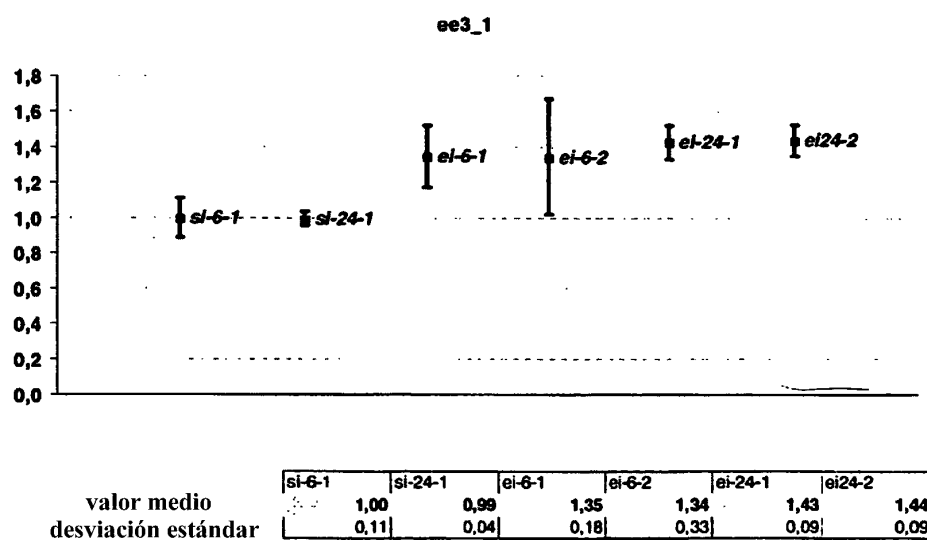


Figura 19



Figura 20

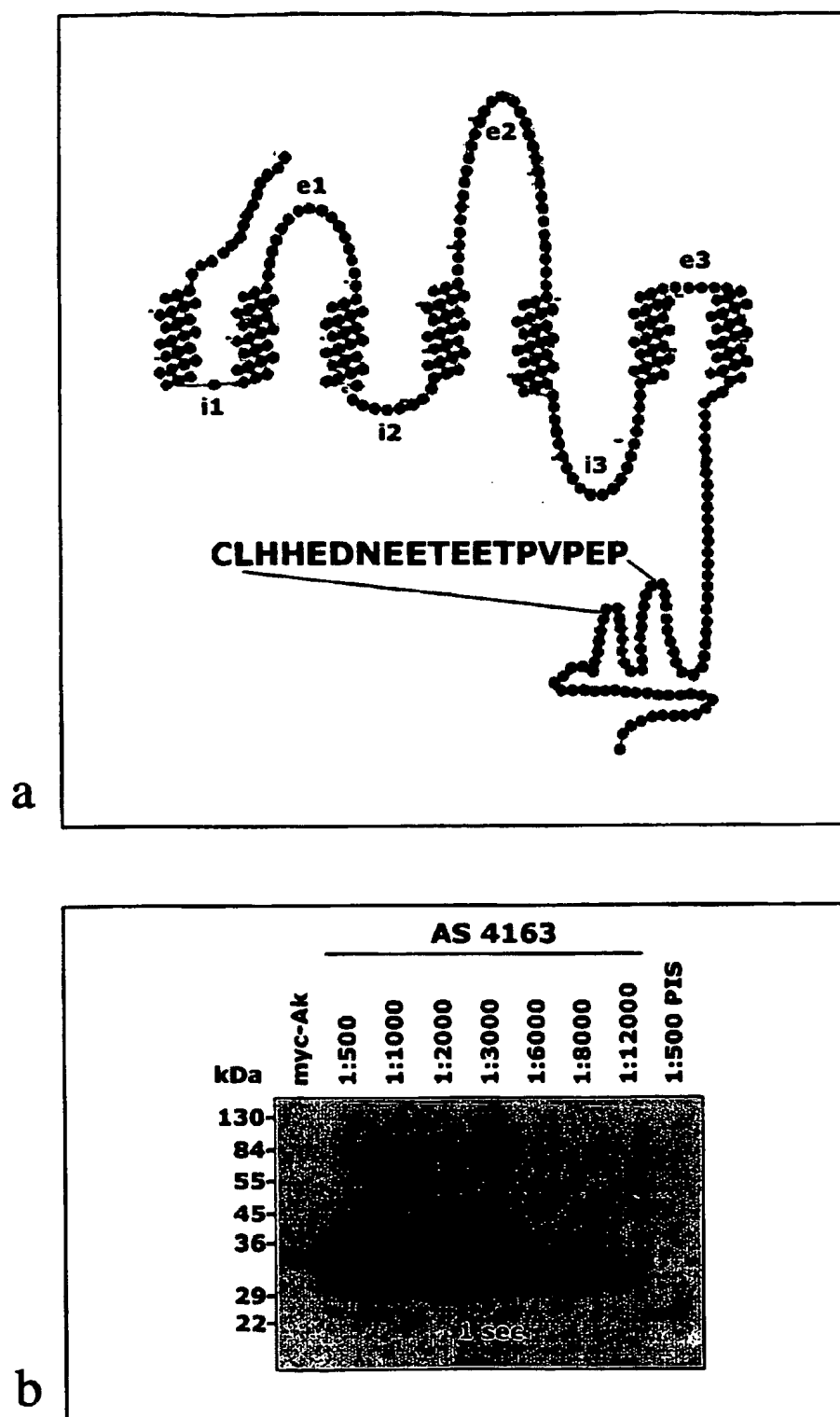


Figura 21

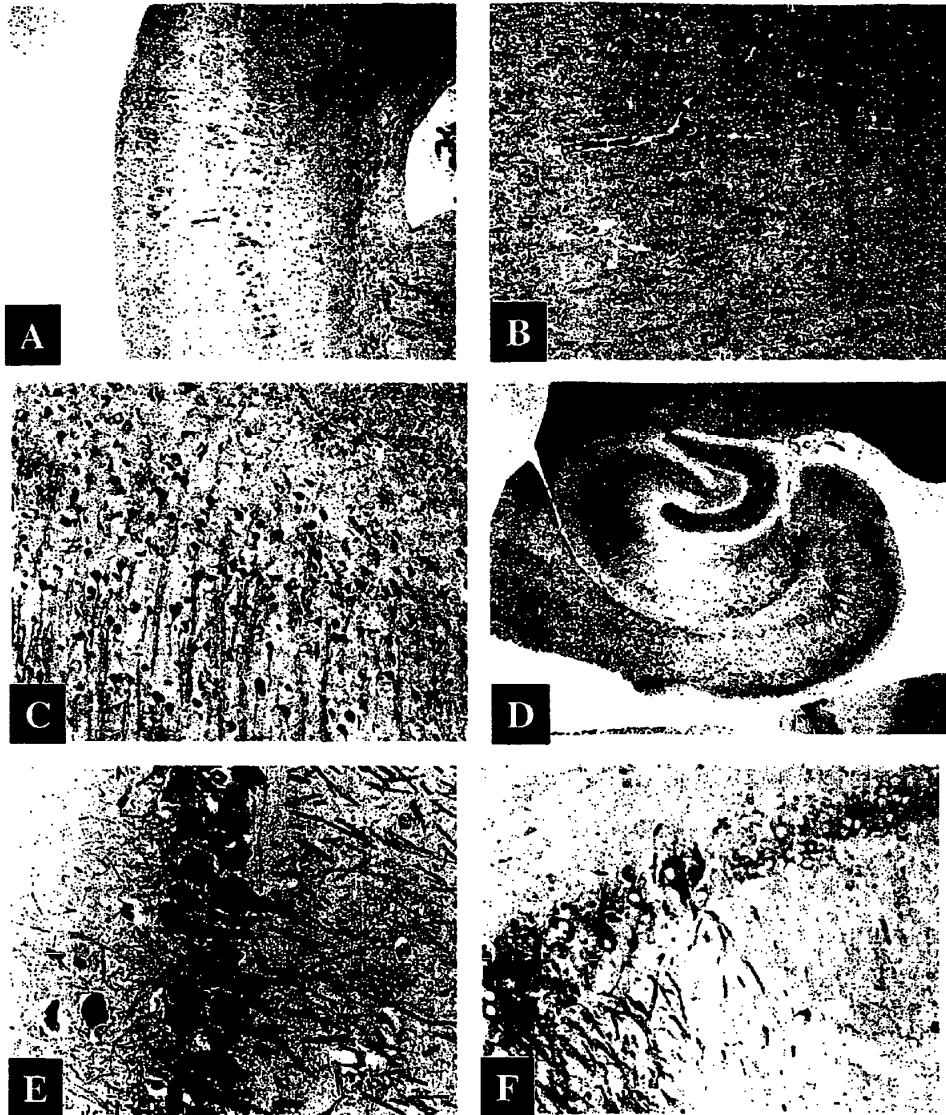


Figura 22 parte 1

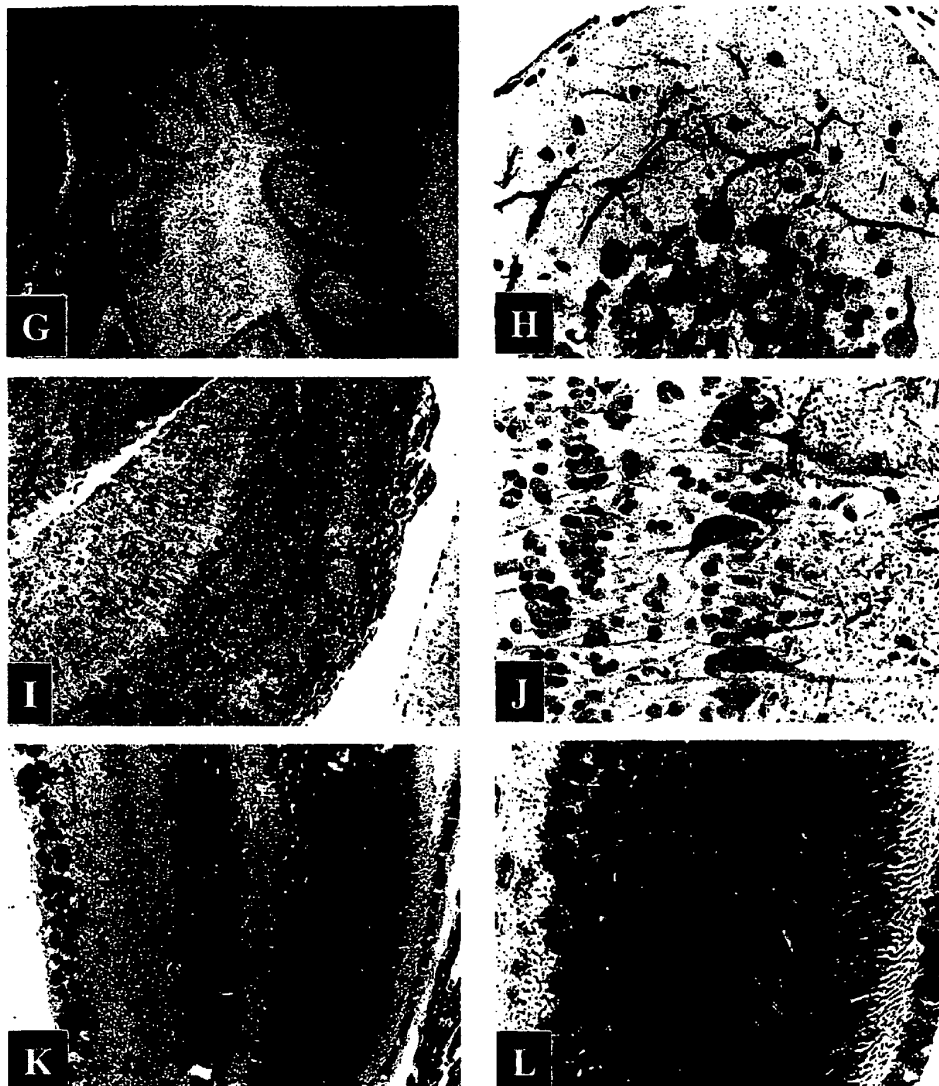


Figura 22 parte 2

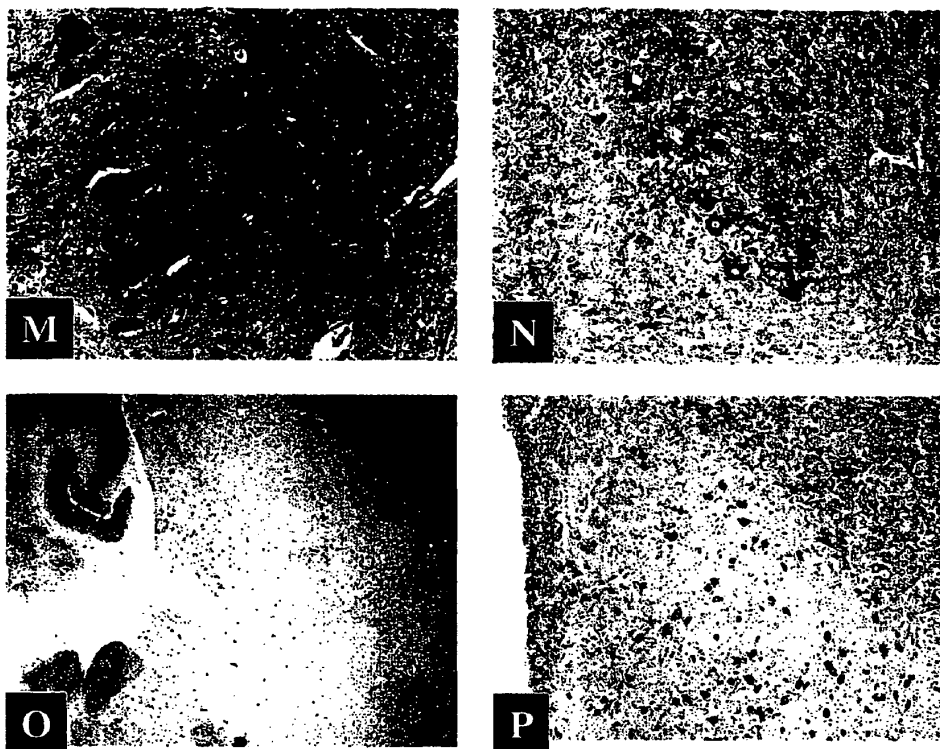


Figura 22 parte 3

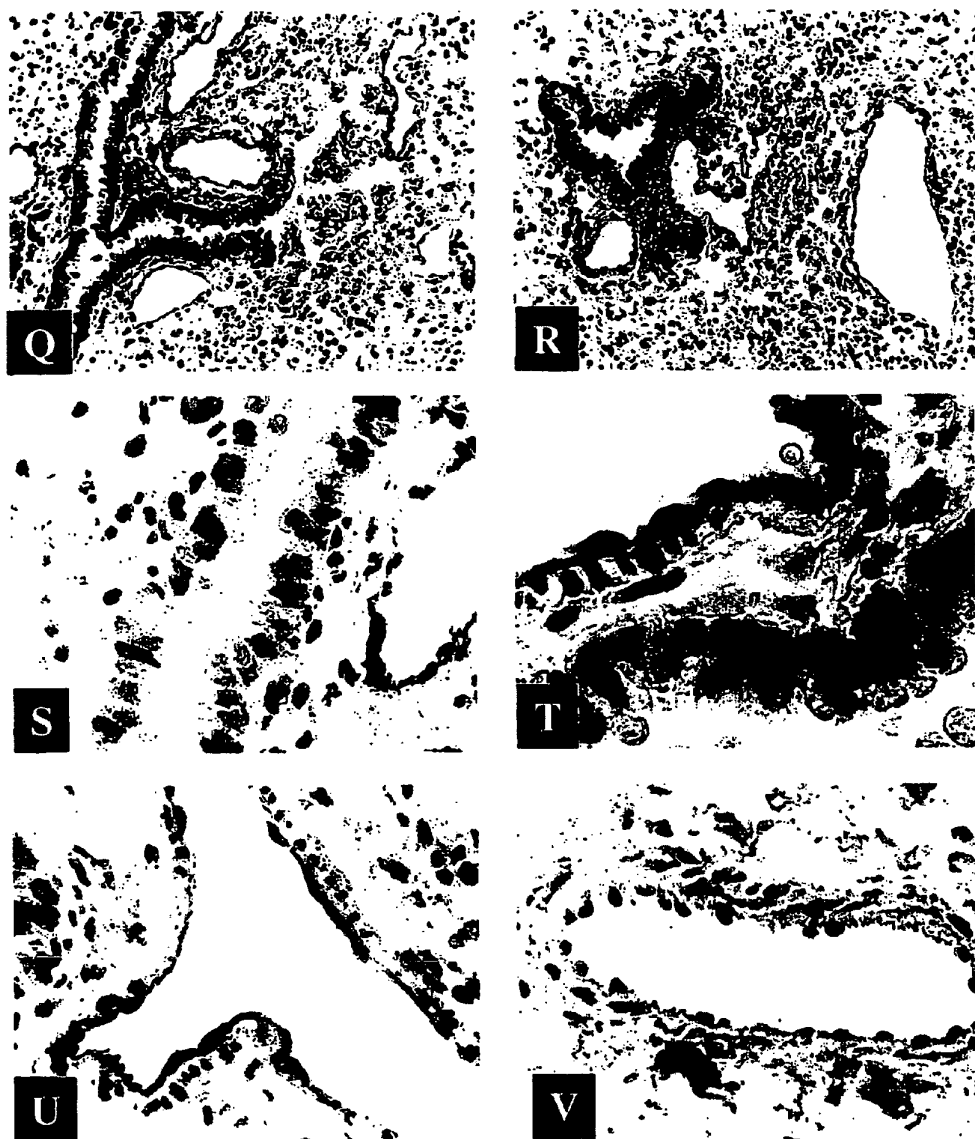


Figura 22 parte 4

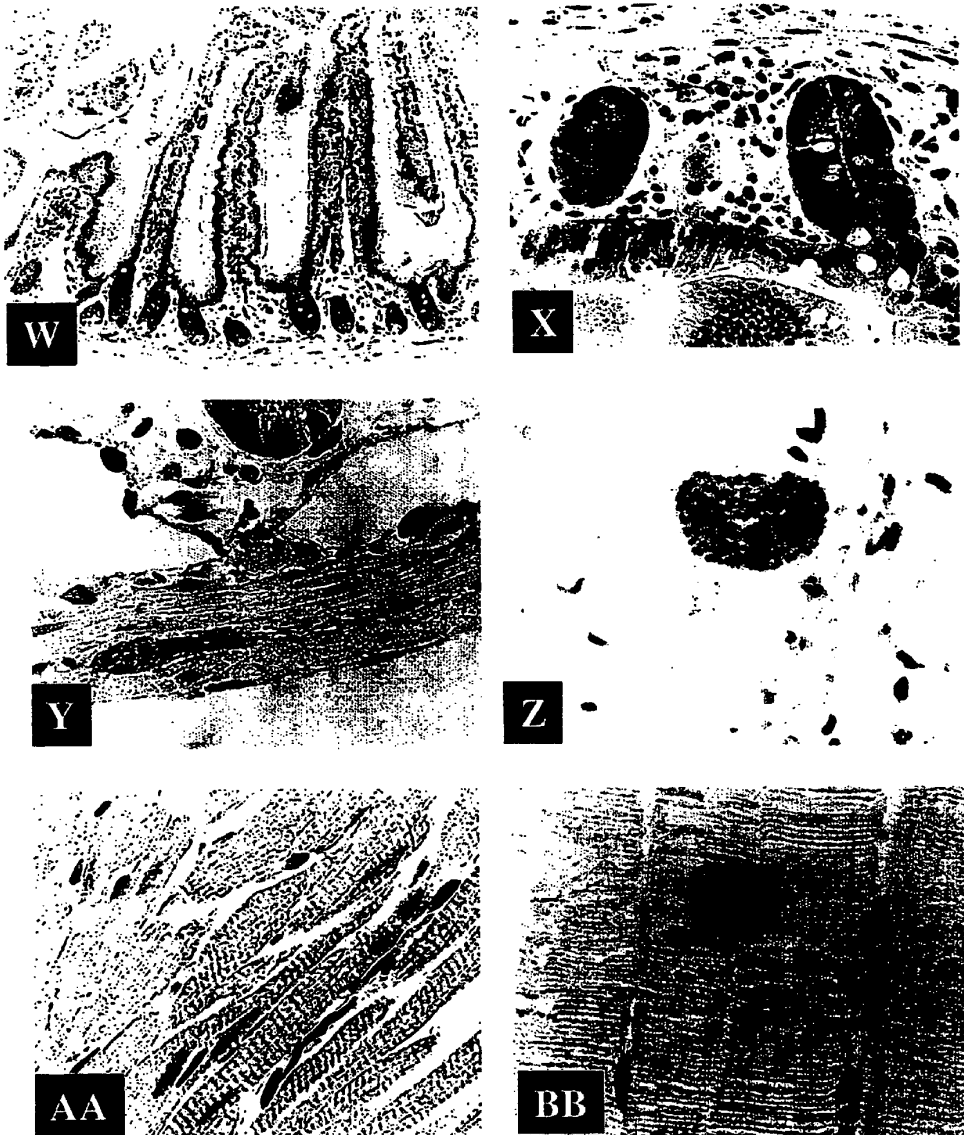
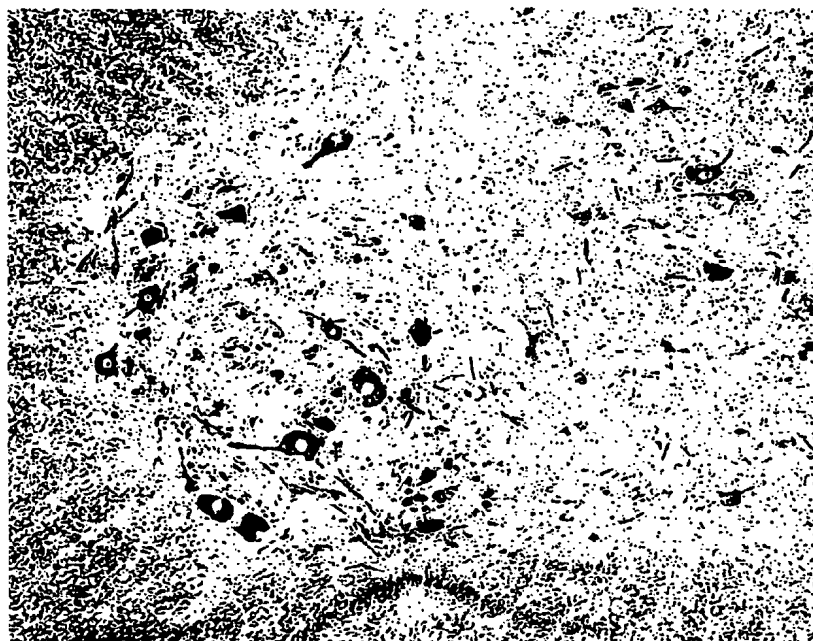


Figura 22 parte 5

wt (salvajes) de la misma camada, médula espinal



ratón EPO-tg (transgénico), tratado en paralelo

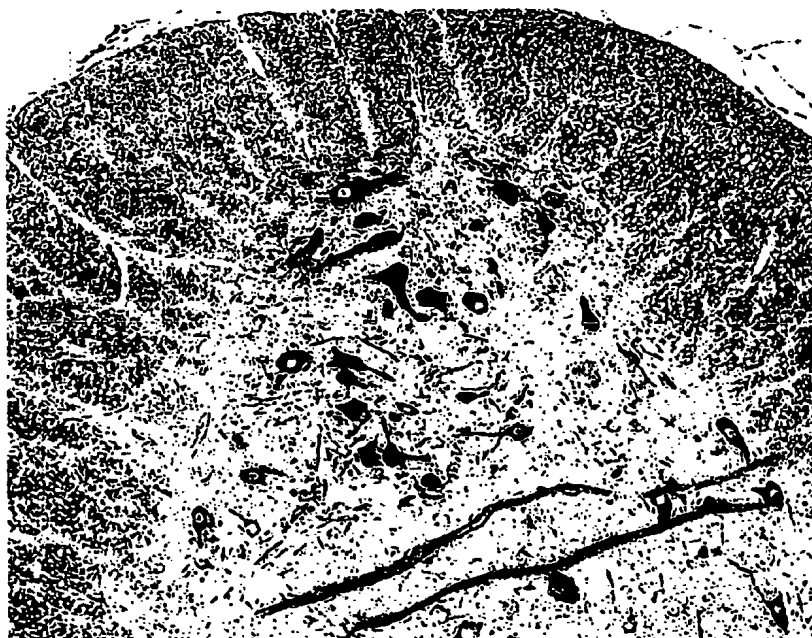


Figura 23

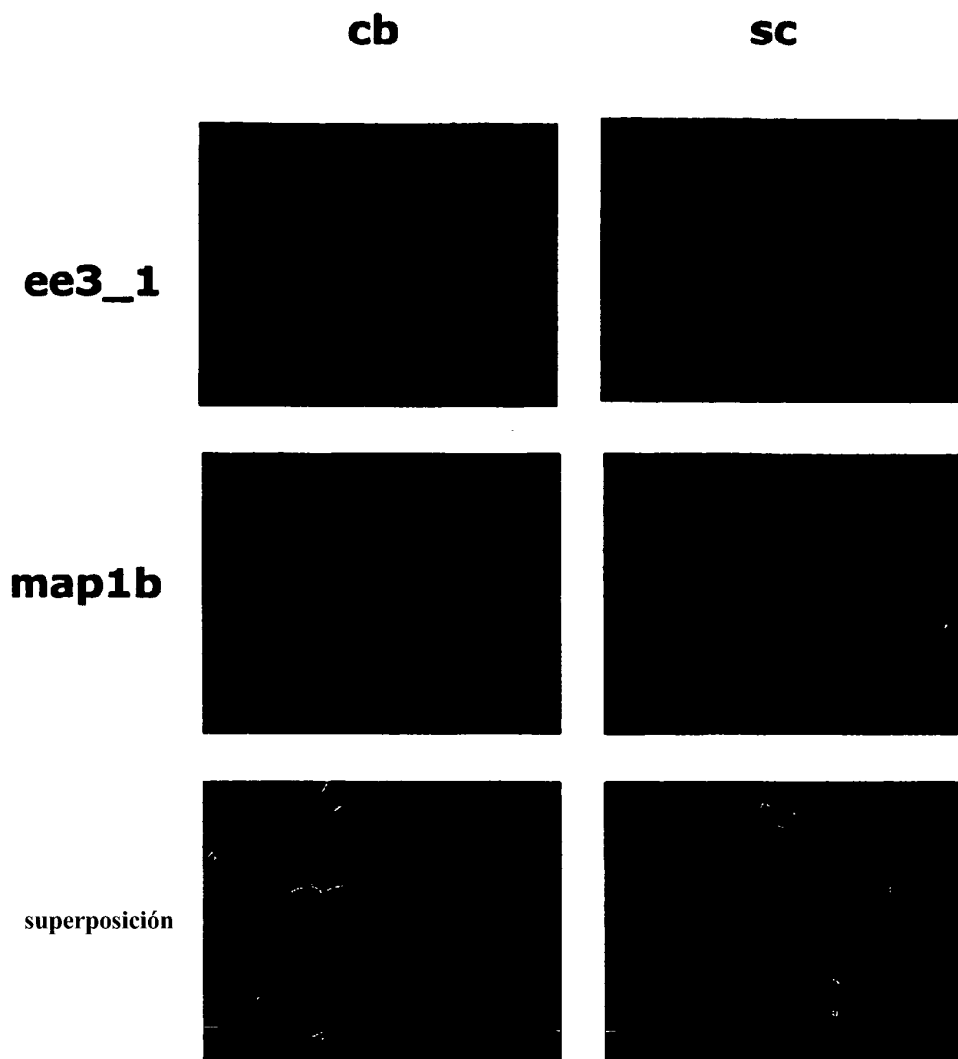


Figura 24



Figura 25

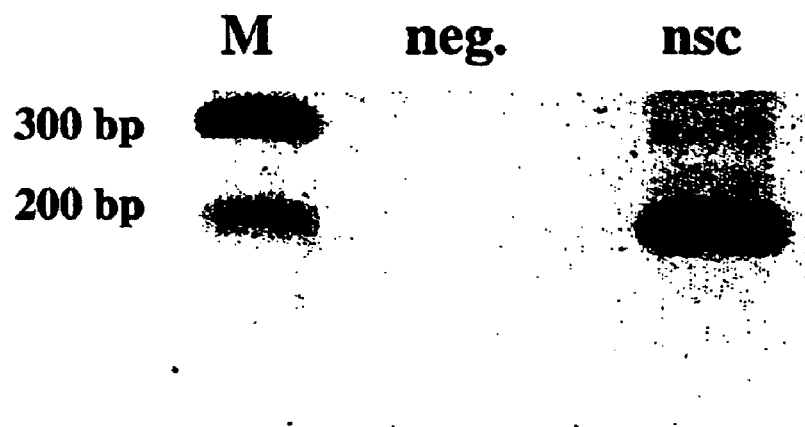


Figura 26

```

      10      20      30      40      50      60
h_ee3_2 ---MNPRLGFQDFNP:SKFLIYTCLLLFSVLLPLRLDGIQWSTWAVFAPIWLWKLNVVAG
h_ee3_1 ---MNLRLGLFQDFNP:SKFLIYACLLLFVLLALRLDGIQWSTWAVFAPIWLWKLNVIVG
m_ee3_2 ---MNPRLGFQDFNP:SKFLIYACLLLFVLLPLRLDGIQWSTWAVFAPIWLWKLNVIVG
m_ee3_1 ---MNLRLGLFQDFNP:SKFLIYACLLLFVLLALRLDGIQWSTWAVFAPIWLWKLNVIVG
xl_ee3  ---MNLRLGLFQDFNP:SKFLIYACLLLFVLLSLRLDNIQWSTWAVFAPIWLWKLNVIVG
dr_ee3  ---MNLRLGVFQDFNP:SKFLIYACLLLFVLLSLRLDGIQWSTWAVFAPIWLWKLNVIIIG
dm_ee3  ---MNLRLSLFRDFNP:CKPIVHCSLPIFVTLPALRLDNIQWSTWAVFAPIWLWKLNVIIIG
ce_ee3  MVELSLGVFFRSFPAKSVILCACLIFTALFTLKLDKGVSPSYAFVFAPIWLWACLNVVFGV

      70      80      90      100     110     120
h_ee3_2 ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRVERG-----TH
h_ee3_1 ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRIERG-----SH
m_ee3_2 ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRVERG-----TH
m_ee3_1 ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRIERG-----SH
xl_ee3  ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRIERG-----HY
dr_ee3  ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRIERG-----I
dm_ee3  ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRIERG-----RH
ce_ee3  ASVGAGVWARNPQYRTEGACVEFKAMLIAGVGHLLLMFVVLVCDRIERG-----RH

      130     140     150     160     170     180
h_ee3_2 FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
h_ee3_1 FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
m_ee3_2 FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
m_ee3_1 FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
xl_ee3  FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
dr_ee3  FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
dm_ee3  FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW
ce_ee3  FWLLVFM:LFFVS:VSVAACVWGFRHDSLELEILCSVHILQFIFIALRLDKIHW:WLW

      190     200     210     220     230     240
h_ee3_2 VFV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
h_ee3_1 VCV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
m_ee3_2 VFV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
m_ee3_1 VCV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
xl_ee3  VCV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
dr_ee3  VCV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
dm_ee3  VFV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL
ce_ee3  VFV:LWILMSFLCLVVLVYIVWSVFLRSLDVVAEQRRTHITMAISWMTIVV:LLTFEVL

      250     260     270     280     290     300
h_ee3_2 LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
h_ee3_1 LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
m_ee3_2 LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
m_ee3_1 LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
xl_ee3  LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
dr_ee3  LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
dm_ee3  LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK
ce_ee3  LVRKLDGHT-----FSYVSIFV:LWLSLLITLMATTFGRKGG-----NHWTFGIRK

      310     320     330     340     350     360
h_ee3_2 DFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHED-----SEDAKTSVPEA
h_ee3_1 DFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHED-----SEDAKTSVPEA
m_ee3_2 DFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHED-----SEDAKTSVPEA
m_ee3_1 DFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHED-----SEDAKTSVPEA
xl_ee3  DFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHED-----SEDAKTSVPEA

```

Figura 27