

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 926**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05797320 .8**

96 Fecha de presentación: **27.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1802749**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Gen KASPP (LRRK2), su producción y uso para la detección y tratamiento de trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

21.10.2004 US 620893 P

22.10.2004 US 621169 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

02.01.2013

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

02.01.2013

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT (GMBH) (33.3%)
INGOLSTÄDTER LANDSTRASSE 1
85764 NEUHERBERG, DE;
MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (33.3%) y
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TUBINGEN
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**MEITINGER, THOMAS;
STROM, TIM, MATTHIAS;
BISKUP, SASKIA;
UEFFING, MARIUS;
KREMMER, ELISABETH;
GLOECKNER, CHRISTIAN, J.;
GASSER, THOMAS;
LEITNER, PETRA;
ASMUS, FRIEDRICH;
PATENGE, NADJA;
ZIMPRICH, ALEXANDER;
FARRER, MATTHEW, J.;
KACHERGUS, JENNIFER, M.;
LINCOLN, SARA, J.;
HULIHAN, MARY, M.;
WSZOLEK, ZIBIGNIEW y
UITTI, RYAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 393 926 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

Gen KASPP (LRRK2), su producción y uso para la detección y tratamiento de trastornos neurodegenerativos

La presente invención se refiere a un gen recientemente descubierto llamado KASPP por quinasa asociada con el parkinsonismo con patología pleomórfica o alternativamente llamado LRRK2 por quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina, su producción, caracterización bioquímica y uso para la detección y tratamiento de trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Parkinson (PD por sus siglas en inglés), que incluye, sin limitación, PD esporádica, la enfermedad de Alzheimer (AD por sus siglas en inglés), esclerosis lateral amiotrófica (ALS por sus siglas en inglés), y otras sinucleinopatías y/o tauopatía.

La enfermedad de Parkinson (PD) es el segundo trastorno más neurodegenerativo que afecta a 1 - 2% de la población mayor de 65 años y se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, asociada con la formación de agregados fibrilares compuestos de proteína α -sinucleína y otras proteínas (cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy). En la mayoría de los casos, la PD se presenta como una enfermedad esporádica de etiología desconocida, pero en raras ocasiones, las mutaciones puntuales o multiplicaciones del gen de la α -sinucleína pueden causar parkinsonismo autosómico dominante que se asemeja a la enfermedad esporádica en muchos aspectos. Se han reconocido formas recesivas de parkinsonismo, que son causadas por mutaciones en los genes para *parkin* (Kitada T. et al., Nature, 392, 605 - 608, 1998), *DJ-1* (Bonifati V. et al., Science, 299, 256 - 259, 2002) y *PINK1* (Valente E. M. et al., Science, 304 (5674), 1158 - 1160, 2004). Se han mapeado loci adicionales en cromosomas 2p (Gasser T. et al., Nat. Genet., 18, 262 - 265, 1998), 12cen (Funayama M. et al., Ann. Neurol., 51 (3), 296 - 301, 2002), 1q (Hicks A. A. et al., Ann. Neurol., 52 (5), 549 - 555, 2002), y 2q (Pankratz N. et al., Am. J. Hum. Genet., 72 (4), 1053 - 1057, 2003). En más del 10% de los pacientes con PD uno o más parientes también son afectados por este trastorno (Elbaz et al., Neurology, 52: 1876 - 82, 1999). Sin embargo, las causas genéticas se encuentran sólo muy raramente.

Ya que la agregación de α -sinucleína es una característica patológica tanto en la forma esporádica común como en una forma heredada dominante de la PD, y también en otras enfermedades neurodegenerativas, tales como la demencia con cuerpos de Lewy (DLB por sus siglas en inglés) y la atrofia multisistémica (MSA por sus siglas en inglés), esas enfermedades han sido llamadas colectivamente como "sinucleinopatías". Otras formas de parkinsonismo están asociadas con la acumulación de filamentos compuestos de la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT por sus siglas en inglés). Las mutaciones en este gen explican al menos un subgrupo de familias con demencia frontotemporal con parkinsonismo (FTDP-17; Ghetti B. et al., "La demencia frontotemporal y parkinsonismo ligados al cromosoma 17 asociado con mutaciones del gen tau (FTDP-17)". En: Dickson D. W., "Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders" ISN Neuropath Press, Basal, 86 - 102, 2003), mientras que los casos esporádicos con patología tau más comúnmente presentes como parálisis supranuclear progresiva (PSP por sus siglas en inglés) o la degeneración corticobasal (CBD por sus siglas en inglés). Con base en el papel central putativo de la proteína tau en estas enfermedades, han sido llamadas "tauopatías".

Recientemente se ha demostrado que dos grandes familias con aparición tardía de parkinsonismo autosómico dominante (familias A y D) están vinculadas al locus de PARK8 en el cromosoma 12p11.2-q13.1 (OMIM # 607060), originalmente mapeado en una familia japonesa por Funayama et al. (Funayama et al., Ann. Neurol., 51 (3), 296 - 301, 2002; Zimprich A. et al., Am. J. Hum. Genet., 74 (1), 11 - 19, 2004).

Ahora, un análisis de haplotipos refinó la región candidata a un intervalo de 13 Mb entre los marcadores flanqueadores D12S1692 y D12S85. Un total de 29 genes han sido secuenciados en esa región en dos pacientes de cada familia (véase la Tabla 1).

Un gen completo, parte de cual había sido previamente depositado bajo la referencia DKFZp434H211 (Número de acceso: XM_058513), ha sido amplificado a partir de ADNc de cerebro humano utilizando cebadores superpuestos correspondientes a las secuencias publicadas de diferentes EST y ARNm. Sin embargo, se hizo evidente a partir de las alineaciones de secuencias de especies cruzadas que el clon DKFZp434H211 estaba incompleto hacia el extremo 5'.

Sorprendentemente, se han encontrado varias mutaciones, incluyendo mutaciones sin sentido y una mutación del sitio de empalme, en el gen grande recientemente descubierto que codifica para una proteína multifuncional, que se denomina como quinasa asociada con parkinsonismo con patología pleomórfica, KASPP. KASPP abarca una región genómica de 144 Kb y comprende 51 exones y codifica 2527 aminoácidos (véanse las SEQ ID NOS: 1 y 2 y la Fig. 4). El gen también puede ser llamado Z, quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina, LRRK2, ya que es el único gen en el genoma humano que codifica una quinasa que contiene repeticiones ricas en leucina, lo cual era muy sorprendente. KASPP/LRRK2 es una proteína de 285 kD.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una

secuencia de polinucleótido seleccionada de:

(a) los nucleótidos 1 a 9104 de la SEQ ID NO: 1;

(b) los nucleótidos 1 a 7584 de la SEQ ID NO: 1;

(c) los nucleótidos 1 a 7581 de la SEQ ID NO: 1;

5 (d) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de la proteína de la SEQ ID NO: 1;

(e) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c) o (d); y/o

(f) una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c), (d) o (e).

10 La SEQ ID NO: 2 refleja la secuencia de aminoácidos de KASPP/LRRK2 humana y la secuencia humana de nucleótidos que codifica para la KASPP/LRRK2 humana.

Los ejemplos de polinucleótidos seleccionados del párrafo (f) anterior, son las mutaciones específicas, las variantes y los polimorfismos descritos en la presente memoria.

15 Un polimorfismo en general es la aparición de diferentes formas de ácidos nucleicos o proteínas en organismos individuales o en organismos de la misma especie, independiente de las variaciones sexuales. De acuerdo con la presente invención, se han encontrado dos polimorfismos diferentes para la KASPP/LRRK2 humana. Una muestra una variación de citosina por timidina en la posición 635 (c635t) causando un cambio en la secuencia de aminoácidos de serina por leucina (S212L) (véanse las SEQ ID NOS: 4 y 5). La otra muestra una variación de timidina por citosina en la posición 7190 que causa un cambio en la secuencia de aminoácidos de metionina por treonina (M2397T) (véanse las SEQ ID NOS: 6 y 7).

25 Ejemplos de condiciones de hibridación de alta rigurosidad se pueden encontrar por ejemplo, en Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY (1989). En un ejemplo particular, un filtro, por ejemplo un filtro de nitrocelulosa, se incubaba durante la noche a 68 ° C con una sonda en una solución de hibridación que contiene por ejemplo formamida al 50%, alta en sal (ya sea 5x SSC [20x: NaCl 3 M/citrato trisódico 0,3 M] o 5x SSPE [20x: NaCl 3,6 M / NaH₂PO₄ 0,2M / EDTA 0,02M, pH 7,7]), solución de Denhardt 5x, SDS al 1%, y 100 µg / ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Esto es seguido por varios lavados con amortiguador, por ejemplo, en 0,2x SSC / SDS al 0,1% a una temperatura seleccionada con base en la rigurosidad deseada y la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN. Por ejemplo, 68 ° C son adecuados para la hibridación de alta rigurosidad.

30 La presente invención también está dirigida a un fragmento de la molécula de ácido nucleico de la invención especificada anteriormente, que contiene al menos uno de los 51 exones y / o que codifica al menos uno de los cinco dominios como se especifica en la Figura 4, la Figura 5 y / o la Figura 11 y / o la presente memoria descriptiva. Los límites de los exones como se especifica en la Figura 4 son aplicables para las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

35 Además, la molécula de ácido nucleico como se especifica en (f) más arriba puede consistir de 10 a 50 nucleótidos, preferiblemente de 10 a 35 nucleótidos, en particular de 20 a 35 nucleótidos. Tal molécula de ácido nucleico puede ser utilizada como una sonda o cebador para la detección del polinucleótido de la presente invención, en particular para la detección de una mutación de la misma como se explica en forma más detallada a continuación.

40 Otro ejemplo de un fragmento es un ácido nucleico que codifica para el péptido inmunogénico de la SEQ ID NO: 3 y el propio péptido.

Tales fragmentos pueden ser producidos sintéticamente, por ejemplo por síntesis de ácido nucleico o por una reacción de PCR o PCR-TR.

45 La presente memoria descriptiva también divulga una molécula de ácido nucleico que contiene por lo menos una de las mutaciones representada en la SEQ ID NO: 1 o 2, preferiblemente sólo una de las mutaciones representada en la SEQ ID NO: 1 o 2, por ejemplo, la(s) mutación(es) en la posición 2378, 2789, 3287, 3342, 3364, 3683, 4321, 5096 y / o 6059. Además, los polimorfismos c635t y t7190c son también una forma de realización específica de la presente memoria descriptiva. Sorprendentemente, se ha descubierto que en la familia A (Y1699C; 5096A>G) y en la familia D (R1441C; 4321C>T) ambas mutaciones segregadas con la enfermedad en las familias (para árboles

genealógicos véase la Fig. 1) y no se encontraron en más de 1000 individuos de control, ni en 300 pacientes con la PD esporádica.

En una familia, 16 individuos fueron tipificados (8 no afectados, 8 afectados). Todos los afectados eran heterocigotos para la mutación y todos los mayores de 60 años no afectados eran de tipo silvestre. Los individuos IV:1 y IV:2 (familia A) no fueron incluidos en nuestro análisis inicial de conexión (Zimprich A. et al., 2004, ver más arriba), ambos individuos han sido genotipificados ahora. Un nuevo cálculo de la puntuación del LOD de dos puntos utilizando la mutación como marcador produce puntajes máximos del LOD de 3,78 con $\theta = 0$.

En la Familia D, se tipificaron 34 individuos (10 afectados y 24 no afectados), todos los afectados eran heterocigotos para la mutación 4321C>T (R1441C); fuera de los 24 clínicamente no afectados, los individuos genotipificados, sólo dos eran mayores de 60 años y eran portadores de la mutación. Estos individuos están en riesgo y probablemente son presintomáticos dado que la edad promedio de inicio en esta familia es de 65 años de acuerdo con Wszolek Z. K. et al., *Neurology*, 62 (9), 1619 - 1622, 2004.

Para la estimación de la prevalencia de las mutaciones de KASPP/LRRK2 entre las familias con PD, un índice de pacientes de 44 familias adicionales con PD, se secuenciaron posteriormente 32 de conformidad con el parkinsonismo autosómico dominante y 12 pares de hermanos afectados.

Sorprendentemente, se han identificado dos más en sentido erróneo y una supuesta mutación del sitio de empalme, todo en familias con aparición tardía típica de la PD, compatible con una transmisión dominante: (I1122V; 3364A>G) en la familia 21; (I2020T; 6059T>C) en la familia 32, y (L1114L; 3342A>G) en la familia 38, que está a 6 pb de distancia del límite exón / intrón. Los individuos afectados en una familia adicional (469), se encontró que portan la misma mutación que la familia D (R1441C; 4321C>T). No se sabe si estas dos familias están relacionados, ni si compartían haplotipos para los marcadores de repetición microsatélites más cercanos de flanco D12S2194, D12SL 048 o tres marcadores de repetición intragénicos recientemente descubiertos, lo que indica que las mutaciones son extremadamente antiguas o surgieron de forma independiente (para los árboles genealógicos véase la Fig. 2).

Una vez más, las mutaciones segregadas con la enfermedad en todas las familias y ninguna de ellas fue encontrada en los controles. Tres de las sustituciones de aminoácidos (R1441C, Y1699C e I122T) están además altamente conservadas entre las especies (véase la Fig. 3).

En el cribado de toda la región de codificación del gen para KASPP/LRRK2 en un grupo de 53 familias aparentemente no relacionadas con un modo aparentemente autosómico de herencia, se identificaron siete familias con más sustituciones de aminoácidos o una mutación del sitio de empalme. Las mutaciones en el gen para KASPP/LRRK2, por lo tanto, representan el 13% de la PD familiar en nuestro grupo total.

En el segundo estudio se han identificado cuatro mutaciones novedosas (R793M, Q930R, S1096C y S1228T). Por lo tanto, junto con la mutación publicada, hasta ahora se han descrito 10 mutaciones de sentido erróneo y una mutación del sitio de empalme.

El gen para KASPP/LRRK2 consta de 51 exones que contienen cinco dominios conservados (véanse las Figuras 5 y 7) lo que indica que pertenece a una familia de proteínas ROCO recientemente definida (Bosgraaf L. et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1643 (1 - 3), 5 - 10, 2003).

Los cinco dominios conservados son en forma detallada:

(1) la repetición rica en leucina (LRR por sus siglas en inglés) del terminal N que consta de 12 hebras de un motivo de 22 - 28 aminoácidos, presentes en un arreglo en tándem, (2) dominio ROC (Ras del complejo) que indica la afiliación de la proteína con la superfamilia de Ras / GTPasa; (3) dominio COR (terminal C de Roc); (4) dominio catalítico de la tirosina quinasa (MAPKKK) y (5) dominio WD-40 del terminal C.

Las proteínas que contienen una LRR están asociadas con diversas funciones, tales como interacciones con los receptores hormonales, inhibición de la enzima, adhesión celular, tráfico celular, empalme y enlazamiento del sustrato para ubiquitinación, una propiedad común implica interacción proteína-proteína (Kobe B. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11 (6), 725 - 723, 2001). En particular, la LRR del terminal N y la estructura de hélice WD-40 del terminal C son puntos de ensamble para los complejos de proteína más grandes. Los dominios Ras / GTPasa dominios implicados en la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a estímulos externos. Ellos también tienen un papel en la transformación celular por Ras, en la citoquinesis, en la formación de adhesiones focales y en la estimulación de la quinasa activada por estrés (Ridley A. J. *Trends Cell. Biol.*, 2001). En particular, la fusión de un dominio como Ras con un dominio MAPKKK indica la función de KASPP/LRRK2 en la transducción de señales intramoleculares. Además, KASPP/LRRK2 debería actuar también como una proteína de andamiaje como Ksr (supresor de quinasa de Ras). El dominio de la quinasa KASPP/LRRK2 también muestra

similitud con la RIR y quinasas de linaje mixto que son parte de la rama de TKL (similar a la tirosina quinasa) del quinoma humano lo que indica una implicación en la señalización celular inducida por estrés y la mediación de la apoptosis. El dominio COR es característico de esta familia de proteínas y no muestra ninguna homología significativa de secuencia con ninguna proteína o dominio actual. Las enzimas con un dominio catalítico de tirosina quinasa pertenecen a una extensa familia de proteínas que comparten un núcleo catalítico conservado común tanto de serina / treonina como de proteínas tirosina quinasas. Ellas ejercen su función de catalizar la transferencia del gamma-fosfato de ATP a residuos de tirosina en sustratos de proteínas (Hubbard S. R. et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 373 - 398, 2000). El dominio WD40 está implicado en la transducción de señales, procesamiento pre-ARNm y el ensamblaje del citoesqueleto (Smith T. F. et al., *Trends Biochem. Sci.*, 24 (5), 181 - 185, 1999).

En vista de la presente invención, existen ahora tres proteínas Roco de la familia de proteínas Roco en mamíferos: LRRK1, DAP-quinasa (proteína quinasa asociada a la muerte) y KASPP/LRRK2 de la presente invención. La DAP-quinasa de mamífero, por ejemplo, debe participar en reordenamientos del citoesqueleto y / o la inducción de apoptosis que depende de su actividad.

El análisis bioquímico de KASPP/LRRK2 y su variante asociada con la enfermedad de Parkinson, I2020T, contiene una mutación situada junto al motivo DFG (DYG en KASPP/LRRK2) al comienzo del bucle de activación del dominio de la quinasa que está altamente conservado en casi todas las MAPKKK, indica de acuerdo con la presente invención que KASPP/LRRK2 actúa como una proteína quinasa verdadera en el citoesqueleto y en la estructura membranosa dentro de la célula. Además, el aumento encontrado (aproximadamente del 30 - 50%) en la actividad de quinasa del mutante I2020T es consistente con mutaciones en posiciones homólogas de otras quinasas tales como B-Raf asociadas con el cáncer (Dibb, N. J. et al. (2004), *Nat. Rev. Cancer*, 4, 718 - 727). También vale la pena señalar que esta mutación es una característica dominante. Además de un aumento general de la actividad de la quinasa, la mutación también podría alterar la especificidad del sustrato. Como con las variantes de la quinasa oncogénica, se podrían considerar entonces inhibidores de quinasa como una opción de tratamiento. La eficacia de tal estrategia terapéutica ha sido probada con respecto a inhibir específicamente la proteína quinasa bcr-abl en leucemia mieloide crónica (CML por sus siglas en inglés) a través del inhibidor de quinasa 2-fenilaminopirimidina STI571 (Gleevec), un inhibidor de la tirosina quinasa de molécula pequeña para el tratamiento de CML (Chalandon, Y. & Schwaller, J., *Haematologica*, 90, 949 - 968, 2005).

En resumen, el análisis bioquímico de KASPP/LRRK2 y su mutante I2020T de acuerdo con las presentes invenciones muestra que KASPP/LRRK2 comparte características comunes con otras MAPKKK, tales como autofosforilación, la dimerización o la interacción con chaperones específicos de la quinasa. La actividad de la autoquinasa del mutante I2020T, localizado dentro del bucle de activación del dominio de la quinasa KASPP/LRRK2 se incrementa en comparación con el tipo silvestre de KASPP/LRRK2 de acuerdo con la presente invención. En vista de su estructura multimodular, KASPP/LRRK2 deben participar en funciones tan diversas como el mantenimiento de la ultraestructura y la dinámica microtubular, el tráfico vesicular (ER, compartimento de Golgi) y / o reordenamientos del citoesqueleto.

Curiosamente, todas las diez mutaciones están dentro de estos dominios conservados (Figura 7). La mutación R793M, sin embargo, se encuentra en el exón 19 que es parte de la región de repetición ancirina (aminoácidos 678 - 806), que parece tomar parte en las interacciones proteína-proteína.

En contraste con los informes anteriores, la mutación más común hasta ahora (G2019S; 6055G>A, Hernandez DG et al., *Ann Neurol*, 57: 453 - 6, 2005) no se detectó en ninguna de las familias investigadas sino únicamente en un paciente con PD esporádica. Además, esta mutación se encontró en sólo uno de cada 340 pacientes con PD esporádica. Por lo tanto, el predominio de esta mutación (Gilks et al., *Lancet*, 365: 415 - 6, 2005; Toft et al., *Lancet*, 365: 1229 - 30, 2005) no puede ser establecida para todas las poblaciones. El cribado en pacientes con PD familiar y esporádica mostró frecuencias de la mutación G2019S hasta del 7% en casos de PD familiar y casi del 1% en casos de PD esporádica, sin embargo, no se pudo demostrar la asociación de este mutante con la forma esporádica no mendeliana de la PD en un estudio reciente de los inventores. En el presente grupo que comprende 340 pacientes con PD esporádica, el nuevo R793M fue encontrado adicionalmente en un paciente esporádico. Por lo tanto, las mutaciones de KASPP/LRRK2 representan sólo el 0,6% de los casos de PD esporádica en la población actual.

En tres familias, la variación específica no se segregó conjuntamente con cada miembro de la familia: En la familia DE022, la Q930R, sólo tres de los cuatro miembros de la familia afectados por la enfermedad eran portadores de la mutación (Fig. 6b), en la familia E de hecho sólo uno de los dos miembros de la familia con fenotipo de la PD era portador de la mutación S1096C (Fig. 6f), y la mutación en el sitio de empalme que se segrega conjuntamente con la PD en una familia previamente investigada (DE038) se encontró sólo en una de las hermanas clínicamente afectada (T112888) (Fig. 6c). Como ninguna de estas variaciones se encontró en ninguno de las 1.200 controles investigados y la variación en el sitio de empalme afectó a dos distintas familias de la DP es probable que sean causantes de la enfermedad, aunque la penetrancia incompleta al menos en la familia DE022 podría indicar que factores adicionales pueden contribuir a la manifestación de la enfermedad en individuos afectados. Esto puede ser debido a fenocopias

en estas tres familias, ya que la alta prevalencia de la PD en la población hace que sea muy posible que otras causas de la PD se presenten en una familia afectada por mutaciones de KASPP/LRRK2. Una fenocopia de la enfermedad no es poco común en la PD. Se ha descrito en la α -sinucleína A53T original afín (Polymeropoulos et al., Science, 276: 2045 - 7, 1997), en una familia con la mutación G2019S de KASPP/LRRK2 (Hernandez et al., 2005, ver más arriba.), pero también en la familia D con la mutación R1441C de KASPP/LRRK2.

Tres de las mutaciones presentes afectan al menos a dos familias. Para dos de estos haplotipos (R793M y I2020T) el análisis reveló un haplotipo común que indica un causante común. Ninguna de las familias era consciente de una posible relación con la respectiva familia, aunque las dos familias portadoras de la mutación I2020T vivía en la misma región geográfica. La misma mutación también había sido descrita en la familia japonesa, que sirvió como base para la definición original del locus PARK8 (Funayama et al, Ann Neurol, 57: 918 - 21, 2005).

La mutación R793M, que se detectó en dos familias distintas con el mismo haplotipo, también se encontró en un paciente con PD esporádica y una persona de control. Debido a problemas técnicos en la evaluación de este exón rico en CG el porcentaje (*call rate*) de la población estudiada fue bajo (alrededor del 50% en tres intentos diferentes). Por lo tanto, es muy posible que esta mutación sea más frecuente aparentemente en los pacientes con PD esporádica. También, se debe tener en cuenta la posibilidad de un polimorfismo, si esta variación se detectó en más controles. Sin embargo, la búsqueda de una posible causante común en las dos familias con la mutación es una indicación de una enfermedad relacionada con la sustitución de aminoácidos. También se proponen causante comunes para otras familias afectadas por mutaciones en el gen para KASPP/LRRK2 (Mata et al., Neurosci Lett, 382: 309 - 311, 2005).

La forma en que se heredan las mutaciones de KASPP/LRRK2 es autosómica dominante. Se ha sugerido que la penetrancia de las mutaciones de KASPP/LRRK2 es dependiente de la edad (DiFonzo et al., Lancet, 365: 412 - 5, 2005; Toft et al., 2005, ver más arriba), que da cuenta de la penetrancia reducida en algunas familias. En las presentes familias sólo se observó una penetrancia reducida en las mutaciones de los exones 19 y 21 situadas antes del dominio LRR altamente conservado. Esto indica que las mutaciones en esta región son menos severas y tienen que estar asociadas con otros factores desconocidos hasta el momento para la manifestación de la enfermedad. A partir de la mutación del sitio de empalme del exón 24 en adelante, la penetrancia fue completa, aunque un portador de la mutación de empalme (DE038, III-1) tenía sólo un leve temblor en reposo durante varios años, mientras que su hermana (III-3), la madre y un tío se vieron afectados por una PD severa.

En todas las familias con la documentación definitiva de la edad de inicio se observó un reconocimiento temprano de los primeros signos parkinsonianos en las generaciones más jóvenes. Hasta ahora, no existe un mecanismo patógeno conocido que permita la hipótesis de anticipación. Por el contrario, una mayor conciencia de una posible enfermedad y una investigación más a fondo en las familias en quienes ya se ha diagnosticado la PD podría ser responsable de los diagnósticos anteriores.

La presentación clínica de portadores de la mutación de KASPP/LRRK2 varía dentro de las familias y entre las familias afectadas por la misma mutación. En general, se puede observar el fenotipo típico de la PD con temblor en reposo, bradicinesia, rigidez y disfunción olfativa. Curiosamente, el temblor, la característica principal y la más mencionada de algunas de las familias inicialmente descritas (Paisan-Ruiz et al., Neuron, 44: 595 - 600, 2004) no fue ni el síntoma inicial principal ni el síntoma guía en muchos de nuestros pacientes con PD. Dos pacientes no reportaron ningún temblor en reposo en su historial médico. En vez de eso, se pudo observar el patrón típico de los diferentes subtipos conocidos de PD idiopática. Todos los pacientes reportaron un alivio considerable de los síntomas después de la aplicación de un tratamiento dopaminérgico, que se vio obstaculizado por alucinaciones sólo en un paciente con el fenotipo de DLBD (fenotipo de la enfermedad de cuerpos de Lewy difusos).

En los pacientes con mutaciones de KASPP/LRRK2, frecuente un síntoma que afecta fuertemente el paciente parece ser que duerme en forma anormal. Ocho de cada 10 pacientes (80%) informó que sufría de dificultades ya sea para conciliar sueño, para quedarse dormido o ambos. De acuerdo con varios estudios, los problemas de sueño se presentan en aproximadamente el 40 - 75% de los pacientes con PD (Lees et al., Clin Neuropharmacol, 11: 512 - 519, 1988; Kumar et al., Mov Disord, 17: 775 - 781, 2002), pero sólo la minoría (aproximadamente 20%) informa las dificultades para conciliar el sueño como un problema (Lees et al., 1988, ver más arriba). En el presente estudio el 80% afirmó que los trastornos del sueño eran realmente un problema. Una evaluación más detallada sobre el comportamiento y el patrón de sueño decidirá, si este síntoma es más pronunciado en los portadores de mutaciones de KASPP/LRRK2, lo que posiblemente indica una participación anterior de los sistemas respectivos. La inestabilidad de la postura se produce tarde en el transcurso de la enfermedad. Como también ha sido descrito por otros autores (Paisan-Ruiz et al., Ann Neurol., 57: 365 - 72, 2005) la demencia no es un hallazgo común en la PD asociada con KASPP/LRRK2 y parece ocurrir bastante tarde en el transcurso de la enfermedad. Lo mismo sigue siendo cierto para las alucinaciones en nuestro grupo de pacientes, que se produce tarde en el transcurso de la enfermedad o en combinación con demencia. En el presente grupo, un paciente se presentó con el cuadro clínico típico de DLBD. La autopsia de un individuo con demencia en nuestro primer grupo reveló una patología de Cuerpo de Lewy difuso en una familia afectada por la mutación Y1699C. La descripción del mismo fenotipo en otro paciente

en este estudio afectado por una mutación diferente favorece la hipótesis de que la presentación clínica de DLBD puede ser causada por las mismas alteraciones fisiopatológicas que el cuadro clínico de la PD. Obviamente cambios fisiopatológicos específicos (en este caso causados por mutaciones en el gen para KASPP/LRRK2) puede conducir a la entidad clínica e histopatológica de ambos: PD y DLBD.

- 5 En nuestro primer estudio, un paciente mostró signos leves de enfermedad neuronal motora. En el segundo estudio, sin embargo, los síntomas neuronales motores no fueron ni clínica ni electrofisiológicamente revelados en ninguno de los pacientes investigados.

10 La neuroimagenología estructural reveló una atrofia entre leve y marcada en los 4 pacientes investigados, aunque la duración de la enfermedad fue de sólo 3 - 12 años en estos y sólo uno se clasificó como demencia (Tabla 4). Esto contrasta con los hallazgos de la PD idiopática, donde la MIR estructural suele ser normal y sólo se produce atrofia con la progresión de la enfermedad, generalmente asociada con la demencia. El paciente con la presentación clínica de DLBD tenía signos marcados de microangiopatía, que también pueden ser causantes de un síndrome parkinsoniano atípico. La presentación clínica con fluctuación de vigilancia, buena respuesta a la L-dopa obstaculizada por hipersensibilidad y desarrollo de la demencia en un corto período de tiempo, sin embargo, hace
15 más probable el diagnóstico de DLBD.

El TCS reveló hiperecogenicidad de la SN - el signo típico de la PD idiopática, que se encuentra en más del 90% de los pacientes con PD (Berg et al., 2001, ver más arriba; Walter et al., J Neural Transm, 109: 191 - 196, 2002) - en al menos un lado de los portadores de la mutación de KASPP/LRRK2. Curiosamente, la hiperecogenicidad de la SN fue sólo moderada en todos los pacientes investigados, en comparación con la PD idiopática, donde es marcada en
20 73 - 79% de los pacientes. Este hallazgo muy característico se supone que está asociado con un aumento en el contenido de hierro en el tejido y posibles alteraciones en el enlazamiento de hierro, anterior a la manifestación de la aparición de la enfermedad (Berg et al., 1999, ver más arriba; Berg et al., Neural Transm, 109: 191 - 196, 2002). Una hiperecogenicidad sólo moderada de la SN en la PD asociada con KASPP/LRRK2 puede servir de argumento en favor de un curso diferente de los mecanismos patológicos subyacentes, lo que finalmente puede conducir a una menor acumulación de hierro en la PD asociada con KASPP/LRRK2 que en la PD idiopática. De manera similar, el progreso más lento de la enfermedad, documentado por una reducción menor aunque típicamente localizada de la incorporación de F-Dopa en los exámenes por PET (Hernández et al., 2005, ver más arriba) favorece la hipótesis de un curso diferente de la enfermedad.

En conclusión, en dos estudios consecutivos se ha demostrado que las mutaciones de KASPP/LRRK2 representan
30 alrededor del 13% de la PD aparentemente heredada autosómica dominante y de parejas de hermanos en la población investigada. Aunque el fenotipo varía dentro y entre las familias afectadas por las mismas mutaciones, es muy similar a la presentación clínica de la PD idiopática. La relación causal entre la manifestación de la enfermedad y la variación no es igualmente clara para todas las variantes descritas. En tres familias las variaciones específicas no segregaron conjuntamente con cada miembro de la familia afectado por la enfermedad. Como ninguna de estas mutaciones se encontró en 1200 personas de control, y se encontró una variante en dos familias distintas de DP, as
35 fenocopias son indicativas.

Además, dos pacientes con la presentación clínica de DLBD debe llevar a la consideración de mutaciones de KASPP/LRRK2 en familias con la ocurrencia simultánea de DLBD y PD.

40 Como ya se indicó anteriormente, se han encontrado mutaciones en diferentes dominios funcionales pero no está claro cuál de ellas están relacionadas con la neurodegeneración. Sin embargo, KASPP/LRRK2 puede ser fundamental para una serie de procesos neurodegenerativos, ya que nuestros resultados muestran que (i) las mutaciones de KASPP/LRRK2 parecen ser una causa numéricamente importante de parkinsonismo autosómico dominante (6 mutaciones independientes en 34 familias con herencia dominante) y (ii) los individuos afectados con mutaciones de KASPP/LRRK2 exhiben cambios patológicos sorprendentemente variables, que representan
45 aspectos de varias de las principales enfermedades neurodegenerativas.

Utilizando fraccionamiento celular y extracción con carbonato, la presente invención divulga que KASPP/LRRK2 está asociada parcialmente con las mitocondrias, el citoesqueleto y las membranas microsomales, lo que es una indicación de que está implicado en KASPP/LRRK2 en reordenamientos del citoesqueleto. No se encontró KASPP/LRRK2 en el citoplasma. Además, la actividad de autoquinasa de KASPP/LRRK2 no se modifica
50 significativamente en el mutante I2020T asociado a la enfermedad en comparación con el tipo silvestre, lo que indica que el efecto autosómico dominante es causado por una ganancia tóxica de la función en lugar de la pérdida de función. La mutación I2020T está situado junto al motivo conservado DFG (DYG en LRRK2) al comienzo del segmento de activación del dominio de la quinasa (Ross O. A. & Farrer M. J. Biochem. Soc. Trans., 33, 586 - 590, 2005) y en la mutación de un residuo hidrófobo de leucina se intercambia por un residuo polar de treonina. Esto también es una indicación de que la enfermedad asociada con Parkinson es causada por la especificidad alterada del sustrato o una mayor actividad de KASPP/LRRK2. La homodimerización y la asociación con el sistema chaperón HSP90/p50^{cdc37} indican además que la función de KASPP/LRRK2 y los mecanismos de activación son similares a

otro MAPKKK. Estos efectos sirven como base para el desarrollo de un ensayo de cribado adecuado y / o el desarrollo de un agente farmacéutico o uno de diagnóstico como se describe a continuación en detalle.

Las autopsias realizadas en los individuos afectados demostraron de manera uniforme la pérdida neuronal y gliosis en la sustancia negra como el sustrato patológico de parkinsonismo. Sin embargo, la patología de α -sinucleína (cuerpos de Lewy, LB) típica para la PD sólo se observó en un caso de la familia D. En otro caso de esta familia de LB extendidos fue más consistente con enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (DLB). Incluso más intrigante, se demostraron placas seniles y ovillos neurofibrilares (NFT), así como depósitos prominentes de tau en otros 3 cerebros de ambos linajes grandes. La patología de la médula espinal consistente con un diagnóstico de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se encontró en los miembros afectados de la familia A.

Por lo tanto, KASPP/LRRK2 es probable que sea central en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas tales como la PD, la enfermedad de Alzheimer (AD) y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y patologías, incluyendo sinucleinopatía y tauopatía, asociadas con un fenotipo clínico de los parkinsonismo.

Se ha demostrado previamente que las patologías tau y α -sinucleína pueden estar estrechamente relacionadas. Se han encontrado agregados de Tau en los cerebros de pacientes portadores de mutaciones patógenas de la α -sinucleína A53T (Kotzbauer P. T. et al., Exp. Neurol, 187 (2), 279 - 288, 2004; Duda J. E. et al., Acta Neuropathol. Berl., 104, 7 - 11, 2002). De manera similar, se ha demostrado que la principal agregación de proteína patógena en AD promueve la fibrilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares en un modelo animal (Gotz J., Science, 293, 1491 - 1495, 2001). De forma muy interesante, se ha identificado una región genómica que se superpone al locus PARK8 en un estudio de vinculación de la enfermedad de Alzheimer familiar (Scott W. K. et al. Am. J. Hum. Genet., 66 (3), 922 - 932, 2000). La evidencia de vinculación se derivó en gran parte de las familias con al menos un miembro con enfermedad de cuerpos de Lewy difusos probada en la autopsia. Si esta vinculación resulta, refleja variantes en el gen para KASPP/LRRK2 que quedan por determinar.

El patrón de expresión de KASPP/LRRK2 se examinó posteriormente en el cerebro y en otros tejidos. Se hibridaron transferencias tipo Northern de múltiples tejidos y de cerebro humano con una sonda de ADNc 3' de 1078 pb y se encontró expresión en la mayoría de regiones del cerebro, aunque a un nivel muy bajo. Se encontraron dos transcripciones de aproximadamente 9 kb y 8 kb, respectivamente, y múltiples bandas en tamaños inferiores. Los dos tamaños de transcritos pueden ser explicados por empalme alternativo y / o el uso alternativo de sitios de poliadenilación.

Ya que los niveles bajos de expresión total en el cerebro impiden un análisis detallado de su distribución regional por medio de transferencias tipo Northern, se utilizó una RT-PCR en tiempo real utilizando ARN aislado de cerebro completo de adulto y fetal, así como de diferentes regiones del cerebro con el fin de evaluar la expresión cuantitativa del gen y el empalme alternativo. Los cebadores se han diseñado para generar productos PCR específicos para el exón 1-8, el exón 13-19 y el exón 31-39, respectivamente. Dentro del mismo tejido o región del cerebro, los niveles de transcritos de los tres ensayos no mostraron diferencias significativas. Se ha encontrado una expresión consistente en la mayoría de regiones del cerebro, ligeramente mayor en el putamen, la sustancia negra y el corazón. Los altos niveles de expresión se observaron en el pulmón. El análisis del ADNc, dentro en múltiples tejidos, confirma la predicción *in silico* de que al menos 11 exones pueden ser alternativamente empalmados. En el tejido de cerebro humano adulto, el exón 6 se expresó constitutivamente en el ARNm de longitud completa.

En vista de lo anterior, la presente invención está dirigida también a un vector, preferiblemente un vector de expresión, que contiene la molécula de ácido nucleico de la presente invención, a una célula que contiene el vector de la presente invención y a un animal transgénico no humano que contiene el ácido nucleico o el vector de la presente invención.

Un vector puede ser un ADN de plásmido o de fago o cualquier otra secuencia de ADN en la cual el ADN puede insertarse para ser clonado. El vector puede replicarse de forma autónoma en una célula huésped, y se puede caracterizar además por uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas en los que dichas secuencias de ADN pueden ser cortadas de una manera determinable y en los que el ADN se puede insertar. El vector puede contener además un marcador adecuado para su uso en la identificación de células transformadas con el vector. Marcadores son, por ejemplo, genes de resistencia a la tetraciclina o genes de resistencia a ampicilina.

En una realización adicional, el vector puede estar en la forma de un vector de expresión que contiene un casete de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención, pero también que comprende preferiblemente adicionalmente secuencias de control de expresión que están operativamente enlazadas a la molécula de ácido nucleico. Las secuencias de control de expresión se eligen de manera que permitan la expresión del polipéptido codificado en un huésped. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser aislado y clonado en un vector de expresión y el vector puede entonces ser transformado en una célula huésped adecuada para la expresión del polipéptido de la invención. Dicho vector puede ser un plásmido, un fagémido o un cósmido. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la invención puede ser

clonada de una manera adecuada en vectores de expresión procariotas o eucariotas, preferiblemente en vectores de expresión eucariotas, y más preferiblemente en vectores de expresión que permiten la expresión en un mamífero y en particular en una célula humana que es conocida por una persona capacitada en la técnica. Dichos vectores de expresión comprenden típicamente al menos un promotor y también pueden comprender una señal de iniciación de la traducción del marco de lectura que codifica el polipéptido y - en el caso de vectores de expresión procariotas - una señal de terminación de la traducción, mientras que en el caso de los vectores de expresión eucariotas, el casete de expresión comprende, preferiblemente, señales de expresión para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Los ejemplos de vectores de expresión eucariotas son bien conocidos por la persona capacitada en la técnica, por ejemplo, para la expresión en células de insectos a través de vectores de baculovirus, y para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, los vectores de CMV o SV40, el sistema de expresión del virus sindbis, o un sistema de expresión de adenovirus, un sistema de expresión con base en el virus Semliki Forest, o un sistema de expresión con base en lentivirus. Los métodos de biología molecular para la producción de estos vectores de expresión son bien conocidos por la persona capacitada en el arte, así como los métodos para la transfección de células huésped y el cultivo de dichas células huésped transfectadas. En una realización preferida, las secuencias especificadas de control de la expresión antes mencionadas indujeron la expresión del polipéptido de la invención, que induce la transcripción del ARN mensajero que codifica el polipéptido de la invención tras la adición o el retiro de una señal externa, tal como un producto químico pequeño como la tetraciclina o una hormona como la Ecdisona, pero la señal extracelular también puede ser incrementada o disminuida en temperatura o radiación ionizante. Además, la expresión inducible puede ser provocada por medio de iniciación inducible de la traducción del ARN mensajero o un sistema en el que se controla la estabilidad del ARNm en una forma inducible. Los ejemplos de secuencias de control de expresión que permiten la inducción de la producción de polipéptido se revisan en las siguientes publicaciones: el sistema TET-off / TET-on, adecuado tanto para cultivos celulares como para animales transgénicos, pero también el sistema de control de expresión basado en métodos con base en la recombinasa Cre, predominantemente para el uso en animales transgénicos. Un sistema de expresión inducible adicional, para uso tanto en cultivo celular como en animales transgénicos se basa en la hormona Ecdisona de insectos. Otro sistema de expresión inducible es el sistema GAL4, que ha sido aplicado con éxito con ratones, pez cebra y *Drosophila*, y permite la expresión condicional a 26 - 29 grados, o también un sistema de expresión condicional basado en Rapamicina. Un sistema de expresión sensible a la temperatura se basa en un casete de expresión del virus Sindbis y predominantemente adecuado para expresión controlada en los sistemas de cultivo de células.

Otro aspecto de esta invención se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico o un vector de la presente invención. Dicha célula puede ser una célula de mamífero no humano dentro o fuera del cuerpo del animal o una célula humana fuera del cuerpo humano. Pero también puede ser una célula de insecto, tal como una célula de *Drosophila*, en cultivo o en el contexto de un insecto transgénico, como una *Drosophila* transgénica. También puede ser una célula de nematodo, como, por ejemplo, presente en *C. elegans* transgénica. Las células huésped preferidas son células de mamífero, y particularmente de humano, células neuronales, células de microglía, astrocitos, oligodendrocitos, fibroblastos, monocitos y macrófagos y otras células primarias no neuronales, que se pueden mantener en cultivo de tejido primario y se puede hacerse capaces de expresar al polipéptido de la invención mediante la introducción del ácido nucleico / o el casete de expresión de la invención, por ejemplo, por transfección con dicho ácido nucleico o casete de expresión. Otros medios de introducir el ácido nucleico y / o el casete de expresión de la invención a las células primarias mencionadas anteriormente son enfoques con "pistola de genes", transferencia de ARNm, infección viral, microinyección o transferencia de ácido nucleico liposomal, para nombrar sólo unos pocos. Otras células huéspedes adecuadas son células de mamífero tales como células HEK, células HELA, células PC12, células CHO, células JURKAT, fibroblastos 3T3 de ratón, células de hepatoma de ratón, células de neuroblastoma humano, pero también líneas de células cancerosas establecidas, particularmente líneas de células neuronales, de origen mamífero y particularmente de origen humano.

También se pueden introducir el ácido nucleico y / o el casete de expresión de la invención en aquellas células mediante los métodos de transferencia de ácido nucleico anteriormente mencionados. Se prefieren particularmente las líneas de células transformadas en forma estable en donde la expresión del polipéptido de la invención es inducible. Puesto que la expresión del polipéptido de la invención puede mostrar mayor neuropatología, se puede preferir que en dichas células huésped la expresión del polipéptido de la invención sea usualmente muy baja o ninguna, por ejemplo durante la generación de una línea de células transformada de forma estable, y sólo con fines experimentales y después del establecimiento de una línea de células transformada de manera estable, la expresión del polipéptido de la invención se activa mediante la adición de un estímulo adecuado, como por ejemplo una hormona como la Ecdisona o un producto químico pequeño como el antibiótico tetraciclina. Una vez más, los ejemplos descritos anteriormente de secuencias de control de expresión que permiten la inducción de la producción de polipéptidos son adecuados para este propósito, como el sistema TET-off/TET-on, los métodos basados en la recombinasa Cre, el sistema de Ecdisona, el sistema GAL4, los sistemas basados en Rapamicina, o los sistemas de expresión sensibles a la temperatura descritos anteriormente basados en un casete de expresión del virus Sindbis.

Otro aspecto de la invención se refiere a animales transgénicos no humanos que comprenden una célula huésped de la invención. Se prefieren particularmente moscas transgénicas, tales como *Drosophila* transgénica, como nematodos transgénicos, como *C. elegans* transgénica, peces transgénicos, tales como peces cebra transgénicos, y mamíferos transgénicos no humanos, tales como roedores transgénicos (ratones, ratas).

Mientras tanto, la generación de animales transgénicos está dentro del conocimiento general de un experto en la técnica. Además, se señala que bajo el control de promotores específicos de tejido se podría dirigir la expresión al CNS en ratones y otros. La mayoría de los promotores específicos de tejido podrían ser utilizados, por ejemplo, también en el contexto de vectores virales. A continuación, se enumeran promotores específicos de tejido de roedores. Expresión en astrocitos: promotor de GFAP, factor de estimulación de colonias de macrófagos (c-fms). Expresión en neuronas: promotor de sinapsina, promotor Thy-1, promotor de enolasa de rata específico de neuronas (NSE), promotor L7 (células de Purkinje), promotor beta-hidroxilasa de dopamina (DBH) (predominantemente en el sistema nervioso periférico), promotor de distrofina en el cerebro, promotor del gen I y II de calmodulina (CaMII, CaMIII), promotor del gen del neurofilamento de cadena ligera humano y de múrido (NF-L), promotor de hipoxantina fosforribosiltransferasa humana (hHPRT), hormona liberadora de corticotropina (CRH), promotor de alfa-tubulina T alfa 1, promotor del receptor NGF de baja afinidad de múrido, promotor del gen de hipocalcina, promotor de la proteína marcadora olfativa (OMP) (neuronas olfativas), promotor de la subunidad alfa 6 del receptor de GABA(A), promotor de la subunidad delta del receptor de GABA(A), promotor de tirosina hidroxilasa (TH), transportador de acetilcolina vesicular de ratón (VACHT), promotores de genes de glutamato descarboxilasa 65 de ratón y de glutamato descarboxilasa 67 de ratón, promotor específico de cerebro la FGFI humana, promotor de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), promotor del gen de la subunidad 2A del receptor de N-metil-D-aspartato; secuencia hacia arriba del subtipo 6 del receptor de glutamato metabotrópico de ratón (mGluR6), cGMP fosfodiesterasa del fotorreceptor Rod (PDE6), promotor de opsin azul humana y promotor de rodopsina (retina). Elementos silenciadores restrictivos neuronales: elementos silenciadores restrictivos neuronales (NRSE). Expresión en oligodendrocitos: MBP (proteína básica de mielina), promotor de proteína proteolipídica (PLP).

Además, la presente invención se dirige a una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de la presente invención, en particular, una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Se señala en particular que la presente memoria descriptiva divulga también proteínas que contienen una o más sustituciones de aminoácidos en la proteína KASPP/LRRK2 pero que aún conservan esencialmente su función. Tales sustituciones de aminoácidos pueden ser semiconservadas o conservadas y más preferiblemente un intercambio de un residuo aminoácido conservado. En la siguiente tabla se dan ejemplos de tales sustituciones de aminoácidos.

Aminoácido	Sustitución conservada	Sustitución semiconservada
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H .	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R

(continuación)

Aminoácido	Sustitución conservada	Sustitución semiconservada
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

5 Por ejemplo, el cambio de A, F, H, I, L, M, P, V, W o Y por C es semiconservada si la nueva cisteína permanece como un tiol libre. Además, el experto en la materia sabe que las glicinas en posiciones estéricamente demandantes no deben ser sustituidas y que P no debe ser introducido en partes de la proteína que tengan una estructura helicoidal alfa o una estructura de lámina beta.

La presente memoria descriptiva también divulga un método para la fabricación de las proteínas por métodos ya explicados anteriormente. En pocas palabras tal método comprende

- (a) cultivar una célula de la presente invención en condiciones adecuadas; y
- 10 (b) aislar la proteína producida por la célula cultivada.

Otra realización preferida de la presente memoria descriptiva está dirigida a un método para detectar una mutación en la posición 2378, 2789, 3287, 3342, 3364, 3683, 4321, 5096 y / o 6059 en la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o 2 en las muestras, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto dicha muestra con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, y
- 15 (b) detectar la presencia de la mutación.

Preferiblemente, la muestra se selecciona de

- (a) una muestra, en particular, una biopsia, a partir de tejido o de células humanas, en particular del cerebro, en particular del putamen o de la sustancia negra; corazón, pulmón y / o linfocitos sanguíneos; o
- 20 (b) ARN y / o ADN de una muestra, en particular una biopsia, a partir de tejido o de células humanas, en particular del cerebro, en particular del putamen o de la sustancia negra; corazón, pulmón y / o linfocitos sanguíneos;

En general, la detección puede llevarse a cabo mediante hibridación de transferencias tipo Southern, hibridación de transferencias tipo Northern, PCR o RT-PCR incluyendo la RT-PCR en tiempo real, técnicas que son bien conocidas para una persona experta en la técnica. La mutación también se puede detectar por radiografía, fluorescencia, quimioluminiscencia, o cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente puede llevarse a cabo una secuenciación automatizada, un método de electroforesis que corre básicamente en un capilar (columna) combinada con fluorescencia.

25

Otros métodos para la detección y / o cuantificación de la cantidad de polinucleótidos, es decir, para los métodos de acuerdo con la invención que permiten por ejemplo la determinación del nivel de expresión de un polinucleótido que contiene una mutación, son los métodos en tiempo real conocidos en la técnica tal como el método TaqMan® divulgado en WO 92/02638. Este método aprovecha la actividad exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. En forma detallada, el (al menos un) componente de ácido nucleico objetivo se detecta mediante un proceso que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria a una región del componente de ácido nucleico objetivo y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma hebra de la secuencia componente del ácido nucleico objetivo, pero no incluye la secuencia de ácido nucleico definida por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla de

30

35

dúplex durante condiciones de hibridación, en el que los dúplex comprenden al ácido nucleico objetivo hibridado con el primer oligonucleótido y con el oligonucleótido marcado de tal manera que el extremo 3' del primer oligonucleótido es adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. Luego se trata esta mezcla con una polimerasa de ácido nucleico que depende del molde que tiene una actividad de nucleasa de 5' a 3' nucleasa bajo condiciones suficientes para permitir que la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la polimerasa escinda al oligonucleótido marcado hibridado y libere fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado se detecta y / o mide. La tecnología TaqMan® elimina la necesidad de una fase sólida unida al complejo de reacción que va a ser formado y lo hace detectable. Otros métodos incluyen por ejemplo la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre dos sondas hibridadas en forma adyacente como se utiliza en el formato LightCycler® descrito en la patente de los Estados Unidos No. 6.174.670.

Un protocolo preferido si el polinucleótido está en forma de un nucleótido transcrito es un método donde se aísla el ARN total, el ADNc y, posteriormente, se sintetiza el ARNc y se incorpora biotina durante la reacción de transcripción. El ARNc purificado se aplica a matrices comercialmente disponibles que se pueden obtener por ejemplo de Affymetrix. Se detecta luego el ARNc hibridado. Las matrices son producidas por medio de fotolitografía o por otros métodos conocidos por los expertos calificados en la técnica.

En consecuencia, el método puede llevarse a cabo en una matriz, por ejemplo, en un sistema robótico o mediante microfluídos.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico que contiene al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención para diagnosticar una enfermedad neuronal, en particular, un trastorno neurodegenerativo, especialmente la enfermedad de Parkinson (PD), incluyendo, sin limitación, PD esporádica, Enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sinucleinopatía y / o tauopatía, en combinación con auxiliares adecuados. Los agentes auxiliares adecuados, como se usan aquí, incluyen amortiguadores, enzimas, compuestos marcadores y similares. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico contenida en el kit es una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridar con el ARNm correspondiente a al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico está unida a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación de poliestireno, una membrana de nitrocelulosa, una superficie de vidrio o a partículas no inmovilizadas en solución. Alternativamente, el kit de diagnóstico contiene uno o más medios necesarios para secuenciación automatizada.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de ácido nucleico o una proteína de la presente invención que puede utilizarse para la prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, especialmente la enfermedad de Parkinson incluyendo, sin limitación, PD esporádica, AD, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sinucleinopatía y / o tauopatía. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico o la proteína de la presente invención también se puede utilizar para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno neurodegenerativo como por ejemplo, el ejemplificado anteriormente.

Otra realización de la presente invención está dirigida a un método para cribar una composición farmacéutica o un agente de diagnóstico, comprendiendo el método:

(a) proporcionar al menos una molécula de ácido nucleico o una proteína de la presente invención,

(b) proporcionar un compuesto de prueba, y

(c) medir o detectar la influencia del compuesto de prueba sobre la actividad de la expresión de la molécula de ácido nucleico o la proteína.

Por ejemplo, el compuesto de prueba se proporciona en la forma de una biblioteca de compuestos químicos. De acuerdo con la presente invención, el término "biblioteca de compuestos químicos" se refiere a una pluralidad de compuestos químicos que han sido montados a partir de cualquiera de múltiples fuentes, incluyendo moléculas sintetizadas químicamente y productos naturales, o que han sido generados por técnicas de química combinatoria.

La influencia del compuesto de prueba puede ser medida o detectada en un ensayo heterogéneo u homogéneo. Como se usa aquí, un ensayo heterogéneo es un ensayo que incluye una o más etapas de lavado, mientras que en un ensayo homogéneo tales etapas de lavado no son necesarias. Los reactivos y los compuestos se mezclan únicamente y se miden. Los ensayos heterogéneos son, por ejemplo, ELISA, DELFIA, SPA y ensayos sobre FlashPlate. Ensayos homogéneos alternativo son, por ejemplo, TR-FRET, FP, ALPHA y ensayos génicos.

El método también puede llevarse a cabo sobre una matriz o utilizando células enteras, por ejemplo, en un sistema robotizado o mediante microfluídos.

Los métodos para preparar dichas matrices usando la química de fase sólida y grupos protectores sensibles a la luz se divulgan, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.744.305. Estas matrices también se pueden poner en contacto con el compuesto de ensayo o con bibliotecas de compuestos y analizada la interacción, por ejemplo uniendo o cambiando de conformación.

- 5 Las células enteras generalmente crecen en el fondo de placas de múltiples pozos y se fijan y permeabilizan, se bloquean y se incuban por ejemplo con un anticuerpo específico primario (P) contra el sustrato de interés. Luego, se utilizan por ejemplo, anticuerpos secundarios conjugados con HRP o marcados con Europio junto con sustancias colorimétricas o quimioluminiscentes específicas, por ejemplo, como se describió anteriormente, para generar la señal. En combinación con el uso de un microscopio se puede cuantificar no solamente la cantidad de anticuerpos
10 específicos (P) a nivel de células individuales, pero también translocaciones inducidas por fosforilación de un sustrato o cambios morfológicos de las células.

El método también puede llevarse a cabo en forma de un sistema de cribado de alto rendimiento. En tal sistema, se automatiza y miniaturiza convenientemente el método de cribado, en particular utiliza pozos miniaturizados y microfluidos controlados por un robot.

- 15 Un ejemplo de un agente farmacéutico o de diagnóstico que se pueden encontrar por medio del ensayo de cribado de la presente invención es un anticuerpo o derivado de anticuerpo que se une específicamente a una proteína de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un anticuerpo o derivado de anticuerpo que se une específicamente a una proteína de la presente invención.

- 20 El anticuerpo es ya sea policlonal o monoclonal, preferentemente es un anticuerpo monoclonal. El término derivado de anticuerpo se entiende que significa también partes del anticuerpo de la invención que se unen al antígeno, preparadas por medio de ingeniería genética y anticuerpos opcionalmente modificados, tales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multifuncionales, anticuerpos bi o oligoespecíficos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos F(ab) o F(ab)₂, que son todos bien conocidos para una persona experta en la técnica.
25

- Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser producidos por inmunización de un mamífero con un péptido inmunogénico y / o en forma recombinante usando protocolos estándar. Un péptido inmunogénico particularmente preferido es el péptido con la secuencia de aminoácidos "CRMGIKTSEG TPGFRAPEVA RGNVIYNQQA D", ya que representa el dominio de quinasa de KASPP/LRRK2 (aminoácidos Nos. 2025 a 2055) y
30 muestra una homología entre ratón y humano del 100%.

- Los anticuerpos y derivados de anticuerpos de la presente invención se puede utilizar, por ejemplo, para el diagnóstico y/o la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad neuronal, en particular, un trastorno neurodegenerativo, especialmente enfermedad de Parkinson (PD), incluyendo, sin limitación, PD esporádica, enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sinucleinopatía y/o tauopatía, pero también para
35 la identificación de otras sustancias farmacológicamente activas. Usos particulares de los anticuerpos y/o derivados de anticuerpos de la presente invención son, por ejemplo, en transferencias tipo Western, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia o ELISA.

La invención se ilustrará adicionalmente a continuación con la ayuda de las Figuras, Tablas, Listados de Secuencias y Ejemplos, sin estar restringida a los mismos.

- 40 Descripción de las tablas, las secuencias y las figuras:

La Tabla 1 muestra los 29 genes y sus fuentes que han sido secuenciados en la región candidata D12S1692-D12S85. "KASPP/LRRK2" es la abreviatura del nuevo gen de la presente invención.

La Tabla 2 muestra las secuencias de cebadores para el análisis de haplotipos del segundo estudio que consta de dos marcadores de flanqueo y tres intragénicos.

- 45 La Tabla 3 muestra la frecuencia de las mutaciones del segundo estudio. El cribado mutacional se realizó en 53 familias con la DP adicionales a las 34 familias del primer estudio, 337 pacientes con PD esporádica y 1200 controles emparejados.

La Tabla 4 muestra las características clínicas y de neuroimagenología de los miembros afectados de las familias del segundo estudio. No todos los individuos podían ser investigados con los mismos
50 métodos, lo que se indica con nr (no realizado). Cuando no hay cambio en comparación con el

normal se indica con na (sin alteración), año y, ~ en curso en el momento del examen, B bradicinesia, R rigidez, RT temblor en reposo. Para una breve evaluación del olfato se utilizó una prueba de olfateo que consta de 8 diferentes olores (/8).

- 5 La Tabla 5 muestra la evaluación neuropsicológica del segundo estudio. Las pruebas aplicadas para inteligencia (LPS-K), función ejecutiva (Torre de Londres), interferencia (CWIT), demencia CERAD 1-8; concentración (D2), así como estado de ánimo (BDI) y la calidad de vida (PDQ-39). ↓ desempeño bajo, ~ promedio y ↑ por encima del promedio de los controles sanos comparados.
- 10 SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de un KASPP/LRRK2 que incluye los sitios de las mutaciones particulares que se encuentran en las familias especificadas (negrita).
- SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de KASPP/LRRK2 humano, que incluye los sitios de las mutaciones particulares que se encuentran en las familias especificados (negrita).
- 15 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido utilizado para la producción de anticuerpos monoclonales contra KASPP/LRRK2.
- SEQ ID NO: 4 muestra la sección relevante de la secuencia de aminoácidos del polimorfismo S212L de KASPP/LRRK2 humano. La variación se muestra en negrita.
- SEQ ID NO: 5 muestra la sección relevante de la secuencia de ácido nucleico del polimorfismo c634t de KASPP/LRRK2 humano. La variación se muestra en negrita.
- 20 SEQ ID NO: 6 muestra la sección relevante de la secuencia de aminoácidos del polimorfismo M2397T de KASPP/LRRK2 humano. La variación se muestra en negrita.
- SEQ ID NO: 7 muestra la sección relevante de la secuencia de aminoácidos del polimorfismo t7190c de KASPP/LRRK2 humano. La variación se muestra en negrita.
- 25 La Figura 1 muestra el árbol genealógico de las dos grandes familias: A (alemana-canadiense), D (Nebraska Occidental) y con mutaciones. Los símbolos sombreados denotan miembros afectados de la familia; asteriscos (*): individuos tipificados para la mutación, m: portador de la mutación y wt: de tipo silvestre. Para proteger la confidencialidad de estos resultados, no se muestran los genotipos de algunos individuos no afectados de las familias A y D.
- 30 La Figura 2 muestra la estructura de árbol genealógico de las familias más pequeñas con mutaciones. Los símbolos sombreados denotan miembros afectados de la familia; asteriscos (*): individuos tipificados para la mutación, m: portador de la mutación y wt: de tipo silvestre. Para proteger la confidencialidad de estos resultados, no se muestran los genotipos de algunos individuos no afectados de la familia 469.
- 35 La Figura 3 muestra las tres sustituciones de aminoácidos altamente conservadas a través de las especies R1441C, Y1699C e I1122T.
- La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de KASPP/LRRK2 así como la localización de los exones 1 - 51. Las líneas verticales marcan el primero y el último de los nucleótidos del exón, respectivamente.
- 40 La Figura 5 muestra **a**: posiciones de los exones; **b**: dibujo esquemático de KASPP/LRRK2 con dominios, posiciones de cebadores para la amplificación del ADNc y posiciones de las mutaciones, y **c**: alineación de las proteínas de tres mutaciones conservadas entre hs: Homo sapiens, mm: Mus musculus, rn: *Rattus norvegicus*, ce: *C. elegans* y dm: *Drosophila melanogaster*.
- 45 La figura 6 a-f muestra árboles genealógicos de las familias con la mutación de KASPP/LRRK2. A excepción de la familia DE038 que se muestra para demostrar segregación conjunta en la primera familia investigada y DE032 (Figura 6e), que se muestra para demostrar los mismos haplotipos en las dos familias afectadas por la mutación I2020T, todos los árboles genealógicos muestran nuevas familias.

Los símbolos sombreados denotan miembros de la familia con la presentación clínica de la PD, "+"

5		denota un individuo genotipificado, con "M" para los portadores de mutaciones y "wt" para KASPP/LRRK2 de tipo silvestre. Los símbolos punteados en la Figura 6f denotan miembros de la familia con la presentación clínica del temblor. Para proteger la confidencialidad, no se presenta el genotipo de algunos miembros de la familia no afectados. Además, se disfraza el genero de los individuos en la generación más joven de la familia E.
	La Figura 7	muestra a : posiciones del exón, y b : dibujo esquemático de KASPP/LRRK2 con los dominios y las posiciones de las mutaciones.
10	La Figura 8	muestra la autofosforilación de KASPP/LRRK2 de tipo silvestre y mutado. En el panel superior se muestra de un autorradiograma de una SDS-PAGE que se transfirió sobre membranas de PVDF. La incorporación de γ - ³² P-ATP (1 h) en KASPP/LRRK2 de tipo silvestre y el mutante I2020T se visualiza mediante un sistema de formación de imágenes de fósforo. Se muestra un control de carga por inmunotransferencia con anti-FLAG M2 en el panel inferior. Todas las muestras presentadas son del mismo experimento y se separaron en el mismo gel.
15	Las Figuras 9	(A) muestra un esquema de la estructura del dominio de KASPP/LRRK2 y las construcciones de fusión de la Etiqueta de LRRK2. (B) muestra la separación en gel SDS de las proteínas asociadas aisladas conjuntamente mediante purificación por afinidad en tándem del dominio de quinasa de KASPP/LRRK2 (carril 1) y un control del vector (carril 2). Las proteínas se visualizaron por medio de tinción con Coomassie coloidal.
20		(C) muestra inmunoprecipitación conjunta. Se analizó la interacción de dos cebos de LRRK2 etiquetados con FLAG (de longitud completa y un dominio de quinasa) con KASPP/LRRK2 de longitud completa etiquetado con HA. Se visualizó KASPP/LRRK2 etiquetado con HA precipitado en forma conjunta mediante inmunotransferencia (3F 10 anti-HA, panel superior). Un control de carga para las construcciones del cebo se muestra en el panel inferior (inmunotransferencias: anti-Flag M2). La Figura 15 (B) es la misma figura que la Figura 9 (C) en una forma mejor.
25		
	La Figura 10	muestra la inmunofluorescencia de las diferentes estructuras celulares.
30	La Figura 11	(A) muestra el fraccionamiento celular de células HEK293 que sobreexpresan KASPP/LRRK2-Flag. Se muestran las diferentes fracciones precipitadas a 700 x g (precipitado celular), el precipitado a 10.000 x g (precipitado a 10K), el precipitado a 160.000 x g (precipitado a 160K) y la fracción citosólica (sobrenadante 160 K). La localización de LRRK2-Flag se muestra en el primer carril. La localización de marcadores específicos para el citoesqueleto (beta-tubulina), membranas mitocondriales (Tom20) y la membrana del retículo endoplasmático (Sec61-alfa) se muestran a continuación.
35		(B) muestra la extracción con carbonato de la fracción del precipitado a 160K. El material de partida se muestra en la columna 1, la fracción de precipitado en la columna 2 y la fracción sobrenadante en la columna 3. LRRK2-flag se muestra en el primer carril. Para el control de calidad de la extracción, se han suministrado inmunotransferencias para diferentes proteínas marcadoras del ER: un marcador luminal del ER (BiP/GRP78, una proteína regulada por glucosa de 78 kD), un marcador asociado con ER citosólica periférica (p97 , VCP) y un marcador de membrana ER integral (Sec61-alfa).
40		
45	La Figura 12	(A) muestra una visión general adicional de la estructura y los constructos del dominio de KASPP/LRRK2. El dominio de la quinasa de KASPP/LRRK2 humano (1), el LRRK2 de longitud completa (2) y un mutante I2020T de LRRK2 asociad con una enfermedad (3) fueron clonados en el marco dentro de un pcDNA3.0 modificado, que contiene una etiqueta de afinidad en el terminal C. La mutación I2020T se localiza, como está marcado, en el dominio de la quinasa de KASPP/LRRK2. Además, se etiquetó el terminal C de KASPP/LRRK2 de tipo silvestre con un epítipo de Hemaglutinina (HA) (4) y una etiqueta de GFP (proteína fluorescente verde) (5).
50		(B) muestra constructos de la etiqueta de LRRK2 y la etiqueta de I2020T de LRRK2 que expresan una proteína de aproximadamente 280 kD en las células HEK293, visualizado por medio de transferencias tipo Western después de SDS-PAGE.
	La Figura 13	muestra KASPP/LRRK2 que aparece en las fracciones de partículas después de fraccionamiento subcelular y se asocia con membranas. (A) muestra sedimentos conjuntos de KASPP/LRRK2 con

membranas. Se fraccionaron las células HEK293 en un precipitado de células (700 x g), un sedimento de organelos (precipitado a 10K), una fracción citosólica soluble (citosol) y una fracción microsomal (precipitado a 160K). Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y transferencias tipo Western con anticuerpos contra la etiqueta Flag, TOM20 (mitocondria), PMP70, (peroxisomas), BiP/GRP78, (lumen del ER), Sec61α (membrana del ER), p50^{cdc37} (citosol) y β-tubulina (microtúbulos).

(B) muestra una extracción alcalina de KASPP/LRRK2. El precipitado a 160K se trató con carbonato de sodio 100 mM. Se separaron la membrana y la fracción soluble (precipitado y sobrenadante, respectivamente) por medio de centrifugación y se analizaron como en (A) usando anticuerpos contra la proteína integral de la membrana del ER Sec61α, la proteína p97/VCP asociada al ER citosólico y la proteína Bip / GRP78 del ER luminal.

La Figura 14 muestra que KASPP/LRRK2-GFP se localiza en las mitocondrias, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y el citoesqueleto de los microtúbulos. Las HEK293 que expresan KASPP/LRRK2-GFP (fluorescencia de GFP mostrada en el panel central) se inmunotifieron para a) la mitocondria (TOM20), b) el retículo endoplasmático (PDI), c) el aparato de Golgi (Golgi de 58 K) d) los peroxisomas (PMP70), e) filamentos intermedios (vimentina), f) el citoesqueleto microtubular (β-tubulina) y g) Faloidina-TRITC (citoesqueleto de actina). El panel de la derecha muestra las imágenes fusionadas en forma digital tomadas de la misma sección micrográfica y se fusiona con fluorescencia verde (GFP), coloración rojo alexa 568 (marcadores específicos) y tinción nuclear con DAPI.

La Figura 15 muestra que KASPP/LRRK2 se dimeriza e interactúa con HSP90 y p50^{cdc37}.

(A) muestra la purificación conjunta de constructos de KASPP/LRRK2 etiquetados en forma diferente: se analizó KASPP/LRRK2 de longitud completa etiquetada con HA por su capacidad de interactuar con dos cebos de KASPP/LRRK2 etiquetados en forma diferente (uno de longitud completa y un constructo único de dominio de quinasa). Las construcciones se expresaron conjuntamente en forma transitoria en células HEK293 antes de purificación y lisis celular. El resultado de la purificación conjunta de KASPP/LRRK2 etiquetada con HA con los cebos etiquetados con Strep/Flag se muestra en el panel superior izquierdo (precipitado). El KASPP/LRRK2 etiquetado con HA precipitado con HA precipitado en forma conjunta fue visualizado por medio de transferencias tipo Western (3F10 anti-HA).

(B) es la misma figura que en la Figura 9 (C) en una forma mejor.

Controles: Con el fin de demostrar una expresión igual de KASPP/LRRK2-HA, se muestra una transferencia tipo Western (anti-HA) de los sobrenadantes (panel superior derecho). Una carga igual de proteínas purificadas de cebo fue garantizada mediante transferencias tipo Western (anti-etiqueta, panel inferior izquierdo). Se determinó la eficiencia de la depuración de los cebos etiquetados con Strep/Flag mediante transferencias tipo Western de los sobrenadantes agotados: después de su afinidad de enlazamiento con las perlas, ninguna proteína cebo detectable permanece en los sobrenadantes (panel inferior derecho).

La Figura 16 muestra transferencias tipo Western de células HEK293 con los sobrenadantes de hibridomas diferentes. La primera transferencia tipo Western muestra el resultado de un lisado de células HEK293 que sobreexpresan KASPP/LRRK2 (llamado "LRRK2"). La otra transferencia tipo Western muestra el resultado de un lisado de células HEK293 transfectadas con un vector vacío (denominado "vector").

Clones:

- 1) 4E1 2) 4A1 3) 3G3 4) 7FL 5) 2H8
- 6) 2D7 7) 4A8 8) 2B5 9) 4G11 10) 3G6
- 11) 4G11 12) 3D9 13) 4H11 14) 4F12 15) 4B7.

Ejemplos del primer estudio

Ejemplo 1: Análisis Genético

Extracción de ADN

El ADN genómico de linfocitos de sangre periférica se extrajo utilizando protocolos estándar y después de obtener el consentimiento del informante de todos los miembros de la familia que participa.

Análisis de secuencia

- 5 Se obtuvieron las secuencias genómicas y las anotaciones del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la Universidad Santa Cruz de California (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>). Los cebadores para la detección de mutaciones fueron diseñados utilizando el software Primer3 integrado en una secuencia de comandos para permitir el diseño automatizado del cebador (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>). Se amplificaron secuencias de los exones y los límites del exón-intrón con cebadores intrónicos y se secuenciaron directamente por medio de un kit de secuenciación del Termociclador BigDye (Applied Biosystems). Entre los Marcadores D 12SL 692 y D12S85 se secuenciaron un total de 29 genes o ARN (véase la Tabla 1).

Análisis del haplotipo

- 15 Se construyeron haplotipos a mano utilizando los marcadores de repetición previamente utilizados para el análisis de enlazamiento (Zimprich, A. et al., 2004, ver más arriba). Se establecieron marcadores intragénicos para el análisis de haplotipo para fam 469 y fam D mediante la búsqueda del gen completo para los polimorfismos de repetición mediante el uso de un "programa de búsqueda de repeticiones en tándem" (<http://c3.biomath.mssm.edu/trf.html>). Se encontraron repeticiones polimórficas en el intrón 5 (caa), el intrón 20 (atct) y el intrón 29 (ac).

Análisis de enlazamiento

- 20 Los puntajes del LOD de dos puntos fueron calculados utilizando el programa MLINK (V 5.10) en su implementación FASTLINK (V4.1P). La tasa de fenocopia se fijó en 0,01, la penetrancia para el estado heterocigoto y los portadores de la mutación homocigota en 0,90. La frecuencia de alelos del alelo que causa la enfermedad se fijó en 0,001, como era la frecuencia de la mutación utilizada como marcador.

Detección de mutaciones y polimorfismos

- 25 Se seleccionaron como controles 2000 mutaciones, para polimorfismos al menos 1200 cromosomas de control de un descendiente europeo mixto. Además se seleccionaron 300 pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica. La genotipificación se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (sistema de arreglo de masas de Sequenom) utilizando el proceso de extensión de masa homogéneo (HME) para producir productos de extensión del cebador (Tang K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 96, 10016 - 10020, 1999).

Amplificación de KASPP/LRRK2

- 30 La secuencia de codificación completa de KASPP/LRRK2 se amplificó a partir del ADNc de cerebro humano mediante el uso de ADNc de Marathon-Ready (BD Biosciences Clontech). Los cebadores fueron programados para amplificar tres fragmentos que se superponen del exon1-21 (P1f, P1r), del exón 20 - 35 (p2f, p2r) y del exón 34 - 51 (p3f, p3r) (véase la Fig. 5). Información de la secuencia se deriva del ARNm publicado de DKFZp434H211. Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa para comprobar su longitud e integridad.

35 **Ejemplo 2:** Análisis de transferencia tipo Northern

El análisis de transferencias tipo Northern se realizó de acuerdo con los protocolos del fabricante (BD Biosciences). Para la hibridación se utilizó un fragmento de ADNc de KASPP/LRRK2 (6577 a 7655 pb; correspondiente al exón 45 - 3' UTR.

Ejemplo 3: Experimentos con un LightCycler

- 40 Se adquirieron los ARNm de diferentes tejidos humanos de BD Biosciences, (Clontech Ciencias BD, Palo Alto, EE.UU.) y se transcribieron de forma inversa con el kit de síntesis de ADNc transcriptor de la primera hebra (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Para amplificación en tiempo real de KASPP/LRRK2 se cuantificaron tres productos PCR específicos que abarcan al exón 1 a 8, al exón 13 a 19 y al exón 31 a 39 utilizando el instrumento LightCycler (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). Las sondas de hibridación marcadas con fluorescencia que proporcionan una especificidad máxima fueron utilizadas para la detección del producto. El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó utilizando el algoritmo de ajuste de punto. El gen para la Forfobolinógeno desaminasa (h-PBGD), un gen de mantenimiento de pocas copias, fue utilizado como estándar externo y absolutamente cuantificado utilizando el (gen de mantenimiento h-

PBGD, Roche Applied Science). Los niveles relativos de transcrito se calcularon como las relaciones de Park8/PBGD normalizadas para la expresión en un adulto del cerebro entero de adulto como el 100%

Ejemplos del segundo estudio

Individuos y métodos

5 Individuos

El ADN de 51 pacientes índice de familias con DP compatible con un modo dominante autosómico de herencia de la PD o con un modo de herencia que no puede ser asignado a un rasgo mendeliano típico, así como dos pares de hermanos afectados, fueron analizados para detectar mutaciones en el gen KASPP/LRRK2. El diagnóstico clínico se basa en criterios publicados (Hughes et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 55: 181 - 4, 1992) y se calificó la severidad de la enfermedad de acuerdo con la Escala Unificada de Calificación de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS) (Fahn et al., Recent Developments in Parkinson's Disease. New York: Macmillan, 153 - 163, 1987) y la puesta en escena de Hoehn y Yahr. En una familia (familia E) los rasgos parkinsonianos típicos se encuentra sólo en un miembro (III-1), mientras que todos los demás miembros afectados de la familia se presentaron principalmente con temblor postural. Además, todas las mutaciones nuevas y conocidas fueron investigadas en un conjunto de 337 pacientes con PD aparentemente esporádica (204 hombres, 133 mujeres, edad promedio 53 ± 13 años) y un grupo de 1200 individuos sin trastornos extrapiramidales emparejados por edad ± 5 años y sexo. Frecuencia de los alelos del polimorfismo N551K; 1653C>G se investigó en 888 de estos individuos de control.

El ADN de los pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica y familiar se obtuvo de nuestro banco de genes, mientras que el ADN de los individuos de control incluía el grupo Kora obtenido del Centro Nacional de Investigación del Medio Ambiente y la Salud / Múnich, Alemania. Todos los pacientes y los controles habían dado su consentimiento informado para pruebas de detección de mutaciones, que fue aprobado por el comité local de ética.

Detección de mutaciones

Se aisló ADN genómico a partir de sangre periférica utilizando protocolos estándar. La detección de mutaciones en pacientes de familias con PD autosómica dominante se realizó para todos los exones y límites exón-intrón del gen KASPP/LRRK2 por secuenciación directa de ambas hebras utilizando el kit de secuenciación del Termociclador BigDye (Applied Biosystems) con los mismos cebadores y bajo la mismas condiciones descritas anteriormente.

La detección de mutaciones en pacientes con PD esporádica temas e individuos de control se realizó mediante el uso de un sistema de detección alélico ABI 7900. Como se describió anteriormente, se realizó la genotipificación en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (sistema de arreglo de masas Sequenom) usando el proceso de extensión de masa homogéneo (hME) para producir productos de extensión del cebador.

En las familias con mutaciones idénticas, se llevó a cabo el análisis del haplotipo de la región KASPP/LRRK2. Los haplotipos se construyeron utilizando 5 marcadores microsatélite marcados en forma fluorescente, dos de flanco y tres intragénicos (Tabla 2). Los fragmentos de ADN que contienen las secuencias de marcadores polimórficos se amplificaron por PCR. Los productos PCR marcados con fluorescencia fueron analizados en un secuenciador automatizado ABI 3100 con un sistema de detección de fluorescencia.

Extracción de ADN a partir de tejido cerebral

En la familia grande, con sólo un paciente con el cuadro clínico de la PD y muchos otros afectados por síntomas que parecen temblor esencial (familia E), la sangre para la extracción de ADN sólo estaba disponible del paciente con PD. Para revelar una posible asociación de una mutación de KASPP/LRRK2 y las características clínicas del temblor esencial, se extrajo ADN de un portaobjetos de un microscopio con tejido de cerebro embebido en parafina (cerebelo) de un miembro de la familia con este fenotipo (III-7).

La eliminación de la parafina se llevó a cabo usando xileno y etanol, seguido de una digestión con proteinasa K. Se purificó luego la sonda utilizando extracción con fenol / cloroformo y finalmente se precipitó con LiCl y etanol.

Investigaciones clínicas

Los pacientes índice de familias con mutaciones en el gen KASPP/LRRK2 fueron invitados a una consulta genética e investigaciones clínicas y de neuroimagenología en virtud de un protocolo aprobado. Después del consentimiento informado se realizó un examen neurológico completo y se analizó la función olfativa usando palillos olfatorios (Daum et al., Nervenarzt, 71: 643 - 50, 2000). Se escogió una batería de pruebas neuropsicológicas sensibles para demencia, concentración, planificación, así como para inteligencia (Tabla 5). Para evaluar el estado de ánimo y la

sensibilidad de los pacientes, se les pidió completar el cuestionario sobre la depresión de Beck (BDI) y el cuestionario PDQ-39 sobre la calidad de vida con la enfermedad de Parkinson.

- 5 Las investigaciones electrofisiológicas incluyeron neurografía del nervio tibial y sural derecho, y electromiografía de los cuádriceps para discernir cambios subclínicos en los potenciales unitarios motores y posible actividad espontánea anormal. Además, los potenciales evocados con imán se realizaron en todos los pacientes sin contraindicaciones.

Neuroimagenología

La neuroimagenología estructural incluía por ultrasonido transcraneal (TCS) y formación de imágenes de resonancia magnética (MRI).

- 10 Para TCS se utilizó un sistema de ultrasonido de disposición en fase con un transductor de 2,5 MHz con una resolución axial de aproximadamente 0,7 mm y una resolución lateral de aproximadamente 3 mm (Elegra, Siemens, Erlangen, Alemania). El examen se realizó a través de una ventana ósea preauricular acústica con una profundidad de penetración de 16 cm y un rango dinámico de 45 dB como se describió previamente (Berg et al., *Ultrasound Med Biol.*, 25: 901 - 904, 1999). Se identificó la SN dentro de la estructura en forma de mariposa del tronco cerebral
15 mesencefálico con la mayor claridad posible, exploración de las dos ventanas temporal óseas, luego el área de las señales hiperecogénicas en la región de la SN fue rodeada y medida (Berg et al., 1999, ver más arriba, Berg et al., *J Neurol*, 248: 684 - 689, 2001). Un área de hiperecogenicidad de la $SN \leq 0,19 \text{ cm}^2$ fue clasificada como normal, un área $> 0,19$ y $\leq 0,24 \text{ cm}^2$ como moderada y una área de $> 0,24 \text{ cm}^2$ como marcadamente hiperecogénica (Berg et al., 1999, ver más arriba).
- 20 La MRI se realizó en un Magnetom Avanto de 1,5 Tesla, Siemens AG, Alemania.

Resultados

Detección mutacional

- 25 La detección de toda la región de codificación del gen KASPP/LRRK2 de un paciente de referencia de cada una de 55 familias identificó 7 nuevas familias con sustituciones de aminoácidos (Figura 6a-f). Cuatro de ellas son nuevas mutaciones de sentido erróneo: R793M; 2378G>T en la familia DE041 y en la familia T11239, Q930R; 2789A>G en la familia DE022; S1096C, 3287C>G en la familia E y S1228T; 3683G>C en la familia DE031. La mutación de sentido erróneo R793M también se encontró en un paciente con PD esporádica y una persona de control.

- 30 La hasta ahora más común sustitución de aminoácidos G2019S; 6055G>A se encontró sólo en un paciente con PD esporádica, que mostró la típica enfermedad de Parkinson sensible a levodopa con una edad de inicio de XX y sin características clínicas adicionales. Además se detectó un paciente adicional con la mutación del sitio de empalme ya descrita anteriormente 3342A>G (familia T11288) y una familia más con la mutación I2020T descrita anteriormente (familia T10738).

- 35 A excepción de la mutación R793M, que se encontró en una persona de control, no se encontró ninguna de las mutaciones en el grupo de control (Tabla 3). No hubo diferencia significativa en la frecuencia del alelo menor del polimorfismo conocido N551K; 1653>G entre los pacientes con PD esporádica (6,5%) y los individuos de control (7,3%).

Análisis del haplotipo

- 40 El análisis del haplotipo reveló haplotipos comunes para las dos nuevas familias afectadas por la mutación R793M, así como para la familia T10758 y la familia DE032 afectadas por la mutación I2020T, indicando causantes comunes para estas mutaciones (Figuras 6a y 6e). Aunque los miembros de las familias DE032 y T10758 no estaban al tanto de antepasados comunes, proceden de la misma zona geográfica (Baden Württemberg, sur de Alemania). Las familias T11239 y DE041 fueron reclutadas de áreas geográficas muy diferentes (familia T11230 de Baden Württemberg y la familia DE041 de Hesse). Los miembros de estas familias no eran tampoco conscientes de antepasados comunes. Para la mutación del sitio de empalme A3342G no se encontró un haplotipo común en las
45 familias afectadas (DE038 y T11288).

Hallazgos clínicos

Un examen clínico extensivo de neuroimagenología reveló las características enumeradas en la Tabla 4.

Todos los pacientes investigados tenían signos típicos de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, las

características diferían entre los miembros de la misma familia afectada por la misma mutación, así como entre diferentes familias con la misma mutación. Además, se encontró que la penetrancia varía para diferentes mutaciones.

Los hallazgos más comunes en los pacientes con mutaciones de KASPP/LRRK2

- 5 Todos los portadores de la mutación con PD clínicamente aparente tenían las características típicas del Parkinson incluyendo bradicinesia, temblor y rigidez. Además, todos los pacientes experimentaron un alivio sustancial de los síntomas después de la aplicación de L-dopa, aunque la terapia se complicó en un paciente (T11288 II-5) por alucinaciones. La estimación de la función olfativa mediante la aplicación de 8 palitos olfativos reveló una pérdida de la capacidad de identificación entre moderada a severa en tres de cinco individuos. Inestabilidad postural se
10 encontró solo a finales del transcurso de la enfermedad. Se reportaron alucinaciones rara vez y únicamente se produjeron después de un largo período de enfermedad o asociadas con la demencia, mientras que se reportaron trastornos del sueño en un 80% de los casos (Tabla 4).

Diferencias intrafamiliares en la presentación clínica

- 15 R793M: Dos hermanas se ven afectadas con una diferencia de edad de inicio de 15 años. Mientras que en el inicio de la enfermedad II-1 tenía sólo temblor postural leve en el lado derecho, el síntoma inicial de II-2 fue temblor en reposo en el lado izquierdo. Un tipo equivalente de PD se desarrolló en II-2, mientras que II-1 no mostró en absoluto ningún temblor en reposo, sino un tipo de rigidez sin movimiento de la PD (Figura 6a).

- 20 Q930R: El lapso de edad de inicio fue de 21 años entre los tres miembros de la misma generación afectada. Sólo el hermano III-7 desarrolló demencia severa y alucinaciones después de más de 20 años de duración de la enfermedad (Figura 6b).

- 25 3342A>G: Aunque la hermana II-7 de la familia T11288 presentó características típicas de Parkinson, el cuadro clínico de demencia precoz severa, hipersensibilidad a alucinaciones dopaminérgicas y somnolencia durante el día con la fluctuación de vigilancia se asemejaba a DLBD en II-5. Sin embargo, el análisis mutacional reveló al alelo de tipo silvestre en II-7. Se debe postular por lo tanto una fenocopia para la presentación de la PD más típica, mientras que el tipo DLBD atípico estaba en realidad asociado con la mutación del sitio de empalme 3342A>G. Sin embargo, el hecho de que esta variación segregada conjuntamente con la mutación en la familia descrita anteriormente DE038 es una indicación de una mutación en lugar de un polimorfismo benigno.

Diferencias interfamiliares en la presentación clínica para la misma mutación

- 30 R793M: Aunque en III-3 de la familia T11239 era imposible hablar debido a una discinesia severa de la lengua, las hermanas afectadas de la familia 41 no mostraron ningún signo atípico salvo por el temblor postural en II-1 (Figura 6a).

- 35 3342A>G: En la familia T11288 ambas hermanas y en la familia DE038 se reportó que el padre y III-I se vieron gravemente afectados por la enfermedad. III-3, sin embargo, no mostró ninguno de los síntomas del Parkinson excepto de temblor mínimo en reposo del pulgar derecho durante más de 15 años (figura 6c).

- Edad de inicio

- 40 La edad promedio de inicio en las nuevas familias fue de 58 ± 14 años. Sin embargo, la edad de inicio difería entre los miembros de la misma familia. En descendientes de portadores de la mutación de las tres nuevas familias, en los cuales estaban disponibles datos claros de los antepasados (Tabla 4) el diagnóstico de sí la PD se estableció más temprano y también la investigación de un miembro adicional de la familia en la familia DE032 reveló un diagnóstico precoz (41 años), mientras que la edad promedio de inicio fue de 54 (48 - 59 años) en la generación I-III (Figura 6e).

Penetrancia

- 45 Por medio de la combinación de los hallazgos del segundo estudio y del primer estudio, se encontró un modo autosómico dominante claro de herencia en al menos una familia afectada por la mutación del sitio de empalme del exón 24, y por las mutaciones de sentido erróneo del exón 25, el exón 27, el exón 31, y el exón 41. No se encontró un patrón genético fuerte en las familias afectadas por mutaciones de sentido erróneo en el exón 19, 21 y 24.

Exón 19; R793M: En la familia T11239 sólo el tío de la paciente índice se vio afectado, mientras que el padre que murió a la edad de 68 años no presentó ningún signo extrapiramidal durante su vida. En la familia DE041 dos hermanas mostraron signos típicos de la PD durante su vida, mientras que ninguno de los padres que murieron ambos a la edad de 74 años mostró signos de Parkinson (Figura 6a).

Exón 21, Q930R: De nueve hermanos y hermanas en la familia DE022, tres se vieron afectados por la mutación y tenían signos clínicos de la PD, mientras que otra hermana y otro hermano, también portadores de la mutación, no se vieron afectados por la PD a una edad de más de 70 años. Ni la madre (II-3), que murió a la edad de 90 años ni su hermano (II-2), que murió a los 75 años de edad mostraron características de Parkinson durante su vida. El primo de los miembros afectados de la familia (III-4) mostró signos típicos de la PD, pero no era portador de la mutación Q930R, lo que indica PD esporádica en este miembro de la familia. Sin embargo, se encontró que su hermana (III-3), tenía la mutación. Después de haber alcanzado la edad de 77 años, no tiene signos clínicos que permitan el diagnóstico de la PD. Tanto II-3 como II-2 deben haber sido portadores de la mutación. El hecho de que ninguno de ellos y tampoco III-3 hayan mostrado rasgos parkinsonianos durante sus vidas demuestra una penetrancia incompleta de esta mutación.

Exón 24, S1096C: En esta gran familia con un fenotipo de temblor adicional (Si) únicamente III-12 era portador de la mutación, afectado por la enfermedad de Parkinson. Un hijo de su hermano, que sólo mostró características de temblor esencial, pero sin síntomas parkinsonianos hasta su muerte a la edad de 66 años, también es portador de la mutación, lo que indica también una penetrancia incompleta para esta mutación.

Fenocopias y la ocurrencia simultánea de temblor

Un miembro de la familia con PD típica de DE022, asociada con la mutación Q930R y una de las hermanas de la familia T11288, (mutación en el sitio de empalme A3342G de la otra hermana), de nuevo con las características típicas del Parkinson tenía alelos de tipo silvestre, argumentando PD idiopática en estos casos.

En la familia E, es evidente una herencia autosómica dominante de temblor (Figura 6f). Dos miembros de la familia (III-7 y III-1) mostraron características típicas de Parkinson durante su vida, en III-11 se detectó la mutación S1096C. Como no había sangre disponible de III-7, se investigó el ADN extraído de tejido cerebral. Sin embargo, en este paciente la mutación C3287G no podía ser detectada, lo que indica una causa diferente para la enfermedad de Parkinson. De uno de los hermanos con un fenotipo de temblor (III-19, que presenta temblor postural y de la voz) también se pueden identificar únicamente alelos de tipo silvestre. El único miembro de la familia con un fenotipo de temblor que porta la mutación S1096C debe haber sido el hermano del III-12, ya que uno de sus hijos también es portador de la mutación. Sin embargo, como la mutación no pudo ser detectada en III-19, una penetrancia incompleta de los síntomas de Parkinson en un individuo afectado también por el temblor es más probable que una asociación de temblor con la mutación en esta familia.

Hallazgos neuropsicológicos

De los 5 pacientes examinados a través de una investigación neuropsicológica, tres fueron capaces de completar la batería completa de pruebas. En tres de ellos, la inteligencia era superior a la del promedio de un grupo de control equivalente (LPS-K), lo que sugiere que los déficits neuropsicológicos sutiles bien pueden ser compensados. Aún así, los tres mostraron déficits en las funciones ejecutivas (Torre de Londres) y tenían puntajes altos de interferencias (CWIT) lo que indica incapacidad de sobreestimulación ciega (Tabla 5). Este patrón está de acuerdo con déficits neuropsicológicos en la PD idiopática. Los otros dos investigados fueron clasificados como dementes. En la paciente III-3 de la familia de T11239, la MMSE fue de 22. Adicionalmente, una grave distonía de la lengua impidió el cumplimiento de la CERAD. En el paciente II-5 de la familia T11288 con mutación del sitio de empalme 3342A>G, el agotamiento y la demencia frustrada completan las pruebas neuropsicológicas.

Hallazgos de TCS y de MRI

TCS: se encontró hiperecogenicidad moderada, al menos en un lado, en todos menos un paciente con mutaciones LRRK2. Curiosamente, ninguno de los pacientes presentó marcada hiperecogenicidad de la SN. MRI mostró leve a marcada atrofia en los 4 pacientes investigados (Tabla 4). El paciente con el fenotipo DLBD tenía adicionalmente alguna evidencia de microangiopatía.

Caracterización bioquímica de KASPP/LRRK2

Material y Métodos

Plásmido y clonación

Se clonó el KASPP/LRRK2 humano mediante PCR a partir de ADNc que había sido generado a partir de ARNm de linfoblastos. KASPP/LRRK2 se clonó en forma de dominios en seis fragmentos. Cada fragmento fue clonado en pcDNA3.0 (Invitrogen) y verificado por secuenciación. La secuencia de longitud completa se generó por la fusión posterior de los subconstructos. Se introdujeron las etiquetas HA y FLAG en el extremo 3' (terminal C) de los constructos. Se introdujo la mutación I2020T en KASPP/LRRK2 por medio de mutagénesis dirigida al sitio usando el

kit de mutagénesis QuikChange® II (Stratagene). Por medio de microscopía de fluorescencia, se clonó el ADNc de GFP humanizada, derivado de pFRED143 (Ludwig, E. et al., J. Virol., 73, 8279 - 8289, 1999), en el marco en el extremo 3' (terminal C) de KASPP/LRRK2.

Cultivo Celular

- 5 Se cultivaron células HEK293 en DMEM suplementado con FBS al 10% a 37° C y 5% de CO₂. Para la inmunoprecipitación (IP), se transfectaron células de experimentos de fraccionamiento celular o de purificación por afinidad en tándem con Effectene® (Qiagen) y se mantuvo en medio completo durante 48 h.

Electroforesis e inmunotransferencia

- 10 Para los análisis de inmunotransferencia se separaron muestras de proteína por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Después de bloquear los sitios no específicos de enlazamiento con 5% de leche seca en TBST (1 h, RT) (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1%) se incubaron las membranas durante la noche a 4° C con anticuerpos primarios en amortiguador de bloqueo (anti-Bip/GRP78 de ratón (BD)), 1: 1000; anti-p50^{cdc37} de ratón (BD), 1:1000; anti-HA 5F10 de rata, 1,3 µg/ml; anti-p97/VCP de ratón (Progen), 1: 1000; anti-PMP70 de conejo (Prof. Dr. A. Völkl, Universidad de Heidelberg, Alemania), 1:1000; anti-Sec 61α de conejo (Acris), 1:1000; anti-TOM20 de ratón (BD), 1:1000; anti β-tubulina de ratón (Sigma), 1:2000), se lavó con TBST y se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se lavaron las membranas y se visualizaron complejos antígeno - anticuerpo utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia + ECL (GE Healthcare) sobre Hyperfilms (GE Healthcare). Para el epítipo HA se utilizó el anticuerpo monoclonal anti HA 5F10 (Roche) en una concentración de 1,3 µg / ml (leche seca al 5%). Para el epítipo FLAG, se utilizó el anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma) acoplado con HRP en una dilución de 1: 1000 (leche seca al 5%). Se utilizaron anticuerpos adicionales con las siguientes diluciones: anti β- tubulina de ratón (Sigma) 1:2000; anti Sec61-α de conejo (Acris) 1:1000; anti TOM20 de ratón (BD) 1:1000; anti BiP/GRP78 de ratón (BD) 1:1000; anti p97NCP de ratón (ProGen) 1:1000).

Fraccionamiento de las células

- 25 Se recolectaron las células a través de tripsinización, se las lavó una vez con PBS frío, se resuspendieron en amortiguador de homogeneización frío (HEPES 20 mM pH 7,4, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarosa 250 mM, cóctel inhibidor de proteasa (Roche)) y se homogeneizó. Se centrifugaron los homogenizados a 700 x g durante 10 min para precipitar los núcleos, desechos y células no rotas (sedimento celular). Se centrifugó el sobrenadante a 10.000 x g durante 20 min para obtener el precipitado a 10K. Se prepararon citosol y precipitado a 160K por ultracentrifugación del sobrenadante 10 K (160.000 x g durante 1 h).

Extracción de carbonato

- 35 Se diluyeron fracciones de 160 K con carbonato de sodio 100 mM (concentración final) pH 11,5 y por 30 min sobre hielo. Se centrifugaron las suspensiones durante 1 h a 160.000 x g a 4° C. Se recuperaron los sobrenadantes y se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10%. Se sometieron por precipitados de membrana y las proteínas precipitadas a SDS-PAGE y análisis por transferencias tipo Western.

Inmunoprecipitación (IP)

- 40 Para los ensayos de interacción se lisó KASPP/LRRK2 marcado con FLAG durante 1 h en amortiguador de lisado (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,5% de Nonidet-P40, inhibidores de la proteasa (Roche), ortovanadato 1 mM) durante 1 h a 4° C. Después de la sedimentación de los núcleos (10 min, 10.000 g, 4° C), se incubó el sobrenadante con perlas de agarosa M2 anti-FLAG (Sigma) durante 2 horas a 4 ° C. Después de la incubación, se lavaron las perlas 4 veces en amortiguador de lisis y se eluyeron con amortiguador de muestra en gel de SDS.

Purificación por afinidad en tándem

- 45 La purificación por afinidad en tándem se hizo con una etiqueta de purificación por afinidad en tándem en el terminal C que consiste en una etiqueta StrepII en tándem y un epítipo Flag (etiqueta de Strep/Flag). Se lisaron las células HEK293 que expresan transitoriamente los constructos etiquetados con Strep/Flag en Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,5% de Nonidet-P40, inhibidores de la proteasa y ortovanadato 1 mM durante 1 h a 4° C. Después de la sedimentación de los núcleos, se incubó el sobrenadante clarificado durante 2 horas a 4° C con estreptactina Superflow (IBA). Antes del lavado, se transfirieron los lisados con resina suspendida a columnas MicroSpin (GE Healthcare). El lavado (1x con amortiguador de lisis y 2x con TBS) se hizo en las columnas MicroSpin. Se removió la solución de lavado de las columnas por centrifugación (10 s, 2.000 x g) después de cada etapa de lavado. Se eluyeron los cebos de proteína con destiobiotina (2 mM en TBS). Se utilizaron los eluatos para experimentos de

precipitación conjunta de LRRK2 de constructos LRRK2-Strep/Flag vs LRRK2-HA.

Para el análisis por MS, se añadió una segunda etapa de purificación. Para esta etapa, se transfirieron los eluatos a agarosa M2 anti-Flag (Sigma) y se incubaron durante 2 horas a 4° C. Se lavaron las perlas 3 veces con TBS en columnas MicroSpin. Se eluyeron las proteínas con péptido Flag (Sigma) en PBS a razón de 200 µg/ml de péptido. Después de la purificación se separaron las muestras mediante SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie coloidal de acuerdo con protocolos estándar antes de la identificación por MS (Neuhoff, V. et al., Electrophoresis, 9, 255 - 262, 1988).

Espectrometría de masas

Se identificaron las proteínas mediante MALDI-MS y MSMS en un instrumento AB3700 (Applied Biosystems). La proteólisis trípica en gel se hizo después de protocolos estándar (Shevchenko, A. et al., Anal. Chem. 68, 850 - 858, 1996). Los péptidos fueron colocados sobre objetivos de acero con el método de gotita seca usando el ácido alfa-ciano-4-hidroxycinámico (Sigma) como matriz (Shevchenko, A. et al., ver más arriba). Los espectros obtenidos de MS y MS/MS fueron analizados por medio de un conjunto de herramientas y aplicaciones de software explorador GPS (Applied Biosystems).

Ensayos de actividad de quinasa (ensayo de autofosforilación)

Para los ensayos de quinasa (ensayos de autofosforilación), la variante I2020T de LRRK2 o de LRRK2 de tipo silvestre de longitud completa etiquetada con Strep/Flag fue transitoriamente expresada en células HEK293 (placas de cultivo de 4 x 14 cm por constructo, placas de 2 x 14 cm para el control del vector). Después de lisis celular y la remoción de los núcleos, se efectuó la purificación de las variantes de LRRK2 por medio de inmunoprecipitación con agarosa M2 anti-Flag. Se lavó la resina 3 veces en amortiguador de lisis. Las proteínas etiquetadas no se eluyeron, ya que los ensayos de quinasa se realizaron directamente sobre la resina. Cada muestra se dividió en 4 partes alícuotas y se almacenaron en TBS + glicerol al 10% a -80° C hasta su uso.

Para el ensayo de la quinasa, una alícuota de cada condición (variante I2020T de LRRK2 y LRRK2 de tipo silvestre) se dividió en tres partes alícuotas (1/2, 1/3, 1/6). Cada parte alícuota, así como una alícuota del control del vector se incubó con ATP 50 µM, 0,3 µCi [γ -³²P] de ATP en 30 µl de amortiguador del ensayo (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, β -glicerofosfato 5 mM, DTT 2 mM, ortovanadato 0,1 mM; MgCl₂ 10 mM; Señalización Celular) durante 1 hora a 30° C. La reacción se detuvo con amortiguador de Laemmli. Las muestras de proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). La formación de imágenes se realizó sobre un sistema de formación de imágenes de fósforo (BioRad). La igualdad de carga se aseguró mediante análisis por transferencia tipo Western (M2 anti-Flag).

Inmunofluorescencia

Las células HEK293 se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio antes de la transfección con LRRK2 de tipo silvestre etiquetadas con GFP. Para evitar la separación de células, los cubreobjetos fueron tratados previamente con poli-D-lisina (Sigma) y laminina (Sigma). 48 h después de la transfección se fijaron las células durante 15 min con paraformaldehído al 4% a RT. Las células fijadas se permeabilizaron con PBS que contenía Triton-X 100 al 0,1% durante 5 min, se bloqueó con PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y BSA al 1% y se incubaron durante 3 h a RT con anticuerpos primarios en solución de bloqueo [Golgi anti-58K de ratón, 1:100 (Abcam); anti-PDI de ratón (proteína disulfuro isomerasa), 1:100 (Abcam); anti-PMP70 de conejo (proteína de membrana peroxisomal de 70 kD), 1:200; anti-TOM20 de ratón (proteína translocasa de la membrana mitocondrial exterior), 1:500 (BD); anti- β -tubulina de ratón, 1:500 (Sigma); anti-Vimentina de ratón, 1:200 (Sigma)]. Se lavaron los cubreobjetos seis veces con PBS y etiquetaron durante 1 h con IgG anti-conejo de cabra, anti-ratón de cabra conjugados con Alexa 568 (Invitrogen) o Faloidina-TRITC (1:10.000, Sigma). Para la tinción nuclear la solución también contenía 1 µg/ml de 4,6-diaminodifenil-2-fenilindol (DAPI, Sigma). Los cubreobjetos se lavaron seis veces con PBS, se montaron con FluorSave (Calbiochem) y se evaluó por medio de microscopía de fluorescencia utilizando un Aptome Zeiss equipado con Cy3, FITC y conjuntos de filtros óptico DAPI. Las imágenes obtenidas proporcionar una resolución axial comparable a la microscopía confocal (Garini, Y. et al, Curr. Opin. Biotechnol., 16, 3 - 12, 2005).

Resultados

KASPP/LRRK2 es una membrana asociada a la proteína de 280 kD

Para los estudios funcionales y bioquímicos, se clonó KASPP/LRRK2 a partir de ADNc humano y generaron una serie de constructos para la expresión de la Hemaglutinina (HA), Strep / Flag y proteínas de fusión LRRK2 etiquetadas con proteína fluorescente verde (GFP) (Fig. 12A). Las células HEK293 que fueron transfectadas transitoriamente con KASPP/LRRK2 humano de tipo silvestre etiquetado con Strep / Flag en el terminal c, expresan

una proteína de ~ 280 kD reconocida por un anticuerpo anti-Flag (Fig. 12B). El peso molecular observado corresponde a aquel esperado para KASPP/LRRK2. Se podría detectar también una señal más débil adicional en algunos casos de ~ 180 kD que es más probable un producto de degradación del terminal N de KASPP/LRRK2.

Con el fin de determinar la localización subcelular de KASPP/LRRK2, se utilizaron dos enfoques: fraccionamiento subcelular y microscopía de fluorescencia. Para la detección de la distribución subcelular de KASPP/LRRK2 *in vitro*, se fraccionaron las células transfectadas mediante centrifugación diferencial. La distribución de los orgánulos subcelulares en las fracciones obtenidas se analizaron luego mediante anticuerpos específicos para las mitocondrias (TOM20), el citoesqueleto (β -tubulina), los peroxisomas (PMP70), los microsomas (BiP/GRP78, Sec61 α) y proteínas citosólicas solubles (p50^{cdc37}). LRRK2 sólo se encontró en las fracciones membranosas (tanto los precipitados de 10K como de 160K), es decir, las fracciones enriquecidas en mitocondrias (precipitado a 10K) y las membranas microsomales (precipitado a 160K) pero estaba ausente en el citosol (Fig. 13A).

Con el fin de investigar si KASPP/LRRK2 es una proteína asociada a la membrana o una proteína integral de la membrana, se extrajo el precipitado a 160K con carbonato de sodio, pH 11,5 (Fujiki, Y. et al., J. Cell Biol., 93 97 - 102, 1982). Se extrajo KASPP/LRRK2, junto con otras proteínas conocidas asociadas a la membrana, el marcador ER luminal BiP/GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kD) y la VCP marcadora asociada ER con ER citosólico (proteína que contiene vasolina), a partir de membranas microsomales, mientras que el proteína de membrana integral Sec61 α fue recuperada en el precipitado de membrana (Fig. 13B). Esto proporciona la evidencia de que KASPP/LRRK2 es una proteína asociada a la membrana en lugar de integrada en las membranas.

Adicionalmente, las células HEK293 que expresaron el dominio de quinasa de KASPP/LRRK2 etiquetado en forma recombinante con Strep/Flag fueron sometidas a fraccionamiento subcelular. En contraste con KASPP/LRRK2 de longitud completa, el constructo del dominio de quinasa fue encontrado en el citosol, mientras que poco o nada de proteína de fusión fue detectada en las fracciones de partículas (tanto los precipitados de 10K como de 160K, Fig. 13A). Por lo tanto, el dominio de quinasa no está implicado en la asociación de KASPP/LRRK2 a estructuras membranosas.

LRRK2 se localiza conjuntamente con estructuras citoplasmáticas discretas

Se utilizó microscopía de inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular de KASPP/LRRK2 etiquetado con GFP expresado en forma transitoria en células HEK293. Después de la fijación, se permeabilizaron las células y etiquetaron en forma inmunológica en forma conjunta con anticuerpos específicos para diferentes estructuras subcelulares. En las células HEK293, KASPP/LRRK2 etiquetado con GFP demostró una distribución citoplasmática (Fig. 314 columna 2). La localización parcial conjunta se observó con las estructuras celulares internas, es decir, las mitocondrias (TOM20), ER (PDI) y el aparato de Golgi (Golgi de 58K). En contraste, no se observó solapamiento con peroxisomas (PMP70). No se encontró localización conjunta con el citoesqueleto de actina (Faloidina-TRITC) y filamentos intermedios (Vimentina). Sin embargo, la localización conjunta más fuerte era una superposición con β -tubulina, lo que sugiere una interacción entre KASPP/LRRK2 y el citoesqueleto microtubular. Por lo tanto, KASPP/LRRK2 es una proteína citoplasmática asociada con un subconjunto de las membranas celulares internas, es decir, las mitocondrias, ER y Golgi, y con el citoesqueleto de los microtúbulos.

Niveles de autofosforilación entre el mutante I2020T y KASPP/LRRK2 de tipo silvestre

Las firmas del dominio de quinasa pueden ser fácilmente detectadas por medio de herramientas de bioinformática. Sin embargo, es necesario verificar la actividad de la quinasa de KASPP/LRRK2 mediante ensayos bioquímicos. Además, una comparación de KASPP/LRRK2 de tipo silvestre y mutado contribuirá a la comprensión de la naturaleza de la mutación, ya sea que se trate de una ganancia o de una pérdida de mutación de la función.

La proteína de tipo silvestre de longitud completa vs la variante mutante I2020T fue analizada por su capacidad para auto-fosforilación. No se han observado diferencias significativas en los niveles de autofosforilación entre la variante I2020T y la de tipo silvestre (Fig. 8). Esto confirma que tanto KASPP/LRRK2 como la mutación I2020T asociada con la enfermedad en el dominio de quinasa de KASPP/LRRK2, poseen actividad de quinasa. La cuantificación de las tasas de autofosforilación reveló un aumento en la actividad del mutante I2020T en comparación con KASPP/LRRK2 de tipo silvestre de aproximadamente 30 - 50%. Este hallazgo puede ser la base para el desarrollo de un ensayo de selección apropiado para compuestos moduladores, en particular inhibidores, de la mayor actividad de quinasa del mutante I2020T, como se describe adicionalmente aquí por ejemplo.

Homodimerización de KASPP/LRRK2

Se prevé que el dominio de quinasa de LRRK2 pertenece a la clase de MAPKKK. Una característica de tales quinasas es la formación de dímeros. Además, para Raf-1 y MLK-3 (quinasa de linaje mixto 3), uno de los familiares más cercanos de LRRK2 en los vertebrados, se requiere de homodimerización para la actividad.

En un primer enfoque, se analizó KASPP/LRRK2 por su capacidad de interactuar consigo mismo por medio de experimentos de precipitación conjunta. Por lo tanto, cebos de KASPP/LRRK2 etiquetados con Flag en tándem fueron coexpresados con KASPP/LRRK2 de longitud completa etiquetado con HA. Como se muestra en la Fig. 9a, el cebo de KASPP/LRRK2 de longitud completa podría retirar HA-KASPP/LRRK2 mientras que una proteína de cebo que contiene sólo el dominio de quinasa no mostró ninguna interacción con KASPP/LRRK2 de longitud completa. Por lo tanto, KASPP/LRRK2 interactúa consigo mismo indicando la formación de homodímeros u oligómeros de orden superior.

En un segundo enfoque, se utilizaron proteínas KASPP/LRRK2 etiquetadas en forma diferente y células HEK293 cotransfectadas con dos constructos para la expresión de HA y las proteínas de fusión KASPP/LRRK2 etiquetadas con Strep/Flag, con la intención de que una cierta fracción de células que expresan dos diferentes proteínas de fusión KASPP/LRRK2 abordaría la cuestión de la dimerización mediante experimentos de coprecipitación. Además de la LRRK2 de longitud completa, se utilizó únicamente una versión etiquetada con Strep / Flag del dominio de quinasa (Fig. 12). Una comparación de las purificaciones con las tres etiquetas mostró los mejores resultados para estreptactina, que precipita casi completamente las proteínas etiquetadas. Por lo tanto, se utilizó estreptactina para la precipitación de las proteínas de fusión KASPP/LRRK2 de células solubilizadas que coexpresan KASPP/LRRK2 etiquetado con Strep/Flag. Como se muestra en la Fig. 15A (parte inferior) por medio de un anticuerpo anti-Flag, ambos, los cebos del dominio de quinasa de KASPP/LRRK2 como de longitud completa se precipitaron con la misma eficacia. El análisis de las proteínas precipitadas con el anticuerpo anti-HA mostró que sólo el cebo de KASPP/LRRK2 de longitud completa podría retirar KASPP/LRRK2 etiquetada con HA, mientras que el dominio de quinasa no mostró ninguna interacción con KASPP/LRRK2 de longitud completa (Fig. 15 A, panel superior izquierdo). Por lo tanto, únicamente KASPP/LRRK2 de longitud completa interactúa consigo misma formando homodímeros u oligómeros de orden superior.

Interacción de KASPP/LRRK2 con HSP90 y su acompañante p50^{cdc37}

Para identificar las proteínas que interaccionan con el dominio de quinasa de KASPP/LRRK2, se llevaron a cabo experimentos de purificación de afinidad en tándem con un sistema de etiquetas. Los complejos de proteína purificados fueron sometidos a SDS-PAGE (Fig. 9b). Las proteínas que interactúan fueron identificadas mediante espectrometría de masas. Como se muestra en la Fig. 10b, el dominio de quinasa aislado de KASPP/LRRK2 está asociado con HSP90 y su acompañante p50^{cdc37}. La KASPP/LRRK2 de longitud completa, sin embargo, se une a HSP90 y p50^{cdc37} en muy poca cantidad. La interacción con el sistema acompañante HSP90/p50^{cdc37} se muestra para varias quinasas, incluyendo la MAPKKK Raf-1 y MLK-3. En ambos casos, no sirven como sustratos, pero se asocian como acompañantes que participan en el mantenimiento de plegamiento apropiado de la quinasa. Este experimento es una evidencia adicional de que KASPP/LRRK2 posee actividad de quinasa y es activo en las células transfectadas.

Asociación de KASPP/LRRK2 con las membranas microsomales

La información de la localización de KASPP/LRRK2 ayudará a comprender su función *in vivo*. Usando experimentos de microscopía de fluorescencia con un constructo etiquetado con GFP en el terminal c, se demostró que KASPP/LRRK2 se distribuye en el citoplasma en células HEK293 y COS7 (Fig. 10). Por inmuno co-tinción no se observó una colocación clara con ninguna estructura celular tipo citoesqueleto u orgánulos. Sin embargo, por medio de co-tinción con TOM20 y TIM23, se obtuvo una superposición parcial con las mitocondrias.

A fin de analizar adicionalmente la localización subcelular de esta proteína, se llevó a cabo un fraccionamiento celular (Fig. 11a). Sorprendentemente, no se encontró KASPP/LRRK2 en el citosol. Sin embargo, se encontraron grandes cantidades de KASPP/LRRK2 en las fracciones membranosas analizadas (tanto los precipitados de 10K como de 160K), es decir, fracciones enriquecidas con mitocondrias (precipitado a 10K) y membranas microsomales (precipitado a 160K).

Con el fin de probar si KASPP/LRRK2 es una membrana integral o una proteína asociada a la membrana, se aplicó la extracción por carbonato de la fracción de membrana microsomal (precipitado a 160K). Ya que KASPP/LRRK2 podía ser extraída con carbonato (Fig. 11b), es una proteína asociada a la membrana en lugar de estar integrada dentro la membrana. Por lo tanto, KASPP/LRRK2 es una proteína con distribución citoplasmática pero no citosólica y demuestra fuerte asociación a las membranas.

Generación de anticuerpos monoclonales contra KASPP/LRRK2

General

La inmunización, la generación de clones de hibridoma y ELISA para los clones positivos contra el péptido # 2025 utilizado para la inmunización se llevó a cabo de acuerdo con protocolos estándar. Los clones productores de anticuerpos se analizaron para determinar la sensibilidad y especificidad contra KASPP/LRRK2. El péptido # 2025

con la secuencia de aminoácidos "CRMGI KTSEG TPGFRAPEVA RGNVIYNQQA D" representa el dominio de quinasa de KASPP/LRRK2 (aminoácidos Nos. 2025 - 2055). Se escogió este péptido particular porque la homología de las secuencias entre el ratón y el humano es del 100%.

Condiciones del ensayo para la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos generados

- 5 Se separaron un lisado de células HEK293 que sobreexpresan KASPP/LRRK2 recombinante y un lisado de control de las células HEK293 transfectadas con un vector vacío en un gel PAGE (8%). Se aplicó la sonda en una ranura ancha sobre el gel entero. Después de la separación electroforética se transfirieron los lisados separados a membranas de PVDF (procedimiento de transferencia tipo Western). Después de la transferencia, se bloquearon primero las membranas con amortiguador de bloqueo (leche en polvo con un contenido bajo en grasa del 5%, BioRad, en TBS-Tween 20) durante 1 h para evitar la adsorción inespecífica de los anticuerpos a la membrana.
- 10 Posteriormente, se incubaron las transferencias con los sobrenadantes de hibridoma ensayados positivamente durante 3 h (ELISA para analizar la afinidad con el péptido). Se llevó a cabo la incubación en una cámara de detección múltiple (BioRad). La cámara permite la incubación de una transferencia con diferentes anticuerpos primarios. Se retiraron las membranas de las cámaras para el lavado (4 veces durante 5 min en amortiguador TBST). Luego, se llevó a cabo la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (peroxidasa de rábano
- 15 picante) (anti IgG de rata) durante 1 h. Después de la incubación, se lavaron las transferencias con TBST (4 x 10 min). La detección de la reacción del anticuerpo se hizo con la ayuda de quimioluminiscencia (ECL +, GE Healthcare) y exposición de una película (Hyperfilm, GE Healthcare).

Resultado

- 20 Los resultados de las transferencias tipo Western anteriormente descritas se muestran en la Fig. 16. El clon 3G6 (No. 10) y el 4B7 (No. 15) (péptido # 2025) produjeron una señal específica. Una señal era específica si (a) aparecía en la posición del peso molecular correcto (280 kD) y (b) aparecía más fuerte o sólo para el lisado de las células que sobreexpresan KASPP/LRRK2.

Tabla 1

Símbolo del gen	No. de acceso
PKP2	NM_001005242
ALG10	NM_032834
CPNE8	NM_153634
KIF21A	NM_017641
ABCD2	NM_005164
FLJ40126	NM_173599
SLC2A 13	NM_052885
KASPP/LRRK2	
MUC19	AY236870
CNTN1	NM_001843
PDZRN4	NM_013377
LOC283464	BC039145
YAF2	NM_005748
MADP-1	NM_033114

(continuación)

Símbolo del gen	No. de acceso
PPHLN1	NM_201438
PRICKLE 1	NM_153026
ADAMTS20	NM_025003
DKFZp434G1415	NM_031292
IRAK4	NM_016123
PTK9	NM_002822
KASPP/LRRK2	
DKFZp434K2435	NM_032256
NELL2	NM_006159
PLEKHA9	NM_015899
DKFZp451M105	AL832340
FLJ14711	AK027617
FLJ22820	AK026473
SLC38A1	NM_030674
SLC38A2	NM_018976
SLC38A4	NM_018018

Tabla 2

Localización	Hacia adelante	Inversa
D12s2194	F GAGGACTATGATTGCCATGG	R AGGGCATACAAAATGTCCCT
D12s1048	F GGTCTGCTTAGGTCCCTTTT	R AAGGAACCAAGGAGTGGAAG
Dentro del gen 1	F TTCAGATGTTTGGGGCAAGT	R CATGAAGACTGTGAATGGTTTG
Dentro del gen_2	F CCAGACAGAAGTCTGAAGGACA	R_TCCAAAACAGACAAGAGGTTGA
Dentro del gen_3	F ATGAAGCCTTGGCTCTTCAA	R_TCCCAATTCAAAATTTTAGTGC

Tabla 3

Variante	Exón	Familias con PD (n = 55)	PD idiopática (n = 337)	Controles (n = 1200)	Familia
R793M; 2378G>T	19	2	1	1	DE041 T11239
Q930R; 2789A>G	21	1	0	0	DE022
S1096C; 3287C>G	24	1	0	0	famE
L1114L; 3342A>G	24	1	0	0	DE038 T11288
S1228T; 3683G>C	27	1	0	0	DE031
G2019S; 6055G>A	41	0	1	0	Hernandez DG et al. (2005)
I2020T; 6059T>C	41	1	0	0	DE032 T10738

Tabla 4

Familia / Paciente	T11239	DE041 / II-1 // II-2	DE022 / III-5 // III-6 // III-7	Fam. E	T11288 / II-5	DE031 / III-1 // III-2	T10738 / II-2
Mutación	R793M	R793M	Q930R	S1096C	3342A>G	S1228T	I2020T
Edad de inicio (años)	42 tío: 79	55 // 70	68 // 58 // 47		77	49 // 49 papá: 62 abuelita: 68	57 papá: 59
Duración de la enfermedad	~ 25	~ 14 // ~ 10	~ 8 // 19 // 30		~ 4	~ 8 // ~ 12	~ 3
Síntoma inicial	B / RT	PT // RT	B, RT // B // B, RT		B	RT // B, RT	B, RT
Respuesta a la L-dopa	+	+ // +	+ // + // +	+	+	+ // +	+
Bradicinesia	+	+ // +	+ // + // +		+	+ // +	+
Rigidez	+	+ // +	+ // + // +		+	+ // +	+
Tembor en reposo	+	- // +	+ // + // +		-	+ // +	+
Inestabilidad postural	+	+ // +	- // + // +		+	- // -	-
Trastorno del sueño	+	+ // -	+ // + // +		+	- // +	+
Complicaciones a largo plazo	+	+ // +	+ // + // +		-	+ // +	-
Alucinaciones	+	- // -	- // - // +		+	- // -	-

(continuación)

Halazgos adicionales	Distonía de la lengua	-			Demencia, hipersensibilidad a la L-dopa		
Prueba de olfato	2 / 8	nd	nd	nd	7 / 8	5 / 8 // 5 / 8	7 / 8
Electroneurografía	na	nd	nd	nd	na	na // na	Na
Electromiografía	na	nd	nd	nd	na	na // na	Na
Potenciales evocados con imán	na	nd	nd	nd	na	na // na	Na
TCS (r; l)	0,21; 0,24	nd	nd	nd	0,24; 0,19	0,23; 0,24 // 0,22; 0,24	0,16; 0,17
MRI	nd, debido a los electrodos	nd	nd	nd	Atrofia global, microangiopatía	Atrofia ligeramente incrementada en ambos, ligera microangiopatía en III-2	Ligera atrofia mejorada frontotemporalmente

Tabla 5

Familia/Paciente	T11239	T11288/II-5	DE031/III-1//	DE031/III-2	T10738/II-2
Mutación	R793M	3342A>G		S1228T	I2020T
LPS-K/ SPM (IQ)	/90↓	75↓↓ /	111↑/	117↑/	120↑ /
Torre de Londres (PR)	xx	-	6↓↓	27↓	xx
CWIT (Valor T INT)	-	(63)	37	41	41
CERAD 1 (Fluidez Verbal)	-	6	20~	31↑	36↑
CERAD 2 (Prueba Boston)	-	12	14~	15~	14~
CERAD 3 (MMSE)	22	24	30~	30~	29~
CERAD 4 (Memorizar listado de palabras)	-	10	19~	22~	29↑
CERAD 5 (Práctica de Construcción)	-	7	10~	10~	11~
CERAD 6.1 (Recordar listado de palabras)	-	1	7~	7~	10↑
CERAD 7.1 (Reconocimiento de listado de palabras)	-	10	9	10	10
CERAD 8 (Recordar práctica de construcción)	-	2	10~	13↑	12↑
D2-Test (Concentración)	-	-	38	46	46
BDI	23↑	11	3	9	7.5
PDQ-39 (PDSI)	40.4	25.6	8.8	18.6	23.6

SEQ ID NO: 1

ES 2 393 926 T3

M A S G S C Q G C E E D E E T L K K	18
ATG GCT AGT GGC AGC TGT CAG GGG TGC GAA GAG GAC GAG GAA ACT CTG AAG AAG	54
L I V R L N N V Q E G K Q I E T L V	36
TTG ATA GTC AGG CTG AAC AAT GTC CAG GAA GGA AAA CAG ATA GAA ACG CTG GTC	108
Q I L E D L L V F T Y S E R A S K L	54
CAA ATC CTG GAG GAT CTG CTG GTG TTC ACG TAC TCC GAG CGC GCC TCC AAG TTA	162
F Q G K N I H V P L L I V L D S Y M	72
TTT CAA GGC AAA AAT ATC CAT GTG CCT CTG TTG ATC GTC TTG GAC TCC TAT ATG	216
R V A S V Q Q V G W S L L C K L I E	90
AGA GTC GCG AGT GTG CAG CAG GTG GGT TGG TCA CTT CTG TGC AAA TTA ATA GAA	270
V C P G T M Q S L M G P Q D V G N D	108
GTC TGT CCA GGT ACA ATG CAA AGC TTA ATG GGA CCC CAG GAT GTT GGA AAT GAT	324
W E V L G V H Q L I L K M L T V H N	126
TGG GAA GTC CTT GGT GTT CAC CAA TTG ATT CTT AAA ATG CTA ACA GTT CAT AAT	378
A S V N L S V I G L K T L D L L L T	144
GCC AGT GTA AAC TTG TCA GTG ATT GGA CTG AAG ACC TTA GAT CTC CTC CTA ACT	432
S G K I T L L I L D E E S D I F M L	162
TCA GGT AAA ATC ACC TTG CTG ATA TTG GAT GAA GAA AGT GAT ATT TTC ATG TTA	486
I F D A M H S F P A N D E V Q K L G	180
ATT TTT GAT GCC ATG CAC TCA TTT CCA GCC AAT GAT GAA GTC CAG AAA CTT GGA	540
C K A L H V L F E R V S E E Q L T E	198
TGC AAA GCT TTA CAT GTG CTG TTT GAG AGA GTC TCA GAG GAG CAA CTG ACT GAA	594
F V E N K D Y M I L L S A S T N F K	216
TTT GTT GAG AAC AAA GAT TAT ATG ATA TTG TTA AGT GCG TCA ACA AAT TTT AAA	648
D E E E I V L H V L H C L H S L A I	234
GAT GAA GAG GAA ATT GTG CTT CAT GTG CTG CAT TGT TTA CAT TCC CTA GCG ATT	702
P C N N V E V L M S G N V R C Y N I	252
CCT TGC AAT AAT GTG GAA GTC CTC ATG AGT GGC AAT GTC AGG TGT TAT AAT ATT	756
V V E A M K A F P M S E R I Q E V S	270

ES 2 393 926 T3

GTG GTG GAA GCT ATG AAA GCA TTC CCT ATG AGT GAA AGA ATT CAA GAA GTG AGT	810
C C L L H R L T L G N F F N I L V L	288
TGC TGT TTG CTC CAT AGG CTT ACA TTA GGT AAT TTT TTC AAT ATC CTG GTA TTA	864
N E V H E F V V K A V Q Q Y P E N A	306
AAC GAA GTC CAT GAG TTT GTG GTG AAA GCT GTG CAG CAG TAC CCA GAG AAT GCA	918
A L Q I S A L S C L A L L T E T I F	324
GCA TTG CAG ATC TCA GCG CTC AGC TGT TTG GCC CTC CTC ACT GAG ACT ATT TTC	972
L N Q D L E E K N E N Q E N D D E G	342
TTA AAT CAA GAT TTA GAG GAA AAG AAT GAG AAT CAA GAG AAT GAT GAT GAG GGG	1026
E E D K L F W L E A C Y K A L T W H	360
GAA GAA GAT AAA TTG TTT TGG CTG GAA GCC TGT TAC AAA GCA TTA ACG TGG CAT	1080
R K N K H V Q E A A C W A L N N L L	378
AGA AAG AAC AAG CAC GTG CAG GAG GCC GCA TGC TGG GCA CTA AAT AAT CTC CTT	1134
M Y Q N S L H E K I G D E D G H F P	396
ATG TAC CAA AAC AGT TTA CAT GAG AAG ATT GGA GAT GAA GAT GGC CAT TTC CCA	1188
A H R E V M L S M L M H S S S K E V	414
GCT CAT AGG GAA GTG ATG CTC TCC ATG CTG ATG CAT TCT TCA TCA AAG GAA GTT	1242
F Q A S A N A L S T L L E Q N V N F	432
TTC CAG GCA TCT GCG AAT GCA TTG TCA ACT CTC TTA GAA CAA AAT GTT AAT TTC	1296
R K I L L S K G I H L N V L E L M Q	450
AGA AAA ATA CTG TTA TCA AAA GGA ATA CAC CTG AAT GTT TTG GAG TTA ATG CAG	1350
K H I H S P E V A E S G C K M L N H	468
AAG CAT ATA CAT TCT CCT GAA GTG GCT GAA AGT GGC TGT AAA ATG CTA AAT CAT	1404
L F E G S N T S L D I M A A V V P K	486
CTT TTT GAA GGA AGC AAC ACT TCC CTG GAT ATA ATG GCA GCA GTG GTC CCC AAA	1458
I L T V M K R H E T S L P V Q L E A	504
ATA CTA ACA GTT ATG AAA CGT CAT GAG ACA TCA TTA CCA GTG CAG CTG GAG GCG	1512
L R A I L H F I V P G M P E E S R E	522
CTT CGA GCT ATT TTA CAT TTT ATA GTG CCT GGC ATG CCA GAA GAA TCC AGG GAG	1566
D T E F H H K L N M V K K Q C F K N	540
GAT ACA GAA TTT CAT CAT AAG CTA AAT ATG GTT AAA AAA CAG TGT TTC AAG AAT	1620

ES 2 393 926 T3

D	I	H	K	L	V	L	A	A	L	N	R	F	I	G	N	P	G	558
GAT	ATT	CAC	AAA	CTG	GTC	CTA	GCA	GCT	TTG	AAC	AGG	TTC	ATT	GGA	AAT	CCT	GGG	1674
I	Q	K	C	G	L	K	V	I	S	S	I	V	H	F	P	D	A	576
ATT	CAG	AAA	TGT	GGA	TTA	AAA	GTA	ATT	TCT	TCT	ATT	GTA	CAT	TTT	CCT	GAT	GCA	1728
L	E	M	L	S	L	E	G	A	M	D	S	V	L	H	T	L	Q	594
TTA	GAG	ATG	TTA	TCC	CTG	GAA	GGT	GCT	ATG	GAT	TCA	GTG	CTT	CAC	ACA	CTG	CAG	1782
M	Y	P	D	D	Q	E	I	Q	C	L	G	L	S	L	I	G	Y	612
ATG	TAT	CCA	GAT	GAC	CAA	GAA	ATT	CAG	TGT	CTG	GGT	TTA	AGT	CTT	ATA	GGA	TAC	1836
L	I	T	K	K	N	V	F	I	G	T	G	H	L	L	A	K	I	630
TTG	ATT	ACA	AAG	AAG	AAT	GTG	TTC	ATA	GGA	ACT	GGA	CAT	CTG	CTG	GCA	AAA	ATT	1890
L	V	S	S	L	Y	R	F	K	D	V	A	E	I	Q	T	K	G	648
CTG	GTT	TCC	AGC	TTA	TAC	CGA	TTT	AAG	GAT	GTT	GCT	GAA	ATA	CAG	ACT	AAA	GGA	1944
F	Q	T	I	L	A	I	L	K	L	S	A	S	F	S	K	L	L	666
TTT	CAG	ACA	ATC	TTA	GCA	ATC	CTC	AAA	TTG	TCA	GCA	TCT	TTT	TCT	AAG	CTG	CTG	1998
V	H	H	S	F	D	L	V	I	F	H	Q	M	S	S	N	I	M	684
GTG	CAT	CAT	TCA	TTT	GAC	TTA	GTA	ATA	TTC	CAT	CAA	ATG	TCT	TCC	AAT	ATC	ATG	2052
E	Q	K	D	Q	Q	F	L	N	L	C	C	K	C	F	A	K	V	702
GAA	CAA	AAG	GAT	CAA	CAG	TTT	CTA	AAC	CTC	TGT	TGC	AAG	TGT	TTT	GCA	AAA	GTA	2106
A	M	D	D	Y	L	K	N	V	M	L	E	R	A	C	D	Q	N	720
GCT	ATG	GAT	GAT	TAC	TTA	AAA	AAT	GTG	ATG	CTA	GAG	AGA	GCG	TGT	GAT	CAG	AAT	2160
N	S	I	M	V	E	C	L	L	L	L	G	A	D	A	N	Q	A	738
AAC	AGC	ATC	ATG	GTT	GAA	TGC	TTG	CTT	CTA	TTG	GGA	GCA	GAT	GCC	AAT	CAA	GCA	2214
K	E	G	S	S	L	I	C	Q	V	C	E	K	E	S	S	P	K	756
AAG	GAG	GGA	TCT	TCT	TTA	ATT	TGT	CAG	GTA	TGT	GAG	AAA	GAG	AGC	AGT	CCC	AAA	2268
L	V	E	L	L	L	N	S	G	S	R	E	Q	D	V	R	K	A	774
TTG	GTG	GAA	CTC	TTA	CTG	AAT	AGT	GGA	TCT	CGT	GAA	CAA	GAT	GTA	CGA	AAA	GCG	2322
L	T	I	S	I	G	K	G	D	S	Q	I	I	S	L	L	L	R	792
TTG	ACG	ATA	AGC	ATT	GGG	AAA	GGT	GAC	AGC	CAG	ATC	ATC	AGC	TTG	CTC	TTA	AGG	2376
R	L	A	L	D	V	A	N	N	S	I	C	L	G	G	F	C	I	810
AGG	CTG	GCC	CTG	GAT	GTG	GCC	AAC	AAT	AGC	ATT	TGC	CTT	GGA	GGA	TTT	TGT	ATA	2430

G K V E P S W L G P L F P D K T S N	828
GGA AAA GTT GAA CCT TCT TGG CTT GGT CCT TTA TTT CCA GAT AAG ACT TCT AAT	2484
L R K Q T N I A S T L A R M V I R Y	846
TTA AGG AAA CAA ACA AAT ATA GCA TCT ACA CTA GCA AGA ATG GTG ATC AGA TAT	2538
Q M K S A V E E G T A S G S D G N F	864
CAG ATG AAA AGT GCT GTG GAA GAA GGA ACA GCC TCA GGC AGC GAT GGA AAT TTT	2592
S E D V L S K F D E W T F I P D S S	882
TCT GAA GAT GTG CTG TCT AAA TTT GAT GAA TGG ACC TTT ATT CCT GAC TCT TCT	2646
M D S V F A Q S D D L D S E G S E G	900
ATG GAC AGT GTG TTT GCT CAA AGT GAT GAC CTG GAT AGT GAA GGA AGT GAA GGC	2700
S F L V K K K S N S I S V G E F Y R	918
TCA TTT CTT GTG AAA AAG AAA TCT AAT TCA ATT AGT GTA GGA GAA TTT TAC CGA	2754
D A V L Q R C S P N L Q R H S N S L	936
GAT GCC GTA TTA CAG CGT TGC TCA CCA AAT TTG CAA AGA CAT TCC AAT TCC TTG	2808
G P I F D H E D L L K R K R K I L S	954
GGG CCC ATT TTT GAT CAT GAA GAT TTA CTG AAG CGA AAA AGA AAA ATA TTA TCT	2862
S D D S L R S S K L Q S H M R H S D	972
TCA GAT GAT TCA CTC AGG TCA TCA AAA CTT CAA TCC CAT ATG AGG CAT TCA GAC	2916
S I S S L A S E R E Y I T S L D L S	990
AGC ATT TCT TCT CTG GCT TCT GAG AGA GAA TAT ATT ACA TCA CTA GAC CTT TCA	2970
A N E L R D I D A L S Q K C C I S V	1008
GCA AAT GAA CTA AGA GAT ATT GAT GCC CTA AGC CAG AAA TGC TGT ATA AGT GTT	3024
H L E H L E K L E L H Q N A L T S F	1026
CAT TTG GAG CAT CTT GAA AAG CTG GAG CTT CAC CAG AAT GCA CTC ACG AGC TTT	3078
P Q Q L C E T L K S L T H L D L H S	1044
CCA CAA CAG CTA TGT GAA ACT CTG AAG AGT TTG ACA CAT TTG GAC TTG CAC AGT	3132
N K F T S F P S Y L L K M S C I A N	1062
AAT AAA TTT ACA TCA TTT CCT TCT TAT TTG TTG AAA ATG AGT TGT ATT GCT AAT	3186
L D V S R N D I G P S V V L D P T V	1080
CTT GAT GTC TCT CGA AAT GAC ATT GGA CCC TCA GTG GTT TTA GAT CCT ACA GTG	3240
K C P T L K Q F N L S Y N Q L S F V	1098

ES 2 393 926 T3

AAA TGT CCA ACT CTG AAA CAG TTT AAC CTG TCA TAT AAC CAG CTG TCT TTT GTA	3294
P E N L T D V V E K L E Q L I L E G	1116
CCT GAG AAC CTC ACT GAT GTG GTA GAG AAA CTG GAG CAG CTC ATT TTA GAA GGA	3348 /g
	fam. 38
N K I S G I C S P L R L K E L K I L	1134
AAT AAA ATA TCA GGG ATA TGC TCC CCC TTG AGA CTG AAG GAA CTG AAG ATT TTA	3402 Ex25/g
	Fam. 21
N L S K N H I S S L S E N F L E A C	1152
AAC CTT AGT AAG AAC CAC ATT TCA TCC CTA TCA GAG AAC TTT CTT GAG GCT TGT	3456
P K V E S F S A R M N F L A A M P F	1170
CCT AAA GTG GAG AGT TTC AGT GCC AGA ATG AAT TTT CTT GCT GCT ATG CCT TTC	3510
L P P S M T I L K L S Q N K F S C I	1188
TTG CCT CCT TCT ATG ACA ATC CTA AAA TTA TCT CAG AAC AAA TTT TCC TGT ATT	3564
P E A I L N L P H L R S L D M S S N	1206
CCA GAA GCA ATT TTA AAT CTT CCA CAC TTG CGG TCT TTA GAT ATG AGC AGC AAT	3618
D I Q Y L P G P A H W K S L N L R E	1224
GAT ATT CAG TAC CTA CCA GGT CCC GCA CAC TGG AAA TCT TTG AAC TTA AGG GAA	3672
L L F S H N Q I S I L D L S E K A Y	1242
CTC TTA TTT AGC CAT AAT CAG ATC AGC ATC TTG GAC TTG AGT GAA AAA GCA TAT	3726
L W S R V E K L H L S H N K L K E I	1260
TTA TGG TCT AGA GTA GAG AAA CTG CAT CTT TCT CAC AAT AAA CTG AAA GAG ATT	3780
P P E I G C L E N L T S L D V S Y N	1278
CCT CCT GAG ATT GGC TGT CTT GAA AAT CTG ACA TCT CTG GAT GTC AGT TAC AAC	3834
L E L R S F P N E M G K L S K I W D	1296
TTG GAA CTA AGA TCC TTT CCC AAT GAA ATG GGG AAA TTA AGC AAA ATA TGG GAT	3888
L P L D E L H L N F D F K H I G C K	1314
CTT CCT TTG GAT GAA CTG CAT CTT AAC TTT GAT TTT AAA CAT ATA GGA TGT AAA	3942
A K D I I R F L Q Q R L K K A V P Y	1332
GCC AAA GAC ATC ATA AGG TTT CTT CAA CAG CGA TTA AAA AAG GCT GTG CCT TAT	3996
N R M K L M I V G N T G S G K T T L	1350
AAC CGA ATG AAA CTT ATG ATT GTG GGA AAT ACT GGG AGT GGT AAA ACC ACC TTA	4050
L Q Q L M K T K K S D L G M Q S A T	1368
TTG CAG CAA TTA ATG AAA ACC AAG AAA TCA GAT CTT GGA ATG CAA AGT GCC ACA	4104

V G I D V K D W P I Q I R D K R K R	1386
GTT GGC ATA GAT GTG AAA GAC TGG CCT ATC CAA ATA AGA GAC AAA AGA AAG AGA	4158
D L V L N V W D F A G R E E F Y S T	1404
GAT CTC GTC CTA AAT GTG TGG GAT TTT GCA GGT CGT GAG GAA TTC TAT AGT ACT	4212
H P H F M T Q R A L Y L A V Y D L S	1422
CAT CCC CAT TTT ATG ACG CAG CGA GCA TTG TAC CTT GCT GTC TAT GAC CTC AGC	4266
K G Q A E V D A M K P W L F N I K A	1440
AAG GGA CAG GCT GAA GTT GAT GCC ATG AAG CCT TGG CTC TTC AAT ATA AAG GCT	4320
R A S S S P V I L V G T H L D V S D	1458
CGC GCT TCT TCT TCC CCT GTG ATT CTC GTT GGC ACA CAT TTG GAT GTT TCT GAT	4374 Ex31/t
	fam.D
E K Q R K A C M S K I T K E L L N K	1476
GAG AAG CAA CGC AAA GCC TGC ATG AGT AAA ATC ACC AAG GAA CTC CTG AAT AAG	4428
R G F P A I R D Y H F V N A T E E S	1494
CGA GGG TTC CCT GCC ATA CGA GAT TAC CAC TTT GTG AAT GCC ACC GAG GAA TCT	4482
D A L A K L R K T I I N E S L N F K	1512
GAT GCT TTG GCA AAA CTT CGG AAA ACC ATC ATA AAC GAG AGC CTT AAT TTC AAG	4536
I R D Q L V V G Q L I P D C Y V E L	1530
ATC CGA GAT CAG CTT GTT GTT GGA CAG CTG ATT CCA GAC TGC TAT GTA GAA CTT	4590
E K I I L S E R K N V P I E F P V I	1548
GAA AAA ATC ATT TTA TCG GAG CGT AAA AAT GTG CCA ATT GAA TTT CCC GTA ATT	4644
D R K R L L Q L V R E N Q L Q L D E	1566
GAC CGG AAA CGA TTA TTA CAA CTA GTG AGA GAA AAT CAG CTG CAG TTA GAT GAA	4698
N E L P H A V H F L N E S G V L L H	1584
AAT GAG CTT CCT CAC GCA GTT CAC TTT CTA AAT GAA TCA GGA GTC CTT CTT CAT	4752
F Q D P A L Q L S D L Y F V E P K W	1602
TTT CAA GAC CCA GCA CTG CAG TTA AGT GAC TTG TAC TTT GTG GAA CCC AAG TGG	4806
L C K I M A Q I L T V K V E G C P K	1620
CTT TGT AAA ATC ATG GCA CAG ATT TTG ACA GTG AAA GTG GAA GGT TGT CCA AAA	4860
H P K G I I S R R D V E K F L S K K	1638
CAC CCT AAG GGC ATT ATT TCG CGT AGA GAT GTG GAA AAA TTT CTT TCA AAA AAA	4914

ES 2 393 926 T3

R K F P K N Y M S Q Y F K L L E K F	1656
AGG AAA TTT CCA AAG AAC TAC ATG TCA CAG TAT TTT AAG CTC CTA GAA AAA TTC	4968
Q I A L P I G E E Y L L V P S S L S	1674
CAG ATT GCT TTG CCA ATA GGA GAA GAA TAT TTG CTG GTT CCA AGC AGT TTG TCT	5022
D H R P V I E L P H C E N S E I I I	1692
GAC CAC AGG CCT GTG ATA GAG CTT CCC CAT TGT GAG AAC TCT GAA ATT ATC ATC	5076
R L Y E M P X F P M G F W S R L I N	1710 <u>Ex35</u>
CGA CTA TAT GAA ATG CCT TAT TTT CCA ATG GGA TTT TGG TCA AGA TTA ATC AAT	5130 /g
	Fam. A
R L L E I S P Y M L S G R E R A L R	1728
CGA TTA CTT GAG ATT TCA CCT TAC ATG CTT TCA GGG AGA GAA CGA GCA CTT CGC	5184
P N R M Y W R Q G I Y L N W S P E A	1746
CCA AAC AGA ATG TAT TGG CGA CAA GGC ATT TAC TTA AAT TGG TCT CCT GAA GCT	5238
Y C L V G S E V L D N H P E S F L K	1764
TAT TGT CTG GTA GGA TCT GAA GTC TTA GAC AAT CAT CCA GAG AGT TTC TTA AAA	5292
I T V P S C R K G C I L L G Q V V D	1782
ATT ACA GTT CCT TCT TGT AGA AAA GGC TGT ATT CTT TTG GGC CAA GTT GTG GAC	5346
H I D S L M E E W F P G L L E I D I	1800
CAC ATT GAT TCT CTC ATG GAA GAA TGG TTT CCT GGG TTG CTG GAG ATT GAT ATT	5400
C G E G E T L L K K W A L Y S F N D	1818
TGT GGT GAA GGA GAA ACT CTG TTG AAG AAA TGG GCA TTA TAT AGT TTT AAT GAT	5454
G E E H Q K I L L D D L M K K A E E	1836
GGT GAA GAA CAT CAA AAA ATC TTA CTT GAT GAC TTG ATG AAG AAA GCA GAG GAA	5508
G D L L V N P D Q P R L T I P I S Q	1854
GGA GAT CTC TTA GTA AAT CCA GAT CAA CCA AGG CTC ACC ATT CCA ATA TCT CAG	5562
I A P D L I L A D L P R N I M L N N	1872
ATT GCC CCT GAC TTG ATT TTG GCT GAC CTG CCT AGA AAT ATT ATG TTG AAT AAT	5616
D E L E F E Q A P E F L L G D G S F	1890
GAT GAG TTG GAA TTT GAA CAA GCT CCA GAG TTT CTC CTA GGT GAT GGC AGT TTT	5670
G S V Y R A A Y E G E E V A V K I F	1908
GGA TCA GTT TAC CGA GCA GCC TAT GAA GGA GAA GAA GTG GCT GTG AAG ATT TTT	5724
N K H T S L R L L R Q E L V V L C H	1926

ES 2 393 926 T3

AAT AAA CAT ACA TCA CTC AGG CTG TTA AGA CAA GAG CTT GTG GTG CTT TGC CAC	5778
L H H P S L I S L L A A G I R P R M	1944
CTC CAC CAC CCC AGT TTG ATA TCT TTG CTG GCA GCT GGG ATT CGT CCC CGG ATG	5832
L V M E L A S K G S L D R L L Q Q D	1962
TTG GTG ATG GAG TTA GCC TCC AAG GGT TCC TTG GAT CGC CTG CTT CAG CAG GAC	5886
K A S L T R T L Q H R I A L H V A D	1980
AAA GCC AGC CTC ACT AGA ACC CTA CAG CAC AGG ATT GCA CTC CAC GTA GCT GAT	5940
G L R Y L H S A M I I Y R D L K P H	1998
GGT TTG AGA TAC CTC CAC TCA GCC ATG ATT ATA TAC CGA GAC CTG AAA CCC CAC	5994
N V L L F T L Y P N A A I I A K I A	2016
AAT GTG CTG CTT TTC ACA CTG TAT CCC AAT GCT GCC ATC ATT GCA AAG ATT GCT	6048
D Y G EE A Q Y C C R M G I K T S E G	2034 Ex41
GAC TAC GGC ATT GCT CAG TAC TGC TGT AGA ATG GGG ATA AAA ACA TCA GAG GGC	6102 /c
	fam.32
T P G F R A P E V A R G N V I Y N Q	2052
ACA CCA GGG TTT CGT GCA CCT GAA GTT GCC AGA GGA AAT GTC ATT TAT AAC CAA	6156
Q A D V Y S F G L L L Y D I L T T G	2070
CAG GCT GAT GTT TAT TCA TTT GGT TTA CTA CTC TAT GAC ATT TTG ACA ACT GGA	6210
G R I V E G L K F P N E F D E L E I	2088
GGT AGA ATA GTA GAG GGT TTG AAG TTT CCA AAT GAG TTT GAT GAA TTA GAA ATA	6264
Q G K L P D P V K E Y G C A P W P M	2106
CAA GGA AAA TTA CCT GAT CCA GTT AAA GAA TAT GGT TGT GCC CCA TGG CCT ATG	6318
V E K L I K Q C L K E N P Q E R P T	2124
GTT GAG AAA TTA ATT AAA CAG TGT TTG AAA GAA AAT CCT CAA GAA AGG CCT ACT	6372
S A Q V F D I L N S A E L V C L T R	2142
TCT GCC CAG GTC TTT GAC ATT TTG AAT TCA GCT GAA TTA GTC TGT CTG ACG AGA	6426
R I L L P K N V I V E C M V A T H H	2160
CGC ATT TTA TTA CCT AAA AAC GTA ATT GTT GAA TGC ATG GTT GCT ACA CAT CAC	6480
N S R N A S I W L G C G H T D R G Q	2178
AAC AGC AGG AAT GCA AGC ATT TGG CTG GGC TGT GGG CAC ACC GAC AGA GGA CAG	6534
L S F L D L N T E G Y T S E E V A D	2196
CTC TCA TTT CTT GAC TTA AAT ACT GAA GGA TAC ACT TCT GAG GAA GTT GCT GAT	6588

ES 2 393 926 T3

S R I L C L A L V H L P V E K E S W	2214
AGT AGA ATA TTG TGC TTA GCC TTG GTG CAT CTT CCT GTT GAA AAG GAA AGC TGG	6642
I V S G T Q S G T L L V I N T E D G	2232
ATT GTG TCT GGG ACA CAG TCT GGT ACT CTC CTG GTC ATC AAT ACC GAA GAT GGG	6696
K K R H T L E K M T D S V T C L Y C	2250
AAA AAG AGA CAT ACC CTA GAA AAG ATG ACT GAT TCT GTC ACT TGT TTG TAT TGC	6750
N S F S K Q S K Q K N F L L V G T A	2268
AAT TCC TTT TCC AAG CAA AGC AAA CAA AAA AAT TTT CTT TTG GTT GGA ACC GCT	6804
D G K L A I F E D K T V K L K G A A	2286
GAT GGC AAG TTA GCA ATT TTT GAA GAT AAG ACT GTT AAG CTT AAA GGA GCT GCT	6858
P L K I L N I G N V S T P L M C L S	2304
CCT TTG AAG ATA CTA AAT ATA GGA AAT GTC AGT ACT CCA TTG ATG TGT TTG AGT	6912
E S T N S T E R N V M W G G C G T K	2322
GAA TCC ACA AAT TCA ACG GAA AGA AAT GTA ATG TGG GGA GGA TGT GGC ACA AAG	6966
I F S F S N D F T I Q K L I E T R T	2340
ATT TTC TCC TTT TCT AAT GAT TTC ACC ATT CAG AAA CTC ATT GAG ACA AGA ACA	7020
S Q L F S Y A A F S D S N I I T V V	2358
AGC CAA CTG TTT TCT TAT GCA GCT TTC AGT GAT TCC AAC ATC ATA ACA GTG GTG	7074
V D T A L Y I A K Q N S P V V E V W	2376
GTA GAC ACT GCT CTC TAT ATT GCT AAG CAA AAT AGC CCT GTT GTG GAA GTG TGG	7128
D K K T E K L C G L I D C V H F L R	2394
GAT AAG AAA ACT GAA AAA CTC TGT GGA CTA ATA GAC TGC GTG CAC TTT TTA AGG	7182
E V M V K E N K E S K H K M S Y S G	2412
GAG GTA ATG GTA AAA GAA AAC AAG GAA TCA AAA CAC AAA ATG TCT TAT TCT GGG	7236
R V K T L C L Q K N T A L W I G T G	2430
AGA GTG AAA ACC CTC TGC CTT CAG AAG AAC ACT GCT CTT TGG ATA GGA ACT GGA	7290
G G H I L L L D L S T R R L I R V I	2448
GGA GGC CAT ATT TTA CTC CTG GAT CTT TCA ACT CGT CGA CTT ATA CGT GTA ATT	7344
Y N F C N S V R V M M T A Q L G S L	2466
TAC AAC TTT TGT AAT TCG GTC AGA GTC ATG ATG ACA GCA CAG CTA GGA AGC CTT	7398

K N V M L V L G Y N R K N T E G T Q	2484
AAA AAT GTC ATG CTG GTA TTG GGC TAC AAC CGG AAA AAT ACT GAA GGT ACA CAA	7452
K Q K E I Q S C L T V W D I N L P H	2502
AAG CAG AAA GAG ATA CAA TCT TGC TTG ACC GTT TGG GAC ATC AAT CTT CCA CAT	7506
E V Q N L E K H I E V R K E L A E K	2520
GAA GTG CAA AAT TTA GAA AAA CAC ATT GAA GTG AGA AAA GAA TTA GCT GAA AAA	7560
M R R T S V E *	2528
ATG AGA CGA ACA TCT GTT GAG TAA gagagaaataggaattgtcctttggataggaaaattattc	7623
tctcctcttgtaaataattttattttaaaaaatgttcacatggaaagggtactcacattttttgaaatagctcgt	7695
gtgtatgaaggaatgttatttttttaatttaaatatgtaaaaatacttaccagtaaatgtgtatttttaa	7767
agaactattttaaaacacaatgttatatttcttataaaataccagttactttcggttcattaattaatgaaaata	7839
aatctgtgaagtacctaattttaagtactcatactaaaattttataaggccgataattttttgttttcttgtct	7911
gtaatggaggtaaacttttatttttaattctgtgcttaagacaggactattgcttgctgatttttctagaat	7983
ctgcacggtataatgaaaatattaagacagtttcccatgtaatgtattccttcttagattgcatcgaaatgc	8055
actatcatatatgcttgtaaataattcaaataaatttgactaataaagtcctttgttggtatgtgaattctc	8127
tttggtgctgttgcaaacagtgcatcttacacaacttcactcaattcaaaagaaaactccattaaaagtact	8199
aatgaaaaaacatgacatactgtcaaagtcctcatatctaggaaagacacagaaactctctttgtcacagaa	8271
actctctgtgtcttttcttagacataatagagttgtttttcaactctatgtttgaatgtggataccctgaatt	8343
ttgtataattagtgtaaatacagtggttcagtccttcaagtgatattttttatttttttattcataccactagc	8415
tacttgtttttctaattctgcttcattctaattgcttatattcatctttccctaaatttgatgatgctgcagatc	8487
ctacatcattcagatagaaaccttttttttttcagaattatagaattccacagctcctaccaagaccatga	8559
ggataaatatctaactttttcagttgctgaaggagaaaggagcttttagttatgatggataaaaaatatctgc	8631
caccctaggcttccaaattatacttaaatgtttacatagcttaccacaataggagtatcaggggccaaatac	8703
ctatgtaataatttgaggtcatttctgctttaggaaaagtactttcggtaaattctttggccctgaccagta	8775
ttcattatttcagataattccctgtgataggacaactagtagacatttaattctcagaacttatggcatttt	8847

ES 2 393 926 T3

actatgtgaaaacttttaaattttatttatattaagggtaatcaaattcttaaagatgaaagattttctgtatt 8919
ttaaaggaagctatgctttaacttggtatgtaattaacaaaaaatcatatataatagagctctttgttcca 8991
gtgttatctctttcattggtactttgtatttgcaatttttttaccaaagacaaattaaaaaatgaatacc 9063
atatttaaattggaataataaagggttttttaaaaactttaaa 9104

SEQ ID NO: 2

M A S G S C Q G C E E D E E T L K K	18
ATG GCT AGT GGC AGC TGT CAG GGG TGC GAA GAG GAC GAG GAA ACT CTG AAG AAG	54
L I V R L N N V Q E G K Q I E T L V	36
TTG ATA GTC AGG CTG AAC AAT GTC CAG GAA GGA AAA CAG ATA GAA ACG CTG GTC	108
Q I L E D L L V F T Y S E H A S K L	54
CAA ATC CTG GAG GAT CTG CTG GTG TTC ACG TAC TCC GAG CAC GCC TCC AAG TTA	162
F Q G K N I H V P L L I V L D S Y M	72
TTT CAA GGC AAA AAT ATC CAT GTG CCT CTG TTG ATC GTC TTG GAC TCC TAT ATG	216
R V A S V Q Q V G W S L L C K L I E	90
AGA GTC GCG AGT GTG CAG CAG GTG GGT TGG TCA CTT CTG TGC AAA TTA ATA GAA	270
V C P G T M Q S L M G P Q D V G N D	108
GTC TGT CCA GGT ACA ATG CAA AGC TTA ATG GGA CCC CAG GAT GTT GGA AAT GAT	324
W E V L G V H Q L I L K M L T V H N	126
TGG GAA GTC CTT GGT GTT CAC CAA TTG ATT CTT AAA ATG CTA ACA GTT CAT AAT	378
A S V N L S V I G L K T L D L L L T	144
GCC AGT GTA AAC TTG TCA GTG ATT GGA CTG AAG ACC TTA GAT CTC CTC CTA ACT	432
S G K I T L L I L D E E S D I F M L	162
TCA GGT AAA ATC ACC TTG CTG ATA CTG GAT GAA GAA AGT GAT ATT TTC ATG TTA	486
I F D A M H S F P A N D E V Q K L G	180
ATT TTT GAT GCC ATG CAC TCA TTT CCA GCC AAT GAT GAA GTC CAG AAA CTT GGA	540
C K A L H V L F E R V S E E Q L T E	198
TGC AAA GCT TTA CAT GTG CTG TTT GAG AGA GTC TCA GAG GAG CAA CTG ACT GAA	594
F V E N K D Y M I L L S A S T N F K	216
TTT GTT GAG AAC AAA GAT TAT ATG ATA TTG TTA AGT GCG TCA ACA AAT TTT AAA	648
D E E E I V L H V L H C L H S L A I	234
GAT GAA GAG GAA ATT GTG CTT CAT GTG CTG CAT TGT TTA CAT TCC CTA GCG ATT	702
P C N N V E V L M S G N V R C Y N I	252
CCT TGC AAT AAT GTG GAA GTC CTC ATG AGT GGC AAT GTC AGG TGT TAT AAT ATT	756

ES 2 393 926 T3

V V E A M K A F P M S E R I Q E V S	270
GTG GTG GAA GCT ATG AAA GCA TTC CCT ATG AGT GAA AGA ATT CAA GAA GTG AGT	810
C C L L H R L T L G N F F N I L V L	288
TGC TGT TTG CTC CAT AGG CTT ACA TTA GGT AAT TTT TTC AAT ATC CTG GTA TTA	864
N E V H E F V V K A V Q Q Y P E N A	306
AAC GAA GTC CAT GAG TTT GTG GTG AAA GCT GTG CAG CAG TAC CCA GAG AAT GCA	918
A L Q I S A L S C L A L L T E T I F	324
GCA TTG CAG ATC TCA GCG CTC AGC TGT TTG GCC CTC CTC ACT GAG ACT ATT TTC	972
L N Q D L E E K N E N Q E N D D E G	342
TTA AAT CAA GAT TTA GAG GAA AAG AAT GAG AAT CAA GAG AAT GAT GAT GAG GGG	1026
E E D K L F W L E A C Y K A L T W H	360
GAA GAA GAT AAA TTG TTT TGG CTG GAA GCC TGT TAC AAA GCA TTA ACG TGG CAT	1080
R K N K H V Q E A A C W A L N N L L	378
AGA AAG AAC AAG CAC GTG CAG GAG GCC GCA TGC TGG GCA CTA AAT AAT CTC CTT	1134
M Y Q N S L H E K I G D E D G H F P	396
ATG TAC CAA AAC AGT TTA CAT GAG AAG ATT GGA GAT GAA GAT GGC CAT TTC CCA	1188
A H R E V M L S M L M H S S S K E V	414
GCT CAT AGG GAA GTG ATG CTC TCC ATG CTG ATG CAT TCT TCA TCA AAG GAA GTT	1242
F Q A S A N A L S T L L E Q N V N F	432
TTC CAG GCA TCT GCG AAT GCA TTG TCA ACT CTC TTA GAA CAA AAT GTT AAT TTC	1296
R K I L L S K G I H L N V L E L M Q	450
AGA AAA ATA CTG TTA TCA AAA GGA ATA CAC CTG AAT GTT TTG GAG TTA ATG CAG	1350
K H I H S P E V A E S G C K M L N H	468
AAG CAT ATA CAT TCT CCT GAA GTG GCT GAA AGT GGC TGT AAA ATG CTA AAT CAT	1404
L F E G S N T S L D I M A A V V P K	486
CTT TTT GAA GGA AGC AAC ACT TCC CTG GAT ATA ATG GCA GCA GTG GTC CCC AAA	1458
I L T V M K R H E T S L P V Q L E A	504
ATA CTA ACA GTT ATG AAA CGT CAT GAG ACA TCA TTA CCA GTG CAG CTG GAG GCG	1512
L R A I L H F I V P G M P E E S R E	522
CTT CGA GCT ATT TTA CAT TTT ATA GTG CCT GGC ATG CCA GAA GAA TCC AGG GAG	1566

ES 2 393 926 T3

D T E F H H K L N M V K K Q C F K N	540
GAT ACA GAA TTT CAT CAT AAG CTA AAT ATG GTT AAA AAA CAG TGT TTC AAG AAT	1620
D I H K L V L A A L N R F I G N P G	558
GAT ATT CAC AAA CTG GTC CTA GCA GCT TTG AAC AGG TTC ATT GGA AAT CCT GGG	1674
I Q K C G L K V I S S I V H F P D A	576
ATT CAG AAA TGT GGA TTA AAA GTA ATT TCT TCT ATT GTA CAT TTT CCT GAT GCA	1728
L E M L S L E G A M D S V L H T L Q	594
TTA GAG ATG TTA TCC CTG GAA GGT GCT ATG GAT TCA GTG CTT CAC ACA CTG CAG	1782
M Y P D D Q E I Q C L G L S L I G Y	612
ATG TAT CCA GAT GAC CAA GAA ATT CAG TGT CTG GGT TTA AGT CTT ATA GGA TAC	1836
L I T K K N V F I G T G H L L A K I	630
TTG ATT ACA AAG AAG AAT GTG TTC ATA GGA ACT GGA CAT CTG CTG GCA AAA ATT	1890
L V S S L Y R F K D V A E I Q T K G	648
CTG GTT TCC AGC TTA TAC CGA TTT AAG GAT GTT GCT GAA ATA CAG ACT AAA GGA	1944
F Q T I L A I L K L S A S F S K L L	666
TTT CAG ACA ATC TTA GCA ATC CTC AAA TTG TCA GCA TCT TTT TCT AAG CTG CTG	1998
V H H S F D L V I F H Q M S S N I M	684
GTG CAT CAT TCA TTT GAC TTA GTA ATA TTC CAT CAA ATG TCT TCC AAT ATC ATG	2052
E Q K D Q Q F L N L C C K C F A K V	702
GAA CAA AAG GAT CAA CAG TTT CTA AAC CTC TGT TGC AAG TGT TTT GCA AAA GTA	2106
A M D D Y L K N V M L E R A C D Q N	720
GCT ATG GAT GAT TAC TTA AAA AAT GTG ATG CTA GAG AGA GCG TGT GAT CAG AAT	2160
N S I M V E C L L L L G A D A N Q A	738
AAC AGC ATC ATG GTT GAA TGC TTG CTT CTA TTG GGA GCA GAT GCC AAT CAA GCA	2214
K E G S S L I C Q V C E K E S S P K	756
AAG GAG GGA TCT TCT TTA ATT TGT CAG GTA TGT GAG AAA GAG AGC AGT CCC AAA	2268
L V E L L L N S G S R E Q D V R K A	774
TTG GTG GAA CTC TTA CTG AAT AGT GGA TCT CGT GAA CAA GAT GTA CGA AAA GCG	2322
L T I S I G K G D S Q I I S L L L R	792
TTG ACG ATA AGC ATT GGG AAA GGT GAC AGC CAG ATC ATC AGC TTG CTC TTA AGG	2376
R L A L D V A N N S I C L G G F C I	810 DE041

ES 2 393 926 T3

AGG CTG GCC CTG GAT GTG GCC AAC AAT AGC ATT TGC CTT GGA GGA TTT TGT ATA	2430 T11239
G K V E P S W L G P L F P D K T S N	828
GGA AAA GTT GAA CCT TCT TGG CTT GGT CCT TTA TTT CCA GAT AAG ACT TCT AAT	2484
L R K Q T N I A S T L A R M V I R Y	846
TTA AGG AAA CAA ACA AAT ATA GCA TCT ACA CTA GCA AGA ATG GTG ATC AGA TAT	2538
Q M K S A V E E G T A S G S D G N F	864
CAG ATG AAA AGT GCT GTG GAA GAA GGA ACA GCC TCA GGC AGC GAT GGA AAT TTT	2592
S E D V L S K F D E W T F I P D S S	882
TCT GAA GAT GTG CTG TCT AAA TTT GAT GAA TGG ACC TTT ATT CCT GAC TCT TCT	2646
M D S V F A Q S D D L D S E G S E G	900
ATG GAC AGT GTG TTT GCT CAA AGT GAT GAC CTG GAT AGT GAA GGA AGT GAA GGC	2700
S F L V K K K S N S I S V G E F Y R	918
TCA TTT CTT GTG AAA AAG AAA TCT AAT TCA ATT AGT GTA GGA GAA TTT TAC CGA	2754
D A V L Q R C S P N L Q R H S N S L	936 DE022
GAT GCC GTA TTA CAG CGT TGC TCA CCA AAT TTG CAA AGA CAT TCC AAT TCC TTG	2808
G P I F D H E D L L K R K R K I L S	954
GGG CCC ATT TTT GAT CAT GAA GAT TTA CTG AAG CGA AAA AGA AAA ATA CTA TCT	2862
S D D S L R S S K L Q S H M R H S D	972
TCA GAT GAT TCA CTC AGG TCA TCA AAA CTT CAA TCC CAT ATG AGG CAT TCA GAC	2916
S I S S L A S E R E Y I T S L D L S	990
AGC ATT TCT TCT CTG GCT TCT GAG AGA GAA TAT ATT ACA TCA CTA GAC CTT TCA	2970
A N E L R D I D A L S Q K C C I S V	1008
GCA AAT GAA CTA AGA GAT ATT GAT GCC CTA AGC CAG AAA TGC TGT ATA AGT GTT	3024
H L E H L E K L E L H Q N A L T S F	1026
CAT TTG GAG CAT CTT GAA AAG CTG GAG CTT CAC CAG AAT GCA CTC ACG AGC TTT	3078
P Q Q L C E T L K S L T H L D L H S	1044
CCA CAA CAG CTA TGT GAA ACT CTG AAG AGT TTG ACA CAT TTG GAC TTG CAC AGT	3132
N K F T S F P S Y L L K M S C I A N	1062
AAT AAA TTT ACA TCA TTT CCT TCT TAT TTG TTG AAA ATG AGT TGT ATT GCT AAT	3186
L D V S R N D I G P S V V L D P T V	1080
CTT GAT GTC TCT CGA AAT GAC ATT GGA CCC TCA GTG GTT TTA GAT CCT ACA GTG	3240

ES 2 393 926 T3

K C P T L K Q F N L S Y N Q L S F V	1098	famE
AAA TGT CCA ACT CTG AAA CAG TTT AAC CTG TCA TAT AAC CAG CTG TCT TTT GTA	3294	
		DE038
P E N L T D V V E K L E Q L I L E G	1116	T11288
CCT GAG AAC CTC ACT GAT GTG GTA GAG AAA CTG GAG CAG CTC ATT TTA GAA GGA	3348	/g
		Fam38
N K I S G I C S P L R L K E L K I L	1134	
AAT AAA ATA TCA GGG ATA TGC TCC CCC TTG AGA CTG AAG GAA CTG AAG ATT TTA	3402	Ex25/g
		Fam21
N L S K N H I S S L S E N F L E A C	1152	
AAC CTT AGT AAG AAC CAC ATT TCA TCC CTA TCA GAG AAC TTT CTT GAG GCT TGT	3456	
P K V E S F S A R M N F L A A M P F	1170	
CCT AAA GTG GAG AGT TTC AGT GCC AGA ATG AAT TTT CTT GCT GCT ATG CCT TTC	3510	
L P P S M T I L K L S Q N K F S C I	1188	
TTG CCT CCT TCT ATG ACA ATC CTA AAA TTA TCT CAG AAC AAA TTT TCC TGT ATT	3564	
P E A I L N L P H L R S L D M S S N	1206	
CCA GAA GCA ATT TTA AAT CTT CCA CAC TTG CGG TCT TTA GAT ATG AGC AGC AAT	3618	
D I Q Y L P G P A H W K S L N L R E	1224	
GAT ATT CAG TAC CTA CCA GGT CCC GCA CAC TGG AAA TCT TTG AAC TTA AGG GAA	3672	
L L F S H N Q I S I L D L S E K A Y	1242	DE031
CTC TTA TTT AGC CAT AAT CAG ATC AGC ATC TTG GAC TTG AGT GAA AAA GCA TAT	3726	
L W S R V E K L H L S H N K L K E I	1260	
TTA TGG TCT AGA GTA GAG AAA CTG CAT CTT TCT CAC AAT AAA CTG AAA GAG ATT	3780	
P P E I G C L E N L T S L D V S Y N	1278	
CCT CCT GAG ATT GGC TGT CTT GAA AAT CTG ACA TCT CTG GAT GTC AGT TAC AAC	3834	
L E L R S F P N E M G K L S K I W D	1296	
TTG GAA CTA AGA TCC TTT CCC AAT GAA ATG GGG AAA TTA AGC AAA ATA TGG GAT	3888	
L P L D E L H L N F D F K H I G C K	1314	
CTT CCT TTG GAT GAA CTG CAT CTT AAC TTT GAT TTT AAA CAT ATA GGA TGT AAA	3942	
A K D I I R F L Q Q R L K K A V P Y	1332	
GCC AAA GAC ATC ATA AGG TTT CTT CAA CAG CGA TTA AAA AAG GCT GTG CCT TAT	3996	
N R M K L M I V G N T G S G K T T L	1350	
AAC CGA ATG AAA CTT ATG ATT GTG GGA AAT ACT GGG AGT GGT AAA ACC ACC TTA	4050	

ES 2 393 926 T3

L Q Q L M K T K K S D L G M Q S A T	1368	
TTG CAG CAA TTA ATG AAA ACC AAG AAA TCA GAT CTT GGA ATG CAA AGT GCC ACA	4104	
V G I D V K D W P I Q I R D K R K R	1386	
GTT GGC ATA GAT GTG AAA GAC TGG CCT ATC CAA ATA AGA GAC AAA AGA AAG AGA	4158	
D L V L N V W D F A G R E E F Y S T	1404	
GAT CTC GTC CTA AAT GTG TGG GAT TTT GCA GGT CGT GAG GAA TTC TAT AGT ACT	4212	
H P H F M T Q R A L Y L A V Y D L S	1422	
CAT CCC CAT TTT ATG ACG CAG CGA GCA TTG TAC CTT GCT GTC TAT GAC CTC AGC	4266	
K G Q A E V D A M K P W L F N I K A	1440	
AAG GGA CAG GCT GAA GTT GAT GCC ATG AAG CCT TGG CTC TTC AAT ATA AAG GCT	4320	
R A S S S P V I L V G T H L D V S D	1458	
CGC GCT TCT TCT TCC CCT GTG ATT CTC GTT GGC ACA CAT TTG GAT GTT TCT GAT	4374	Ex31/t
		famD
E K Q R K A C M S K I T K E L L N K	1476	
GAG AAG CAA CGC AAA GCC TGC ATG AGT AAA ATC ACC AAG GAA CTC CTG AAT AAG	4428	
R G F P A I R D Y H F V N A T E E S	1494	
CGA GGG TTC CCT GCC ATA CGA GAT TAC CAC TTT GTG AAT GCC ACC GAG GAA TCT	4482	
D A L A K L R K T I I N E S L N F K	1512	
GAT GCT TTG GCA AAA CTT CGG AAA ACC ATC ATA AAC GAG AGC CTT AAT TTC AAG	4536	
I R D Q L V V G Q L I P D C Y V E L	1530	
ATC CGA GAT CAG CTT GTT GTT GGA CAG CTG ATT CCA GAC TGC TAT GTA GAA CTT	4590	
E K I I L S E R K N V P I E F P V I	1548	
GAA AAA ATC ATT TTA TCG GAG CGT AAA AAT GTG CCA ATT GAA TTT CCC GTA ATT	4644	
D R K R L L Q L V R E N Q L Q L D E	1566	
GAC CGG AAA CGA TTA TTA CAA CTA GTG AGA GAA AAT CAG CTG CAG TTA GAT GAA	4698	
N E L P H A V H F L N E S G V L L H	1584	
AAT GAG CTT CCT CAC GCA GTT CAC TTT CTA AAT GAA TCA GGA GTC CTT CTT CAT	4752	
F Q D P A L Q L S D L Y F V E P K W	1602	
TTT CAA GAC CCA GCA CTG CAG TTA AGT GAC TTG TAC TTT GTG GAA CCC AAG TGG	4806	
L C K I M A Q I L T V K V E G C P K	1620	
CTT TGT AAA ATC ATG GCA CAG ATT TTG ACA GTG AAA GTG GAA GGT TGT CCA AAA	4860	
H P K G I I S R R D V E K F L S K K	1638	

ES 2 393 926 T3

CAC CCT AAG GGC ATT ATT TCG CGT AGA GAT GTG GAA AAA TTT CTT TCA AAA AAA	4914	
R K F P K N Y M S Q Y F K L L E K F	1656	
AGG AAA TTT CCA AAG AAC TAC ATG TCA CAG TAT TTT AAG CTC CTA GAA AAA TTC	4968	
Q I A L P I G E E Y L L V P S S L S	1674	
CAG ATT GCT TTG CCA ATA GGA GAA GAA TAT TTG CTG GTT CCA AGC AGT TTG TCT	5022	
D H R P V I E L P H C E N S E I I I	1692	
GAC CAC AGG CCT GTG ATA GAG CTT CCC CAT TGT GAG AAC TCT GAA ATT ATC ATC	5076	
R L Y E M P Y F P M G F W S R L I N	1710	Ex35/g
CGA CTA TAT GAA ATG CCT TAT TTT CCA ATG GGA TTT TGG TCA AGA TTA ATC AAT	5130	famA
R L L E I S P Y M L S G R E R A L R	1728	
CGA TTA CTT GAG ATT TCA CCT TAC ATG CTT TCA GGG AGA GAA CGA GCA CTT CGC	5184	
P N R M Y W R Q G I Y L N W S P E A	1746	
CCA AAC AGA ATG TAT TGG CGA CAA GGC ATT TAC TTA AAT TGG TCT CCT GAA GCT	5238	
Y C L V G S E V L D N H P E S F L K	1764	
TAT TGT CTG GTA GGA TCT GAA GTC TTA GAC AAT CAT CCA GAG AGT TTC TTA AAA	5292	
I T V P S C R K G C I L L G Q V V D	1782	
ATT ACA GTT CCT TCT TGT AGA AAA GGC TGT ATT CTT TTG GGC CAA GTT GTG GAC	5346	
H I D S L M E E W F P G L L E I D I	1800	
CAC ATT GAT TCT CTC ATG GAA GAA TGG TTT CCT GGG TTG CTG GAG ATT GAT ATT	5400	
C G E G E T L L K K W A L Y S F N D	1818	
TGT GGT GAA GGA GAA ACT CTG TTG AAG AAA TGG GCA TTA TAT AGT TTT AAT GAT	5454	
G E E H Q K I L L D D L M K K A E E	1836	
GGC GAA GAA CAT CAA AAA ATC TTA CTT GAT GAC TTG ATG AAG AAA GCA GAG GAA	5508	
G D L L V N P D Q P R L T I P I S Q	1854	
GGA GAT CTC TTA GTA AAT CCA GAT CAA CCA AGG CTC ACC ATT CCA ATA TCT CAG	5562	
I A P D L I L A D L P R N I M L N N	1872	
ATT GCC CCT GAC TTG ATT TTG GCT GAC CTG CCT AGA AAT ATT ATG TTG AAT AAT	5616	
D E L E F E Q A P E F L L G D G S F	1890	
GAT GAG TTG GAA TTT GAA CAA GCT CCA GAG TTT CTC CTA GGT GAT GGC AGT TTT	5670	
G S V Y R A A Y E G E E V A V K I F	1908	
GGA TCA GTT TAC CGA GCA GCC TAT GAA GGA GAA GAA GTG GCT GTG AAG ATT TTT	5724	

ES 2 393 926 T3

N	K	H	T	S	L	R	L	L	R	Q	E	L	V	V	L	C	H	1926
AAT	AAA	CAT	ACA	TCA	CTC	AGG	CTG	TTA	AGA	CAA	GAG	CTT	GTG	GTG	CTT	TGC	CAC	5778
L	H	H	P	S	L	I	S	L	L	A	A	G	I	R	P	R	M	1944
CTC	CAC	CAC	CCC	AGT	TTG	ATA	TCT	TTG	CTG	GCA	GCT	GGG	ATT	CGT	CCC	CGG	ATG	5832
L	V	M	E	L	A	S	K	G	S	L	D	R	L	L	Q	Q	D	1962
TTG	GTG	ATG	GAG	TTA	GCC	TCC	AAG	GGT	TCC	TTG	GAT	CGC	CTG	CTT	CAG	CAG	GAC	5886
K	A	S	L	T	R	T	L	Q	H	R	I	A	L	H	V	A	D	1980
AAA	GCC	AGC	CTC	ACT	AGA	ACC	CTA	CAG	CAC	AGG	ATT	GCA	CTC	CAC	GTA	GCT	GAT	5940
G	L	R	Y	L	H	S	A	M	I	I	Y	R	D	L	K	P	H	1998
GGT	TTG	AGA	TAC	CTC	CAC	TCA	GCC	ATG	ATT	ATA	TAC	CGA	GAC	CTG	AAA	CCC	CAC	5994
N	V	L	L	F	T	L	Y	P	N	A	A	I	I	A	K	I	A	2016
AAT	GTG	CTG	CTT	TTC	ACA	CTG	TAT	CCC	AAT	GCT	GCC	ATC	ATT	GCA	AAG	ATT	GCT	6048
																		DE032
D	Y	G	I	A	Q	Y	C	C	R	M	G	I	K	T	S	E	G	2034
GAC	TAC	GGC	ATT	GCT	CAG	TAC	TGC	TGT	AGA	ATG	GGG	ATA	AAA	ACA	TCA	GAG	GGC	T10738
																		Ex41/c
																		fam32
T	P	G	F	R	A	P	E	V	A	R	G	N	V	I	Y	N	Q	2052
ACA	CCA	GGG	TTT	CGT	GCA	CCT	GAA	GTT	GCC	AGA	GGA	AAT	GTC	ATT	TAT	AAC	CAA	6156
Q	A	D	V	Y	S	F	G	L	L	L	Y	D	I	L	T	T	G	2070
CAG	GCT	GAT	GTT	TAT	TCA	TTT	GGT	TTA	CTA	CTC	TAT	GAC	ATT	TTG	ACA	ACT	GGA	6210
G	R	I	V	E	G	L	K	F	P	N	E	F	D	E	L	E	I	2088
GGT	AGA	ATA	GTA	GAG	GGT	TTG	AAG	TTT	CCA	AAT	GAG	TTT	GAT	GAA	TTA	GAA	ATA	6264
Q	G	K	L	P	D	P	V	K	E	Y	G	C	A	P	W	P	M	2106
CAA	GGA	AAA	TTA	CCT	GAT	CCA	GTT	AAA	GAA	TAT	GGT	TGT	GCC	CCA	TGG	CCT	ATG	6318
V	E	K	L	I	K	Q	C	L	K	E	N	P	Q	E	R	P	T	2124
GTT	GAG	AAA	TTA	ATT	AAA	CAG	TGT	TTG	AAA	GAA	AAT	CCT	CAA	GAA	AGG	CCT	ACT	6372
S	A	Q	V	F	D	I	L	N	S	A	E	L	V	C	L	T	R	2142
TCT	GCC	CAG	GTC	TTT	GAC	ATT	TTG	AAT	TCA	GCT	GAA	TTA	GTC	TGT	CTG	ACG	AGA	6426
R	I	L	L	P	K	N	V	I	V	E	C	M	V	A	T	H	H	2160
CGC	ATT	TTA	TTA	CCT	AAA	AAC	GTA	ATT	GTT	GAA	TGC	ATG	GTT	GCT	ACA	CAT	CAC	6480
N	S	R	N	A	S	I	W	L	G	C	G	H	T	D	R	G	Q	2178
AAC	AGC	AGG	AAT	GCA	AGC	ATT	TGG	CTG	GGC	TGT	GGG	CAC	ACC	GAC	AGA	GGA	CAG	6534

ES 2 393 926 T3

L S F L D L N T E G Y T S E E V A D	2196
CTC TCA TTT CTT GAC TTA AAT ACT GAA GGA TAC ACT TCT GAG GAA GTT GCT GAT	6588
S R I L C L A L V H L P V E K E S W	2214
AGT AGA ATA TTG TGC TTA GCC TTG GTG CAT CTT CCT GTT GAA AAG GAA AGC TGG	6642
I V S G T Q S G T L L V I N T E D G	2232
ATT GTG TCT GGG ACA CAG TCT GGT ACT CTC CTG GTC ATC AAT ACC GAA GAT GGG	6696
K K R H T L E K M T D S V T C L Y C	2250
AAA AAG AGA CAT ACC CTA GAA AAG ATG ACT GAT TCT GTC ACT TGT TTG TAT TGC	6750
N S F S K Q S K Q K N F L L V G T A	2268
AAT TCC TTT TCC AAG CAA AGC AAA CAA AAA AAT TTT CTT TTG GTT GGA ACC GCT	6804
D G K L A I F E D K T V K L K G A A	2286
GAT GGC AAG TTA GCA ATT TTT GAA GAT AAG ACT GTT AAG CTT AAA GGA GCT GCT	6858
P L K I L N I G N V S T P L M C L S	2304
CCT TTG AAG ATA CTA AAT ATA GGA AAT GTC AGT ACT CCA TTG ATG TGT TTG AGT	6912
E S T N S T E R N V M W G G C G T K	2322
GAA TCC ACA AAT TCA ACG GAA AGA AAT GTA ATG TGG GGA GGA TGT GGC ACA AAG	6966
I F S F S N D F T I Q K L I E T R T	2340
ATT TTC TCC TTT TCT AAT GAT TTC ACC ATT CAG AAA CTC ATT GAG ACA AGA ACA	7020
S Q L F S Y A A F S D S N I I T V V	2358
AGC CAA CTG TTT TCT TAT GCA GCT TTC AGT GAT TCC AAC ATC ATA ACA GTG GTG	7074
V D T A L Y I A K Q N S P V V E V W	2376
GTA GAC ACT GCT CTC TAT ATT GCT AAG CAA AAT AGC CCT GTT GTG GAA GTG TGG	7128
D K K T E K L C G L I D C V H F L R	2394
GAT AAG AAA ACT GAA AAA CTC TGT GGA CTA ATA GAC TGC GTG CAC TTT TTA AGG	7182
E V M V K E N K E S K H K M S Y S G	2412
GAG GTA ATG GTA AAA GAA AAC AAG GAA TCA AAA CAC AAA ATG TCT TAT TCT GGG	7236
R V K T L C L Q K N T A L W I G T G	2430
AGA GTG AAA ACC CTC TGC CTT CAG AAG AAC ACT GCT CTT TGG ATA GGA ACT GGA	7290
G G H I L L L D L S T R R L I R V I	2448
GGA GGC CAT ATT TTA CTC CTG GAT CTT TCA ACT CGT CGA CTT ATA CGT GTA ATT	7344
Y N F C N S V R V M M T A Q L G S L	2466

ES 2 393 926 T3

TAC AAC TTT TGT AAT TCG GTC AGA GTC ATG ATG ACA GCA CAG CTA GGA AGC CTT 7398

K N V M L V L G Y N R K N T E G T Q 2484
 AAA AAT GTC ATG CTG GTA TTG GGC TAC AAC CGG AAA AAT ACT GAA GGT ACA CAA 7452

K Q K E I Q S C L T V W D I N L P H 2502
 AAG CAG AAA GAG ATA CAA TCT TGC TTG ACC GTT TGG GAC ATC AAT CTT CCA CAT 7506

E V Q N L E K H I E V R K E L A E K 2520
 GAA GTG CAA AAT TTA GAA AAA CAC ATT GAA GTG AGA AAA GAA TTA GCT GAA AAA 7560

M R R T S V E * 2528
 ATG AGA CGA ACA TCT GTT GAG TAA gagagaaataggaattgtcctttggataggaaaattattc 7623

tctcctcttgtaaataattttatatttttaaaaatgttcacatggaaagggtactcacattttttgaaatagctcgt 7695

gtgtatgaaggaatgttattatttttaatttaaatatatgtaaaaatacttaccagtaaatgtgtatttttaa 7767

agaactattttaaaacacaatgttatatttcttataaaataccagttactttcgttcattaattaatgaaaata 7839

aatctgtgaagtacctaatttaagtactcatactaaaatttataaggccgataattttttgttttcttgtct 7911

gtaatggaggtaaactttatttttaattctgtgcttaagacaggactattgcttgctcgatttttctagaaat 7983

ctgcacggtataatgaaaatattaagacagtttcccatgtaatgtattccttcttagattgcatcgaaatgc 8055

actatcatatatgcttgtaaataattcaaataaatttgactaataaaagtcctttgttggtatgtgaattctc 8127

ttgttgctgttgcaaacagtgcatcttacacaacttcactcaattcaaaagaaaactccattaaaagtact 8199

aatgaaaaaacatgacatactgtcaaagtcctcatatctaggaaagacacagaaactctctttgtcacagaa 8271

actctctgtgtctttcctagacataaatagagttgtttttcaactctatgtttgaatgtggataccctgaatt 8343

ttgtataattagtgtaaatacagtggtcagtccttcaagtgatatttttatttttttattcataccactagc 8415

tacttgttttctaactctgcttcattctaagtgttatattcatcttttccctaaatttgatgctgcagatc 8487

ctacatcattcagatagaaaccttttttttttcagaattatagaattccacagctcctaccaagaccatga 8559

ggataaatatctaactttttcagttgctgaaggagaaaggagcttttagttatgatggataaaaaatatctgc 8631

caccctaggcttccaaattatactttaaattggtttacatagcttaccacaataggagtatcagggccaaatac 8703

ctatgtaataatttgagggtcatttctgcttttaggaaaagtactttcggtaaattcctttggccctgaccagta 8775

ttcattatttcagataattccctgtgataggacaactagtagacatttaataattctcagaacttatggcatttt 8847
 actatgtgaaaacttttaaattttatttatattaagggtaatcaaattcttaaagatgaaagattttctgtatt 8919
 tttaaaggaagctatgctttaacttggtatgtaattaacaaaaaatcatatataatagagctctttgttcca 8991
 gtgttatctctttcattggttactttgtatttgcaattttttttaccaaagacaaattaaaaaatgaatacc 9063
 atatttaaagtgaataataaagggttttttaaaaacttttaa 9104

SEQ ID NO: 3

5 CRMGIKTSEG TPGFRAPEVA RGNVIYNQQA D

SEQ ID NO: 4

LSALTN

SEQ ID NO: 5

ttaagtgcgt taacaaat

10 **SEQ ID NO: 6**

REVTVK

SEQ ID NO: 7

agggaggtaa cggtaaaa

REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de:
 - (a) los nucleótidos 1 a 9104 de la SEQ ID NO: 1;
 - (b) los nucleótidos 1 a 7584 de la SEQ ID NO: 1;
 - 5 (c) los nucleótidos 1 a 7581 de la SEQ ID NO: 1;
 - (d) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de la proteína de la SEQ ID NO: 1;
 - (e) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c) o (d); y / o
 - 10 (f) una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c), o (d) que codifica para la secuencia de la proteína de la SEQ ID NO: 1 o que hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (e).
2. Un vector, preferiblemente un vector de expresión, que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
3. Una célula que contiene el vector de la reivindicación 2.
- 15 4. Un animal transgénico no humano que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 1 o el vector de la reivindicación 2.
5. Una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1.
6. La proteína de acuerdo con la reivindicación 5 que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
7. Un método para producir la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 3 bajo condiciones adecuadas; y
 - (b) aislar la proteína producida por la célula cultivada.
- 20 8. Un kit de diagnóstico que contiene al menos una molécula de ácido nucleico como la definida en la reivindicación 1 para el diagnóstico de una enfermedad neuronal, en particular un trastorno neurodegenerativo, especialmente enfermedad de Parkinson (PD), incluyendo PD esporádica, enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sinucleinopatía y / o tauopatía, en combinación con auxiliares adecuados.
9. Una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de ácido nucleico como la definida en la reivindicación 1 o una proteína como la definida en la reivindicación 5 y 6.
- 30 10. El uso de una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 o de una proteína como se define en la reivindicación 5 y 6 para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno neurodegenerativo, especialmente enfermedad de Parkinson (PD), incluyendo la PD esporádica, AD, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sinucleinopatía y/o tauopatía, en combinación con auxiliares adecuados.
11. Un método para el cribado de un agente farmacéutico o de diagnóstico, comprendiendo el método:
 - (a) proporcionar al menos una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 o una proteína tal como se definen en la reivindicación 5 y 6,
 - 35 (b) proporcionar un compuesto de prueba, y
 - (c) medir o detectar la influencia del compuesto de prueba sobre la actividad de la expresión de la molécula de ácido nucleico o la proteína.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde se provee el compuesto de prueba en la forma de una biblioteca de compuestos químicos.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la influencia del compuesto de prueba se mide o se detecta en un ensayo heterogéneo u homogéneo.

5 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 - 13, en donde el método se lleva a cabo en una matriz.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 - 14, en donde el método se lleva a cabo utilizando células enteras.

10 16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 - 15, en donde el método se lleva a cabo en un sistema robótico.

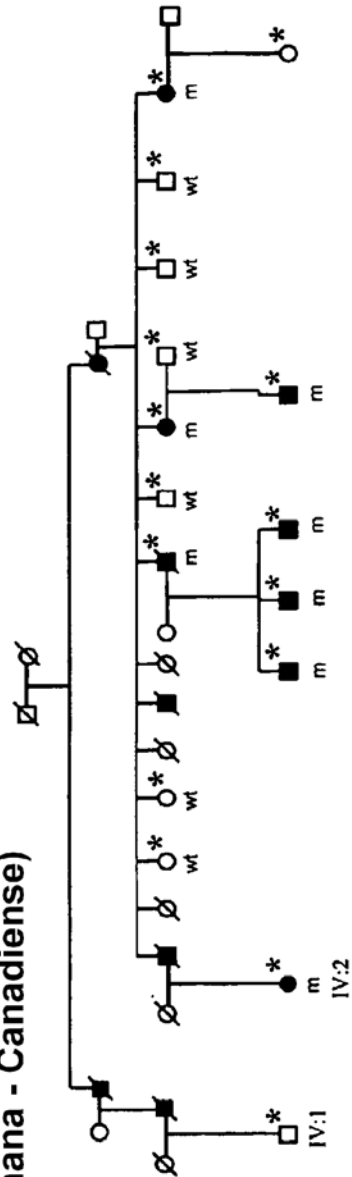
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 - 16, en donde el método se lleva a cabo mediante microfluídos.

18. Un anticuerpo o derivado de anticuerpo que se enlaza específicamente a una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.

15

Fig.1

Familia A (Alemana - Canadiense)
(Y1699C)



Familia D (Nebraska Occidental)
(R1441C)

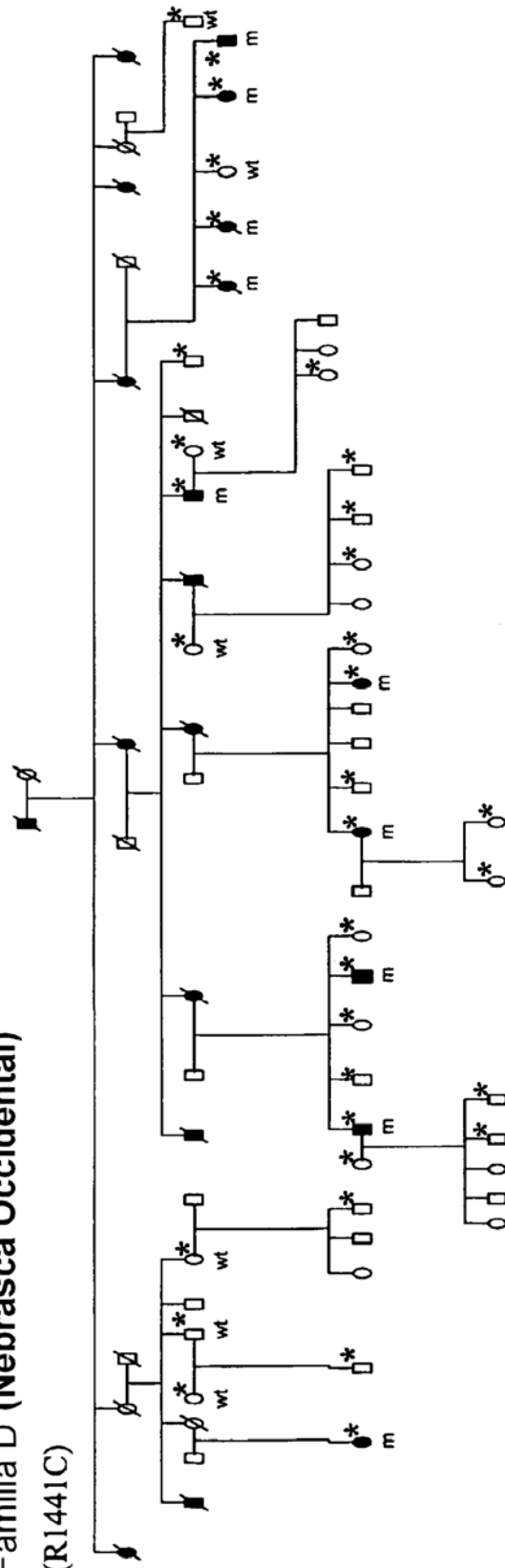


Fig. 2

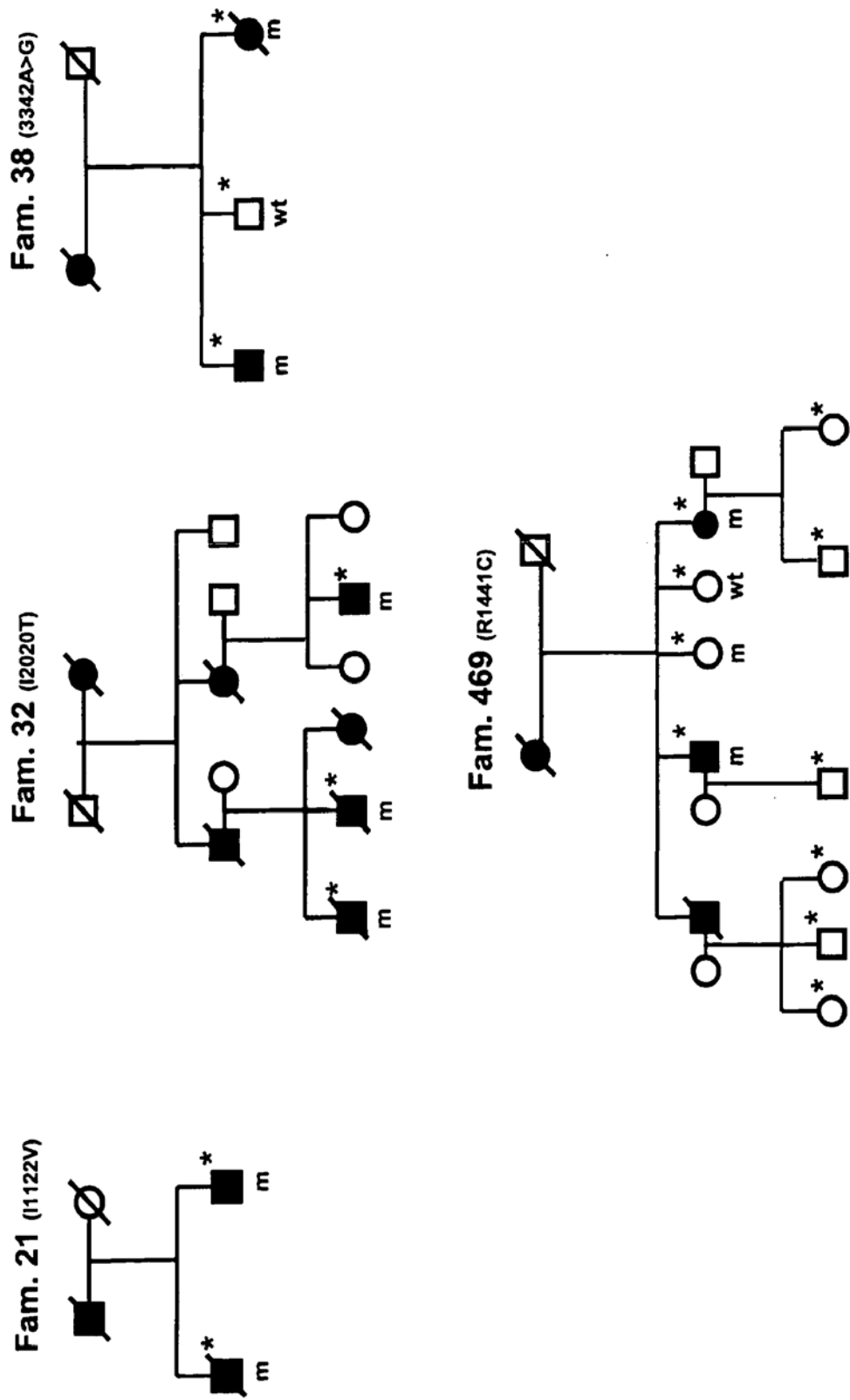


Fig.3

Humano	I1122V	R1441C	Y1699C	I1122T
Ratón	ISGICSP	IKAPASS	EMPIFPM	DYGIAQY
Fugu	ISGICSP	IKAPASS	EMPIFPM	DYGIAQY
Gusano	IAELCVP	IKAVAPL	EMPIFPM	.YGTIAQH
Mosca	IQ....E	IHAAPN	ALAYIPS	DYGTISR
	IS..CWP	IQAPAPN	LMTYFPS	DYGTISRQ
Familia	21	D/469	A	32
Exón	24	30	34	40

Fig. 4

2005034094.TXT

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      10      20      30      40      50      60
ATGGCTAGTGGCAGCTGTCCAGGGGTGCGAAGAGGACGAGGAACTCTGAAGAAGTTGATA
M A S G S C Q G C E E D E E T L K K L I

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      70      80      90      100     110     120
GTCAGGCTGAACAATGTCCAGGAAGGAAAACAGATAGAAACGCTGGTCCAAATCCTGGAG
V R L N N V Q E G K Q I E T L V Q I L E

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     130     140     150     160     170     180
GATCTGCTGGTGTTCACGTACTCCGAGCACGCCTCCAAGTTATTTCAAGGCAAAAATATC
D L L V F T Y S E H A S K L F Q G K N I
          ||
          exon1/exon2

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     190     200     210     220     230     240
CATGTGCCTCTGTTGATCGTCTTGACTCCTATATGAGAGTCGCGAGTGTGCAGCAGGTG
H V P L L I V L D S Y M R V A S V Q Q V
                              ||
                              exon2/exon3

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     250     260     270     280     290     300
GGTTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAGTCTGTCCAGGTACAATGCAAAGCTTAATG
G W S L L C K L I E V C P G T M Q S L M

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     310     320     330     340     350     360
GGACCCAGGATGTTGGAATGATTGGGAAGTCCTTGGTGTTCACCAATTGATTCTTAAA
G P Q D V G N D W E V L G V H Q L I L K
                              ||
                              exon3/exon4

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     370     380     390     400     410     420
ATGCTAACAGTTCATAATGCCAGTGTAAGTCTGTCCAGTATTGGACTGAAGACCTTAGAT
M L T V H N A S V N L S V I G L K T L D

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     430     440     450     460     470     480
CTCCTCCTAACTTCAGGTAAAATCACCTTGCTGATACTGGATGAAGAAAGTGATATTTTC
L L L T S G K I T L L I L D E E S D I F
          ||
          exon4/exon5

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     490     500     510     520     530     540
ATGTTAATTTTGTATGCCATGCACTCATTTCCAGCCAATGATGAAGTCCAGAACTTGGA
M L I F D A M H S F P A N D E V Q K L G

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     550     560     570     580     590     600
TGCAAAGCTTTACATGTGCTGTTTGAGAGAGTCTCAGAGGAGCAACTGACTGAATTTGTT
C K A L H V L F E R V S E E Q L T E F V
          ||
          exon5/exon6

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     610     620     630     640     650     660
GAGAACAAAGATTATATGATATTGTTAAGTTCGCTCAACAAATTTTAAAGATGAAGAGGAA
E N K D Y M I L L S A S T N F K D E E E

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
     670     680     690     700     710     720

```

2005034094.TXT

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ATTGTGCTTCATGTGCTGCATTGTTTACATTCCCTAGCGATTCCCTTGAATAATGTGGAA
I V L H V L H C L H S L A I P C N N V E
||
exon6/exon7

730       740       750       760       770       780
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GTCCTCATGAGTGGCAATGTGAGGTGTTATAATATTGTGGTGAAGCTATGAAAGCATTG
V L M S G N V R C Y N I V V E A M K A F

790       800       810       820       830       840
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CCTATGAGTGAAAGAATTCAAGAAGTGAGTTGCTGTTTGTCCATAGGCTTACATTAGGT
P M S E R I Q E V S C C L L H R L T L G
||
exon7/exon8

850       860       870       880       890       900
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AATTTTTCAATATCCTGGTATTAACGAAGTCCATGAGTTTGTGGTGAAAGCTGTGCAG
N F F N I L V L N E V H E F V V K A V Q

910       920       930       940       950       960
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CAGTACCCAGAGAATGCAGCATTGCGAGATCTCAGCGCTCAGCTGTTTGGCCCTCCTCACT
Q Y P E N A A L Q I S A L S C L A L L T
||
exon8/exon9

970       980       990       1000      1010      1020
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GAGACTATTTTCTTAAATCAAGATTTAGAGGAAAAGAATGAGAATCAAGAGAATGATGAT
E T I F L N Q D L E E K N E N Q E N D D

1030      1040      1050      1060      1070      1080
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GAGGGGGAAGAAGATAAATTGTTTGGCTGGAAGCCTGTTACAAAGCATTAACTGGGCAT
E G E E D K L F W L E A C Y K A L T W H

1090      1100      1110      1120      1130      1140
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AGAAAGAACAAGCACGTGCAGGAGGCCGCATGCTGGGCACTAAATAATCTCTTATGTAC
R K N K H V Q E A A C W A L N N L L M Y
||
exon9/exon10

1150      1160      1170      1180      1190      1200
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CAAAACAGTTTACATGAGAAGATTGGAGATGAAGATGGCCATTTCCAGCTCATAGGGAA
Q N S L H E K I G D E D G H F P A H R E
||
exon10/exon11

1210      1220      1230      1240      1250      1260
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GTGATGCTCTCCATGCTGATGCATTCTTCATCAAAGGAAGTTTCCAGGCATCTGCGAAT
V M L S M L M H S S S K E V F Q A S A N

1270      1280      1290      1300      1310      1320
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GCATTGTCAACTCTCTTAGAACAAAATGTTAATTTAGAAAAATACTGTTATCAAAAGGA
A L S T L L E Q N V N F R K I L L S K G
||
exon11/exon12

1330      1340      1350      1360      1370      1380
-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

2005034094.TXT

ATACACCTGAATGTTTTGGAGTTAATGCAGAAGCATATACATTCTCCTGAAGTGGCTGAA
I H L N V L E L M Q K H I H S P E V A E

1390 1400 1410 1420 1430 1440
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
AGTGGCTGTAATAATGCTAAATCATCTTTTTGAAGGAAGCAACACTTCCCTGGATATAATG
S G C K M L N H L F E G S N T S L D I M

||
exon12/exon13

1450 1460 1470 1480 1490 1500
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GCAGCAGTGGTCCCCAAATACTAACAGTTATGAAACGTCATGAGACATCATTACCAAGTG
A A V V P K I L T V M K R H E T S L P V

1510 1520 1530 1540 1550 1560
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
CAGCTGGAGGCGCTTCGAGCTATTTTACATTTTATAGTGCCTGGCATGCCAGAAGAATCC
Q L E A L R A I L H F I V P G M P E E S

||
exon13/exon14

1570 1580 1590 1600 1610 1620
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
AGGGAGGATACAGAATTTTCATCATAAGCTAAATATGGTTAAAAAACAGTGTTCAGAAGT
R E D T E F H H K L N M V K K Q C F K N

1630 1640 1650 1660 1670 1680
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GATATTCACAACTGGTCCTAGCAGCTTTGAACAGGTTTCATTGGAAATCCTGGGATTGAG
D I H K L V L A A L N R F I G N P G I Q

||
exon14/exon15

1690 1700 1710 1720 1730 1740
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
AAATGTGGATTAAGTAATTTCTTCTATTGTACATTTTCCTGATGCATTAGAGATGTTA
K C G L K V I S S I V H F P D A L E M L

1750 1760 1770 1780 1790 1800
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
TCCCTGGAAGGTGCTATGGATTGCTTACACACTGCAGATGTATCCAGATGACCAA
S L E G A M D S V L H T L Q M Y P D D Q

1810 1820 1830 1840 1850 1860
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GAAATTCAGTGTCTGGGTTAAGTCTTATAGGATACTTGATTACAAAGAAGAATGTGTTG
E I Q C L G L S L I G Y L I T K K N V F

||
exon15/exon16

1870 1880 1890 1900 1910 1920
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
ATAGGAACTGGACATCTGCTGGCAAAAATTCTGGTTTCCAGCTTATACCGATTAAAGGAT
I G T G H L L A K I L V S S L Y R F K D

1930 1940 1950 1960 1970 1980
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GTTGCTGAAATACAGACTAAAGGATTTTACAGCAATCTTAGCAATCCTCAAATGTGAGCA
V A E I Q T K G F Q T I L A I L K L S A

||
exon16/exon17

1990 2000 2010 2020 2030 2040
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
TCTTTTTCTAAGCTGCTGGTGCATCATTCAATTTGACTTAGTAATATTCCATCAAATGTCT
S F S K L L V H H S F D L V I F H Q M S

2005034094.TXT

```

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2050      2060      2070      2080      2090      2100
TCCAATATCATGGAACAAAAGGATCAACAGTTTCTAAACCTCTGTTGCAAGTGTGTTGCA
S N I M E Q K D Q Q F L N L C C K C F A
      ||
      exon17/exon18

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2110      2120      2130      2140      2150      2160
AAAGTAGCTATGGATGATTACTTAAAAAATGTGATGCTAGAGAGAGCGTGTGATCAGAAT
K V A M D D Y L K N V M L E R A C D Q N

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2170      2180      2190      2200      2210      2220
AACAGCATCATGGTTGAATGCTTGCTTCTATTGGGAGCAGATGCCAATCAAGCAAAGGAG
N S I M V E C L L L L G A D A N Q A K E

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2230      2240      2250      2260      2270      2280
GGATCTTCTTTAATTGTGTCAGGTATGTGAGAAAGAGAGCAGTCCCAAATTGGTGGAACTC
G S S L I C Q V C E K E S S P K L V E L
      ||
      exon18/exon19

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2290      2300      2310      2320      2330      2340
TTACTGAATAGTGGATCTCGTGAACAAGATGTACGAAAAGCGTTGACGATAAGCATTGGG
L L N S G S R E Q D V R K A L T I S I G

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2350      2360      2370      2380      2390      2400
AAAGGTGACAGCCAGATCATCAGCTTGCTCTTAAGGAGGCTGGCCCTGGATGTGGCCAAC
K G D S Q I I S L L L R R L A L D V A N

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2410      2420      2430      2440      2450      2460
AATAGCATTTGCCTTGAGGATTTTGTATAGGAAAAGTTGAACCTTCTTGGCTTGGTCTCT
N S I C L G G F C I G K V E P S W L G P

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2470      2480      2490      2500      2510      2520
TTATTTCCAGATAAGACTTCTAATTTAAGGAAACAAACAAATATAGCATCTACACTAGCA
L F P D K T S N L R K Q T N I A S T L A
      ||
      exon19/exon20

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2530      2540      2550      2560      2570      2580
AGAATGGTGATCAGATATCAGATGAAAAGTGCTGTGGAAGAAGGAACAGCCTCAGGCAGC
R M V I R Y Q M K S A V E E G T A S G S

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2590      2600      2610      2620      2630      2640
GATGGAAATTTTCTGAAGATGTGCTGTCTAAATTTGATGAATGGACCTTTATTCCTGAC
D G N F S E D V L S K F D E W T F I P D

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2650      2660      2670      2680      2690      2700
TCTTCTATGGACAGTGTGTTTGCTCAAAGTGATGACCTGGATAGTGAAGGAAGTGAAGGC
S S M D S V F A Q S D D L D S E G S E G
      ||
      exon20/exon21

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2710      2720      2730      2740      2750      2760
TCATTTCTTGAAAAAGAAATCTAATTCAATTAGTGTAGGAGAATTTTACCGAGATGCC
S F L V K K K S N S I S V G E F Y R D A

```

2005034094.TXT

```

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2770      2780      2790      2800      2810      2820
GTATTACAGCGTTGCTCACCAAATTTGCAAAGACATTCCAATTCCTTGGGGCCCATTTTT
V L Q R C S P N L Q R H S N S L G P I F
                                     ||
                                     exon21/exon22

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2830      2840      2850      2860      2870      2880
GATCATGAAGATTTACTGAAGCGAAAAAGAAAAATACTATCTTCAGATGATTCACCTCAGG
D H E D L L K R K R K I L S S D D S L R
                                     ||
                                     exon22/exon23

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2890      2900      2910      2920      2930      2940
TCATCAAAACTTCAATCCCATATGAGGCATTGAGACAGCATTTCTTCTCTGGCTTCTGAG
S S K L Q S H M R H S D S I S S L A S E

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
2950      2960      2970      2980      2990      3000
AGAGAATATATTACATCACTAGACCTTTGAGCAAATGAACTAAGAGATATTGATGCCCTA
R E Y I T S L D L S A N E L R D I D A L

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3010      3020      3030      3040      3050      3060
AGCCAGAAATGCTGTATAAGTGTTTCATTTGGAGCATCTTGAAAAGCTGGAGCTTCACCAG
S Q K C C I S V H L E H L E K L E L H Q

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3070      3080      3090      3100      3110      3120
AATGCACTCACGAGCTTTCCACAACAGCTATGTGAACTCTGAAGAGTTTGACACATTTG
N A L T S F P Q Q L C E T L K S L T H L
                                     ||
                                     exon23/exon24

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3130      3140      3150      3160      3170      3180
GACTTGACAGTAATAAATTTACATCATTTCTTCTTATTTGTTGAAAATGAGTTGTATT
D L H S N K F T S F P S Y L L K M S C I

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3190      3200      3210      3220      3230      3240
GCTAATCTTGATGTCTCTCGAAATGACATTGGACCCTCAGTGGTTTTAGATCCTACAGTG
A N L D V S R N D I G P S V V L D P T V

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3250      3260      3270      3280      3290      3300
AAATGTCCAACCTCTGAAACAGTTTAACCTGTGATATAACCAGCTGTCTTTGTACCTGAG
K C P T L K Q F N L S Y N Q L S F V P E

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3310      3320      3330      3340      3350      3360
AACCTCACTGATGTGGTAGAGAACTGGAGCAGCTCATTTTAGAAGGAAATAAAATATCA
N L T D V V E K L E Q L I L E G N K I S
                                     ||
                                     exon24/exon25

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3370      3380      3390      3400      3410      3420
GGGATATGCTCCCTCTGAGACTGAAGGAACTGAAGATTTTAAACCTTAGTAAGAACCAC
G I C S P L R L K E L K I L N L S K N H

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3430      3440      3450      3460      3470      3480
ATTTTCATCCCTATCAGAGAACTTTCTTGAGGCTTGTCCTAAAGTGGAGAGTTTCAGTGCC
I S S L S E N F L E A C P K V E S F S A

```

2005034094.TXT

```

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3490      3500      3510      3520      3530      3540
AGAATGAATTTTCTTGCTGCTATGCCTTTCTTGCTCCTTCTATGACAATCCTAAAATTA
R M N F L A A M P F L P P S M T I L K L
      ||
      exon25/exon26

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3550      3560      3570      3580      3590      3600
TCTCAGAACAAATTTTCTGTATTCCAGAAGCAATTTTAAATCTTCCACACTTGCGGTCT
S Q N K F S C I P E A I L N L P H L R S
                        ||
                        exon26/exon27

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3610      3620      3630      3640      3650      3660
TTAGATATGAGCAGCAATGATATTCACTACCTACCAGGTCCCGCACACTGGAAATCTTTG
L D M S S N D I Q Y L P G P A H W K S L

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3670      3680      3690      3700      3710      3720
AACTTAAGGGAACCTTATTTAGCCATAATCAGATCAGCATCTTGGACTTGAGTGAAAAA
N L R E L L F S H N Q I S I L D L S E K

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3730      3740      3750      3760      3770      3780
GCATATTTATGGTCTAGAGTAGAGAACTGCATCTTCTCACAATAAACTGAAAGAGATT
A Y L W S R V E K L H L S H N K L K E I
                        ||
                        exon27/exon28

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3790      3800      3810      3820      3830      3840
CCTCCTGAGATTGGCTGTCTTGAAATCTGACATCTCTGGATGTCAGTTACAACCTTGAA
P P E I G C L E N L T S L D V S Y N L E

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3850      3860      3870      3880      3890      3900
CTAAGATCCTTTCCAATGAAATGGGGAAATTAAGCAAAATATGGGATCTTCTTTGGAT
L R S F P N E M G K L S K I W D L P L D

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3910      3920      3930      3940      3950      3960
GAACTGCATCTTAACTTTGATTTTAAACATATAGGATGTAAAGCCAAAGACATCATAAGG
E L H L N F D F K H I G C K A K D I I R
                        ||
                        exon28/exon29

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
3970      3980      3990      4000      4010      4020
TTTCTTCAACAGCGATTAAAAAAGGCTGTGCCTTATAACCGAATGAAACTTATGATTGTG
F L Q Q R L K K A V P Y N R M K L M I V

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
4030      4040      4050      4060      4070      4080
GGAAATACTGGGAGTGGTAAAACACCTTATTGCAGCAATTAATGAAAACCAAGAAATCA
G N T G S G K T T L L Q Q L M K T K K S

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
4090      4100      4110      4120      4130      4140
GATCTTGGAATGCAAAGTGCCACAGTTGGCATAGATGTGAAAGACTGGCCTATCCAAATA
D L G M Q S A T V G I D V K D W P I Q I

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
4150      4160      4170      4180      4190      4200
AGAGACAAAAGAAAGAGAGATCTCGTCCTAAATGTGTGGGATTTTGCAGGTCGTGAGGAA
R D K R K R D L V L N V W D F A G R E E
                        ||

```


2005034094.TXT

exon29/exon30

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4210      4220      4230      4240      4250      4260
TTCTATAGTACTCATCCCCATTTTATGACGCAGCGAGCATTGTACCTTGCTGTCTATGAC
F Y S T H P H F M T Q R A L Y L A V Y D

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4270      4280      4290      4300      4310      4320
CTCAGCAAGGGACAGGCTGAAGTTGATGCCATGAAGCCTTGGCTCTTCAATATAAAGGCT
L S K G Q A E V D A M K P W L F N I K A

```

||
exon30/exon31

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4330      4340      4350      4360      4370      4380
CGCGCTTCTTCTCCCTGTGATTCTCGTTGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAAG
R A S S S P V I L V G T H L D V S D E K

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4390      4400      4410      4420      4430      4440
CAACGCAAAGCCTGCATGAGTAAATCACCAGGAACCTCTGAATAAGCGAGGGTTCCTT
Q R K A C M S K I T K E L L N K R G F P

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4450      4460      4470      4480      4490      4500
GCCATACGAGATTACCACTTTGTGAATGCCACCGAGGAATCTGATGCTTTGGCAAACTT
A I R D Y H F V N A T E E S D A L A K L

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4510      4520      4530      4540      4550      4560
CGGAAAACCATCATAAACGAGAGCCTTAATTTCAAGATCCGAGATCAGCTTGTGTTGGA
R K T I I N E S L N F K I R D Q L V V G

```

||
exon31/exon32

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4570      4580      4590      4600      4610      4620
CAGCTGATTCCAGACTGCTATGTAGAACTTGAAAAATCATTTTATCGGAGCGTAAAAAT
Q L I P D C Y V E L E K I I L S E R K N

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4630      4640      4650      4660      4670      4680
GTGCCAATTGAATTTCCCGTAATTGACCGGAAACGATTATTACAAGTAGTGAGAGAAAAT
V P I E F P V I D R K R L L Q L V R E N

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4690      4700      4710      4720      4730      4740
CAGCTGCAGTTAGATGAAAATGAGCTTCTCACGCAGTTCACCTTCTAAATGAATCAGGA
Q L Q L D E N E L P H A V H F L N E S G

```

||
exon32/exon33

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4750      4760      4770      4780      4790      4800
GTCCTTCTTCATTTTCAAGACCCAGCACTGCAGTTAAGTGACTTGTACTTTGTGGAACCC
V L L H F Q D P A L Q L S D L Y F V E P

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4810      4820      4830      4840      4850      4860
AAGTGGCTTTGTAAATCATGGCACAGATTTTGACAGTGAAAGTGAAGGTTGTCCAAAA
K W L C K I M A Q I L T V K V E G C P K

```

||
exon33/exon34

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
4870      4880      4890      4900      4910      4920
CACCTAAGGGCATTATTTGCGGTAGAGATGTGGAAAAATTTCTTTCAAAAAAAGGAAA

```

2005034094.TXT

H P K G I I S R R D V E K F L S K K R K

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 TTTCAAAGAACTACATGTCACAGTATTTTAAGCTCCTAGAAAAATCCAGATTGCTTTG
 F P K N Y M S Q Y F K L L E K F Q I A L

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 CCAATAGGAGAAGAATATTTGCTGGTTCCAAGCAGTTTGTCTGACCACAGGCCTGTGATA
 P I G E E Y L L V P S S L S D H R P V I

||
 exon34/exon35

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 GAGCTTCCCCATTGTGAGAACTCTGAAATTATCATCCGACTATATGAAATGCCTTATTTT
 E L P H C E N S E I I I R L Y E M P Y F

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5110 5120 5130 5140 5150 5160
 CCAATGGGATTTTGGTCAAGATTAATCAATCGATTACTTGAGATTTCACCTTACATGCTT
 P M G F W S R L I N R L L E I S P Y M L

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5170 5180 5190 5200 5210 5220
 TCAGGGAGAGAACGAGCACTTCGCCCAAACAGAAATGTATTGGCGACAAGGCATTACTTA
 S G R E R A L R P N R M Y W R Q G I Y L

||
 exon35/exon36

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5230 5240 5250 5260 5270 5280
 AATTGGTCTCCTGAAGCTTATTGTCTGGTAGGATCTGAAGTCTTAGACAATCATCCAGAG
 N W S P E A Y C L V G S E V L D N H P E

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5290 5300 5310 5320 5330 5340
 AGTTTCTTAAAAATTACAGTTCCTTCTGTAGAAAAGGCTGTATTCTTTTGGGCCAAGTT
 S F L K I T V P S C R K G C I L L G Q V

||
 exon36/exon37

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 GTGGACCACATTGATTCTCTCATGGAAGAATGGTTTCCTGGGTTGCTGGAGATTGATATT
 V D H I D S L M E E W F P G L L E I D I

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5410 5420 5430 5440 5450 5460
 TGTGGTGAAGGAGAACTCTGTTGAAGAAATGGGCATTATATAGTTTTAATGATGGCGAA
 C G E G E T L L K K W A L Y S F N D G E

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5470 5480 5490 5500 5510 5520
 GAACATCAAAAAATCTTACTTGATGACTTGATGAAGAAAGCAGAGGAAGGAGATCTCTTA
 E H Q K I L L D D L M K K A E E G D L L

||
 exon37/exon38

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5530 5540 5550 5560 5570 5580
 GTAAATCCAGATCAACCAAGGCTCACCATTCCAATATCTCAGATTGCCCTGACTTGATT
 V N P D Q P R L T I P I S Q I A P D L I

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 5590 5600 5610 5620 5630 5640
 TTGGCTGACCTGCCTAGAAATATTATGTTGAATAATGATGAGTTGGAATTTGAACAAGCT

2005034094.TXT

L A D L P R N I M L N N D E L E F E Q A

-----5650-----5660-----5670-----5680-----5690-----5700
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 CCAGAGTTTCTCCTAGGTGATGGCAGTTTGGATCAGTTTACCGAGCAGCCTATGAAGGA
 P E F L L G D G S F G S V Y R A A Y E G
 ||
 exon38/exon39

-----5710-----5720-----5730-----5740-----5750-----5760
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 GAAGAAGTGGCTGTGAAGATTTTAAATAACATACATCACTCAGGCTGTTAAGACAAGAG
 E E V A V K I F N K H T S L R L L R Q E
 ||
 exon39/exon40

-----5770-----5780-----5790-----5800-----5810-----5820
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 CTTGTGGTGCTTTGCCACCTCCACCACCCAGTTTGATATCTTTGCTGGCAGCTGGGATT
 L V V L C H L H H P S L I S L L A A G I

-----5830-----5840-----5850-----5860-----5870-----5880
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 CGTCCCCGGATGTTGGTGATGGAGTTAGCCTCCAAGGGTTCCTTGGATCGCCTGCTTCAG
 R P R M L V M E L A S K G S L D R L L Q

-----5890-----5900-----5910-----5920-----5930-----5940
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 CAGGACAAAGCCAGCCTCACTAGAACCTACAGCACAGGATTGCACTCCACGTAGCTGAT
 Q D K A S L T R T L Q H R I A L H V A D

-----5950-----5960-----5970-----5980-----5990-----6000
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 GGTTTGAGATACCTCCACTCAGCCATGATTATATACCGAGACCTGAAACCCCAATGTG
 G L R Y L H S A M I I Y R D L K P H N V
 ||
 exon40/exon41

-----6010-----6020-----6030-----6040-----6050-----6060
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 CTGCTTTTCACTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATT
 L L F T L Y P N A A I I A K I A D Y G I

-----6070-----6080-----6090-----6100-----6110-----6120
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 GCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACATCAGAGGGCACACCAGGGTTTCGTGCA
 A Q Y C C R M G I K T S E G T P G F R A
 ||
 exon41/exon42

-----6130-----6140-----6150-----6160-----6170-----6180
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 CCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAACCAACAGGCTGATGTTTATTCATTTGGT
 P E V A R G N V I Y N Q Q A D V Y S F G

-----6190-----6200-----6210-----6220-----6230-----6240
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 TTACTACTCTATGACATTTTGACAACCTGGAGGTAGAATAGTAGAGGGTTTGAAGTTTCCA
 L L L Y D I L T T G G R I V E G L K F P

-----6250-----6260-----6270-----6280-----6290-----6300
 -----:-----:-----:-----:-----:-----:-----:-----
 AATGAGTTTGATGAATTAGAAATACAAGGAAAATTACCTGATCCAGTTAAAGAATATGGT
 N E F D E L E I Q G K L P D P V K E Y G
 ||
 exon42/exon43

-----6310-----6320-----6330-----6340-----6350-----6360

2005034094.TXT

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGAAATTAATTAAACAGTGTGTGAAAGAAAATCCTCAA
C A P W P M V E K L I K Q C L K E N P Q

        6370      6380      6390      6400      6410      6420
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GAAAGGCCTACTTCTGCCAGGTCTTTGACATTTTGAATTCAGCTGAATTAGTCTGTCTG
E R P T S A Q V F D I L N S A E L V C L
      ||
      exon43/exon44

        6430      6440      6450      6460      6470      6480
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ACGAGACGCATTTTATTACCTAAAAACGTAATTGTTGAATGCATGGTTGCTACACATCAC
T R R I L L P K N V I V E C M V A T H H

        6490      6500      6510      6520      6530      6540
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AACAGCAGGAATGCAAGCATTGGCTGGGCTGTGGGCACACCGACAGAGGACAGCTCTCA
N S R N A S I W L G C G H T D R G Q L S

        6550      6560      6570      6580      6590      6600
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TTTCTTGACTTAAATACTGAAGGATACACTTCTGAGGAAGTTGCTGATAGTAGAATATTG
F L D L N T E G Y T S E E V A D S R I L
      ||
      exon44/exon45

        6610      6620      6630      6640      6650      6660
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TGCTTAGCCTTGGTGCATCTTCTGTTGAAAAGGAAAGCTGGATTGTGTCTGGGACACAG
C L A L V H L P V E K E S W I V S G T Q

        6670      6680      6690      6700      6710      6720
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TCTGGTACTCTCTGGTCATCAATACCGAAGATGGGAAAAAGAGACATACCTAGAAAAG
S G T L L V I N T E D G K K R H T L E K

        6730      6740      6750      6760      6770      6780
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ATGACTGATTCTGTCACTTGTTGTATTGCAATTCCTTTTCCAAGCAAAGCAAACAAAAA
M T D S V T C L Y C N S F S K Q S K Q K
      ||
      exon45/exon46

        6790      6800      6810      6820      6830      6840
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AATTTTCTTTTGGTTGGAACCGCTGATGGCAAGTTAGCAATTTTGAAGATAAGACTGTT
N F L L V G T A D G K L A I F E D K T V

        6850      6860      6870      6880      6890      6900
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AAGCTTAAAGGAGCTGCTCCTTTGAAGATACTAAATATAGGAAATGTCAGTACTCCATTG
K L K G A A P L K I L N I G N V S T P L
      ||
      exon46/exon47

        6910      6920      6930      6940      6950      6960
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ATGTGTTTGAGTGAATCCACAAATTCAACGGAAAGAAATGTAATGTGGGGAGGATGTGGC
M C L S E S T N S T E R N V M W G G C G

        6970      6980      6990      7000      7010      7020
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ACAAAGATTTTCTCCTTTTCTAATGATTTCAACATTGAGAACTCATTGAGACAAGAACA
T K I F S F S N D F T I Q K L I E T R T

        7030      7040      7050      7060      7070      7080

```

2005034094.TXT

```

-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
AGCCAACTGTTTTCTTATGCAGCTTTCAGTGATTCCAACATCATAACAGTGGTGGTAGAC
S  Q  L  F  S  Y  A  A  F  S  D  S  N  I  I  T  V  V  V  D
      ||
      exon47/exon48

      7090      7100      7110      7120      7130      7140
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
ACTGCTCTCTATATTGCTAAGCAAAATAGCCCTGTTGTGGAAGTGTGGGATAAGAAAAC
T  A  L  Y  I  A  K  Q  N  S  P  V  V  E  V  W  D  K  K  T

      7150      7160      7170      7180      7190      7200
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GAAAACTCTGTGGACTAATAGACTGCGTGCACTTTTTAAGGGAGGTAATGGTAAAAGAA
E  K  L  C  G  L  I  D  C  V  H  F  L  R  E  V  M  V  K  E
                        ||
                        exon48/exon49

      7210      7220      7230      7240      7250      7260
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
AACAGGAATCAAAACACAAAATGTCTTATTCTGGGAGAGTGAAAACCTCTGCCTTCAG
N  K  E  S  K  H  K  M  S  Y  S  G  R  V  K  T  L  C  L  Q

      7270      7280      7290      7300      7310      7320
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
AAGAACTGCTCTTTGGATAGGAACTGGAGGAGGCCATATTTACTCCTGGATCTTTCA
K  N  T  A  L  W  I  G  T  G  G  G  H  I  L  L  L  D  L  S

      7330      7340      7350      7360      7370      7380
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
ACTCGTCGACTTATACGTGTAATTTACAACCTTTGTAATTCGGTCAGAGTCATGATGACA
T  R  R  L  I  R  V  I  Y  N  F  C  N  S  V  R  V  M  M  T

      7390      7400      7410      7420      7430      7440
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GCACAGCTAGGAAGCCTTAAAAATGTCATGCTGGTATTGGGCTACAACCGAAAAATACT
A  Q  L  G  S  L  K  N  V  M  L  V  L  G  Y  N  R  K  N  T
      ||
      exon49/exon50

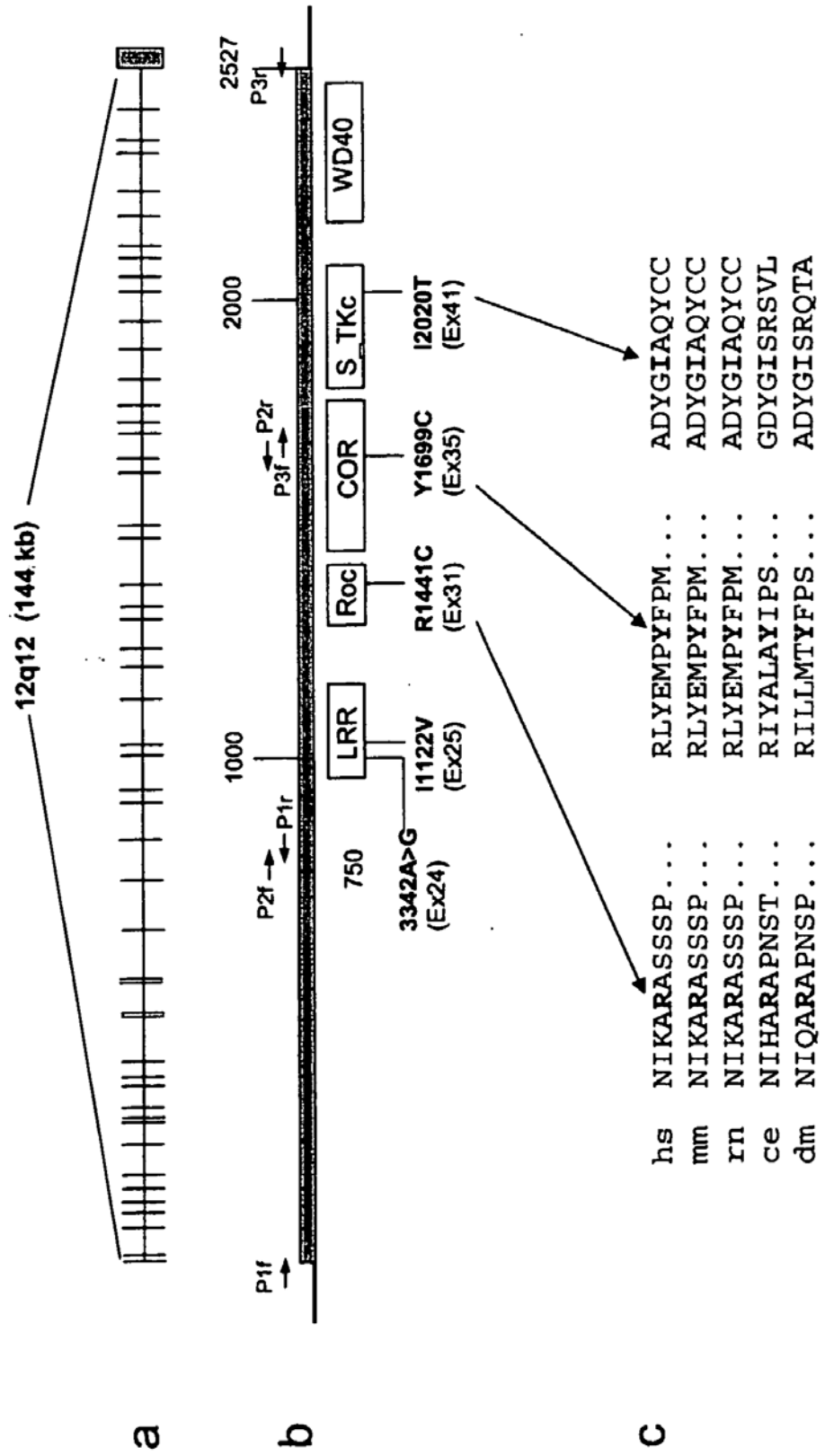
      7450      7460      7470      7480      7490      7500
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
GAAGGTACACAAAAGCAGAAAGAGATACAATCTTGCTTGACCGTTTGGGACATCAATCTT
E  G  T  Q  K  Q  K  E  I  Q  S  C  L  T  V  W  D  I  N  L
      ||
      exon50/exon51

      7510      7520      7530      7540      7550      7560
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
CCACATGAAGTGCAAAATTTAGAAAAACACATTGAAGTGAGAAAAGAATTAGCTGAAAAA
P  H  E  V  Q  N  L  E  K  H  I  E  V  R  K  E  L  A  E  K

      7570      7580      7590      7600      7610      7620
-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|-----:-----|
ATGAGACGAACATCTGTTGAGTAA
M  R  R  T  S  V  E  *

```

Fig. 5



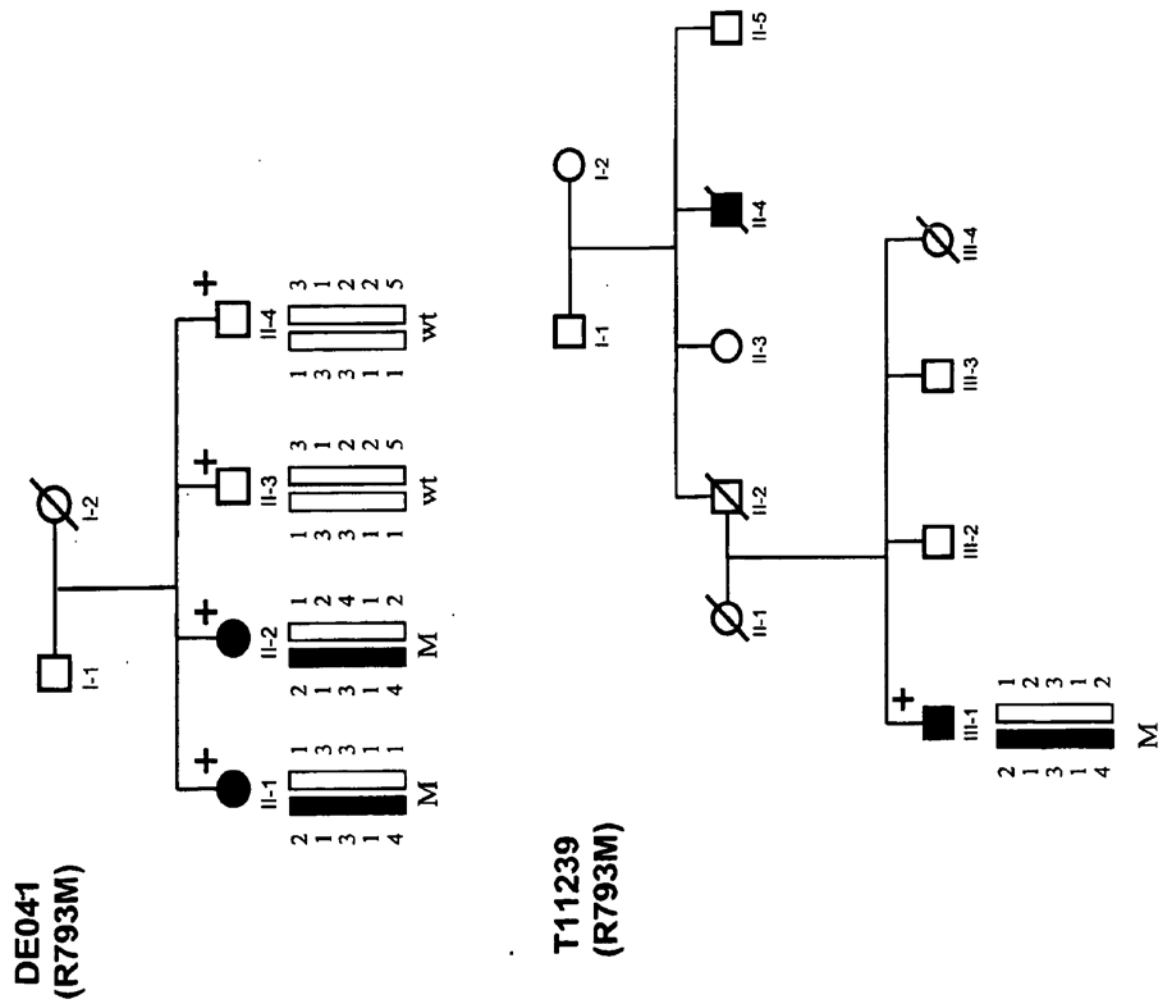


Fig. 6a

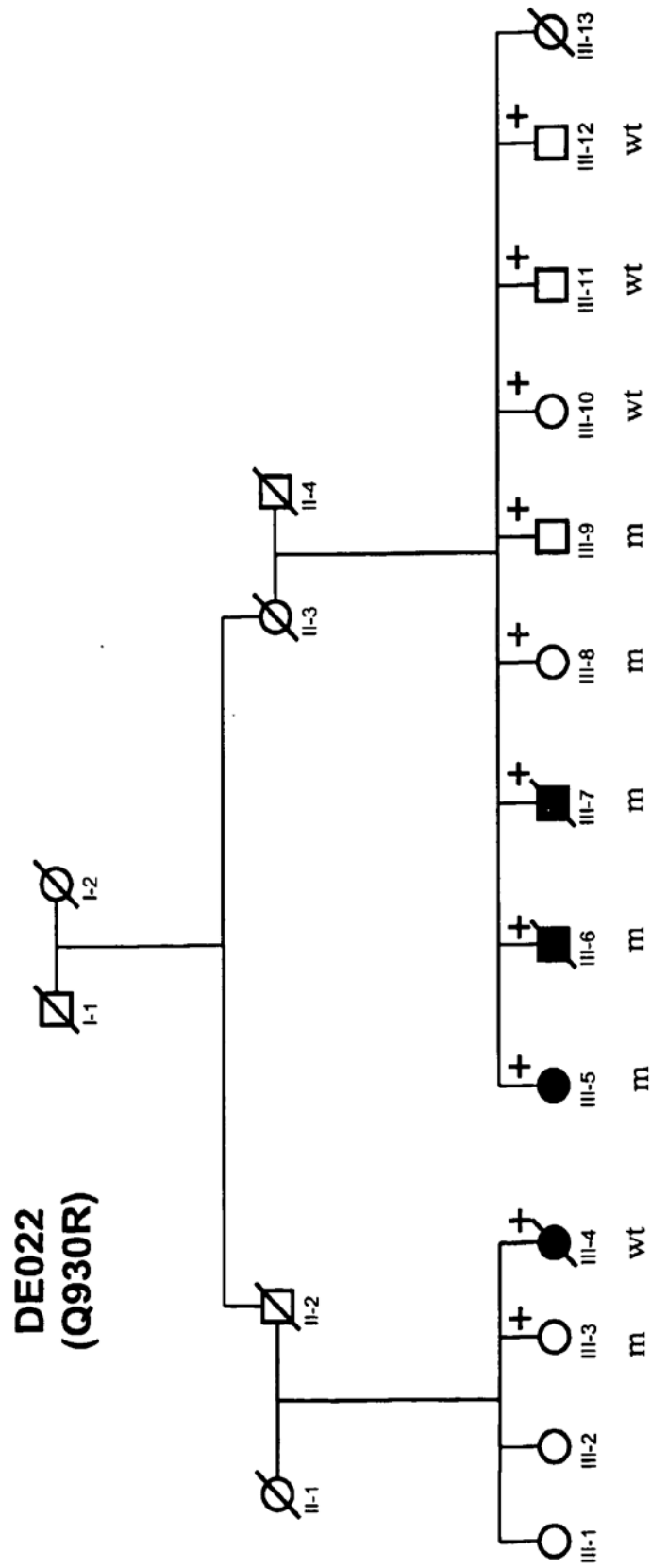


Fig. 6b

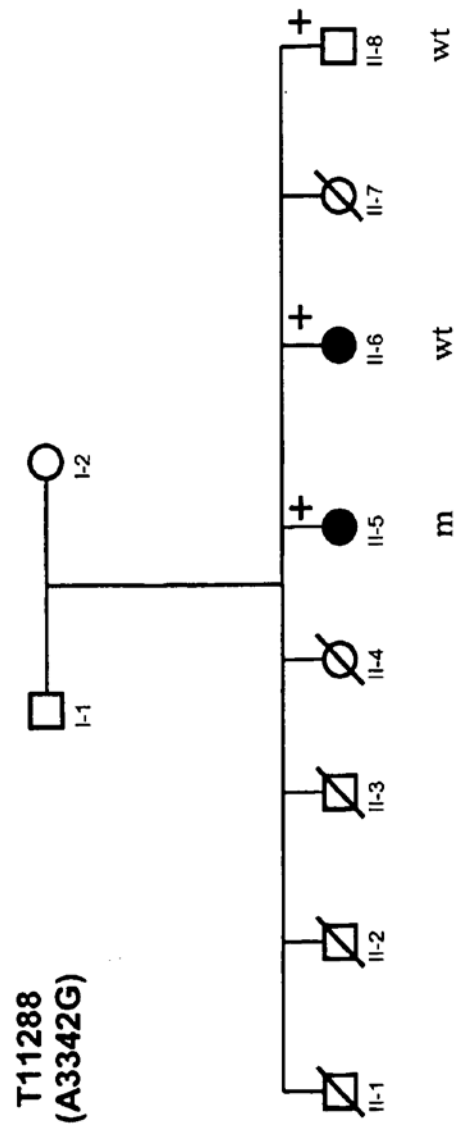
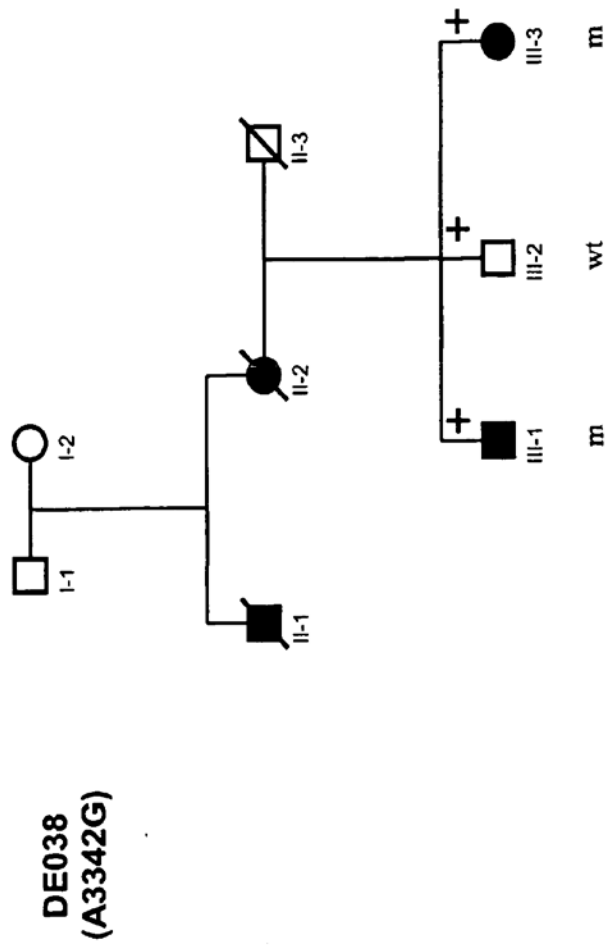


Fig. 6c

DE031
(S1228T)

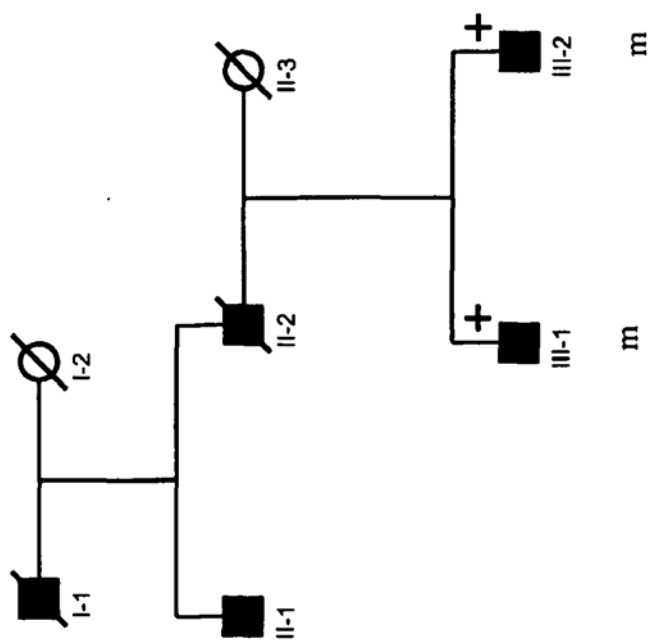


Fig. 6d

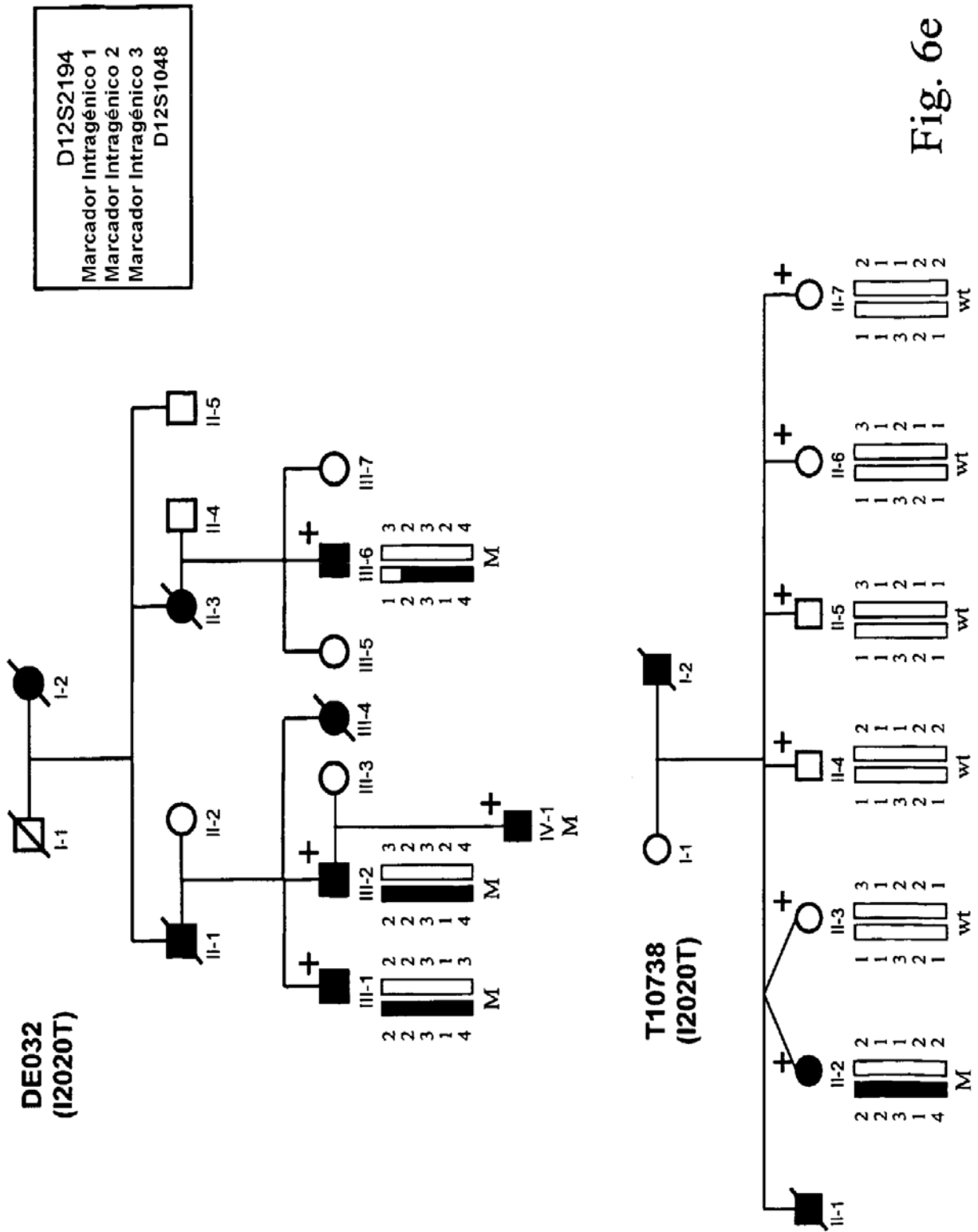


Fig. 6e

Familia E
(S1096C)

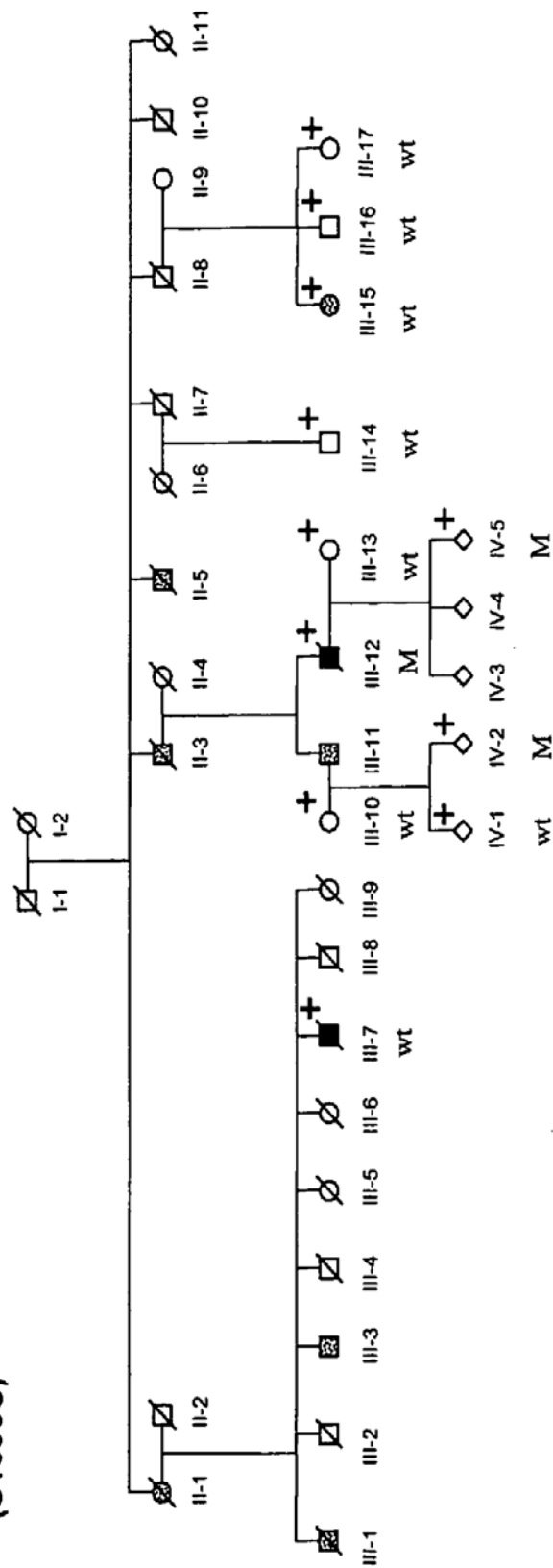


Fig. 6f

Fig. 7

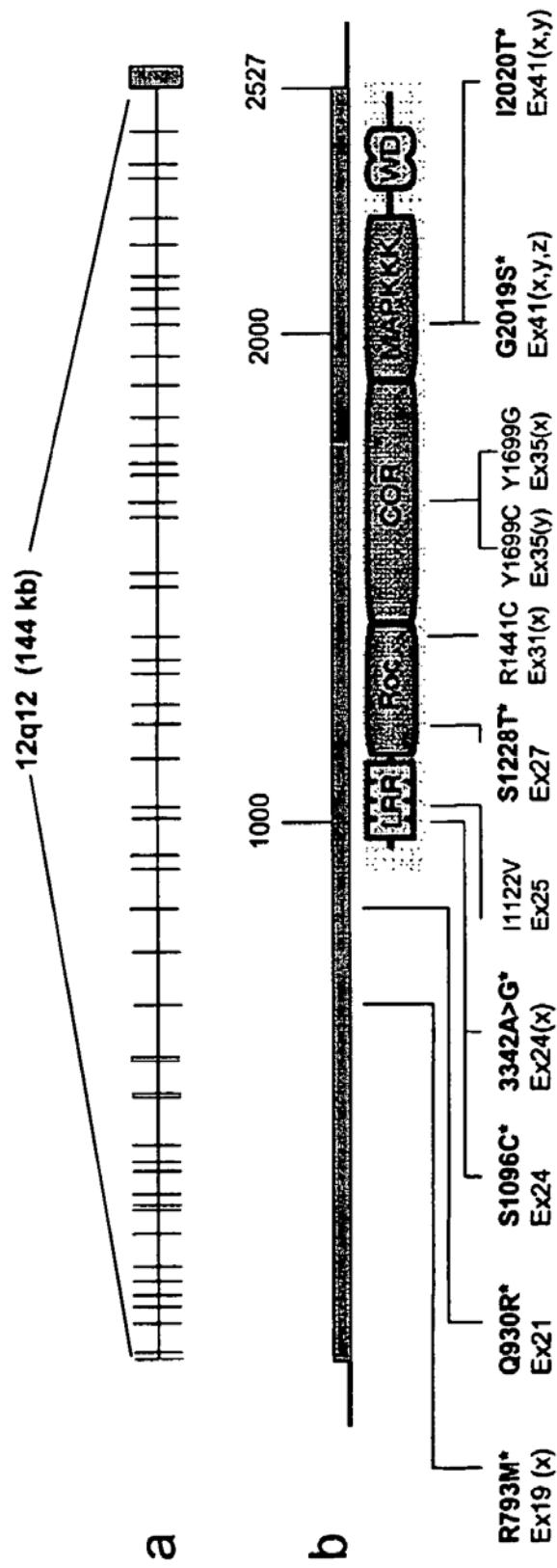


Figura 8

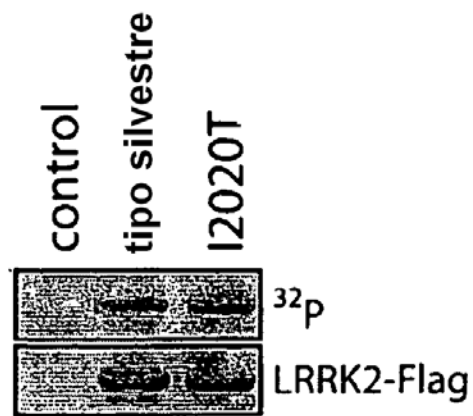


Figura 9

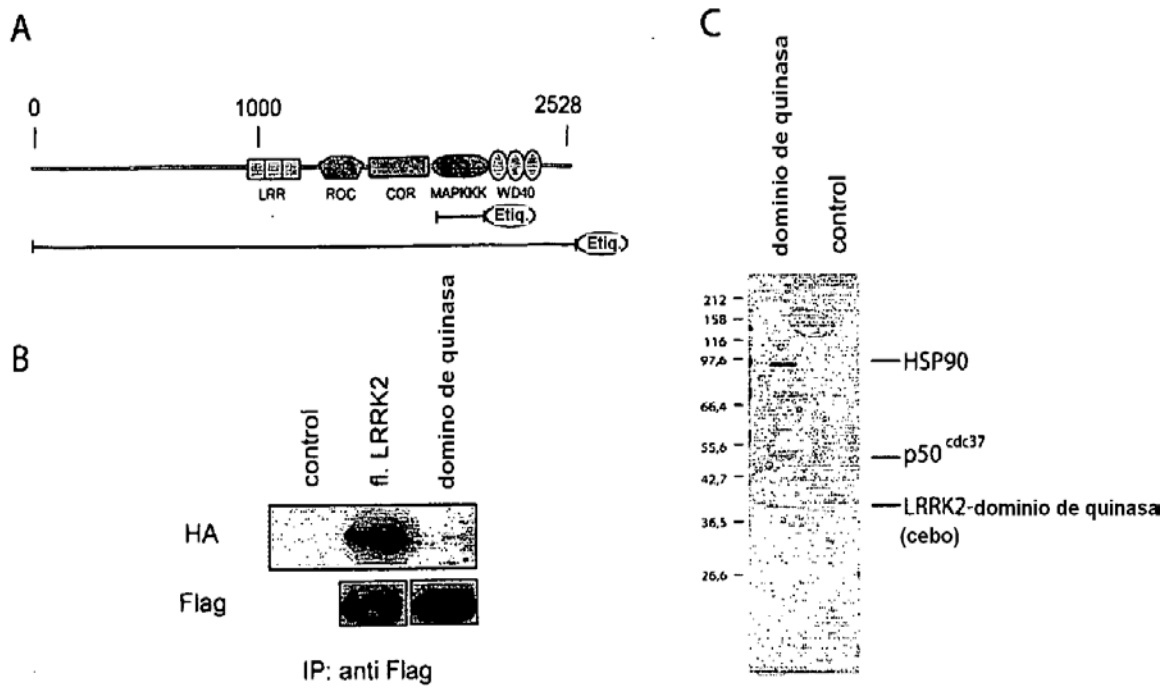


Figura 10

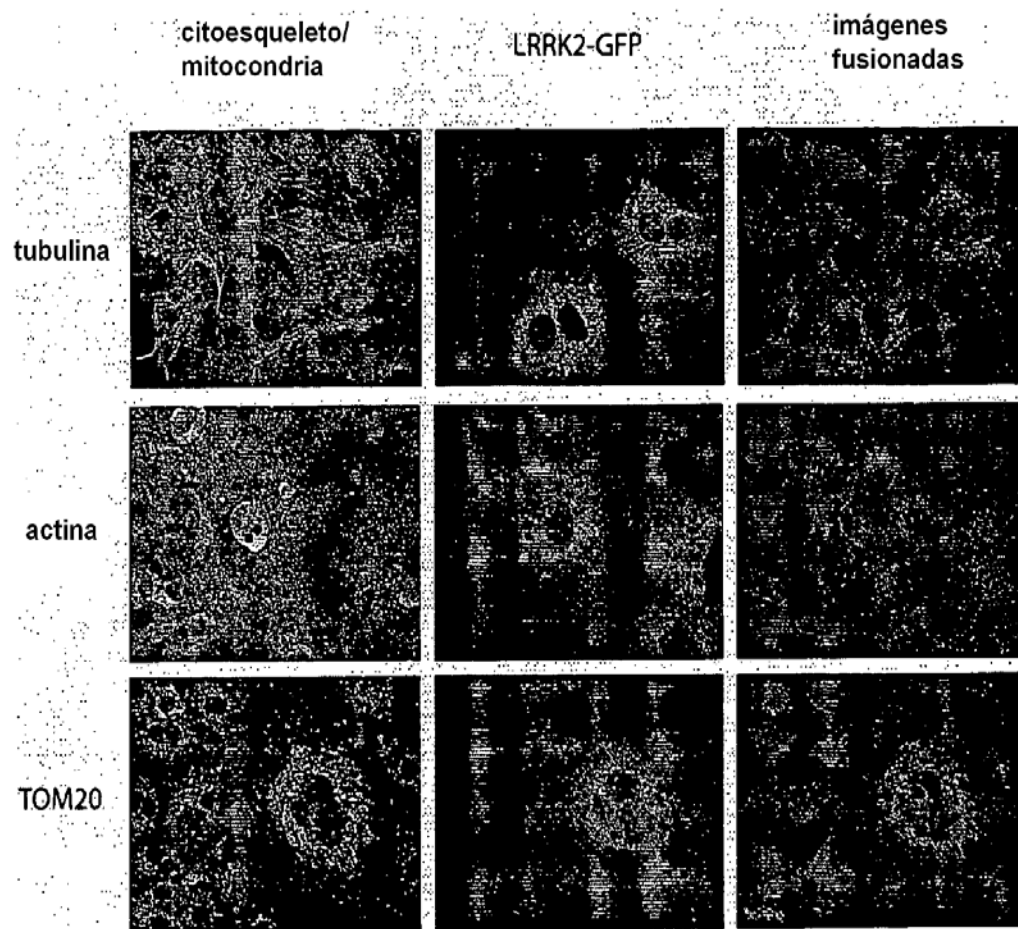


Figura 11

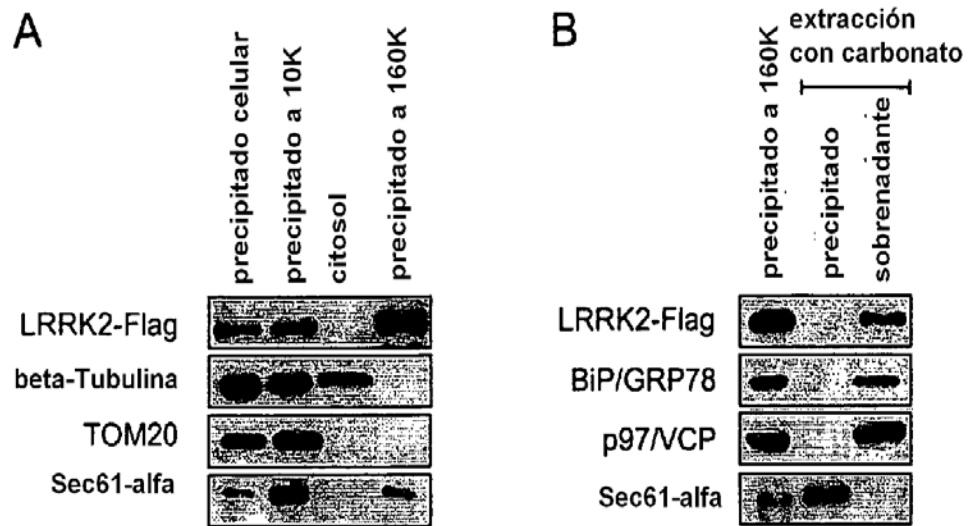


Figura 12

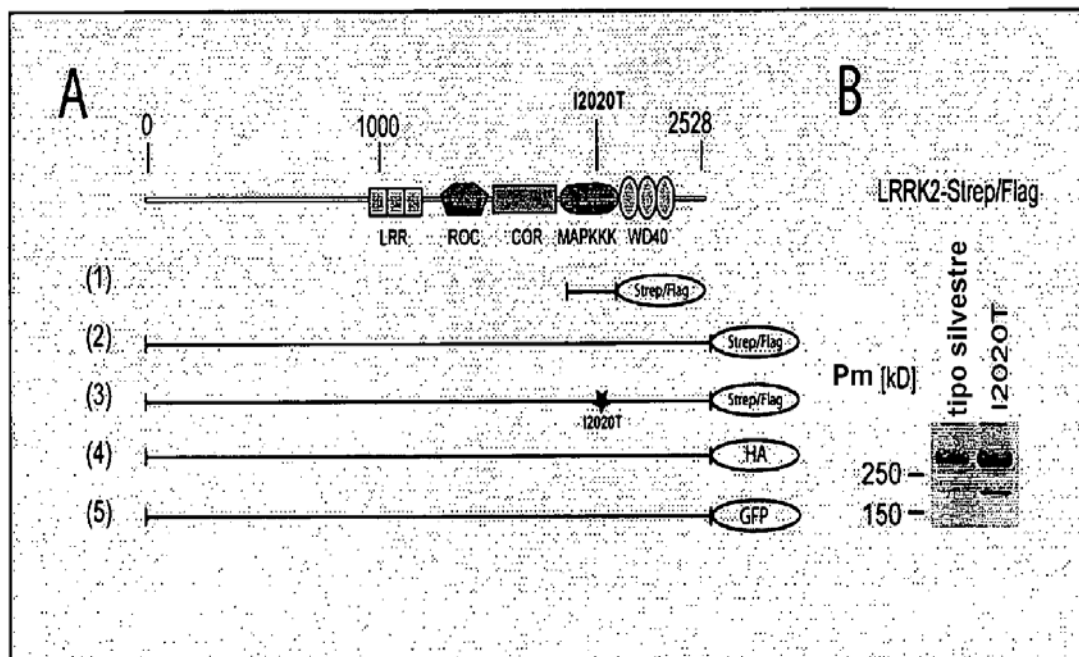


Figura 13:

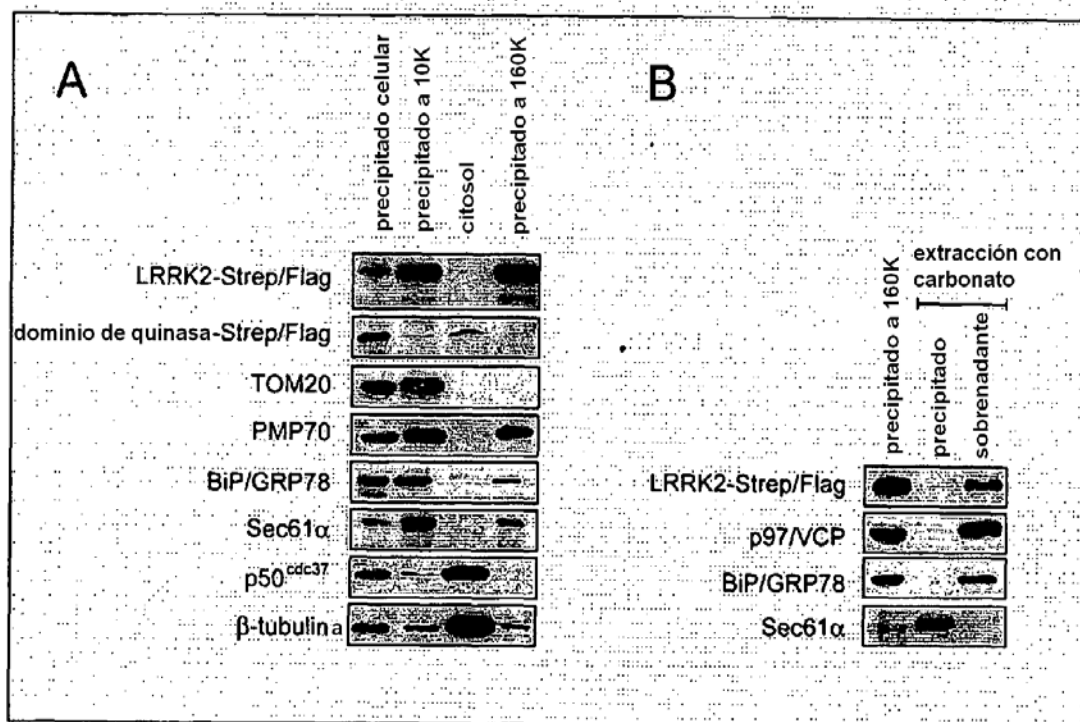


Figura 14:

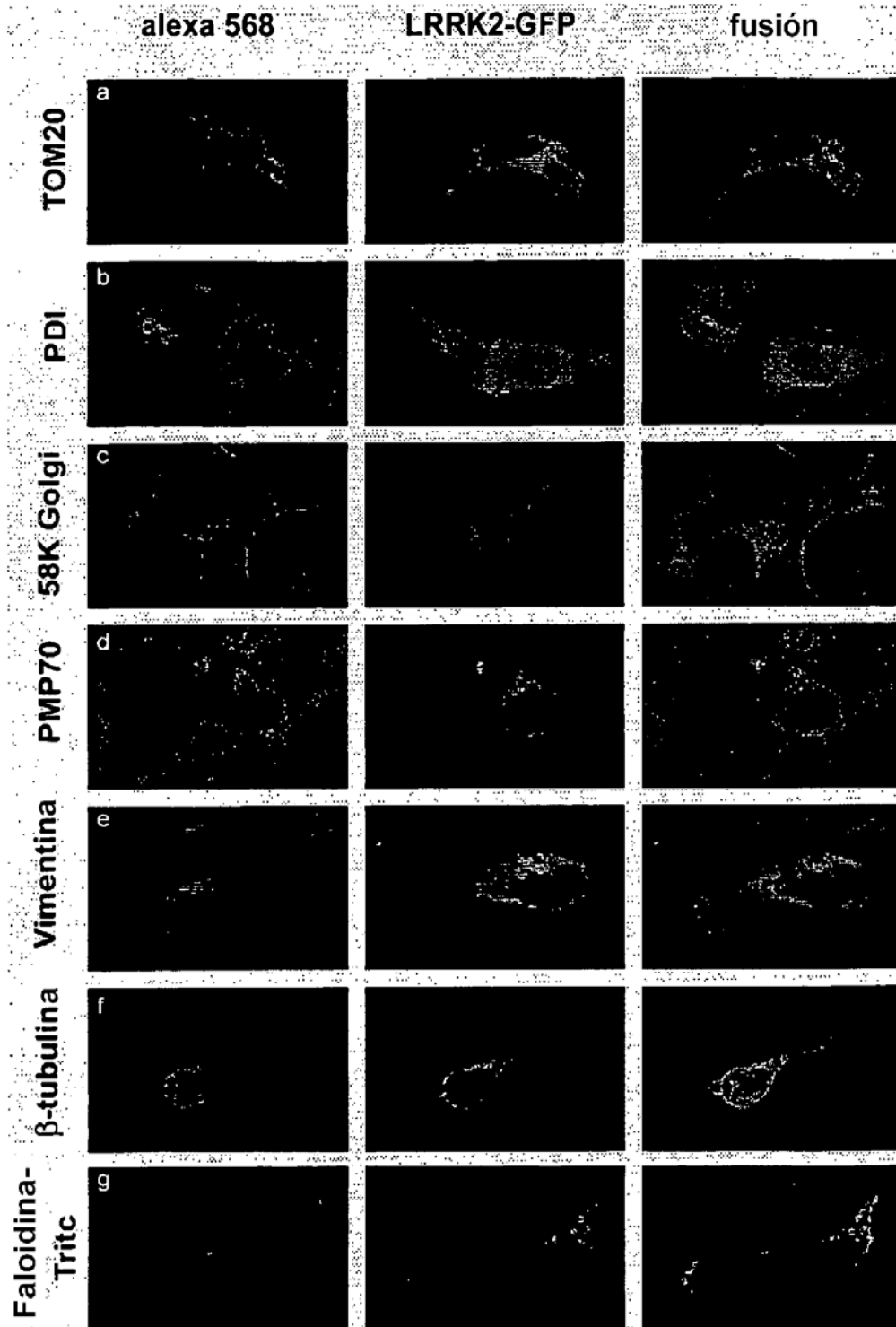


Figura 15:

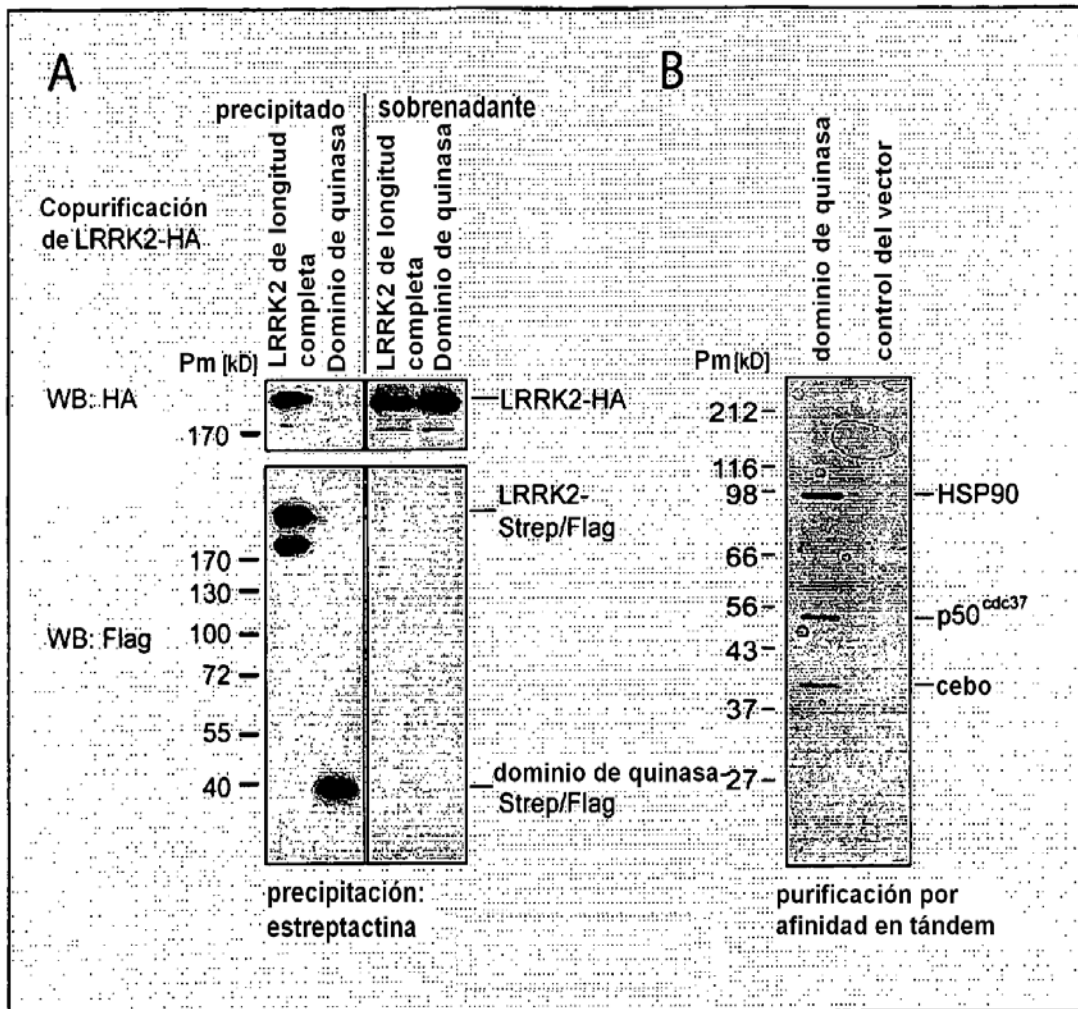


Figura 16:

