



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 374**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99916886 .7**

86 Fecha de presentación : **24.03.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1070253**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2001**

54 Título: **Uso de receptores hROR α para rastrear sustancias útiles para el tratamiento de la aterosclerosis.**

30 Prioridad: **29.03.1998 FR 98 03475**

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

72 Inventor/es: **Raspe, Eric y**
Bonhomme, Yves

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

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

ES 2 303 374 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de receptores hROR α para rastrear sustancias útiles para el tratamiento de la aterosclerosis.

5 La presente invención se refiere al uso de receptores ROR α humanos para rastrear compuestos que tienen una actividad antiaterosclerótica. La invención se refiere más particularmente a los diferentes métodos de rastreo que hacen posible identificar sustancias útiles para el tratamiento y/o la prevención de la aterosclerosis.

10 La invención también se refiere al uso de pruebas de rastreo para caracterizar, justificar y reivindicar el mecanismo de acción de sustancias para la preparación de composiciones terapéuticas destinadas al tratamiento y/o la prevención de la aterosclerosis.

15 Los receptores huérfanos ROR (receptor huérfano relacionado con receptor de ácido retinoico), también llamados RZR (17-19), constituyen una subfamilia de receptores nucleares para los que no se ha identificado un ligando.

Los receptores ROR existen en tres formas, ROR α , β , γ (17, 29, 20). Los receptores ROR se unen en forma monómera o dímera, cada uno a un elemento de respuesta específico que consiste en una secuencia rica en A/T que precede a una secuencia del tipo PuGGTCA (17, 21, 22) y modulan la transcripción de sus genes diana.

20 Después de la reparación alternativa, el gen de ROR α conduce a 4 isoformas, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y RZR α (17-19) que difieren en su dominio N-terminal y muestran reconocimiento de DNA y distintas propiedades de transactivación (17).

25 Se entenderá que los receptores ROR significan posteriormente en la presente memoria ROR así como RZR y ROR γ , así como, a no ser que se indique otra cosa, las diferentes isoformas de ROR α , $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y RZR α . La invención se refiere a cualquier receptor ROR de mamífero pero los receptores ROR humanos se prevén más particularmente.

30 El descubrimiento de ligandos para la familia de receptores huérfanos en general y de receptores ROR en particular y la definición de su papel en las propiedades de transcripción de ROR constituye un tema de investigación de importancia fundamental para la comprensión de los fenómenos de regulación de genes, especialmente de los genes implicados en ciertos estados patológicos (DN & P(3), abril de 1996).

35 La melatonina se ha propuesto como un ligando para un receptor de la familia de receptores nucleares huérfanos ROR/RZR (51). Asimismo, la solicitud de patente internacional PCT, publicada bajo el número WO 95/27202, basada en la enseñanza del artículo de Becker-André y otros, describe el uso de receptores RZR/ROR α para el rastreo de sustancias que poseen una actividad de melatonina de tipo antiartrítico, antitumoral o antiautoinmune.

40 Sin embargo, recientes estudios (52) desafían la capacidad efectiva de la melatonina para actuar como un ligando para la familia de receptores nucleares RZR/ROR α .

Por lo tanto, en la actualidad no existe una sustancia cuya capacidad para actuar como un ligando para un receptor de la familia RZR/ROR α esté claramente establecida.

45 Se conocen en la técnica anterior varios genes cuya expresión es regulada por los receptores nucleares. Entre ellos, puede mencionarse un trabajo reciente que muestra que los receptores ROR α están implicados en la regulación de la expresión del gen de apo A-I en ratones y ratas (53).

50 Recientemente, se observó una hipoalfalipoproteinemia sustancial en ratones cuyo gen ROR α está truncado y conduce a la síntesis de una proteína no funcional (ratón sg/sg).

Por otra parte, estos ratones sufren una aterosclerosis más pronunciada que los ratones SG/SG silvestres cuando se someten a un régimen proaterogénico. Esta respuesta exacerbada se atribuye al incremento en la respuesta inflamatoria en los ratones sg/sg y a la reducción sustancial en la expresión del gen de apo A-I (59).

55 Sin embargo, los resultados obtenidos en ratones no son directamente trasladables a seres humanos debido al hecho de que el gen humano para APO A-I parece ser insensible a ROR, lo que se ilustra por los resultados obtenidos por el solicitante y presentados en el anexo (Figura 13). En efecto, las secuencias de los promotores de los genes para APO A-I murino y humano divergen a nivel del sitio reconocido por ROR.

60 Los inventores han descubierto ahora, sorprendentemente, que los receptores ROR α humanos están implicados en la regulación de la expresión del gen de apo C-III tanto en ratones como en seres humanos.

65 La apolipoproteína C-III es una glicoproteína de 79 aminoácidos que se sintetiza en el hígado y en un menor grado en el intestino. Sin embargo, la apolipoproteína C-III, también denominada posteriormente en la presente memoria apo C-III, es un producto clave del metabolismo plasmático de los triglicéridos. Se ha observado que las concentraciones en plasma de apo C-III se correlacionan con el nivel en plasma de triglicéridos, tanto en población normal como en pacientes hipertrigliceridémicos (1-4).

Además, se ha observado que las apolipoproteínas y más particularmente apo C-III representan un papel principal en la aparición de enfermedades cardiovasculares. En efecto, el incremento en las concentraciones de apo C-III en las partículas lipoproteínicas que contienen apo B (apo C-III-LpB) está asociado con un incremento en el riesgo de enfermedades cardíacas coronarias (5).

También se ha presentado que una deficiencia en apo C-III provocaba un incremento en el catabolismo de las partículas de VLDL, mientras que un incremento en la síntesis de apo C-III se observaba en pacientes con hipertrigliceridemia (6, 7). Por lo tanto, apo C-III está directamente conectada con el catabolismo de los triglicéridos plasmáticos.

Además, estudios genéticos han demostrado una asociación entre ciertos polimorfismos del gen de apo C-III y altas concentraciones en plasma de apo C-III y triglicéridos (8, 9). Asimismo, la sobreexpresión de apo C-III humana en animales transgénicos tiene como consecuencia el desarrollo de una hipertrigliceridemia mientras que la eliminación del gen de apo C-III endógeno por combinación homóloga en ratones conduce a la reducción de las concentraciones en plasma de apo C-III y protege a los animales contra hipertrigliceridemia posprandial (10, 11). Además, el cruce de ratones que tienen el transgén de apo C-III humano con ratones heterocigóticos deficientes en receptores de LDL da como resultado la adquisición de varias características de hiperlipidemia familiar combinada y provoca una sensibilidad incrementada a la aterosclerosis: el gen de apo C-III es capaz de inducir el desarrollo de aterosclerosis (55).

Además, los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* indican que apo C-III actúa principalmente retardando el catabolismo de partículas ricas en triglicéridos a través de la inhibición de su ligazón a la superficie endotelial y sus lipólisis por lipasas específicas para lipoproteínas, así como interfiriendo con la depuración de partículas residuales en el plasma por el receptor de apo E (12-16).

Recientemente, se ha observado claramente que, además de los niveles en plasma de colesterol y su distribución de partículas, el nivel en plasma de triglicéridos es un factor de riesgo independiente del desarrollo de enfermedades coronarias (56). En efecto, varios estudios han demostrado una asociación entre el nivel en plasma de triglicéridos y la extensión y la gravedad de enfermedades coronarias diagnosticadas por angiografía (58). Finalmente, resultados recientes de estudios epidemiológicos y de experimentos clínicos sugieren acusadamente que un alto nivel de triglicéridos en circulación constituye un factor de riesgo independiente de las enfermedades coronarias (57).

La reducción en la expresión de apo C-III representa por lo tanto un objetivo predominante para identificar sustancias que poseen propiedades antiaterogénicas.

Lavrentiadou y otros han mostrado que la actividad promotora de apo C-III es modulada por heterodímeros de receptores nucleares dependientes de ligandos RXR α -RAR α , RXR α -T3R β y RXR α -PPAR α (62).

Ogami y otros han mapeado los elementos promotores requeridos para la transcripción hepática e intestinal del gen de apo C-III humano (63).

La presente invención se basa en la demostración de una nueva propiedad de los receptores ROR α humanos como regulador positivo de la transcripción del gen de apo C-III tanto en ratones como en seres humanos. Estos resultados se basan en particular en la observación realizada por los inventores de que la expresión del gen de apo C-III estaba intensamente reprimida en ratones tambaleantes ("staggerer") que se sabe que tienen una delección para el gen de ROR α que provoca la síntesis de una proteína no funcional (27).

Estos resultados pueden hacer posible establecer que los receptores ROR α humanos constituyen un nuevo factor para regular la expresión de genes implicados en el catabolismo de los triglicéridos y por lo tanto en la aterosclerosis.

Por consiguiente, el objetivo de la invención es ofrecer medios que hagan posible identificar nuevos ligandos para los receptores ROR α humanos capaces de modular la transcripción del gen de apo C-III y por lo tanto sean capaces de influenciar en la aterosclerosis, tanto en cuanto a su prevención como a su tratamiento.

La presente invención se refiere por lo tanto al uso de los receptores ROR α humanos, o a los receptores ROR α humanos y su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, para el rastreo de sustancias que tienen propiedades antiateroscleróticas.

La presente invención también se refiere al uso de los receptores ROR α humanos, o a los receptores ROR α humanos y su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, para la caracterización, la justificación y la reivindicación del mecanismo de acción de sustancias que tienen propiedades antiateroscleróticas.

La materia de la presente invención es por lo tanto un primer tipo de método para rastrear sustancias útiles en el tratamiento de disfunciones del metabolismo de los lípidos, que consiste en poner la sustancia de prueba en contacto con un receptor de los receptores ROR α humanos, o los receptores ROR α humanos y su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, y a continuación en medir mediante cualquier medio apropiado:

- la unión de dicha sustancia al receptor ROR α humano o la unión del complejo formado por dicha sustancia y el receptor ROR α humano a su elemento de respuesta, y/o

- la modulación de la actividad de transcripción de un gen puesto bajo el control de un promotor que comprende dicho elemento de respuesta.

La medida de la unión de la sustancia al receptor ROR α humano o la unión del complejo formado por dicha sustancia y el receptor ROR α humano a su elemento de respuesta puede llevarse a cabo mediante cualesquiera métodos directos o indirectos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los que usan un gen informador, pruebas de unión y similares.

De la misma manera, la medida de la modulación de la actividad de transcripción de un gen puesto bajo el control de un promotor que comprende el elemento de respuesta de ROR α humano puede llevarse a cabo mediante cualesquiera métodos directos o indirectos conocidos por los expertos en la técnica.

Para especificar el uso de la sustancia probada en el tratamiento de disfunciones del metabolismo de los lípidos, el método de la invención comprende una etapa adicional destinada a determinar mediante cualquier medio apropiado el efecto de dicha sustancia sobre la expresión de apo C-III. La determinación del efecto de la sustancia probada sobre la expresión de apo C-III puede llevarse a cabo mediante cualesquiera métodos directos o indirectos conocidos por los expertos en la técnica, tales como transfección, análisis de los mRNAs *in vitro* o en modelos *in vitro* e *in vivo* sobre animales no humanos.

Un primer ejemplo del método de rastreo de acuerdo con la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) un huésped celular es transfectado con un fragmento de DNA que codifica un receptor ROR α humano o uno de sus equivalentes funcionales,
- b) el huésped en la etapa (a) se cotransfecta con un constructo que comprende un elemento de respuesta humano de dicho receptor ROR α humano y al menos un gen informador,
- c) la expresión del gen informador en presencia de la sustancia de prueba se mide mediante cualquier medio apropiado.

El elemento de respuesta usado en la etapa (b) puede consistir, por ejemplo, en el fragmento del promotor de apo C-III entre las posiciones 1415 y +24.

Cualquier gen informador que haga posible medir la actividad de receptores nucleares en la secuencia que comprende su elemento de respuesta puede usarse en el método de rastreo de acuerdo con la invención. Entre estos, pueden mencionarse, sin que sean exclusivos, por ejemplo, el gen para cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), el gen para la luciferasa de luciérnaga (Luc) o de Renilla (Ren), el gen para fosfatasa alcalina (Pas) secretada o aquel para beta-galactosidasa (β -Gal). La actividad de las proteínas codificadas por estos genes puede medirse fácilmente mediante métodos convencionales y hace posible conocer el efecto de los receptores nucleares o la expresión de los genes midiendo la cantidad de proteínas producidas y/o su actividad enzimática.

Se entiende que los genes suicidas para la selección (tales como, por ejemplo, timidina quinasa del virus de herpes simple (44)) o los genes para la selección positiva (tales como, por ejemplo, genes para la resistencia a un antibiótico o a deficiencias nutricionales) también pueden considerarse genes informadores debido al hecho de que la supervivencia celular en medio selectivo es un reflejo de la actividad de estos genes.

La acción de los receptores ROR α humanos y más particularmente del receptor hROR α 1 sobre el gen para apo C-III presentada por los inventores hace posible, por supuesto, usar, en los constructos de la invención y los métodos de rastreo que los usan, el gen para apo C-III como gen informador.

En el método de rastreo de la invención, se entiende que huésped celular significa cualquier tipo de célula apropiada para la expresión de los genes anteriores, tales como, en particular, células mamíferas, bacterianas o de levadura o alternativamente células de insecto. Los vectores usados son, por supuesto, apropiados para el tipo de célula transfectada; pueden mencionarse plásmidos, virus o cromosomas artificiales.

Otro ejemplo de este primer tipo de método de rastreo de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- a) se crea un plásmido que comprende varias copias de un elemento de respuesta reconocido por ROR α humano tal como, por ejemplo, el sitio de consenso descrito por M. Lazar (43), el elemento o los elementos de respuesta identificados en el promotor de apo C-III. Estas copias del elemento de respuesta se clonan aguas arriba de un promotor heterólogo fuerte tal como el promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple, o un promotor homólogo fuerte tal como el promotor de apo C-III. Este promotor está situado él mismo a fin de controlar la expresión de un gen informador tal como luciferasa, CAT, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y similares.
- b) el constructo de la etapa (a) se transfecta en células que expresan ROR α humano naturalmente o artificialmente, es decir, después de la cotransfección transitoria de un vector de expresión o la creación de una línea estable que expresa ROR α humano.

- c) el huésped de la etapa (b) se incuba en presencia de la sustancia de prueba.
- d) la actividad del gen informador se mide mediante cualquier medio apropiado.

Un ejemplo adicional de este primer tipo de método comprende las siguientes etapas:

- a) se crea un plásmido que comprende varias copias de un elemento de respuesta reconocido por ROR α humano clonado aguas arriba de un promotor que controla la expresión de un gen suicida para selección, tal como, por ejemplo, el activador de un profármaco tóxico tal como timidina quinasa del herpesvirus (44).
- b) el constructo de la etapa (a) se transfecta a un huésped celular.
- c) el huésped de la etapa (b) se cotransfecta con la ayuda de un vector que expresa ROR α humano.
- d) el huésped de la etapa (c) se incuba en presencia de la sustancia de prueba.
- e) la supervivencia celular en presencia del profármaco tóxico se mide mediante cualquier medio apropiado.

El profármaco tóxico puede ser, por ejemplo, ganciclovir.

Otro ejemplo más de este primer tipo de método comprende las siguientes etapas:

- a) se crea un plásmido que comprende varias copias de un elemento de respuesta reconocido por el factor nuclear de levadura Gal4 clonado aguas arriba de un promotor fuerte tal como, por ejemplo, el promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple, que controla la actividad de un gen informador tal como luciferasa, CAT, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, hormonas del crecimiento, activadores de profármacos tóxicos (por ejemplo, timidina quinasa del virus del herpes simple) y similares.
- b) se crea otro plásmido a partir de una quimera que comprende el dominio de unión a DNA de Gal4 y los dominios DEF de ROR que son los dominios de ROR α humano a los que se unen los ligandos.
- c) los plásmidos obtenidos en las etapas (a) y (b) se cotransfectan a un huésped celular.
- d) el huésped de la etapa (c) se incuba en presencia de la sustancia de prueba.

La actividad del gen informador se mide mediante cualquier medio apropiado.

Los dominios DEF de los receptores nucleares difieren entre los diferentes miembros de esta familia. Comprenden secuencias implicadas en la transactivación de la transcripción y la unión de los ligandos y de los cofactores. Los dominios DEF de ROR α humano están comprendidos por el fragmento de Gal4 que contiene los primeros 147 aminoácidos de Gal4 para crear una quimera Gal4-ROR que se une al elemento de respuesta de Gal4 y cuya actividad de transcripción depende de los ligandos y/o los cofactores para ROR α humano (43).

La actividad básica de la quimera puede incrementarse mediante la inserción de un fragmento de DNA que codifica la totalidad o parte de la proteína VP16 (45).

Un ejemplo adicional de este primer tipo de método de rastreo consiste en la evaluación cuantitativa de los efectos de los compuestos probados en sistemas del tipo de "doble híbrido" en levaduras u otras células que comprenden los fragmentos de ROR que interactúan con cofactores y los correspondientes fragmentos de los cofactores (por ejemplo: N-COR, SMRT (43)) que acoplan ROR a la maquinaria de transcripción y en particular al complejo de RNA polimerasa.

Otro ejemplo del primer tipo del método de rastreo de acuerdo con la invención consiste en evaluar cuantitativamente los efectos de los compuestos probados sobre la capacidad para la interacción *in vitro* entre la proteína de ROR α humano de longitud completa o algunos de sus fragmentos y cofactores o algunos de sus fragmentos mediante cualquier técnica conocida en el estado de la especialidad (por ejemplo, mediante el sistema CARLA desarrollado para el rastreo del ligando PPAR (42), método de medida de transferencia de energía por fluorescencia de resonancia).

Un ejemplo final del primer tipo de método de rastreo de acuerdo con la invención consiste en transformar una célula huésped como la definida anteriormente con un constructo que tiene un gen que codifica los receptores ROR α humanos, o los receptores ROR α humanos y su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, y a continuación en usar dichos huéspedes celulares o extractos de los mismos en pruebas de unión basadas en el desplazamiento competitivo entre un ligando frío y un ligando marcado.

La materia de la presente invención es también las sustancias seleccionadas por un método de rastreo de acuerdo con la presente invención, así como el uso de estas sustancias para la preparación de una composición, especialmente

una composición farmacéutica, que reprime la expresión de apo C-III y por lo tanto está destinada para el tratamiento de disfunciones del metabolismo de los lípidos en seres humanos o animales. En efecto, los compuestos que tienen tales propiedades se seleccionan sobre la base de su capacidad para reprimir la expresión de apo C-III, y pueden ser ligandos ROR α humanos o análogos de ROR α humanos, cuyas propiedades se demuestran bien directamente a partir del nivel de expresión de apo C-III o bien a través de la expresión de un gen informador, o alternativamente por su capacidad para formar un complejo con el receptor ROR α humano.

Por lo tanto, la invención se refiere más generalmente al uso de una sustancia capaz de modular la expresión de apo C-III para la preparación de una composición, especialmente una composición farmacéutica, útil para el tratamiento y/o la prevención de disfunciones del metabolismo de los lípidos relacionadas con apolipoproteína C-III en seres humanos o animales. Más particularmente, la invención se refiere al uso de una sustancia capaz de unirse al receptor ROR α humano o a su elemento de respuesta para la preparación de una composición farmacéutica útil para el tratamiento y/o la prevención de disfunciones del metabolismo de los lípidos en seres humanos o animales.

La materia de la presente invención también es el uso de los métodos de rastreo de acuerdo con la presente invención para caracterizar, justificar y reivindicar el mecanismo de acción de sustancias capaces, mediante la unión a y mediante la modulación de la actividad de ROR α humano, de modular la expresión de apo C-III para la preparación de una composición, especialmente una composición farmacéutica, útil para el tratamiento y/o la prevención de disfunciones del metabolismo de los lípidos relacionadas con apolipoproteína C-III en seres humanos o animales.

Otras ventajas y características de la invención se harán evidentes a partir de los siguientes ejemplos que describen la activación del promotor de apo C-III por el receptor ROR α humano.

I. Métodos

1. Cultivo celular

La línea HepG2 (hepatoma humano) se obtiene de E.C.A.C.C. (Porton Down, Salisbury, Reino Unido) mientras las células RK13 (riñón de conejo) fueron ofrecidas por C. Lagros (laboratorio del Prof. Stéhelin). Estas líneas se mantuvieron bajo condiciones de cultivo estándar (medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco), se complementaron con suero de ternero fetal al 10%, incubación a 37°C bajo una atmósfera húmeda de CO₂ al 5%/aire al 95%. El medio de cultivo se cambia cada dos días.

2. Construcción de los plásmidos recombinantes

La actividad del promotor del gen de apo C-III se estudió de acuerdo con técnicas convencionales usando genes informadores. Los constructos -1415/+24hCIIWT-CAT, -1415/+24hCIIIC3P5' KO-CAT, -198/+24hCIIIWT-CAT y -198/+24hCIIIC3P5' KO-CAT, que comprenden fragmentos del promotor del gen humano para apo C-III, que son silvestres o están mutados a nivel del semisitio TGGGCA presente en la posición 5' del sitio C3P clonado aguas arriba del gen informador de CAT, se han descrito previamente (61). El constructo RORETkCAT que comprende una copia del elemento de respuesta de consenso de hROR α se ha descrito previamente (53). El fragmento -2051/+26 del gen humano para apo A-I se cortó con la ayuda de la enzima KpnI a partir de un clon aislado de una biblioteca de DNA genómico en γ _Charon 4A, se hizo romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa y se clonó antes del gen informador de CAT en el vector pBLCAT5, al nivel del sitio XbaI hecho romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa para crear el constructo -2051/+26hAIWT-CAT. El constructo hAITaTaTkCAT que comprende una copia del sitio de la caja TaTa del gen humano para apo A-I clonado antes del promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple se obtuvo de acuerdo con el protocolo descrito para el constructo RORETkCAT usando los oligonucleótidos hAIFI y hAIR1 (Tabla 1). Para intercambiar el gen informador de CAT de los constructos que comprenden fragmentos del promotor del gen humano para apo C-III clonado aguas arriba del gen informador de CAT por el gen informador Luc+, el gen informador de luciferasa Luc+ del vector informador pGL3 (Promega) se cortó con las enzimas SacI y BamHI y se subclonó en los sitios correspondientes del vector pBKCMV (Stratagene) para formar el vector pBKCMVLuc+. El gen informador de CAT de los constructos -1415/+24hCIIWT-CAT y -1415/+24hCIIIC3P5' KO-CAT se cortó con las enzimas KpnI y BamHI. A continuación, se reemplazó por el gen informador Luc+ obtenido mediante digestión del plásmido pBKCMV-Luc+ con las enzimas BglII y KpnI para crear los plásmidos -1415/+24hCIIWT-Luc+ y -1415/+24hCIIIC3P5' KO-Luc+. Los mutantes puntuales del promotor de apo C-III -1415/+24hCIIIC3P3' KO-Luc+, -1415/+24hCIIIC3P5'+3' KO-Luc+, -1415/+24hCIIITaTaKO-Luc+, -1415/+24hCIIITaTa+C3P5' KO-Luc+, -1415/+24h-CIII-TaTa+C3P3' KO-Luc+ se obtuvieron con la ayuda del estuche "Quick Change Site Directed Mutagenesis" (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante usando los oligonucleótidos hC3F20/hC3R20, hC3F30/hC3R30 y hC3F29/hC3R29 (Tabla 1), respectivamente. El plásmido Tk-Luc+ se construyó insertando el gen informador Luc+ obtenido mediante digestión del plásmido pBKCMV-Luc+ con las enzimas BglII y KpnI en el vector pBLCAT4 (29) cortado con BglII y KpnI en lugar del gen informador de CAT. Los constructos (RevDR2)_{3x} TkLuc+ y (RevDR2M3')_{3x} TkLuc+ se obtuvieron intercambiado el gen informador de CAT de los constructos correspondientes por el gen informador Luc+ (digestión con BglII/EcoRI). Los correspondientes constructos de CAT se obtuvieron mediante la estrategia previamente descrita (59) usando los oligonucleótidos 1129/1142 y 1126/1132 (Tabla 1). El plásmido -1415/+24hCIIWT-Luc+ se digirió con HindIII para cortar el promotor de apo C-III. El fragmento de DNA obtenido se insertó a continuación en el sitio HindIII de los plásmidos pGL3 (Promega) y pSL301 (Pharmacia) para crear los constructos -1415/+24hCIIWTpGL3 y -1415/+24hCIIWTpSL301. La orientación del inserto se definió a continuación. El constructo -198/+24hCIIWTpGL3 se obtuvo mediante digestión

del constructo -1415/+24hCIIIpGL3 con PstI y religación. El constructo -1415/+24hCIIIWTPSL301 se digirió a continuación parcialmente con la enzima EcoO109I y se autorreligó para crear el constructo -108/+29hCIIIWTPSL301. El fragmento -108/+24 del promotor de apo C-III se clonó a continuación en los sitios XmaI y HindIII del vector pGL3 para crear el constructo -108/+24hCIIIWTPGL3. Para crear el constructo -62/+24hCIIIWTPGL3, el constructo -1415/+24hCIIIWTPSL301 se digirió exhaustivamente con la enzima EcoO109I, se hizo romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa y se autorreligó. El fragmento -62/+24 del promotor de apo C-III se clonó a continuación en los sitios XmaI y HindIII del vector pGL3. El plásmido pTk-pGL3 se construyó amplificando, mediante PCR, el fragmento del promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple presente en el plásmido pBLCAT4 con la ayuda de los cebadores 514 y 510 (Tabla 1), digiriendo el fragmento de PCR obtenido con las enzimas BglII y HindIII e insertándolo en los sitios correspondientes del vector pGL3. Los constructos (-27/-58)_{3x} hCIIIITkpGL3, (-58/-27)_{8x} hCIIIITkpGL3 y (-47/-79)hCIIIITkpGL3 se obtuvieron de acuerdo con la estrategia descrita anteriormente (Vu Dac y otros, JCI, 96, 741-750, 1995) con la ayuda de los oligonucleótidos hC3F15/hC3R15 y hC3F17/hC3R17, respectivamente. Los constructos intermedios en el vector pic20H se digirieron con las enzimas SalI y XhoI. Los insertos obtenidos se clonaron a continuación en el sitio XhoI del vector TkpGL3 y su orientación se definió mediante la secuencia. Los oligonucleótidos hC3F18 y hC3R18 se usaron como cebadores para crear, mediante PCR con la ayuda de la polimerasa de Pfu (Stratagene), un fragmento de DNA que contiene varias copias del fragmento -30/-15 del promotor de apo C-III. Este fragmento se digirió con las enzimas XhoI y SpeI y se insertó en el vector TkpGL3 previamente cortado con las enzimas NheI y XhoI para crear el constructo (-30/-15)_n TkpGL3. Los oligonucleótidos hC3F22 y hC3R22 se usaron como cebadores para crear, mediante PCR con la ayuda de la polimerasa de Pfu (Stratagene), un fragmento de DNA que contiene varias copias del fragmento-103/-73 del promotor de apo C-III. Este fragmento se digirió con las enzimas XhoI y SpeI y se insertó en el vector TkpGL3 previamente cortado con las enzimas NheI y XhoI para crear el constructo (-76/-100)_{2x} TkpGL3. El plásmido pG5TkpGL3 se obtuvo insertando 5 copias del elemento de respuesta del factor de transcripción de levadura Gal4 (sitio 17 m) (46) aguas arriba del promotor de Tk en el plásmido TkpGL3.

Los plásmidos pCMX-hROR α 1, pCMX-hROR α 2, pCMX-hROR α 3 que permiten la expresión exógena de los receptores nucleares correspondientes se han obtenido y descrito anteriormente (47). El plásmido pCDNA3-hROR α 1 se construyó restringiendo el plásmido pCMX-hROR α 1 con la ayuda de las enzimas KpnI y parcialmente con XbaI y clonando el inserto en los sitios correspondientes del vector pCDNA3. Para generar el plásmido pSG5-hROR α 1, el plásmido pCMX-hROR α 1 se digirió con la enzima KpnI, se hizo romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa y se digirió con BamHI. El inserto obtenido se clonó en el vector pSG5 digerido con EcoRI, se hizo romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa y se digirió con BamHI. El plásmido pGal4- ϕ se construyó subclonando el dominio de unión a DNA del factor de transcripción de levadura Gal4 presente en el plásmido pBDGal4 (Stratagene) en los sitios HindIII-EcoRI del vector pCDNA3. Para generar el plásmido pBDGal4-hROR α DEF, el plásmido pSG5-hROR α 1 se cortó con la enzima XhoI, se hizo romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa y se digirió con XmaI. Este inserto se clonó a continuación en el vector pBDGal4 previamente restringido con EcoRI, hecho romo mediante tratamiento con el fragmento de Klenow de DNA polimerasa y digerido con XmaI. El plásmido pBDGal4-hROR α DEF se digirió a continuación con las enzimas HindIII y EcoRI. El inserto obtenido se clonó en los sitios correspondientes del vector pCDNA3 para crear el plásmido pGal4-hROR α DEF.

Todos los constructos se comprobaron mediante secuenciación.

3. Transfección transitoria y medida de la actividad promotora de apo C-III humana

La actividad de los receptores nucleares se midió mediante técnicas de gen informador/cotransfección convencionales. El DNA se introdujo en las células estudiadas usando tecnologías comunes disponibles en el laboratorio (fosfato cálcico, electroporación, lipofección y similares). Los vectores pSG5, pCDNA3 y pCMX se usaron como controles negativos. En los experimentos llevados a cabo con la ayuda de la técnica de precipitación de fosfato cálcico, las células cultivadas en placas sobre placas de cultivo de 60 mm se transfectaron a 50-60% de confluencia con una mezcla de plásmidos que comprendía, además de los plásmidos informadores CAT, Luc+ o pGL3 (0,5 μ g/placa de 60 mm) y los vectores de expresión pSG5-hROR α 1, pCMX-hROR α 1, pCMX-hROR α 2 y pCMX-hROR α 3 (0,1-1 μ g/placa de 60 mm), 0,1 μ g/placa de 60 mm de plásmido pCMV- β -gal (Clontech) usado como control para la eficacia de transfección (30). Después de 5 a 6 horas, las células se lavaron dos veces con la ayuda de un tampón de lavado (NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M, pH 7,2) y se incubaron durante 36 horas en medio de cultivo reciente que contenía suero de ternero fetal al 10%. Después de la transfección, las células se sometieron a lisis y las actividades de luciferasa y β -galactosidasa se midieron de acuerdo con protocolos convencionales (31). Para los experimentos llevados a cabo mediante lipofección, las células se cultivaron en placa sobre placas de 24 pocillos en una cantidad de 10.000 células por pocillo y se incubaron durante 16 horas a 37°C antes de la transfección. Las células se transfectaron a continuación durante 2 horas a 37°C en un medio de cultivo libre de suero con la ayuda de un lípido catiónico. Los plásmidos (vectores informadores: 50 ng/pocillo; vectores de expresión: 100 ng/pocillo, vectores para el control de la eficacia de transfección: pSV- β gal (Promega) (50 ng/pocillo) y DNA portador (pBluescript (Stratagene) añadido para llevar la cantidad de DNA transfectado hasta 500 ng/pocillo) se disolvieron en DMEM libre de suero complementado con NaCl (150 mM), bicarbonato sódico (50 mM) y lípido catiónico (6 nmol/ μ g de DNA), se sometieron a turbulencia, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a las células. Después de incubación durante 2 horas, las células se enjuagaron con la ayuda del tampón de lavado descrito anteriormente y se incubaron durante 36 horas en medio de cultivo reciente que contenía suero de ternero fetal al 10%. Al final del experimento, las células se enjuagaron con la ayuda del tampón de lavado y la actividad de luciferasa se midió con la ayuda del estuche "Dual-

Luciferase™ Reporter Assay System” de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El contenido de proteína de los extractos obtenidos se añadió mediante la técnica de Bradford con la ayuda del estuche “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad).

5 4. Retardo en gel

La proteína hRoRα1 se sintetizó *in vitro* partiendo del plásmido pCMX-hRoRα1 mediante la técnica del lisado de reticulocitos con la ayuda del estuche “TnT T7 quick coupled transcription/translation system” de Promega. Los experimentos de retardo en gel se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente (48 y 49) usando oligonucleótidos de doble hebra fosforilados en los extremos usando polinucleótido quinasa en presencia de [γ -³²P] ATP. 500 picomoles de oligonucleótidos 82 y 512 se marcaron con la ayuda de polinucleótido quinasa y [γ -³²P]ATP, se purificaron sobre una matriz de sílice (Quiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se usaron como cebadores para amplificar el fragmento -198/+24 del promotor de apo C-III usando el plásmido -198/+24hCIIIWT-Luc+ como plantilla. El fragmento de PCR obtenido se purificó a continuación sobre una matriz de sílice (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se usó como sonda.

La identidad de los oligonucleótidos usados para sintetizar los DNAs de doble hebra usados como sondas se describe en la Tabla 2.

Los oligonucleótidos de doble hebra se obtuvieron incubando 2,5 ó 5 μ g de oligonucleótidos de sentido o antisentido diluidos en tampón de hibridación (Tris-HCl 50 mM, pH 8, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 10 mM) a 100°C durante 10 min y a continuación a 65°C durante 10 min y enfriando lentamente la mezcla hasta temperatura ambiente. Se fosforilaron en los extremos 5' usando polinucleótido quinasa en presencia de [γ -³²P]ATP según se describe anteriormente (48 y 49).

El tampón de unión tenía la siguiente composición: Hepes 10 mM, KCl 50 mM, glicerol al 1%, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1,25 mM, 0,1 μ g/ μ l de polidIdC, 50 ng/ μ l de DNA de esperma de arenque, 1 μ g/ μ l de albúmina de suero bovino, lisado de reticulocitos al 10%.

Durante los experimentos de competición, concentraciones crecientes de oligonucleótidos de doble hebra no marcados (exceso molar de 10 a 100 veces) se añadieron a las mezclas y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente antes de la adición de las sondas radiactivas. Después de la adición de las sondas radiactivas, los lisados de reticulocitos se añadieron a la mezcla y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente antes de la separación de los complejos de proteína/DNA mediante electroforesis sobre un gel de poliacrilamida (4%) en 0,25 x tampón de Tris-borato-EDTA a temperatura ambiente (50).

5. Ratones

Los ratones mutantes homocigóticos tambaleantes (sg/sg) desarrollan, en comparación con el tipo silvestre C57BL/6 SG/+SG, ataxia y neurodegeneración cerebral (23, 24) así como anomalías inmunitarias, tales como hiperproducción de citoquinas inflamatorias (26, 25). Los ratones sg/sg tienen una delección en el gen de RORα. Esta delección impide la traducción del dominio de unión al ligando putativo, rompiendo de ese modo el funcionamiento de este factor de transcripción (27). La mutación tambaleante que se mantiene en el genoma C57BL/6 que permite el análisis del desarrollo de lesiones ateroscleróticas después de someter a una región aterogénica, los perfiles de lipoproteína y apolipoproteína en plasma, la extensión de las placas de grasa en la aorta y la incidencia de aterosclerosis en las arterias coronarias se determinaron sometiendo ratones sg/sg a un régimen aterogénico rico en grasa y comparándolos con ratones +/+ C57BL/6. Los resultados mostraban que los ratones sg/sg desarrollan aterosclerosis grave, lo que sugiere el papel importante de RORα en enfermedades cardiovasculares.

Los ratones C57BL/6 macho y hembra (de 6 a 8 semanas de edad) se obtuvieron de CERJ (Francia), los ratones mutantes tambaleantes (sg/sg) se obtuvieron cruzando heterocigóticos conocidos (+/sg) e identificando la progenie homocigótica por su ataxia. La mutación sg se desarrolló en un fondo genético C57BL/6.

6. Análisis de los RNAs

Los ratones son sacrificados con una sobredosis de éter. Las extracciones de RNA, las hibridaciones “northern” y de “transferencia de gotas” y las medidas de los niveles de RNA mensajero para apo C-III se llevan a cabo como se describe anteriormente (32). El clon de cDNA de 36B4 (33) que codifica fosfoproteína ribosómica ácida humana PO (34) se usa como control. Las sondas de cDNA se marcan usando hexámeros aleatorios como cebadores (Boehringer Mannheim). Los filtros se hibridan con $1,5 \times 10^6$ cpm/ml de cada sonda según se describe (35). Se lavan una vez en 0,5 x SSC y SDS al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente y dos veces durante 30 minutos a 65°C y a continuación se exponen subsiguientemente a película de rayos X (X-OMAT-AR, Kodak). Los autorradiogramas se analizan mediante densitometría de exploración cuantitativa (densitómetro Biorad GS670) y los resultados se normalizan con relación a los niveles de RNA mensajero de 36B4 (35).

II. Figuras

Figura 1: Estimulación de la actividad del promotor del gen de apo C-III con hROR α 1 en células HepG2.

Figura 2: Activación del promotor de apo C-III con hROR α 1: comparación de tres vectores de expresión y de dos métodos de transfección.

Figura 3: Comparación de la estimulación de la actividad del promotor de apo C-III clonado en dos vectores informadores diferentes.

Figura 4: Estimulación de la actividad del promotor del gen de apo C-III humano clonado en el vector pBLCAT5 con hROR α 1 en células RK13.

Figura 5: Estimulación de la actividad del constructo -1415/+24hCIIIWT-Luc+ con cantidades crecientes de plásmido pCDNA3-hROR α 1 cotransfectado en células RK13.

Figura 6: Estimulación de la actividad de fragmentos de tamaño decreciente del promotor del gen de apo C-III humano clonado en el vector pGL3 con hROR α 1 en células RK13.

Figura 7: Evaluación de la unión de hROR α 1 al promotor proximal del gen humano para apo C-III mediante retardo en gel.

Figura 8: Evaluación de la unión de hROR α 1 al fragmento -34/-10 del promotor del gen humano para apo C-III mediante retardo en gel.

Figura 9: Evaluación de la unión de hROR α 1 a los fragmentos -34/-10 y -62/-100 del promotor del gen humano para apo C-III mediante retardo en gel.

Figura 10: Evaluación de la unión de hROR α 1 al fragmento -90/-64 del promotor del gen humano para apo C-III mediante retardo en gel.

Figura 11: Estimulación de la actividad de mutantes puntuales del promotor del gen de apo C-III humano con hROR α 1 en células RK13.

Figura 12: Estimulación de la actividad de fragmentos del promotor del gen de apo C-III humano clonado antes del promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple con hROR α 1 en células RK13.

Figura 13: Novedad de la activación con hROR α 1 del promotor de apo C-III humana.

Figura 14: Estimulación de la actividad del promotor del gen de apo C-III humano con las isoformas α 1, α 2 y α 3 de hROR α en células RK13.

Figura 15: Expresión hepática del gen de apo C-III en ratones mutantes sg/sg o silvestres SG/SG.

Figura 16: Validación de un vector informador apropiado para los rastreos de sustancias capaces de modular la actividad de hROR α .

Figura 17: Validación de una prueba de rastreo para sustancias capaces de modular la actividad de hROR α basándose en el uso de una quimera que comprende el dominio de unión a DNA del factor de transcripción de levadura Gal4 y los dominios de unión a ligando DEF de hROR α .

III. Resultados

1. hROR α activa el promotor de apo C-III humana en células HepG2

La Figura 1 ilustra la sensibilidad del promotor del gen humano para apo C-III a la expresión exógena del receptor nuclear hROR α 1 inducida en células HepG2.

En esta figura, las células HepG2 se cultivaron en placa sobre placas de cultivo de 60 mm y se transfirieron a 50-60% de confluencia mediante la técnica del fosfato cálcico con 500 mg/placa de vector informador -1415/+24hCIIIWT-Luc+, 1 μ g/placa de vector de expresión pCMX (control negativo) o pCMX-hROR α 1, según se indique, y 100 ng/placa del plásmido pCMV- β gal usado como control para la eficacia de transfección. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa y β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con protocolos convencionales (31).

Estas células se cotransfectaron con un plásmido informador que contenía la parte del promotor del gen de apo C-III entre las posiciones -1415 y +24 clonada aguas arriba del gen informador de luciferasa (-1415/+24hCIIIWT-Luc+) y el vector de expresión pCMX-hROR α 1. Esta observación sugiere la presencia de un elemento de respuesta de receptor nuclear hROR α 1 en la porción -1415/+24 del promotor de apo C-III humana.

2. *hROR activa el promotor de apo C-III humana en células RK13*

Para determinar si la activación del promotor de apo C-III humana con hROR α 1 depende del contexto celular y para identificar un modelo experimental más estable que las células HepG2, el experimento se repitió sobre células RK13. Se obtienen resultados similares (Figura 2).

En el experimento 1, las células RK13 se cultivaron en placa sobre placas de cultivo de 60 mm y se transfectoron a 50-60% de confluencia mediante la técnica del fosfato cálcico con 500 ng/placa de vector informador -1415/+24hCIIIWT-Luc+, 1 μ g/placa de vector de expresión pCMX o pSG5 (controles negativos) o pCMX-hROR α 1 o pSG5-hROR α 1, según se indique, y 100 ng/placa del plásmido pCMV- β gal usado como control para la eficacia de transfección. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa y β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con protocolos convencionales (31). En el experimento 2, 10.000 células RKJ.3 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectoron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vector informador -1415/+24hCIIIWT-Luc+, 100 ng/pocillo de vector de expresión pCMX o pCDNA3 o pCMX-hROR α 1 o pCDNA3-hROR α 1, según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche "Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System" de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

Este modelo, cuyo fenotipo es más constante que el de las células HepG2, se usará por lo tanto subsiguientemente para la caracterización del efecto de hROR y de sus isoformas.

3. *El efecto de hROR α 1 es independiente del modo de transfección, el vector de expresión y el gen informador usados*

La activación del constructo -1415/+24hCIIIWT-Luc+ con pCMX-hROR α 1 se observa independientemente del protocolo de transfección usado, precipitación de DNA con fosfato cálcico o lipofección (Figura 2). Puesto que la eficacia de transfección mediante el segundo método es superior, puesto que las cantidades de DNA usadas pueden reducirse sustancialmente y puesto que la transfección puede llevarse a cabo en presencia de un exceso de DNA portador inerte, se prefiere el último método. La activación del constructo -1415/+24hCIIIWT-Luc+ con hROR α 1 se observa con los vectores pCMX-hROR α 1, pSG5-hROR α 1 y pCDNA3-hROR α 1 (Figura 2). Puesto que la expresión exógena de hROR α 1 inducida por el vector pCDNA3-hROR α 1 parece ser más eficaz (datos no ilustrados) y puesto que el vector vacío pCDNA3 interfiere poco con la actividad básica del constructo -1415/+24hCIIIWT-Luc+, este vector se usa preferiblemente. La activación de la porción entre las posiciones -1415 y +24 del promotor de apo C-III se observa cuando se clona antes del gen informador Luc+ en el vector Luc+ o en el vector pGL3 (Promega) (Figura 3) así como antes del gen informador de CAT en el vector pBLCA5 (Figura 4).

En la Figura 3, 10.000 células RK13 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectoron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vector informador -1415/+24hCIIIWT-Luc+ (señalado -1415/+24WTLuc+) o -1415/+24hCIIIWTpGL3 (señalado -1415/+24hWTpGL3), según se indique, 100 ng/pocillo de vector de expresión pCDNA3 o pCDNA-hROR α 1, según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche "Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System" de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

En la Figura 4, las células RK13 se cultivaron en placas sobre placas de cultivo de 60 mm y se transfectoron a 50-60% de confluencia mediante la técnica del fosfato cálcico con 500 ng/placa de vector informador -1415/+24hCIIIWT-CAT (señalado -1415/+24WTCAT), pBLCAT5 o pBLCAT4 (30), según se indique, 1 μ g/placa de vector de expresión pSG5 (control negativo) o pSG5-hROR α 1, según se indique, y 100 ng/placa de plásmido pCMV- β gal usado como control para la eficacia de transfección. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de CAT y β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con protocolos convencionales (31).

En conclusión, la activación con hROR α 1 de la porción entre las posiciones -1415 y +24 del promotor de apo C-III es observable en todos los sistemas experimentales probados: el efecto es robusto.

4. *El efecto de hROR α 1 depende de la cantidad de vector de expresión transfectado*

La Figura 5 ilustra la dependencia del efecto de hROR α 1 sobre la actividad del constructo -1415/+24hCIIIWT-Luc+ en relación con la cantidad de vector de expresión transfectado.

En la Figura 5, 10.000 células RK13 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectoron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vector informador -1415/+24hCIIIWT-Luc+ (señalado -1415/+24WTLuc+), de 0 a 100 ng/pocillo de vector de expresión pCDNA3-hROR α 1 (complementado con el plásmido pCDNA3 para mantener el número de unidades de transcripción constante), según se indique, y 50 ng

de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche “Dual-Luciferase™ Reporter Assay System” de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el

5. El efecto de hROR α 1 es específico

En la Figura 6, 10.000 células RK13 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectaron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vectores informadores -1415/+24hCIIIWTPGL3 (señalado -1415/+24WTPGL3), -198/+24hCIIIWTPGL3 (señalado -198/+24WTPGL3), -108/+24hCIIIWTPGL3 (señalado -108/+24WTPGL3), -62/+24hCIIIWTPGL3 (señalado -62/+24WTPGL3), pGL3 y TkpGL3 (controles negativos), según se indique, 100 ng/pocillo de vector de expresión pCDNA3 o pCDNA3-hROR α 1, según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche “Dual-Luciferase™ Reporter Assay System” de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

Las Figuras 4 y 6 indican que la actividad del gen informador de los vectores libres de promotor (pBLCAT5, pGL3), en el que se clona el fragmento entre las posiciones -1415 y +24 del promotor de apo C-III, no se incrementa por la expresión exógena de hROR α 1. Por otra parte, la actividad de un promotor heterólogo, el promotor del gen de timidina quinasa del virus del herpes simple, también es insensible a la acción de hROR α 1. El efecto de este receptor nuclear sobre el promotor del gen humano para apo C-III es por lo tanto específico.

6. Identificación del mecanismo molecular de acción de hROR α 1

a. Análisis de los mutantes de delección del promotor

La Figura 6 muestra una disminución gradual en la actividad de hROR α 1 cuando el fragmento del promotor de apo C-III clonado aguas arriba de un gen informador está truncado hasta la posición -108 (constructo -108/+24hCIIIWTPGL3). La respuesta a hROR α 1 desaparece partiendo de la delección -62/+24hCIIIWTPGL3. Esto sugiere la presencia de elementos de secuencia esenciales para la actividad de hROR α 1 entre las posiciones -62 y -108. La diferencia en la sensibilidad a hROR α 1 observada entre los constructos -1415/+24hCIIIWTPGL3 y -198/+24hCIIIWTPGL3 (Figura 6) sugiere la presencia, en la región entre las posiciones -1415 y -198, de elementos de respuesta de hROR α 1 de un sitio de unión de factores nucleares que actúan en sinergia con hROR α 1. El papel de tales sitios en el control de la actividad del promotor de apo C-III, por ejemplo, mediante el factor nuclear NHF4, se conoce en el estado de la técnica (60).

b. Análisis del promotor mediante retardo en gel

Para validar *in vitro* la unión de hROR α 1 al fragmento -198/+24 del promotor de apo C-III, se amplificó mediante PCR con la ayuda de cebadores marcados radiativamente con [γ -³²P]ATP y se purificó. Por otra parte, la proteína de hROR α 1 se sintetizó *in vitro* a partir del plásmido pCMX-hROR α 1 con la ayuda de lisado de reticulocitos de conejo. El DNA marcado se incubó en presencia de lisado de reticulocitos que contiene la proteína de hROR α 1 o lisado no programado para expresar la proteína. Los complejos de DNA/proteína así obtenidos se resolvieron a continuación sobre gel de poliacrilamida (método de “retardo en gel”). Se identificó un complejo específico para hROR α 1 en el fragmento -198/+24 y se señala con una flecha en la Figura 7.

En la Figura 7, el fragmento -198/+24 del promotor del gen humano para apo C-III se amplificó mediante PCR con la ayuda de los cebadores 32 y 512 (Tabla 1) previamente fosforilados en el extremo 5' mediante polinucleótido quinasa en presencia de [γ -³²P]ATP. Esta sonda se incubó en presencia de lisado de reticulocitos (TNT-T7, Promega) programado para expresar el receptor hROR α 1 de acuerdo con el protocolo definido por el fabricante o en presencia de lisado de control. Los complejos de DNA/proteína se separaron a continuación sobre un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Después de secar, el gel se somete a autorradiografía. El primer carril del gel corresponde a la migración de la sonda sola. El segundo carril corresponde a la migración de la sonda incubada en presencia del lisado de control. Otros carriles corresponden a la migración de la sonda incubada en presencia de lisado programado para expresar hROR α 1. Un exceso molar (10, 50, 100 veces) de los oligonucleótidos de doble hebra no marcados indicados se preincubó con el lisado programado durante 15 minutos antes de la adición de la sonda.

La formación de este complejo se reduce mediante la adición de oligonucleótido de doble hebra no marcado (competidores) añadido en exceso cuyas secuencias corresponden al elemento de respuesta de consenso de hROR α 1 (RORECons) y al semisitio AGGTCA presente aguas abajo de la caja TaTa del gen de apo C-III humano (hCIII-TaTaWT) (fuerte). Por otra parte, el oligonucleótido de doble hebra no marcado correspondiente cuya secuencia está mutada (AGGTCA→AGGCAG) (hCIIITaTaKO) no reduce la formación de este complejo. También se observa un retardo en gel específico cuando el oligonucleótido marcado usado como sonda corresponde al semisitio AGGTCA presente al nivel del sitio de la caja TaTa del gen de apo C-III humano (hCIII-TaTaWT) (Figura 8).

En esta Figura, el fragmento -34/-10 (sonda hCIII-TaTaWT) del promotor del gen humano para apo C-III se fosforiló en los extremos 5' mediante polinucleótido quinasa en presencia de [γ -³²P]ATP. Esta sonda se incubó en presencia de lisado de reticulocitos (TNT-T7, Promega) programado para expresar el receptor hROR α 1 de acuerdo con el protocolo definido por el fabricante o en presencia de lisado de control. Los complejos de DNA/proteína se separaron a continuación sobre gel de poliacrilamida no desnaturizante. Después de secar, el gel se somete a autorradiografía. El primer carril del gel corresponde a la migración de la sonda incubada en presencia del lisado de control. Los otros carriles corresponden a la migración de la sonda incubada en presencia de lisado programado para expresar hROR α 1. Un exceso molar (10, 50, 100 veces) de los oligonucleótidos de doble hebra no marcados indicados se preincubó con el lisado programado durante 15 minutos antes de la adición de la sonda.

La intensidad del complejo retardado se reduce mediante competición con el oligonucleótido de doble hebra no marcado homólogo, mediante oligonucleótidos de doble hebra no marcados cuyas secuencias corresponden al sitio de ligazón de hROR α 1 en el promotor del gen de apo AI de rata (rAITaTaWT) (sitio al que se sabe que se une hROR α 1 con alta afinidad (Vu-Dac y otros, 1997, J. Biol. Chem., 272, 22401-22404)) o del elemento de respuesta de consenso de hROR α 1 (RORECons). El oligonucleótido de doble hebra no marcado cuya secuencia corresponde al semisito AGGTCA mutado hCIIITaTaKO (AGGCAG) (Figura 8) situado aguas abajo de la caja TaTa del gen de apo C-III es inactivo. También se observa un retardo en gel específico pero débil sobre el fragmento de DNA entre las posiciones -62 y -109 requerido para observar la activación de la expresión del gen informador mediante hROR α 1 en experimentos de transfección transitoria (Figura 9).

En esta Figura, los fragmentos -34/-10 (sonda hCIIITaTaWT) del promotor del gen humano para apo C-III se fosforilaron en los extremos 5' mediante polinucleótido quinasa en presencia de [γ -³²P]ATP. Estas sondas se incubaron en presencia de lisado de reticulocitos (TNT-T7, Promega) programado para expresar el receptor hROR α 1 de acuerdo con el protocolo definido por el fabricante o en presencia de lisado de control. Los complejos de DNA/proteína se separaron a continuación sobre gel de poliacrilamida no desnaturizante. Después de secar, el gel se somete a autorradiografía.

Más precisamente, este retardo parece ser atribuible al sitio entre las posiciones -82 y -70 (hCIII-C3PDR1) (Figura 10).

En esta figura, el fragmento -90/-64 del promotor del gen humano para apo C-III se fosforiló en los extremos 5' con polinucleótido quinasa en presencia de [γ -³²P]ATP. Esta sonda se incubó en presencia de lisado de reticulocitos ("TNT-T7", Promega) programado para expresar el receptor hROR α 1 de acuerdo con el protocolo definido por el fabricante o en presencia de lisado de control. Los complejos de DNA/proteína se separaron a continuación sobre gel de poliacrilamida no desnaturizante. Después de secar, el gel se somete a autorradiografía. El primer carril del gel corresponde a la migración de la sonda incubada en presencia de lisado de control. Los otros carriles corresponden a la migración de la sonda incubada en presencia de lisado programado para expresar hROR α 1. Un exceso molar (10, 50, 100 veces) de los oligonucleótidos de doble hebra no marcados indicados se preincubó con el lisado programado durante 15 minutos antes de la adición de la sonda.

Este retardo es específico: la competición aparece con el oligonucleótido cuyas secuencias corresponden al elemento de respuesta de consenso de hROR α 1 (RORECons) o al semisito de la caja TaTa del gen de apo C-III humano (hCIIITaTaWT) (Figura 10). También se observa la competición con el oligonucleótido no marcado homólogo (Figura 10).

En conclusión, los experimentos de retardo en gel confirman la interacción de hROR α 1 con la porción entre las posiciones -198 y +24 del promotor de apo C-III y sugieren la existencia de dos sitios de unión: el semisito AGGTCA situado aguas abajo de la caja TaTa (-23/-18) y el semisito AGGTCA presente en 5' del sitio C3P (-77/-82).

c. Análisis de los mutantes puntuales del promotor del gen de apo C-III humano

Para validar los resultados obtenidos con los mutantes de delección y con la técnica de retardo en gel, el constructo -1415/+24hCIIITaTaWT-Luc+ se mutó mediante mutagénesis dirigida al sitio a nivel del semisito AGGTCA presente aguas abajo de la caja TaTa del gen para apo C-III (-23/-18) y/o a nivel de los dos semisitos AGGTCA del sitio C3P (-70/-82).

En la Figura 11, se cultivaron en placa 10.000 células RK13 por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectaron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vectores informadores -1415/+24hCIIITaTaWT-Luc+ (señalado WT), -1415/+24hCIIIC3P5' KO-Luc+ (señalado C3P5' KO), -1415/+24hCIIIC3P3' KO-Luc+ (señalado C3P3' KO), -1415/+24hCIIIC3P5'+3' KO-Luc+ (señalado C3P5'+3' KO), -1415/+24hCIIITaTaKO-Luc+ (señalado TaTaKO), -1415/+24hCIIITaTa+C3P5' KO-Luc+ (señalado TaTa+C3P5' KO) y -1415/+24hCIIITaTa+C3P3' KO-Luc+ (señalado TaTa+C3P3' KO), según se indique, 100 ng/pocillo de vector de expresión pCDNA3 o pCDNA3-hROR α 1, según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche "Dual-Luciferase™ Reporter Assay System" de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

La Figura 11 indica que la mutación del semisitio AGGTCA presente en la posición 3' del sitio C3P (-77/-82) (constructo -1415/+24hCIIIC3P3'KOLuc+) reduce significativamente la sensibilidad a hROR α 1 del promotor del gen de apo C-III humano. Además, mientras que la mutación simple de semisitio AGGTCA presente aguas abajo de la caja TaTa (constructo -1415/+24hCIIITaTaKOLuc+) no afecta a la sensibilidad del promotor a la acción de hROR α 1, la combinación de la misma mutación con la mutación del semisitio AGGTCA presente en la posición 3' del sitio C3P (constructo -1415/+24hCIIITaTa+C3P3'KOLuc+) parece acentuar la pérdida de sensibilidad del promotor con respecto a hROR α 1.

d. Análisis de los elementos de respuesta aislados del promotor de apo C-III clonado aguas arriba del promotor de TK

En la Figura 12, 10.000 células RK13 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectoron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vectores informadores (-30/-15)_nTkpGL3, (-76/-100)_{2x}TkpGL3, (-27/-59)_{5x}TkpGL3, (-59/-27)_{8x}TkpGL3, (-47/-79)TkpGL3 y TkpGL3 (control negativo), según se indique, 100 ng/pocillo de vector de expresión pCDNA3 o pCDNA3-hROR α 1, según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche "Dual-Luciferase™ Reporter Assay System" de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

La Figura 12 muestra que el semisitio AGGTCA presente aguas abajo de la caja TaTa del gen de apo C-III clonado aguas arriba del promotor de Tk (constructo (-30/-15)hCIIITkpGL3) es activable por hROR α 1. Fuera del contexto del promotor de apo C-III humano, este sitio que se identifica mediante retardo en gel es funcional. El constructo que comprende dos copias del fragmento -76/-100 (semisitio AGGTCA 3' del sitio C3P incluido) (constructo (-76/-100)_{2x}hCIIITkpGL3) clonado antes del promotor de Tk también es activado por hROR α 1. Los constructos que comprenden otros fragmentos del promotor proximal de apo C-III humana entre la caja TaTa y el sitio C3P clonado antes del promotor de Tk son insensibles a hROR α 1.

e. Conclusiones

Al menos un sitio que es esencial para la acción de hROR α 1 sobre el promotor del gen de apo C-III humano se ha identificado claramente: el semisitio AGGTCA situado en la posición 3' del sitio C3P (-77/-82). El papel del semisitio presente aguas abajo de la caja TaTa es difícil de evaluar a la luz de los resultados presentados. La presencia de otros elementos de respuesta de hROR α 1 o de sitios a los que se unen otros factores nucleares capaces de interactuar con hROR α 1 es sugerida por la pérdida de sensibilidad a hROR α 1 que se observa cuando el fragmento -1415/-198 se retira del promotor de apo C-III.

7. Novedad de la acción de hROR α 1

En la Figura 13, las células RK13 se cultivaron en placas sobre placas de cultivo de 60 mm y se transfectoron a 50-60% de confluencia mediante la técnica del fosfato cálcico con 500 ng/placa de vector informador -1415/+24hCIIWT-CAT (señalado -1415/+24WTCAT), -198/+24hCIIWT-CAT (señalado -198/+24WTCAT), -2051/+26hAIWT-CAT (señalado -2051/+26hAICAT) (promotor de apo AI humana), hAITaTakCAT (caja TaTa del gen de apo AI humano clonado antes del promotor de Tk), RORETkCAT (elemento de respuesta de ROR de consenso (monómero) clonado aguas arriba del promotor de Tk) o pBLCAT4, según se indique, 1 μ g/placa de vector de expresión pSG5 (control negativo) o pSG5-hROR α 1, según se indique, y 100 ng/placa de plásmido pCMV- β gal usado como control para la eficacia de transfección. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de CAT y β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con protocolos convencionales (31).

La Figura 13 indica que el efecto de hROR α 1 es específico para el gen humano para apo C-III: el promotor de apo A-I humana no está significativamente afectado al contrario de lo que se describe en ratas (53). La secuencia de la porción del promotor de apo A-I humana que flanquea la caja TaTa es diferente en comparación con la porción equivalente del promotor de rata. La Figura 13 muestra que esta porción del promotor humano de apo A-I es insensible a hROR α 1. La modulación de la expresión o de la actividad de hROR α 1 es por lo tanto capaz de afectar diferencialmente a la expresión de los genes humanos que codifican apo C-III o apo A-I, respectivamente. Las sustancias capaces de modular la actividad de hROR α 1 tendrán por consiguiente una acción a nivel de los triglicéridos que está disociada de su acción sobre el nivel de colesterol HDL en plasma. Por lo tanto, tales sustancias tendrán un nuevo perfil farmacológico.

8. Efectos de las isoformas de hROR

La Figura 14 muestra, sorprendentemente, que las isoformas hROR α 1, hROR α 2 y hROR α 3 activan todas el constructo -1415/+24hCIIWTLuc+. Esta observación está en contraste con la ausencia de hROR α 2 en el promotor de apo A-I de rata (53).

En esta Figura, las células RK13 se cultivaron en placa sobre placas de cultivo de 60 mm y se transfectoron a 50-60% de confluencia mediante la técnica del fosfato cálcico con 500 ng/placa de vector informador -1415/+24hCIIWT-Luc+, 1 μ g/placa de vector de expresión pCMX (control negativo), pCMX-hROR α 1, pCMX-hROR α 2 o pCMX-

hROR α 3, según se indique, y 100 ng/placa de plásmido pCMV- β gal usado como control para la eficacia de transfección. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa y β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con protocolos convencionales (31).

5 9. *La ruptura del gen de ROR α en los ratones tambaleantes sg/sg está asociada con una expresión reducida de apo C-III en el hígado de estos animales*

En la Figura 15, la expresión hepática del gen de apo C-III en los ratones mutantes sg/sg (que tienen un gen de ROR α truncado y no funcional) se compara con la expresión correspondiente en los ratones silvestres SG/SG mediante transferencia Northern de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente (32). El RNA mensajero que codifica apo C-III murina se visualiza con la ayuda de una sonda de cDNA que codifica apo C-III de rata marcada usando hexámeros aleatorios como cebadores (Boehringer Mannheim). El clon de cDNA de 36B4 que codifica la fosfoproteína ribosómica ácida humana PO (34) cuya expresión es constante se usa como control de cuantificación.

La Figura 15 muestra que la expresión del gen de apo C-III de ratón está considerablemente reducida en el hígado de ratones mutantes sg/sg deficientes en el gen ROR α en comparación con ratones SG/SG. La expresión del gen de control SB34 no está afectada por la mutación. Este resultado confirma la importancia fisiológica de las observaciones descritas anteriormente y sugiere que el gen de ROR α también es importante para la expresión de apo C-III en el hígado de roedores.

10. *Importancia de los métodos de rastreo propuestos*

La activación (Figuras 1 a 6, 11, 13 y 14) de la expresión del gen informador clonado aguas abajo del promotor del gen humano para apo C-III cuando la expresión exógena de hROR α 1 se incrementa artificialmente se basa en la importancia del uso de este método para identificar sustancias capaces de modular la actividad de hROR α 1.

La Figura 12 establece lo apropiado de usar los sitios aislados clonados aguas arriba del promotor de Tk antes de un gen informador para identificar sustancias capaces de modular la actividad de hROR α 1. Se ha caracterizado un constructo que comprende tres copias del siguiente sitio: 5'-GGAAAAGTGTGTCAGTGGGGCACG-3' clonado antes del promotor de Tk (Figura 16).

En esta Figura, 10.000 células RK13 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectaron con la ayuda de un lípido catiónico con 50 ng/pocillo de vectores informadores (RevDR2)_{3x}TkLuc+, (RevDR2m3')TkLuc+ (semisitio 3' del DR2 mutado) o TkLuc+ (control negativo), según se indique, 100 ng/pocillo de vector de expresión pCDNA3 o pCDNA3-hROR α 1, según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche "Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System" de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

Su sensibilidad hacia hROR α 1 se incrementa. Esto justifica su importancia para rastrear sustancias capaces de modular la actividad del receptor nuclear hROR α 1 natural.

Finalmente, la Figura 17 establece lo apropiado de usar quimeras que combinan el dominio de unión a DNA del factor de transcripción de levadura Gal4 y el dominio de unión a ligando de hROR α 1 y de un vector informador que comprende 5 copias de un elemento de respuesta de Gal4 para identificar sustancias capaces de modular la actividad de hROR α 1.

En la Figura 17, 10.000 células RK13 se cultivaron en placa por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se transfectaron con la ayuda de un lípido catiónico con 100 ng/ml de vector informador pG5TkpGL3, de 0 a 100 ng/pocillo de vector de expresión pGal4- ϕ o pGal4-hROR α DEF (complementado con el plásmido pCDNA3 para mantener el número de unidades de transcripción constante), según se indique, y 50 ng de vector pSV- β gal. La cantidad total de DNA transfectado se llevó hasta 500 ng/pocillo con la ayuda del plásmido pBluescript usado como portador. Después de incubar durante 36 horas, las células se enjuagaron, se sometieron a lisis y la actividad de luciferasa de los extractos celulares se ensayó con la ayuda del estuche "Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System" de Promega. La actividad de β -galactosidasa de los extractos celulares se midió de acuerdo con el protocolo convencional (31).

Referencias

1. Cury M. D., McConathy W.J., Fesmire J.D., Alaupovic P. 1980. Quantitative determination of human apolipoprotein C-III by electroimmunoassay. *Biochim. Biophys. Acta.* 617:503-513.
2. Schonfeld G., Georges P.I., Miller J., Reilly P., Witztum J., 1979. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hypolipoproteinemia *Metabolism*.28:1001-1009.
3. Stocks J., Holdsworth G, Galton D.J. 1979. Hypertriglycerideamia associated with an abnormal triglycerid rich lipoprotein carrying excess apolipoprotein C-III. *Lancet.* ii:667-671.

4. **LA N.A., Gibson J.C., Ginsberg H.N.** 1998. Independent regulation of plasma apolipoprotein C-II and C-III concentrations in very low density and high density lipoproteins: implications for the regulation of the catabolism of these lipoproteins. *J. Lipid. Res.* 29:669-677.
5. **Luc G., Fievet C. Arveiler D., Evans A., Bard J.M., Cambien F., Fruchart J.C., Ducimetiere P.** 1996. Apolipoproteins C-III and E in apo B and non apo B containing lipoproteins in two populations at cotasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. *J. Lipid Res.* 31: 508-517.
6. **Malmendier C.L., Lontie J.F., Delcroix C., Dubois Y., Magot T., DeRoy.** 1989. Apolipoproteins C-II and C-II metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effects of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. *Atherosclerosis.* 77:139-149.
7. **Ginsberg H.N., Le N.A., Goldberg I.J., Gibson J.C. Rubinstein A., Wang-Iverson P., Norum R., Brown W.V.** 1986. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoprotein C-III and A-I: evidence that apolipoprotein C-III inhibits catabolism of triglycerid-rich lipoproteins by lipoprotein lipase *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 78:1287-1295.
8. **Dammerman M, Sandkuijl L.A., Halaas J.L., Chung W., Breslow J.L.** 1993 An apolipoprotein C-III haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 90:4562-4566.
9. **Rees A.C., Shoulders C.C., Stocks J., Galton D.J., Baralle F.E.** 1983. DNA polymorphism adjacent to human apolipoprotein A-I gene: relation to hypertriglyceridemia. *Lancet.* i:444-446.
10. **Maeda N., Li H., Lee D., Oliver P., Quarfordt S.H., Osada J.** 1994. Targeted disruption of the apolipoprotein CIII gene in mice results in hypertriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J.Biol.Chem.* 269:23610-23616.
11. **Ito Y., Azrolan N., O'Connel A., Walsh A., Breslow J.L.** 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science.* 249:790-793.
12. **De Silva H.V., Lauer S.J., Wang J., Simonet W.S., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Taylor J.M.** 1994. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J.Biol.Chem.* 269:2324-2335.
13. **Aalto-Setälä, i K., Fisher E.A., Chen X., Chaek-Shaul T., Hayek T., Zechner R., Walsh A., Ramakrishnan R., Ginsberg H.N., Breslow J.L.** 1992. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein C-III transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo C-III and reduced apo E on the particles. *J. Clin. Invest.* 90:1889-1900.
14. **Clavey V., Lestavel-Delattre S., Copin C., Bard T.M., Fruchart J.C.** 1995. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins C-I, C-II, C-III and E. *Arterioscler. Throm. Vasc.Biol.* 15:963-971.
15. **Aalto-Setälä K., Weinstock P.H., Bisgaier C.L., Wu L., Smith J.D., Breslow J.L.** 1996. Further characterization of the metabolic properties of triglycerid rich lipoproteins from human and mouse apo C-III transgenic mice. *J.Lipid Res.* 37:1802-1811.
16. **Ebara T., Ramakrishnan R., Steiner G., Shachter N.S.** 1997. Chylomicronemia due to apolipoprotein C-II overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein C-III induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J.Clin.Invest.* 99:2672-2681.
17. **Giguère V., Tini M., Flock G., Ong E., Evans R.M., Otulakowski G.** 1994. *Genes Dev.* 8:538-553.
18. **Becker-andré, M., André, E., DeLamarter J.F.** 1993. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 194:1371-1379.
19. **Carlberg C., van Huijsduijnen R., Staple J.K., DeLamarter J.F., and Becker-André, M.** 1994. *Mol. Endocrinol.* 8: 757-770.
20. **Hirose T., Smith R.J. and Jetten A.M.** 1994. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 205:1976-1983.
21. **Forman B.M., Chen J., Blumberg B., Klierer S.A., Henshaw R., Ong E.S., Evans R.M.** 1994. *Mol. Endocrinol.* 8:1253-1260.
22. **Giguère V., McBroom L.D.B., and Flock G.** 1995. *Mol.Cell.Biol.* 15:2517-2526.
23. **Herrup K. and Mullen R.J.** 1979. Regional variation and absence of large neurons in the cerebellum of the staggerer mouse. *Brain Res.* 172: 1-12.

24. **Shojaeian-Zanjani H., Herrup K., Guastavino J.M., Delhay-Bouchaud N., and Mariani J.** 1994. Development studies of the inferior olivary nucleus in the staggerer mutant mice. *De. Brain. Res.* 82: 18-28.
25. **Trenkner E., and Hoffman N.K.** 1986. Defective development of the thymus and immunological abnormalities in the neurological mouse mutation staggerer. *J.Neurosci.* 6: 1733-1737.
26. **Kopmels B., Mariani J., Delhay-Bouchaud N., Audibert F., Fradeliti D., and Wollman E.E.** 1992. Evidence for a hyperexcitability stage of the staggerer mutant mice macrophages. *J. Neurochem.* 58:192-199.
27. **Hamilton B.A., Frankel W.N., Kerrebrock A.W., Hawkins T.L., FitzHugh W., Kusumi K., Russel L.B., Mueller K.L., van Berkel V., Birren B.W., Kruglyak L. and Lander E.S.** 1996. Disruption of the nuclear hormone receptor ROR α in staggerer mice. *Nature.* 379:736-739.
28. **Pagen B., Ishida B.Y., Verstuyft J., Winters R.B. and AL bee D.** 1990. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis.* 10: 316-323.
29. **Luckow B., and Schütz G.** 1987. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucl.Acids Res.* 15:5490.
30. **Mc Gregor G.R. and Caskey C.T.** 1989. Construction of plasmids that express *E.coli* b-galactosidase in mammalian cells. *Nucl.Acids Res.* 17:2365.
31. **Ausubel F. Brent R., Kingston R., Moore D., Smith J., Seidman C., Struhl K.** 1987. *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing - Wiley Interscience, Nueva York.
32. **Staels B., Vu-Dac N., Kosykh R., Saladin R., Fruchart J.C., Dallongeville J. and Auwerx J.** 1995. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal Acyl Coenzyme A oxidase. *J. Clin. Invest.* 95:705-712.
33. **Masiakowski P., Breathnach R., Bloch J., Gannon F., Krust A., and Chambon P.** 1982. cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucl.Acid Res.* 10:7895-7903.
34. **Laborda J.** 1991. 36B4 c DNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucl.Acid Res.* 19:3998.
35. **Staels B., and Auwerx J.** 1992. Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. *Development.* 115: 1035-1043.
36. **Harding H.P. and Lazar M.A.** 1993. The orphan receptor Rev-Erba activates transcription via a novel response element. *Mol.Cell.Biol.* 13: 3113.
37. **Harding H.P. and Lazar M.A.** 1995. The monomer-binding orphan receptor Rev-ErbA represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol.Cell.Biol.* 15: 4791.
38. **Harding H.P. and Lazar M.A.** 1993. The orphan receptor Rev-Erba activates transcription via a novel response element. *Mol.Cell.Biol.* 13: 3113.
39. **Dumas B., Harding H.S., Choi K., Lehman M., Chung M., Lazar M.A., Moore D.** 1994. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol. Endocrinol.* 3:996.
40. **Forman B., Chen J., Blumberg B., Kliewer S.A., Hensaw R., Ong E.S., Evans R.** Cross-talk among ROR α and the Rev-Erb family of nuclear receptor. *Mol.Endocrinol.* 3:1253.
41. **Giguère V., Mc Broom L., Flock G.** 1995. Determinants of target gene specificity for ROR α monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol.Cell.Biol.* 15:2517.
42. **Krey G, Braissant O, LiHorest F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker M, Wahli W.** 1997. Fatty acids, Eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated Receptors by coactivator-dependent Receptor Ligand Assay. *Mol. Endocrinol.* 779-791.
43. **Harding HP, Atkins GB, Jaffe AB, Seo WJ, Lazar MA,** 1997. Transcriptional activation and repression by ROR α , an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol. Endocrinol.* 11: 1737-1746.
44. **Molten F** 1994, Drug sensitivity (suicide) genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* 1: 125-134.
45. **Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashme M.** 1988. Gal4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335: 563-564.

46. Webster y otros, 1998. *Cell*. 52: 169-178.

47. Giguère V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. 1994. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan nuclear receptors *Genes Dev*. 8: 538-553.

48. Vanacker JM, laudet V, Adelmant G, Stéhelin D, Rommelaere J. 1993. Interconnection between thyroid hormone receptor signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J. Virol*. 67: 7668-7672.

49. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B. 1994. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J. Biol. chem*. 269: 31012-31018.

50. Fried MG, Crothers DM. 1983. CAP and RNA polymerase interactions with the lac promoter: binding stoichiometry and long range effects. *Nucl. Acids res*. 11: 141-158.

51. Becker-André, M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J.Biol.Chem*. 1994, 269: 28531-4.

52. Becker-André, M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily., *J. Biol. Chem.*, 272, 26, página 16707.

53. Vu-Dac N., Gervois P, Grotzinger P, De vos P, Schoonjans K., Fruchart J.C., Auwerx J., Mariani J., Tedgui A., Staels B., Transcriptional Regulation of apo A-I gene expression by nuclear receptor ROR alpha, *J. Biol.Chem.*, 1997, vol 272, Iss 36, pp 22401-22404.

54. Mamontova A, Seguret-Mace S, Esposito B, Chanial C, Bouly M, Delhaye-Bouchaud N, Luc G, Staels B, Duverger N, Mariani J, Tedgui A severe atherosclerosis and hypoalpha lipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor ROR alpha, *Circulation*, 98, 2738-2743, 1998.

55. Masucci-Magoulas L, Goldberg IJ, Bisgaier CL, Serajuddin H, Francone OL, Breslow JL, Tall AR, A Mouse Model with Features of Familial Combined Hyperlipidemia, *Science*, 1997, 275, 391-394.

56. Hodis and Mack, 1998, *Eur. Heart J.*, supl. 19 A40-44.

57. Assman G, Schulte H, Culien P, New and classical risk factors - the munster heart study (PROCAM), 1997, *Eur. J. Med. Res*. 2, 237-242.

58. Austin, 1991, *Arterioscler. Thromb*. 11: 2-14.

59. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J, Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor, *JCI*, 96,741-750, 1995.

60. Talianidis I, Tambakaki A, Toursounova J, Zannis VI, Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human APOCIII gene, 1995, *Biochemistry*, 34, 10298-10309.

61. Vu-Dac N, Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Kosykh V, Kooistra T, Princen HM, Dallongeville J, Staels B, Retinoids increase human Apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor. Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids, *JCI*, 1998, 102(3): 623-32.

62. Lavrentiadou, S y otros, "Modulation of the ApoCIII promotor activity by heterodimers of ligand dependent nuclear receptors RXR -alpha- RAR, RXR -alpha-T3R-beta and RXR -alpha-PPAR-alpha". *Circulation* (1995) Vol. 92, N° 8 Supl., pp 1291.

63. Ogami, K. y otros, "Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human apoCIII gene". *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, N° 17 (1990), pp. 9808-9815.

Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Extremo 5'	Extremo 3'	Uso	Notas
hC3F7	5'-GATCTCAGCAGGTGACCTTTGGCCAGCGCCC-3'	-90	-64	desplazamiento en gel	
hC3R77	5'-GATCGGGCGCTGGGCAAAAGGTCACCTGCTGA-3'	-64	-90	desplazamiento en gel	
hC3F8	5'-GATCTGATATAAAACAGGTGCGAACCCCTC-3'	-34	-10	desplazamiento en gel	
hC3R8	5'-GATCGAGGTTCTGACCTGTTTTATATCA-3'	-10	-34	desplazamiento en gel	
hC3F12	5'-GATCGATATAAAACAGGCAGGAACCCCTC-3'	-33	-10	desplazamiento en gel	-20,-19,-18
hC3R12	5'-GATCGAGGGTTCTGCTGCCTGTTTTATATC-3'	-10	-33	desplazamiento en gel	-20,-19,-18
hC3F15	5'-GATCCTCAGTGCCTGCTGCCCTGGAGATGATATAA-3'	-56	-27	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
hC3R15	5'-GATCTTATATCATCTCCAGGGCAGCAGGCACTGAG-3'	-27	-56	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
hC3F17	5'-GATCCTTGGCCAGCGCCCTGGGTCTCAGTGCCTGA-3'	-76	-47	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
hC3R17	5'-GATCTCAGGCACTGAGGACCCAGGGGCTGGGCAAG-3'	-47	-76	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
hC3F18	5'-ACGTGTCGACACTAGTGATAAAACAGGTCAGAAGATAAAACAGG-3'	-53	-15	clonación	
hC3R18	5'-CGATGGTACCCCTCGAGCAATGTGCTAGCTTCTGACCTGTTTTATCTTCTGACCTGTTTATC-3'	-15	-33	clonación	
hC3F20	5'-TCAGCAGGTGATGTTTGCCCGAGCGCCC-3'	-90	-64	mutagénesis	-78,-79
hC3R20	5'-GGGCGCTGGGCAAAACATCACCTGCTGA-3'	-64	-90	mutagénesis	-78,-79
hC3F21	5'-GATCTCATCTCCACTGTCAGCAGGTGACCTTTGCCAGCGCGCGCTG-3'	-102	-62	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
hC3R21	5'-GATCCAGGGCGCTGGGCAAGGTCACCTGCTGACCAAGTGGAGATGA-3'	-62	-102	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
hC3F22	5'-ACGTGTCGACACTAGTAAGGTCACCTGCTGACCAGTGGAGAAAGGTCACC TGCTGACCAAGTG-3'	-76	-100	clonación	
hC3R22	5'-CGATGGTACCCCTCGAGCAATGTGCTAGCTTCTCCACTGCAGGTCTTCTCCACTGG-3	-100	-76	clonación	
hC3F29	5'-GGAGATGATATAAAACACACATGAACCCCTCTGCTG-3'	-39	-3	mutagénesis	-22,-21,-20,-19,-18
hC3R29	5'-CAGGCAGGAGGTTTCATGTGTTTTATATCATCTCC-3'	-3	-39	mutagénesis	-22,-21,-20,-19,-18

(continuación)

Nombre	Secuencia	Extremo 5'	Extremo 3'	Uso	Notas
hC3F30	5'-GGTCAGCAGGTGATGTTTGCAGAGCGCCCTGGGTCC-3'	-92	-57	mutagénesis	-71, -72, -78, -79
hC3R30	5'-GGACCCAGGCGCTCTGCAACATCACCTGCTGACC-3'	-57	-92	mutagénesis	-71, -72, -78, -79
hAIF	5'-GATCCAGACATAAATAGGCCCTGCAAGAGCA-3'	-105	-81	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
hAIRI	5'-GATCTGCTCTGCAGGGCCTATTATGTCTG-3'	-81	-105	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
82	5'-GATGGGATCCGCCAGGTTTCCAGTCAAGAC-3'		4282	clonación	pBLCAT4
610	5'-GATCCACACATATATAGGTCAGGGAAGAAGA-3'	-36	-12	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
609	5'-GATCTCTTCCCTGACCTATATATGTGTG-3'	-12	-36	clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
613	5'-GATCTTGACCTACATTCTAAGCTG-3'			clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
614	5'-GATCCAGCTTAGAATGTAGGTCAA-3'			clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
510	5'-TCGCCAAGCTTCTCGTGATCTGCGGCA-3'	215	189	clonación	sitio + HindIII; pBLCAT4
512	5'-TATGCAGTTGCTCTCCAGCGGTTCCATCTTCC-3'	169	138	clonación	pGL3
514	5'-CGACTCAGAAAGATCTGCCCCCCCCCAGCG-3'	21	50	clonación	pBLCAT4
1129	5'-GATCCGGGAAAAGTGTGTCACTGGGCAACGA-3'			clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI
1142	5'-GATCTCGTGCCCCAGTGACACACTTTTCCG-3'			clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
1126	5'-GATCTCGCCTACCAAGTGACACACTTTTCCG-3'			clonación, desplazamiento en gel	sitio + BglII
1132	5'-GATCC ¹⁴⁴ GGAAAAGTGTGTCACTCTAGCCGA-3'	Tabla I		clonación, desplazamiento en gel	sitio + BamHI

TABLA 2

Composición de los oligonucleótidos de doble hebra usados en el retardo en gel

Nombre	Oligonucleótido de “sentido”	Oligonucleótido de “antisentido”
hCIITaTaWT	hCIIF8	hCIIR8
hCIITaTaKO	hCIIF12	hCIIR12
hCIIC3PDR1WT	hCIIF7	hCIIR7
hCII(-62/-102)	hCIIF21	hCIIR21
RORECons	613	614
rATTaTaWT	610	609

REIVINDICACIONES

1. Uso de los receptores ROR α humanos, o los receptores ROR α humanos y su elemento de respuesta, en el que dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, para el rastreo *in vitro* de sustancias que tienen propiedades antiateroscleróticas.

2. Método para rastrear sustancias *in vitro* útiles en el tratamiento de disfunciones del metabolismo de los lípidos, **caracterizado** porque la sustancia de prueba se pone en contacto con un receptor de la familia de ROR α humanos, o los receptores ROR α humanos y su elemento de respuesta, en el que dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, y a continuación se mide mediante cualquier medio apropiado:

- la unión de dicha sustancia al receptor ROR α humano o la unión del complejo formado por dicha sustancia y el receptor ROR α humano a su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, y/o
- la modulación de la actividad de transcripción de un gen puesto bajo el control de un promotor que comprende dicho elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III.

3. Método de rastreo de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) un huésped celular se transfecta con un fragmento de DNA que codifica un receptor ROR α humano,
- b) el huésped en la etapa (a) se cotransfecta con un constructo que comprende un elemento de respuesta de dicho receptor ROR α humano, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, y al menos un gen informador,
- c) la expresión del gen informador en presencia de la sustancia de prueba se mide mediante cualquier medio apropiado.

4. Método de rastreo de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) se crea un plásmido que comprende varias copias de un elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, reconocido por ROR α humano clonado aguas arriba de un promotor heterólogo fuerte situado a fin de controlar la expresión de un gen informador,
- b) el constructo de la etapa (a) se transfecta en células que expresan ROR α humano naturalmente o artificialmente,
- c) el huésped de la etapa (b) se incuba en presencia de la sustancia de prueba,
- d) la actividad del gen informador se mide mediante cualquier medio apropiado.

5. Método de rastreo de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) se crea un plásmido que comprende varias copias de un elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, reconocido por ROR α humano clonado aguas arriba de un promotor que controla la expresión de un gen seleccionable (gen suicida) que codifica el activador de un profármaco tóxico,
- b) el constructo de la etapa (a) se transfecta a un huésped celular,
- c) el huésped de la etapa (b) se cotransfecta con la ayuda de un vector que expresar ROR α humano,
- d) el huésped de la etapa (c) se incuba en presencia de la sustancia de prueba,
- e) la supervivencia celular en presencia del profármaco tóxico se mide mediante cualquier medio apropiado.

6. Método de rastreo de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) se crea un plásmido que comprende varias copias de un elemento de respuesta reconocido por el factor nuclear de levadura Gal4 clonado aguas arriba de un promotor fuerte que controla la actividad del gen informador,
- b) se crea otro plásmido a partir de una quimera que comprende el dominio de unión a DNA de Gal4 y los dominios DEF de ROR α humano que son los dominios de ROR α humano a los que se unen los ligandos,

ES 2 303 374 T3

- c) los plásmidos obtenidos en las etapas (a) y (b) se cotransfectan a un huésped celular,
- d) el huésped de la etapa (c) se incuba en presencia de la sustancia de prueba,
- e) la actividad del gen informador se mide mediante cualquier medio apropiado.

7. Método de rastreo de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) un huésped celular como el definido anteriormente se transforma con un constructo que tiene un gen que codifica el receptor ROR α humano, o el receptor ROR α humano y su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, y a continuación,
- b) dichos huéspedes celulares o extractos de los mismos se usan en pruebas de “unión” basadas en el desplazamiento competitivo entre un ligando frío y un ligando marcado.

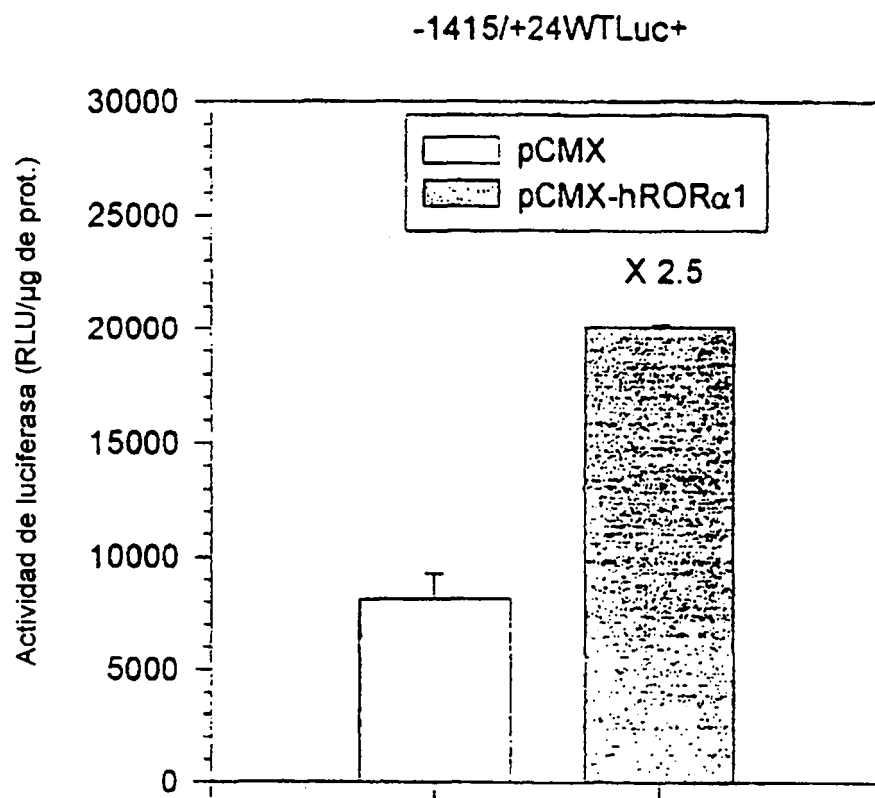
8. Método de rastreo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7, **caracterizado** porque el constructo que tiene un gen que codifica el receptor ROR α humano, o el receptor ROR α humano y su elemento de respuesta, en donde dicho elemento de respuesta es el elemento de respuesta humano de apo C-III, también comprende un gen informador.

9. Método de rastreo de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el gen informador se elige del gen para cloranfenicol acetiltransferasa, el gen para la luciferasa de luciérnaga o de Renilla, el gen para fosfatasa alcalina secretada, el gen para beta-galactosidasa o el gen para apo C-III.

10. Método de rastreo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, **caracterizado** porque el huésped celular se elige de células de mamífero, bacterias o levaduras o alternativamente células de insecto.

11. Método de rastreo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, **caracterizado** porque, además, el efecto de dicha sustancia sobre la expresión de apo C-III se determina mediante cualquier medio apropiado.

Fig.1



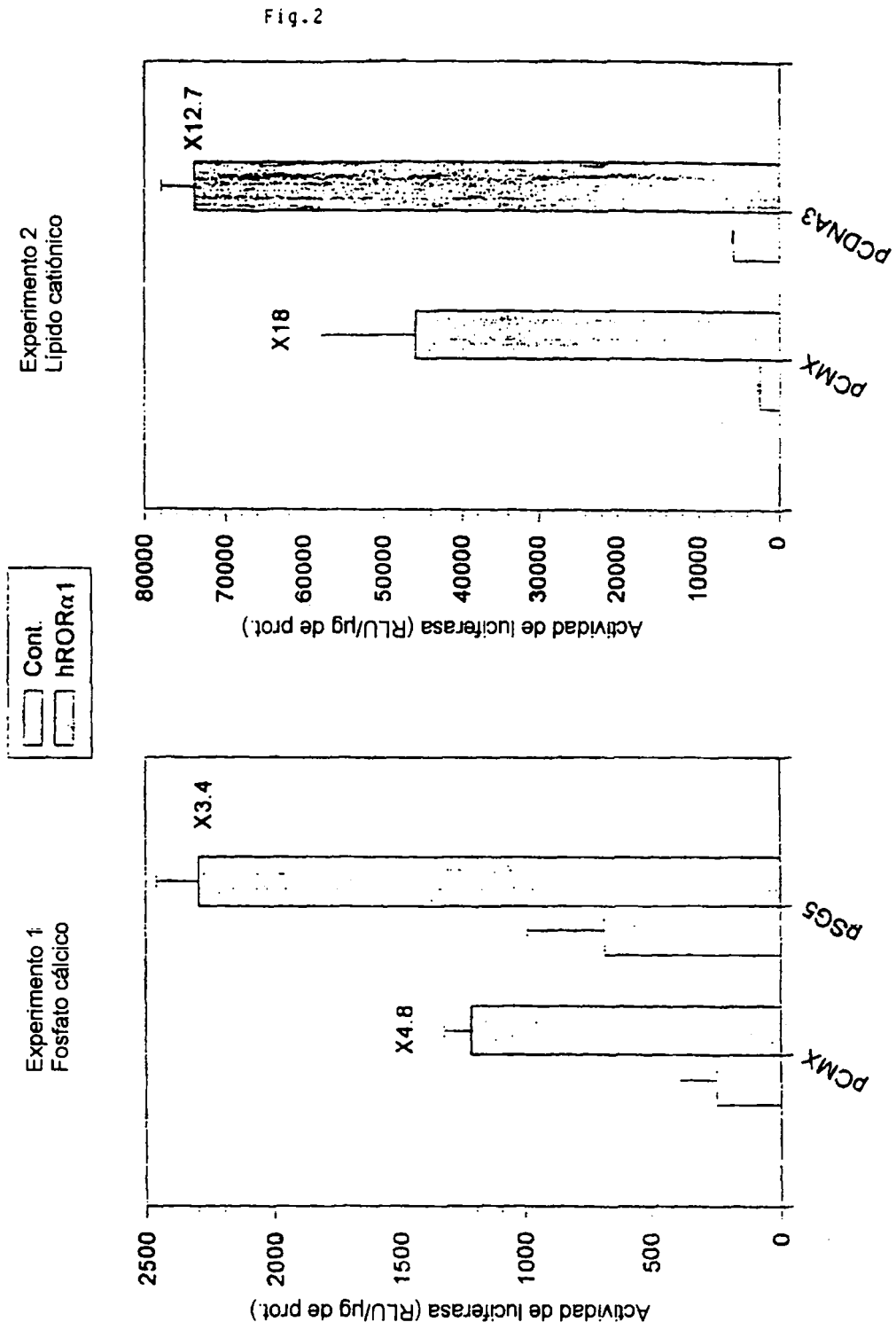


Fig.3

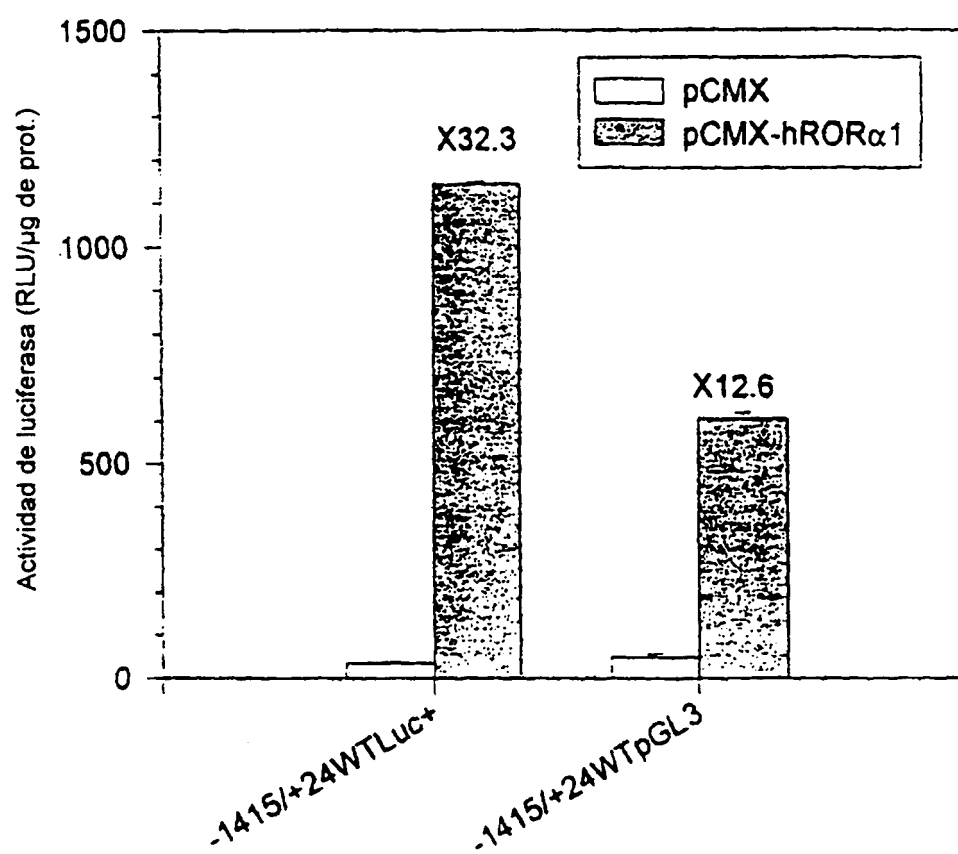


Fig.4

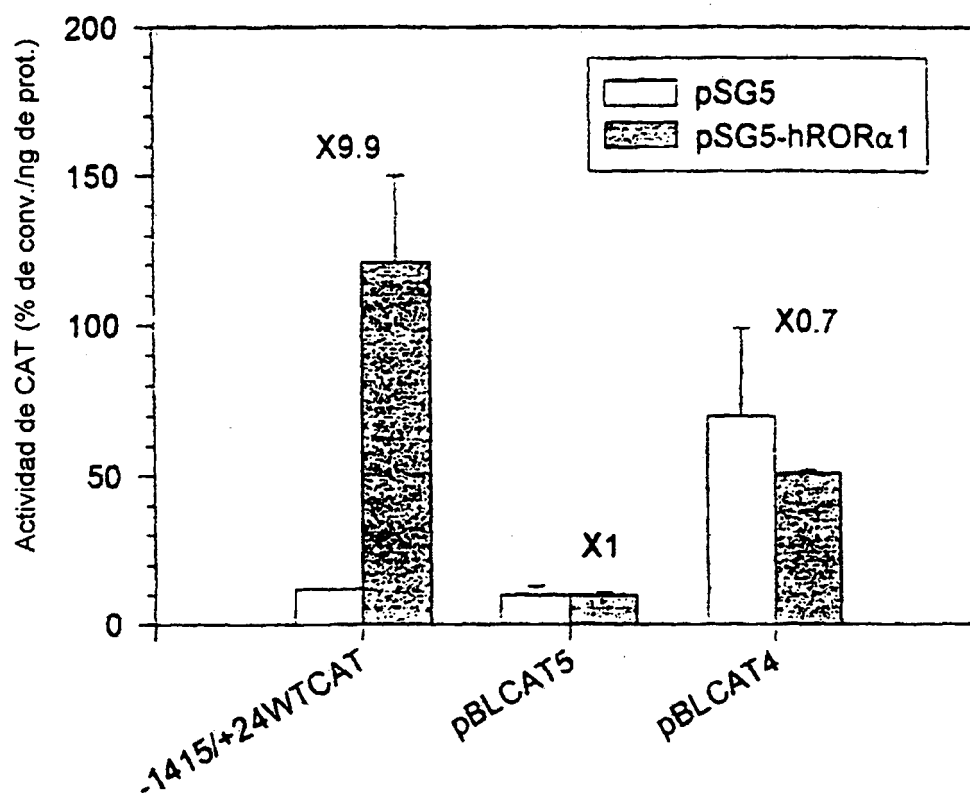


Fig.5

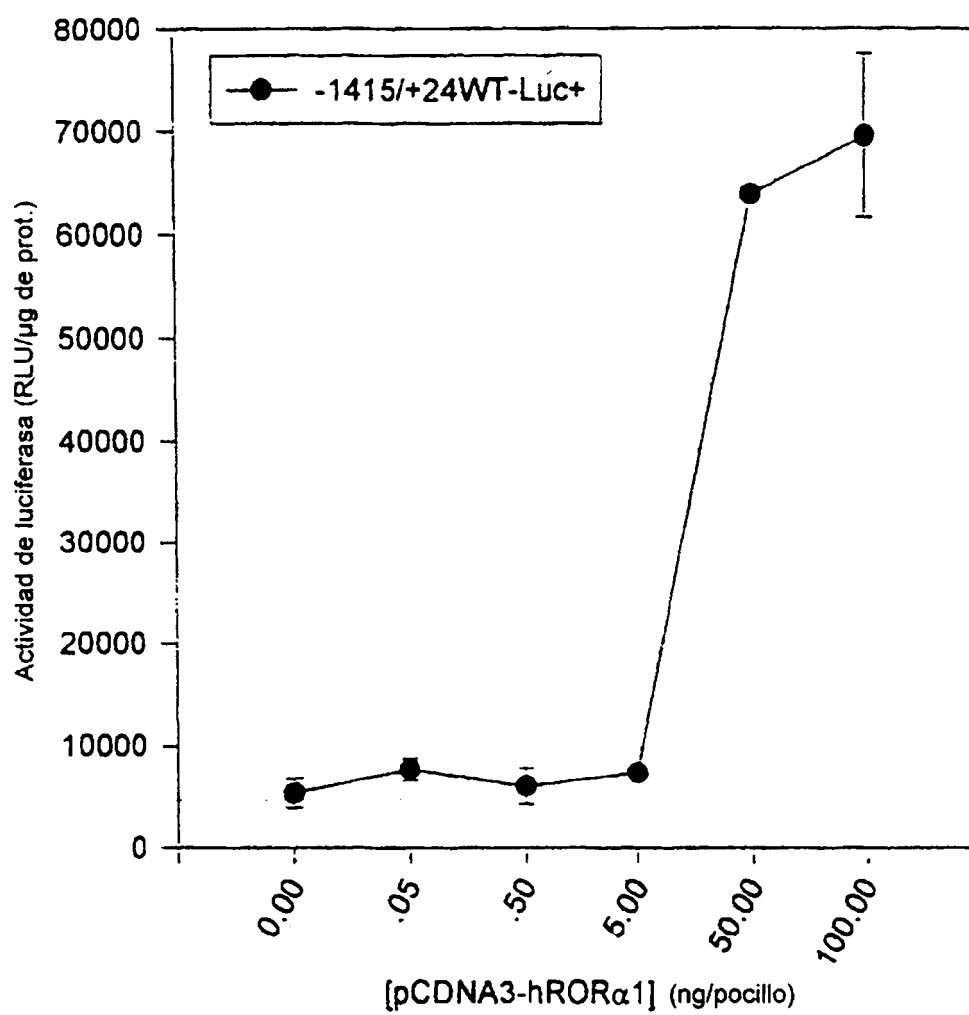
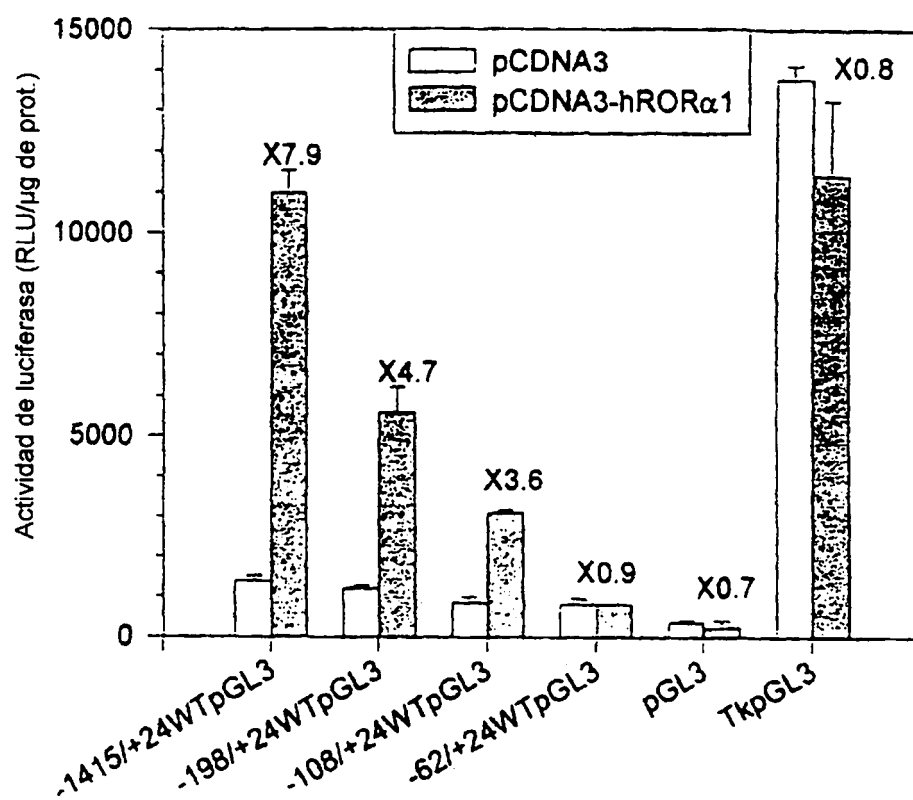


Fig.6



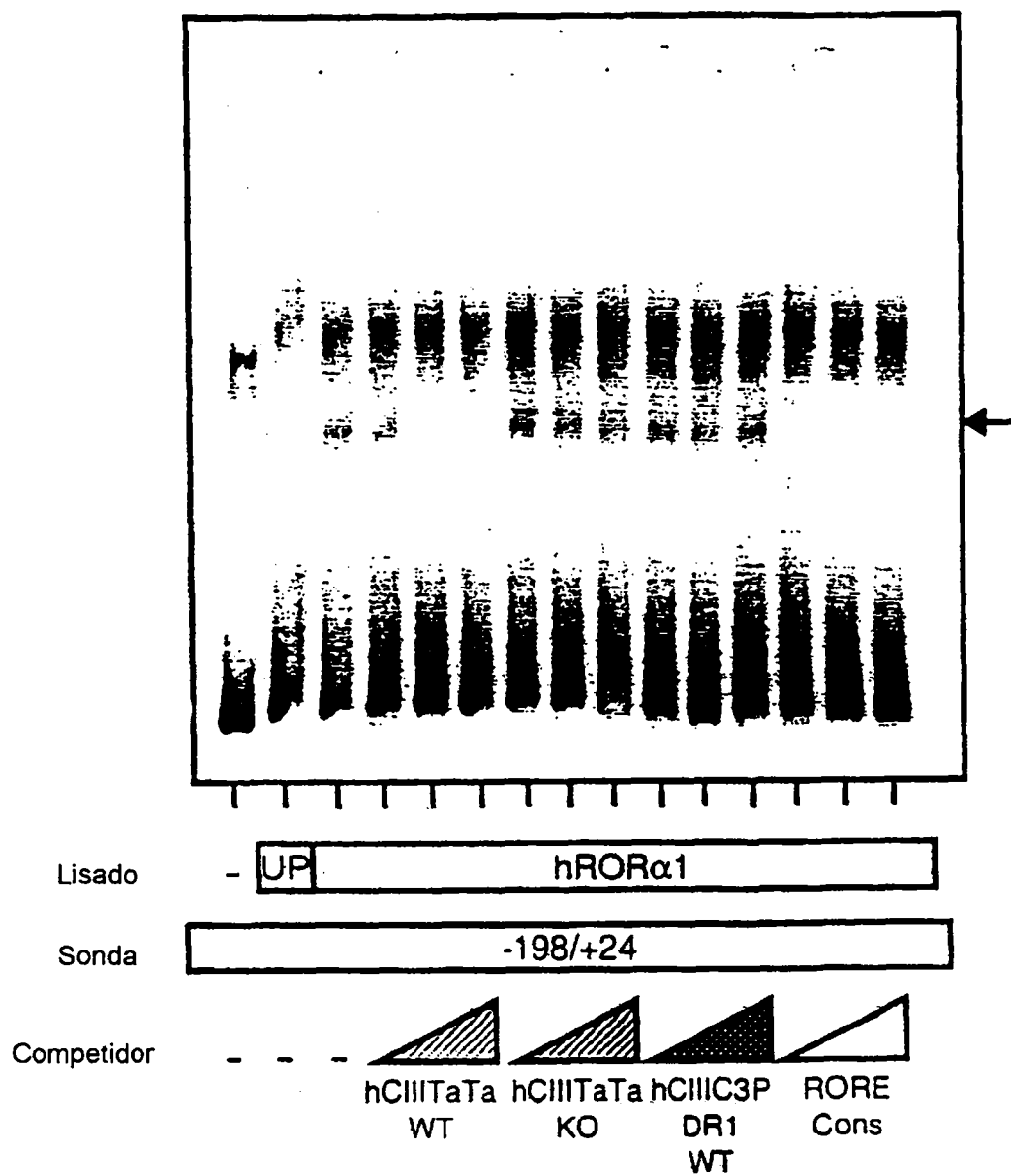


Fig.7

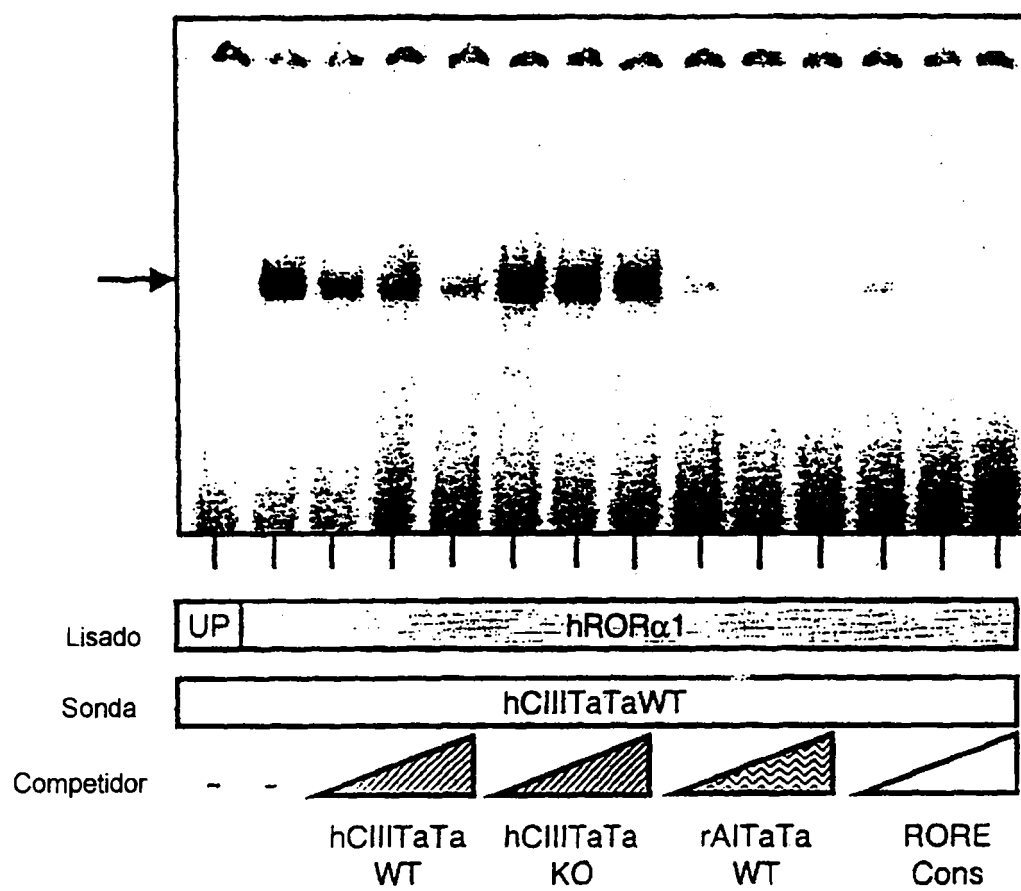


Fig.8

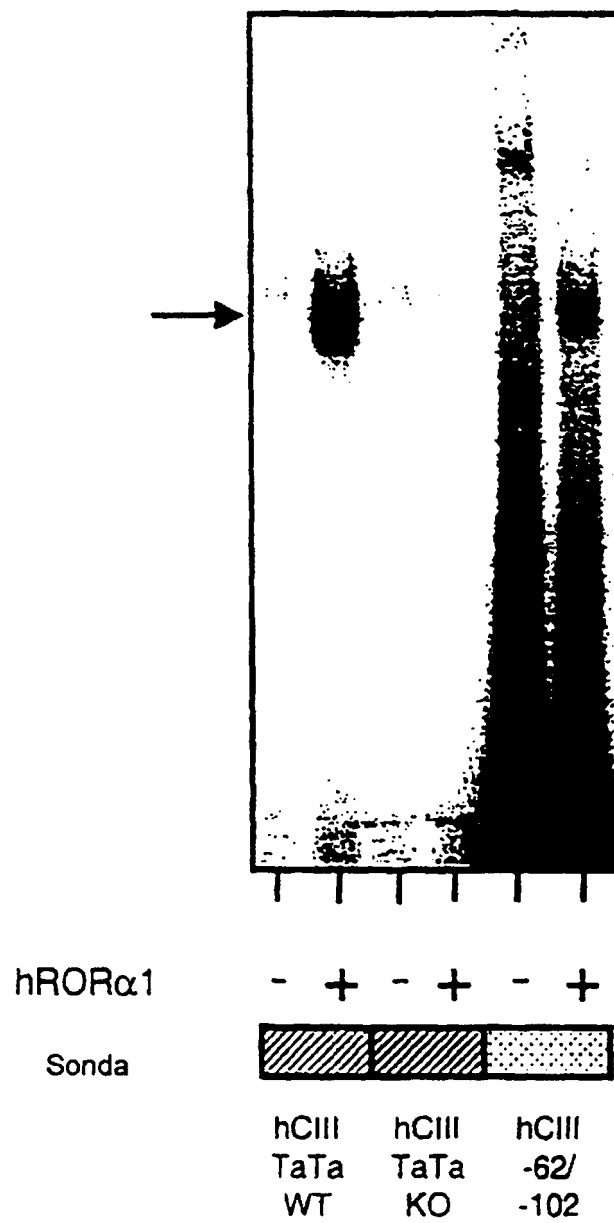


Fig.9

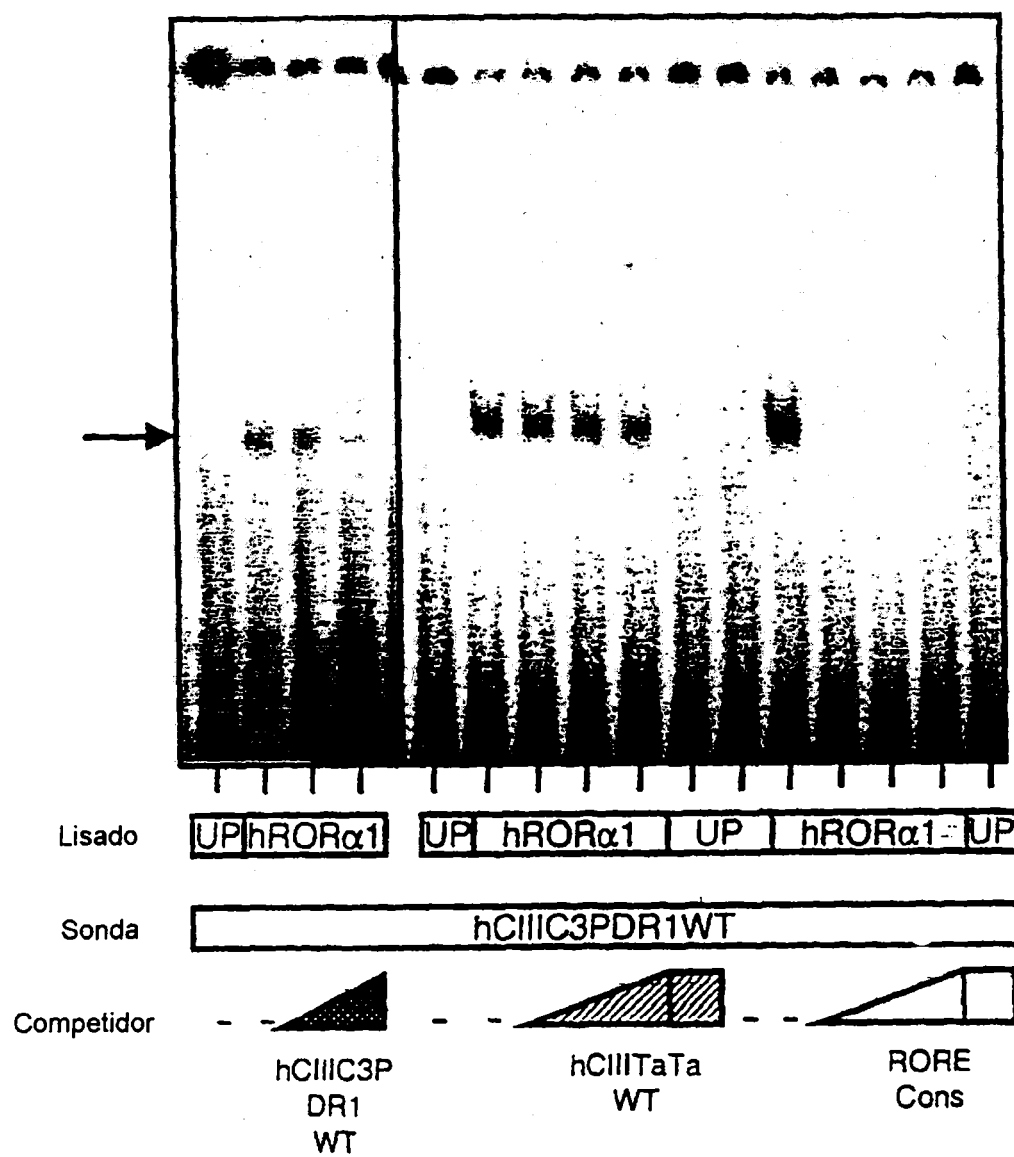


Fig.10

Fig.11

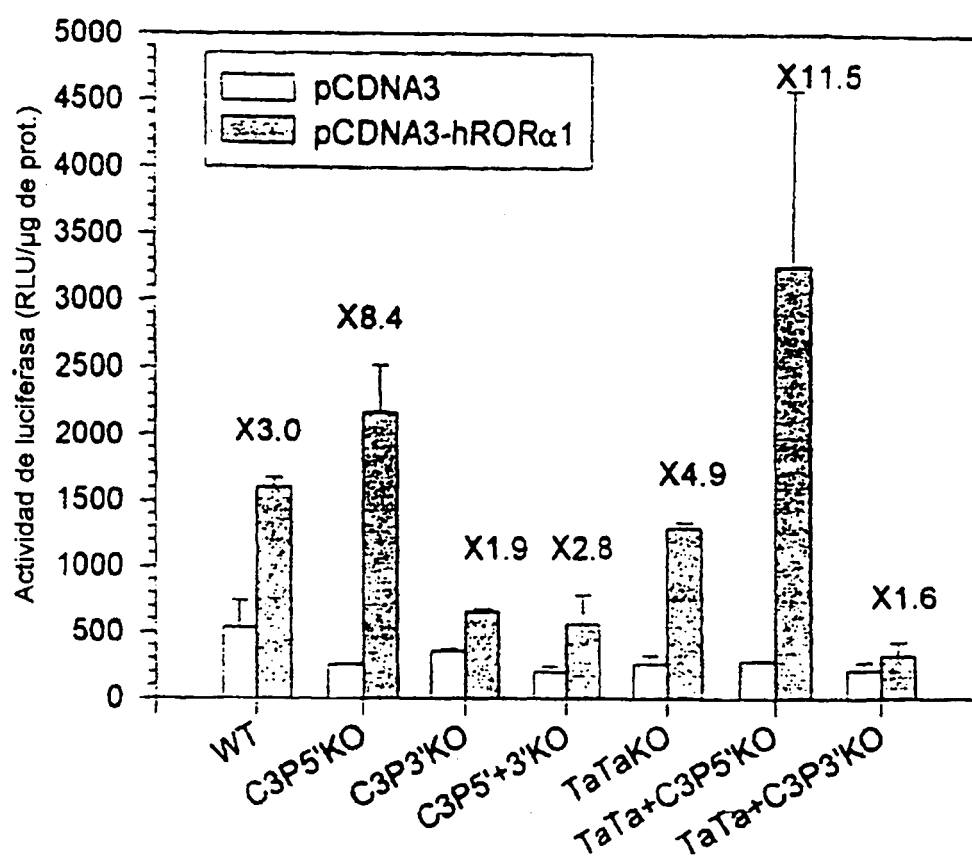


Fig.12

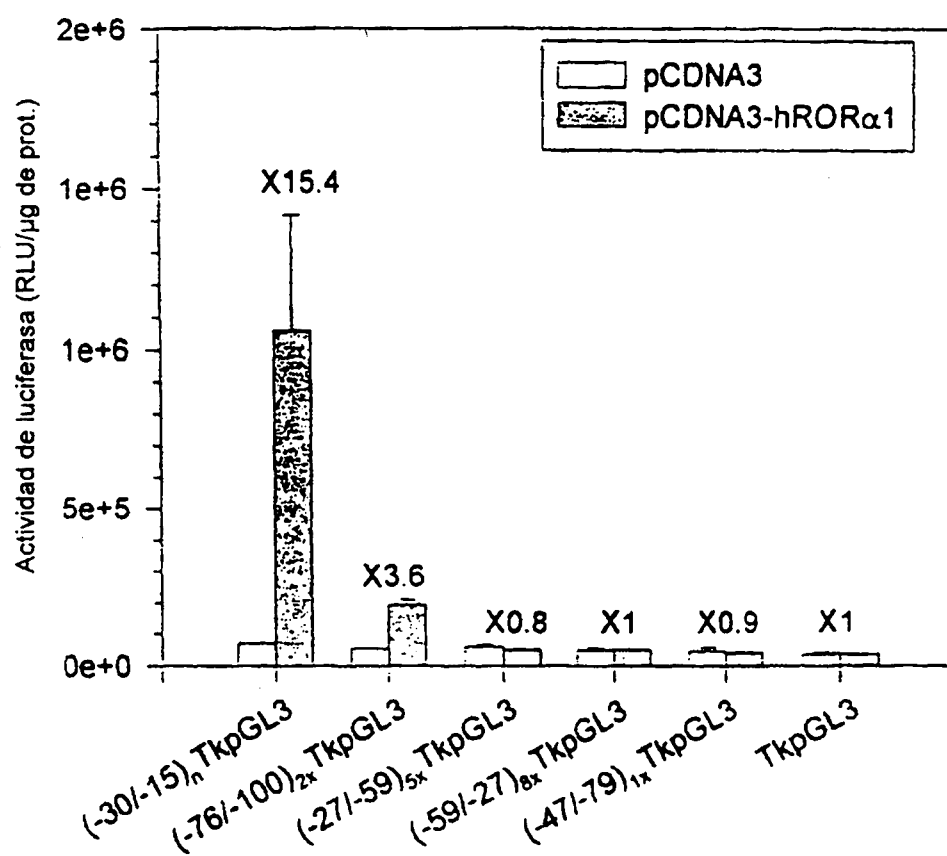


Fig.13

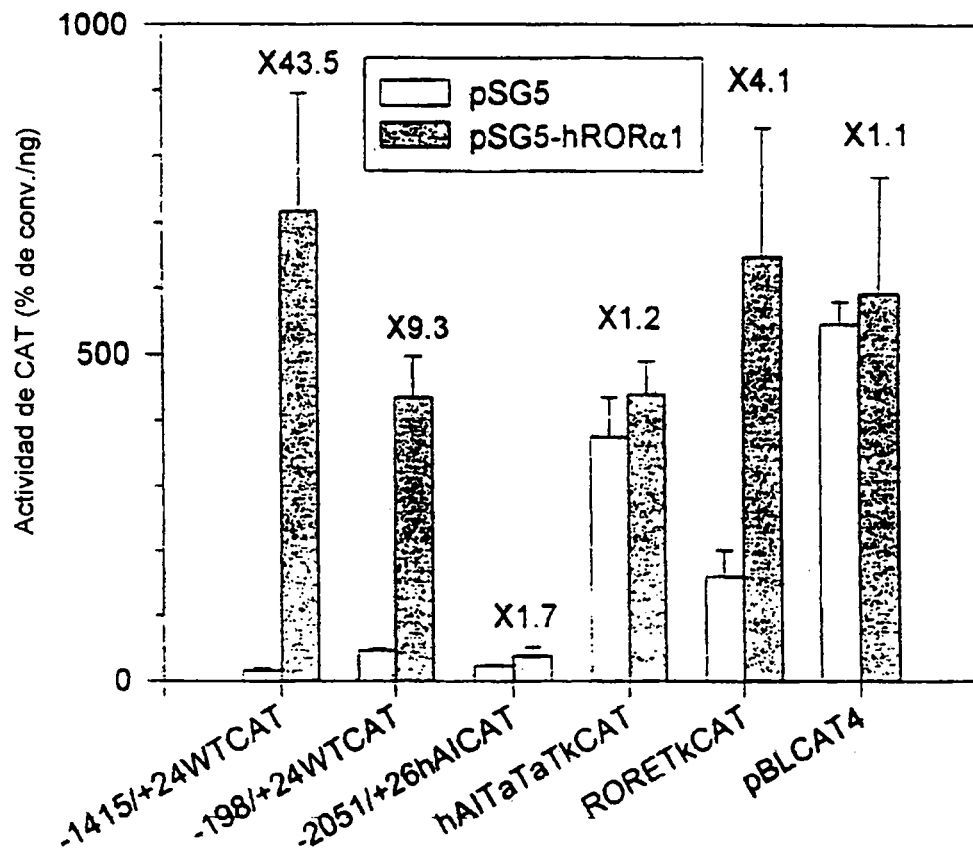
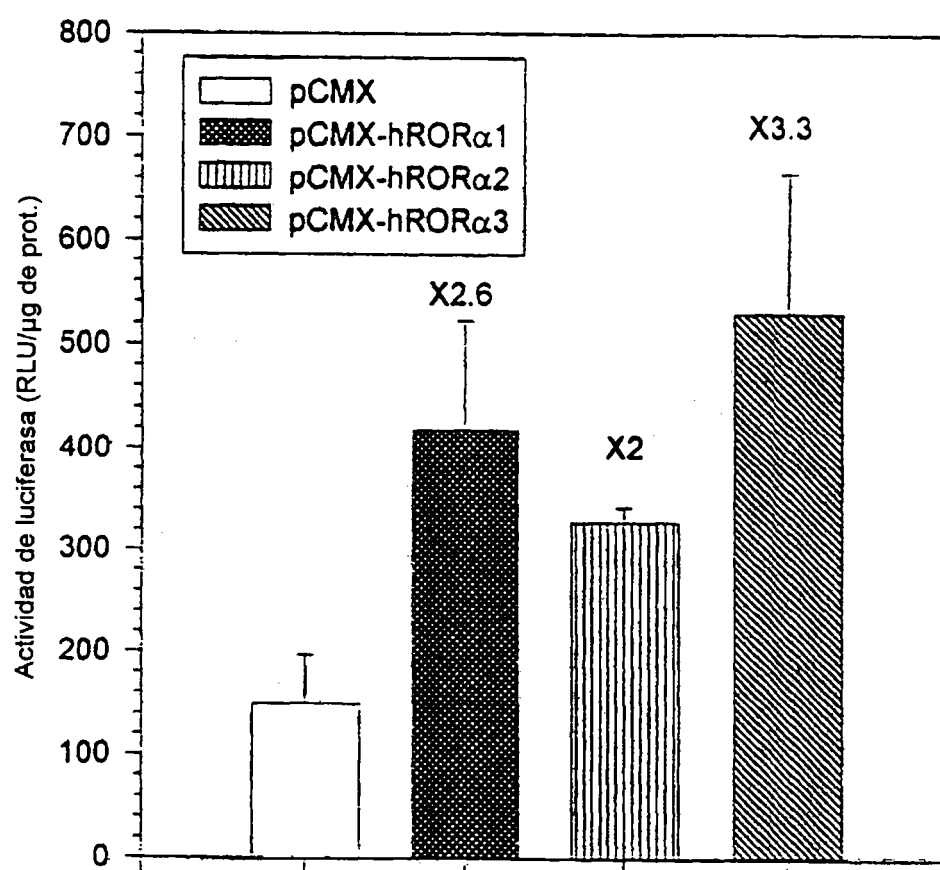


Fig.14



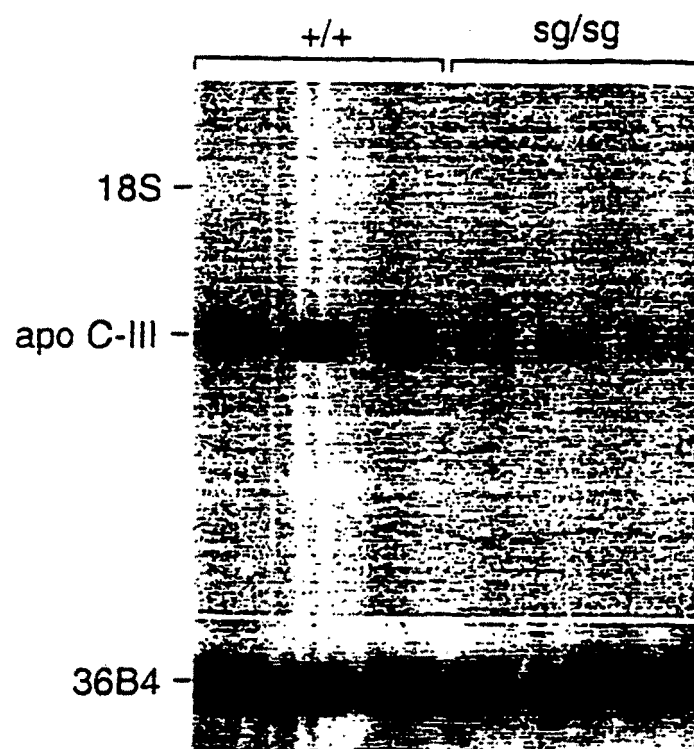


Fig.15

Fig.16

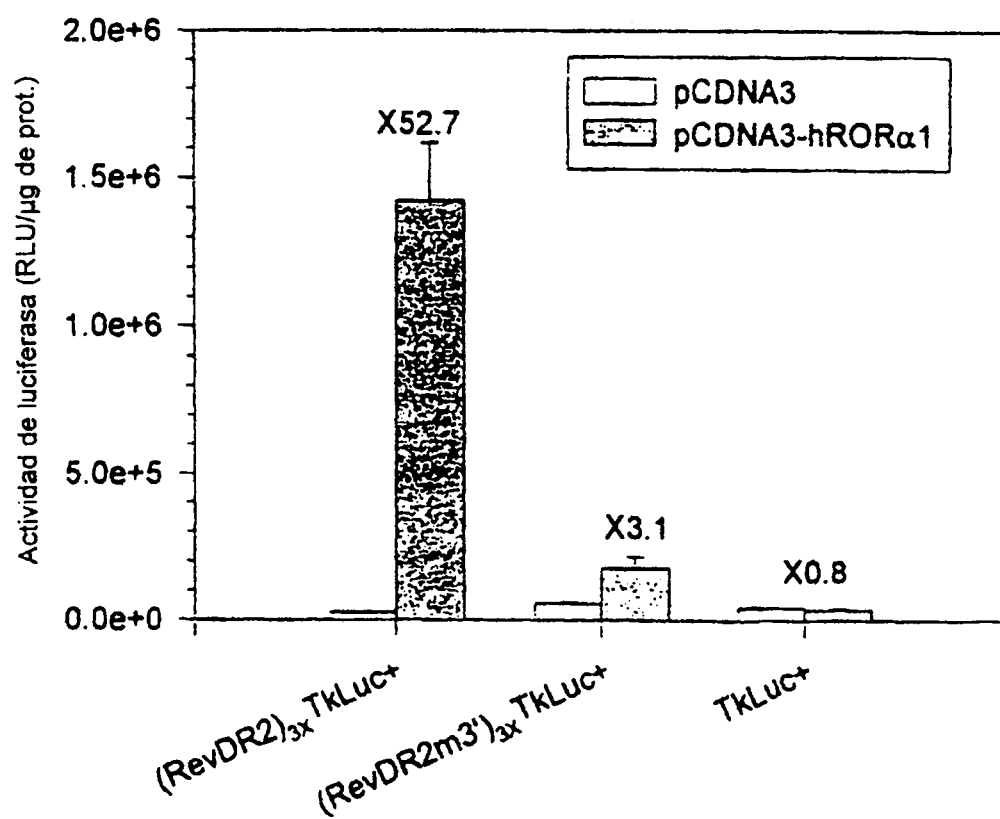


Fig.17

