



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 379**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07101726 .3**

96 Fecha de presentación : **11.07.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1865060**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Factor intermediario transcripcional 2.**

30 Prioridad: **12.07.1996 US 21247 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2011

73 Titular/es: **Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS),
Université de Strasbourg y
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**

72 Inventor/es: **Chambon, Pierre;
Gronemeyer, Hinrich;
Voegel, Johannes y
Lutz, Yves**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 354 379 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).

DESCRIPCION

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un mediador transcripcional de receptor nuclear (RN). Más específicamente, se dan a conocer moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican factor intermediario transcripcional 2 (TIF2). Los procedimientos recombinantes para producir polipéptidos TIF2 también se dan a conocer ya que son procedimientos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la función de activación AF-2 de receptores nucleares, así como anticuerpos TIF2. También se dan a conocer procedimientos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la actividad del dominio de activación AD1 de TIF2, así como se dan a conocer procedimientos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la actividad del dominio de activación AD2 de TIF2.

Antecedentes de la Invención

Los activadores que potencian la iniciación de la transcripción por ARN polimerasa B (II) están compuestos de al menos dos dominios funcionales: un dominio de unión a ADN y un dominio de activación (M. Ptashne, Nature 335: 683-689 (1988); P. J. Mitchell y col., Science 245: 371-378 (1989)). Estos dos dominios son generalmente unidades funcionales separables y cada una puede de hecho intercambiarse con la región complementaria de un activador no relacionado, produciendo por lo tanto activadores quiméricos funcionales (S. Green y col., Nature 325: 75-78 (1987)).

Se han realizado varios análisis de función-estructura de la transcripción de eucariotas, centrándose principalmente en las proteínas de levadura GAL4 y GUN4 y en miembros de la familia de receptores nucleares. Las proteínas GAL4 y GCN4 activan la transcripción uniéndose a secuencias de activación cadena arriba específicas, que tienen muchas de las características de elementos potenciadores de eucariotas superiores (K. Struhl, Cell 49: 295-297 (1987)). El activador de herpes simplex VP16 representa otro tipo de activador, que activa la transcripción uniéndose al factor de transcripción del octámero unido a ADN en lugar de unirse al ADN directamente (T. Gerster y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6347-6351 (1988)).

La familia de los receptores nucleares que incluye receptores de hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, vitamina D y el derivado de vitamina A ácido retinoico, son también factores que potencian la transcripción que se unen a ADN directamente en presencia de su ligando afín por reconocimiento de elementos potenciadores específicos, es decir, elementos sensibles a hormona o ligando (R. M. Evans, Cell 240: 889-895 (1988)). Estos ligandos afines tienden a ser moléculas pequeñas hidrófobas, que incluyen hormonas esteroideas tales como estrógeno y progesterona, hormona tiroidea, vitamina D y varios retinoides (S. Halachmi y col.,

Science 264: 1455-1458 (1994); Gronemeyer, H. y Laudet, V., Protein Profile 2: 1173-1308 (1995)).

5 A pesar de su pequeño tamaño y aparentemente simple estructura, sin embargo, se sabe que los ligandos afines asociados con RN inducen un amplio intervalo de respuestas fisiológicas. Los esteroides adrenales por ejemplo, tales como cortisol y aldosterona, influyen ampliamente en la homeostasis corporal, controlando el glucógeno y metabolismo mineral, tienen efectos generalizados en los sistemas inmune y nervioso e influyen sobre el crecimiento y diferenciación de células en cultivo. Las hormonas sexuales (progesterona, estrógenos y testosterona) provocan el desarrollo y determinación del sistema reproductor embrionario, 10 feminizan/masculinizan el cerebro al nacimiento, controlan la reproducción y comportamiento relacionado en adultos y son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. La vitamina D es necesaria para el desarrollo óseo adecuado y desempeña un papel crítico en el metabolismo del calcio y la diferenciación del hueso. Significativamente, la producción aberrante de estas hormonas se ha asociado con un amplio espectro de 15 enfermedades clínicas, incluyendo cáncer y afecciones patológicas similares.

Todos los RN presentan una estructura modular, con de cinco a seis regiones distintas, denominadas A-F. La región N terminal A/B contiene la función de activación AF-1, que puede activar la transcripción constitutivamente. La región C abarca el dominio de unión a ADN (DBD), que reconoce elementos que actúan en *cis* afines. La región E contiene el dominio de unión a 20 ligando (LBD), una superficie de dimerización y la función de activación transcripcional dependiente de ligando AF-2 (revisada en Mangelsdorff, D. J. y col., Cell 83:835-839 (1995a); Mangelsdorff & Evans, Cell 83: 841-850 (1995b); Beato, M. y col., Cell 83: 851-857 (1995); Gronemeyer & Laudet, "Transcription Factors 3: Nuclear Receptors", in Protein Profile, vol. 2, Academic Press (1995); Kastner, P. y col., EMBD J. 11: 629-642 (1992); Chambon, P., FASEB 25 J 10: 940-954 (1996)).

Varias clases de dominios en activadores son capaces de mediar la activación transcripcional. Los activadores de levadura GAL4 y GCN4 y VP16 de herpes simplex contienen todos dominios de activación que están compuestos de secuencias de aminoácidos 30 ácidos, que pueden actuar formando hélices α anfipáticas (I. A. Hope y col., Cell 46: 885-894 (1986); J. Ma y col., Cell 48: 847-853 (1987); E. Giniger y col., Nature 330: 670-672 (1987); S. J. Triezenberg y col., Genes Dev. 2: 718-729 (1988)). Las funciones de activación de proteínas humanas Sp1 y CTF/NPI contienen áreas ricas en glutamina y prolina, respectivamente (A. J. Courey y col., Cell 55: 887-898 (1988); N. Mermod y col., Cell 58: 741-753 (1989)). Los estudios con receptores de hormonas esteroideas han mostrado que tanto el dominio N 35 terminal A/B como el dominio de unión a hormona (HBD) C terminal contienen funciones de

activación de la transcripción (AF) (M. T. Bocquel y col., Nucl. Acids Res., 17: 2581-2595 (1989); L. Tora y col., Cell 59: 477-487 (1989)). Las AF del receptor de estrógenos humano (hER) no contienen secuencias de aminoácidos ácidos (S. Halachmi y col., Science 264: 1455-1458 (1994)). Por el contrario, sin embargo, el receptor de glucocorticoides humano (hGR) contiene dos funciones de activación τ -1 (localizado en el dominio A/B) y τ -2 (localizado en la región N terminal del HBD), ambos de los cuales son ácidos (S. M. Hollenberg y col., Cell 55: 899-906 (1988)).

A partir de los resultados de estudio sobre interferencia/silenciamiento transcripcional entre receptores nucleares y sobre estimulación homo y heterosinérgica de iniciación de la transcripción a partir de promotores mínimos por las funciones de activación presentes en hER (AF-1 y AF-2) y el activador ácido VP16, se ha propuesto que las AF pueden activar la transcripción interactuando con diferentes componentes del complejo de iniciación básico (Bocquel y col., Nucl. Acids. Res. 17: 2581-2595 (1989); Meyer y col., Cell 57: 433-442 (1989), L. Tora y col., Cell 59: 477-487 (1989)). Los estudios de las propiedades de interferencia/silenciamiento transcripcional de AAD, hER AF-1 y hER AF-2, sin embargo, mostraron que tanto hER AF-1 como AF-2 pueden silenciar activadores ácidos, tales como VP16, pero que lo contrario no era cierto, es decir, AAD no silencia hER AF-1 o AF-2. Sin embargo, hER AF-1 y AF-2, que se distinguen claramente por sus propiedades sinérgicas, sin embargo se silenciaban entre ellos (D. Tasset y col., Cell 62: 1177-1187 (1990)).

Basándose en estos resultados, se propuso que existe una serie de factores intermediarios transcripcionales (TIF), interpuesta entre factores potenciadores y los factores transcripcionales básicos. Por ejemplo, se ha sugerido que AF-1 y AF-2 se ponen en contacto con la serie de TIF a puntos funcionalmente equivalentes, mientras que se cree que AAD interactúan en un punto más temprano en la serie (D. Tasset y col., Cell 62: 1177-1187(1990)).

Se han caracterizado varios TIF coactivadores potenciales para RN AF-2 (véase Chambon, P., FASEB J 10: 940-954 (1996); Glass, C. K. y col., Current Opin. Cell Biol. 9: 222-232 (1997); Horwitz, K. B. y col., Mol. Endocrinol. 10: 1167-1177 (1996) para revisiones recientes). Voegel. J. y col., EMBO J. 15: 3667-3675(1996) han clonado un TIF2 de longitud completa que exhibe las propiedades esperadas para un mediador de AF-2. LeDouarin, B. y col., EMBO J. 15: 6701-6715 (1996) han demostrado que un fragmento de 10 aminoácidos de TIF1 α es necesario y suficiente para mediar la interacción con RXR en un ligando de un modo dependiente de integridad de AF-2 y ligando. Notablemente, dentro de este fragmento de TIF1 α , identificaron un motivo LxxLLL (SEC ID N $^{\circ}$: 13), denominado caja RN, cuya integridad se requiere para la interacción con receptores nucleares y señala que este motivo está

conservado en varios coactivadores potenciales distintos (LeDouarin, B. y col., EMBO J. 15: 6701-6715 (1996)). Mientras que TIF1 α y varios coactivadores potenciales distintos no estimulan la transactivación por NR en células mamíferas transfectadas transitoriamente o lo hacen muy escasamente, se ha mostrado de manera inequívoca que la familia TIF2/SRC-1 (Oñate, S.A. y col., Science 270: 1354-1357 (1995); Voegel, J. J. y col., EMBO J. 15:3667-3675 (1996)), la familia CBP/p300 (Kamei, Y. y col., Cell 85: 403-414 (1996); Chakravarti, D. y col., Nature 5: 99-103 (1996); Hanstein, B., y col., Proc. Natl. Acad Sci USA 93: 11540-11545 (1996); Smith, C. L. y col., Proc. Natl. Acad Sci. USA 93: 8884-8888 (1996); para revisiones recientes véase Eckner, R., Biol. Chem. 377: 685-688 (1996); Janknecht & Hunter, Current Biol. 6: 951-954 (1996b); Shikama, N. y col., Trends in Cell Biol. 7: 230-236 (1997)) y el coactivador del receptor de andrógenos ARA70 (Yeh & Chang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5517-5521 (1996)) potencian la actividad de AF-2.

Además de la unión a NR, CBP/p300 también puede interaccionar directamente con SRC-1 (Kamei, Y. y col., Cell 85: 403-414 (1996); Yao, T. P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10626-10631 (1996)) y se ha mostrado que ambos factores ejercen actividad acetiltransferasa de histona (Bannister & Kouzarides, Nature 384: 641-643 (1996); Ogryzko, V. V. y col., Cell 87: 953-959 (1996)). Además, CBP/p300 puede reclutar p/CAF que por sí mismo es una acetiltransferasa de histona nuclear (Yang, X. J. y col., Nature 382: 319-324 (1996)). Sin embargo, aparte de interaccionar con coactivadores en un modo dependiente de ligando, también se ha mostrado que NR interaccionan, a menudo de un modo independiente de ligando, directa o indirectamente con componentes de la maquinaria transcripcional, tales como TFIIB, TBP, TAF o TFLIH (Baniahmad y col., (1993); Jacq, X. y col., Cell 79: 107-117 (1994); Schulman, IG. y col., Mol. Cell. Biol. 16: 3807-3813 (1996); May, M. y col., EMBO J. 15: 3093-3104 (1996); Mengus, G. y col., Genes & Dev. 11:1381-1395 (1997)).

Hong, H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4948-4952 (1996) originalmente describieron un ADNc parcial del homólogo de ratón de TIF2, denominado GRIP1 y notificaron recientemente el aislamiento de un ADNc de GRIP 1 de longitud completa (Hong, H. y col., Mol. Cell. Biol. 17: 2735-2744 (1997)). Usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un sistema modelo han mostrado que la activación transcripcional por TR, RAR y RXR, también puede estimularse por la coexpresión de GRIP1, lo que sugiere que TIF2/GRIP1 puede ser un coactivador general de NR (Hong, H. y col., Mol. Cell. Biol. 17: 2735-2744 (1997)).

El retrato global que surge de múltiples estudios recientes sobre los mecanismos mediante los cuales los receptores nucleares modulan la transcripción génica implica tres etapas posteriores, (i) la transconformación inducida por ligando de NR LBD, que da como resultado (ii) la disociación de correpresores y formación de complejos TIF/coactivador, que

por sí mismos (iii) a través de interacción con factores corriente abajo adicionales (por ejemplo, CBP, p300) modulan el estado de acetilación de histonas centrales y, por tanto, la condensación/descondensación de la cromatina. La acetilación de la histona por sí misma es, sin embargo, insuficiente para activación de la transcripción (Wong y col, (1997)) y un cuarto evento simultáneo o posterior comprende el reclutamiento directo y/o indirecto de elementos de la maquinaria transcripcional (por ejemplo, TFIB, TBP, TAF, TFIIH; Jacq, X. y col., Cell 79: 107-117 (1994); Schulman, IG. y col., Mol. Cell. Biol. 16: 3807-3813 (1996); May; M. y col., EMBO J. 15: 3093-3104 (1996); Mengus, G. y col., Genes & Dev. 11: 1381-1395 (1997)). Nótese que dichas interacciones no necesitan ser dependientes de ligando, si la función primaria del LBD unido a ligando (AF-2) es regular la accesibilidad al ADN a través de remodelado de la cromatina. De hecho, varias de las interacciones notificadas entre NR y factores de transcripción general se producen de un modo independiente de ligando. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica del aislamiento y caracterización de factores intermediarios transcripcionales.

15 **Sumario de la Invención**

Explorando 340.000 clones de un biblioteca de expresión de ADNc de placenta humana con una sonda de receptor de estrógeno unida a estradiol, los presentes inventores han identificado un clon de ADNc que contiene el gen que codifica el factor intermediario transcripcional 2 (TIF2). Por la invención, se ha mostrado que TIF2 exhibe todas las propiedades que se esperan para un TIF/mediador de AF-2: interacciona directamente con los LBD de varios NR en un modo dependiente de agonista e integridad de AF-2 *in vitro* e *in vivo*, alberga una AF autónoma, libera el autosilenciamiento de NR y potencia la actividad de NR AF-2 cuando se sobreexpresa en células de mamífero.

Por tanto, la presente invención da a conocer moléculas de ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica TIF2 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2) o un fragmento del mismo. La invención también da a conocer moléculas de ácido nucleico que codifican TIF2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se codifica por el ADNc depositado como N° de Depósito ATCC 97612.

La invención da a conocer adicionalmente una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida en condiciones estrictas a las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. La presente invención también da a conocer variantes de las moléculas de ácido nucleico en el contexto de la presente invención, que codifican fragmentos, análogos o derivados de la proteína TIF2, por ejemplo, polipéptidos que tienen al menos una actividad biológica que es sustancialmente similar a al menos una actividad biológica de la proteína TIF2.

La presente invención da a conocer adicionalmente moléculas de ácido nucleico

aisladas que codifican un polipéptido TIF2 citoplasmático. Los procedimientos para generar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido TIF2 citoplasmático incluyen mutación o delección de la región N terminal que codifica NLS de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1). Preferentemente, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de TIF2 citoplasmático serán fragmentos que tienen una delección en toda o parte de la región codificante de NLS N terminal. Por la invención, los polipéptidos de TIF2 citoplasmáticos descritos en el presente documento presentan al menos una actividad biológica que es sustancialmente similar a al menos una actividad biológica de TIF2.

La invención da a conocer moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % idéntica y más preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente.

La presente invención también da a conocer vectores que contienen las moléculas de ácidos nucleicos aisladas descritas anteriormente, células huésped transformadas con los vectores y la producción de polipéptidos de TIF2 por procedimientos recombinantes.

La presente invención proporciona adicionalmente polipéptido de TIF2 aislados que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 2), En particular, la presente invención proporciona un polipéptido que tiene una actividad de proteína de TIF2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) aminoácidos de 1 a 1464 de SEC ID N°: 2;
- (b) la secuencia de aminoácidos completa como se codifica por el ADNc contenido en el N° de Depósito ATCC 97612;
- (c) aminoácidos de 624 a 869 de SEC ID N°: 2;
- (d) aminoácidos de 624 a 1131 de SEC ID N°: 2;
- (e) aminoácidos de 1410 a 1131 de SEC ID N°: 2;
- (f) aminoácidos de 1288 a 1464 de SEC ID N°: 2;
- (g) aminoácidos de 624 a 1287 de SEC ID N°: 2;
- (h) aminoácidos de 624 a 1179 de SEC ID N°: 2;
- (i) aminoácidos de 624 a 1010 de SEC ID N°: 2;
- (j) aminoácidos de 870 a 1179 de SEC ID N°: 2;
- (k) aminoácidos de 1010 a 1179 de SEC ID N°: 2;
- (l) aminoácidos de 940 a 1179 de SEC ID N°: 2;
- (m) aminoácidos de 940 a 1131 de SEC ID N°: 2; y
- (n) una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a una cualquiera de (a)-(m);

seleccionándose dicha actividad TIF2 del grupo que consiste en: unión a un receptor nuclear y

potenciación de la transcripción. La presente invención proporciona adicionalmente polipéptidos siendo la secuencia de aminoácidos de (n) al menos el 95 % idéntica a una cualquiera de (a) a (n). También se proporcionan en el presente documento dichos polipéptidos que se producen por una célula huésped recombinante. En un aspecto adicional, se dan a conocer polipéptidos de TIF aislados que tienen una secuencia de aminoácidos como se codifica por el ADNc depositado como N° de Depósito ATCC 97612.

También se dan a conocer procedimientos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la función de AF-2 del receptor nuclear, para identificar agonistas y antagonistas de la actividad de TIF AD1 y para identificar agonistas y antagonistas de la actividad de TIF2 AD2. También se describen anticuerpos TIF2.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1(a-b). Las secuencias de nucleótidos (SEC ID N°: 1) y aminoácidos (SEC ID N°: 2) de la proteína factor intermediario transcripcional 2 (TIF2). Esta proteína tiene un peso molecular deducido de aproximadamente 160 kDa. La secuencia de aminoácidos del fragmento de proteína del coactivador funcional TIF2.1 se muestra del resto de aminoácidos 624 al resto 1287.

Figura 2(a-c). TIF2 es el factor de interacción de receptor nuclear de 160 kDa.

(a) los experimentos de inmunoprecipitación de complejos de GST identificaron una proteína de 160 kDa que interaccionaba con el receptor de estrógenos unido a ligando (ER) y los dominios de unión a ligando (LBD) del receptor de ácido retinoico (RAR)- α (ER(DEF) y RAR α (DEF), respectivamente). Nótese que se procesó menos material en el carril 5 que en los carriles 1-4.

(b) La inmunodepleción seguida de detección Far-Western demuestra la identidad de TIF2 con la proteína de 160 kDa identificada bioquímicamente. El triángulo abierto, TIF2; la cabeza de flecha, TIF1; círculo, reacción cruzada de anticuerpo frente a GST-ER (DEF). La especie inmunodetectada de p α -TIF2 más pequeñas que TIF2 (carriles 2 y 6) más probablemente es un producto de la degradación de TIF2, ya que se elimina por inmunodepleción con m α -TIF2 (carriles 4 y 8). (c) La transferencia de Northern revela un transcrito de TIF2 de \approx 9 kb en diversos tejidos humanos.

Procedimientos. (a) Extractos de célula total de MCF7 marcados con ³⁵S-Met *in vivo* (Cavaillès, V. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10009-100013 (1994)) dos veces preaclerados con sepharose de glutatión cargado con GST, se incubaron (Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14: 2020-2033 (1995)) con GST, GST-hER (DEF) o GST-hRAR α (DEF), en

presencia o ausencia de E2 10^{-6} M o T-RA. Las proteínas unidas se recuperaron con tampón de muestra SDS y se revelaron por fluorografía (Amplify, Amersham) de geles de SDS-poliacrilamida.

(b) Extractos celulares totales de HeLa (2 ml en Na Cl 500 mM, TrisHCl 250 mM pH 7,5, glicerol al 20 %, DTT 5 mM), se preaclararon con sepharose proteína-G (400 μ l) se trataron con sepharose de proteína-G (3 x 400 μ l) cargado con $m\alpha$ -TIF2 (producido frente a un péptido sintético que abarca los aminoácidos E624-Q643 acoplados a ovoalbúmina) o suero de IgG de ratón no específico. Después de aclarado adicional con sepharose proteína G (400 μ l), se incubó el sobrenadante (Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14: 2020-2033 (1995)) con GST-hER(DEF) en presencia o ausencia de E2(10^{-6} M]. Las proteínas retenidas se recuperaron con tampón de muestra SDS, se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. La transferencia Far Western fue como describen (Cavaillès, V. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10009-100013 (1994)). Para la inmunotransferencia se usó antisuero policlonal de conejo ($p\alpha$ -TIF2), producido frente a (Chen, Z-P. y col., J. Biol. Chem. 269: 25770-25776 (1994)) TIF2.1 purificado marcado con histidina expresado en *E. coli* recombinante. $p\alpha$ -TIF2 y $p\alpha$ -TIF1 policlonal de conejo se diluyeron 1:2000 para transferencia de Western basada en ECL (Amersham). Todas las construcciones usadas en este estudio se verificaron por secuenciación de ADN.

(c) La Transferencia Northern humana (Clonotech, N° 7760-1; Lote 5x332) se reveló con TIF2.1 marcado con 32 P. Para confirmar la carga proporcional, la membrana se rehibridó con ADNc de β -actina marcada con 32 P (Clonotech).

Figure 3(a-b). Secuencia de aminoácidos de TIF2: la homología con SRC-1 indica la existencia de una familia nueva de mediadores de NR.

(a) Alineamiento y secuencias de aminoácidos de TIF-2 (SEC ID N°: 2) y el coactivador de receptor esteroideo SRC-1 (SEC ID N°: 3) (Onate, S.A. y col., Science 270: 1354-1357 (1995)). Dos grupos cargados ricos en restos de aminoácidos ácidos y básicos, tres regiones ricas en serina/treonina (S/T) y una región rica en glutamina se destacan. El grupo cargado de N terminal contiene señales de localización nuclear bipartita potenciales (NLS) (subrayadas). Se indican las regiones que codifican TIF2.1 (aminoácidos de 624 a 1287;

fragmento coactivador funcional) y dnSRC-1 (aminoácidos de 865 a 1061; fragmento negativo dominante). Un asterisco identifica el codón de terminación TIF2. Nótese que TIF2.1 y dnSRC-1 no solapan, lo que indica que dnSRC-1 puede contener posiblemente una región de interacción con NR distinta de la de TIF2.1.

(b) Comparación esquemática de TIF2 y SRC-1. Se indican los porcentajes de identidad (similitudes entre paréntesis) de regiones homólogas. El grupo cargado N terminal que alberga el NLS potencial y la región rica en S/T C terminal de TIF2 no se conservan en SRC-1 o lo hacen sólo débilmente.

Procedimientos. Se exploraron 340.000 clones de una librería de expresión de λ EXlox de ADNc de placenta humana con una sonda de GST-hER(DEF) marcada con ^{32}P en presencia de E2 10^{-6}M usando la técnica Far-Western (Cavaillès, V. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10009-100013 (1994)). El inserto de 1992 pb correspondiente al clon inicial (TIF2.1) se usó para reexplorar la misma biblioteca. Cinco insertos de ADNc altamente solapantes cubrieron una región de 6 kb que contenía una ORF de 1.464 aminoácidos. Todos los insertos se secuenciaron en ambas cadenas. La expresión transitoria de los insertos de ADNc ensamblados que abarcan la ORF prevista produjeron una proteína de 160 kDa.

Figura 4(a-n). Interacciones *in vivo* e *in vitro* de TIF2 con receptores nucleares.

(a) La proteína TIF2 sobreexpresada se localiza principalmente en cuerpos nucleares discretos y se excluye de los nucleolos. Se muestra una imagen superpuesta de tinción de ADN de Hoechst y la inmunotinción de TIF2.

(b-i) TIF2.1 citoplasmático interacciona de un modo dependiente de agonista con receptores nucleares en células de mamífero. La tinción débil indica la colocalización de TIF2.1-NO.

(k-n) TIF2.1 directamente interacciona *in vitro* en un modo dependiente de agonista con receptores nucleares y las mutaciones puntuales dentro del dominio de activación de AF-2 (AD) suprimen esta interacción. WT, tipo silvestre. Las concentraciones de ligando para *n*: 9C-RA, T-RA y T3, 10^{-6}M ; E2, $5 \times 10^{-8}\text{M}$; OHT, $5 \times 10^{-6}\text{M}$. El polipéptido inmunodetectado más pequeño es un producto de degradación de TIF2.1. Nótese que el suero anti-TIF2 reacciona de manera cruzada débilmente con GST-hER(DEF).

Procedimientos. (a-i) Se introdujo por transfección de manera transitoria TIF2.1 (10 μg) a células Cos-1 (a) solo o (b=i) además de los

vectores de expresión de NR indicados (10 µg, excepto RARα, 1 µg) en ausencia o presencia del ligando afín (10⁻⁶M, excepto R5020, 10⁻⁸ M). En d-f se usó HE0 (Webster, N. J. y col., Cell 54: 199-207 (1988)). Los ensayos de inmunocitofluorescencia fueron como se describe (Kastner, P. y col., EMBO J. 11: 629-642 (1992)). Las imágenes se registraron por microscopía de láser confocal.

(k-n) Los ensayos de interacción de GST con TIF2.1 recombinante expresado en *E. coli* (Figura 2b) se realizaron como se describe (Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14: 2020-2033 (1995)). Las proteínas unidas se revelaron por transferencia de Western con antisuero pα-TIF2 (dilución 1: 30.000), la misma carga de matrices de afinidad se verificó por SDS-PAGE y tinción de Coomassie. Los carriles “de entrada” contienen un tercio de entrada de TIF2.1.

Figura 5 (a-e). TIF2 contiene una AF autónoma, “antisilenciamientos” y estimula la actividad NO-AF2 en un modo dependiente de células, promotores y agonista.

(a) Las cantidades en aumento de la proteína de fusión GAL-TIF2.1 (carriles 2-4) activan la transcripción de un indicador afín en células transfectadas. Las veces de inducciones se proporcionan a continuación de los ensayos CAT.

(b) TIF2.1 parcialmente invierte la autointerferencia transcripcional de ER. Se muestra la expresión de CAT normalizada (media ± e.t. de 4 experimentos independientes). Los círculos abiertos, +E2, +TIF2; cuadrados, +E2, -TIF2; cruces, +OHT, +TIF2.

(c) TIF2 potencia la transactivación mediada por algunos NR AF-2, pero no la mediada por otros factores de transcripción. Se proporcionan las estimulaciones de TIF2 medias de 3 experimentos independientes (variación ≤ 13 %). Ligandos: carriles 3-4, E2; carriles 7-8, DHT (dihidrotestosterona); carriles 11-12, R5020; carriles 15-16, T-RA.

(d) TIF2 potencia la activación transcripcional mediada por PR tanto de un promotor mínimo (GRE-TATA) como de uno complejo (MMTV); esta estimulación es significativamente mayor en células Cos-1 que en HeLa.

(e) TIF2 potencia mucho la activación inducida por agonista por ER en Cos-1 y más débilmente en células HeLa. Nótese que la inducción de TIF2 débil aparentemente independiente de ligando de ER (comparar carriles 1 con 2 y 7 con 8) se debe al estradiol residual en el medio de cultivo. En d y e, se muestran las inducciones de TIF2 de ≥ 3 experimentos (variación ≤ 10 %).

Procedimientos. Con la excepción de GAL-TIF2.1, TIF2.1 y TIF2, se ha descrito la construcción de plásmidos indicadores y vectores de expresión (Meyer, M-E. y col., Cell 57:433-442 (1989); Bocquel, M-T. y col., Nucl. acids Res. 17:2581-2595 (1989); Tasset, D. y col., Cell 62:1177-1187 (1990); Gronemeyer, H. y Laudet, V., Protein Profile 2:1173-1308 (1995); Webster, N. J. y col., Cell 54:199-207 (1988); Strähle, U. y col., FMBO J. 7:3389-3395 (1988); Seipel, K. y col., EMBO J. 11:4961-4968 (1992); Nagpal, S. y col., EMBO J. 12:2349-2360 (1993); Chen, J-Y. y col., EMBO J. 14:1187-1197 (1995)). Los ensayos CAT se realizaron como se describe (Bocquel, M-T. y col., Nucl. Acids Res. 17:2581-2595 (1989)).

(a) las células HeLa se cotransfectaron con 1 μg (17 m)₅- β G-CAT y 10 μg de GAL(1-147) o 1,3 y 10 μg de GAL (1-147)-TIF2.1, respectivamente.

(b) las células HeLa se cotransfectaron con 5 μg de Vit-tk-CAT y la cantidad indicada de HEG0, con o sin 5 μg de TIF2.1 en presencia de E2 10^{-6} M u OHT. La actividad CAT se proporciona en relación a la inducida por 100 ng de HEG0 en presencia de E2.

(c) las células HeLa se cotransfectaron con 1 μg de 17 m-tk-CAT y 1 μg de los vectores de fusión de GAL indicados con o sin la adición de 3 μg de vectores de expresión de TIF2 en presencia o ausencia de ligando 10^{-6} M.

(d) Las células HeLa (carriles 1-12) o Cos-1 (carriles 13-18) se transfectaron con 5 μg de GRE-TATA-CAT (carriles 1-6) o 1 μg de MMTV-CAT (carriles 7-18) junto con 1 μg de hPR con o sin 3 μg de TIF2 en presencia o ausencia del ligando indicado a 10^{-6} M.

(e) las células Cos-1 se cotransfectaron con 1 μg de Vit-tk-CAT y 1 μg de HEG0 con o sin 3 μg de TIF2 en presencia o ausencia de los ligandos indicados a 10^{-6} M.

Figura 6 (a-b). Representación esquemática de genes indicadores (A) y vectores de expresión receptores (B) (véase la sección de Materiales y Procedimientos de Nagpal y col., EMBO J 12 (6): 2349-2360 (1993) para una descripción detallada de la construcción). Se indican las secuencias de mCRBP II (SEC ID N^o: 11) y mCRBP II (17mERE) CAT (SEC ID N^o: 11). Los números con menos y con más son con respecto al sitio de inicio del ARN (+1). En (B), las diversas regiones (A-F) de RXR y RAR de tipo silvestre, así como sus mutantes de truncamiento, mutantes de sustitución y

construcciones de receptor quimérico se representan esquemáticamente (no a escala) (véase Zelent y col., *Nature* 339:714-717 (1989); Leid y col., *Trends Biochem. Sci.* 17:427-433 (1992); Leid y col., *Cell* 68:377-395 (1992); Nagpal y col., *Cell* 70:1007-1019 (1992); y Allenby y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:30-34 (1993)). Los números indican las posiciones de aminoácidos en el receptor de tipo silvestre. Las posiciones de las sustituciones de aminoácido se indican con una flecha.

Figura 7 (a-e). Mapeo de dominios TIF2.

(a) representación esquemática de dominios funcionales identificados en TIF2. Se indican las diversas construcciones de TIF2; los restos expresados se proporcionan entre paréntesis. Las líneas en negrita indican secuencias expresadas. Las construcciones que puntúan positivo o negativo para la interacción de NR, transactivación o unión de CBP se identifican en la derecha por los signos “+” y “-”; respectivamente; ND no determinado.

(b) mapeo del dominio de interacción con el receptor nuclear de TIF2. Los experimentos de inmunoprecipitación de complejos de glutatión-S-transferasa (GST) se realizaron con polipéptidos TIF2 traducidos *in vitro* marcados con ³⁵S y GST, GST-hER α (DEF) y GST-hRAR α (DEF) producidos por bacterias en presencia o ausencia del ligando afín a 10⁻⁶ M (E2, estradiol para ER; ácido *trans-retinoico* para RAR).

(c) Análisis de la actividad transcripcional de proteínas de fusión GAL-TTF2. Se transfectaron células Cos-1 y HeLa con 3 μ g de plásmidos que expresaban diferentes regiones de TIF2 fusionadas con el dominio de unión de ADN del factor de transcripción de levadura GAL4 junto con 1 μ g del plásmido indicador (17 m)₅-G-CAT. Los ensayos CAT se realizaron como se describe (Bocquel, M. T. y col., *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989)). Los datos cuantitativos sobre la expresión del indicador de CAT se obtuvieron por análisis de diagnóstico por imágenes de fósforo (BAS2000, Fuji) de productos de reacción de CAT marcados con ¹⁴C separados por cromatografía de capa fina o usando el kit de ELISA de CAT (Boehringer Mannheim). En todos los casos las actividades de CAT se normalizaron a las concentraciones de β -galactosidasa resultantes de la co-transfección de 1 μ g de pCMV β Gal (donación de T. Lerouge) como control interno. Se indican las veces de inducciones sobre el valor de GAL4 DBD. Se muestran la media y la desviación típica de al menos tres experimentos. Una transferencia de Western representativa que ilustra los niveles de expresión de las proteínas de fusión GAL4-TIF2, expresadas a partir de 10 μ g de los

correspondientes vectores de expresión, se muestra en la izquierda. La transferencia se reveló con anticuerpos monoclonales de ratón 2GV3 y 3GV2 específicos para GAL4 DBD y 2GV4B7 específicos para el dominio de activación de VP16.

5 (d) Mapeo del dominio de interacción con CBP de TIF2. Los experimentos de inmunoprecipitación de complejos de GST se realizaron con polipéptidos de TIF2 traducidos *in vitro* marcados con ³⁵S y GST y GST-CBP producidos por bacterias (que expresaban restos de CBP de 1872 a 2165).

10 (e) Dos análisis de híbridos de la interacción CBP-TIF2 en células de mamífero *in vivo*. Las células HeLa se transfectaron con 0,2 µg de los vectores de expresión GAL4 o GAL4-CBP (que expresaban los restos de CBP de 1872 a 2165) junto con 0,2 µg de los vectores de expresión VP16 o VP16-TIF2 en presencia de 1 µg de plásmido indicador (17m)₅-TATA-CAT. Se indican las veces de inducción en relación con la actividad de GAL-CBP. Se muestra la
15 media de tres experimentos; en cada caso, los valores variaron en menos de ±20 %.

Figura 8 (a-e). Mapeo del dominio de interacción con el receptor nuclear TIF2 (NTD).

20 (a) Alineamiento de TIF2 NID (SEC ID N°: 2) con las regiones correspondientes de SRC-1 (SEC ID N°: 3) y P/CIP (SEC ID N°: 5) y descripción de mutaciones de NID. Las tres regiones conservadas se presentan con los números de aminoácidos correspondientes de hTIF2 o hSRC-1 de longitud completa (F-SRC-1); las leucinas que pertenecen a los tres motivos de cajas NR (I, II, III) están rodeadas por cajas. Se indican las diversas construcciones de mutaciones puntuales leucina a alanina y de delección.

25 (b) Alineamiento de las cajas NR TIF2 (SEC ID N°: 2) con cajas NR identificadas en varios cofactores: TIF1α (SEC ID N°: 6); RIP140 (SEC ID N°: 7) y TRIP3 (SEC ID N°: 8). Las leucinas conservadas están rodeadas por cajas.

30 (c-d) Interacción de mutantes TIF2 NID con NR *in vitro*. Los experimentos de cromatografía de afinidad de GST se realizaron con fusiones GAL4 DBD traducidas *in vitro* marcadas con ³⁵S de mutantes de delección de TIF2 (c) o mutantes puntuales de TIF2.1

35 (d) y GST y fusiones de GST expresadas por bacterias de los ER(DEF) y RAR(DEF) en ausencia o presencia de estradiol 10⁻⁶ M o ácido *trans-retinoico*, respectivamente. Para la cuantificación de interacciones de mutaciones puntuales, véase a continuación.

(e) Efecto de las mutaciones puntuales de TIF2 NID en la estimulación de la actividad NR AF-2. Las células Cos-1 se co-transfectaron con 1 μg del indicador (17 m)₅ –TATA-CAT, 0,2 μg de GAL-hER α (EF) o GAL-mRXR α (DE) y 2,5 μg del tipo silvestre de TIF2.1 o fragmentos mutados, como se indica. La activación del gen indicador en relación con la actividad del TIF2.1 de tipo silvestre y en presencia de estradiol 10⁻⁶ M (E2) o ácido *trans-retinoico* (RA), respectivamente, se indica para cada mutante (barras negras); para comparación, la unión *in vitro* de los mutantes respectivos en relación con la unión del TIF2.1 de tipo silvestre en presencia de ligando se indica con las barras blancas. Cada barra representa el valor medio obtenido de al menos tres (interacción) o al menos cuatro (transactivación) experimentos, respectivamente; se indican las desviaciones típicas. Nótese que los valores absolutos de la actividad de TIF2.1 de tipo silvestre variaron en $\pm 16\%$ cuando se co-transfectaron con GAL-hER α (EF) y en $\pm 34\%$ cuando se co-transfectaron con GAL-mRXR α (DE). En los ensayos de interacción *in vitro*, la afinidad del patrón de tipo silvestre de TIF2.1 varió en menos del $\pm 25\%$. Los niveles de expresión de mutantes de TIF2 en las células se verificaron por transferencia de Western (no mostrados) con anticuerpo monoclonal de ratón 3Ti3F1, que se dirige contra un epítipo fuera del área mutada.

Figura 9 (a-c). Mapeo de la función de activación 1 de TIF2-1 (AF-1) e interacción del dominio de AF-1 con CBP.

(a) alineamiento de TIF2 AF-1, con la región correspondiente de SRC-1 (SEC ID Nº: 3) y P/CIP (SEC ID Nº: 9). Descripción de los mutantes de delección de TIF2 AF-1 y sus propiedades. Las regiones de TIF2 y hSRC-1 previstas para plegarse en α -hélices se rodean por cajas (programa PHD). Las construcciones GAL-TIF2 que puntúan positivo o negativo para la transactivación de un indicador GAL4 se identifica en la derecha por los signos “+” y “-”, respectivamente; ND, no determinado.

(b) activación transcripcional de mutantes TIF2 AF-1. Las células Cos-1 y HeLa se cotransfectaron con 3 μg de plásmidos que expresaban diferentes mutantes de TIF2 AF-1 fusionado al dominio de unión de ADN del factor de transcripción de levadura GAL4 junto con 1 μg del plásmido indicador (17 m)₅-G-CAT. Solo se indican las veces de inducción sobre la activación observada con el GAL4 DBD. Los valores representan la media de al menos tres experimentos. Nótese que todas las proteínas de fusión GAL4-TIF2 se expresaron hasta niveles similares,

como se revela por transferencia de Western con anticuerpos dirigidos frente a GAL4 DBD (datos no mostrados).

(c) Interacción de mutantes TIF2 AF-1 con CBP *in vitro*. Los experimentos de inmunoprecipitación de complejos de GST se realizaron con proteínas de fusión GAL-TIF2 traducidas *in vitro* marcadas con ³⁵S y GST y GST-CBP producidas por bacterias. Nótese, que los GAL4 DBD por sí solos no interaccionan con la matriz de afinidad de GST-CBP.

Figura 10 (a-c). Identificación de mutantes de TIF2 AF-1 que están alterados en su activación transcripcional e interacción con CBP.

(a) Activación transcripcional por TIF2.13 y mutantes de TIF2.13. Se cotransfectaron células Cos-1 y HeLa con 3 µg de plásmidos que expresaban la región de TIF2.13 y los mutantes de TIF2.13 indicados fusionados con el dominio de unión a ADN del factor de transcripción de levadura GAL4 junto con 1 µg del plásmido indicador (17 m)₅-G-CAT. Se indican las veces de inducción sobre el valor de 1 vez de GAL4 DBD. La media y la desviación estándar obtenidas de al menos cuatro experimentos se muestran. Los niveles de expresión de las proteínas de fusión GAL4-TIF2.13 se confirmaron por transferencia de Western (datos no mostrados).

(b) Interacción del tipo silvestre de TIF2.13 y mutantes de TIF2.13 con CBP en células de mamíferos revelados por dos análisis híbridos. Las células HeLa se transfectaron con 0,2 µg de vectores de expresión GAL-CBP o GAL4 junto con 0,2 µg de vectores de expresión VP16-TIF2.13 o VP16 y en presencia de 1 µg de plásmido indicador (17 m)₅-TATA-CAT. Los datos se representan como veces de inducción de la actividad vista con GAL-CBP solo. Se muestran la media y la desviación estándar obtenida de diez experimentos. Los niveles de expresión se confirmaron por transferencia de Western con anticuerpos dirigidos frente a GAL4 DBD y VP16 AAD (datos no mostrados).

(c) Interacción del tipo silvestre de TIF2.13 y mutantes de TIF2.13 con CBP *in vitro*. Los experimentos de inmunoprecipitación de complejos de GST se realizaron con polipéptidos VP16-TIF2.13 traducidos *in vitro* marcados con ³⁵S y GST y GST-CBP producidos por bacterias. Nótese que el dominio de activación de VP16 por sí mismo no interacciona con GST-CBP.

Figura 11. El fragmento coactivador de TIF2.1 estimula eficazmente la AF-2 dependiente de ligando de ER, RAR y RXR en levadura. No se puede observar ningún efecto estimulador de TIF2.1 en la AF-1 aislada de ER (HE15). Los plásmidos que

expresaban diferentes regiones de hER α (blanco), hRAR α (gris) y mRXR α (negro) fusionados con el ER DBD (hER α (C)) se introdujeron en la cepa indicadora de levadura PL3(α) junto con TIF2.1, como se indica. Las cajas blancas representan secuencias de transformantes que se cultivaron en presencia o ausencia del ligando afín a 10⁻⁶ M (estradiol para ER, ácido *trans-retinoico* para RAR, ácido 9-*cis*-retinoico para RXR). Las actividades OMP decaen en cada extracto libre de células se expresan en nmol/min/mg de proteína; se muestran la media y la desviación típica de al menos cuatro experimentos.

Figura 12 (a-d). El dominio de interacción del receptor nuclear aislado (NID) de TIF2 actúa dominando negativamente la activación transcripcional por ER, RXR y RAR LBD. El valor medio de la inducción obtenida de la cuantificación de al menos tres experimentos (en relación con la actividad del receptor respectivo LBD en ausencia del TIF2 recombinante) se indica debajo de cada panel. Los niveles de expresión de TIF2, TIF2.1 y TIF2.5 se verificaron rutinariamente por transferencia de Western con anticuerpo monoclonal de ratón 3Ti3C11 dirigido frente a una región de TIF2.5 (no mostrado).

(a) La sobreexpresión del fragmento de TIF2.5 que contiene el NID aislado invierte el efecto estimulador del potente fragmento coactivador TIF2.1. Las células Cos-1 se cotransfectaron con 1 μ g del indicador (17 m)₅-TATA-CAT y 0,2 μ g del vector de expresión GAL-ER α (EF) en presencia o ausencia de estradiol 10⁻⁶ M. Cuando se indicó, además se cotransfectaron de los vectores de expresión 0,1 μ g de TIF2.1 y 2,5 μ g de TIF2.5.

(b-d) TIF2 de longitud completa y el fragmento coactivador TIF2.1 potencian, mientras que el dominio que interacciona con el receptor nuclear TIF2.5 bloquea la actividad del ER. RXR y RAR LBD. Las células Cos-1 y HeLa se cotransfectaron con 1 μ g del indicador (17 m)₅-TATA-CAT y 0,2 μ g del vector de expresión que codificaba la fusión GAL-DBD respectiva de hER α (EF), mRXR α (DE) o mRAR α (DEF). En presencia o ausencia de ligando 10⁻⁶ M (E2, estradiol; 9C-RA, ácido 9-*cis*-retinoico; T-RA, ácido *trans-retinoico*), junto con 0,25 μ g o 2,5 μ g de los vectores de expresión TIF2, TIF2.1 y TIF2.5.

Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

La presente invención da a conocer moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica el factor intermediario de transcripción 2 (TIF2) cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 (SEC ID N^o: 2). La proteína TIF2 de la presente invención comparte homología de secuencia con el coactivador del receptor de

esteroides humano SRC-1 (SEC ID N°: 3) (Figura 3). La secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) se obtuvo por secuenciación de un clon de ADNc que se depositó el 14 de junio de 1996 en la ATCC y al que se proporcionó el número de acceso 97612.

Moléculas de Ácidos Nucleicos

5 Se dan a conocer moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican la proteína TIF2. Las similitudes de secuencia entre TIF2 y SRC-1 (Onate y col., Science 270:1354 (1995)) indican la existencia de una nueva familia de genes de mediadores transcripcionales NR. Usando la información proporcionada en el presente documento, tal como la secuencia de nucleótidos en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) o el clon depositado descrito anteriormente, una
10 molécula de ácido nucleico en el contexto de la presente invención que codifica un polipéptido TIF2 puede obtenerse usando procedimientos de exploración y clonación convencionales. Ilustrativa de la invención, la molécula de ácidos nucleicos descrita en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) se descubrió en una biblioteca de expresión de ADNc de tejido de placenta humana. El ADNc de TIF2 en el contexto de la presente invención codifica una proteína de
15 aproximadamente 159 kDa (1,464 aminoácidos), que incluye señales de localización nuclear N terminales (NLS), una región rica en Gln y tres en Ser/Thr y dos conjuntos cargados (Figura 3). TIF2 se expresa ampliamente, puesto que el transcrito correspondiente se encontró en varios tejidos humanos, incluyendo páncreas, riñón, músculo, hígado, pulmón, placenta, cerebro y corazón (Figura 2c).

20 Los ácidos nucleicos aislados en el contexto de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario. El ARN o ADN monocatenario puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena sentido o puede ser la cadena no codificante, también denominada
25 cadena antisentido.

Por molécula o moléculas de ácidos nucleicos "aislada" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinantes contenidas en un vector se consideran aisladas para fines de la presente invención. Los ejemplos ilustrativos adicionales de moléculas de ADN aisladas
30 incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas y moléculas de ADN purificadas (parcialmente o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vitro* de las moléculas de ADN en el contexto de la presente invención así como moléculas de ARNm parcialmente o sustancialmente purificadas. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas en el contexto de la presente invención incluyen
35 adicionalmente dichas moléculas producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas en el contexto de la presente invención incluyen moléculas de ADN que comprenden una fase de lectura abierta (ORF) con un codón de iniciación en la posición 163-165 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1); y las moléculas de ADN que comprenden una secuencia sustancialmente diferente a la descrita anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifica la proteína TIF2. Por supuesto, el código genético se conoce bien en la técnica. Por tanto, sería rutina para un experto en la materia generar las variantes degeneradas descritas anteriormente.

La invención describe adicionalmente moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican el polipéptido TIF2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se codificaba por el clon de ADNc depositado como N° de Depósito de ATCC 97612 el 14 de junio, 1996 (Colección Americana de Cultivos Tipo, (ATCC) Rockville, MD). La invención da a conocer adicionalmente una molécula de ácidos nucleicos aislada que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) o la secuencia de nucleótidos del ADNc de TIF2 contenida en el clon descrito anteriormente o una molécula de ácidos nucleicos que tiene una secuencia complementaria a una de las secuencias anteriores. Dichas moléculas de ácidos nucleicos aisladas, preferentemente moléculas de ADN, son útiles como sondas para el mapeo de genes por hibridación *in situ* con cromosomas para detectar la expresión del gen TIF2 en tejido humano, por ejemplo, por análisis de transferencia de Northern.

La invención también da a conocer una molécula de ácido nucleico aislado que hibrida en condiciones estrictas con las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. Como se usa en el presente documento "condiciones estrictas" pretende significar, como un ejemplo no limitante, incubación durante una noche a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50 %, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y ADN de esperma de salmón 20 µg/ml desnaturalizado cortado, seguido de lavado de los filtros en 0,1xSSC a aproximadamente 65 °C. Preferentemente, dicha "molécula de ácidos nucleicos aislada que hibrida en condiciones estrictas" tendrá al menos 15 pb, preferentemente al menos 20 pb, más preferentemente al menos 30 pb y aún más preferentemente, al menos 50 pb de longitud.

Como se usa en el presente documento, "fragmentos" de una molécula de ADN aislada que tiene la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado o la secuencia de nucleótidos como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) pretende significar fragmentos de ADN que tienen al menos 15 pb, más preferentemente al menos 20 pb y aún más preferentemente al menos 30 pb de longitud que son útiles como cebadores y sondas de diagnóstico como se analiza anteriormente y con más detalle a continuación. Los fragmentos de ADN más grades,

hasta, por ejemplo, 500 pb de longitud, son también útiles como sondas de acuerdo con la presente invención. Un fragmento de al menos 20 pb de longitud, por ejemplo, pretende significar fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado o la secuencia de nucleótidos como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 1). Como se indica, dichos fragmentos son útiles diagnósticamente como una sonda de acuerdo con las técnicas de hibridación de ADN convencional o como cebadores para amplificación de una secuencia diana por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Puesto que el gen se ha depositado y la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) se describe, generar dichos fragmentos de ADN sería rutina para el trabajador experto en la materia relevante. La escisión por endonucleasa de restricción o el corte por sonicación, por ejemplo, pueden usarse fácilmente para generar fragmentos de diversos tamaños. Como alternativa, los fragmentos de ADN en el contexto de la presente invención se pueden generar sintéticamente de acuerdo con los procedimientos y técnicas conocidos y disponibles para los expertos en la materia. Diez marcadores de secuencia expresados con homología a parte de la secuencia de nucleótidos de TIF-2 se identificaron por los inventores en GenBank: Números de Acceso GenBank T77249, R77864, T77464, R77770, R08880, T85560, R25318, T85561, R08986 y R26517.

La presente invención da a conocer adicionalmente variantes de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención, que codifican fragmentos, análogos o derivados de la proteína TIF2, por ejemplo, polipéptidos que tienen actividad biológica sustancialmente similar a la proteína TIF2. Las variantes se pueden producir de manera natural, tal como isoformas y variantes alélicas. Las variantes que se producen de manera no natural pueden producirse usando cualquiera de las técnicas de mutagénesis conocidas y disponibles para los expertos en la materia.

Dichas variantes incluyen aquellas producidas por sustituciones de nucleótidos, deleciones o adiciones. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes se pueden alterar en regiones codificantes o no codificantes o ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativos o no conservativos. Se prefieren especialmente entre estas sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades de la proteína TIF2 o fragmentos de la misma. También se prefieren especialmente en este sentido sustituciones conservativas.

La presente invención da a conocer adicionalmente moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican un polipéptido de TIF2 citoplasmático. TIF2 de longitud completa es una proteína nuclear debido a la presencia de señales de localización nuclear N terminales (NLS)

(Figura 3). Por un “polipéptido TIF2 citoplasmático”, se entiende un polipéptido TIF2 que se encuentra esencialmente en el citoplasma después de que se exprese de manera recombinante en células de mamífero. Los procedimientos para generar moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de TIF2 citoplasmático incluyen la mutación o delección de la región N terminal que codifica NLS de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1). Los ejemplos de secuencias de NLS incluyen los aminoácidos 13-20 y 31-39 y nucleótidos 199-222 y 253-279 de la Figura 1 (Véase también, Figura 3). Las mutaciones adecuadas en la región N terminal que codifica NLS incluyen sustituciones, deleciones e inserciones que dan como resultado una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TIF2 que carece de la función de localización nuclear. Los procedimientos para generar dichas mutaciones serán fácilmente evidentes para los expertos y se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, editado por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Preferentemente, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de TIF2 citoplasmático serán fragmentos que tienen una delección en toda o parte de la región codificante de NLS N terminal. Los procedimientos para generar dichos fragmentos se describen a continuación. En el contexto de la presente invención, dichos fragmentos de ácidos nucleicos incluyen adicionalmente deleciones N terminales que se extienden más allá de la región codificante de NLS y pueden incluir también deleciones C terminales. Por ejemplo, los presentes inventores han generado una molécula de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de TIF2.1 citoplasmático (aminoácidos 624 a 1287 en Figuras 1 y 3 (SEC ID N°: 2)), que, como TIF2 de longitud total nuclear, interacciona de un modo dependiente de agonista con los receptores nucleares y potencia la activación transcripcional mediada por receptores nucleares. Los presentes inventores también han generado una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de TIF2.5 citoplasmático (aminoácidos 624-869 en las Figuras 1 y 3 (SEC ID N°: 2)), que interacciona con el dominio NID de receptores nucleares, pero no potencia la transcripción. También se generaron ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos citoplasmáticos TIF2.8 y TIF2.12 (aminoácidos 1010-1179 y aminoácidos 940-1131, respectivamente, en las Figuras 1 y 3 (SEC ID N°: 2), que potencian la transcripción, pero no se unen a los receptores nucleares. Por lo tanto, por la invención, se dan a conocer moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de TIF2 citoplasmáticos que interaccionan de un modo dependiente de agonista con receptores nucleares y potencian la activación transcripcional mediada por receptor nuclear. También se dan a conocer polipéptidos de TIF2 citoplasmáticos que se unen a receptores nucleares, pero que no potencian la transcripción al igual que se proporcionan los polipéptidos de TIF2 citoplasmáticos que potencian la

transcripción, pero no se unen a receptores nucleares. Como el experto reconocerá, la longitud de dichas moléculas de ácidos nucleicos puede variar.

Se dan a conocer adicionalmente moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % idéntica y más preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ó 99 % idéntica a: (a) la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado como ATCC 97612; (b) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1); (c) la secuencia de nucleótidos del ADNc depositada como ATCC 97612 que codifica la proteína TIF2 de longitud completa; (d) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1), que codifica la proteína TIF2 de longitud completa; (e) la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado como ATCC 97612, que codifica la proteína TIF2.1 coactivadora funcional; (f) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1), que codifica la proteína TIF2.1 coactivadora funcional; (g) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.0; (h) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1), que codifica el polipéptido TIF2.2; (i) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.3; (j) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.4; (k) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.5; (l) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.6; (m) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1), que codifica el polipéptido TIF2.7; (n) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.8; (o) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.9; (p) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.10; (q) la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1) que codifica el polipéptido TIF2.12; y (r) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a-q).

Si dos moléculas de ácidos nucleicos cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos que son al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ó 99 % "idénticas" se pueden determinar convencionalmente usando algoritmos de ordenador conocidos tales como el programa "fastA" que usa, por ejemplo, los parámetros predeterminados (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)). La presente solicitud da a conocer dichas moléculas de ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácidos nucleicos enumeradas anteriormente independientemente de si codifican un polipéptido que tiene actividad TIF2. Esto es porque, incluso cuando una molécula de ácidos nucleicos particular no codifica un

polipéptido que tiene actividad TIF2, un experto en la materia sabría todavía cómo usar la molécula de ácidos nucleicos como una sonda. Los usos de las moléculas de ácidos nucleicos del contexto de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene actividad TIF2 incluyen, entre otros, (1) aislar el gen TIF2 o variantes alélicas del mismo en una biblioteca de
5 ADNc; (2) hibridación *in situ* (FISH) a las diseminaciones de cromosomas de la metafase para proporcionar localización precisa cromosómica del gen TIF2 como se describe en Verma y col., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988); y análisis de transferencia de Northern para detectar expresión de ARNm de TIF2 en tejidos específicos, tales como tejido de placenta.

10 Se prefieren, sin embargo, moléculas de ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % y preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ó 99 % idénticas a la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente que codifican, de hecho, un polipéptido que tiene al menos una actividad de
15 de proteína TIF2” pretende significar polipéptidos que exhiben actividad similar, pero no necesariamente idéntica, como al menos una actividad biológica de la proteína TIF2 como se mide en un ensayo biológico particular. Por ejemplo, la proteína TIF2 de la presente invención interacciona directamente de un modo dependiente de agonista con los dominios de unión a
20 en células de mamífero, la proteína TIF2 de la presente invención potencia la transcripción por medio de vías dependientes de CBP e independientes de CBP.

Por tanto, “un polipéptido que tiene actividad de proteína TIF2” incluye polipéptidos que tienen una o más de las siguientes actividades: interacción con el LBD o uno o más NR de un modo dependiente de agonista; potenciación de activación transcripcional dependiente de CBP
25 o potenciación de activación transcripcional independiente de CBP.

Los ensayos de exploración para determinar si un polipéptido candidato tiene actividad de proteína TIF2 se describen en detalle a continuación en los Ejemplos 1, 3, 4 y 6. Por ejemplo, realizando dichos ensayos, los presentes inventores han descubierto que el fragmento coactivador funcional TIF2.1 (aminoácidos de 624 a 1287 en las Figuras 1 y 3 (SEC
30 ID Nº: 2)) es “un polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2”. Los presentes inventores también han descubierto que el fragmento TIF2.5 (aminoácidos 624-869) se une al LBD de NR sin activar la transcripción y es “un polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2”. También se descubrió el fragmento TIF2.2 (aminoácidos 1288-1464 como se muestra en Figura 1 (SEC ID Nº: 2)), que potencia la transcripción independiente de CBP. Por tanto,
35 TIF2.2 es “un polipéptido que tiene una actividad de proteína de TIF2”. Otro fragmento

descubierto por los inventores, TIF 2.8 (aminoácidos 1010-1179 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2)) es un “polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2” ya que este activa la transcripción dependiente de CBP.

Debido a la degeneración del código genético, un experto en la materia reconocerá inmediatamente que un gran número de las moléculas de ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idénticas a la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente codificarán “un polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2”. De hecho, puesto que las variantes degeneradas todas codifican el mismo polipéptido, esto será evidente para el experto incluso sin realizar los ensayos de exploración descritos anteriormente. Se reconocerá adicionalmente por los expertos en la materia que, para dichas moléculas de ácidos nucleicos que no son variantes degeneradas, un número razonable también codificará un polipéptido que tiene actividad de proteína TIF2. Esto se debe a que el experto es totalmente consciente de sus posibles sustituciones de aminoácidos que es menos probable o no es probable que afecten significativamente a la función de la proteína (por ejemplo, reemplazando un aminoácido alifático con un segundo aminoácido alifático).

Se proporcionan las directrices respecto a cómo generar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas, por ejemplo, en J.U. Bowie y col., “Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions,” *Science* 247: 1306-1310 (1990), en el que los autores indican que hay dos principales estrategias para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio. El primer procedimiento se basa en el proceso de la evolución, en el cual las mutaciones se aceptan o rechazan por selección natural. La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciones o exploraciones para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Como los autores afirman, estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican adicionalmente qué cambios de aminoácidos es probable que sean permisivos a una determinada posición de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de restos de aminoácidos internados requieren cadenas laterales no polares, mientras que pocas características de cadenas laterales de superficie se conservan generalmente. Otras de estas sustituciones fenotípicamente silenciosas se describen en Bowie y col., mencionado anteriormente, y las referencias citadas en el mismo.

Vectores y Células Huésped

La presente invención también da a conocer vectores que incluyen las moléculas de ADN aisladas en el contexto de la presente invención, células huésped que están modificadas

por ingeniería genética con los vectores recombinantes y la producción de polipéptidos de TIF2 o fragmentos del mismo, tales como TIF2.1, por técnicas recombinantes.

5 Pueden introducirse construcciones recombinantes en células huésped usando técnicas bien conocidas tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes para replicación o defectuosos para la replicación. En el último caso, la propagación viral generalmente se producirá sólo en células huésped que complementen.

10 Los polinucleótidos pueden estar unidos a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, un vector plasmídico se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede estar empaquetado *in vitro* usando una línea celular empaquetadora apropiada y después transducirla en células huésped.

15 Se prefieren vectores que comprenden regiones de control que actúan en cis para el nucleótido de interés. Los factores que actúan en trans apropiados pueden suministrarse por el huésped, suministrarse por un vector que complemente o suministrarse por el vector por sí mismo tras la introducción en el huésped.

20 En determinadas realizaciones preferidas en este sentido, los vectores posibilitan una expresión específica, que puede ser inducible y/o específica de tipo celular. Se prefieren particularmente entre estos vectores los inducibles por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como temperatura y aditivos nutritivos.

25 Vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de virus, episomas, cromosomas, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papova virus, vaccinia virus, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus pseudorabies y retrovirus y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagémidos.

30 El inserto de ADN debe estar ligado operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, el lac de *E. coli*, promotores trp y tac, los promotores SV40 tardío y temprano y promotores de LTR retrovirales, por nombrar unos pocos. Otros promotores adecuados se conocerán por los expertos. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para la iniciación de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirá preferentemente un AUG
35 iniciador de la traducción en el principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG)

dispuesto apropiadamente al final del polipéptido a traducir.

Como se ha indicado, los vectores de expresión preferentemente incluirán al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo celular de eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivar *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, células Cos y células de melanoma Bowes; y células vegetales. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica.

Ejemplos ilustrativos de vectores preferidos para su uso en bacterias incluyen, pero sin limitación, pA2, pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia. Los vectores eucariotas preferidos incluyen, pero sin limitación, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponible de Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto.

Entre promotores bacterianos conocidos adecuados para su uso en la presente invención se incluyen los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores PR y PL de lambda y el promotor trp. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores SV40 tardíos y tempranos, los promotores de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("RSV") y los promotores de metalotioneinas, tales como el promotor de metalotioneina-I de ratón.

La introducción de las construcciones en la célula huésped puede efectuarse por transfección por fosfato cálcico, transfección mediada por dextrano-DEAE, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Dichos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis y col., Basic Methods in Molecular Biology (1986).

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, generalmente aproximadamente de 100 a 300 pb de tamaño, que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula huésped. Los ejemplos ilustrativos de potenciadores incluyen, pero sin limitación, el potenciador de SV40, que se localiza en el lado tardío del origen de

replicación en los pb de 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores adenovirales.

5 Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplásmico o en el ambiente extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiada en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

10 El polipéptido se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por lo tanto, por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, aminoácidos cargados particularmente, se puede añadir al extremo N terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante el almacenamiento y manipulación posterior. También, los restos de péptidos se pueden añadir al polipéptido para facilitar la purificación.

15 La proteína TIF2 o fracción de la misma se puede recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes por procedimientos bien conocidos que incluyen precipitación por etanol o sulfato de amonio, extracción ácida, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más
20 preferentemente, se emplea para purificación cromatografía líquida de alto rendimiento (“HPLC”).

Polipéptidos de la presente invención pueden incluir productos purificados de manera natural, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota, que incluyen, por ejemplo,
25 células bacterianas, levaduras, de plantas superiores, de insectos y de mamífero. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse después de la traducción (por ejemplo, glucosilarse, fosforilarse, farnesilarse, etc.). Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como un resultado de procesos
30 mediados por el huésped.

Polipéptidos TIF2 y Fragmentos

La invención proporciona adicionalmente un polipéptido TIF2 aislado que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc depositado o la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2) o un fragmento del mismo. Los fragmentos de
35 polipéptidos preferidos tendrán una actividad de proteína TIF2. Para que un polipéptido TIF2

interaccione de un modo dependiente de agonista con receptores nucleares y para potenciar la activación transcripcional mediada por receptor nuclear, dichos fragmentos de polipéptido TIF2 deberían incluir al menos restos de aminoácidos de 624 a 1131 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2) o sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones de los mismos que no son perjudiciales significativamente para la capacidad de los polipéptidos de interaccionar de un modo dependiente de agonista con receptores nucleares y para potenciar la activación transcripcional mediada por receptor nuclear. Para que un fragmento del polipéptido TIF2 interaccione con el LBD de un NR sin activar la transcripción, el fragmento de polipéptido TIF2 debe al menos incluir los aminoácidos 624-869 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2) o sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones de los mismos que no son significativamente perjudiciales para la capacidad de los polipéptidos de interaccionar con el LBD o un NR. Para que un fragmento de polipéptido TIF2 active una transcripción dependiente de CBP, el polipéptido TIF2 debería al menos incluir restos de aminoácidos 1010-1131 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2) o sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de los mismos que no son significativamente perjudiciales para la capacidad de los polipéptidos de activar la transcripción dependiente de CBP. Para que un polipéptido TIF2 active la transcripción independiente de CBP, el polipéptido TIF2 debería al menos incluir restos de aminoácidos 1288-1464 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2) o sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones de los mismos que no son significativamente perjudiciales para la capacidad de los polipéptidos para activar transcripción independiente de CBP.

Fragmentos de polipéptidos TIF2 de acuerdo con la presente invención a modo de ejemplo incluyen polipéptidos de TIF2 citoplasmáticos que tienen al menos una mutación o deleción en una región de NLS N terminal que interfiere con la función de localización nuclear. Los procedimientos para generar polipéptidos de TIF2 citoplasmáticos se han descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido o proteína "aislado" se pretende que signifique un polipéptido o proteína extraído de su ambiente nativo, tal como proteínas y polipéptidos producidos de manera recombinante expresados en células huésped y polipéptidos recombinantes o nativos que se han purificado sustancialmente por cualquier técnica adecuada (por ejemplo, el procedimiento de purificación de una sola etapa descrito en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988)). Las proteínas o polipéptidos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen adicionalmente dichos compuestos producidos sintéticamente:

Los presentes inventores han descubierto que la proteína de TIF2 de longitud completa es una proteína de 1464 restos aminoacídicos con un peso molecular deducido de

aproximadamente 160 kDa. Se reconocerá por los expertos en la materia que algunas secuencias de aminoácidos de la proteína TIF2 pueden variar sin efecto significativo en la estructura o función de la proteína. Si dichas diferencias de secuencias se contemplan, debe recordarse que hay áreas críticas en la proteína que determinan la actividad, de modo que la región descrita anteriormente que se ha determinado por los inventores como que es crítica para la capacidad de la proteína para potenciar la activación transcripcional mediada por receptor nuclear. En general, es posible sustituir restos que forman la estructura terciaria, dado que se usan restos que realizan una función similar. En otros casos, el tipo de resto puede no ser en absoluto importante si la alteración se produce en una región no crítica de la proteína.

Por tanto, la presente invención incluye adicionalmente variaciones del polipéptido TIF2 que muestran actividad de polipéptido de TIF2 sustancial o que incluyen regiones de proteínas TIF2 tales como los fragmentos de proteína analizados a continuación. Dichos mutantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo (por ejemplo, sustituyendo un resto hidrófilo a otro, pero no fuertemente hidrófilo a fuertemente hidrófobo como norma). Pequeños cambios de dichas sustituciones de aminoácidos "neutras" generalmente tendrán poco efecto en la actividad.

Las sustituciones se ven típicamente como sustituciones conservativas, una por otra, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; intercambio de los restos hidroxilo Ser y Thr, intercambio de restos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los restos amida Asn y Gln, intercambio de los restos básicos Lys y Arg y sustitución entre los restos aromáticos Phe y Tyr.

Como se indica en detalle anteriormente, direcciones adicionales respecto a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos (es decir, no probable que tengan efecto deletéreo en una función) se puede encontrar en Bowie y col., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247:1306-1310 (1990)).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos como se codifica por el ADNc depositado, una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N^o: 2, así como una secuencia de aminoácidos al menos el 80 % idéntica, más preferentemente al menos el 90 % idéntica y aún más preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ó 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc depositado, a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N^o: 2 o a la secuencia de aminoácidos de un fragmento polipeptídico descrito anteriormente. Si dos polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, 90 % ó 95 % idéntica, se puede determinar usando un algoritmo de ordenador como se ha descrito anteriormente.

Como se describe en detalle a continuación, las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos en el contexto de la presente invención son útiles en ensayos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la transactivación mediada por NR AF2. Por ejemplo, en Halachmi, S., y col., Science 264: 1455 (1994), los autores muestran que tamoxifeno, que tiene efectos inhibidores del crecimiento en el cáncer de mama, altera la formación de un complejo que incluye el receptor de estrógenos y ERAP160. Por consiguiente, las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos de la presente invención son útiles en ensayos para identificar fármacos capaces de potenciar o inhibir las vías mediadas por receptor nuclear.

Las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos en el contexto de la presente invención son útiles en ensayos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la actividad de TIF2 AD1 y en ensayos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la actividad de TIF2 AD2, como se describe en detalle a continuación.

Método de Exploración

Los receptores nucleares (NR) son miembros de una superfamilia de factores de regulación transcripcional inducibles por ligando que inducen hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, vitamina D3 y receptores retinoides (Leid, M., y col., Trends Biochem. Sci. 17:427-433 (1992); Leid, M., y col., Cell 68:377-395 (1992); y Linney, E. Curr. Top. Dev. Biol., 27:309-350 (1992)). Los NR exhiben una estructura molecular que refleja la existencia de varios dominios funcionales autónomos. Basándose en la similitud de secuencia de aminoácidos entre el receptor de estrógenos de pollo, los receptores de glucocorticoides y estrógenos humanos y el oncogén v-erb-A, Krust, A., y col., EMBO J. 5:891-897 (1986), se definieron seis regiones A, B, C, D, E y F (véase Figura 6), que presentan diferentes grados de conservación evolutiva entre diversos miembros de la superfamilia de receptores nucleares. La región C altamente conservada contiene dos dedos de zinc y corresponde al núcleo del dominio de unión de ADN (DBD), que es responsable del reconocimiento específico de los elementos de respuesta afines. La región E es funcionalmente compleja puesto que además del dominio de unión de ligando (LBD), contiene una función de activación dependiente de ligando (AF-2) y una interfaz de dimerización. Una función de activación transcripcional autónoma (AF-1) está presente en las regiones A/B N terminal no conservadas de los receptores esteroideos. Curiosamente, tanto los receptores esteroideos AF-1 como los AF-2 exhiben propiedades de activación transcripcional diferenciales que parecen ser tanto de tipo celular como específicas del contexto del promotor (Gronemeyer, H. Annu. Rev. Genet. 25:89-123 (1991)).

Las señales de ácido *trans* (T-RA) y 9-*cis* (9C-RA) retinoico se transducen por dos familias de receptores nucleares, RAR α , β y γ (y sus isoformas) se activan tanto por T-RA como por 9 C-RA, mientras que RXR α , β y γ se activan exclusivamente por 9 C-RA (Allenby,

G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:30-34 (1993)). Los tres tipos de RAR difieren en sus regiones B y sus isoformas principales ($\alpha 1$ y $\alpha 2$, $\beta 1-4$ y $\gamma 1$ y $\gamma 2$) tienen regiones A N terminal diferentes (Leid, M. y col., Trends Biochem. Sci. 17:427-433 (1992)). De manera similar, los tipos de RXR difieren en sus regiones A/B (Mangelsdorf, D.J. y col., Genes Dev. 6:329-344 (1992)).

5
También se ha mostrado que la región E de RAR y RXR contienen una interfaz de dimerización (Yu, V.C. y col., Curr. Opin. Biotechnol. 3:597-602 (1992)). Más curiosamente, se demostró que los heterodímeros RAR/RXR se unen mucho más eficazmente *in vitro* que los homodímeros de cualquier receptor a un número de elementos de respuesta RA (RARE) (Yu, V.C. y col., Cell 67:1251-1266 (1991); Berrodin, T. J. y col., Mol Endocrinol 6:1468-1478 (1992); Bugge, T. H. y col., EMBO J. 11:1409-1418 (1992); Hall, R. K. y col., Mol. Cell. Biol. 12: 5527-5535 (1992); Hallenbeck, P. L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5572-5576 (1992); Husmann, M. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:1558-1564 (1992); Kliewer, S.A. y col., Nature 355:446-449 (1992b); Leid, M. y col., Cell 68:377-395 (1992); Marks, M. S. y col., EMBO J. 11:1419-1435 (1992); Zhang, X. K. y col., Nature 355:441-446 (1992)). Los heterodímeros RAR y RXR se forman preferentemente también en solución *in vitro* (Yu, V.C. y col., Cell 67:1251-1266 (1991); Leid, M. y col., Cell 68:377-395 (1992); Marks, M.S. y col., EMBO J. 11:1419-143 (1992)), sin embargo la adición de 9C-RA parece potenciar la formación de homodímeros RXR *in vitro* (Lehman, J. M. y col., Science 258:1944-1946 (1992); Zhang, X. K. y col., Nature 358:587-591 (1992b)). Que esos heterodímeros RAR-RXR, en lugar de los homodímeros correspondientes, preferencialmente se unen a RARE en células cultivadas *in vivo* se ha apoyado fuertemente por experimentos descritos en Durand, B. y col., Cell. 71:73-85 (1992).

25
Como se sabe que el ácido retinoico regula las capacidades proliferativas y diferenciadoras de varios tipos de células de mamífero (Gudas, L.J. y col. (1994) en Sporn, M.B., Roberts, A.B. y Goodman, D.S. (ed.), The Retinoids. 2^o edición, Raven Press, Nueva York, pág. 443-520), los retinoides se usan en una diversidad de entornos quimiopreventivos y quimioterapéuticos. Se ha notificado la prevención de cánceres oral, cutáneo y de cabeza y cuello en pacientes con riesgo de esos tumores (Hong, W. K. y col., N. Engl. J. Med. 315:1501-1505 (1986); Hong, W. K. y col., N. Engl. J. Med. 323:795-801 (1990); Kraemer, K. H. y col., N. Engl. J. Med. 318:1633-1637 (1988); Bollag, W. y col., Ann. Oncol. 3:513-526 (1992); Chiesa, F. y col., Eur. J. Cancer B. Oral Oncol. 28:97-102 (1992); Costa, A. y col., 54 Cancer Res. 54: Suppl. 7, 2032-2037 (1994)), y los retinoides se usan en la terapia de leucemia promielocítica aguda (Huang, M.E. y col., Blood 72:567-574 (1988); Castaigne, S. y col., Blood 76:1704-1709 (1990); Chomienne, C. y col., Blood 76:1710-1717 (1990); Chomienne, C. y col., J. Clin. Invest.

88:2150-2154 (1991); Chen Z. y col., *Leukemia* 5:288-292 (1991); Lo Coco, F. y col., *Blood* 77:1657-1659 (1991); Warrell, R P., Jr., y col., *N. Engl. J. Med.* 324:1385-1393 (1991)), carcinoma de células escamosas de cérvix y de piel (Verma, K. A., *Cancer Res* 47:5097-5101 (1987); Lippman S. M. y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 84:235-241 (1992); Lippman S. M. y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 84:241-245 (1992)) y sarcoma de Kaposi (Bonhomme, L. y col., *Ann Oncol.* 2:234-235 (1991)).

Por ejemplo, en Chen, J-Y y col., *EMBO J.* 14 (6):1187-1197 (1995), se caracterizan varios retinoides sintéticos de disociación que inducen selectivamente la función de activación de AF-2 presente en el LBD de RAR β (β AF-2). Los autores también notifican que estos retinoides sintéticos, como RA, pueden inhibir el crecimiento independiente del anclaje de células 3T3 transformadas con oncogén. Adicionalmente, el promotor del gen de la interleucina-6 (IL-6) humana, cuyo producto está implicado en la regulación de la hematopoyesis, respuestas inmunes e inflamación (Kishimoto, T. y col., *Science* 258:593-597 (1992)), se induce por RA pero no por los retinoides “de disociación” que reprimen su actividad.

Además de los receptores retinoides, también se han notificado compuestos con propiedades agonistas y antagonistas en las funciones de los receptores esteroideos. Por ejemplo, en Meyer, M-E. y col., *EMBOJ.* 9(12): 3923-3932 (1990), un sistema de retardo de gel/expresión transitoria se usó para estudiar los efectos de RU486 y R5020 sobre la función del receptor de progesterona y glucocorticoides. Adicionalmente, en Halachimi, S., y col., *Science* 264:1455-1458 (1994), se muestra que el tamoxifeno inhibe competitivamente la unión de ERAP160 inducida por estradiol al receptor de estrógenos, lo que sugiere un mecanismo para sus efectos inhibidores del crecimiento en el cáncer de mama. Por consiguiente, debido a su importancia clínica, hay gran interés en el desarrollo de procedimientos de exploración capaces de identificar agonistas y antagonistas de la transactivación de receptores nucleares.

Como se ha indicado, los presentes inventores han clonado un gen que codifica TIF2 y han mostrado que TIF2 y un fragmento citoplasmático del mismo se unen, en un modo dependiente de agonista, a todos los receptores nucleares analizados RAR, RXR, ER, TR, VDR, GR y AR. Adicionalmente, los presentes inventores han mostrado que los polipéptidos TIF2 son mediadores transcripcionales del receptor nuclear AF-2. Por tanto, la presente invención describe adicionalmente un procedimiento de exploración para identificar un antagonista de un receptor nuclear (NR) que implica: (a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligando de NR (LBD) y un polipéptido que comprende factor intermediario transcripcional 2 (TIF-2) o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un antagonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho LBD de NR; (b) administrar un

antagonista candidato a dicha célula y (c) determinar si dicho antagonista candidato reduce: (1) la unión de TIF-2 o del fragmento de TIF-2 a las AF-2 de dicho LBD de NR en comparación con dicha unión en ausencia de dicho antagonista candidato o (2) transactivación mediada por AF-2 de LBD NR estimulada por TIF-2 o fragmento de TIF-2 en comparación con dicha transactivación en ausencia de dicho antagonista candidato.

En un aspecto adicional, se describe un método de exploración para identificar un agonista de receptor nuclear (NR), que implica: (a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión de ligando de NR (LBD) y un polipéptido que comprende un factor intermediario transcripcional 2 (TIF-2) o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho LBD de NR; (b) administrar un agonista candidato a dicha célula y (c) determinar si dicho agonista candidato potencia: (1) la unión de TIF-2 o fragmento de TIF-2 a la AF-2 de dicho LBD de NR en comparación con dicha unión en ausencia de dicho agonista de candidato o (2) transactivación mediada por AF-2 de LBD NR estimulada por TIF-2 o fragmento de TIF-2 en comparación con dicha transactivación en ausencia de dicho agonista candidato.

“Una célula huésped que contiene genes recombinantes” significa células huésped en las que se ha introducido una o más de las construcciones recombinantes descritas en el presente documento o una progenie de dichas células huésped.

Agonista y antagonista candidato en el contexto de la presente invención incluyen ligandos de disociación para receptores nucleares tales como los descritos en Chen y col., EMBO J. 14:1187-1197 (1995) y Ostrowski y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:1812-1816 (1995). El antagonista y el agonista del receptor de glucocorticoides y progesterona se describen en Meyer y col., EMBO J. 9 (12): 3923-3932 (1990). Un antagonista de receptor de estrógeno se describe en Halachmi y col., *Science* 264:1455-1458 (1994). Por tanto, se conocen procedimientos en la técnica para desarrollar antagonistas y agonistas del receptor nuclear candidatos para la exploración en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, se ha descrito la estructura cristalina de los dominios de unión de ligando de determinados receptores nucleares. En particular, la estructura cristalina del LBD de RXR se describe en Bourguet y col., *Nature* 375:377-382 (1995); la estructura cristalina del LBD de RAR se describe en Renaud y col., *Nature* 378:681-689 (1995); y la estructura cristalina de un receptor de hormona tiroidea se describe en Wagner y col., 378:690-697 (1995). Usando la información de la estructura cristalina de un receptor nuclear, existen programas de ordenador disponibles para diseñar la estructura de antagonistas y agonistas candidatos que probablemente se unirían al dominio de unión de ligando. Los paquetes de programas de ordenador para este fin

incluyen WHAT IF (Vriend, G., *J. Mol. Graphics* 8:52-56 (1990)) y GRID (Goodford, J. *Med. Chem.* 28:849-857 (1985)).

5 Se han descrito anteriormente genes recombinantes que codifican un polipéptido que comprende TIF2 o un fragmento de TIF2 capaz de unirse a receptores nucleares de un modo dependiente de agonista. Se han descrito con mucho detalle en la técnica genes recombinantes que codifican un polipéptido que comprende un LBD de NR. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar si un antagonista o agonista candidato potencia o interfiere con la unión de TIF-2 o el fragmento de TIF-2 a un NR. Por ejemplo, el efecto de un antagonista o agonista candidato en la unión de TIF2 o un fragmento de TIF-2 a un LBD de NR se puede estudiar usando ensayos de interacción de glutatión-S-transferasa (GST) marcando LBD de NR con GST como se describe en detalle en la sección experimental a continuación y en Le Douarin y col., *EMBO J* 14:2020-2033 (1995).

15 Cuando el efecto de un antagonista o agonista candidato en la transactivación de AF-2 de NR se va a ensayar, preferentemente, los genes recombinantes codificarán un polipéptido quimérico que comprende un LBD de NR fusionado con un dominio de unión de ADN de una proteína transactivadora. La célula huésped que expresa los genes recombinantes también pueden expresar un gen indicador. Por ejemplo, en Chen y col., *EMBO J.* 14(6):1187-1197 (1995), tres líneas celulares "indicadoras" se han establecido en las que los agonistas RAR α , RAR β o RAR γ inducen la actividad luciferasa que se puede medir en las células intactas utilizando una cámara de recuento fotónico única. Estas líneas celulares expresan establemente proteínas quiméricas que contienen el dominio de unión de ADN del transactivador de levadura GAL4 fusionado con las regiones EF (que contienen el LBD y la función de activación AF-2) de RAR α (GAL-RAR α), RAR β (GAL-RAR β) o RAR γ (GAL-RAR γ) y un gen indicador de luciferasa dirigido por un pentámero de la secuencia de reconocimiento de GAL4 ("17m") delante del promotor de β -globina (17mx5-G-Luc). Este sistema indicador es insensible a los receptores endógenos que no pueden reconocer el sitio de unión de GAL4. Ejemplos adicionales de genes indicadores y vectores de expresión indicadores para su uso en el contexto de la presente invención para explorar antagonistas y agonistas candidatos de receptores retinoides se proporciona en la Figura 6.

30 Los vectores de expresión de ER HEO, HE19 y HE15, los vectores de expresión de GR HG1 y HG3 y las expresiones de cPR3 y cPR1 de PR se describen en Kumar y col., *Cell* 51:941-951 (1987) y Gronemeyer y col., *EMBO J.* 6:3985-3994 (1987). El vector de expresión de GR HG8 y el vector de expresión de PR cPR5A se describen en Bocquel y col., *Nucl. Acids. Res.* 17:2581-2595 (1989). Los genes indicadores para los vectores de expresión PR, GR y ER descritos anteriormente incluyen MMTV-CAT (en el caso de PR y GR; Cato y col., *EMBO. J.*

5:2237-2240 (1986)) y vit-tk-CAT (en el caso de ER; Klein-Hitpass y col., Cell 41:1055-1061 (1986)).

El vector de expresión de TR LexA-TR se describe en Lee y col., Nature 374:91-94 (1995), que también describe usando el sistema de dos híbridos de levadura para identificar
5 compuestos que afectan a la transactivación de TR.

Además referencias adicionales que dan a conocer plásmidos indicadores que contienen un gen indicador y vectores de expresión que codifican un LBD de NR incluyen Meyer y col., Cell 57:433-442 (1989); Meyer y col., EMBO J. 9(12):3923-3932 (1990); Tasset y col., Cell 62:1177-1187 (1990); Gronemeyer, H. y Laudet, V., Protein Profile 2:1173-1308
10 (1995); Webster y col., Cell 54: 199-207 (1988); Strähle y col., EMBO J. 7:3389-3395 (1988); Seipel y col., EMBO J. 11:4961-4968 (1992); y Nagpal y col., EMBO J. 12:2349-2360 (1993). El efecto de un antagonista o agonista candidato en la transactivación mediada por AF-2 de NR se puede ensayar de acuerdo con el procedimiento descrito en la leyenda de la Figura 5 a continuación.

15 Los presentes inventores han identificado un dominio de activación de TIF2, AD1 (aminoácidos 1010-1131, como se muestra en la Figura 1 (SEC ID Nº: 2)), que media la función de activación transcripcional dependiente de CBP de TIF2. Adicionalmente, los presentes inventores han mostrado que los polipéptidos que contienen este dominio de activación, cuando se fusionan con un dominio de unión de ADN de un activador
20 transcripcional, son capaces de activar la transcripción por medio de una vía dependiente de CBP. Por consiguiente, la presente invención da a conocer adicionalmente un procedimiento de exploración para identificar un agonista de la actividad del dominio de activación AD1 de TIF2, que implica: (a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN
25 activador transcripcional (DBD) y un dominio de activación 1 AD1 de TIF-2; (b) administrar un agonista candidato a dicha célula y determinar (c) si dicho agonista candidato potencia la actividad del dominio de activación AD1 de TIF2.

La invención da a conocer adicionalmente un método de exploración para identificar un antagonista de la actividad del dominio de activación AD1 de TIF2, que comprende: (a)
30 proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN activador transcripcional (DBD) y un dominio de activación 1 AD1 de TIF-2; (b) administrar un antagonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho antagonista candidato inhibe la actividad de un dominio de activación AD1 de TIF2.

35 Por "activador transcripcional" se entiende moléculas que potencian la iniciación de la

transcripción por ARN polimerasa B (II). Los activadores transcripcionales incluyen activadores transcripcionales de levadura, tales como GAL4 y GCN4; el activador de herpes simplex, VP16; y miembros de la familia del receptor nuclear, que incluyen RAR, RXR, ER, TR, VDR, GR y AR.

5 Se describen a continuación genes recombinantes que codifican un polipéptido que comprende un dominio de activación AD1 de TIF2. Los genes recombinantes que codifican un polipéptido que comprende un activador transcripcional DBD se conocen bien en la técnica. Los procedimientos para determinar si un antagonista o agonista candidato potencia o interfiere en la transcripción se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el efecto de un antagonista o agonista candidato de la actividad del dominio de activación AD1 de TIF2 se puede determinar usando ensayos CAT como se describe a continuación y en Gronemeyer y col. (1987) y Bocquel y col., Nucl. Acids. Res (1989).

10 Cuando el efecto de un antagonista o agonista candidato de la actividad del dominio de activación AD1 de TIF2 se va a determinar, preferentemente, los genes recombinantes codificarán un polipéptido quimérico que comprende un activador transcripcional DBD fusionado con un polipéptido TIF2 que comprende el dominio de activación AD1. La célula huésped que expresa los genes recombinantes también puede expresar un gen indicador. Se han descrito anteriormente ejemplos de genes indicadores. El efecto de un antagonista o agonista candidato de función del dominio de activación AD1 de TIF2 puede determinarse como se describe en la leyenda de la Figura 7 (c).

15 Los presentes inventores también han identificado un segundo dominio de activación de TIF2, AD2 (aminoácidos 1288-1464 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2)), que media la activación transcripcional independiente de CBP. Adicionalmente, los presentes inventores han mostrado que los polipéptidos que contiene este dominio de activación, cuando se fusionan con un dominio de unión a ADN de un activador transcripcional, son capaces de activar la transcripción por medio de una vía independiente de CBP. Por consiguiente, la presente invención da a conocer adicionalmente un procedimiento de exploración para identificar un agonista de la actividad del dominio de activación AD2 de TEF2, que comprende:

20 (a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión de ADN activador transcripcional (DBD) y un dominio de activación AD2 de TIF-2; (b) administrar un agonista candidato a dicha célula y (c) determinar si dicho agonista candidato potencia la actividad del dominio de activación AD2 de TIF2.

25 La invención da a conocer adicionalmente un procedimiento de exploración para identificar un antagonista de la actividad del dominio de activación AD2 de TIF2, que

30

35

comprende: (a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN activador transcripcional (DBD) y un dominio de activación AD2 de TIF-2; (b) administrar un antagonista candidato a dicha célula y (c) determinar si dicho antagonista candidato inhibe la actividad del dominio de activación AD2 de TIF2.

Genes recombinantes que codifican un polipéptido que comprende un dominio de activación AD2 de TIF2 se describen a continuación. Genes recombinantes que codifican un polipéptido que comprende un activador transcripcional DBD se conocen bien en la técnica. Los procedimientos para determinar si un agonista o antagonista candidato potencia o interfiere con la transcripción se conocen en la técnica.

Cuando se va a determinar el efecto de un agonista o antagonista candidato de la actividad del dominio de activación AD2 de TIF2, genes recombinantes pueden codificar un polipéptido quimérico que comprende un activador transcripcional DBD fusionado a un polipéptido TIF2 que comprende el dominio de activación AD2. Se han descrito anteriormente activadores transcripcionales. La célula huésped que expresa los genes recombinantes también puede expresar un gen indicador. Los ejemplos de genes indicadores se han descrito anteriormente. El efecto de un agonista o antagonista candidato de la actividad del dominio de activación AD2 de TIF2 puede determinarse como se describe en la leyenda de la Figura 7(c).

Anticuerpos de TIF-2 y Procedimientos

También se dan a conocer por la presente invención anticuerpos de TIF2, como específicos para una proteína TIF2, un polipéptido TIF2, un fragmento de proteína TIF2 o un fragmento de polipéptido TIF2. El término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) frente a anticuerpos que se pueden marcar en una forma soluble o unida, así como fragmentos de los mismos proporcionados por cualquier técnica conocida, tales como, pero sin limitación, escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno. Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos frente a antígenos, cuya población contiene sitios de unión de epítipo sustancialmente similares. Se pueden obtener mAb por procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Kohler y Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Patente de Estados Unidos Nº 4.376.110; Ausubel y col., ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1987-1996); y Harlow y Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan y col., eds., Current Protocols in Immunology,

Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992-1996).

Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de los mismos. Un hibridoma que produce un mAb de la presente invención puede cultivarse *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La producción de altos títulos de mAb *in vivo* o *in situ* hace de éste el procedimiento preferido a día de hoy de producción.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas, diferentes porciones de las cuales proceden de especies animales diferentes, tales como las que tiene una región variable que procede de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, que se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, cuando los mAb murinos tienen rendimientos más altos de los hibridomas pero inmunogenicidad más alta en humanos, de modo que se usan mAb quiméricos murinos/humanos. Se conocen en la técnica anticuerpos quiméricos y procedimientos para su producción (Cabilly y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984); Solicitud de Patente Europea 125023 (publicada el 14 de noviembre, 1984); Neuberger y col., Nature 314:268-270 (1985); Taniguchi y col., Solicitud de Patente Europea 171496 (1985); Morrison y col., Solicitud de Patente Europea 173494 (1986); Neuberger y col., Solicitud de PCT WO 86/01533, (1986); Kudo y col., Solicitud de Patente Europea 184187 (1986); Morrison y col., Solicitud de Patente Europea 173494 (1986); Robinson y col., Publicación PCT PCT/US86/02269 (1987); Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443 (1987); Sun y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218 (1987); Better y col., Science 240:1041-1043 (1988); y Harlow y Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Estas referencias se incorporan completamente en el presente documento por referencia.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como la fuente del mAb con el mAb frente al cual se prepara un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo frente a esos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunogen" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo un anticuerpo denominado anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser idéntico desde el punto de vista de epítomos al mAb original que indujo el anti-Id. Por tanto, usando anticuerpos frente a las determinantes idiotípicas de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Los mAb

anti-Ig por tanto tienen sus propios epítomos idiotípicos o "idiotopos" similares estructuralmente al epítomo a evaluar, tal como proteína GRB α .

El término "anticuerpo" pretende incluir tanto moléculas de inmunoglobulina intactas como fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unir antígeno. Los fragmentos de F(ab')₂ y Fab carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica de tejido que un anticuerpo intacto (Wahl y col., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden usar para la detección y cuantificación de un TIF2 de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el presente documento para moléculas de anticuerpo intactas. Dichos fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de F(ab')₂).

Se dice que un anticuerpo es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para así unir la molécula al anticuerpo. El término "epítomo" pretende referirse a la parte de cualquier molécula capaz de que se le una un anticuerpo que también puede reconocerse por dicho anticuerpo. Los epítomos o "determinantes antigénicos" normalmente consisten en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales específicas tridimensionales así como características de carga específicas.

Un "antígeno" es una molécula o una parte de una molécula capaz de que se le una un anticuerpo que es capaz adicionalmente de inducir en un animal la producción de anticuerpo capaz de unirse a un epítomo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítomo. La reacción específica citada anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará, de un modo altamente selectivo, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden suscitarse por otros antígenos.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención se pueden usar para detectar cualitativamente o cuantitativamente una proteína TIF2, polipéptido o fragmento, en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan un TIF2 de la presente invención. Esto puede conseguirse por técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado por fluorescencia (véase a continuación) junto con microscopio de luz, citometría de flujo o detección fluorométrica.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) dados a conocer en la presente invención pueden emplearse histológicamente, como en microscopía inmunoelectrónica o inmunofluorescencia, para la detección *in situ* de una proteína TIF2, polipéptido o fragmento,

de la presente invención. La detección *in situ* puede conseguirse extrayendo un espécimen histológico de un paciente y proporcionando un anticuerpo marcado de la presente invención a dicho muestra. El anticuerpo (o fragmento) se proporciona preferentemente aplicando o recubriendo con el anticuerpo marcado (o fragmento) una muestra biológica. A través del uso de dicho procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de una proteína TIF2, polipéptido o fragmento, sino también su distribución en el tejido examinado. Los expertos habituales percibirán fácilmente que cualquier de una amplia variedad de procedimientos histológicos (tales como procedimientos de tinción) se pueden modificar para conseguir dicha detección *in situ*.

10 Ensayos de este tipo para una proteína TIF2, polipéptido o fragmento, en el contexto de la presente invención típicamente comprenden la incubación de una muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recientemente cultivadas tales como linfocitos o leucocitos o células que se han incubado en cultivo de tejido, en presencia de un anticuerpo marcado de manera detectable capaz de identificar una proteína TIF2, polipéptido o
15 fragmento y detectar el anticuerpo por cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica.

 La muestra biológica puede tratarse con un vehículo o soporte de fase sólida tal como nitrocelulosa u otro soporte o vehículo sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte o vehículo puede lavarse después con tampones adecuados seguido del tratamiento con un anticuerpo específico de TIF2 marcado de manera
20 detectable. El vehículo o soporte de fase sólida puede lavarse después con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de anticuerpo unido en dicho vehículo o soporte sólido puede detectarse después por medios convencionales.

 Por “soporte de fase sólida”, “vehículo de fase sólida”, “soporte sólido”, “vehículo sólido”, “soporte” o “vehículo” se pretende cualquier soporte o vehículo capaz de unirse a antígeno o anticuerpos. Los vehículos o soportes bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilasas de nylon, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabro y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierto grado o insoluble para los fines en el contexto de la presente invención. El material de soporte
30 puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por tanto, la configuración del vehículo o soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo o la superficie externa de un bastoncillo. Como alternativa, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira de ensayo, etc.. Los soportes o vehículos
35 preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros

vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación de rutina.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo anti-TIF2 puede determinarse de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los expertos en la materia serán capaces de
5 determinar las condiciones de ensayo óptimas y de funcionamiento para cada determinación empleando experimentación de rutina. Otras de estas etapas como lavar, agitar, batir, filtrar y similares se puede añadir a los ensayos si es habitual o necesario para la situación particular.

Uno de los modos en el que un anticuerpo específico de TIF2 se puede marcar de forma detectable es uniendo el mismo a una enzima y usarlo en un inmunoensayo enzimático
10 (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando se expone más tarde a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de tal modo que produce un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol
15 deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección se puede conseguir por procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede conseguir
20 por comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de manera similar.

La detección se puede conseguir usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, por marcaje radiactivo de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Es posible detectar R-PTPasa a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA).
25 Una buena descripción de RIA se puede encontrar en Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, de Work, T. S. y col., North Holland Publishing Company, NY (1978) con referencia particular al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" por Chard, T., incorporado por referencia en el presente documento. El isótopo radiactivo se puede detectar por tales medios como el uso de un contador γ o un
30 contador de centelleo o por autorradiografía.

También es posible marcar un anticuerpo anti-TIF2 con un componente fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado por fluorescencia se expone a la luz de la longitud de onda adecuada, su presencia se puede detectar entonces debido a la fluorescencia. Entre los componentes de marcaje fluorescente más comúnmente usados están isotiocianato de
35 fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también se puede marcar de manera detectable usando metales de emisión de fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie de lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo usando tales grupos de quelación de metales como ácido dietilentriamina pentacético (EDTA).

5 El anticuerpo también se puede marcar de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscente se determina después detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de
10 acridinio y éster de oxalato.

De la misma manera, un compuesto bioluminiscente se puede usar para marcar el anticuerpo en el contexto de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína
15 bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para fines de marcaje son luciferina, luciferasa y aequorina.

Una molécula de anticuerpo en el contexto de la presente invención puede adaptarse para su utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo “de dos sitios” o “sándwich”. En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad de anticuerpo no
20 marcado (o fragmento de anticuerpo) se une a un soporte o vehículo sólido y una cantidad de anticuerpo soluble marcado de manera detectable se añade para permitir la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo, antígeno y anticuerpo marcado de fase sólida.

Ensayos inmunométricos típicos y preferidos incluyen ensayos “directos” en los que el
25 anticuerpo unido a la fase sólida se pone en contacto primero con la muestra a ensayar para extraer el antígeno de la muestra por formación de un complejo antígeno-anticuerpo de fase sólida binario. Después de un período de incubación adecuado, el vehículo o soporte sólido se lava para eliminar el resto de la muestra fluida, incluyendo antígeno no reaccionado, si lo hubiera, y después se pone en contacto con la solución que contiene una cantidad
30 desconocida de anticuerpo marcado (que funciona como una “molécula indicadora”). Después de un segundo período de incubación para permitir que el anticuerpo marcado forme complejo con el antígeno unido al vehículo o soporte sólido a través del anticuerpo no marcado, el vehículo o soporte sólido se lava una segunda vez para eliminar el anticuerpo marcado que no ha reaccionado.

35 En otro tipo de ensayo “sándwich”, que también puede ser útil con los antígenos de la

presente invención, se usan los denominados ensayos “simultáneo” e “inverso”. Se usan unos ensayos “simultáneo” e “inverso”. Un ensayo simultáneo implica una sola etapa de incubación ya que el anticuerpo unido al vehículo o soporte sólido y anticuerpo marcado se añaden ambos a la muestra a ensayar al mismo tiempo. Después de que se complete la incubación, el

5 vehículo o soporte sólido se lava para eliminar el resto de muestra fluida y anticuerpo marcado que no formaba complejos. La presencia de anticuerpo marcado asociado con el vehículo o soporte sólido se determina después como se haría en un ensayo de sándwich “directo” convencional.

En el ensayo “inverso”, adición etapa por etapa primero de una solución de anticuerpo

10 marcado a la muestra fluida seguida de la adición de anticuerpo no marcado unido a un vehículo o soporte sólido después de que se utilice un período de incubación adecuado. Después de una segunda incubación, la fase sólida se lava de un modo convencional para liberarla del resto de la muestra a ensayar y la solución de anticuerpo marcado que no ha reaccionado. La determinación del anticuerpo marcado asociado con un vehículo o soporte

15 sólido se determina después como en los ensayos “simultáneo” y “directo”.

Ejemplo 1: Clonaje de TIF2 y Expresión

De acuerdo con los informes previos (Halachmi, S. y col., Science 264:1455-1458 (1994); Cavallès, V. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10009-10013 (1994); Kurokawa, R. y col., Nature 377:451-454 (1995)), los investigadores observaron unión dependiente de agonista

20 *in vitro* de una proteína de 160-kDa a partir de extractos celulares completos marcados con ³⁵S (HeLa, Cos-1, P19,6, MCF-7) a las LBD marcadas con glutatión-S-transferasa (GST) de receptores de ácido retinoico (RAR) y de estrógeno (ER) (FIGURA 2a). Un clon de ADNc, identificado por exploración de 340.000 clones de una biblioteca de expresión de ADNc de placenta humana con una sonda de ER (DEF) marcada con ³²P unido a (E2) estradiol, que

25 codifica un fragmento de proteína (TIF2.1) que interaccionó en transferencias Far-Western con tres LBD de NR marcados con ³²P diferentes (ER, RAR, RXR) en un modo dependiente de agonista (no mostrado) y podrían corresponder por lo tanto a la proteína de 160-kDa anterior. La secuencia codificante de TIF2 (FIGURA 3a), precedida por codones de terminación en fase

30 5' del iniciador AUG, se obtuvo tras la re-exploración con una sonda de ADNc de TIF2.1. El ADNc de TIF2 humano codifica una proteína de 159,160 Da (1.464 aminoácidos) que incluye señales de localización nuclear potenciales N terminales (NLS), una región rica en Gln y tres en Ser/Thr y dos grupos cargados (FIGURA 3). Algunas regiones de TIF2 muestran similitudes de secuencias significativas con el coactivador del receptor esteroide recientemente descrito (Oate, S.A. y col., Science 270:1354-1357 (1995) SRC-1 (FIGURA 3). Parece que TIF2 se

35 expresa ampliamente, puesto que el transcrito correspondiente se encontró en varios tejidos

humanos, aunque a un nivel mucho más bajo en el riñón (FIGURA 2c y no mostradas).

Los estudios de inmunodepleción respaldan con fuerza que TIF2 es la especie de proteína de 160-kDa que interacciona en un modo dependiente de agonista con LBD de NR (véase anteriormente y Halachmi, S. y col., Science 264:1455-1458 (1994); Cavailès, V. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10009-10013 (1994); y Kurokawa, R. y col., Nature 377:451-454 (1995)). La transferencia de Western con un antisuero de conejo (α -TIF2), producido frente a TIF2.1 expresado por bacterias, reveló principalmente una proteína de células HeLa de 160-kDa que interaccionó con un GST-ER(DEF) unido a agonista (FIGURAS 2b, carriles 1 y 2; también véase leyenda de FIGURA 2b). La inmunodepleción con un anticuerpo de TIF2 monoclonal de ratón ($m\alpha$ -TIF2) antes de la purificación por afinidad dio como resultado una disminución específica de las cantidades de TIF2, pero no de TIF1 (Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14:2020-2033 (1995)), mantenido en GST-ER(DEF) unido a E2 (FIGURA 2b, comparar carriles 2 con 4 y 6 con 8). Notablemente, el análisis Far-Western posterior con una sonda ^{32}P -GST-ER(DEF) unida a E2 reveló la especie de 160-kDa sólo en control, pero no en extractos sometidos a inmunodepleción de TIF2 (FIGURA 2b, comparar carriles 10 y 12).

TIF2 de longitud completa expresado transitoriamente fue nuclear y estuvo asociado principalmente con cuerpos discretos (FIGURA 4a). Puesto que el fragmento de TIF2.1 sobreexpresado fue esencialmente citoplasmático (confirmando la asignación anterior de un NLS de TIF2 N terminal), la interacción de TIF2.1 con NR se podría estudiar en células de mamífero usando ensayos de co-traslación nuclear. En ausencia de ligando, TIF2.1 permaneció citoplasmático y NR fueron nucleares (para RAR α , ER y PR, véase FIGURAS 4b, d, g). La exposición de agonista, sin embargo, dio como resultado en los tres casos co-localización nuclear de TIF2.1 y NR, lo que indicó la interacción NR-TIF2 *in vivo* (FIGURAS 4c, e, h). La interacción dependiente de agonista de TIF2.1 con NR se observó para todos los otros receptores analizados (RXR, TR, VDR, GR y AR, no mostrado). Curiosamente, no se detectó interacción entre ER y TIF2.1 en presencia del antagonista de AF-2 ER hidroxitamoxifeno (OHT) (FIGURA 4f) y el antagonista de AF-2 PR RU 486 invirtió la interacción de PR-TIF2.1 inducida por R5020 (FIGURA 4i).

De acuerdo con los experimentos de transferencia de Far-Western, NR y TIF2 interaccionaron directamente, ya que la proteína TIF2.1 purificada se unió *in vitro* en presencia de un agonista a GST-ER(DEF), GST-RAR α (DEF), GST-RXR α (DE) y GST-TR(DE) (Figura 4k, l, m, carriles 3 y 4; Figura 4n, carriles 5 y 6). Como se esperaba, la unión de TIF2 a GST-RXR α (DE) se produjo con *cis*-RA (9C-RA) pero no *trans* RA (T-RA) (Figura 4n, carriles 1 y 2) y OHT evitó la unión dependiente de E2 de TIF2 a GST-ER(DEF) (Figura 4n, carriles 7-9). La integridad del núcleo conservado de los dominios de activación AF-2 (AF-2 AD) de RXR α ,

RAR α y ER que se mostró que es crítica para la actividad AF-2 (Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14:2020-2033 (1995); Danielian, P.S. y col., EMBO J. 11:1025-1033 (1992); Durand, B. y col., EMBO J. 13:5370-5382 (1994); y Gronemeyer, H. y Laudet, V., Protein Profile 2:1173-1308 (1995), y en los mismos), se requería para la interacción de TIF2 *in vitro*. La mayoría de los
5 mutantes de núcleo AF-2 AD que han perdido actividad AF-2 (ER, Figura 4k, carriles 5-8; RAR α , Figura 4l, carriles 5-10; RXR α , Figura 4m, carriles 5-8) no se asociaron de manera detectable, o sólo lo hicieron débilmente, con TIF2, mientras que la fusión GST-LBD del mutante de RXR α E461Q, cuyas AF-2 sólo están parcialmente deteriorados (Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14:2020-2033 (1995)), todavía exhibieron una interacción dependiente de RA
10 significativa con TIF2.1 *in vitro* (Figura 4m, carriles 9 y 10). No se observó interacción significativa de TIF2.1 con GST-VP16 (dominio de activación ácido), GST-TBP, GST-TFLIB, o una serie de GST-TAF (hTAF_{II}18, hTAF_{II}20, hTAF_{II}28 y hTAF_{II}55; véase Jacq, X. y col., Cell 79:107-117 (1994); Mengus, G. y col., EMBO J.14:1520-1531 (1995)) (no mostrado).

Conceptualmente, un TIF capaz de mediar la actividad transcripcional de una AF afín a
15 la maquinaria de transcripción, podría ser por sí mismo un activador cuando se fusiona con un dominio de unión a ADN heterólogo. Curiosamente, en células HeLa transfectadas transitoriamente, TIF2.1 se fusionó con el dominio de unión de ADN de GAL4 transactivó fuertemente un indicador GAL4 (Figura 5a). Por tanto, TIF2 puede corresponder a uno del factor o factores limitantes hipotéticos que se ha propuesto previamente que están implicados
20 en el silenciamiento/interferencia transcripcional de NR (Meyer, M.-E. y col., Cell 57:433-442 (1989); Bocquel, M.-T. y col., Nucl. Acids Res. 17:2581-2595 (1989); Tasset, D. y col., Cell 62:1177-1187 (1990)). Apoyando esta posibilidad, experimentos “anti-silenciamiento” mostraron que la expresión de TIF2.1 en células transfectadas con ER podría, al menos parcialmente, invertir la autointerferencia transcripcional (Bocquel, M.-T. y col., Nucl. Acids
25 Res. 17:2581-2595 (1989)) generada por la expresión del aumento de cantidades de ER (Figura 5b, nótese el cambio pronunciado en la curva de activación con forma de campana a concentraciones más altas de ER en presencia de TIF2.1). En altos niveles de ER, la transactivación estimulada por TIF2.1 disminuyó, posiblemente debido al silenciamiento de otros mediadores potenciales (Jacq, X. y col., Cell 79:107-117 (1994); Lee, J.W. y col., Nature
30 374:91-94 (1995); Le Douarin, B. y col., EMBO J. 14:2020-2033 (1995); vom Baur, E. y col., EMBO J. 15:110-124 (1996); Lee, J.W. y col., Endocrinology 9:243-254 (1995); Cavailles, V. y col., EMBO J. 14:3741-3751 (1995); Onate, S.A. y col., Science 270:1354-1357 (1995)) y/o factores transcripcionales.

Como se esperaba, la coexpresión de TIF2.1 con un NR unido a antagonista no
35 condujo a ninguna estimulación de la transactivación llevada a cabo por AF-1 en presencia de

antagonistas de AF-2 puros (Berry, M. y col., EMBO J 9:2811-2818 (1990); Meyer, M.E. y col., EMBO J. 9:3923-3932 (1990)), confirmando adicionalmente que TIF2 es específico de AF2 (Figura 5b y 5e para ER, OHT; Figura 5d para PR, RU486). La expresión de TIF2 también aumentó la transactivación mediada por agonista/AF-2 por los receptores de andrógenos (AR) y progesterona (PR), pero no la transactivación por GALP-VP16 y GALP-AP2 (Figura 5c). En condiciones similares, la transactivación por GAL-RAR, GAL-RXR, GAL-VDR, GAL-TR y GAL-GR no se vio afectada por TIF2 (Figura 5c y no mostradas), lo que sugiere que para esos NR cualquier TIF2 no está implicado críticamente en la mediación de sus actividades AF-2 o las cantidades de TIF2 endógenas son suficientes para soportar óptimamente la transactivación, por ejemplo, debido a que TIF2 tiene una afinidad más alta por estos receptores. La estimulación de TIF2 está afectada en algún grado por el ambiente del promotor del gen sensible, puesto que el efecto de TIF2 en la transactivación inducida por PR/5020 fue más grande para un complejo (MMTV) que para un promotor mínimo (GRE-TAT), sin embargo el último se podía estimular de forma reproducible (Figura 5d). Como se esperaba de los niveles distintos de transcritos de TIF2 en distintos tejidos (Figura 2c), el efecto de TIF2 fue dependiente de tipo celular, puesto que TIF2 tiene un efecto mucho más fuerte en las transactivaciones inducidas por PR- y ER- en células Cos-1 que en células HeLa (Figuras 5d, e).

El silenciamiento (Meyer, M.-E. y col., Cell 57:433-442 (1989); Bocquel, M.-T. y col., Nucl. Acids Res. 17:2581-2595 (1989); Tasset, D. y col., Cell 62:1177-1187 (1990)) y los estudios estructurales (Bourguet, M. y col., Nature 375:377-382 (1995); Benaud, J.-P. y col., Nature 378:681-689 (1995); Wagner, R.L. y col., Nature 378:690-697 (1995); Wurtz, J.-M. y col., Nature Struct. Biol. 3:87-94 (1996)) han respaldado un modelo en el que la unión del ligando al LBD de NR da como resultado cambios conformacionales que generan la superficie o superficies requeridas para la interacción con factores intermediarios transcripcionales (TIF/mediadores) que transducen la afinidad de AF2 a la maquinaria de transcripción. Conceptualmente dichos mediadores deberían exhibir las siguientes propiedades: (i) deberían unirse a LBD de NR unidos a agonista pero no a antagonista, (ii) su unión debería evitarse por mutaciones que suprimen la actividad AF-2, (iii) deberían exhibir colectivamente una función o unas funciones de transactivación, (iv) su expresión debería mitigar el auto-silenciamiento de AF-2 y (v) su sobre-expresión debería estimular la actividad de AF-2, siempre que estén presentes en cantidades limitantes. El presente estudio es el primer informe de un mediador autentico de AF-2 de NR que exhibe todas estas propiedades.

Ejemplo 2: Producción de Anticuerpos de TIF-2

Los siguientes anticuerpos de TIF-2 se fabricaron utilizando técnicas conocidas, a no ser que se especifique otra cosa a continuación. Véase, por ejemplo, Ausubel y col, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1987-1996); Harlow y Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan y col., ed., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc and Wiley Interscience, N.Y., (1992-1996), incorporándose los contenidos de dichas referencias completamente en el presente documento por referencia.

Anticuerpos Policlonales. La secuencia codificante de TIF2.1 (aminoácidos 624-1287) se clonó en pET15b y el plásmido resultante se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Después de la sobreexpresión de la proteína (His)₆-TIF2.1 las bacterias se lisaron y se purificó la proteína del extracto bruto por medio de cromatografía de afinidad en una columna de quelación HiTrap (Pharmacia) como se describe (véase Bourguet y col., Prot. Expr. Purif. 6:604-608 (1995) para detalles técnicos). Las alícuotas de la proteína purificada (50 µg) en emulsión (Adyuvante de Freund) se inyectaron (sólo una vez) en conejos Nueva Zelanda usando un protocolo de inyección intradérmico multisitio. El antisuero obtenido de sangrados en serie reveló una única banda de aproximadamente 160 kDa en las transferencia de Western de extractos de células Cos-1 transformadas con un vector de expresión de TIF2 de longitud completa.

Anticuerpos Monoclonales. Se seleccionó un péptido de 20 unidades de aminoácidos de TIF2 (con una cisteína añadida C terminal) basándose en sus características inmunogénicas potenciales en términos de hidrofilia, flexibilidad, probabilidad de superficie y el "índice antigénico" de acuerdo con los programas de software Plot y Peptidestructure del paquete GCG.

El péptido elegido corresponde al fragmento N terminal codificado por el ADNc parcial de TIF2 aislado inicialmente (que codifica aminoácidos 624 a 1287) y corresponde a los aminoácidos 624 a 643 de la proteína total (SEC ID N°: 2):

ERADGQSRLHDSKGQTKLLQ(C) (SEC ID N°: 4)

624

643

El péptido se acopló a ovoalbúmina por medio de la cisteína adicional usando el reticulador heterobifuncional MBS. Se realizaron inyecciones en ratones BALB/c por vía intraperitoneal e intravenosa.

Las células de bazo de los ratones inmunizados se fusionaron con el mieloma Sp2/0 Ag14. Los hibridomas en crecimiento se exploraron primero por ELISA usando la proteína recombinante TIF2.1 y el péptido libre. Los cultivos positivos se ensayaron después por inmunocitofluorescencia en células Cos transfectadas con TIF2.1 (en el vector pSG5) así como

por transferencia de Western usando los extractos celulares de Cos transfectados y extracto nuclear de HeLa. Los cultivos positivos también se ensayaron con respecto a su capacidad para inmunoprecipitar la proteína TIF2.1 a partir de células transfectadas Cos.

Los cultivos se clonaron dos veces en agar blando. Se han establecido 5 hibridomas, 4 que secretan anticuerpos IgG₁, κ y 1, IgG_{2a}, κ, como se muestra en la Tabla:

5

Hibridoma	ELISA	Inmunofluores. (Cos)	Transferencia de Western (Cos)	Inmunoprecip. (Cos)
1Ti-1B6 (IgG1, κ)	+	+	+	+
1Ti-1C9 (IgG1, κ)	+	+	+	-
1Ti-1D8 (IgG1, κ)	+	+	++	+
1Ti-1D12 (IgG1, κ)	+	+	++	+
1Ti-1G3 (IgG1, κ)	+	+	++	+

Ejemplo 3: Identificación de NID de TIF2

Todo el trabajo de ADN recombinante se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales (Ausubel, F.M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). Las fusiones de GST de receptores nucleares se expresaron de los siguientes plásmidos descritos anteriormente: GST (pGEX2T; Pharmacia), GST-ER (pGEX2T-hERα(DEF), también denominado pGEX2THE14G, aminoácidos 282-595), GST-RXR (pGEX2T-mRXRα(DE), aminoácidos 205-467), y GST-RAR (pGEX2T-hRARα(DEF), aminoácidos 153-462) (todos LeDouarin, B. y col., EMBO J. 14:2020-2033 (1995a)).

10

15

Para delinear adicionalmente el dominio de interacción de NR de TIF2 (NID), los investigadores estudiaron la interacción entre una serie de mutantes de delección de TIF2 y los LBD de ER o RARα, usando ensayos *in vitro* basados en proteína de fusión GST. En ambos casos, se mapeó un NID a la región central de TIF2 (aminoácidos 624-869 en mutante TIF2.5; véanse Figuras 7a y b). No se pudo identificar NID adicional en los extremos N o C terminal de TIF2 (Figuras 7a y b; mutantes TIF2.0, TIF2.2 y TIF2.7). Nótese que, en contraste, SRC-1, un parálogo de TIF2, aparentemente alberga dos NID distintos no contiguos localizados en las regiones central y C terminal (Oñate, S.A. y col., Science 270:1354-1357 (1995); Yao, T.P. y col., Proc. Natl. Acad Sci. USA 93:10626-10631 (1996); Zhu, Y. y col., Gene Expression 6:185-195 (1996)).

20

25

Para definir adicionalmente el NID de TIF2, se truncó TIF2.5 en C terminal a Pro775, produciendo TIF2.34 que también interaccionó con LBD de ER y RARα en un modo dependiente de ligando (Figuras 8a y c). Tras truncamiento adicional a Ser697, el mutante resultante también interaccionó con LBD tanto de ER como de RARα pero,

sorprendentemente, también se descubrió una interacción dependiente de ligando con TIF2.36 (Figuras 8a y c), lo que indica por tanto que el NID de TIF2 está compuesto de al menos dos módulos que interaccionan con NO autónomos.

Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de NID de TIF2 presente en TIF2.34 con la región correspondiente de SRC-1 (Onate, S.A. y col., *Science* 270:1354-1357 (1995))
5 reveló tres regiones altamente conservadas (Figura 8a). Curiosamente, las tres contenían el motivo LxxLL (SEC ID N°:12) (Figura 8b), originalmente identificado en la denominada “caja del receptor nuclear” (caja NR) TIF1 α como el motivo LxxLLL (SEC ID N°: 13), que también estuvo presente en RIP140 (Cavaillès, V. y col., *EMBO J.* 14:3741-3751 (1995)) y TRIP3 (Lee, J.W. y col., (1995)) (véase LeDouarin, B. y col., *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996) y Figura 8b).
10 Notablemente, 10 secuencias de aminoácidos que comprenden las cajas NR RP140 o TIF1 α fueron suficientes para la interacción funcional con RXR en un modo dependiente de ligando y de integridad de AD AF-2 y la mutación de las leucinas en la posición 4 y 5 (LL \rightarrow AA) del motivo LxxLLL (SEC ID N°: 13) anuló la interacción RXR-TIF1 α (LeDouarin, B. y col., *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996)). La funcionalidad de la caja NR RIP140 se confirmó recientemente (Heery, D.M. y col., *Nature* 387:733-736 (1997)).
15

Para investigar la significancia funcional de estos tres motivos en el NID de TIF2, la mutación LL \rightarrow AA anterior se introdujo en TIF2.1, en cada motivo sólo o en todas las posibles combinaciones de los tres motivos (TIF2.1m1 a m123 en la Figura 8a; los números detrás de “m” se refieren a los motivos mutados). La mutación de las tres cajas MR se requería para anular tanto la unión a ER, RAR α y RXR α (Figura 8d, cuantificación en Figura 8e, barras blancas) como la estimulación dependiente de TIF2 de la transactivación inducida por ligando por AF-2 de ER y RXR α (Figura 8e, barras negras y datos no mostrados; en el caso de AF-2 de RAR α la estimulación fue débil y no se cuantificó). Las construcciones TIF2.1 en las que se mutaron dos motivos de caja NR todavía exhibieron unión de ER y estimulación de la actividad de AF-2, en particular cuando el motivo de la caja NR II quedó intacto, lo que sugiere que los tres módulos que contenían cajas NR son al menos en parte, funcionalmente redundantes (Figuras 8d y e; TIF2.1m12, m13 y m23). Esta redundancia fue obvia cuando sólo se mutó un motivo de la caja NR; a diferencia de TIF1 α , que contiene sólo una caja NR. (LeDouarin, B. y col., *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996)), la mutación de una sola caja NR de TIF2 no anuló la unión de ER y la estimulación de la actividad AF-2 de ER. Los tres mutantes (de TIF2.1m1 a m3) se unieron a ER y estimularon la transactivación dependiente de estradiol por ER con eficacia similar a TIF2.1 por sí mismo (Figuras 8d y e). En el caso de RAR α y RXR α las mutaciones tuvieron, en general, un efecto más deletéreo en la unión de LBD del receptor y estimulación de la actividad AF-2 que en el caso de ER (Figuras 8d y e). Esto puede reflejar
20
25
30
35

posiblemente una interacción más débil entre TIF2 y RAR α o RXR α que con ER. Sin embargo, a pesar de exhibir en general una actividad más baja, los patrones de la unión de NR y estimulación de la actividad AF-2 de los mutantes de la caja NR fueron similares para ER y RAR α y RXR α , ya que la mutación del motivo II fue siempre más perjudicial en mutantes dobles que la mutación de los motivos I y III (véase Figura 8e). Notablemente, para tanto ER como RXR α hubo una buena correlación entre el efecto de cualquiera de las diversas mutaciones en la unión del receptor TIF2.1 *in vitro* y estimulación mediada por TIF2.1 de la actividad AF-2 (Figura 8e), confirmando un mecanismo por el cual la estimulación de la actividad AF-2 por TIF2 implica interacción TIF2-NO a través de la interfase o las interfases de la caja NR NR holo-LBD-TIF2.

Nuestro presente análisis de estructura-función revela que TIF2 contiene un único dominio de interacción de receptor nuclear (NTD). Nótese que a diferencia de los otros miembros de la familia TIF2, se notificó que SRC-1 contenía dos NID (Oñate, S.A. y col., Science 270:1354-1357 (1995); Yao, T.P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10626-10631 (1996); Zhu, Y. y col., Gene Expression 6:185-195 (1996)). Nótese, sin embargo, que uno de los dos NID de SRC-1 es más probablemente homólogo al NID de TIF2 caracterizado en el presente documento (véase Figura 8a). El NMD de TIF2 está compuesto de tres módulos y cada uno puede unirse independientemente de un modo dependiente de ligando a los NR ensayados en este estudio. Curiosamente, esos módulos contienen el motivo de la caja NR LxxLL (SEC ID N $^{\circ}$: 12), que se registró originalmente (como el motivo LxxLL (SEC ID N $^{\circ}$: 13), Figura 8b) dentro de un módulo de unión de NR de 10 aminoácidos de TIF1 α que se descubrió que se conservaba en el NID de RIP140 y también presente en TRIP3 (LeDouarin, B. y col., EMBO J. 15:6701-6715 (1996) y referencias en el mismo). Además, se mostró que los módulos TIF1 α y RIP140 interaccionaban funcionalmente con NR (LeDouarin, B. y col., EMBO J. 15:6701-6715 (1996)). La implicación de los motivos de caja NR en la unión NO-coactivador y su presencia en varios coactivadores distintos se señaló en notificaciones recientes (Heery, D.M. y col., Nature 387:733-736 (1997); Torchia, J. y col., Nature 387:677-684 (1987); LeDouarin, B. y col., EMBO J. 15:6701-6715 (1996)). Nótese que los tres motivos de caja NR de TIF2 descritos en el presente documento se conservan en el parálogo de TIF2 p/CIP recientemente descubierto (Torchia, J. y col., Nature 387:677-684 (1987)). A diferencia de TIF1 α para cuya mutación de leucinas en las posiciones 4 y 5 a alanina de su único motivo de caja NR (LL \rightarrow AA) anula la unión de NR, la mutación de los tres motivos se requiere en el NID de TIF2 para anular la unión de NR, lo que indica que cada uno de estos motivos puede contribuir a una superficie TIF2 que interacciona con una superficie afín de holo-LBD de NR. Que las cajas NR de TIF2 exhiban redundancia funcional se ha soportado por la observación

de que la mutación LL→AA en cualquiera de los tres motivos de NID de TIF2 aparentemente no redujo (en el caso de ER) o sólo lo hizo débilmente (en el caso de RAR α , RXR α) la eficacia de interacción de NR. Además, en el ambiente de TIF2.1, cualquier único motivo de caja NR intacto sólo (es decir, cuando los dos otros motivos estaban mutados) fue suficiente para la interacción con el holo-LBD de ER, aunque sólo el motivo II sólo pudo producir una eficacia cercana a la unión a NR de tipo silvestre. A diferencia, para la interacción de RAR α y RXR α , los mutantes con cajas NR intactas únicas fueron de 5 (caja II) a 20 (caja I o III) veces menos eficaces que el TIF2 de tipo silvestre que contenía las tres cajas NR. Serán necesarios estudios de cristalografía para distinguir entre dos posibles modelos, en los que los tres motivos de caja NR (i) contribuyen a la formación de una superficie de NID tripartita que reconoce específicamente una superficie holo-NO LBD afín o (ii) pertenece a superficies independientes que pueden interactuar cada una, aunque con diferentes eficacias, con la misma superficie holo-NO. Nótese, sin embargo, que el segundo modelo pudo permitir a TIF2 interactuar cooperativamente con ambos compañeros de homo- o heterodímeros de NR, por tanto convirtiendo la transactivación por NR en sensible a pequeñas variaciones en los niveles de TIF2. Nótese también que, para tanto ER como RXR α , los efectos de mutaciones de caja NR en la unión de NR y estimulación de la actividad AF-2 estuvieron correlacionados, lo que soporta adicionalmente la conclusión de que el efecto transcripcional de TIF2 implica la formación de una interfase de interacción LBD NO- caja NR.

El motivo LxxLL (SEC ID N^o: 12) se ha encontrado en varios co-activadores de NR distintos (véase anteriormente), lo que sugiere por tanto algo de similitud en el modo de las interacciones NO-coactivador. Sin embargo, esto no excluye la modulación específica de NO de estas interacciones, ya que la secuencias circundantes de la caja NR son altamente variables. En este sentido, nótese también que las cajas II y III de NR de TIF2 se predice que forman hélices α , mientras que la caja I de NR se predice que se pliega en una estructura de lámina β (predicciones de estructura de acuerdo con SOPMA, Geourjon y Deleage, 1994).

Ejemplo 4: Identificación de los dominios de activación AD1 y AD2 de TIF2

Los ensayos de transfección transitoria con un plásmido indicador GAL4 y quimeras que contienen diversos fragmentos TIF2 unidos al dominio de unión de ADN de GAL4 (DBD) demostraron la presencia de dos dominios de activación transcripcional autónomos en los 460 aminoácidos C terminal de TIF2, denominados AD1 y AD2 (definidos por los mutantes TIF2.8, TIF2.12 y TIF2.2 en las Figuras 7a y c). Las transfecciones transitorias de células HeLa y Cos-1 se realizaron como se ha descrito (Gronemeyer y col., (1987); Bocquel, M.T. y col., Nucl. Acids Res. 17:2581-2595 (1989)).

El AD1 N terminal (aminoácidos 1010-1131), que está presente en TIF2.1, mostró una

actividad más fuerte que el AD2 C terminal (aminoácidos 1268-1464) (compárese TIF2.8 y TIF2.12 con TIF2.2 en las Figuras 7a y c). Nótese, sin embargo, que la actividad más débil de AD2 (en relación con AD1) podría deberse a un nivel de expresión más bajo de la proteína de fusión GAL-TIF2.2 (compárese con GAL-TIF2.8 y GAL-TIF2.12 en la Figura 7c). Las dos funciones de activación de TIF2 fueron activas en células Cos-1 y HeLa (Figura 7c). Notablemente, las construcciones de AD2 (TIF2.2) y AD1 (TIF2.8) mínimas exhibieron algunas actividades específicas de célula, puesto que GALTIF2.8 fue más activo en células HeLa que en Cos mientras que se observó lo opuesto para GAL-TIF2.2 (Figura 7c). Curiosamente, la región rica en glutamina de TIF2 ni pudo activar la transcripción por sí sola cuando se fusionó con el DBD de GAL4 (Figura 7a y c; mutante TIF2.6) ni se requirió para la activación transcripcional por AD1 o AD2. No se pudo detectar ninguna función de activación en la parte N terminal de TIF2 (véase Figura 7a y c; mutante TIF2.0).

Los investigadores concluyeron a partir de estos datos que el dominio de interacción del receptor nuclear (NR) y las dos funciones de activación transcripcional de TIF2 corresponden a dominios modulares distintos, puesto que TIF2.5 se puede unir a NR, pero no puede activar la transcripción, mientras que TIF2.2 y TIF2.8 no se pueden unir a NR pero son capaces de activar la transcripción (Figura 7a).

Ejemplo 5: Caracterización de los dominios de activación AD1 y AD2 de TIF2

Recientemente se mostró que CBP y p300, identificados originalmente como coactivadores del factor de transcripción CREB, actuaban como integradores generales de múltiples vías de señalización, incluyendo la activación por medio de TR y RAR α unido a agonista (para revisiones y referencias véase Eckner, R., Biol. Chem. 377:685-688 (1996); Janknecht & Hunter, (1996); Glass, C.K. y col., Current Opin. Cell Biol. 9:222-232 (1997); Shikama, N. y col., Trends in Cell Biol. 7:230-236 (1997)). Adicionalmente, se notificó que SRC-1, que pertenece a la misma familia génica que TIF2, interacciona con CBP y p300 (Kamei, Y. y col., Cell 85:403-414 (1996); Yao, T.P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10626-10631 (1996); Hanstein, B., y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:11540-11545 (1996)). Usando la interacción basada en la proteína de fusión GST y ensayos de dos híbridos basados en células animales, los investigadores por lo tanto analizaron si TIF2 podría interaccionar también con CBP. En el sistema de dos híbridos sólo el fragmento central de TIF2.1, pero no los fragmentos de TIF2.2 C terminal o el TIF2.0 N terminal (Figura 7a), puntuaron positivos para interacción con GAL-CBP (que contenía los aminoácidos 1874-2165 de CBP, que abarcan el dominio de interacción SRC-1 de CBP; Figura 7e). Se expresó una proteína de fusión GST-CBP en *E. coli* y se usó para ensayos de inmunoprecipitación de complejos con polipéptidos TIF2 traducidos *in vitro* (Figura 7d). TIF2 interaccionó con CBP y, curiosamente, el dominio de

interacción de CBP (CID) solapó aparentemente con el dominio de activación AD1 de TIF2 (compárese Figuras 7a, c y d; mutantes TIF2.8 y TIF2.12). La interacción de TIF2 con CBP fue directa, puesto que una proteína TIF2.1 expresada en *E. coli* también interaccionó con GST-CBP (datos no mostrados). Sólo esta región de TIF2 interaccionó significativamente con la proteína de fusión GST-CBP, lo que sugiere por lo tanto que la actividad AD1 de TIF2 puede originarse del reclutamiento de CBP. Las regiones N terminales de purgación (Figuras 7a y d; mutantes TIF2.10 y TIF2.4) o el dominio de activación AD2 C terminal (Figuras 7a y d; mutante TIF2.2) no mostraron ninguna unión a GST-CBP. Nótese que TIF2.2 tampoco interaccionó con CBP de longitud completa (datos no mostrados), lo que sugirió que la actividad de AD de TIF2 está mediada por un factor o factores distintos de CBP.

Para investigar si el CID de TIF2 se pudiera separar del dominio de activación AD1, la capacidad de una serie de mutantes de truncamiento de TIF2 de GAL para activar un indicador GAL4 se comparó con su capacidad de interaccionar con una proteína GST-CBP *in vitro* (FIGURA 9). TIF2.13 (que abarca Pro₁₀₁₁ a Ser₁₁₂₂) exhibió una actividad transcripcional potente, comparable a la de fragmentos más grandes de TIF2 (compárese FIGURAS 7 y 9). La eliminación de 26 restos aminoacídicos C terminal (TIF2.15) o 20 N terminal (TIF2.18) redujo la actividad transcripcional sólo débilmente (FIGURAS 9a y b). Nótese que TIF2.13 también interaccionó con CBP *in vivo*, como se muestra usando un ensayo de dos híbridos en células de mamífero transfectadas (FIGURA 10b).

Mientras que la delección interna de los restos de Asp₁₀₆₁ a Ala₁₀₇₀ (TIF2.19) tuvo sólo un efecto leve en la capacidad de TIF2.13 de transactivar, la delección del segmento de Glu₁₀₇₁ a Leu₁₀₈₀ (mutante TIF2.20) significativamente redujo la actividad transcripcional de AD1 de TIF2. Notablemente, estos restos pertenecen a una secuencia que se predice que se pliega en una estructura anfipática de hélice α que está altamente conservada entre TIF2 y SRC-1 (FIGURA 9a). La implicación de esta región en la transactivación se confirmó por análisis de mutantes TIF2.21 a TIF2.32 (FIGURAS 9a y b). Todas las construcciones que contenían la secuencia de TIF2 de tipo silvestre de Asp₁₀₇₅ a Leu₁₀₈₇ estimularon la transcripción, mientras que incluso una delección de sólo algunos de estos restos significativamente redujo la activación transcripcional. Sin embargo, por sí mismo este péptido de hélice α sólo transactivó muy pobremente y tuvo que incorporarse en secuencias de TIF2 cadena arriba y/o cadena abajo adicionales para generar actividad transcripcional significativa (FIGURAS 9a y b; comparar mutantes TIF2.13, TIF2.21 y TIF2.32). Notablemente, en todos los casos la actividad ADD coincidió con la interacción CBP, puesto que las construcciones transcripcionalmente inactivas no interaccionaron con CBP (TIF2.24, TIF2.27 y TIF2.29 en las FIGURAS 9a-c), mientras que los mutantes transcripcionalmente activos también se unieron a CBP. Además, la fuerza de la

interacción *in vitro* con GST-CBP aparentemente se correlacionó con la eficacia de transactivación (FIGURAS 9a-c; por ejemplo, compárese TIF2.21 y TIF2.31).

Para investigar si la integridad de la región anfipática de hélice α potencial se requiere tanto para la actividad transcripcional AD1 como para la interacción con CBP, los investigadores introdujeron mutaciones puntuales en TIF2.13; los tres restos de Leu hidrófobos conservados o los de Asp-Glu hidrófilos se convirtieron en alaninas [FIGURA 9a; TIF2.13(LL) y TIF2.13(DQ)]. Curiosamente, la mutación de los tres restos de leucina casi suprimió completamente la actividad AD1, mientras que la mutación de la secuencia Asp-Glu tuvo muy poco efecto si tuvo alguno (FIGURA 10a). De nuevo la actividad AD1 y la interacción con CBP *in vitro* (FIGURA 10c), así como *in vivo* (FIGURA 10b), estuvieron estrictamente correlacionadas, puesto que GAL-TIF2.13(DQ), que transactiva tan eficazmente como GAL-TIF2.13 de tipo silvestre, interaccionó fuertemente con CBP, mientras que el GAL-TIF2.13(LL) transcripcionalmente inactivo interaccionó muy débilmente con CBP. En conjunto estos resultados indican que (i) CBP media la actividad AD1 de TIF2, (ii) un motivo anfipático de hélice α potencial localizado dentro del dominio AD1 está implicado críticamente en, pero no es suficiente para, la transactivación/unión de CBP eficaz y (iii) la anfifilicidad de este motivo no se requiere para la actividad AD1 y unión de CBP.

Las dos funciones de activación de TIF2 AD1 y AD2 aparentemente funcionan a través de diferentes cascadas de activación transcripcional. Mientras que el dominio de activación AD1 de TIF2 no podría separarse por análisis mutacional del dominio TIF2 que interacciona *in vitro* e *in vivo* con una región de la superficie de CBP que también media en la unión de SRC-1 (Kamei, Y. y col., Cell 85: 403-414 (1996)), ni esta región, ni CBP de longitud completa interaccionaron con AD2 de TIF2. Que las dos funciones de activación de TIF2 pueden funcionar a través de distintas vías también se sugiere por la especificidad celular diferencial de los fragmentos mínimos que exhibían actividad AD1 (por ejemplo, TIF2.8, TIF2.7, TIF2.9, TIF2.12) y actividad AD2 (TIF2.2). Mientras que TIF2.2 es más activo en células Cos-1 que en HeLa, todos los fragmentos mínimos que contenían AD1 son más activos en células HeLa. A lo largo de las mismas líneas, la eliminación en TIF2.3 de las secuencias N terminal de TIF2.8 dio como resultado un aumento de 10 veces y 2 veces de la transactivación de las células HeLa y Cos-1, respectivamente, y la eliminación en TIF2.1 de las secuencias C terminal de TIF2.3 dio una transactivación 9 veces y 3 veces más alta en células HeLa y Cos-1, respectivamente. Esto sugiere que las secuencias eliminadas podrían ejercer represión intra o intermolecular sobre la actividad AD1 de TIF2/interacción de CBP. Además, la actividad coactivadora de TIF2 se puede modular con especificidad para células por la eficacia diferencial de sus dos AD y factores que interaccionan con las secuencias por N y C terminal de la función de activación

AD.

Vale la pena señalar que el núcleo de AD1 (TIF2.32) por sí mismo es un agente de unión de CBP y transactivador muy débil y requiere secuencias circundantes adicionales para generar una superficie totalmente activa (es decir, unión de CBP eficaz). Sin embargo, el análisis mutacional del núcleo de AD1 en el contexto de un fragmento activador fuerte (TIF2.13) revela la importancia crítica para la transactivación y unión de CBP *in vivo* e *in vitro* de tres restos de leucina (FIGURA 10). Estas leucinas pertenecen a un motivo LLxxLxxxL conservado (SEC ID N°: 14) en los tres miembros de la familia coactivadora de TIF2 (FIGURA 9a; Torchia, J. y col., Nature 387: 677-684 (1987)) que es distinto del motivo de la caja de NR LxxLL (SEC ID N°: 12). Notablemente, aunque estas leucinas están incluidas en una hélice α anfipática prevista, la anfifilia no se requiere para la función, puesto que una mutación de los restos hidrófilos (compárese TIF2.13 con TIF2.13 (DQ)) no afecta a la transactivación/unión de CBP.

IF2 puede aparentemente cumplir por lo menos dos funciones de mediador, (i) como un “factor de enlace” entre la función AF-2 de receptores nucleares y CBP por medio de su dominio de activación AD1 y (ii) como un mediador transcripcional a través de una vía o vías independientes de la unión de CBP todavía desconocidas por medio de su función AD2. A día de hoy, no se tiene evidencia de que TIF2 pueda tener una actividad enzimática intrínseca; ninguno de los fragmentos de TIF2 purificados expresados en bacterias, en particular TIF2.1 que se mostró que era totalmente competente en interacciones CBP y NR *in vitro*, exhibió cualquier actividad de histona acetilasa en condiciones en las que GCN45 de levadura purificada expresada en bacterias era altamente activa (los resultados no publicados).

Ejemplo 6: potenciación de TIF2 de actividad AF-2 de NR

La observación de que los activadores transcripcionales animales, tales como el ER humano (Metzger, D. y col., Nature 334: 31-36 (1988)), también son activos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* demostró que los principios básicos del potenciamiento transcripcional se han conservado de la levadura al hombre. Los inventores por tanto investigaron si TIF2 podría potenciar la activación transcripcional por diversas construcciones de NR expresadas en *S. cerevisiae*. Tanto NR como TIF2.1 se expresaron de plásmidos multicopia en la cepa de levadura PL3(α), que contiene un gen indicador URA3 bajo el control de tres elementos de respuesta a estrógenos ((ERE)₃-IJR-A3 Pierrat, B. y col., Gene 119: 237-245 (1992)).

En la levadura, las construcciones hER α se expresaron de los siguientes plásmidos basados en YEp90: HEG0 (hER α , YEp90-HEG0, aminoácidos 1-595), HE15 (YEp90-HE15, aminoácidos 1-282) y HEG19 (YEp90-HEG19, aminoácidos 179-595) (todos en Pierrat, B. y

col., Gene 119: 237-245 (1992)), HE179-338 (YEp90-HE 179-338; Pierrat, B. y col., Gene 143: 193-200 (1994)). Del plásmido multicopia de levadura pBL1 (LeDouarin, B. y col., Nucleic Acids Res. 23: 876-878 (1995b)), que codifica las fusiones ER(F)-epítipo-ER(C) marcado, se expresaron los siguientes plásmidos: ER(C)-RAR(DEF) (pBL1-hRAR α (DEF), aminoácidos 154-462) y ER(C)-RXR(DE) (pBL1-mRXR α (DE), aminoácidos 205-467) (ambos vom Baur, E. y col., EMBO J. 15:10-124 (1996)). TIF2 se expresó en levadura a partir del plásmido multicopia pAS3 (donado por B.LeDouann), que es un derivado de YEp90 que contiene el marcador LEU2. Los transformantes de levadura PL3(α) (Pierrat, B. y col., Gene 119: 237-245 (1992)) se cultivaron exponencialmente en presencia o ausencia de ligando durante aproximadamente cinco generaciones en medio selectivo que contenía uracilo. Los extractos de levadura se prepararon y ensayaron con respecto a la actividad OMP decasa como se ha descrito anteriormente (Pierrat, B. y col., Gene 119: 237-245 (1992)).

Como se esperaba a partir de estudios anteriores (Metzger, Nucl. Acids Res. (1992); Pierrat, B. y col., Gene 119: 237-245 (1992); Pierrat, B. y col., Gene 143: 193-200 (1994)) el ER de longitud total (HEG0) indujo la actividad orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMP Decasa) en un modo dependiente de ligando (FIGURA 11, carriles 1 y 3). Curiosamente, la actividad transcripcional de ER se potenció adicionalmente por coexpresión del fragmento TIF-2.1 (FIGURA 11, compárense los carriles 3 y 4). En ausencia de hormona, TIF2.1 no tuvo efecto significativo en la activación transcripcional inducida por ER (FIGURA 11, compárense los carriles 1 y 2). Se observaron esencialmente los mismos resultados para HEG19 que está desprovisto de la región N terminal A/B, lo que indicó que TIF2 ejerce su efecto en la AF-2 de ER dependiente de ligando (FIGURA 11, carriles 5-8). Por el contrario, ni la actividad de AF-1 de HE15, (que abarca las regiones ER A, B y C; Kumar & Chambon, Cell 55: 145-156 (1988)), ni la actividad AF-2a de la construcción HE179-338 (Pierrat, B. y col., Gene 143: 193-200 (1994)) se estimularon coexpresando TIF2.1 (FIGURA 11, carriles 9-12). Esto concuerda con los resultados obtenidos en células de mamífero y con la observación de que se requiere un LBD intacto para que TIF2.1 interaccione con el ER (Voegel, J. J. y col., EMBOJ. 15: 3667-3675 (1996)).

TIF2.1 también estimuló la actividad AF-2 de la región RXR α (DEF) unida a ligando en levadura (FIGURA 11, compárense carriles 19 y 20). Esta potenciación fue dependiente de ligando; no se observó activación por medio de la región RXR α (DEF) cuando la quimera ER(C)-RXR α (DEF) se coexpresó con Ten2-1 en ausencia de ligando (FIGURA 11, compárense carriles 18 y 20). De nuevo estas observaciones son paralelas a las realizadas en células HeLa y Cos-1 (véase FIGURA 12c).

Sorprendentemente, incluso en ausencia de ligando y a diferencia de las observaciones

realizadas con ER y RXR α , TIF2.1 potenció muy eficazmente la transactivación por el LBD de RAR α (FIGURA 11, carriles 13 y 14). La adición de ácido retinoico adicionalmente incrementó esta activación transcripcional (FIGURA 11, carriles 14 y 16). Nótese que, como se ha indicado previamente (Heery, D. M. y col., Nature 387: 733-736 (1997)), AF-2 tanto de RAR α como de RXR α por sí solas activaron pobremente la transcripción del indicador URA3.

La potenciación de la actividad AF-2 que fue particularmente fuerte en células de levadura, también se ha observado recientemente para GRIP1, el homólogo de ratón de TIF2 (Hong, H. y col., Mol. Cell. Biol. 17: 2735-2744 (1997)). Estas observaciones sugieren que las células de levadura contienen coactivadores que sólo imitan pobremente la acción de los coactivadores de NR de mamíferos. Como las células de levadura aparentemente no contienen un homólogo de CBP, será interesante investigar qué factores de levadura median en la actividad de TIF2. Nótese en este sentido que GAL-TIF2.1 es un transactivador fuerte en levadura (resultados no publicados).

Curiosamente, la expresión de TIF2 en levadura llevó a una estimulación marcada de la transactivación por el ER(C)-RAR α (DEF), no unido a ligando, que no se observó con LBD de ER o RXR α no unidas a ligando. Los estudios estructurales han revelado que la unión del ligando da como resultado un cambio conformacional del LBD, que genera la superficie o las superficies para unión de coactivador (Renaud, J. P. y col., Nature 378: 681-689 (1995)). El presente resultado, por lo tanto, sugiere que un nivel alto de coactivadores podría dirigir en ausencia de ligando el LBD de algunos receptores a una conformación de tipo holo-LBD, dando lugar por lo tanto a actividad transcripcional independiente de ligando. Por analogía, se podría especular que los altos niveles de correpresores podrían "bloquear" los LBD de NR en la conformación apo-LBD. Sería por lo tanto interesante investigar si los niveles de correpressores podrían conducir a actividad constitutiva (incluso en presencia de antagonistas) o por el contrario a la ausencia de inducción de receptores nucleares en algunas enfermedades.

Ejemplo 7: inhibición de NID de TIF2 de actividad AF-2 de NR

La sobreexpresión del fragmento de TIF2.1 que contiene tanto la función de activación NID como AD1, estimula la actividad AF-2 de ER del LBD de ER transitoriamente en células Cos-1 (FIGURA 12a, carriles 2 y 3; Voegel, J. J. y col., EMBO J. 15: 3667-3675 (1996)). Que esta estimulación se debió a la interacción directa entre LBD de ER y NID de TIF2, se sugirió fuertemente por la observación de que la sobreexpresión del mutante TIF2.5 que contiene el NID aislado, pero carece de AD1 (véase FIGURA 7a) evitó el efecto estimulador de TIF2.1 (FIGURA 12a), compárense los carriles 3 y 4). Nótese que en ausencia de TIF2.1, la sobreexpresión de TIF2.5 también disminuyó la transactivación por la AF-2 de ER que estuvo

mediado probablemente a través de coactivadores endógenos de Cos-1 (FIGURA 12a, compárese el carril 4 con el carril 2), lo que sugiere por lo tanto que estos mediadores de Cos-1 corresponden a TIF2 endógenos o interaccionan con los holo-LBD de ER a través de superficies que son idénticas a, o en las inmediaciones de, la superficie de interacción de NID de TIF2.

Los investigadores indicaron anteriormente una interacción dependiente de agonista de TIF2 con LBD de RAR y RXR, que fue dependiente de la integridad del núcleo de AD de AF-2 de NR, pero no observaron un efecto estimulador de TIF2 en la activación de la transcripción de un indicador (17m)₅-Globina-promotor-CAT por proteínas de fusión GAL-RAR LBD o GAL-RXR LBD (Voegel, J. J. y col., EMBO J. 15: 3667-3675 (1996)). Puesto que este fallo es probable que se debiera a la presencia de cantidades suficientes de mediadores endógenos para conseguir transactivación máxima a partir de este gen indicador, los investigadores modificaron las condiciones de transfección y usaron una construcción indicadora que portaba un promotor mínimo. Una actividad estimuladora de TIF2 y TIF2.1 clara se observó para AF2 de RXR α en células HeLa y Cos-1 cuando se usó el indicador (17m)₅-TATA-CAT (FIGURA 12c, compárense carriles 3-6 y 11-14). Este efecto estimulador fue menos marcado con AF-2 de RAR α y se pudo observar de manera reproducible sólo con el fragmento TIF2.1 en células Cos-1 (FIGURA 12d, compárese carril 10 con carriles 13 y 14; nótese que TIF2.1 se expresa a niveles >10 veces mayores que TIF2; datos no mostrados). Los plásmidos indicadores (17m)₅-TATA-CAT (May, M. y col., EMBO J. 15: 3093-3104 (1996)) y 17M5-G/CAT ((17m)₅- β -globina-CAT; Durand, B. y col., EMBO J. 13: 5370-5382 (1994)) cada uno contiene cinco copias del elemento de respuesta de GAL4 delante de un motivo TATA simple o del promotor de β -globina, respectivamente, cadena arriba del gen indicador CAT.

Suponiendo que TIF2 o los coactivadores que reconocen la superficie de interacción de TIF2 en LBD de NR, generalmente median en la función AF-2 de NR, el NID que contiene TIF2.5 debería ejercer su actividad negativa dominante no sólo en ER, sino también en otros NR, independientemente del contexto celular. Por tanto los investigadores analizaron el efecto de TIF2.5 en la actividad AF-2 de ER, RXR α y RARE α en células HeLa y Cos-1 (FIGURAS 12b-d). En todos los casos, la expresión de TIF2.5 llevó a una inhibición dependiente de dosis de la actividad AF-2 de NR, lo que indicó que los mediadores presentes endógenamente estaban superados por competición por NID de TIF2 sobreexpresado aislado y lo que sugirió fuertemente que TIF2 o factores intermediarios transcripcionales que reconocen las mismas superficies o superficies solapantes median en la actividad AF-2 de NR en estas células transfectadas (FIGURAS 12b-d, compárese carril 2 con carriles 7 y 8; carril 10 con carriles 15 y 16).

Es importante señalar que los presentes datos demuestran que TIF2 interacciona con NR a través de una superficie (NID) que es crítica para la actividad AF-2 de NR, puesto que la expresión de TIF2.5 que abarca el NID bloqueó la actividad inducida por ligando de todos los AF-2 de NR ensayados. Esta observación que claramente establece que, al menos en células transfectadas, TIF2 u otros coactivadores que interaccionan con una superficie holo-LBD solapante, si no idéntica, son esenciales para mediar en la función de activación AF-2 de NR. Esto es coherente con la presencia de tres motivos de cajas de NR en el NID de TIF2 y de al menos un motivo de caja de NR LxxLL conservado (SEC ID N°: 12) en todos los coactivadores descritos hasta la fecha.

10 La presente invención también se caracteriza por los siguientes elementos:

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como codifica el ADNc contenido en el N° de Depósito ATCC 97612;
- (c) un polinucleótido que codifica un fragmento de polipéptido TIF2 que comprende los aminoácidos 624-869 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);
- 20 (d) un polinucleótido que codifica un fragmento de polipéptido TIF2 que comprende los aminoácidos 624-1131 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);
- (e) un polinucleótido que codifica un fragmento de polipéptido TIF2 que comprende los aminoácidos 1010-1131 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);
- 25 (f) un polinucleótido que codifica un fragmento de polipéptido TIF2 que comprende los aminoácidos 1288-1464 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);
- 30 (g) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los polinucleótidos de (a)-(f);
- (h) un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas con cualquiera de los polinucleótidos de (a)-(g) o el complemento de los mismos;
- 35 (i) un fragmento polinucleotídico de cualquiera de los polinucleótidos (a)-(h),

siendo dicho fragmento de al menos 15 pb de longitud; y

(j) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los polinucleótidos (a)-(i).

5

2. La molécula de ácido nucleico aislada del elemento 1, en la que dicho polinucleótido es ADN.

3. La molécula de ácido nucleico aislada del elemento 1, en la que dicho polinucleótido es ARN.

4. La molécula de ácido nucleico aislada del elemento 1, en la que dicho polinucleótido codifica un fragmento de polipéptido TIF2 citoplasmático.

10

5. La molécula de ácido nucleico aislada del elemento 4, en la que dicho polipéptido TIF2 se selecciona del grupo que consiste en TIF2.1, TIF2.2, TIF2.3, TIF2.4, TIF2.5, TIF2.6, TIF2.7, TIF2.8, TIF2.9, y TIF2.12.

6. Un procedimiento para fabricar un vector recombinante que comprende la inserción de la molécula de ácido nucleico aislada del elemento 1 en un vector.

15

7. Un vector recombinante producido por el procedimiento del elemento 6.

8. Un procedimiento para fabricar una célula huésped recombinante que comprende introducir el vector recombinante del elemento 7 en una célula huésped.

9. Una célula huésped recombinante producida por el procedimiento del elemento 8.

20

10. Un procedimiento recombinante para producir un polipéptido, que comprende el cultivo de la célula huésped recombinante del elemento 9.

11. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos del polipéptido TIF2 que comprende la secuencia de aminoácidos completa como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);

25

(b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 624-869 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);

(c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 624-1131 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);

30

(d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 1010-1131 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);

(e) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 1288-1464 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);

(f) un polipéptido que es al menos el 90 % idéntico a cualquiera de los polipéptidos de (a)-(e);

35

(g) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los

restos 641-645 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2);

(h) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 690-694 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2); y

(i) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 745-749 como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2).

5

12. El polipéptido aislado del elemento 11, en el que dicho polinucleótido es un fragmento de polipéptido TIF2 citoplasmático.

13. El polipéptido aislado del elemento 12, en el que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en TIF2.1, TIF2.2, TIF2.3, TIF2.4, TIF2.5, TIF2.6, TIF2.7, TIF2.8, TIF2.9, y TIF2.12.

10

14. Un procedimiento de exploración para identificar un antagonista del receptor nuclear (NR), que comprende:

(a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligando NR (LBD) y un polipéptido que comprende un factor intermediario transcripcional 2 (TIF-2) o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho LBD de NR y son capaces de activar la transcripción;

15

(b) administrar un antagonista candidato a dicha célula y

20

(c) determinar si dicho antagonista candidato reduce: (1) la unión de TIF-2 o fragmento de TIF-2 al AF-2 de dicho LBD de NR en comparación con dicha unión en ausencia de dicho antagonista candidato o (2) transactivación mediada por AF-2 de LBD de NR estimulada por TIF2 o fragmento de TIF2 en comparación con dicha transactivación en ausencia de dicho antagonista candidato.

25

15. Un procedimiento de exploración para identificar un agonista de receptor nuclear (NR), que comprende:

(a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligando NR (LBD) y un polipéptido que comprende factor intermediario transcripcional 2 (TIF-2) o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho LBD de NR;

30

(b) administrar un agonista candidato a dicha célula, y

(c) determinar si dicho antagonista candidato potencia: (1) la unión de TIF-2 o fragmento de TIF-2 a la AF-2 de dicho LBD de NR en comparación con dicha

35

unión en ausencia de dicho agonista candidato o (2) transactivación mediada por AF-2 de LBD de NR estimulada por TIF2 o fragmento de TIF2 en comparación con dicha transactivación en ausencia de dicho agonista candidato.

- 5 16. El procedimiento del elemento 14, en el que dicha célula huésped expresa adicionalmente un gen indicador.
17. El procedimiento del elemento 15, en el que dicha célula huésped expresa adicionalmente un gen indicador.
- 10 18. El procedimiento del elemento 14, en el que dicha célula huésped expresa un polipéptido que comprende un LBD de NR y GAL4.
19. El procedimiento del elemento 15, en el que dicha célula huésped expresa un polipéptido que comprende un LBD de NR y GAL4.
20. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido aislado de acuerdo con el elemento 11.

15

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 20 (i) SOLICITANTE: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÈ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE
101 rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
Francia
- 25 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3 rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 16
Francia
- 30 UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
4 rue Blaise Pascal, BP 1032F
67070 Strasbourg Cedex
Francia
- 35 BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Route 206 & Provinceline Road
Princeton, Nueva Jersey 08543-4000

Estados Unidos de América

INVENTORES: Chambon, Pierre

Gronemeyer, Hinrich

Voegel, Johannes

5

Lutz, Yves

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Factor intermediario transcripcional-2

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 14

(iv) DIRECCIÓN POSTAL:

10

(A) DESTINATARIO: Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C.

(B) CALLE: 1100 New York Avenue, NW, Suite 600

(C) CIUDAD: Washington

(D) ESTADO: DC

(E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS

15

(F) CÓDIGO POSTAL: 20005-3934

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

20

(A) TIPO DE SOPORTE: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

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

(D) SOFTWARE: PatentIn Release N° 1.0, Versión N° 1.30

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

25

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: A asignar

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: Adjunta

(C) CLASIFICACIÓN:

30

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/021.247

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12-JUL-1996

35

(viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Steffe, Eric K.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.688

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 1383.013PC01/EKS

5

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: 207-371-2600

(B) TELEFAX: 202-371-2540

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 6156 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICAS

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 163..4554

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 1

GCGCGCCGCA	GCCTCGGCTA	CAGCTTCGGC	GGCGAAGGTC	AGCGCCGACG	GCAGCCGGCA	60
CCTGACGGCG	TGACCGACCC	GAGCCGATTT	CTCTTGGATT	TGGCTACACA	CTTATAGATC	120
TTCTGCACTG	TTTACAGGCA	CAGTTGCTGA	TATGTGTTCA	AG ATG AGT GGG ATG		174
				Met Ser Gly Met		
				1		
GGA GAA AAT ACC TCT GAC CCC TCC AGG GCA GAG ACA AGA AAG CGC AAG	222					
Gly Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Arg Ala Glu Thr Arg Lys Arg Lys						
5 10 15 20						
GAA TGT CCT GAC CAA CTT GGA CCC AGC CCC AAA AGG AAC ACT GAA AAA	270					
Glu Cys Pro Asp Gln Leu Gly Pro Ser Pro Lys Arg Asn Thr Glu Lys						
25 30 35						
CGT AAT CGT GAA CAG GAA AAT AAA TAT ATA GAA GAA CTT GCA GAG TTG	318					
Arg Asn Arg Glu Gln Glu Asn Lys Tyr Ile Glu Glu Leu Ala Glu Leu						
40 45 50						
ATT TTT GCA AAT TTT AAT GAT ATA GAC AAC TTT AAC TTC AAA CCT GAC	366					
Ile Phe Ala Asn Phe Asn Asp Ile Asp Asn Phe Asn Phe Lys Pro Asp						
55 60 65						
AAA TGT GCA ATC TTA AAA GAA ACT GTG AAG CAA ATT CGT CAG ATC AAA	414					
Lys Cys Ala Ile Leu Lys Glu Thr Val Lys Gln Ile Arg Gln Ile Lys						
70 75 80						
GAA CAA GAG AAA GCA GCA GCT GCC AAC ATA GAT GAA GTG CAG AAG TCA	462					

Glu	Gln	Glu	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Asp	Glu	Val	Gln	Lys	Ser		
85					90					95					100		
GAT	GTA	TCC	TCT	ACA	GGG	CAG	GGT	GTC	ATC	GAC	AAG	GAT	GCG	CTG	GGG		510
Asp	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Ile	Asp	Lys	Asp	Ala	Leu	Gly		
				105					110					115			
CCT	ATG	ATG	CTT	GAG	GCC	CTT	GAT	GGG	TTC	TTC	TTT	GTA	GTG	AAC	CTG		558
Pro	Met	Met	Leu	Glu	Ala	Leu	Asp	Gly	Phe	Phe	Phe	Val	Val	Val	Asn	Leu	
			120					125					130				
GAA	GGC	AAC	GTT	GTG	TTT	GTG	TCA	GAG	AAT	GTG	ACA	CAG	TAT	CTA	AGG		606
Glu	Gly	Asn	Val	Val	Phe	Val	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Gln	Tyr	Leu	Arg		
		135					140					145					
TAT	AAC	CAA	GAA	GAG	CTG	ATG	AAC	AAA	AGT	GTA	TAT	AGC	ATC	TTG	CAT		654
Tyr	Asn	Gln	Glu	Glu	Leu	Met	Asn	Lys	Ser	Val	Tyr	Ser	Ile	Leu	His		
	150					155					160						
GTT	GGG	GAC	CAC	ACG	GAA	TTT	GTC	AAA	AAC	CTG	CTG	CCA	AAG	TCT	ATA		702
Val	Gly	Asp	His	Thr	Glu	Phe	Val	Lys	Asn	Leu	Leu	Pro	Lys	Ser	Ile		
165					170					175					180		
GTA	AAT	GGG	GGA	TCT	TGG	TCT	GGC	GAA	CCT	CCG	AGG	CGG	AAC	AGC	CAT		750
Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Arg	Arg	Asn	Ser	His		
				185					190					195			
ACC	TTC	AAT	TGT	CGG	ATG	CTG	GTA	AAA	CCT	TTA	CCT	GAT	TCA	GAA	GAG		798
Thr	Phe	Asn	Cys	Arg	Met	Leu	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu		
			200					205					210				
GAG	GGT	CAT	GAT	AAC	CAG	GAA	GCT	CAT	CAG	AAA	TAT	GAA	ACT	ATG	CAG		846
Glu	Gly	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ala	His	Gln	Lys	Tyr	Glu	Thr	Met	Gln		
		215					220					225					
TGC	TTC	GCT	GTC	TCT	CAA	CCA	AAG	TCC	ATC	AAA	GAA	GAA	GGA	GAA	GAT		894
Cys	Phe	Ala	Val	Ser	Gln	Pro	Lys	Ser	Ile	Lys	Glu	Glu	Gly	Glu	Asp		
	230					235					240						
TTG	CAG	TCC	TGC	TTG	ATT	TGC	GTG	GCA	AGA	AGA	GTT	CCC	ATG	AAG	GAA		942
Leu	Gln	Ser	Cys	Leu	Ile	Cys	Val	Ala	Arg	Arg	Val	Pro	Met	Lys	Glu		
245					250					255					260		
AGA	CCA	GTT	CTT	CCC	TCA	TCA	GAA	AGT	TTT	ACT	ACT	CGC	CAG	GAT	CTC		990
Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Ser	Phe	Thr	Thr	Arg	Gln	Asp	Leu		
				265					270					275			
CAA	GGC	AAG	ATC	ACG	TCT	CTG	GAT	ACC	AGC	ACC	ATG	AGA	GCA	GCC	ATG		1038
Gln	Gly	Lys	Ile	Thr	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Met	Arg	Ala	Ala	Met		
			280					285					290				
AAA	CCA	GGC	TGG	GAG	GAC	CTG	GTA	AGA	AGG	TGT	ATT	CAG	AAG	TTC	CAT		1086
Lys	Pro	Gly	Trp	Glu	Asp	Leu	Val	Arg	Arg	Cys	Ile	Gln	Lys	Phe	His		
		295					300					305					
GCG	CAG	CAT	GAA	GGA	GAA	TCT	GTG	TCC	TAT	GCT	AAG	AGG	CAT	CAT	CAT		1134
Ala	Gln	His	Glu	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Tyr	Ala	Lys	Arg	His	His	His		

310		315		320		
GAA GTA CTG AGA CAA GGA TTG GCA TTC AGT CAA ATC TAT CGT TTT TCC						1182
Glu Val Leu Arg Gln Gly Leu Ala Phe Ser Gln Ile Tyr Arg Phe Ser						
325		330		335		340
TTG TCT GAT GGC ACT CTT GTT GCT GCA CAA ACG AAG AGC AAA CTC ATC						1230
Leu Ser Asp Gly Thr Leu Val Ala Ala Gln Thr Lys Ser Lys Leu Ile						
		345		350		355
CGT TCT CAG ACT ACT AAT GAA CCT CAA CTT GTA ATA TCT TTA CAT ATG						1278
Arg Ser Gln Thr Thr Asn Glu Pro Gln Leu Val Ile Ser Leu His Met						
		360		365		370
CTT CAC AGA GAG CAG AAT GTG TGT GTG ATG AAT CCG GAT CTG ACT GGA						1326
Leu His Arg Glu Gln Asn Val Cys Val Met Asn Pro Asp Leu Thr Gly						
		375		380		385
CAA ACG ATG GGG AAG CCA CTG AAT CCA ATT AGC TCT AAC AGC CCT GCC						1374
Gln Thr Met Gly Lys Pro Leu Asn Pro Ile Ser Ser Asn Ser Pro Ala						
		390		395		400
CAT CAG GCC CTG TGC AGT GGG AAC CCA GGT CAG GAC ATG ACC CTC AGT						1422
His Gln Ala Leu Cys Ser Gly Asn Pro Gly Gln Asp Met Thr Leu Ser						
		405		410		420
AGC AAT ATA AAT TTT CCC ATA AAT GGC CCA AAG GAA CAA ATG GGC ATG						1470
Ser Asn Ile Asn Phe Pro Ile Asn Gly Pro Lys Glu Gln Met Gly Met						
		425		430		435
CCC ATG GGC AGG TTT GGT GGT TCT GGG GGA ATG AAC CAT GTG TCA GGC						1518
Pro Met Gly Arg Phe Gly Gly Ser Gly Gly Met Asn His Val Ser Gly						
		440		445		450
ATG CAA GCA ACC ACT CCT CAG GGT AGT AAC TAT GCA CTC AAA ATG AAC						1566
Met Gln Ala Thr Thr Pro Gln Gly Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Met Asn						
		455		460		465
AGC CCC TCA CAA AGC AGC CCT GGC ATG AAT CCA GGA CAG CCC ACC TCC						1614
Ser Pro Ser Gln Ser Ser Pro Gly Met Asn Pro Gly Gln Pro Thr Ser						
		470		475		480
ATG CTT TCA CCA AGG CAT CGC ATG AGC CCT GGA GTG GCT GGC AGC CCT						1662
Met Leu Ser Pro Arg His Arg Met Ser Pro Gly Val Ala Gly Ser Pro						
		485		490		495
CGA ATC CCA CCC AGT CAG TTT TCC CCT GCA GGA AGC TTG CAT TCC CCT						1710
Arg Ile Pro Pro Ser Gln Phe Ser Pro Ala Gly Ser Leu His Ser Pro						
		505		510		515
GTG GGA GTT TGC AGC AGC ACA GGA AAT AGC CAT AGT TAT ACC AAC AGC						1758
Val Gly Val Cys Ser Ser Thr Gly Asn Ser His Ser Tyr Thr Asn Ser						
		520		525		530
TCC CTC AAT GCA CTT CAG GCC CTC AGC GAG GGG CAC GGG GTC TCA TTA						1806
Ser Leu Asn Ala Leu Gln Ala Leu Ser Glu Gly His Gly Val Ser Leu						
		535		540		545

GGG Gly	TCA Ser	TCG Ser	TTG Leu	GCT Ala	TCA Ser	CCA Pro	GAC Asp	CTA Leu	AAA Lys	ATG Met	GGC Gly	AAT Asn	TTG Leu	CAA Gln	AAC Asn	1854
550						555					560					
TCC Ser	CCA Pro	GTT Val	AAT Asn	ATG Met	AAT Asn	CCT Pro	CCC Pro	CCA Pro	CTC Leu	AGC Ser	AAG Lys	ATG Met	GGA Gly	AGC Ser	TTG Leu	1902
565					570					575					580	
GAC Asp	TCA Ser	AAA Lys	GAC Asp	TGT Cys	TTT Phe	GGA Gly	CTA Leu	TAT Tyr	GGG Gly	GAG Glu	CCC Pro	TCT Ser	GAA Glu	GGT Gly	ACA Thr	1950
				585					590					595		
ACT Thr	GGA Gly	CAA Gln	GCA Ala	GAG Glu	AGC Ser	AGC Ser	TGC Cys	CAT His	CCT Pro	GGA Gly	GAG Glu	CAA Gln	AAG Lys	GAA Glu	ACA Thr	1998
			600					605					610			
AAT Asn	GAC Asp	CCC Pro	AAC Asn	CTG Leu	CCC Pro	CCG Pro	GCC Ala	GTG Val	AGC Ser	AGT Ser	GAG Glu	AGA Arg	GCT Ala	GAC Asp	GGG Gly	2046
			615				620						625			
CAG Gln	AGC Ser	AGA Arg	CTG Leu	CAT His	GAC Asp	AGC Ser	AAA Lys	GGG Gly	CAG Gln	ACC Thr	AAA Lys	CTC Leu	CTG Leu	CAG Gln	CTG Leu	2094
			630				635					640				
CTG Leu	ACC Thr	ACC Thr	AAA Lys	TCT Ser	GAT Asp	CAG Gln	ATG Met	GAG Glu	CCC Pro	TCG Ser	CCC Pro	TTA Leu	GCC Ala	AGC Ser	TCT Ser	2142
645					650					655					660	
TTG Leu	TCG Ser	GAT Asp	ACA Thr	AAC Asn	AAA Lys	GAC Asp	TCC Ser	ACA Thr	GGT Gly	AGC Ser	TTG Leu	CCT Pro	GGT Gly	TCT Ser	GGG Gly	2190
				665					670					675		
TCT Ser	ACA Thr	CAT His	GGA Gly	ACC Thr	TCG Ser	CTC Leu	AAG Lys	GAG Glu	AAG Lys	CAT His	AAA Lys	ATT Ile	TTG Leu	CAC His	AGA Arg	2238
			680					685					690			
CTC Leu	TTG Leu	CAG Gln	GAC Asp	AGC Ser	AGT Ser	TCC Ser	CCT Pro	GTG Val	GAC Asp	TTG Leu	GCC Ala	AAG Lys	TTA Leu	ACA Thr	GCA Ala	2286
			695				700					705				
GAA Glu	GCC Ala	ACA Thr	GGC Gly	AAA Lys	GAC Asp	CTG Leu	AGC Ser	CAG Gln	GAG Glu	TCC Ser	AGC Ser	AGC Ser	ACA Thr	GCT Ala	CCT Pro	2334
	710					715					720					
GGA Gly	TCA Ser	GAA Glu	GTG Val	ACT Thr	ATT Ile	AAA Lys	CAA Gln	GAG Glu	CCG Pro	GTG Val	AGC Ser	CCC Pro	AAG Lys	AAG Lys	AAA Lys	2382
725					730					735					740	
GAG Glu	AAT Asn	GCA Ala	CTA Leu	CTT Leu	CGC Arg	TAT Tyr	TTG Leu	CTA Leu	GAT Asp	AAA Lys	GAT Asp	GAT Asp	ACT Thr	AAA Lys	GAT Asp	2430
				745					750					755		
ATT Ile	GGT Gly	TTA Leu	CCA Pro	GAA Glu	ATA Ile	ACC Thr	CCC Pro	AAA Lys	CTT Leu	GAG Glu	AGA Arg	CTG Leu	GAC Asp	AGT Ser	AAG Lys	2478
			760					765					770			
ACA Gly	GAT Ser	CCT Pro	GCC Pro	AGT Ser	AAC Ser	ACA Ser	AAA Ser	TTA Ser	ATA Ser	GCA Ser	ATG Ser	AAA Ser	ACT Ser	GAG Ser	AAG Ser	2526

Thr	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Met	Lys	Thr	Glu	Lys		
		775					780					785					
GAG	GAG	ATG	AGC	TTT	GAG	CCT	GGT	GAC	CAG	CCT	GGC	AGT	GAG	CTG	GAC	2574	
Glu	Glu	Met	Ser	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Gln	Pro	Gly	Ser	Glu	Leu	Asp		
		790				795					800						
AAC	TTG	GAG	GAG	ATT	TTG	GAT	GAT	TTG	CAG	AAT	AGT	CAA	TTA	CCA	CAG	2622	
Asn	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Leu	Pro	Gln		
805					810					815					820		
CTT	TTC	CCA	GAC	ACG	AGG	CCA	GGC	GCC	CCT	GCT	GGA	TCA	GTT	GAC	AAG	2670	
Leu	Phe	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Asp	Lys		
				825					830					835			
CAA	GCC	ATC	ATC	AAT	GAC	CTC	ATG	CAA	CTC	ACA	GCT	GAA	AAC	AGC	CCT	2718	
Gln	Ala	Ile	Ile	Asn	Asp	Leu	Met	Gln	Leu	Thr	Ala	Glu	Asn	Ser	Pro		
			840					845					850				
GTC	ACA	CCT	GTT	GGA	GCC	CAG	AAA	ACA	GCA	CTG	CGA	ATT	TCA	CAG	AGC	2766	
Val	Thr	Pro	Val	Gly	Ala	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Ser		
		855					860					865					
ACT	TTT	AAT	AAC	CCA	CGA	CCA	GGG	CAA	CTG	GGC	AGG	TTA	TTG	CCA	AAC	2814	
Thr	Phe	Asn	Asn	Pro	Arg	Pro	Gly	Gln	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Pro	Asn		
870						875					880						
CAG	AAT	TTA	CCA	CTT	GAC	ATC	ACA	TTG	CAA	AGC	CCA	ACT	GGT	GCT	GGA	2862	
Gln	Asn	Leu	Pro	Leu	Asp	Ile	Thr	Leu	Gln	Ser	Pro	Thr	Gly	Ala	Gly		
885					890					895					900		
CCT	TTC	CCA	CCA	ATC	AGA	AAC	AGT	AGT	CCC	TAC	TCA	GTG	ATA	CCT	CAG	2910	
Pro	Phe	Pro	Pro	Ile	Arg	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Ser	Val	Ile	Pro	Gln		
				905					910					915			
CCA	GGA	ATG	ATG	GGT	AAT	CAA	GGG	ATG	ATA	GGA	AAC	CAA	GGA	AAT	TTA	2958	
Pro	Gly	Met	Met	Gly	Asn	Gln	Gly	Met	Ile	Gly	Asn	Gln	Gly	Asn	Leu		
			920				925					930					
GGG	AAC	AGT	AGC	ACA	GGA	ATG	ATT	GGT	AAC	AGT	GCT	TCT	CGG	CCT	ACT	3006	
Gly	Asn	Ser	Ser	Thr	Gly	Met	Ile	Gly	Asn	Ser	Ala	Ser	Arg	Pro	Thr		
		935				940						945					
ATG	CCA	TCT	GGA	GAA	TGG	GCA	CCG	CAG	AGT	TCG	GCT	GTG	AGA	GTC	ACC	3054	
Met	Pro	Ser	Gly	Glu	Trp	Ala	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Val	Arg	Val	Thr		
		950				955					960						
TGT	GCT	GCT	ACC	ACC	AGT	GCC	ATG	AAC	CGG	CCA	GTC	CAA	GGA	GGT	ATG	3102	
Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Ala	Met	Asn	Arg	Pro	Val	Gln	Gly	Gly	Met		
965					970					975					980		
ATT	CGG	AAC	CCA	GCA	GCC	AGC	ATC	CCC	ATG	AGG	CCC	AGC	AGC	CAG	CCT	3150	
Ile	Arg	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser	Ile	Pro	Met	Arg	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro		
				985				990						995			
GGC	CAA	AGA	CAG	ACG	CTT	CAG	TCT	CAG	GTC	ATG	AAT	ATA	GGG	CCA	TCT	3198	
Gly	Gln	Arg	Gln	Thr	Leu	Gln	Ser	Gln	Val	Met	Asn	Ile	Gly	Pro	Ser		

1000			1005			1010			
GAA TTA GAG ATG AAC ATG GGG GGA CCT CAG TAT AGC CAA CAA CAA GCT	Glu Leu Glu Met Asn Met Gly Gly Pro Gln Tyr Ser Gln Gln Gln Ala	1015	1020	1025				3246	
CCT CCA AAT CAG ACT GCC CCA TGG CCT GAA AGC ATC CTG CCT ATA GAC	Pro Pro Asn Gln Thr Ala Pro Trp Pro Glu Ser Ile Leu Pro Ile Asp	1030	1035	1040				3294	
CAG GCG TCT TTT GCC AGC CAA AAC AGG CAG CCA TTT GGC AGT TCT CCA	Gln Ala Ser Phe Ala Ser Gln Asn Arg Gln Pro Phe Gly Ser Ser Pro	1045	1050	1055			1060	3342	
GAT GAC TTG CTA TGT CCA CAT CCT GCA GCT GAG TCT CCG AGT GAT GAG	Asp Asp Leu Leu Cys Pro His Pro Ala Ala Glu Ser Pro Ser Asp Glu	1065	1070	1075				3390	
GGA GCT CTC CTG GAC CAG CTG TAT CTG GCC TTG CGG AAT TTT GAT GGC	Gly Ala Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Leu Ala Leu Arg Asn Phe Asp Gly	1080	1085	1090				3438	
CTG GAG GAG ATT GAT AGA GCC TTA GGA ATA CCC GAA CTG GTC AGC CAG	Leu Glu Glu Ile Asp Arg Ala Leu Gly Ile Pro Glu Leu Val Ser Gln	1095	1100	1105				3486	
AGC CAA GCA GTA GAT CCA GAA CAG TTC TCA AGT CAG GAT TCC AAC ATC	Ser Gln Ala Val Asp Pro Glu Gln Phe Ser Ser Gln Asp Ser Asn Ile	1110	1115	1120				3534	
ATG CTG GAG CAG AAG GCG CCC GTT TTC CCA CAG CAG TAT GCA TCT CAG	Met Leu Glu Gln Lys Ala Pro Val Phe Pro Gln Gln Tyr Ala Ser Gln	1125	1130	1135			1140	3582	
GCA CAA ATG GCC CAG GGT AGC TAT TCT CCC ATG CAA GAT CCA AAC TTT	Ala Gln Met Ala Gln Gly Ser Tyr Ser Pro Met Gln Asp Pro Asn Phe	1145	1150	1155				3630	
CAC ACC ATG GGA CAG CGG CCT AGT TAT GCC ACA CTC CGT ATG CAG CCC	His Thr Met Gly Gln Arg Pro Ser Tyr Ala Thr Leu Arg Met Gln Pro	1160	1165	1170				3678	
AGA CCG GGC CTC AGG CCC ACG GGC CTA GTG CAG AAC CAG CCA AAT CAA	Arg Pro Gly Leu Arg Pro Thr Gly Leu Val Gln Asn Gln Pro Asn Gln	1175	1180	1185				3726	
CTA AGA CTT CAA CTT CAG CAT CGC CTC CAA GCA CAG CAG AAT CGC CAG	Leu Arg Leu Gln Leu Gln His Arg Leu Gln Ala Gln Gln Asn Arg Gln	1190	1195	1200				3774	
CCA CTT ATG AAT CAA ATC AGC AAT GTT TCC AAT GTG AAC TTG ACT CTG	Pro Leu Met Asn Gln Ile Ser Asn Val Ser Asn Val Asn Leu Thr Leu	1205	1210	1215			1220	3822	
AGG CCT GGA GTA CCA ACA CAG GCA CCT ATT AAT GCA CAG ATG CTG GCC	Arg Pro Gly Val Pro Thr Gln Ala Pro Ile Asn Ala Gln Met Leu Ala	1225	1230	1235				3870	

CAG AGA CAG AGG GAA ATC CTG AAC CAG CAT CTT CGA CAG AGA CAA ATG Gln Arg Gln Arg Glu Ile Leu Asn Gln His Leu Arg Gln Arg Gln Met 1240 1245 1250	3918
CAT CAG CAA CAG CAA GTT CAG CAA CGA ACT TTG ATG ATG AGA GGA CAA His Gln Gln Gln Gln Val Gln Gln Arg Thr Leu Met Met Arg Gly Gln 1255 1260 1265	3966
GGG TTG AAT ATG ACA CCA AGC ATG GTG GCT CCT AGT GGT ATG CCA GCA Gly Leu Asn Met Thr Pro Ser Met Val Ala Pro Ser Gly Met Pro Ala 1270 1275 1280	4014
ACT ATG AGC AAC CCT CGG ATT CCC CAG GCA AAT GCA CAG CAG TTT CCA Thr Met Ser Asn Pro Arg Ile Pro Gln Ala Asn Ala Gln Gln Phe Pro 1285 1290 1295 1300	4062
TTT CCT CCA AAC TAC GGA ATA AGT CAG CAA CCT GAT CCA GGC TTT ACT Phe Pro Pro Asn Tyr Gln Ile Ser Gln Gln Pro Asp Pro Gly Phe Thr 1305 1310 1315	4110
GGG GCT ACG ACT CCC CAG AGC CCA CTT ATG TCA CCC CGA ATG GCA CAT Gly Ala Thr Thr Pro Gln Ser Pro Leu Met Ser Pro Arg Met Ala His 1320 1325 1330	4158
ACA CAG AGT CCC ATG ATG CAA CAG TCT CAG GCC AAC CCA GCC TAT CAG Thr Gln Ser Pro Met Met Gln Ser Gln Ala Asn Pro Ala Tyr Gln 1335 1340 1345	4206
GCC CCC TCC GAC ATA AAT GGA TGG GCG CAG GGG AAC ATG GGC GGA AAC Ala Pro Ser Asp Ile Asn Gly Trp Ala Gln Gly Asn Met Gly Gly Asn 1350 1355 1360	4254
AGC ATG TTT TCC CAG CAG TCC CCA CCA CAC TTT GGG CAG CAA GCA AAC Ser Met Phe Ser Gln Gln Ser Pro Pro His Phe Gly Gln Gln Ala Asn 1365 1370 1375 1380	4302
ACC AGC ATG TAC AGT AAC AAC ATG AAC ATC AAT GTG TCC ATG GCG ACC Thr Ser Met Tyr Ser Asn Asn Met Asn Ile Asn Val Ser Met Ala Thr 1385 1390 1395	4350
AAC ACA GGT GGC ATG AGC AGC ATG AAC CAG ATG ACA GGA CAG ATC AGC Asn Thr Gly Gly Met Ser Ser Met Asn Gln Met Thr Gly Gln Ile Ser 1400 1405 1410	4398
ATG ACC TCA GTG ACC TCC GTG TCT ACG TCA GGG CTG TCC TCC ATG GGT Met Thr Ser Val Thr Ser Val Ser Thr Ser Gly Leu Ser Ser Met Gly 1415 1420 1425	4446
CCC GAG CAG GTT AAT GAT CCT GCT CTG AGG GGA GGC AAC CTG TTC CCA Pro Glu Gln Val Asn Asp Pro Ala Leu Arg Gly Gly Asn Leu Phe Pro 1430 1435 1440	4494
AAC CAG CTG CCT GGA ATG GAT ATG ATT AAG CAG GAG GGA GAC ACA ACA Asn Gln Leu Pro Gly Met Asp Met Ile Lys Gln Glu Gly Asp Thr Thr 1445 1450 1455 1460	4542
CGG AAA TAT TGC TGACACTGCT GAAGCCAGTT GCTTCTTCAG CTGACCGGGC	4594

Arg Lys Tyr Cys

TCACCTGCTC	AAAACACTTC	CAGTCTGGAG	AGCTGTGTCT	ATTTGTTTCA	ACCCAAGTGA	4654
CCTGCCAGCC	GGTTCTGCTA	GAGCAGACAG	GCCTGGCCCT	GGTTCCCAGG	GTGGCGTCCA	4714
CTCGGCTGTG	GCAGGAGGAG	CTGCCTCTTC	TCTTGACAGT	CTGAAGCTCG	CATCCAGACA	4774
GTCGCTCAGT	CTGTTCCCTG	CATTCACCTT	AGTGCAACTT	AGATCTCTCC	TCCCCAAGTA	4834
AATGTTGACA	GGCCAATTTT	ATACCCATGT	CAGATTGAAT	GTATTTAAAT	GTATGTATTT	4894
AAGGAGAACC	ATGCTCTTGT	TCTGTTCCCTG	TTCGTTTCCA	GACACTGGTT	TCTTGCTTTG	4954
TTTTCCCTGG	CTAACAGTCT	AGTGCCAAAG	ATTAAGATTT	TATCTGGGGG	AAAGAAAAGA	5014
ATTTTTTAAA	AAATTAAACT	AAAGATGTTT	TAAGCTAAAG	CCTGAATTTG	GGATGGAAGC	5074
AGGACAGACA	CCGTGGACAG	CGCTGTATTT	ACAGACACAC	CCAGTGCCTG	AAGACCAACA	5134
AAGTCACAGT	CGTATCTCTA	GAAAGCTCTA	AAGACCATGT	TGGAAAGAGT	CTCCAGTTAC	5194
TGAACAGATG	AAAAGGAGCC	TGTGAGAGGG	CTGTTAACAT	TAGCAAATAT	TTTTTCCTTG	5254
TTTTTTCTTT	GTTAAAACCA	AAC TGTTCA	CCTGAATCAT	GAATTGAGAA	GAAATAATTT	5314
TCATTTCTAA	ATTAAGTCCC	TTTTAGTTTG	ATCAGACAGC	TTGAATCAGC	ATCTCTTCTT	5374
CCCTGTCAGC	CTGACTCTTC	CCTTCCCCTC	TCTCATTTCC	CATACTCCCT	ATTTTCATTC	5434
CTTTTTTAAA	AAATAATATA	AGCTACAGAA	ACCAGGTAAG	CCCTTTATTT	CCTTAAATGT	5494
TTTGCCAGCC	ACTTACCAAT	TGCTAAGTAT	TGAATTTTCA	AAAAAAAAAA	TGCATTTACT	5554
GGCAAGGAGA	AGAGCAAAGT	TAAGGCTTGA	TACCAATCGA	GCTAAGGATA	CCTGCTTTGG	5614
AAGCATGTTT	ATTCTGTTCC	CCAGCAACTC	TGGCCTCCAA	AATGGGAGAA	ACGCCAGTGT	5674
GTTTAAATTG	ATAGCAGATA	TCACGACAGA	TTTAACTCT	GCCATGTGTT	TTTTATTTTG	5734
TTTTTTAGCA	GTGCTGACTA	AGCCGAAGTT	TTGTAAGGTA	CATAAAATCC	AATTTATATG	5794
TAAACAAGCA	ATAATTTAAG	TTGAGAACTT	ATGTGTTTTA	ATGTATAAAT	TTTTGTGAGG	5854
TATACATATT	GTGGAATTGA	CTCAAAAATG	AGGTACTTCA	GTATTAAATT	AGATATCTTC	5914
ATAGCAATGT	CTCCTAAAGG	TGTTTTGTAA	AGGATATCAA	TGCCTTGATT	AGACCTAATT	5974
TGTAGACTTA	AGACTTTTTA	TTTTCTAAAC	CTTGTGATTC	TGCTTATAAG	TCATTTATCT	6034
AATCTATATG	ATATGCAGCC	GCTGTAGGAA	CCAATCTTGG	ATTTTATAT	GTTTATATTC	6094
TTTCTTAATG	AACCTTAGAA	AGACTACATG	TTACTAAGCA	GGCCACTTTT	ATGGTTGTTT	6154
TT						6156

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1464 aminoácidos

5

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

10

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

245				250				255							
Pro	Met	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Ser	Phe	Thr	Thr
			260					265					270		
Arg	Gln	Asp	Leu	Gln	Gly	Lys	Ile	Thr	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Met
		275					280					285			
Arg	Ala	Ala	Met	Lys	Pro	Gly	Trp	Glu	Asp	Leu	Val	Arg	Arg	Cys	Ile
	290					295					300				
Gln	Lys	Phe	His	Ala	Gln	His	Glu	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Tyr	Ala	Lys
305					310					315					320
Arg	His	His	His	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Phe	Ser	Gln	Ile
				325					330					335	
Tyr	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Gly	Thr	Leu	Val	Ala	Ala	Gln	Thr	Lys
			340					345					350		
Ser	Lys	Leu	Ile	Arg	Ser	Gln	Thr	Thr	Asn	Glu	Pro	Gln	Leu	Val	Ile
		355					360					365			
Ser	Leu	His	Met	Leu	His	Arg	Glu	Gln	Asn	Val	Cys	Val	Met	Asn	Pro
	370					375					380				
Asp	Leu	Thr	Gly	Gln	Thr	Met	Gly	Lys	Pro	Leu	Asn	Pro	Ile	Ser	Ser
385					390					395					400
Asn	Ser	Pro	Ala	His	Gln	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Asn	Pro	Gly	Gln	Asp
				405					410					415	
Met	Thr	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asn	Phe	Pro	Ile	Asn	Gly	Pro	Lys	Glu
			420					425					430		
Gln	Met	Gly	Met	Pro	Met	Gly	Arg	Phe	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Met	Asn
		435					440					445			
His	Val	Ser	Gly	Met	Gln	Ala	Thr	Thr	Pro	Gln	Gly	Ser	Asn	Tyr	Ala
	450					455					460				
Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Pro	Ser	Gln	Ser	Ser	Pro	Gly	Met	Asn	Pro	Gly
465					470					475					480
Gln	Pro	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Pro	Arg	His	Arg	Met	Ser	Pro	Gly	Val
				485					490					495	
Ala	Gly	Ser	Pro	Arg	Ile	Pro	Pro	Ser	Gln	Phe	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser
			500					505					510		
Leu	His	Ser	Pro	Val	Gly	Val	Cys	Ser	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	His	Ser
		515					520					525			
Tyr	Thr	Asn	Ser	Ser	Leu	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Gly	His
	530					535					540				
Gly	Val	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Asp	Leu	Lys	Met	Gly

1155	1160	1165	
Arg Met Gln Pro Arg Pro Gly Leu Arg Pro Thr Gly Leu Val Gln Asn 1170	1175	1180	
Gln Pro Asn Gln Leu Arg Leu Gln Leu Gln His Arg Leu Gln Ala Gln 1185	1190	1195	1200
Gln Asn Arg Gln Pro Leu Met Asn Gln Ile Ser Asn Val Ser Asn Val 1205	1210	1215	
Asn Leu Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Thr Gln Ala Pro Ile Asn Ala 1220	1225	1230	
Gln Met Leu Ala Gln Arg Gln Arg Glu Ile Leu Asn Gln His Leu Arg 1235	1240	1245	
Gln Arg Gln Met His Gln Gln Gln Gln Val Gln Gln Arg Thr Leu Met 1250	1255	1260	
Met Arg Gly Gln Gly Leu Asn Met Thr Pro Ser Met Val Ala Pro Ser 1265	1270	1275	1280
Gly Met Pro Ala Thr Met Ser Asn Pro Arg Ile Pro Gln Ala Asn Ala 1285	1290	1295	
Gln Gln Phe Pro Phe Pro Pro Asn Tyr Gly Ile Ser Gln Gln Pro Asp 1300	1305	1310	
Pro Gly Phe Thr Gly Ala Thr Thr Pro Gln Ser Pro Leu Met Ser Pro 1315	1320	1325	
Arg Met Ala His Thr Gln Ser Pro Met Met Gln Gln Ser Gln Ala Asn 1330	1335	1340	
Pro Ala Tyr Gln Ala Pro Ser Asp Ile Asn Gly Trp Ala Gln Gly Asn 1345	1350	1355	1360
Met Gly Gly Asn Ser Met Phe Ser Gln Gln Ser Pro Pro His Phe Gly 1365	1370	1375	
Gln Gln Ala Asn Thr Ser Met Tyr Ser Asn Asn Met Asn Ile Asn Val 1380	1385	1390	
Ser Met Ala Thr Asn Thr Gly Gly Met Ser Ser Met Asn Gln Met Thr 1395	1400	1405	
Gly Gln Ile Ser Met Thr Ser Val Thr Ser Val Ser Thr Ser Gly Leu 1410	1415	1420	
Ser Ser Met Gly Pro Glu Gln Val Asn Asp Pro Ala Leu Arg Gly Gly 1425	1430	1435	1440
Asn Leu Phe Pro Asn Gln Leu Pro Gly Met Asp Met Ile Lys Gln Glu 1445	1450	1455	
Gly Asp Thr Thr Arg Lys Tyr Cys			1460

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 1036 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 3

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

210						215										220
Gly	Lys	Pro	Leu	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	His	Asn	Asn	Asp	Arg	Leu	Ser	
225					230					235					240	
Asp	Gly	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ser	Gln	Thr	Ser	His	Lys	Leu	Val	Gln	Leu	
				245					250					255		
Leu	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Gln	Gln	Leu	Arg	His	Ala	Asp	Ile	Asp	Thr	
			260					265					270			
Ser	Cys	Lys	Asp	Val	Leu	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	
		275					280					285				
Ala	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Cys	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Leu	Thr	
	290					295					300					
Ala	Arg	His	Lys	Ile	Leu	His	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Pro	Ser	
305					310					315					320	
Asp	Ile	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Glu	Pro	Asp	Lys	Lys	Asp	Ser	Ala	Ser	
				325					330					335		
Thr	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Ser	Ser	Ile	Lys	
			340					345					350			
Leu	Glu	Leu	Asp	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Ser	Lys	Asp	His	Gln	Leu	
		355					360					365				
Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Asp	Lys	Asp	Glu	Lys	Asp	Leu	Arg	Ser	Thr	Pro	
	370					375					380					
Asn	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Lys	Lys	Glu	Gln	
385					390					395					400	
Met	Asp	Pro	Cys	Asn	Thr	Asn	Pro	Thr	Pro	Met	Thr	Lys	Ala	Thr	Pro	
				405					410					415		
Glu	Glu	Ile	Lys	Leu	Glu	Ala	Gln	Ser	Gln	Phe	Thr	Ala	Asp	Leu	Asp	
			420					425					430			
Gln	Phe	Asp	Gln	Leu	Leu	Pro	Thr	Leu	Glu	Lys	Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	
		435					440					445				
Gly	Leu	Cys	Glu	Thr	Asp	Arg	Met	Asp	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Thr	
	450					455					460					
Ile	Lys	Ser	Glu	Ile	Thr	Ile	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	
465					470					475					480	
Gln	Ser	Ala	Thr	Ala	Arg	Pro	Thr	Ser	Arg	Leu	Asn	Arg	Leu	Pro	Glu	
				485					490					495		
Leu	Glu	Leu	Glu	Ala	Ile	Asp	Asn	Gln	Phe	Gly	Gln	Pro	Gly	Thr	Gly	
			500					505					510			
Asp	Gln	Ile	Pro	Trp	Thr	Asn	Asn	Thr	Val	Thr	Ala	Ile	Asn	Gln	Ser	

515					520					525					
Lys	Ser	Glu	Asp	Gln	Cys	Ile	Ser	Ser	Gln	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Cys
	530					535					540				
Pro	Pro	Thr	Thr	Val	Glu	Gly	Arg	Asn	Asp	Glu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu
545					550					555					560
Gln	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Ser	Gly	Lys	Asp	Glu	Thr	Glu	Leu	Ala	Glu
				565					570					575	
Leu	Asp	Arg	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu
			580					585						590	
Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Pro	Leu
		595					600					605			
Ile	Met	Glu	Glu	Arg	Pro	Asn	Leu	Tyr	Ser	Gln	Pro	Tyr	Ser	Ser	Pro
	610					615					620				
Phe	Pro	Thr	Ala	Asn	Leu	Pro	Ser	Pro	Phe	Gln	Gly	Met	Val	Arg	Gln
625					630					635					640
Lys	Pro	Ser	Leu	Gly	Thr	Met	Pro	Val	Gln	Val	Thr	Pro	Pro	Arg	Gly
				645					650					655	
Ala	Phe	Ser	Pro	Gly	Met	Gly	Met	Gln	Pro	Arg	Gln	Thr	Leu	Asn	Arg
			660					665						670	
Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Asn	Gln	Leu	Arg	Leu	Gln	Leu	Gln	Gln	Arg	Leu
		675					680					685			
Gln	Gly	Gln	Gln	Gln	Leu	Ile	His	Gln	Asn	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Asn
	690					695					700				
Gln	Phe	Ala	Ala	Thr	Ala	Pro	Val	Gly	Ile	Asn	Met	Arg	Ser	Gly	Met
705					710					715					720
Gln	Gln	Gln	Ile	Thr	Pro	Gln	Pro	Pro	Leu	Asn	Ala	Gln	Met	Leu	Ala
				725					730					735	
Gln	Arg	Gln	Arg	Glu	Leu	Tyr	Ser	Gln	Gln	His	Arg	Gln	Arg	Gln	Leu
			740					745					750		
Ile	Gln	Gln	Gln	Arg	Ala	Met	Leu	Met	Arg	Gln	Gln	Ser	Phe	Gly	Asn
			755				760					765			
Asn	Leu	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Gln	Thr	Gly	Asn	Pro	Arg
	770					775					780				
Leu	Pro	Gln	Gly	Ala	Pro	Gln	Gln	Phe	Pro	Tyr	Pro	Pro	Asn	Tyr	Gly
785					790					795					800
Thr	Asn	Pro	Gly	Thr	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Ser	Pro	Phe	Ser	Gln	Leu
				805					810					815	
Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asn	Arg	Asn	Ser	Met	Val	Ser

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4

5
 Glu Arg Ala Asp Gly Gln Ser Arg Leu His Asp Ser Lys Gly Gln Thr
 1 5 10 15
 Lys Leu Leu Gln Cys
 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:

20
 Gly His Lys Lys Leu Leu Gln Leu Leu Thr Cys Ser Ser His Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Gln Glu Lys His Arg Ile Leu His Lys Leu Leu Gln Asn Gly
 20 25 30
 Asn Asn Ala Leu Leu Arg Tyr Leu Leu Asp Arg Asp Asp Pro Ser Asp
 35 40 45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

Arg Ser Ile Leu Thr Ser Leu Leu Leu Asn Ser Ser
1 5 10

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7:

Phe Asn Val Leu Lys Gln Leu Leu Leu Ser Glu Asn
1 5 10

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

25

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 8:

30

Ser Ala Thr Leu Arg Ser Leu Leu Leu Asn Pro His
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 58 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9

10

```

Leu Arg Asn Ser Leu Asp Asp Leu Leu Gly Pro Pro Ser Asn Ala Glu
1           5           10           15
Gly Gln Ser Asp Glu Arg Ala Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Phe Leu
                20           25           30
Ser Asn Thr Asp Ala Thr Gly Leu Glu Glu Ile Asp Arg Ala Leu Gly
                35           40           45
Ile Pro Glu Leu Val Asn Gln Gly Gln Ala
    50           55
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 64 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10

25

```

AGACCTGTTG AACTTTGCAA AGGCAAGGGC AGTTCCTTTG AGCTGGGCTT ATGACCTTTG      60
ACTC                                             64
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 38 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N^o: 11:

CGGAGGACAG TCCTCCGGCG GCCGCGGTCA CAGTGACC 38

- 15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N^o: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N^o: 12

Leu Xaa Xaa Leu Leu
 1 . 5

- 30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N^o: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 13:

5

```

Leu Xaa Xaa Leu Leu Leu
 1                               5

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 14:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14:

20

```

Leu Leu Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu
 1                               5

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 (a) aminoácidos 1 a 1464 de la SEC ID N^o: 2;
(b) la secuencia de aminoácidos completa tal como ha codificado el ADNc contenido en el N^o de Depósito ATCC 97612;
(c) aminoácidos 624 a 869 de la SEC ID N^o: 2;
(d) aminoácidos 624 a 1131 de la SEC ID N^o: 2;
10 (e) aminoácidos 1410 a 1131 de la SEC ID N^o: 2;
(f) aminoácidos 1288 a 1464 de la SEC ID N^o: 2;
(g) aminoácidos 624 a 1287 de la SEC ID N^o: 2;
(h) aminoácidos 624 a 1179 de la SEC ID N^o: 2;
(i) aminoácidos 624 a 1010 de la SEC ID N^o: 2;
15 (j) aminoácidos 870 a 1179 de la SEC ID N^o: 2;
(k) aminoácidos 1010 a 1179 de la SEC ID N^o: 2;
(l) aminoácidos 940 a 1179 de la SEC ID N^o: 2;
(m) aminoácidos 940 a 1131 de la SEC ID N^o: 2 y
20 (n) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a una cualquiera de (a)-(m);

en el que dicha actividad de TIF2 se selecciona del grupo que consiste en: unión a un receptor nuclear y potenciamiento de la transcripción.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de (n) es al menos el 95 % idéntica a una cualquiera de (a)-(m).

3. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, que es producida por una célula huésped recombinante.

3961 GGACAAGGGTTGAATATGACACCAAGCATGGTGGCTCCTAGTGGTATGCCAGCAACTATGAGCAACCCCTCGGATCCCGAGGCAATGCACAGCAGTTTCATTTCCTCCAAACTACGGA
 G Q G L N M T P S M V A P S G M P A T M S N P R I P Q A N A Q Q F P F P P N Y G
 4081 ATAAGTCAGCAACCTGATCCAGGCTTTACTGGGGCTACGACTCCCAGAGCCCACTTATGTACCCCGAATGGCACATACACAGAGTCCCATGATGCAACAGTCTCAGGCCAACCCAGCC
 I S Q Q P D P G F T G A T T P Q S P L M S P R M A H T Q S P M H Q Q S Q A N P A
 4201 TATCAGGCCCCCTCCGACATAAATGGATGGGCGCAGGGGAACATGGGCGGAACAGCATGTTTTCCAGCAGTCCCACCACACTTTGGGAGCAAGCAAAACACCAGCATGTACAGTAAC
 Y Q A P S D I N G W A Q G N M G G N S M F S Q Q S P P H F G Q Q A N T S M Y S N
 4321 AACATGAACATCAATGTGTCCATGGCGACCAACACAGGTGGCATGAGCAGCATGAACCAGATGACAGGACAGATCAGCATGACCTCAGTGACCTCCGTGTCTACGTGAGGGCTGTCTCC
 N M N I N V S M A T N T G G H S S M N Q M T G Q I S H T S V T S V S T S G L S S
 4441 ATGGGTCCCGAGCAGTTAATGATCCTGCTCTGAGGGGAGGCAACCTGTTCCTCCAAACCAGTGCCTGGAATGGATATGATTAAAGCAGGAGGGAGACACAACACGGAAATATTGCTGACAC
 H G P E Q V N D P A L R G G N L F P N Q L P G M D H I K Q E G D T T R K Y C *
 4561 TGCTGAAGCCAGTTGCTTCTCAGCTGACCGGGCTCACTTGTCTCAAACACTTCCAGTCTGGAGAGCTGTGTCTATTGTTTCAACCCAACTGACCTGCCAGCCGGTCTGTAGAGCAG
 4681 ACAGGCCCTGGCCCTGGTCCAGGGTGGCTCCACTCGGCTGTGGCAGGAGGAGCTGCCCTTCTCTTGACAGTCTGAAGCTCGCATCCAGACAGTCCGTCAGTCTGTTCCCTGCATTCA
 4801 CCTTAGTGCAACTTAGATCTCTCTCCCAAGTAAATGTTGACAGGCCAATTTATACCCATGTCAGATTGAATGATTTAAATGATGATTTAAGGAGAACCATGCTCTGTTCTGTT
 4921 CCTGTTGGTTCAGACACTGGTTCTTGGCTTTGTTCCCTGGCTAACAGTCTAGTGCCAAAGATTAAGATTTTATCTGGGGGAAAGAAAAGAAATTTTTAAAAAATTAACATAAGAT
 5041 GTTTTAAAGCTAAAGCCTGAATTTGGGATGGAAGCAGGACAGACACCCTGGACAGCGCTGTATTTACAGACACACCAGTGCCTGAAGACCAACAAAGTCAAGTCTATCTAGAAAAGC
 5161 TCTAAGACCATGTTGGAAGAGTCTCCAGTTACTGAACAGATGAAAAGGAGCCTGTGAGAGGGCTGTTAACATTAGCAAATATTTTTCTGTTTTTTCTTTGTTAAACCAAACCTGG
 5281 TTCACCTGAATCATGAATTGAGAGAAATAATTTTCATTTCTAAATTAAGTCCCTTTTAGTTTGATCAGACAGCTTGAATCAGCATCTCTCTCCCTGTGAGCCTGACTCTCCCTTCC
 5401 CCTCTCTATCCCATACCTCCCTATTTTTCATTCCTTTTTAAAAAATAATAAGCTACAGAAACCAGGTAAGCCCTTATTTCTTAAATGTTTTGCCAGCCACTTACCAATGTCTAA
 5521 GTATTGAATTTAGAAAAAATGCAATTTACTGGCAAGGAGAGAGCAAGTTAAGGCTTGATACCAATCGAGCTAAGGATACCTGCTTTGGAAGCATGTTTATCTGTCTCCAGCA
 5641 ACTCTGGCCTCCAAAATGGGAGAAACGCCAGTGTGTTAAATTGATAGCAGATATCAGCAGATTTAACCTCTGCGCATGTTTATTATTGTTTTAGCAGTGTGACTAAGCCGA
 5760 AGTTTTGTAAGGTACATAAAATCCAATTTATATGTAACAAGCAATATTTAAGTTGAGAACTTATGTGTTTAAATGTAATAATTTTGTGAGGTATACATATTGTGGAATTGACTCAA
 5881 AATGAGTACTTCAGTATTAATTAAGTATCTTATAGCAATGTCTCCTAAAGGTGTTTTGTAAGGATATCAATGCCTTGATTAGACCTAATTTGTAGACTTAAGACTTTTTATTTTCT
 6001 AAACCTTGATTCCTCTATAAGTCAATTTATCTAATCTATATGATATGCAGCCGCTGAGGAACCAATCTTGATTTTTATATGTTTATATCTTCTTCTAATGAACCTTAGAAAGACTA
 6121 CATGTTACTAAGCAGGCCACTTTTATGTTGTTTT

FIG. 1B

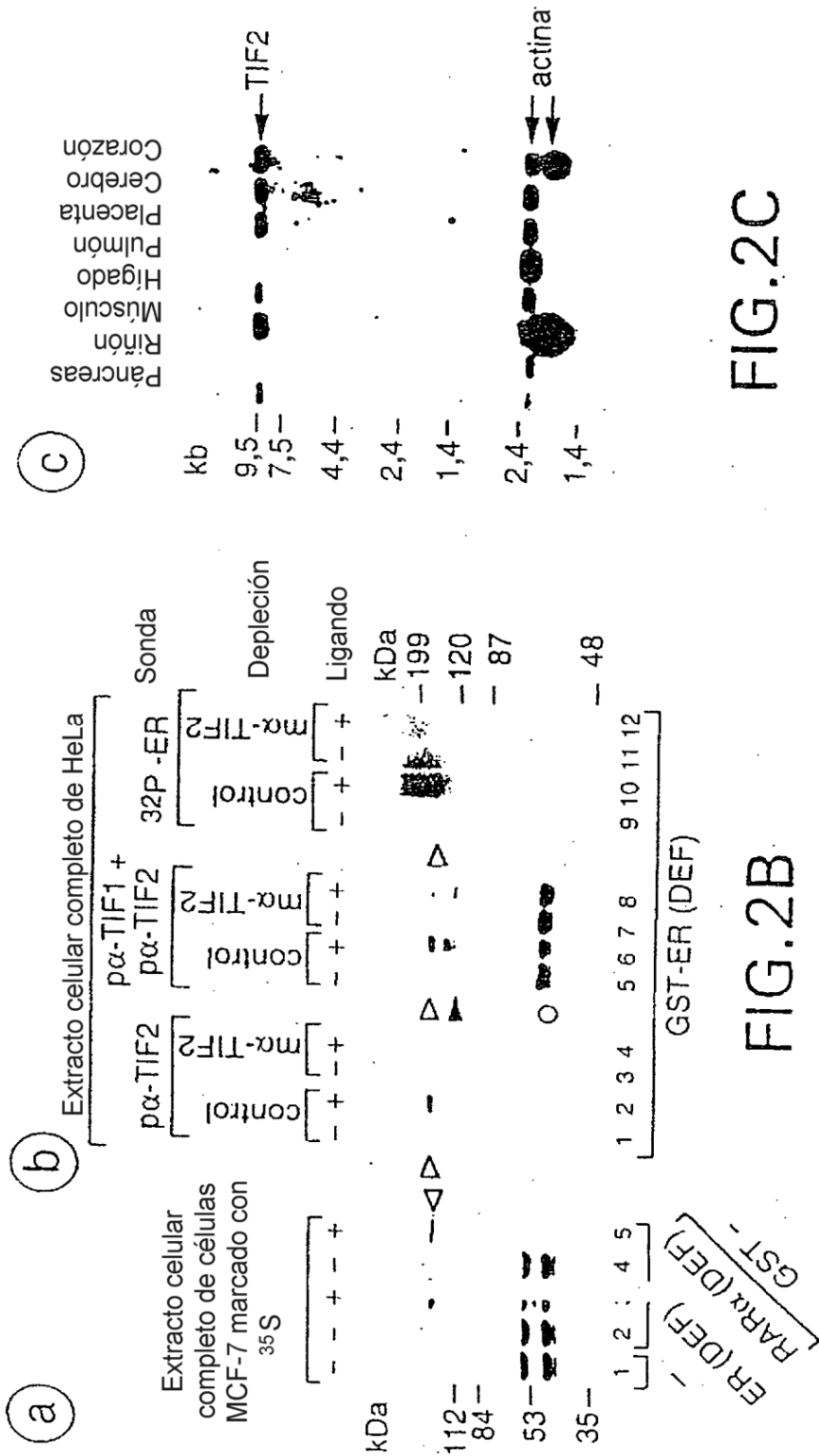


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

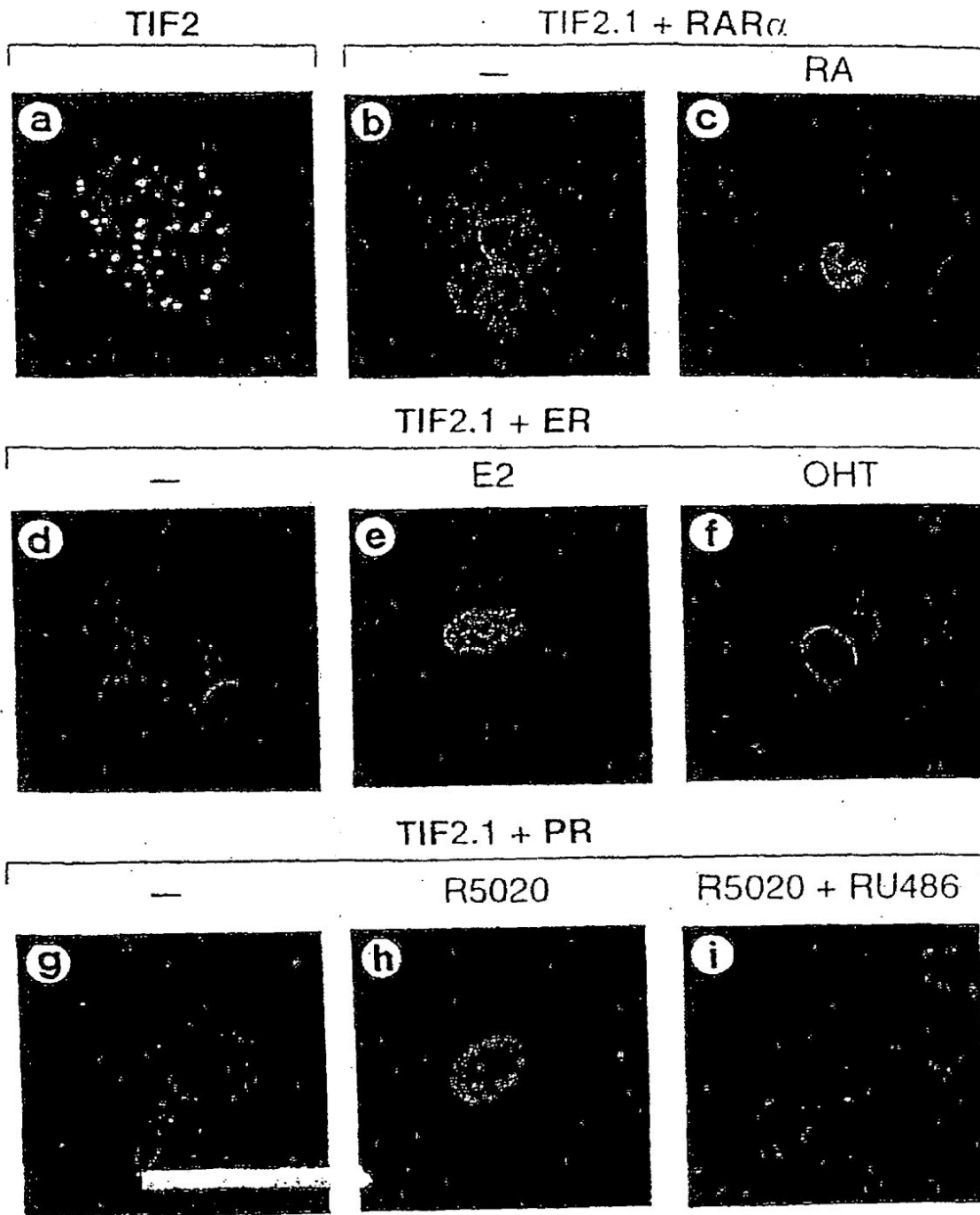


FIG. 4A-I

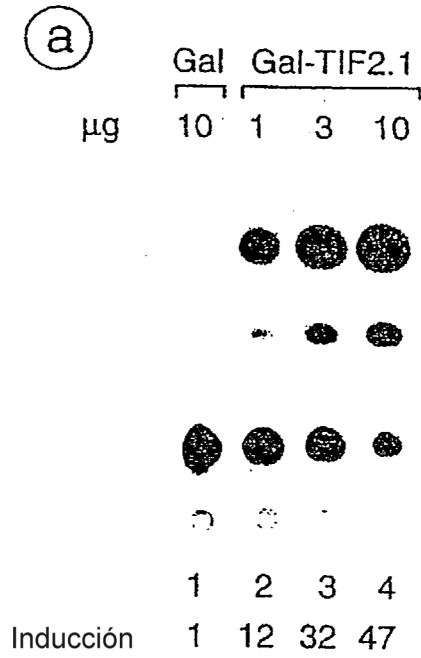


FIG.5A

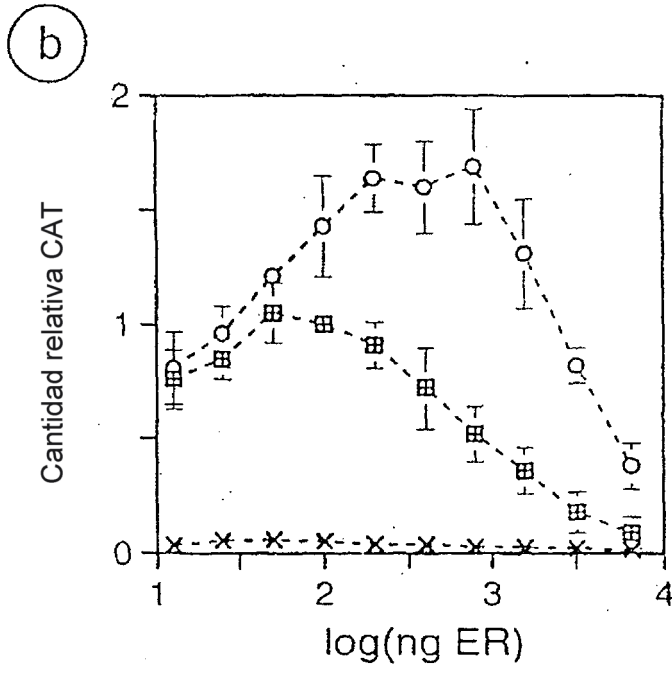


FIG. 5B

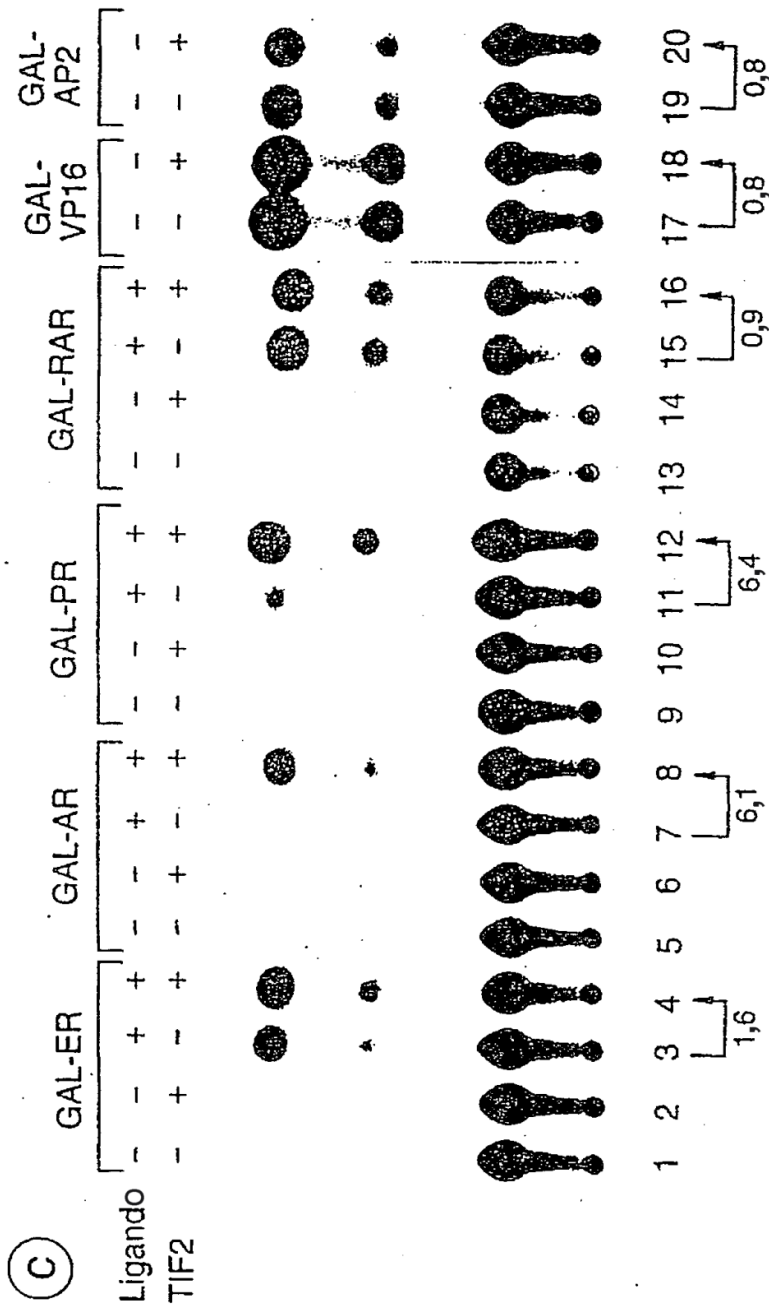


FIG.5C

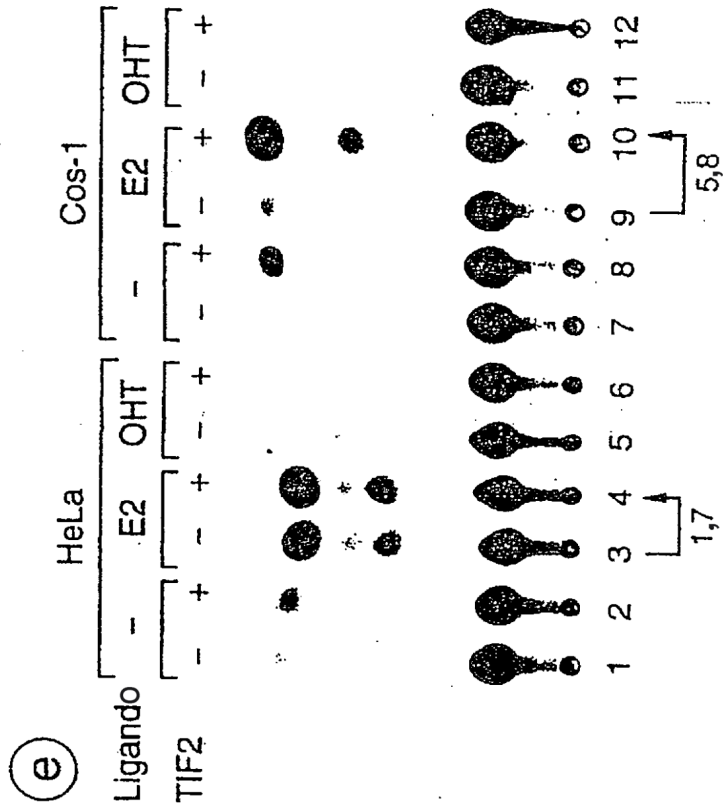
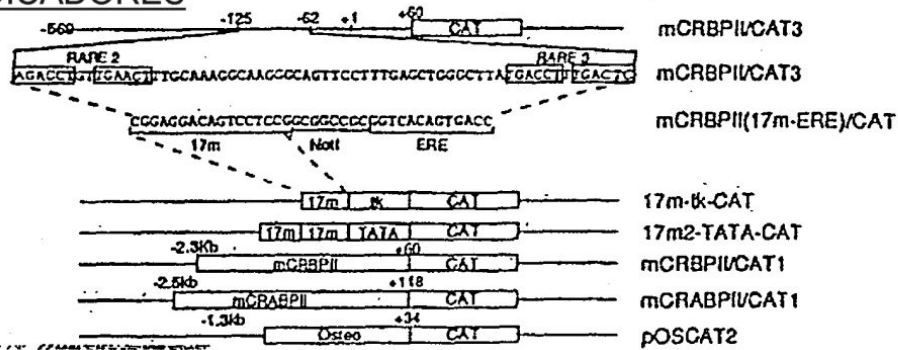


FIG.5E

(A) INDICADORES



(B) RECEPTORES

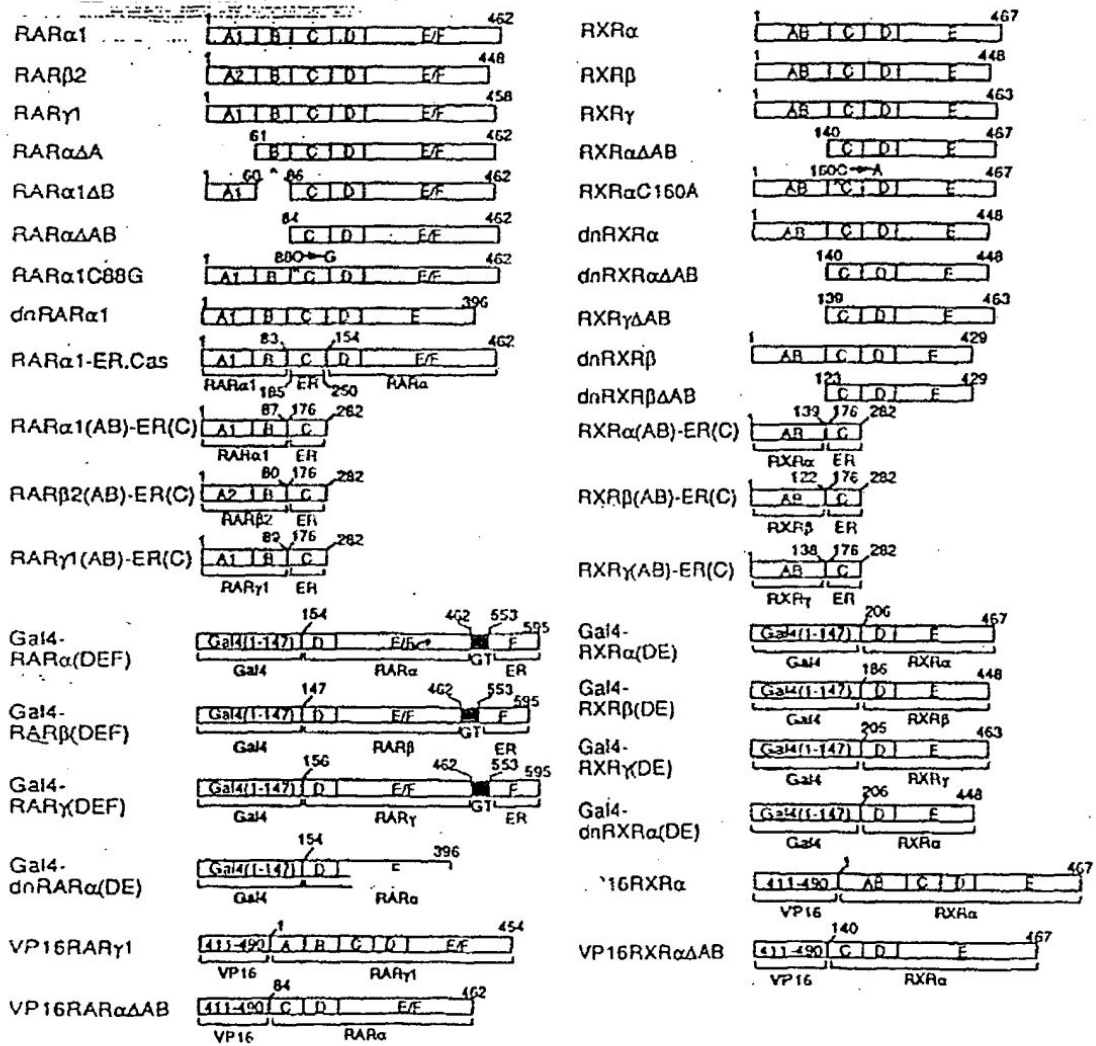


FIG. 6A-B

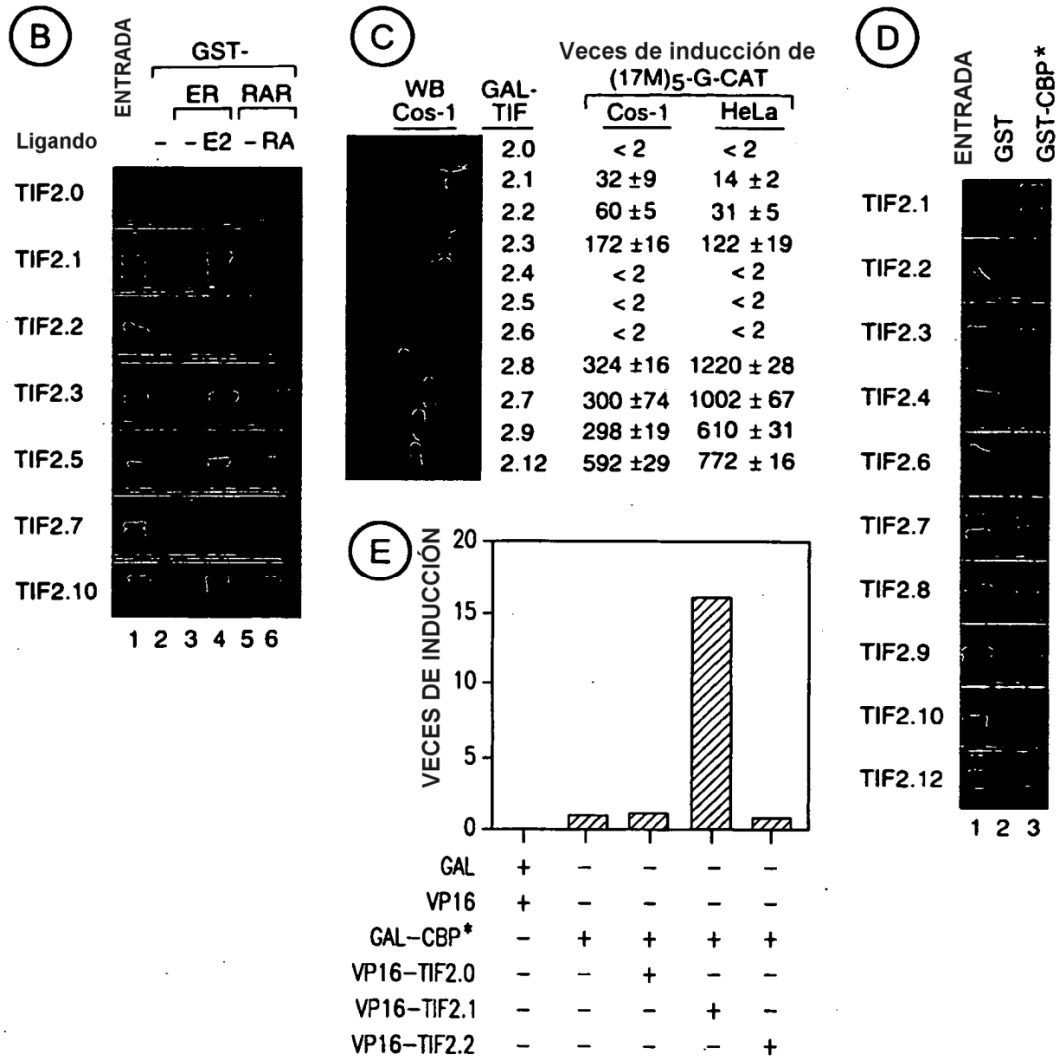


FIG.7B-E

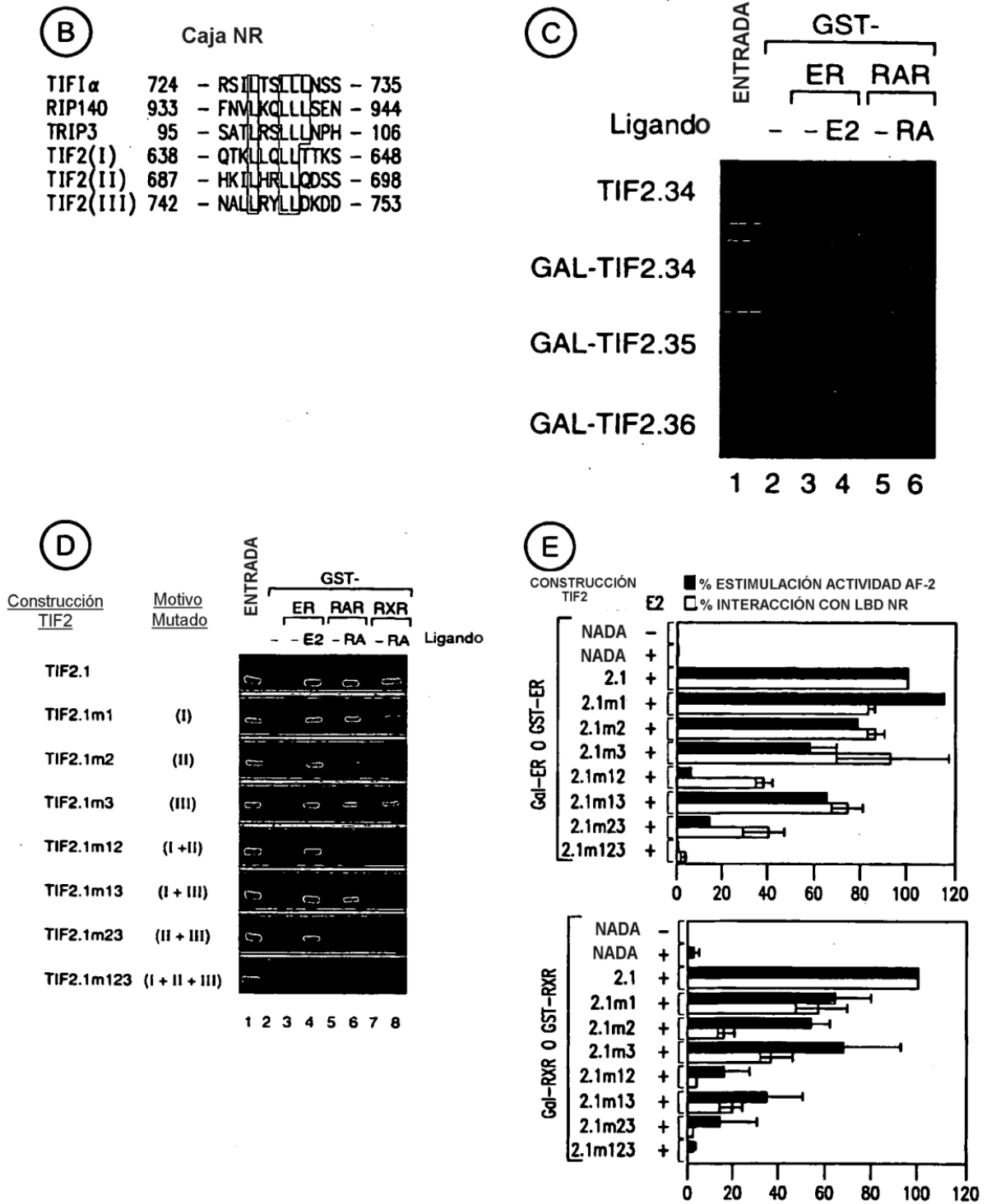


FIG.8B-E

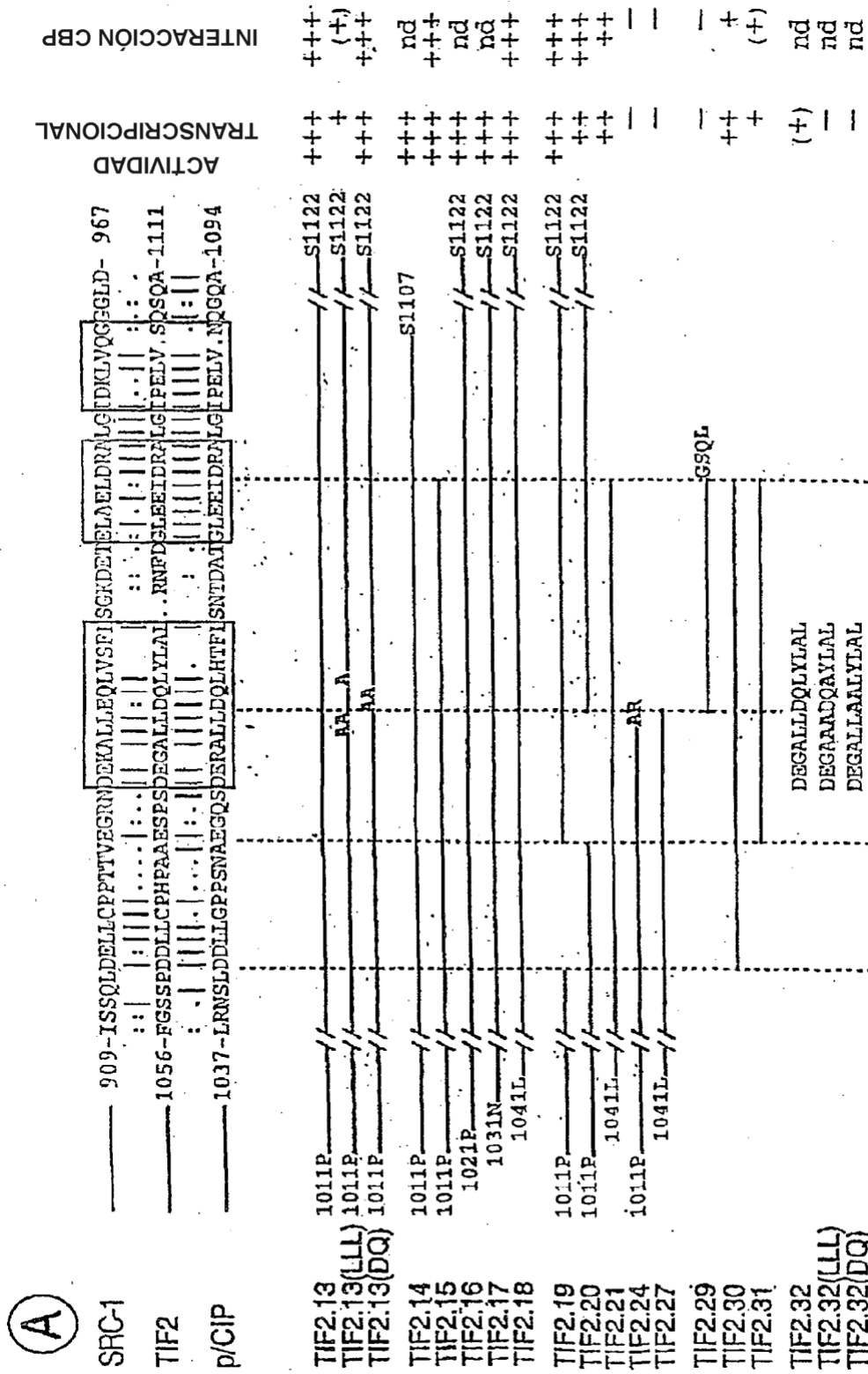


FIG. 9A

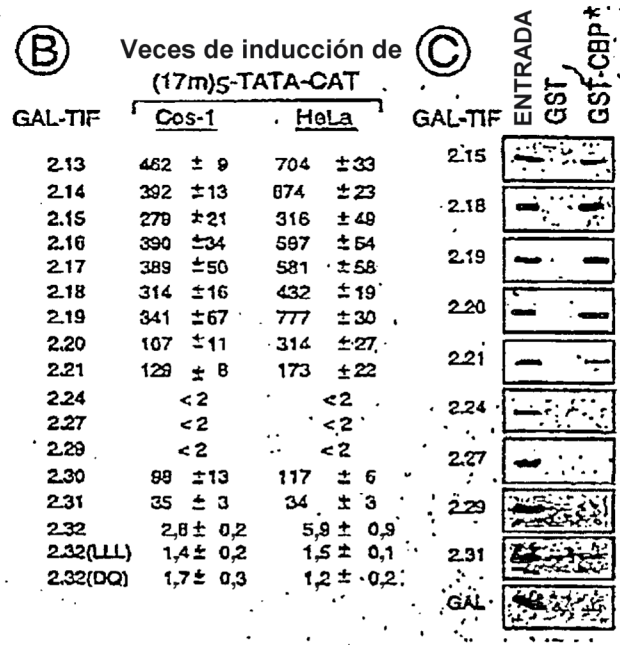


FIG. 9B - C

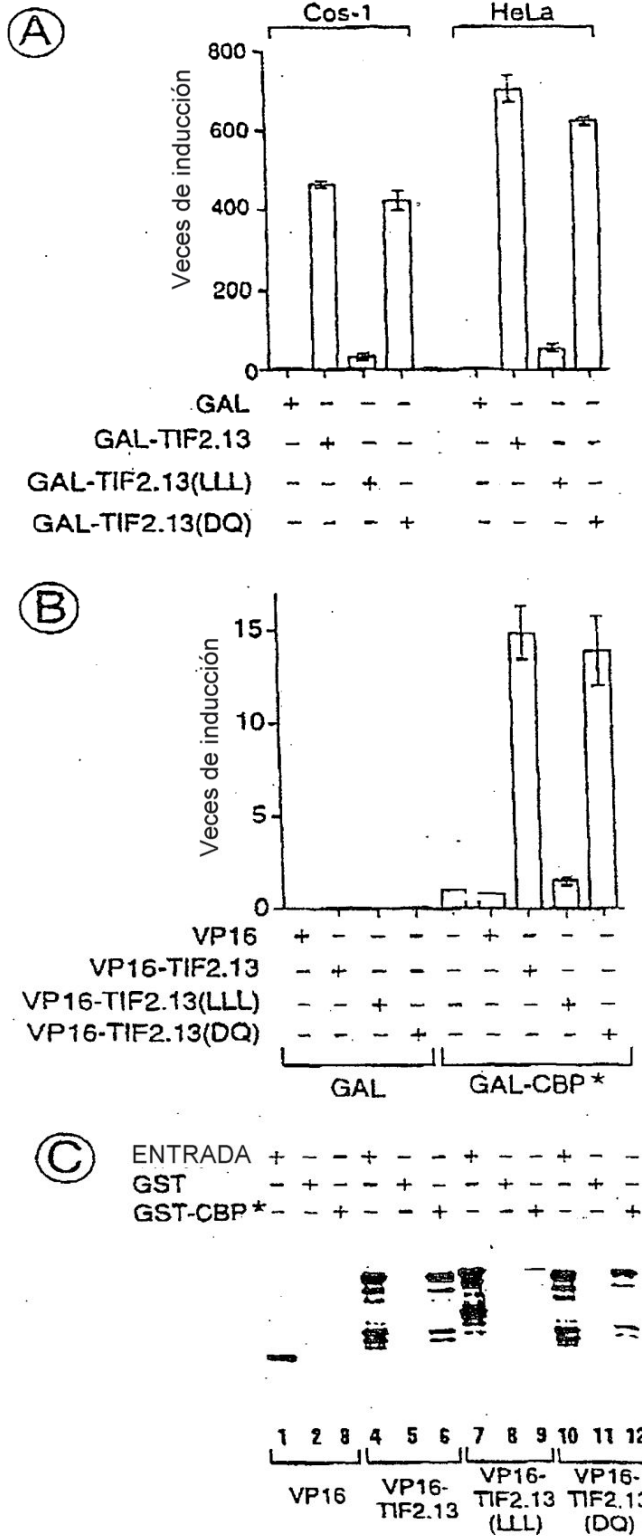


Figura 10A-C

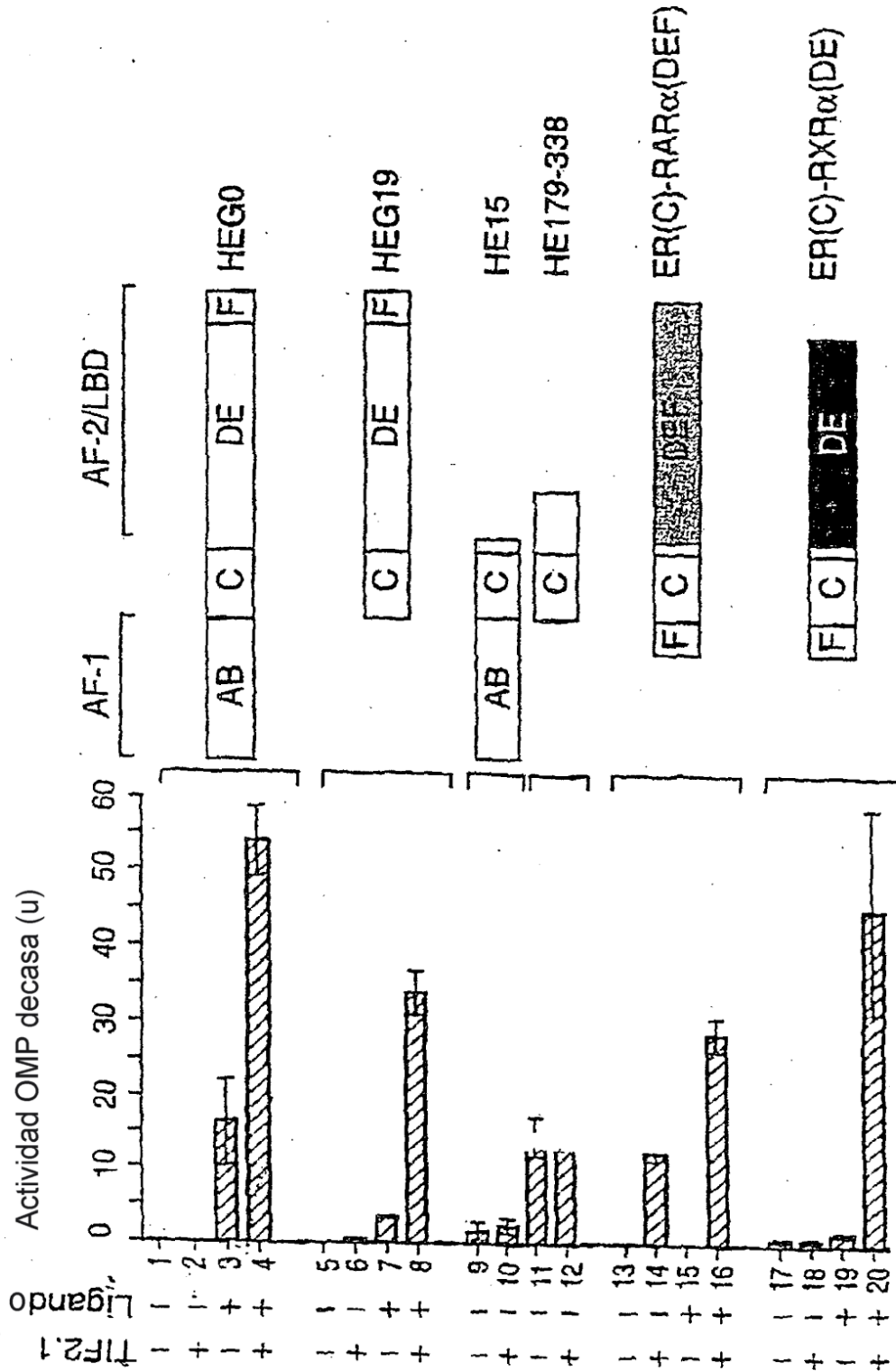


Figura 11

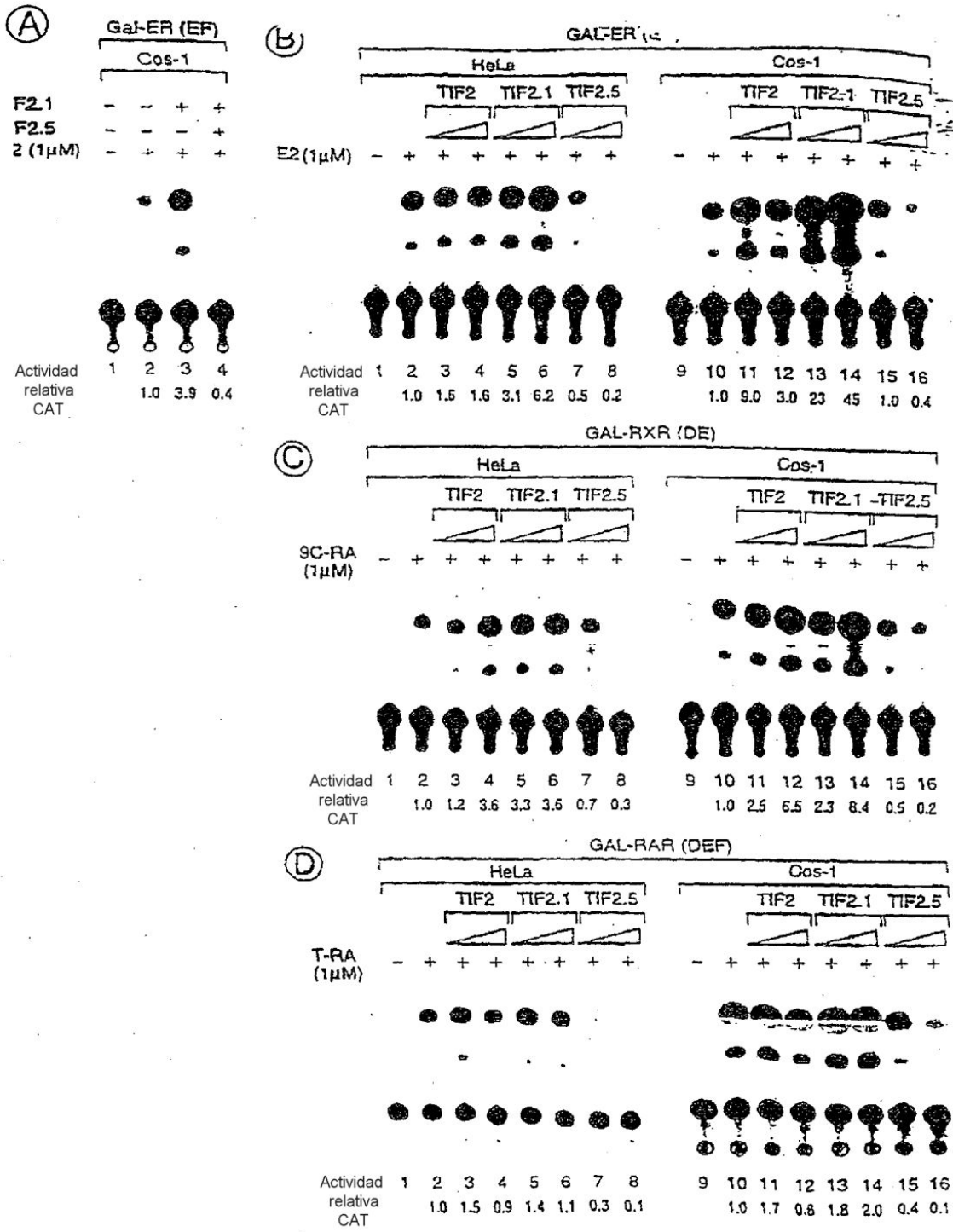


Figura 12A-D