



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 905**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00920497 .5**

96 Fecha de presentación : **13.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1163337**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2001**

54

Título: **Moléculas de adhesión vascular y modulación de su función.**

30

Prioridad: **11.03.1999 EP 99200746**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

73

Titular/es: **Merck Serono S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaduz, CH

72

Inventor/es: **Imhof, Beat, Albert y**
Aurrand-Lions, Michel

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 905 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de adhesión vascular y modulación de su función

5 La presente invención se refiere a la identificación de una subfamilia de moléculas de adhesión vascular, a la identificación de su actividad biológica y a la modulación de la función de estas moléculas para el tratamiento de diversas enfermedades.

10 Durante todo el desarrollo embrionario y el desarrollo posnatal precoz, las células endoteliales proliferan y se diferencian formando nuevos vasos sanguíneos mediante vasculogénesis y angiogénesis. En los organismos adultos el endotelio define la barrera hematótica y consiste en células quiescentes que no ciclan. Estas células polarizadas están enlazadas unas con otras mediante uniones herméticas y uniones adherentes formando una capa continua de células. Las funciones de la capa endotelial consisten en el mantenimiento de la homeostasia tisular, fibrinólisis, coagulación, tono vascular y trans migración leucocitaria. Todas estas propiedades están reguladas por una sintonía fina de la expresión y por la función de moléculas de adhesión.

15 Las situaciones patológicas tales como la inflamación, el crecimiento tumoral, la formación de heridas o la angiogénesis, conducen a un cambio temporal del número y función las moléculas de adhesión sobre el endotelio vascular y este hecho da por resultado una homeostasia alterada del vaso. Como ejemplo, los tumores aumentan la concentración local de factores angiogénicos lo que induce a una desviación desde las células endoteliales quiescentes que no cicla a endotelio en proliferación. La desviación angiogénica es inducida por varios factores que incluyen la IL-8, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la VCAM-1 soluble, el factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), y el factor de la necrosis tumoral (TNF).
20 Como resultado, las células endoteliales de los vasos existentes degradan la matriz extracelular (ECM) e invaden el tejido circundante, lo que lleva a la vascularización de tumores.

25 Durante la desviación angiogénica se modifica el tipo de expresión génica endotelial. Por ejemplo, el tratamiento de las células endoteliales con bFGF o TNF- α da por resultado un aumento cuádruple de la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$, una molécula de adhesión implicada en la emigración de células endoteliales. Además, la desviación angiogénica modifica la respuesta inflamatoria del endotelio conduciendo a una emigración anormal de leucocitos hacia los tumores. Normalmente, los leucocitos se extravasan desde la sangre por adherencia al endotelio y emigran a través de él. Estos mecanismos ocurren en un proceso de varias etapas que implica selectinas, integrinas y moléculas de adhesión de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas.

30 Se ha indicado que en el endotelio asociado a tumores la VCAM, la ICAM y las selectinas están reguladas a la baja. La regulación a la baja de estas moléculas de adhesión puede representar un mecanismo por el que los tumores evitan la invasión por células citotóxicas del sistema inmunitario. La solicitud de patente PCT, documento WO 98/24897, se refiere a moléculas de adhesión de la unión (JAM) de origen humano y murino, y describe también anticuerpos y expresión de JAM solubles. La solicitud de patente PCT, documento WO 00/36102, describe las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos de una proteína denominada PRO1868, pero no describe una actividad biológica concreta.
35

Es el objeto de la presente invención investigar nuevas proteínas de adhesión de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig Sf), que están reguladas en el endotelio bajo la influencia de tumores en cuanto a la transcripción.

40 Es otro objeto de la invención definir moléculas derivadas desde las nuevas proteínas de adhesión para emplear en el tratamiento de diversas indicaciones, tales como, por ejemplo, tumores e inflamación.

45 En la investigación que condujo a la presente invención, se utilizó un modelo murino experimental para identificar transcritos regulados durante el cultivo conjunto de una línea de células endoteliales con células de melanoma. Para restringir la estrategia de selección a moléculas de adhesión de la Ig Sf, se desarrolló un nuevo enfoque de exposición del RNA denominado "Exposición Diferencial Dirigida" (Targeted Differential Display). La novedad de ea técnica de exposición modificada reside en el uso de solo un conjunto de cebadores degenerados. Como se demuestra en los ejemplos, se encontró, sorprendentemente, que esto lleva a una especificidad suficiente.

50 Más específicamente, los cebadores parcialmente degenerados (en el caso presente el nivel de degeneración está entre 2048 y 4096 formas diferentes de cebadores dentro de un conjunto), designados para dirigir la secuencia conservada encontrada en los dominios C2 de miembros de la Ig Sf, fueron utilizados para conducir la Técnica de Exposición Diferencial Dirigida basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Samaridis and Colonna (1997) Eur. J. Immunol. 27, 660-665).

Basándose en este descubrimiento la invención proporciona un método para la identificación específica de secuencias de DNA expresadas diferencialmente, que comprende el uso de PCR de Transcripción Inversa de Exposición Diferencial, en la que se utiliza un conjunto de cebadores parcial o totalmente degenerados, específicos del gen diana. Una limitación importante de la estrategia convencional de exposición de RNA es la falta de especificidad del método. Con la pretensión de aumentar esta especificidad, los inventores, en su búsqueda de otras moléculas de adhesión, han utilizado cebadores degenerados que tienen como objetivo las secuencias que codifican moléculas con dominios C₂. Esto se consiguió mediante la alineación de los dominios C₂ de diversas moléculas de adhesión de la Ig Sf, y la identificación de un consenso lineal de aminoácidos, que rodean al resto de cisteína que participa en la estructura de los dominios C₂: Y-(RQYS)-C-x-A-S-N-x₂-G. En un sentido más general, este enfoque puede ser usado también para la búsqueda de otras secuencias en que se usa la traducción inversa de una o más de las secuencias de consenso más frecuentes, para diseñar los cebadores degenerados utilizados en la exposición diferencial.

El método ha permitido la identificación de un transcrito, regulado a la baja en las células endoteliales por confluencia en presencia de células de melanoma o de carcinomas. El cDNA codificaba una molécula de la Ig Sf con características estructurales inusuales, y se denominó CRAM-1 por "Molécula de Adhesión Regulada en Confluencia". (Confluency Regulated Adhesion Molecule) Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de CRAM-1 son idénticas a las de la proteína PRO1868 descritas en el documento WO 00/36102, pero aquí, por primera vez, su actividad biológica ha sido identificada. La descripción reciente de una molécula estructuralmente afín, JAM, implicada en la transmigración leucocitaria, sugirió la existencia de una nueva familia de moléculas de adhesión de la que las moléculas JAM y CRAM-1 eran los prototipos. La comparación de las secuencias con las bases de datos EST permitió, además, la clonación de CRAM-2, un tercer miembro de esta familia molecular. La Fig. 1 muestra las secuencias de cDNA murinas que codifican las proteínas de CRAM-1 y CRAM-2. En esta solicitud de patente los nombres JAM y JAM-1, CRAM-1 y JAM-2, así como CRAM-2 y JAM-1, se usan indistintamente.

La distribución tisular comparativa de los transcritos que codifican JAM, CRAM-1 y CRAM-2 puso de manifiesto una expresión preferente de esas moléculas en los compartimentos endotelial y epitelial, lo que sugiere un papel importante desempeñado en el mantenimiento de los contactos de célula-célula. Estas interacciones de célula-célula de células endoteliales quiescentes regulan la permeabilidad vascular, el ciclo celular y la transmigración leucocitaria a través de la pared endotelial.

Para esclarecer adicionalmente la función y la interacción de las tres moléculas, se usó un enfoque molecular. A este fin, fueron construidas moléculas quiméricas que consistían en las secuencias "Flag-tag" y Proteína Fluorescente Verde Intensificada (Enhanced Green Fluorescent Protein) (EGFP) fusionadas a una forma soluble o una forma unida a la membrana, de CRAM-1, CRAM-2 o JAM) (resumido en la Fig. 2). Cuando fueron transfectados en líneas celulares, los productos de fusión de EGFP de CRAM-1 y JAM se localizaron en los contactos de célula-célula, confirmando el papel que desempeñan estas moléculas en la comunicación de célula-célula. Por el contrario, CRAM-2 estaba distribuida más ampliamente sobre la superficie celular. Además, la construcción soluble de CRAM-1 bloqueaba la emigración endotelial de leucocitos, *in vitro*, mientras que la molécula JAM soluble, manifestaba solamente un efecto marginal. En conjunto, estos resultados sugirieron un papel central de esta nueva subfamilia de moléculas de adhesión para el mantenimiento de la integridad vascular y de la función de la capa endotelial.

Basada en estos descubrimientos, la presente invención proporciona nuevos medios de contrarrestar indicaciones médicas tales como la inflamación crónica y el desarrollo tumoral, con reactivos basados en polipéptidos de CRAM.

Más en particular, la presente invención se refiere a un polipéptido en forma aislada que pertenece a una subfamilia de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas humanas, cuyo polipéptido muestra al menos 70% de homología de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de las Moléculas de Adhesión Reguladas en Confluencia -1 (CRAM-1) murinas, como se describe en la Fig. 3 ,fila superior, para usar como un medicamento. Las Figuras 4 y 5 muestran la alineación sobre el nivel de aminoácidos entre JAM-2 (CRAM-1) y JAM-3 (CRAM-2) del ratón, respectivamente.

Los polipéptidos de CRAM encontrados en el cuerpo humano o en el cuerpo de un animal, son marcadores de células en crecimiento. La expresión de CRAM está regulada al alza en células que están creciendo.

En esta memoria se describen dos polipéptidos murinos que son miembros de esta familia. Basándose en la información de las secuencias de estos polipéptidos pueden identificarse otros miembros de la familia por medios bien conocidos tales como PCR, hibridación cruzada en colecciones de DNA o reactividad cruzada de anticuerpos.

La información de las secuencias puede ser o bien de la secuencia de aminoácidos o de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos.

Más particularmente, la invención se refiere, por tanto, al polipéptido correspondiente de los seres humanos, que comprende esencialmente la secuencia de aminoácidos representada en la Fig. 6, grupo de la parte media, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% homóloga con ella, para usar como un medicamento.

5 Además de usar la información de las secuencias de las dos proteínas de CRAM descritas en esta memoria, para identificar otros miembros de la familia en otras especies, tales como la de los seres humanos, las dos proteínas y sus correspondientes miembros de la familia, pueden ser usados también para preparar moléculas derivadas, tales como anticuerpos dirigidos contra los (poli)péptidos de la invención, o equivalentes recombinantes de las proteínas, opcionalmente en forma soluble, o péptidos que comprenden al menos parte de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos. Partes adecuadas de la secuencia de aminoácidos son, especialmente, los dominios extracelulares: VC₂, y la secuencia citoplásmica proximal de la membrana: A-[Y,Q] – [R,S] – [R,K]-G-[C,Y]-F.

10 Además de los derivados del tipo de anticuerpos y de (poli)péptidos, la invención se refiere también a poli- u oligonucleótidos que poseen una secuencia que codifica un polipéptido completo o una de sus partes, cuyo polipéptido posee una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% homóloga con la secuencia de aminoácidos de la proteína de CRAM-1 según se describe en esta memoria, para usar como un medicamento. Más particularmente, la invención se refiere a secuencias de nucleótidos que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferible, esencialmente 100%, homólogas con la secuencia de DNA de la CRAM-1 humana, como se describe en la Fig. 6, para usar como un medicamento. Tales poli- u oligonucleótidos pueden ser, por ejemplo, RNA o DNA y pueden ser cebadores, sondas, RNA antisentido, etc.

15 Todas estas moléculas pueden ser utilizadas para modular la función de los polipéptidos originales encontrados en el cuerpo humano o en el cuerpo de un animal, o para diagnóstico.

La angiogénesis de, por ejemplo, tumores, puede ser inhibida con anticuerpos. Estos pueden utilizarse como moléculas dirigidas hacia células que son portadoras de los polipéptidos de CRAM. Los anticuerpos pueden actuar tal cual son o pueden acoplarse a otras moléculas tales como toxinas, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores fotoactivables, así como también a liposomas, células, etc.

25 Los anticuerpos marcados son particularmente adecuados para usos de diagnóstico de los anticuerpos, es decir, pueden ser utilizados para localizar la angiogénesis en un tumor en crecimiento. Además, los anticuerpos acoplados a toxinas o a moléculas radiactivas, pueden ser usados para matar específicamente el tumor desde dentro, por dirección hacia los vasos (en crecimiento) del tumor.

30 Se ha descubierto que las moléculas del tipo de las moléculas CRAM no eran detectadas en la vasculatura normal excepto en las vénulas linfáticas y las vénulas endoteliales altas de órganos linfoides tales como los nódulos linfáticos y las placas de Peyer. La ventaja de ello es que la dirección de, por ejemplo, anticuerpos anti-CRAM, puede ser altamente específica, por ejemplo, hacia células tumorales, evitándose de este modo efectos secundarios indeseables.

35 Además, los (poli)péptidos pueden unirse también a la molécula sobre vasos angiogénicos y por ello estimulan o inhiben la angiogénesis.

40 Los (poli)péptidos solubles que poseen esencialmente la misma secuencia de aminoácidos que los polipéptidos de CRAM pueden ser empleados en el tratamiento de reacciones de inflamación del endotelio vascular. Se ha descubierto, según la invención, que la emigración transendotelial de leucocitos puede ser inhibida por sCRAM-1-IG2Do o anticuerpos monoclonales contra CRAM-1. Esta molécula y moléculas similares pueden ser utilizadas, por tanto, para enfriar o estimular una reacción inmunológica tal como la que se encuentra en la inflamación.

45 La expresión específica de la molécula sobre células vasculares de vénulas endoteliales altas (HEVs) *in vivo*, que están especializadas en la emigración de leucocitos, sostiene un efecto estimulante de CRAM sobre la emigración de linfocitos o sobre la permeabilidad capilar. Este efecto puede deberse por sí mismo a la modulación de moléculas implicadas normalmente en el sellado del lecho vascular (CRAM-1, CRAM-2, JAM, PECAM, VE-Cadherin). Este descubrimiento es la base de otras aplicaciones de la invención que llevan consigo la regulación de las uniones interendoteliales por liberación de (poli)péptidos recombinantes de moléculas CRAM de la invención, o anticuerpos monoclonales contra CRAM-1.

50 También pueden utilizarse anticuerpos anti-CRAM para bloquear interacciones de célula-célula en células en crecimiento. Esto conduce a desorganización de los contactos intercelulares que son necesarios, normalmente, para la función de barrera de los vasos sanguíneos. Este descubrimiento puede ser utilizado para aumentar la permeabilidad de vasos en crecimiento y aumentar la distribución de medicamentos a lugares tales como tumores en crecimiento, útero posmenstrual, etc. La desorganización de contactos intercelulares puede utilizarse, por

consiguiente, para bloquear el desarrollo de células tumorales portadoras del antígeno, tales como angiomas (tumores que se originan desde el endotelio vascular) o algunos carcinomas que crecen rápidamente.

5 Para diagnóstico puede hacerse uso de anticuerpos marcados pero también de oligonucleótidos marcados que son complementarios del DNA o el mRNA de CRAM encontrado en las células endoteliales que expresan la proteína o proteínas de CRAM.

La presente invención será ilustrada, además, en el ejemplo que sigue en el que se hace referencia a los dibujos que se acompañan, que muestran:

10 Fig. 1 : La secuencia de cDNA murina muCRAM-1 que codifica las proteínas de CRAM-1 y CRAM-2, fue subclonada en el vector pcDNA3 y secuenciada empleando los cebadores Sp6 y T7. Se obtuvo la secuencia muCRAM-2 como el clon de IMAGE procedente de la colección EST (Ac: AA690843 y W80145) y se secuenció en el vector pT7T3-DPac usando los cebadores T7 y T3.

15 Fig. 2: Representación esquemática de las herramientas moleculares utilizadas en el ejemplo. La estructura y restos importantes de la nueva familia están representados en la parte superior del grupo de la parte de arriba. Las estrellas representan los sitios putativos de fosforilación de la parte citoplásmica de las tres moléculas. El segundo resto canónico Cys del dominio C2 está perdido en la secuencia de JAM. Diferentes moléculas quiméricas están representadas en la parte baja con la posición y los restos circundantes de los sitios de fusión. Parte de las moléculas que tienen su origen en secuencias de JAM, CRAM-1 o CRAM-2 se indican en fondo blanco.

Fig. 3: Alineación de CRAM-1 y de secuencias de aminoácidos de CRAM-1. Las separaciones están indicadas con líneas de trazos.

20 Fig. 4: Alineación entre CRAM-1 murina y humana (JAM-2).

Fig. 5: Alineación entre CRAM-2 murina y humana (JAM-3).

Fig. 6: Secuencia de los ácidos nucleicos de la CRAM-1 humana (grupo superior), secuencia completa de aminoácidos de la CRAM-1 humana (grupo medio), y secuencia parcial de aminoácidos de la CRAM-2 humana.

25 Fig. 7: Exposición diferencial dirigida usando cebadores degenerados. (A) : Se indican las secuencias de nucleótidos de cebadores de la PCR que codifican las secuencias presentes en los dominios C2 de Ig. Dos cebadores codifican la misma secuencia debido a los codones que codifican el resto de Ser. El nivel de degeneración es de 4096 formas diferentes para los cebadores que codifican YRCXAS y de 2048 formas para los otros. (B) : Se indica la exposición de productos radiactivos de la PCR obtenidos con los cebadores de YYCXAS1. Las calles corresponden a la exposición de producto de la PCR introducido sobre cDNA obtenido a partir de la línea de células endoteliales t-end (calle t-end), la línea de células de melanoma B16 (calle B16), o el cultivo conjunto entre las dos líneas celulares (calle central). La flecha indica el producto de la PCR de interés obtenido de la CRAM-1 del transcrito regulado a la baja, en las condiciones del cultivo conjunto.

30

35 Fig. 8: (A) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida, del cDNA de la Molécula de Adhesión Regulada en Confluencia -1 (CRAM-1). El péptido señal hidrófobo, putativo, (primero) y la región transmembranal (segunda) están subrayados. Están indicados los sitios de N-glicosilación predichos (rayado) restos de cisteínas que forman, probablemente, uniones disulfuro (partes curvadas) y restos de Ser/Thr/Tyr de sitios de fosforilación posibles (negrilla). (B) Modelo estructural de la proteína de CRAM-1 murina. Parte extracelular que muestra un dominio de Ig tal como VH y otro C2 con dos sitios putativos de glicosilación enlazados a N. La flecha apunta hacia la región dirigida por los cebadores parcialmente degenerados usados (YYCXAS!) en la Exposición Diferencial Dirigida,

40 Fig. 9: Alineación de las secuencias proteínicas murinas de JAM, CRAM-1 y CRAM-2- Los restos idénticos están en cajas en negro y los restos homólogos están sombreados en gris. La identidad global es 36% entre CRAM-2 y CRAM-1, 31% entre JAM y CRAM-1 y 33% entre JAM y CRAM-2; las respectivas homologías son 52%, 52% y 49%. Las separaciones se indican en las secuencias por líneas de trazos. Los restos canónicos conservados (Cys y Trp) de los dominios V y C2 están marcados con asteriscos.

45 Fig. 10: Expresión de transcritos que codifican JAM, CRAM-1 y CRAM-2 detectados mediante RT-PCR en líneas diferentes (A) o detectados por transferencia Northern en diversos tejidos (B). (A): RT-PCR ha sido conseguida sobre cDNA procedente de una línea de células endoteliales tratada con TNF (las calles 2 y 11 corresponden a células t-end tratadas con TNF) o sin tratar (las calles 3, 4, 6, 7, 9, 12 corresponden a células b-end.5, e-end.2, t-end V⁺⁺L⁻, t-end, V^{bajo}L⁺⁺, TME y t-end, respectivamente). Las calles 5 y 10 corresponden a las líneas de células tumorales B16 (melanoma) y KLN205 (carcinoma). La calle 8 corresponde a la línea de células epiteliales tímicas, sin transformar, MTE4-14. La calle 1 es el testigo positivo para amplificaciones de JAM, CRAM-1 y CRAM-2 sobre

50

los plásmidos que contienen los cDNAs clonados. (B) : Autorradiografía de hibridación de la sonda marcada con P³² a transferencia Northern del ratón. Las sondas utilizadas para cada hibridación están indicadas a la izquierda. Las señales de hibridación para JAM y CRAM-1 está detectadas en el tamaño de 2 kb.

5 Fig. 11: Localización de JAM-2 y JAM-1 para contactos de célula-célula establecidos. a: Se llevó a cabo inmunocitoquímica sobre células TME fijadas con paraformaldehído, con anticuerpos anti-Jam-2 (a) o anti-Jam-1 (b). Las flechas indican la localización específica de las proteínas para contactos de célula-célula. Barra, 10 μ m. B: Las moléculas quiméricas JAM-2-EGFP (a) y JAM-1-EGFP (c) estaban localizadas específicamente para contactos de células entre células transfectadas. El enriquecimiento en proteínas recombinantes EGFP no se observó entre células transfectadas y células sin transfectar (punta de flecha). Barra, 20 μ m. C: Inmunoprecipitación de JAM-2 después de biotilación superficial de células endoteliales TME. Se emplearon anticuerpos anti-PECAM (calle 1) y anti-JAM-1 (calle 2) como testigos negativo y positivo, respectivamente, para la inmunoprecipitación con el anticuerpo CRAM-XIXH35 (calle 3). Los pesos moleculares están indicados a la derecha. D: Inmunoprecipitación de proteínas recombinantes EGFP procedentes de células CHO transfectadas. Se usaron los anticuerpos anti-JAM-2 (calles 2, 3, 6) y anti-JAM-1 (calles 1, 4, 5) para inmunoprecipitar los lisados biotilados procedentes de células CHO sin transfectar (calle 1 y 2), transfectadas con JAM-1-EGFP (calles 3 y 4), o transfectadas con JAM-2-EGFP (calles 5 y 6). Los pesos moleculares están indicados a la derecha.

20 Fig. 12: Emigración de esplenocitos a través de monocapas de endotelios activados con TNF, en presencia o ausencia de la quimioquina SDF-1. Se usaron tres endotelios: tEnd.1 de tipo salvaje, o tEnd.1 transfectado con el cDNA que codifica CRAM-1 ó CRAM-2. Dos anticuerpos monoclonales fueron ensayados para determinar su capacidad para afectar a la transmigración, F-26 ó H-26, ambos anticuerpos monoclonales de IgG1 de la rata dirigidos contra CRAM-1 murina.

25 Fig. 13: Regulación de CRAM-1 en función de la confluencia. La PCR semicuantitativa se lleva a cabo usando una mezcla de cebadores específicos de los cDNAs de HPRT y CRAM-1. Las reacciones PCR se realizan sobre un gel de agarosa al 1,2% y la tinción con bromuro de etidio. Las calles 1, 2 y 3 corresponden, respectivamente, a confluencias de 100, 50 y 10%. Se observa una señal más débil para CRAM-1 en la confluencia de 100% (calle 1). Se indican las condiciones de cultivo de las líneas de células endoteliales (t-end.1 y TME) tal cual, solas, o mezcladas con la línea de células tumorales KLN 205.

30 Fig. 14: Análisis de transferencia Northern de transcritos de JAM-2 (a), JAM-1 (b), o β -actina (c) en tejidos de ratón. Se indican los resultados en preparaciones de mRNA embrionario poscoito y adulto. Las dimensiones de las señales de hibridación están indicadas a la derecha.

35 Fig. 15: Análisis inmunohistológico de la expresión de JAM-2, JAM-1, ZO-1 y PECAM. Cortes en serie de riñón (a-d) o cortes procedentes de nódulos linfáticos mesentéricos (e-l) fueron sometidos a tinción con anticuerpos anti-JAM-2 (a, e, i), anti-JAM-1 (b, f, j), anti-ZO-1 (c, g, k) o anti-PECAM (d, h, l). Cada serie de fotografías (a-d, e-h e i-l) se adquirió con fijaciones idénticas para CCD.

40 Fig. 16: Expresión de JAM-2 en células endoteliales. A: Análisis citofluorimétrico de la expresión de JAM-2, JAM-1 y PECAM en líneas de células endoteliales (tEnd.1, eEnd.2 y TME) o la línea de carcinoma de células escamosas (KLN 205). Los perfiles de líneas discontinuas representan los testigos negativos obtenidos con un anticuerpo dirigido contra CD4. B: Análisis citofluorimétrico de JAM-2 sobre células endoteliales recientemente aisladas. Los órganos indicados fueron disociados por digestión con colagenasa/dispasa, teñidos con DiIAc-LDL, CD31 y anti-JAM-2 ó anti-JAM-1, como está indicado. Se obtuvieron perfiles de histogramas representando la población de células endoteliales positivas para DiIAc.LDL (FL-2) y CD31 (FL-3). Los testigos negativos fueron obtenidos omitiendo los mAbs primarios contra JAM-1 ó JAM-2.

45 Fig. 17: (A) : Localización de JAM-2-EGFP durante la formación del contacto de célula-célula. Fotografías de la fluorescencia fueron tomadas cada 3 minutos durante 1 hora, durante la formación de una monocapa de células CHO transfectadas con JAM-2-EGFP. Se muestran las fotografías obtenidas durante los primeros 18 minutos. En el tiempo 0, los asteriscos identifican las tres células presentes en el campo. En los tiempos 6, 12 y 18 minutos, las flechas señalan la relocalización de JAM-2-EGFP del contacto de célula-célula formado nuevamente. (B): Localización de JAM-2-EGFP después de la lesión. Las flechas indican el lado lesionado y las puntas de las flechas destacan los procesos membranales ricos en JAM-2-EGFP. El tiempo transcurrido está indicado en las fotografías. Barra, 10 μ m.

50 Fig. 18: La expresión de JAM-2 disminuye la permeabilidad paracelular. (A) : La permeabilidad paracelular fue evaluada por difusión de FITC-Dextrano a través de monocapas de células CHO sin transfectar, células CHO transfectadas con Tac (hull2R α) o con la proteína de fusión EGFP indicada (JAM-1 ó JAM-2). La transfección de JAM-2-EGFP o JAM-1-EGFP en células CHO llevó a una disminución importante de la permeabilidad celular (57,8% \pm 4,9 y 70,8% \pm 3,6, respectivamente, p < 0,0001), mientras que la transfección de Tac no afectó

significativamente a la permeabilidad celular ($100,4\% \pm 4,4$, $p = 0,9872$). Los resultados fueron normalizados con respecto a células CHO sin transfectar.

Fig. 19: Dirección de JAM-2-EGFP (A) y JAM-1-EGFP (B) a uniones herméticas preexistentes. Células MDCK confluentes, transfectadas de modo estable con JAM-2-EGFP (A), o JAM-1-EGFP (B), fueron teñidas con anti-occludina y anti-conejo-Texas/Red. Series de fotografías cada $0,9 \mu\text{m}$ desde los niveles basal a apical se muestran para la fluorescencia de EGFP (a) o tinción con ocludina (b). El nivel basal de la izquierda fue definido arbitrariamente tal que las fotografías en serie comprenden el nivel de unión hermética sobre los focos en $-3,6$ y $+4,5 \mu\text{m}$ (cuarta y quinta fotografías a la derecha).

Fig. 20: Efecto de moléculas recombinantes solubles sobre la emigración transendotelial de leucocitos. (A): Transmigración expresada como un índice relativo y normalizada sobre los valores obtenidos en la línea de células t-end (sin tratar) (línea de trazos, Índice 1). Se indican los resultados obtenidos en presencia de $1 \mu\text{g}$ de sJAM-Ig2do (cuadrados) o en presencia de $1 \mu\text{g}$ de sCRAM-1-Ig2do (círculos llenos). Se calcula el índice como media de cinco experimentos de trans migración independientes. (B) : Fenotipo de células transmigradas expresado como números de células calculados a partir de los porcentajes obtenidos mediante análisis FACS después de tinción con anti CD3-FITC y anti B220-PE. Las estrellas indican los puntos experimentales con una diferencia importante con respecto al testigo.

En los ejemplos los términos JAM y JAM-1, CRAM-1 y JAM-2, y también CRAM-2 y JAM-3 pueden utilizarse indistintamente.

EJEMPLO

20 MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Las líneas celulares de endotelioma tímico (tEnd.1) y endotelioma embrionario (eEnd.2) (Williams et al., 1989, Cell 57:1053-1063) fueron proporcionadas por el Dr. W. Risau y el Dr. B. Engelhardt (Instituto Max Planck, Bad-Nauheim, Alemania). La línea celular del endotelio de los nódulos linfáticos transformadas con SV40, TME, fue proporcionada por el DR. A. Hamann (Harder et al., 1991, *Exp. Cell Res.* 1997:259-267). La línea de células escamosas de carcinoma, KLN 205, la línea de células CHO, la MDCK y la línea de células de mieloma Sp2/0, fueron obtenidas de la colección de American Type Tissue Culture (ATCC). Todas las células, excepto las CHO, fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco BRL, Paisley, Escocia), suplementado con FCS al 19% (PAA Laboratories, Liz, Austria), glutamina 2 mM, penicilina, 100 U/ml, y estreptomycin, 100 U/ml (todo de Gibco BRL). Las células CHO fueron cultivadas en medio Nut.Mix.F-12 (HAM) suplementado como antes. Las células adherentes fueron desprendidas por lavado con PBS/ EDTA 0,15 mM, seguido de 5 minutos de incubación a 37°C en el seno de tripsina/EDTA.

Exposición, clonación y análisis de las secuencias

Para experimentos de cultivo conjunto se cultivaron 5×10^5 células t.End.1 junto con $2,5 \times 10^4$ células de melanoma B16 F10 durante 64 horas en placas de cultivo de tejidos de 10 cm. Como testigo se cultivaron por separado 5×10^5 células B16 F10, en las mismas condiciones, obteniendo como resultado monocapas confluentes al cabo de 64 horas. Se extrajo directamente el RNA total en placas petri con reactivo Trizol siguiendo las indicaciones del fabricante (Gibco BRL, Paisley, Escocia). Se preparó el cDNA a partir de $5 \mu\text{g}$ de RNA total empleando el cebador oligo-dT (16-mero) y Transcriptasa Inversa Superscript (Gibco BRL, Paisley, Escocia). La calidad y la cantidad de cDNA fueron comprobadas llevado a cabo 27 ciclos de PCR sobre $1 \mu\text{l}$ de cDNA diluido 1:5, usando cebadores específicos para el cDNA de HPRT casero. Luego se efectuó la PCR diferencial con los siguientes cebadores degenerados $5'$ TAYAGNTGYNNNGCYTCYAA $3'$, $5'$ TAYCRGTGYNNNGCYTCYAA $3'$ y $5'$ TAYTAYTGYNNNGCYTCYAA $3'$ que codifican las secuencias más frecuentes de aminoácidos encontradas en los dominios C_2 : YRCXAS, YQCXAS, e YYCXAS. Las condiciones de la PCR consistieron en el uso de: $2 \mu\text{l}$ de cDNA diluido; $2,5 \mu\text{l}$ de solución tampón de PCR Goldstar 10X; $2 \mu\text{l}$ de MgCl_2 ; $2 \mu\text{l}$ de cebadores degenerados 0,3 mM; $0,5 \mu\text{l}$ de dNTP 0,1 mM; $0,1 \mu\text{l}$ de dATP αP^{33} , 10 mCi/ml (Amersham Pharmacia Biotech, Dübendorf, Suiza); $15,65 \mu\text{l}$ de H_2O ; $0,25 \mu\text{l}$ de Taq polimerasa Goldstar (Eurogentech, Seraing, Bélgica).

Los parámetros de la PCR fueron los siguientes: 45 segundos a 94°C , 90 segundos a 50°C , y 45 segundos a 72°C , repetido 40 veces. Se añadió solución tampón de carga Formamida/EDTA y se desnaturalizaron las muestras durante 2 minutos a 94°C . Los productos de la PCR fueron separados después sobre un gel de poliacrilamida al 6%, y sometidos a autorradiografía usando OM-Mat de Kodak. Se compararon las intensidades de las bandas.

Las bandas expresadas diferencialmente fueron cortadas desde el gel de poliacrilamida seco y se recuperaron fragmentos por ebullición y precipitación con etanol según se ha descrito anteriormente (Liang y Pardee, 1992, *Science*, 257:967-970). Los productos de la PCR fueron reamplificados después usando concentraciones crecientes de dNTPs (0,2 mM en lugar de 2 μ M) sin ATP marcado con P³³. Los productos de reamplificación fueron clonados en el vector pGem-T Easy (Promega Corp. Wallisellen, Suiza) según ha sido descrito anteriormente (Sambrook, Fritsch, y Maniatis; *Molecular Cloning*; 2^a ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989).

Las secuencias de los ácidos nucleicos de dos clones independientes fueron determinadas usando el kit de secuenciación Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle (Amersham Pharmacia Biotech, Dübendorf, Suiza) y el sistema de análisis de DNA LI-COR (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, Alemania).

10 Identificación de JAM-3

El análisis y comparación de las secuencias se llevaron a cabo mediante las aplicaciones disponibles del Servidor de Biología Molecular ExpASY, es decir, Blast, Prosite, Suiza-Prot. Fueron identificados tres homólogos ESTs diferentes, homólogos de CRAM-1 (Nos. de Catálogo, AA726206, AA052463 y AA175925). Ninguno de ellos codificaba un transcrito de longitud total ni comprendía la secuencia de iniciación ATG. Por consiguiente, la secuencia codificante de 5' se obtuvo usando el sistema 5'RACE-PCR para amplificación rápida de extremos de cDNA, versión 2.0, según las indicaciones del fabricante (Gibco BRL, Paisley, Escocia).

Los tres cebadores utilizados fueron diseñados basándose en las secuencias de EST, como sigue: 5'-GAGGTACTTGCATGTGCT-3' para la síntesis de la primera hebra, y 5'-CGACAGGTGTCAGATAACA-3' y 5'-CACCTCCTCACTCGT-3' para las dos PCRs anidadas. El producto de 5'RACE-PCR fue clonado en el vector pGem-T. Para obtener la secuencia codificante de longitud total de CRAM-1, el producto de la 5'RACE-PCR clonado y el EST (Nº de catálogo AA726206) fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción HpaI y NotI y ligados en el vector pGem-t. La clonación de CRAM-2 de longitud total se basó en la misma estrategia de comparación de secuencias y técnica de 5'RACE. El cDNA de longitud total que codifica CRAM-2 se obtuvo finalmente desde los números de catálogo de ESTs: AA690843 y W80145. Estos dos clones se diferenciaban en la longitud de la región 3' sin traducir.

Transferencia Northern

Se extrajo mRNA total desde células o tejidos, usando Trizol (Life Technologies AG, Basilea, Suiza) según las indicaciones del fabricante. Se extrajo mRNA de poli-A partiendo de 250 μ g de RNA total con el kit de purificación de mRNA Oligotex (Qiagen, Zurich, Suiza). La transferencia Northern de poli-A embrionario se adquirió de CLONTECH (P.H Stehelin y Cie AG, Basilea, Suiza). Las ribosondas fueron preparadas a partir del vector pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Países Bajos), y comprendían las secuencias que codifican los dominios de inmunoglobulina de JAM-1 y JAM-2, o la secuencia codificante de longitud total de β -actina. La hibridación se llevó a cabo a 62°C en el seno de una solución tampón que contenía formamida al 50%. Las transferencias fueron lavadas luego dos veces (0,5xSSC, SDS al 0,1%, 67°C), y autorradiografiadas sobre X-Omat de Kodak a -80°C.

35 Experimento de confluencia

Se investigó el efecto de la confluencia de células endoteliales sobre los niveles de mRNA de JAM-2. 2x10⁵ células endoteliales TME fueron cultivadas en placas de cultivo de 6, 10 y 15 cm de diámetro alcanzando diferentes niveles de confluencia después de 64 horas, que variaron desde 10 a 100%. El número de células al cabo de 64 horas, comprobado mediante exclusión con azul tripán y recuento, fue igual en todos los casos, y no estaba relacionado con la superficie específica de la placa petri.

Se usaron PCR semicuantitativa o transferencia Northern para determinar la cantidad relativa de transcrito en las diversas condiciones. Para la detección del transcrito de JAM-2 se usó el par de cebadores 5'-GACTCACAGACAAGTGAC-3' y 5'-CACCTCCTCACTCGT-3', obteniendo un producto de amplificación de 750 bp. Como testigo interno se usaron los cebadores específicos que siguen para el cDNA de Hprt, y amplificar un fragmento de 350 bp de largo: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' y 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'.

Construcción de vectores de expresión

La secuencia que codifica la EGFP fue subclonada partiendo del vector pEGFP-1 (CLONTECH, P.H. Stehelin y Cie AG, Basilea, Suiza) en el pcDNA3 usando los sitios HindIII u NotI, denominado, por tanto pcDNA3/EGFP. Los sitios de restricción del extremo 3', HpaI y Scal, encontrados en la secuencia que codifica, respectivamente, el dominio citoplásmico de JAM-2 y JAM-1, fueron usados para fusionar las dos secuencia en el extremo N-terminal de EGFP.

del vector pcDBA3 (Invitrogen, Leek, Países Bajos). Las inserciones que codifican JAM-2 ó JAM-1 fueron escindidas desde pGemt o pRc/CMV usando digestiones de SacII/HpaI ó HindIII/ScaI, respectivamente.

5 Las secuencias codificantes fueron clonadas luego en el vector pcDNA3/EGFP digerido con AgeI, hechas de extremos romos por llenado y digeridas posteriormente con las enzimas HindIII o SacII. Este dio como resultado sitios de fusión en las posiciones de aminoácidos DGV₂₉₁ para JAM-2 y QPS₂₈₅ para JAM-1. La transfección de células CHO se llevó a cabo según se ha descrito anteriormente (Ballestrem et al., 1998, J. Cell Sci., 111:1649-1658).

10 Se seleccionaron transfectantes estables utilizados para ensayos de permeabilidad, cultivando durante dos semanas células CHO transfectadas, en un medio que contenía 1 mg/ml de G418. Se aislaron colonias resistentes y se comprobó la intensidad de la fluorescencia de EGFP por citometría de flujo (aparato FACScalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA) y localización de la fluorescencia por microscopía (Axiovert, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Se efectuó una microscopía de vídeo de lapso de tiempo usando un microscopio de fluorescencia Axiovert y el soporte lógico Openlab para la obtención de imágenes.

15 El vector pcDNA3 de expresión de mamíferos (Invitrogen, Leekm Holanda) fue modificado por integración de las secuencias codificantes de Flag-Tag (G. Wiedle, Dep. of Pathology, CMU, Ginebra). Las construcciones de Flag-Tag que contenían secuencias codificantes para las formas solubles de las proteínas de JAM, CRAM-1 y CRAM-2 fueron preparadas mediante PCR. En todos los casos, los cebadores directos fueron diseñados para adaptar la región de iniciación ATG. Los cebadores inversos fueron diseñados en las secuencias que codifican la región de la rólula para la una forma soluble de Ig o en la secuencia que codifica la región entre los dominios C2 y transmembranal de dos moléculas solubles de dominios de Ig. Todos los cebadores inversos tenían extensiones de 3' que contenían un sitio de restricción XbaI para clonación directa en el marco de lectura del vector de Flag-Tag modificado. Se empleó DNA polimerasa de pfu en la PCR para evitar mutaciones frecuentes (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Los fragmentos obtenidos de la PCR fueron sometidos a digestión luego con XbaI y clonados en el vector pcDNA-3 Flag-Tag, se sometió a digestión con EcoRI, se llenó por Klenow y se siguió por un digerido con XbaI.

25 Reactivos y análisis de inmunofluorescencia

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales. anti-PECAM (GC51, IgG_{2a} de la rata; EA.3, IgG₁ de la rata) y anti-JAM (H202.106.7.4, IgG₁ de la rata) (Malergue et al., 1998, Mol. Immunol. 35:1111-1119; Piali et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23:2464-2471).

30 El grupo de anticuerpos CRAM contra JAM-2 fue generado en el laboratorio usando técnicas estándar, y una molécula recombinante soluble como inmunógeno (Aurrand-Lions et al., 1996, Immunity. 5: 391-405). Los hibridomas seleccionados fueron seleccionados mediante el ensayo ELISA para producir anticuerpos que reconocían específicamente la molécula recombinante, soluble, de JAM-2. Los clones positivos fueron ensayados posteriormente sobre células CHO transfectadas con cDNA de JAM-2 (no indicado).

35 Todos los anticuerpos CRAM son del isotipo IgG₁ ó IgG_{2a} excepto el CRAM-25F24, que pertenece a la subclase IgG_{2b}. Los anticuerpos fueron purificados en una columna de Proteína G Sepharose (Pharmacia Biotech Europe, Dübendorf, Suiza) según las indicaciones del fabricante. El mAb CRAM-19H36 se utilizó para inmunoprecipitación, mientras que el CRAM-18F26 fue el reactivo utilizado para los ensayos inmunohistoquímicos. Se obtuvieron resultados similares con los mAbs CRAM-4H31 y CRAM-17D33.

40 El análisis de inmunofluorescencia se realizó usando reactivos secundarios acoplados a FITC o Texas Red (Jackson Immunoresearch, Milan AG, La Roche, Suiza) para ensayos de citofluorimetría e inmunohistoquímica, respectivamente

45 Para la inmunohistoquímica, las muestras fueron fijadas 5 minutos con metanol frío (-20°C). Las muestras fueron rehidratadas en el seno de PBS, gelatina, 0,2%, Tween 20, 0,05%, e incubadas durante la noche con los anticuerpos primarios antes de lavar, y reveladas con el reactivo secundario apropiado acoplado a Texas Red. Para el análisis de células endoteliales de reciente aportación, se llevó a cabo disociación de tejidos recién diseccionados usando digestión con colagenasa/dispa, según procedimientos operatorios establecidos (Kramer et al., 1984, J. Cell Biol. 99:692-698). Las células disociadas fueron teñidas durante 2 horas a 37°C Dil-Acetylated LDL (Molecular Probe Europe BV, Leiden, Países Bajos) antes de someter a tinción con anti-CRAM-19 y sonda de cabra anti-rata-FITC. Después de tres lavados las células fueron teñidas con anti-CD31 biotinilado (Pharmingen) y Rojo de estreptavidina 670 (Life technologies AG, Basilea, Suiza).

50 Se analizó la expresión de JAM-1 ó JAM-2 en células positivas para los dos marcadores de células endoteliales: Acetylated-LDL (FL-2) y CD31 (FL-3). Se obtuvieron testigos negativos omitiendo el anticuerpo primario.

Inmunoprecipitaciones

- 5 Se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones según se ha descrito anteriormente (Aurrand-Lions et al., 1997, Cellular Immunology. 176:173-179) usando para lisis solución tampón de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X100 al 0,5%, NP40 al 0,5%, como cocktail inhibidor de proteasas (Roche Diagnostica Ltd., Rotkreuz, Suiza). Después de inmunoprecipitación, SDS/PAGE y transferencia a membrana de nitrocelulosa, las proteínas biotiniladas fueron reveladas usando estreptavidina acoplada a peroxidasa (Jackson Immunoresearch) y ECL (Amersham Pharmacia Biotech. GB).

Ensayos de permeabilidad

- 10 La permeabilidad se midió usando cámaras Transwell (6,5 mm de diámetro, filtros PC, tamaño de poro 0,4 μm , Costar Corp.). Brevemente, 1×10^4 células CHO transfectadas o sin transfectar fueron cultivadas a confluencia sobre filtros revestidos previamente durante 30 minutos con gelatina al 0,2%. Después de 5 días se cambió el medio por medio Nut/F12 sin FCS calentado previamente (500 μl en la cámara inferior y 200 μl en la cámara superior). Se añadió en la cámara superior FITC-dextrano (PM 38.900, Sigma Chemical Co.) a una concentración final de 1 mg/ml.
- 15 Al cabo de 1 hora las cámaras fueron separadas y se leyó directamente la fluorescencia de la cámara inferior usando Cytofluor II. Se calculó la intensidad media de la fluorescencia de cinco cámaras independientes y se comparó usando comparaciones desapareadas del soporte lógico Statview y del ensayo de la t. Para normalizar los experimentos se tomo como 100% el valor de la intensidad media de la fluorescencia obtenida con células CHO de tipo salvaje.

20 Transfección y purificación de moléculas solubles

- 25 Una transfección transitoria de T 293, Bosc 23 ó la transfección estable de células CHO con las construcciones solubles Ig1Do e Ig2Do Flagtag/pcDNA-3 fueron llevadas a cabo usando Reactivo Lipofectamina según las indicaciones del fabricante (Gibco BRL, Paisley, Escocia) Después de la transfección se recogieron los sobrenadantes cada dos días durante un período de diez días. Bolas M2 (Kodak, New Haven, EE.UU.) enlazadas covalentemente a anticuerpo anti-Flag fueron lavadas dos veces con PBS que contenía una Mezcla de Inhibidor de Proteasas (Boehringer Mannheim, Alemania). Las bolas fueron incubadas después a 40° durante 3 horas con sobrenadante procedente de las células transfectadas. Después de cinco lavados con PBS que contenía inhibidores de proteasa, se rellenó una columna con las bolas y las moléculas recombinantes fueron eluidas con una solución tampón de glicina 10 mM, pH 3,4, según las indicaciones del fabricante. Las fracciones eluidas que contenían las proteínas recombinantes fueron concentradas después sobre Centricon-10 (Millipore) y dializadas frente a PBS.

30 La concentración proteínica final se determinó usando el ensayo Micro BCA (Biorad). Los productos purificados fueron sometidos luego a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, seguida de tinción con azul de coomassie, para analizar su pureza.

Ensayos de trans migración

- 35 Se llevó a cabo trans migración de leucocitos a través de las células endoteliales según se ha descrito anteriormente (Wheerasinghe et al., 1998, J. Cell Biology. 142: 595-607). En breve, 1×10^5 células t-end fueron cultivadas durante dos días en pocillos "transwell" (filtros de policarbonato, tamaño de poro 5 μm , Costar) en presencia de 1 μg de moléculas recombinantes solubles de Ig: sJAM 2do ó sCRAM-1 2do. Al cabo de dos días se añadió al compartimento superior 1×10^6 leucocitos obtenidos de nódulos linfáticos y placas de Peyer, y se monitorizó cada hora el número de células que habían trans migrado durante el experimento. Al cabo de 4 horas, las células que habían trans migrado obtenidas de cinco pocillos independientes fueron reunidas y sometidas a análisis citofluorimétrico para los marcadores de células B y T, B220 y CD3. Los resultados fueron obtenidos usando un aparato Facscalibur y el programa de análisis Cell-Quest. (Becton Dickinson).

- 45 Para un ensayo de trans migración con esplenocitos, 3×10^5 células endoteliales fueron sembradas en unidades "transwell" (filtros de policarbonato, tamaño de poro 8 μm , Costar) dejando que las células formaran una monocapa durante 18 horas. Se retiró el medio del compartimento superior y se añadieron al compartimento superior 1×10^6 leucocitos en el seno de 100 μl , preparados recientemente a partir de bazo por centrifugación Ficoll. Se añadió SDF-1 al medio (concentración final: 40 nM) situado en el compartimento inferior para establecer un gradiente de quimioquinas entre los compartimentos inferior y superior. Para el experimento con anticuerpos se añadieron los anticuerpos purificados 18-F26 ó 19-H36 en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, en el compartimento superior con esplenocitos. Al cabo de 4 horas, los leucocitos que habían trans migrado (en el compartimento inferior) fueron cosechados y contados. Los resultados se expresaron como % de la cantidad de entrada.

RESULTADOS

Exposición Diferencial Dirigida

5 La regulación de genes de células endoteliales depende de su medio ambiente. La presente invención ha sido dirigida a la identificación de genes que sufren regulación por el contacto del endotelio con células tumorales. Para este fin, se desarrolló un ensayo *in vitro* usando el cultivo conjunto de células tumorales de melanoma (B16) con una línea celular de endoteliomas (t-end). RNA total extraído desde la mezcla se usó como molde para preparar cDNA
 10 sometido a una selección diferencial por PCR. El cDNA obtenido desde las células endoteliales o de melanoma cultivadas por sí solas, se utilizó como testigos. Los tres tipos diferentes fueron comparados para identificar los transcritos regulados por las condiciones del cultivo conjunto. Para limitar el análisis a las secuencias que codifican moléculas de la superficie celular de la familia de Ig, se emplearon cebadores parcialmente degenerados que tenían como objetivo la secuencia en torno a la cisteína del extremo C-terminal de los dominios C2 de moléculas de la superfamilia de Ig. El tipo más reproducible de productos de PCR se obtuvo utilizando cebadores que codifican la secuencia YYCxAS1 (Fig. 7A). Este método mejorado de técnica de exposición de RNA se denominó TDD por
 15 "Exposición Diferencial Dirigida" (Targeted Differential Display).

En experimentos de TDD repetidos, fueron identificados dieciséis genes expresados diferencialmente. Después de clonación y análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, tres de los dieciséis productos de la PCR eran
 20 candidatos posibles de miembros desconocidos de la superfamilia de Ig. Uno de los tres candidatos (CRAM-1) fue escogido para una investigación adicional. Cuando se cultivaron por separado, las células endoteliales t-end.1 y las células de melanoma B16 expresaron altos niveles del transcrito de CRAM-1. Sin embargo, en condiciones de cultivo conjunto, el nivel de expresión de CRAM-1 estaba regulado a la baja (Fig. 7B). La traducción de un fragmento de 350 bp de longitud, correspondiente a CRAM-1, mostró la secuencia de aminoácidos YYCxAS que indica los extremos de un dominio C2 de Ig seguido de un marco de lectura abierto (ORF) que contenía una extensión hidrófoba de 18 aminoácidos que señalaba una región transmembranal.

25

CRAM-1, un miembro de la Superfamilia de Inmunoglobulinas

La comparación de secuencias entre la secuencia de productos de la PCR y de bases de datos de nucleótidos, reveló secuencias homólogas e idénticas en bases de datos de ESTs del ratón. La presencia de ESTs indicó que el
 30 producto de la PCR correspondía a una secuencia expresada *in vivo*. Se encontraron tres ESTs que contenían una secuencia de 300 bp de longitud en su extremo 5', que era idéntica al producto de 300 bp de TDD. Los extremos 3' de cada EST contenían una cola de poli-A. En total los ESTs tenían una longitud de 1270 bp y correspondían al extremo 3' del transcrito de CRAM. Dado que el extremo 5' del transcrito estaba perdido en el clon de cDNA de EST, éste se obtuvo mediante 5'RACE-PCR. La secuencia codificante completa de 1980 nucleótidos de longitud que
 35 resultado, del cDNA de CRAM-1 postulado, se muestra en la Fig. 8A. Había un sitio de consenso fuerte (GACATGG) de iniciación de la traducción 16 bp aguas abajo del extremo 5', seguido de un único ORF predictor de una proteína de 310 aminoácidos. La región de 31 aminoácidos, que seguía a la metionina de iniciación potencial, era característica de un péptido señal. Se predijo que el sitio de escisión estaba en Ala 31-Val 32.

La estructura putativa de la proteína de la CRAM-1 murina se muestra en la Fig. 8B y consiste en una región extracelular con una cadena pesada variable y un tipo 2 constante semejante al dominio de las inmunoglobulinas
 40 (Pfam, The Sanger Centre and Blast) con dos sitios de glicosilación potenciales unidos a N (aa 104 y 192). El análisis de la hidrofobicidad (TmPred, ISREC) predijo una región transmembranal entre las posiciones 242-260. El dominio citoplásmico postulado consistía en 49 aminoácidos y contenía varios sitios de fosforilación Ser/Thr y Tyr altamente conservados (Fig. 8A, restos en *italica*). La búsqueda de tipos conocidos con el programa Prosite identificó los motivos SSK/SYK como proteína quinasa C, SKQD/TSEE como CK2 y KQDGESY/KHDGVNY como
 45 señales de fosforilación de Tirosina quinasa.

JAM, CRAM-1 y CRAM-2 definen una nueva subfamilia

Varias proteínas mostraban homología alta con la molécula CRAM-1. Se encontró que dos miembros de la superfamilia de Ig: antígeno A33 humano y parte de la molécula de adhesión de células neurales del ratón, N-CAM,
 50 tenían una homología de 41% y 46%, respectivamente, con CRAM-1. JAM, otro miembro de la superfamilia de Ig tenía una estructura similar a la de CRAM-1 con una identidad de secuencias de aminoácidos de 34%, y una homología de 54%. La identidad importante entre JAM y CRAM-1 se usó para descubrir una tercera secuencia estrechamente afin, en las bases de datos de EST, a saber, CRAM-2. La identidad entre las tres moléculas sugirió la existencia de una nueva subfamilia de moléculas dentro de la superfamilia de Ig (Fig. 9). La homología concernía no

5 solo a la estructura general de los dominios V y C2 (C54 a C118 y C147 a C235, en la Fig. 9) sino también a secuencias del interior de los dominios citoplásmicos. De modo interesante, las regiones más divergentes entre las tres moléculas se encontraron al comienzo del dominio V (posición 40 a 60) y en la parte citoplásmica proximal (posición 280 a 300). Las funciones de estas dos regiones corresponden a secuencias implicadas en la unión de ligandos y transducción de señales de otros miembros de la superfamilia de Ig, lo que sugiere un papel importante de las moléculas JAM, CRAM-1 y CRAM-2 en la comunicación de célula-célula.

Distribución en tejidos del mRNA de JAM, CRAM-1 y CRAM-2

10 La expresión de los tres transcritos en células de origen diferente, se detectó usando RT-PCR. Todas las líneas celulares ensayadas, endoteliales, epiteliales y de la mayoría de los tumores, eran positivas, aunque en grados variables, para los diferentes transcritos (Fig. 10A). El nivel máximo de expresión de CRAM-1 se encontró en la línea de células TME de HEV transformada por SV40 (calle 9), y en la línea de células endoteliales embrionarias e-end 2 (calle 4). Los transcritos de CRAM-2 y JAM pusieron de manifiesto una distribución más restringida, y se encontraron en líneas de células endoteliales adultas junto con el transcrito de CRAM-1 (calles 3, 7, 9 y 12).
15 Notablemente, los transcritos de JAM y CRAM-2 estaban fuertemente regulados a la baja por el tratamiento con TNF de células endoteliales, mientras que el nivel del transcrito de CRAM-1 permanecía inalterado (calles 2 y 11). Interesantemente, una línea de células endoteliales embrionarias (calle 4) o una línea de células endoteliales adultas que representan una variante angiogénica de t-end (calle 6), falló para expresar JAM ó CRAM-2.

20 La distribución en tejidos del transcrito de JAM-2 fue explorada por transferencia Northern y comparada con la de JAM-1 (Fig. 14). El transcrito de JAM-2 tenía una longitud de 2 kb y era expresado altamente en tejido embrionario y en placas de Peyer, nódulos linfáticos, riñón y testículos de animales adultos. Una variante putativa de corte y empalme de 1,8 kb fue detectada en los testículos. La expresión del transcrito de JAM-2 era baja en el pulmón, el hígado, el bazo y el timo. Las abundancias relativas de JAM-1 y JAM-2 fueron comparadas durante la embriogénesis: el mRNA que codifica JAM-2 pudo detectarse tan pronto como el día 7,5 después del coito, mientras que el mRNA de JAM-1 no se detectó, en absoluto, durante la embriogénesis.

25 Estos resultados sugieren que CRAM-1 es expresada ampliamente durante la embriogénesis y pone de manifiesto una expresión restringida a compartimentos epiteliales o endoteliales de tejidos adultos. Este hecho está de acuerdo con la idea de que desempeña un papel importante en el establecimiento y el mantenimiento de la organización polarizada de células.

JAM-2, una proteína de 45 kD, que depende de interacciones homofílicas para su localización en los contactos de célula-célula

30 Puesto que la línea celular TME derivada de HEV expresaba el máximo nivel de JAM-2, esta línea de células endoteliales se usó para estudiar adicionalmente la localización subcelular de JAM-2 y compararla con la de JAM-1. La localización de la proteína JAM-2 sobre la superficie de las células endoteliales, estaba restringida a los contactos de célula-célula (Fig. 11A, a). La tinción para JAM-2 fue más débil que la observada para JAM-1 y menos prominente en las extensiones membranales entre células.

35 Después se investigó si la proteína JAM-2, presente en los contactos de célula-célula, interactuaba homofílicamente con JAM-2 o si interactuaba heterofílicamente con otra molécula situada en la célula vecina. Para este fin la proteína JAM-2 fue fusionada con la proteína fluorescente verde (JAM-2-EGFP), y la construcción fue transfectada en células CHO. Cuando las células CHO transfectadas con el cDNA de JAM-2-EGFP alcanzaron confluencia solamente se observó JAM-2 en los contactos de célula-célula donde ambas células expresaban la proteína (Fig. 11B), mientras que los contactos entre células que expresaban y células que no expresaban eran debidos a JAM-2 (Fig. 11B, a, indicado por las puntas de flechas). El mismo resultado se obtuvo cuando se transfectaron células con la molécula quimérica JAM-1-EGFP (Fig. 11B, b). Este hecho indicó que o bien JAM-2, o bien JAM-1, necesitaban interacciones homofílicas para localizarse en los contactos de célula-célula.

45 Para caracterizar bioquímicamente JAM-2, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones de JAM-2 o de proteínas quiméricas con EGFP, expresadas por la línea celular TME o por células CHO transfectadas, respectivamente (Fig. 11C y D). El anticuerpo anti-JAM-2, CRAM-19H36, inmunoprecipitó una banda única de 45 kD desde un lisado de células TME (Fig. 11C, calle 3).

50 El peso molecular aparente era idéntico en condiciones tanto reductoras como no reductoras (no está indicado) y se correspondía con el peso molecular predicho deducido de la secuencia de aminoácidos de JAM-2 justificando cada sitio de N-glicosilación 5 kDa. La inmunoprecipitación de JAM-1 usando el anticuerpo específico anti-JAM, H202-106, dio como resultado una banda única de menor peso molecular (~ 42 kD, calle 2), lo que excluía una posible reacción cruzada entre los anticuerpos anti-JAM-2 y anti-JAM-1.

Las inmunoprecipitaciones de las proteínas recombinantes JAM-1-EGFP o JAM-2-EGFP después de biotilización de la superficie, dieron por resultado bandas anchas, únicas, de 70 y 73 kD, respectivamente, lo que indica que las moléculas habían sido expresadas sobre la superficie de células CHO transfectadas (Fig. 11D, calles 4 y 6). Estos pesos moleculares eran de esperar puesto que la EGFP posee un peso molecular de 28 kD.

5 Hermeticidad y emigración leucocitaria

Con objeto de entender como influyen las moléculas en la integridad de la monocapa de células endoteliales y como regulan la función del endotelio vascular, se llevaron a cabo ensayos de emigración transendotelial de leucocitos en presencia de moléculas recombinantes, solubles, JAM o CRAM-1. Se cultivaron células endoteliales durante dos días en presencia de sJAM-Ig2Do o sCRAM-1-Ig2Do. La integridad de la monocapa no resultó afectada durante este período, debido, probablemente, a la redundancia molecular del mecanismo de formación del contacto de célula-célula. El ensayo de transmigración se efectuó en presencia de 1 µg de moléculas recombinantes solubles. Como muestra la Fig. 20A, el número de células que habían transmigrado estaba escasamente afectado por la presencia de sJAM-Ig2Do (cuadrados) durante las tres primeras horas. Al cabo de cuatro horas, el número de células que habían transmigrado había aumentado en comparación con el del testigo (línea de trazos). Por el contrario, la presencia de sCRAM-1-Ig2Do (círculos cerrados) había reducido fuertemente el número de células que habían transmigrado.

Dado que las poblaciones de leucocitos eran heterogéneas, se evaluó si sCRAM-1-Ig2Do actuaba sobre una subpoblación de leucocitos específica o si la transmigración había sido bloqueada sin especificidad. Para este fin, las células que habían transmigrado fueron marcadas con los marcadores linfocitarios CD3 y B220 (Fig. 20B).

20 Notablemente, sCRAM-1-Ig2Do bloqueó específicamente la transmigración de leucocitos no linfoides, es decir, células de linaje mieloide (grupo central, columna rayada). Por el contrario, sJAM-Ig2Do aumentó escasamente el número de células T que habían transmigrado (grupo izquierdo, columna blanca) sin efecto alguno sobre otras subpoblaciones de células.

25 Además, al usar células endoteliales transfectadas con CRAM-1 para el ensayo de transmigración, se observó una transmigración acrecentada (Fig. 12), mientras que la transfección de CRAM-2 careció de efecto sobre la transmigración. Cuando se añadió al ensayo SDF-1, la emigración leucocitaria transendotelial alcanzó el 20%. Este hecho fue bloqueado parcialmente por anticuerpos monoclonales contra CRAM-1.

30 Estos resultados indican que la inclusión de CRAM-1 entre células endoteliales puede regular la función de la capa endotelial. Podría esperarse que las moléculas de esta familia pudieran llegar a constituir una barrera cuando las células endoteliales alcanzan confluencia. A este fin, se exploró la regulación de transcritos de CRAM-1 en células endoteliales, en diferentes condiciones de cultivo.

CRAM es regulada a la baja por una confluencia alta

35 Puesto que el transcrito que codifica CRAM-1 no estaba regulado por el TNF, sino que era regulado a la baja cuando el endotelio se cultivaba junto con células tumorales, se utilizó un ensayo de confluencia para explorar adicionalmente esta regulación. En confluencia baja, las células ciclaban activamente y no ocurrieron interacciones debidas a CRAM-1, mientras que en confluencia alta las células se dividían menos y estaba comprometida la molécula CRAM-1. Se determinó el nivel de expresión del mRNA de CRAM-1 en diversas densidades celulares mediante RT-PCR semicuantitativa. Como indica la Fig. 13, el nivel de expresión de transcritos de CRAM-1 disminuyó al alcanzar confluencia (calles 1, 2 y 3 de la Fig. 13, que corresponden, respectivamente, a confluencias de 100, 50 y 10%). Este efecto apenas fue detectable con las células t-end, pero fue más pronunciado con la línea celular TME que expresaba altamente CRAM-1. La regulación a la baja de CRAM-1 en endotelios resultó intensificada también cuando las células endoteliales fueron cultivadas conjuntamente con células de carcinoma KLN 205 que por sí mismas no expresan CRAM-1. Esto confirmó el enlace existente entre la expresión de CRAM-1 y el ciclo celular dado que se había descrito que las células tumorales aumentaban la velocidad de crecimiento de células endoteliales debido al contacto. Merece la pena hacer notar que los resultados obtenidos con las células de carcinoma KLN 205 fueron idénticos al usado en la estrategia de clasificación original de los inventores con el tumor de melanoma B16. Esto indica un mecanismo general mediante el cual los tumores afectan al comportamiento endotelial.

50 JAM-2 es expresada altamente durante la embriogénesis, y queda restringido a subpoblaciones de células de HEVs y células endoteliales en tejidos adultos

Para definir mejor la distribución tisular de JAM-2, se llevó a cabo un análisis inmunohistológico sobre cortes de nódulos linfáticos de riñón y mesentéricos (Fig. 15), que expresaban los niveles máximos de transcrito de JAM-2. En la región cortical del riñón, se detectó una tinción específica de estructuras tubulares con los mAbs anti-PECAM

(GC51) o anti-JAM-2 (CRAM-XVIIIIF26), mientras que los mAbs anti-ZO-1 o anti-JAM-1 teñían predominantemente las células epiteliales tubulares (no se indica).

Por consiguiente, los inventores concentraron su atención sobre estructuras vasculares, que se sumergen en la médula y corresponden a estructuras de venas radiales o estructuras endoteliales de vasos rectos. Para este fin, se realizaron cortes seriados y se identificaron las estructuras vasculares con la tinción de anti-PECAM (Fig. 15d). En la región equivalente de secciones vecinas, se detectaron tinciones interendoteliales lineales con anti-JAM-2, anti-Jam-1 o anti-ZO-1 (Fig. 15 a, b y c, respectivamente). En cortes de nódulo linfático mesentérico, se obtuvo una tinción típica de las vénulas endoteliales altas (HEVs) con el mAb anti-JAM-2 (Fig. 15A). Se encontró también que las HEVs expresaban JAM-1, ZO-1 ó PECAM (Fig. 15 f, g y h), con pequeñas diferencias en la localización subcelular de las tinciones (Fig. 15 e-h, inserciones). En la zona cortical de los nódulos linfáticos mesentéricos, se observó una tinción típica de los senos subescapulares con todos los anticuerpos (Fig. 15 i-l), que correspondía a la tinción de vasos linfáticos aferentes. Por tanto, la tinción con el mAb CRAM-18F26 anti-JAM-2 está restringida a ciertas células endoteliales o a estructuras estrechamente asociadas con la vasculatura-

Con objeto de aclarar si la tinción de células endoteliales justificaba las fotografías mostradas en la Fig. 15, se realizó un análisis citofluorimétrico de expresión de JAM-2 sobre varias líneas celulares o diversas células endoteliales recién aisladas procedentes de tejidos disociados. Las líneas de células endoteliales (tEnd.1, eEnd.2 y TME) expresaron niveles bajos de JAM-2 sobre la superficie celular y niveles variables de JAM-1 (Fig. 16 A).

El análisis citométrico de células endoteliales aisladas recientemente se llevó a cabo mediante tinción triple de suspensiones celulares obtenidas después de disociación de los órganos con colagenasa/dispasa. Las células endoteliales fueron identificadas mediante células teñidas con PECAM/CD31 y LDL-Acetilada, ambos (Voyta et al., 1984, *J. Cell Biol.* 99:2034). La tinción por JAM-2 ó JAM-1 sobre esta doble población celular positiva, se expone en la Fig. 16B. En el riñón y en placas de Peyer, todas las células aisladas positivas respecto a CD31 y LDL-Acetilada, fueron teñidas también por JAM-2, lo que significa que, por lo menos en estos órganos, las células endoteliales expresaban JAM-2 *in vivo*. Cuando la tinción se llevó a cabo sobre células obtenidas de nódulos linfáticos, la expresión de JAM-2 se encontró solamente en una subpoblación celular, lo que refleja una posible heterogeneidad de fenotipos de células endoteliales dentro de este tejido.

En conjunto, los resultados de los análisis citométrico e inmunohistoquímico ponen de manifiesto que la molécula JAM-2 es expresada conjuntamente con JAM-1 por las células endoteliales del riñón, placas de Peyer y nódulos linfáticos.

30 Localización dinámica de JAM-2 para los contactos de célula-célula

Para analizar el mecanismo mediante el cual JAM-2 se localizaba específicamente en los contactos de célula-célula, se utilizó microscopía de vídeo de tiempo transcurrido. Las células CHO, transfectadas establemente con la molécula quimérica fluorescente, fueron tripsinizadas y depositadas en portaobjetos de cámaras para formar imágenes. Después de la extensión de las células, la expresión superficial de JAM-2-EGFP no era uniforme, sino que estaba bastante arrimada en los contactos de célula-célula (Fig. 17A, células representadas por asteriscos). Durante la formación de nuevos contactos de célula-célula, se observó la relocalización de JAM-2-EGFP en uniones celulares y se detectó una señal intensa de fluorescencia en el nuevo punto de contacto entre las células que formaban el nuevo contacto de célula-célula (flechas). La proteína quimérica estaba enriquecida en las protrusiones membranales existentes entre las células en contacto, lo que condujo a las imágenes "semejantes a una cremallera" observadas después de 12 ó 18 minutos. Interesantemente, la localización de JAM-2 en los contactos primarios de célula-célula no se perdió durante la formación del nuevo contacto membranal (véanse los contactos celulares de la esquina superior izquierda). Este descubrimiento indicó que JAM-2-EGFP estaba relocalizada específicamente en el nuevo contacto celular, y que, por compromiso, su localización era estable.

Para estudiar, además, los requisitos de localización de JAM-2, se llevó a cabo una microscopía de vídeo de tiempo transcurrido después de dañar la monocapa de células (Fig. 17B). Las células del borde dañado mantenían la molécula JAM-2 en sus sitios de contacto intactos (punta de flecha), pero la localización de JAM-2 se había perdido en el sitio dañado (flechas), lo que indica que era necesario el compromiso de JAM-2 por un ligando existente sobre la célula opuesta para mantener su localización membranal. Durante un período de 90 minutos después de la lesión, las células que bordeaban el daño comenzaron a emigrar hacia la zona dañada. Interesantemente, estas células mantenían contactos con las células vecinas mediante protrusiones membranales que eran brillantemente fluorescentes, es decir JAM-2 positivas (punta de flecha). Estos resultados apoyaron la hipótesis de que las interacciones homófilas de JAM-2 pueden desempeñar un papel importante en el establecimiento o mantenimiento de los contactos de célula-célula.

JAM-2 aumenta la hermeticidad de la monocapa y participa en complejos funcionales herméticos

Puesto que se ha puesto de manifiesto que cierto número de moléculas que participan en la conexión de célula-célula regulan la permeabilidad paracelular de monocapas de células, se analizó si la molécula JAM-2 podía afectar también a esta función. La transfección de JAM-2-EGFP redujo la permeabilidad paracelular al FITC-dextrano y mejoró la hermeticidad de monocapas de células CHO en un 42,5%; mientras que la transfección de la molécula TAC (IL2R α), no afin, no redujo significativamente la permeabilidad paracelular de células CHO transfectadas (Fig. 18). La transfección de JAM-1-EGFP redujo también la permeabilidad paracelular de monocapas de células CHO transfectadas.

Estos resultados plantean la pregunta de si las moléculas quiméricas eran capaces de participar en un compartimento subcelular especializado tal como el de uniones herméticas, en células epiteliales polarizadas.

Para responder a esta pregunta las proteínas quiméricas de EGFP fueron transfectadas en células MDCK, y se comparó su localización subcelular con la del marcador de unión hermético: ocludina. Como muestra la Fig. 19A, cuando se analizaron fotografías tomadas en serie cada 0,9 μm para determinar la fluorescencia de EGFP y se comparó con la tinción de ocludina, se observó que la molécula JAM-2-EGFP estaba enriquecida específicamente en los contactos de célula-célula al nivel de la unión hermética. A nivel basal (izquierda), se observaron puntos de fluorescencia de EGFP. Un análisis similar (Fig. 19B) de células MDCK transfectadas con JAM-1-EGFP mostró una co-localización similar a la obtenida con ocludina. No obstante, la distribución de la fluorescencia de JAM-1-EGFP era menos continua que la observada para JAM-2-EGFP al nivel de las uniones herméticas.

DISCUSIÓN

Este ejemplo expone el uso de una nueva estrategia de selección para identificar transcritos regulados que codifican miembros de moléculas de adhesión de la superfamilia de Ig. Se describe en esta memoria la clonación con este método de la molécula CRAM-1 como un transcrito regulado. La regulación observada en células endoteliales cultivadas en presencia de tumores, ha sido confirmada por RT-PCR semicuantitativa y se ha puesto de manifiesto que es dependiente de la fase de crecimiento de las células. Debido a la diferencia de expresión en condiciones cambiantes de la confluencia celular, se adoptó el nombre CRAM-1 para la "Molécula de Adhesión Regulada en Confluencia- 1".

También se describe en esta memoria una secuencia estrechamente relacionada con la de CRAM-1 denominada CRAM-2. CRAM-1 y CRAM-2 representan los prototipos de una nueva subfamilia de moléculas de adhesión que incluye, asimismo, la molécula JAM descrita recientemente (Chretien et al., 1998, Eur. J. Immunol. 28, 4094-4104; Malergue et al., 1998., Mol. Immunol. 35, 1111-1119).

CRAM-1 y JAM son expresadas, preferentemente, por el tejido endotelial y el tejido epitelial de los contactos de célula-célula y comunican propiedades especiales a capas polarizadas. El efecto de moléculas recombinantes solubles en un ensayo de emigración transendotelial y la regulación de JAM, CRAM-1 y CRAM-2, indican que estas tres moléculas desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la fisiología vascular.

La nueva estrategia de selección, denominada Exposición Diferencial Dirigida (Targeted Differential Display) (TDD), ha demostrado que es una técnica eficaz para amplificar selectivamente cDNAs de interés. La técnica TDD ha aprovechado, con éxito, el uso de cebadores parcialmente degenerados para comunicar una dirección selectiva hacia la región conservada, Y(Y/Q/R)CXAS, de dominios de Ig tales como el C2. Experimentos repetidos han conducido a tipos de exposición reproducibles. De 16 transcritos expresados diferencialmente, tres corresponden a genes con homología importante con las secuencias de Ig conservadas, Este aumento de especificidad actúa superando las dificultades principales existentes en las ya conocidas técnicas de la clásica identificación génica de RNA y de exposición diferencial. La identificación génica de RNA ha sido empleada durante largo tiempo para la identificación de genes expresados diferencialmente. Sin embargo, debido a los cebadores específicos secuenciales empleados, este método detecta solamente los transcritos de proteínas seleccionadas y ya conocidas. Por otra parte la exposición de RNA emplea cebadores aleatorios y lleva consigo la amplificación inespecífica de transcritos. La pretensión, en este caso, es indicar con toda precisión cualesquiera diferencias existentes en los niveles de mRNA de dos sistemas biológicos sometidos a comparación. La técnica TDD es un método de selección avanzado que combina la especificidad de la técnica de identificación génica de RNA con la degeneración de la Exposición Diferencial de RNA, obteniendo como resultado selectividad. Debido a la elección como objetivo de transcritos afines, esta técnica ha reducido significativamente el tiempo necesario para realizar la selección. Se hace posible, por tanto, la identificación de nuevos miembros de familias de proteínas específicas. Esto constituye una mejora sustancial de las estrategias de selección inespecíficas que habían sido indicadas..

Esas características comunes fueron usadas para construir proteínas recombinantes con objeto de estudiar las funciones de JAM, CRAM-1 y CRAM-2. En el presente ejemplo se describen efectos de sJAM-Ig2Do y sCRAM-1-Ig2Do en un ensayo de trans migración in vitro. Pudieron observarse efectos específicos de bloqueo sobre la emigración de células mieloides, con sCRAM-1-Ig2Do, al tiempo que el sJAM-Ig2Do ponía de manifiesto solamente un pequeño efecto sobre los linfocitos.

5

Los transcritos de JAM y CRAM-2 mostraron una distribución tisular y una regulación de la expresión similares bajo la influencia del TNF, lo que indica que actúan mediante mecanismos fisiológicos similares. Por el contrario, los transcritos de CRAM-1 no son regulados por el TNF sino más bien por el grado de proliferación o por la densidad de las células endoteliales. En efecto, la sobreexpresión de transcritos de CRAM-1 en células en ciclación y su regulación a la baja en células quiescentes, indican que esta molécula participa en el establecimiento de una monocapa continua. Su función en monocapas confluentes de células es el mantenimiento de la capa de células endoteliales y de las propiedades relacionadas con ello. Dado que diferentes poblaciones de leucocitos han de emigrar hacia el sitio de la respuesta inmunitaria, se opina que las células no linfoides emigran por medio de un mecanismo que depende de CRAM-1, mientras que las células linfoides emigran por medio de JAM o CRAM-2. En este caso, la respuesta inmunitaria puede ser modulada usando combinaciones de diferentes moléculas recombinantes solubles.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que pertenece a una subfamilia de la Superfamilia de Inmunoglobulinas humanas, seleccionado entre el grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos de las Moléculas de Adhesión Reguladas en Confluencia-1 (CRAM-1), murinas, según se representa en la Fig. 3, fila superior;
 - 5 b) la forma madura del polipéptido según (a), en la que dicha forma madura comienza en el aminoácido de la posición 32;
 - c) un polipéptido que pone de manifiesto, al menos, 70% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las Moléculas de Adhesión Reguladas en Confluencia-1 (CRAM-1), murinas, según se representa en la Fig. 3, fila superior, cuyo polipéptido estimula la emigración de linfocitos o hace disminuir la permeabilidad paracelular de monocapas celulares;
 - 10 d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la CRAM-1 humana, según se representa en la Fig. 6, grupo medio;
 - e) la forma madura del polipéptido según (d), en la que dicha forma madura comienza en el aminoácido de la posición 32; y
 - 15 f) un polipéptido con un aminoácido que es, al menos, 70% homólogo con el polipéptido según (d), cuyo polipéptido estimula la emigración de linfocitos o hace disminuir la permeabilidad paracelular de monocapas celulares
- para usar como un medicamento.
- 2.- Un polipéptido soluble de CRAM-1 que comprende el dominio V de CRAM-1 según se representa en la Fig. 2-2, capaz de bloquear la emigración transendotelial de leucocitos.
- 20 3.- El polipéptido soluble según la reivindicación 2, que comprende:
- a) el dominio V de la CRAM-1 murina, según se representa en la Fig. 2-2 ó en la Fig. 8;
 - b) el dominio V y el dominio C2 de la CRAM-1 murina, según se representa en la Fig. 2-2 o en la Fig. 8;
 - c) los aminoácidos 1 a 159 de la CRAM-1 murina, según se representa en la Fig. 8; o
 - 25 d) los aminoácidos 1 a 238 de la CRAM-1 murina, según se representa en la Fig. 8.
- 4.- Un polipéptido soluble según la reivindicación 2 ó 3, para usar como un medicamento.
- 5.- Un polipéptido soluble según la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de reacciones de inflamación.
- 6.- Un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:
- a) un polinucleótido que posee una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de nucleótidos de la CRAM-1 murina, según se representa en la Fig. 1 ó en la Fig. 8;
 - 30 b) un polinucleótido que posee una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido completo o una de sus partes, cuyo polipéptido posee una secuencia de aminoácidos que es, al menos, 70% homóloga con la secuencia de aminoácidos de la CRAM-1, según se representa en la fila superior de la Fig. 3, y cuyo polipéptido estimula la emigración de linfocitos o hace disminuir la permeabilidad paracelular de monocapas celulares;
 - 35 c) un polinucleótido que posee una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de nucleótidos de la CRAM-1 humana, según se representa en la Fig. 6; y
 - d) un polinucleótido que posee una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido completo o una de sus partes, cuyo polipéptido posee una secuencia de aminoácidos que es, al menos, 70% homóloga con la

secuencia de aminoácidos de la CRAM-1 humana, según se representa en la Fig. 6, y cuyo polipéptido estimula la emigración de linfocitos o hace disminuir la permeabilidad paracelular de monocapas celulares,

para usar como un medicamento.

- 5
- 7.- Un anticuerpo dirigido contra el polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es capaz de inhibir la emigración transendotelial de leucocitos.
 - 8.- Un anticuerpo según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo está acoplado a una toxina, un marcador radiactivo o un fármaco.
 - 9.- Un anticuerpo según la reivindicación 7 u 8, para usar como un medicamento.

```

>muCRAM-1
CAAGACATTCCTCCCTGGACATGGCGCTGAGCCGGGGCTGGGACTTCGACTGLACGGGGGGCTGCCTCACTTCTTCTGCTGCTG
CTGCTCTTCAGGGGCTGCATGATAGAGCCAGTGAATCTCAAATCCAGCAACCGAAACCCAGTGGTACATGAATTTGAAAG
TGTGGAAATTGCTTGGATCATTACGCACTCACAGACAAGTGACCCTAGGATTGAATGGAAAGAAAATCCAAGATGGCCAAA
CCACATATGTGTATTTTGGACAAAGATTCAAGGAGACCTGGCAGGTGGCACAGATGTGTTTGGAAAACTTCCCTGAGG
ATCTGGAAATGTGACACGATCGGATTCAGCCATCTATCGCTGTGAGGTGGTCTCTAAATGACCGAAAAGAAGTTGATGA
GATTACCATTGAGTTAATTTGTCAAGTGAAGCCAGTGACCCCTGTCTGCAGAATTCAGCCGGCTGTACCTGTAGGCAAGA
CGGCAACTGCGTGGCAAGAGAGCGAGGGCTATCCCCGGCTCACTACAGCTGGTACCGCAATGATGTGCCACTGCCT
ACAGATTCAGAGCCAAATCCCAGGTTCCAGAATTCCTCTTCCATGTGAAGTGGAGACAGGCACCTCTGGTTTTCAATGC
TGCCACAAGGACGACTCTGGCCAGTACTACTGCATTGCTTCCATGAAGCAGGTGCAGCCAGGTGTGAGGGGCAGGACA
TGGAAATCTATGATTTGAACATTTGCTGGGATTTATGGGGGAGTCCCTTGTGTCTTATTGTTCTTGTGTGATTAGGATG
GGCATCTGCTGTGCTACAGACGAGGCTGCTTCATCAGCAGTAAACAAAGATGGAGAAAGCTATAAGAGCCAGGGAAGCA
TGACGGTCTTAACTACATCCGACGAGTGGAGGGGTGACTTCAGACACAAATCGTCTTTGTTATCTGACACCTGTGGG
CTGGGAGAGCACATGCAAGTACCTCTGTTGGAAAGCTGGTCAAGGGCTGTGTGAGCCCGAGAGCTCTGACAAAGGCCAC
CGGCAGAAAGCTTTTGTGTTGGCCAAAGTTGATGACTCCTTCCTTCTTCTCTTTAAACAAGCCACAAGAAATAA
AGGAAGCCTCCTGAAGATGGATGTAGACACAGATTTGTGTAGCCTGACCTCATATGGGGATTAGGGTGTCTCAAGG
CCTTTGTGCTCGCTTCCATGTCAGGGCAATTTGGACTGTTTTTGGCCAGGCTGTTAGCTGCCAGGAGAACACTG
GCAGAGAGAGGCTGAGGCGCTGGCTGCAAGTACAGCAGGCAACAGCCTGATGCCTGTGACAGTCCCGAGAAAGGTTTT
CAGGCAGTGCCTTGTCCCTGGACCTGACCCACCGTGTGGCTCTGTTGATGGCCAGTACTGTCAATTCATCCTGGA
GAATGTGTTTGGAAATCAGCATTTTATAAAAAACCCAAATCAGAAAGGTGAATTTGCTGTGGGAGAGGGGCTCTGACCC
AGGAACTCTCCTCCAGAGATGCCAGGAGATAGGAGAACCTGTCTGTCTTAAGTCTGAAATGGTACTGAAGTCTCCT
TTTCTATTGGTCTTGTCTTATTTTATAAAAAATTAACATTTCTAAATTTTGTAGAGATGTATTTGATTAAGTAAAGTTT
TATATAAACTGTAATATATTGCCATACAGTGTTCAAAACGTATTTTTTTATAATGAGTTCAACTTAAGGTAGAAGGCT
TGGGCTGCTAGTGTAAATTGGAAAATACCAAGTGTAAAGTCTTTAAGGAGTTTTCTAAGGAGGCTGGCTGAATATTC
CTTTGTTCAAAGAAGTTTAGCATTTTTATAAGAAAATTAAGTCTGTCTGACCACTGTGTCTTAGGAAACCATTAAAG
AATCCAATCTAAaaaaaaaaa

```

```

>muCRAM-2
CAGAAATTCGGCACGAAGGCTGGGGGGGGGGCCGACCTACGGGTCTCCCTCAAGAGCTAATCTCTGCcGCCACTCGC
TTAGgACCCCTGGGACACCGCTCCCGcGTCCAGcCCTCCCTCAACCTCTTCCACCCTCAAAAAGAAGGACTGTCCA
GACACCACGTCCTAGGGCCAGAAcGACCTGCCCCACGACAGTcGCTGGAGACACCCAGACCGGAGAGACTGACATCGGG
ACAGGACCCGCCCCCTCTGCTTCCACCTCTCAGGGACCTCCTCTGCTCCGCCCCGGGGCAGTGTGGGAGACCCAGCCG
CCTGTcGGCTCCTGCAGGGGACCCCTCAGCTAGGCAGCCAGCTGGCGCCCGGTAGATGGCGAGGAGCCCCAAGGCC
CCTGATGCTGCTGCTGTACACTACTTGATCGCTCGCCCTGGACTATCATAAGGCAAAATGGGTTTTCTGCATCAAAAGACC
ACCGTCAAGAAGTACAGTAATAGAGTCCAAAGAGGCTATTTGGCTTGTA AAAACCCCAAAGAAGACTACCTCCTCCAGA
CTGGAGTGAAGAAGGTGGGACAGGGGTCTCCTTGGTCTACTACCAACAGGCTCTCCAAGGTGACTTTAAAGACCGTGC
TGAGATGATAGATTTCAATATACGAATCAAAAATGTTACAAGAAGTGTGCTGGAGAGTATCGCTGTGAAGTACGGCTC
CGACTGAGCAAGGCCAGAACCTGCAGGAAGALAAAGTcATGTAGAAAGTACTAGTGGCTCCTGTCTTCCcGCCTGTGAA
GTGCCACTTCTGTTATGACTGGAAGTGTGGTGGAGCTACGATGCCAGGATAAAGAAGGAAAcCCAGCTCCGGAGTACAT
CTGGTTTAAAGATGGCACAAGTTTGCTAGGGAAATOCAAAAGGGCGGCACACACAACACAGCtCGTACACAATGAACAG
AaTCTGGAATTTCTGCAATCAACATGATTTCCAAGATGGACAGTGGAGAGTATTACTGCGAAGCCCGGAACCTCTGTGGSA
CaCGCAGTGCCTTGGGAAGCGAATGCAAGTAGATGTTCTCAACATAAGCGCATCATAGCAACGGTTGTGGTGGTGGC
CTTCTGTGATTTCTGTaTGTGGCCTTGGCACATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAGAAGAACTTCTTCCAGA
AGGGCAGTCTGCACTCAAAGTCACTACGATGgGCGAAAATGATTTCAgGCACACAAAATCCTTTATAATTTAAAGAAAT
TCCAGTTTTGgGCTGCCAAAAGCAGTGTGCACATGTTATTAATAATTTGTA AAAACTGTGTCTTACACTTGCAAAGTG
ATGAAGAAATATGAAGGGGAGTTCATCAGAAGTTTTATGATCTCTAACTCACAAGAAATATTTTAAAGCAAACGTTCTT
GCCATCACTAAATTAACAACCTGGCATCTTGTGTGACCTAAAGGAAATGTCTGGTAATATTCTGGTTTTTGAAGGCAAAT
GAATGTCAAGTTTGGAGTTGACTATATCACTGACTGTAAGGCTAATCCAAGAGCAAGAATATAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTC

```

Fig. 1

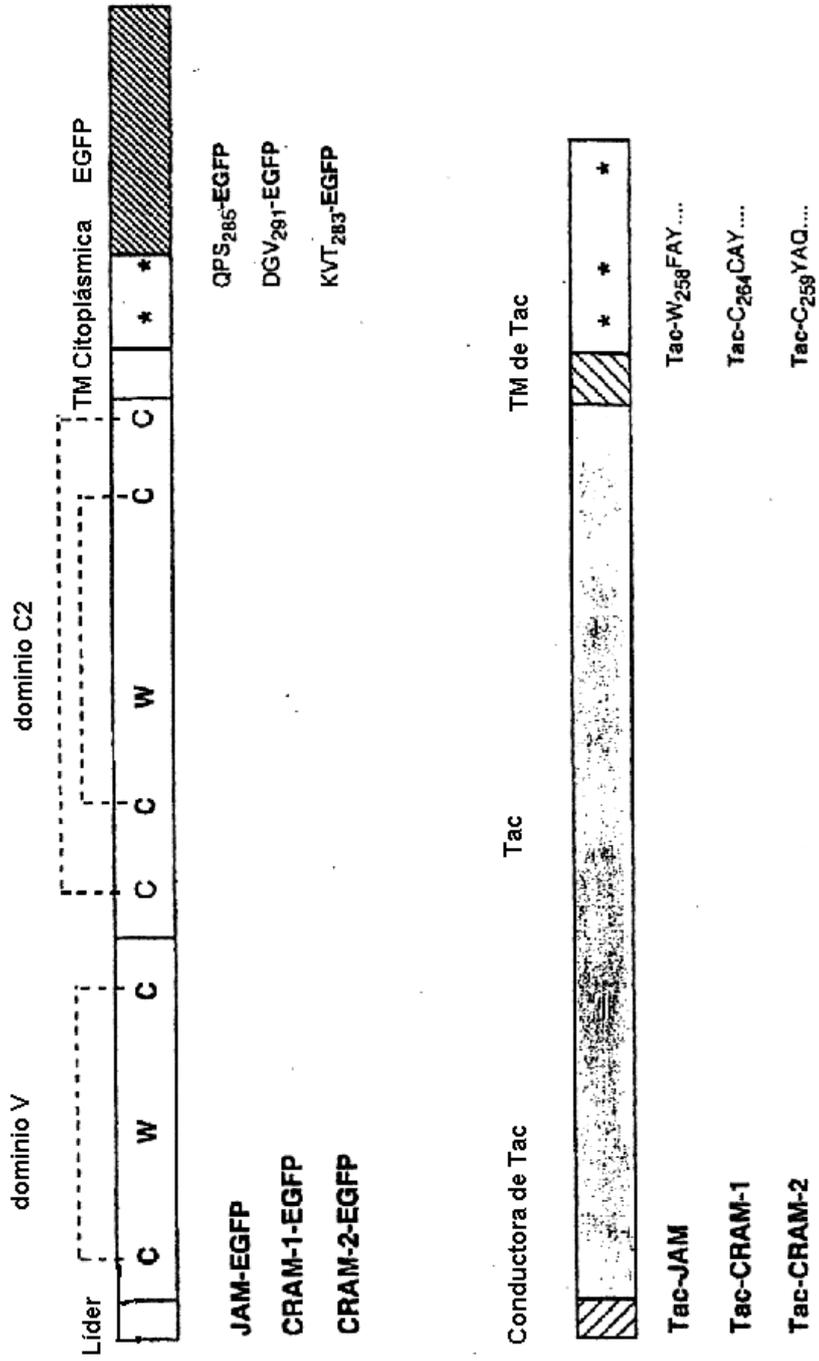


Fig. 2-1

MALSRLRLR LYARLPFFL LLLFRGCMIE AVNLSNNRN FVVEFESVE
MARSPQGL INLLLLHYLI VALDYHKANG FSASKDHRQE VTVIEFQEI

LSCIITHSQT SDPRIWKKI QDGQTTYVYF DNKIQDLAG RTDYFGKSL
LACK-TPKKT TSSRLEWKKV GQG-VSLVYY QQALQGDFKD RAEMID-FNI

RIWNVTRSDS AIYRCEVVAL NDR-KEVDEI TIELIVQVKP VTPVCRIPAA
RIKNVTRSDA GEYRCEVSAP TEQGQNLQED KVMLEVLVAP AVPACEVPTS

VPVGTATLQ CQSEGYPRP HYSWYRNDVP LPT-DSRANP RFQNSSFVN
VMTGSVVELR CQDKEGNPAP EYIWFKDGTG LLG-NPKGGT H-NNSSYTNE

SETCTLVFNA VHKDDSGQYY CIASNDAGAA RCEGQDMEVY DLNIAGIIGG
HESGILQFNM ISKMDSGEYV CEARNVSVGHR RCPGKRMQVD VLNISGIIAT

VLVVLIVLAV ITMGICCAVR RGCFISSQD GESYKSPGKH DGVNYIRTSE
VVVVAFVISV CGLGTCYAQR KGYF--SKET SFQKGS PASK -----VTTMG

EGDFRHKSSF VI
ENDFRHTKSF II

Fig. 3

JAM-2 (CRAM-1) murina y humana



Fig. 4

> Secuencia de los ácidos nucleicos huCRAM-1/huJAM-2

ATGGCGCTGAGGCGGCCACCGGACTCCGGCTCTGCGCTCGGCTGCCTGACTTCTTCCCT
 GCTGCTGCTTTTCAGGGGCTGCCTGATAGGGGCTGTAAATCTCAAATCCAGCAATCGAA
 CCCAGTGGTACAGGAATTTGAAAGTGTGGAAGTGTCTTGCATCATTACGGATTCCGAG
 ACAAGTGACCCAGGATCGAGTGGAGAAAATTCAGATGAACAAACCACATATGTGTT
 TTTTGACAACAAAATTCAGGGGAGACTTGGCCGGTCCGTGCAGAAATACTGGGGAAGACAT
 CCCTGAAGATCTGGAATGTGACACGGAGAGACTCAGCCCTTTATCGCTGTGAGGTCCGTT
 GCTCGAAATGACCGCAAGGAAATTTGATGAGATTGTGATCGAGTTAACTGTGCAAGTGAA
 GCCAGTGACCCCTGTCTGTAGAGTCCGAAGGCTGTACCAGTAGGCAAGATGGCAACAC
 TGCCTGCCAGGAGAGTGGAGGCCACCCCGGCTCACTACAGCTGGTATCGCAATGAT
 GTACCACTGCCACGGATTCCAGAGCCAATCCAGATTTCCGCAATTTCTTTCCACTT
 AAATCTGAAACAGGCACCTTTGGTGTTCCTGCTGTTTCAAGGACGACTCTGGGCACT
 ACTACTGCATTTGCTTCCAATGACGCAGGCTCAGCCAGGTGTGAGGAGCAGGAGATGGAA
 GTCTATGACCTGAACATTTGGCGGAATTTATTTGGGGGGTCTGGTTGTCCTTGCTGTACT
 GGCCCTGATCAGTTGGGCATCTGCTGTGCATACAGACGTGGCTACTTCAACAATA
 AACAGGATGGAGAAAGTTACAAGAACCCAGGGAAACCAGATGGAGTTAACTACATCCGC
 ACTGACGAGGAGGGCGACTTCAGACACAAGTCATCGTTTGTGATCTGAGACCCGGGTGT
 GGCTGAGAGCGCACAGAGCCGCACGTGCACATACCTCTGCTAGAAACTCCTGTCAAGGC
 AGCGAGAGCTGATGCACTCGACAGAGCTAGACACTCTTCAAAGCTTTTCGTTTGGCAAG
 GTGACCCTACTCTTTTACTCTACAAGCCCATGAAAAGAGAAAATTTCTCAAGAGGACC
 CGGAAATATAACCCCAAGGAACCAAACTGGGTGCGTTCACTGAGGTGGGGTCTTAATT
 TGTTTTGGCCTGATTTCCATGAAAATAAGGGGCTTTTAAGAGTTTGGTACGTAAAACC
 CCCCCTTGGCCCTTGAAAACCACATGTTTACCACCTGCGTTAAAAAAAAAAAAAAAA

> huCRAM-1/huJAM-2 completa

MALRRPRLRLCARLPDFFLLLLFRGCLIGAVNLKSSNRTPVVQEFESVELSCIITDSQ
 TSDPRIEWKKIQDEQTTYVFFDNKIQGDLAGRAEILGKTSLKIWNVTRRDSALYRCEVV
 ARNDRKEIDEIVIELTVQVKPVTPVCRVPKAVPVGKMATLHCQSEGHPRPHYSWRND
 VPLPTDSRANPRFRNSSFHLNSETGTLVFTAVHKDDSGQYYCIASNDAGSARCEEQEME
 VYDLNIGGIIGGVLVVLAVALITLGICCAAYRRGYFINNKQDGESYKNPGKPDGVNYIR
 TDEEGDFRHKSSFVI

> huCRAM-2/huJAM-3 parcial

RAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPAEQGNLEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSS
 ALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLENPRLGSQSTNSSYTMNTKTGTLOFNT
 VSKLDTGEYSCEARNSVGYRRC PGKRMQVDDLNSGIIAAVVVVVALVISVCGLVGYA
 RKGYFSKETS FQKSNSSSKATTMS ENDFKHTKSFII

Fig. 6

A

Y R C X A S1
TAY AGN TGY NNN GCY TCY AA

Y R C X A S2
TAY AGN TGY NNN GCY AGY AA

Y Q C X A S1
TAY CRG TGY NNN GCY TCY AA

Y Q C X A S2
TAY CRG TGY NNN GCY AGY AA

Y Y C X A S1
TAY TAY TGY NNN GCY TCY AA

Y Y C X A S2
TAY TAY TGY NNN GCY AGY AA

B

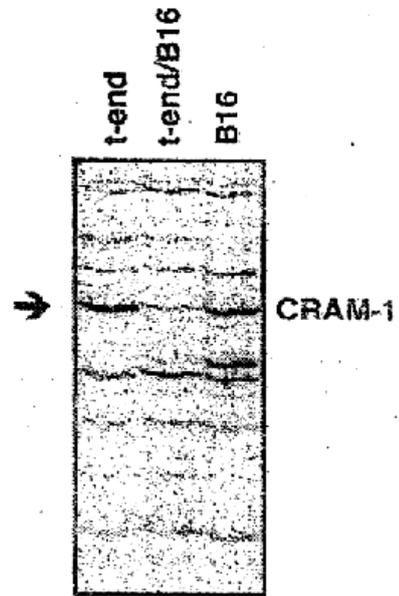


Fig. 7

A

```

yadatttccccgagaaatgggggtgagccgggggtgcgcctttagactgtacgggggtg
60
      H A I S R R R L R L R L I Y A R L L
120
cctaaattcttcttctgtctgtctcttcaaggggctgcacatgtaggggagtgaaatctcaaa
180
      P N P F L L L L L L F R G C M I E A V Y L K
33
tccagcaaacgaaaccagtggtgactgactttagaaagtgtggaattgtcttgcacatatt
100
      S S N R N P V V V H E F E S V R L S (C) I I
53
nugcaactcaccagcaagtgaacostaggattgaatggaaagaaatcaacagatggccaaaco
240
      T E S Q T S D P R I E W K X I Q D G Q T
75
acaaatgtgtattttgacacaaagattcaagggagaaotggcaggtggcaaatgtgttt
300
      T Y V Y F D N K I Q G D L A G R T D V F
95
ggaaaaacttccctgaggtatggaaatgtgacagatcggattcaagccatctatcagatgt
360
      G K T S L R I W W V T R S D S A I Y A (C)
115
gaggtgtgtcttaaatgacagcaaaagagttgagtagattaccattgagtttaattgtg
420
      B V V A L H D R X E V D E I T I R L I V
135
caagtgaaagcagtgaccctgtctgtgagaatccaaagcagctgtaccctgtagggcaagag
480
      Q V K P V T P V C R I P A A V F V G X T
155
gcacacactgactgcaaaagagagaggggtatccccgcaatcaacagatgtagggcaag
540
      A T L Q (C) Q R S E G Y P R P R Y S W Y R
175
aatgtagtgcactgcctcagatctaaagagcaactccaggttcagaaattctctcttctt
600
      N D V P L P T D S R A N P R F Q W S S F
195
cctgtgaantggagacagggcaactctgttttcaatgctgtccacaagggcagcactctgg
660
      H V N S E T G T L V F N A V H E R D D S G
215
cagtaactactgactgttccaaatgacagagtgagcaaggtgtagggggcaagggcaatg
720
      Q Y Y (C) I A S H D A G A A R C E G Q D H
235
gaagtotatgatttgaaantgtgtgggattattggggagctcctgttctgacthattgtt
780
      I V Y D L N I A G T I G G V L V V I T V
255
cttgotgtgattacagatgggcatctgtgtgtgactacagaggggtgottcaacagaggt
840
      L A Y I T N G I C C A Y R R G C F I S S
275
aaacaaatgggaaagotataagagcccagggaaagatgacgggtgtaactacatccgg
900
      K Q D G E S F X S P G K R B G V N Y I R
295
aogagtgaggaggggtgactccagacacaaactcgtccattgttatctgacacctgtcggct
960
      F E E G D F R H K S S F V I
310
gggagagcaaatgcaatgactctgttggaaagctggtcaacaggggtgtgtgtagggcaaga
1020
      gctcctgcaaaagcccacggggcaagagctttttgtttggccaaagtgtgactcact
1080
ccttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
1140
      gtagcaaaagattgttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
1200
tctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
1260
      gctgcagagcaaaacactgtagagaggggtgaggggtgaggggtgaggggtgaggggtgag
1320
acagcctgatgactgtgaaagtgcacagggaggggttccagggagtgactgtctcctctgg
1380
      acactgaccccaactgttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
1440
atgtgtttggactcagacttttatataaaacccaaatccagaaagtgaaattgottgctg
1500
      gggagagggctctgacccagggaaactctctctccaaagatgcaagagataggagaaat
1560
ctgtctgtcttaagtctgaaatggtagaagtagtctcctctctctctctctctctctctctct
1620
      tataaaatctaacatctcaactttgttagagatgtattctgactctgaaactctcta
1680
tataaaatctaacatctcaactttgttagagatgtattctgactctgaaactctctctctctct
1740
      aacttaaggtgaaaggggttgggtctgtctgttttaattggaaatccagtagtaaggtc
1800
tcttaaggggtttcttaaggggtggtggtgaaatctctctctctctctctctctctctctct
1860
      cttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
1920
      ttccactctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
1980

```

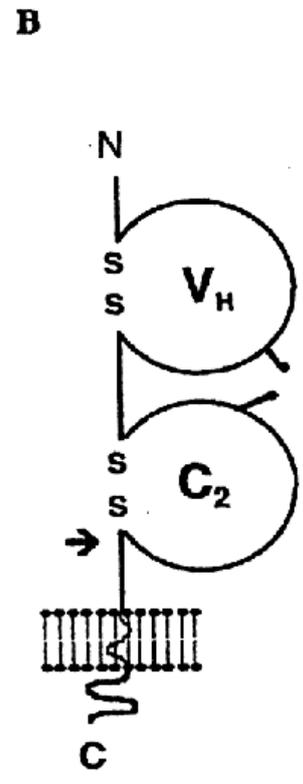


Fig. 8

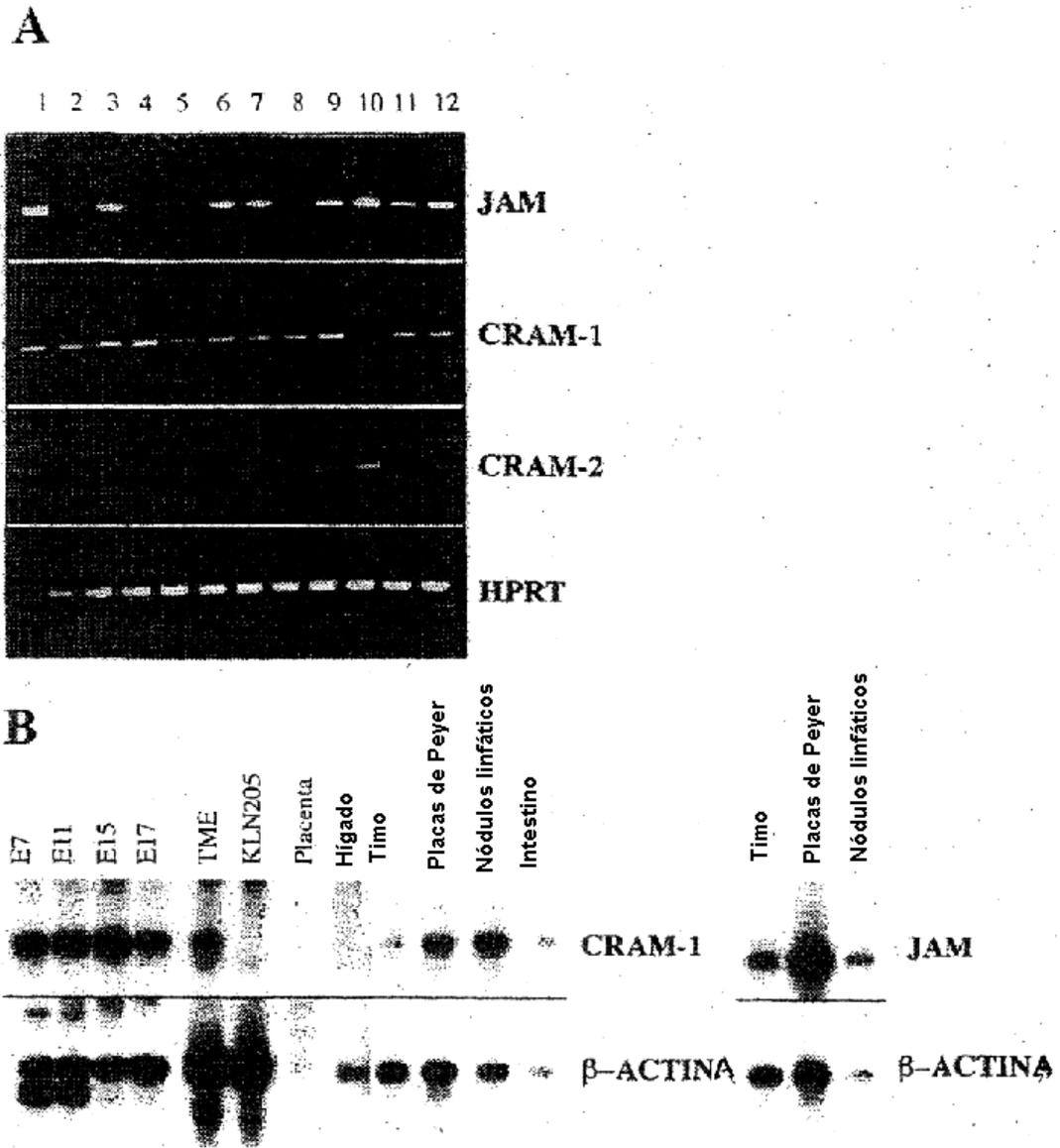
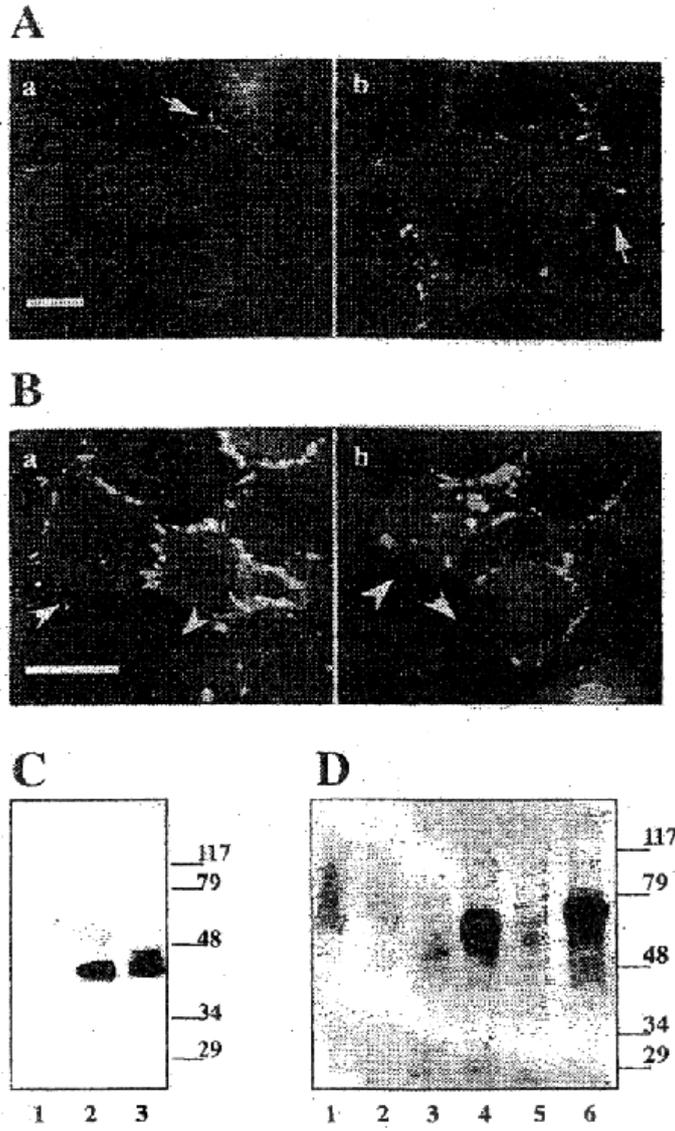


Fig. 10



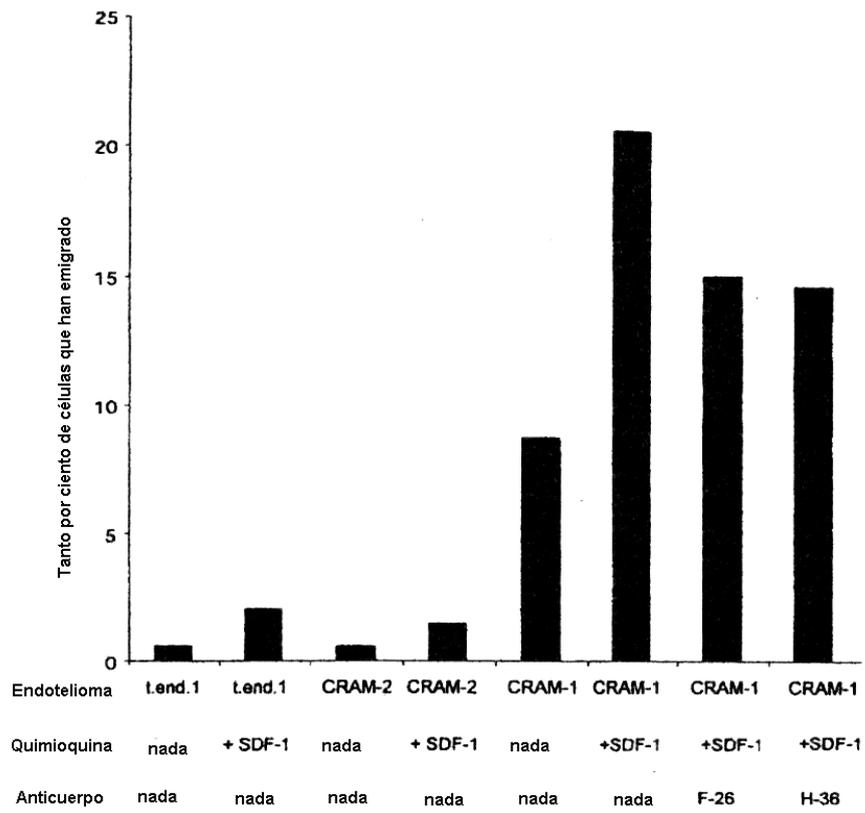


Fig. 12

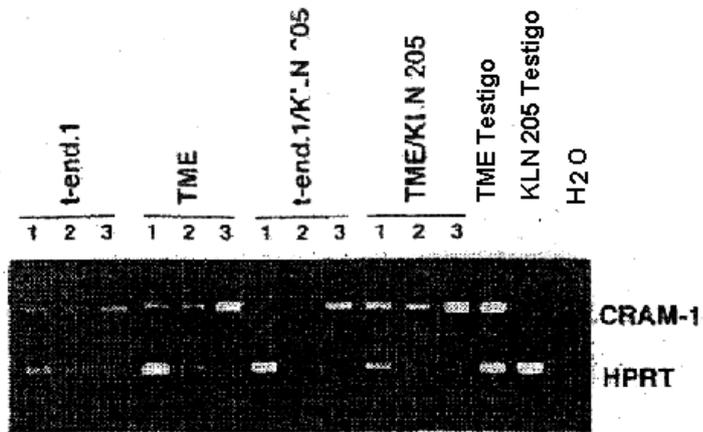


Fig. 13

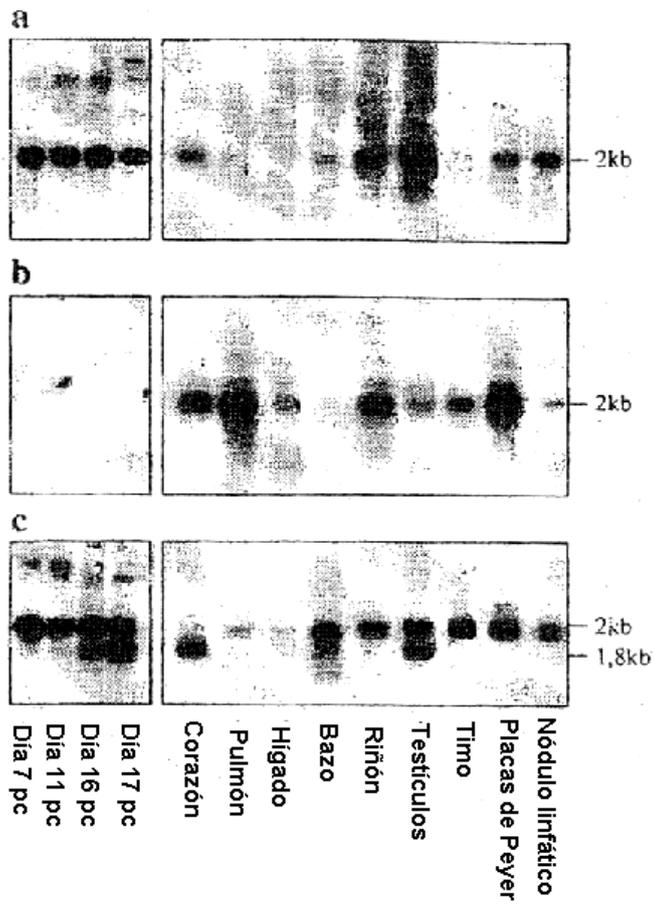


Fig. 14

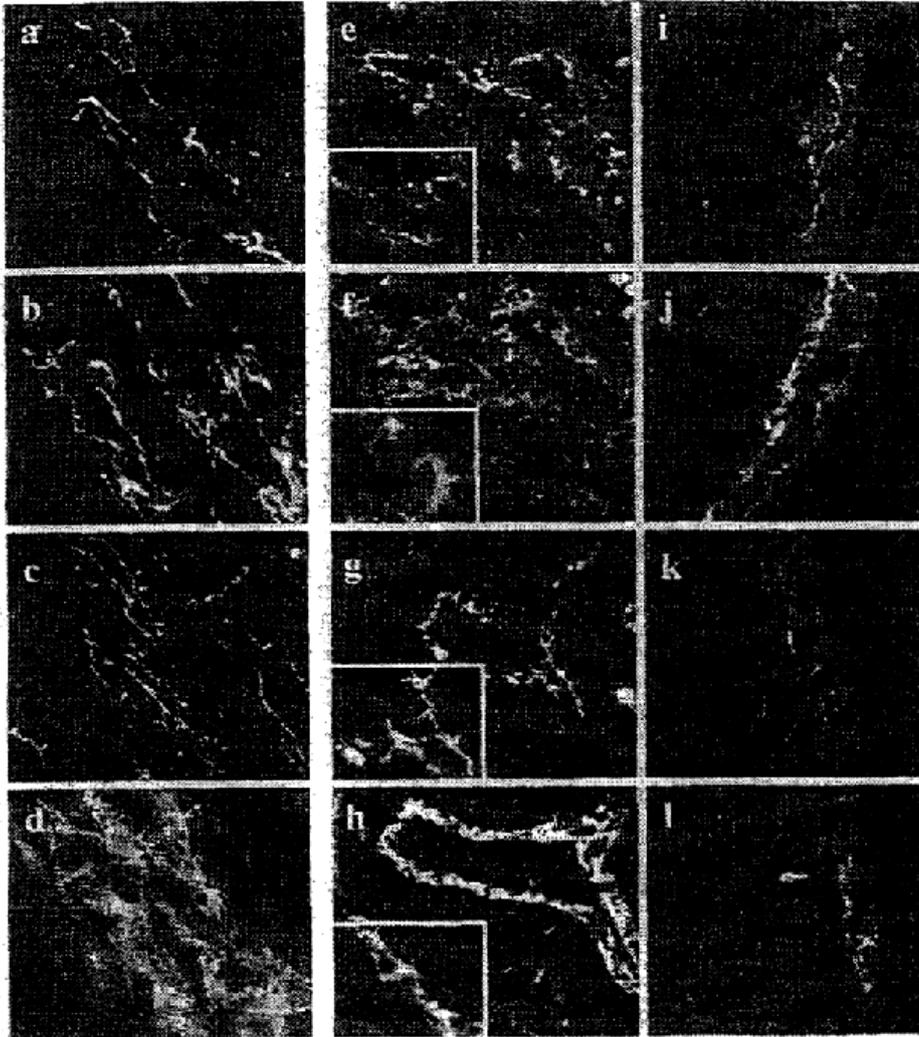


Fig. 15

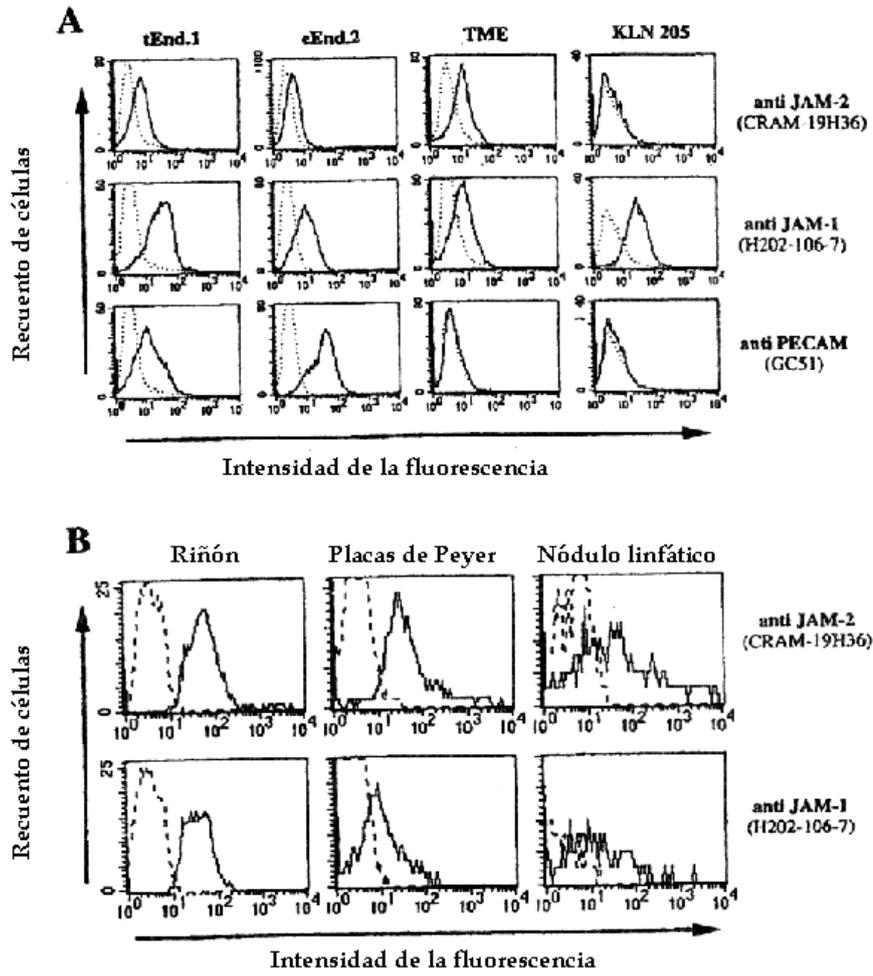


Fig. 16

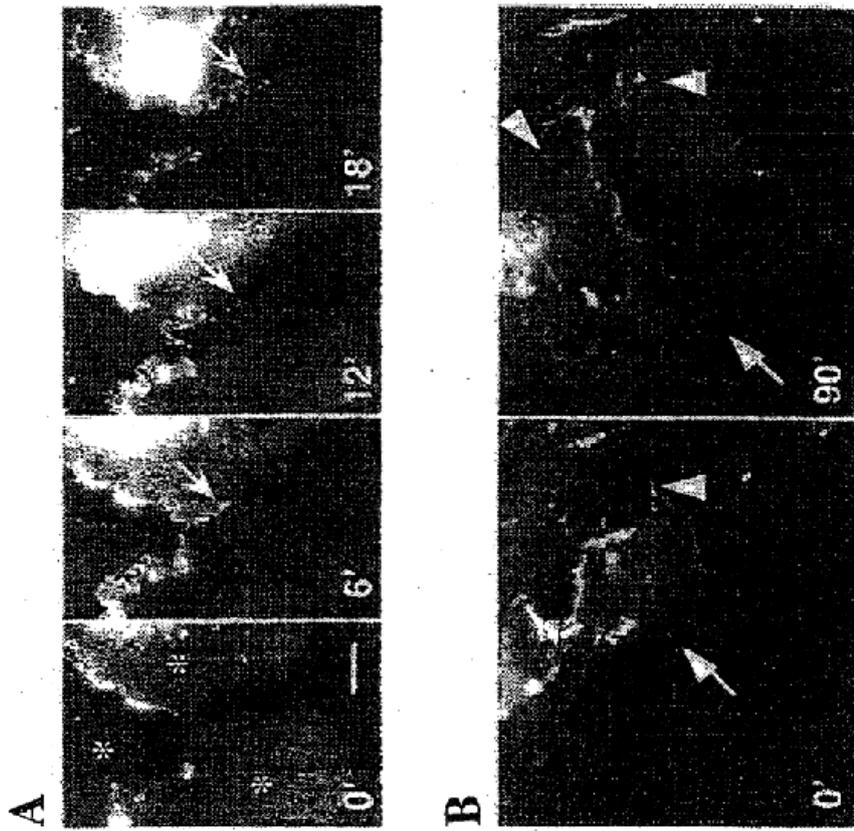


Fig. 17

Fig. 17

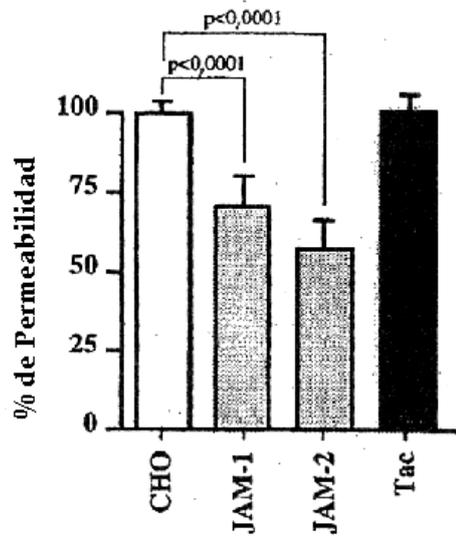


Fig. 18

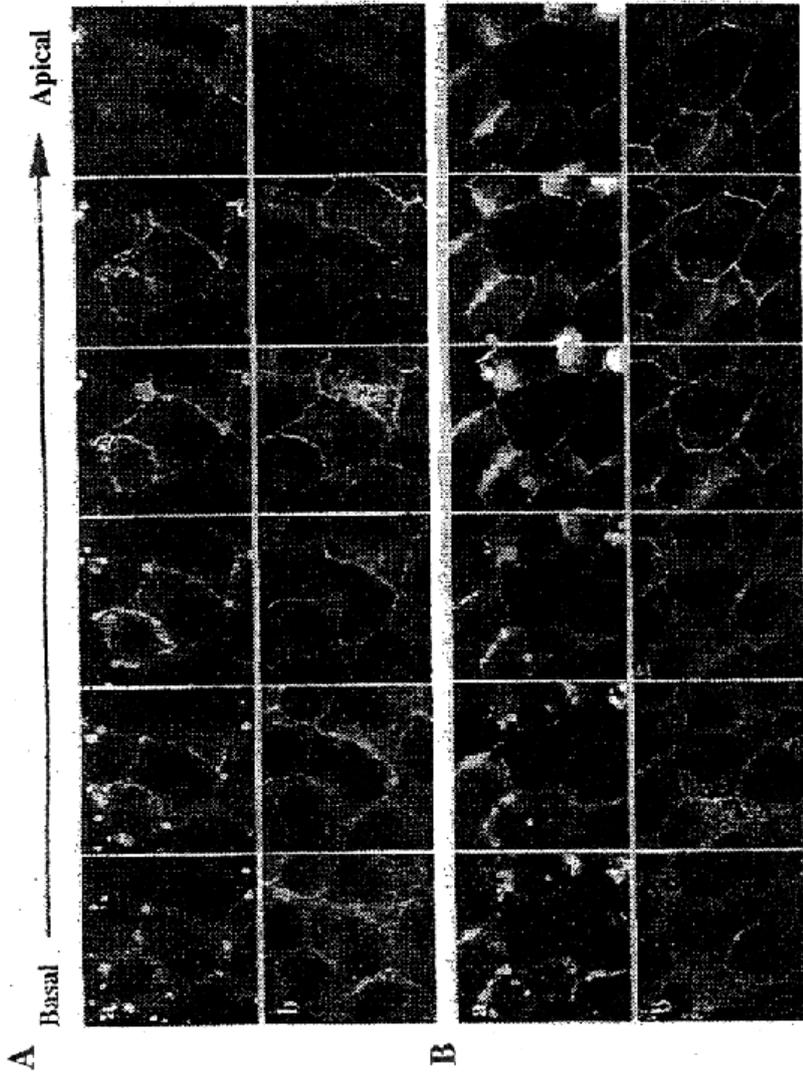
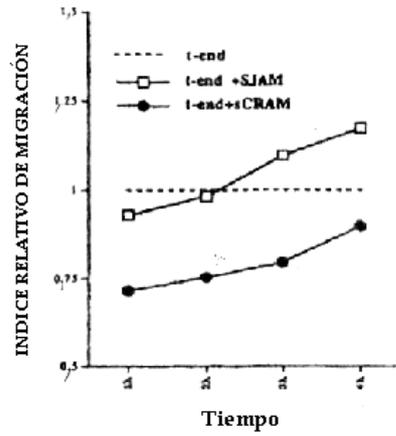


Fig. 19

A



B

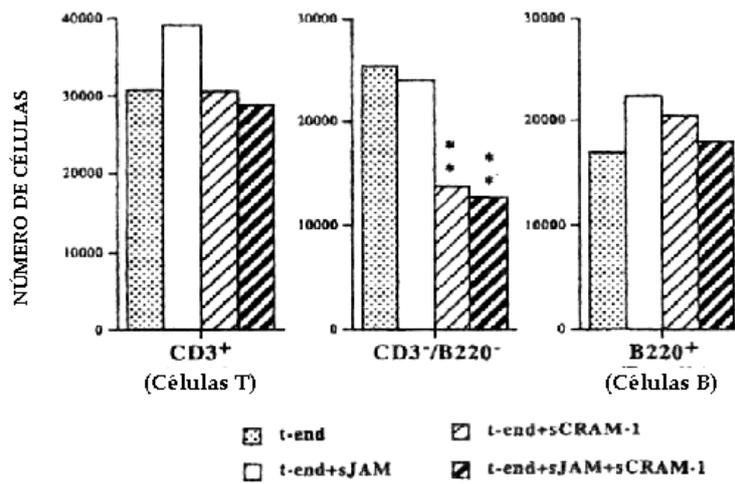


Fig. 20