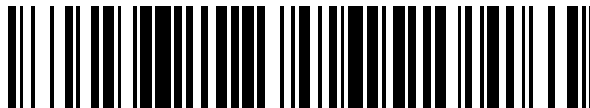


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 260**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09730842 .3**

96 Fecha de presentación: **08.04.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2132337**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE COLAPSO CANINO INDUCIDO POR EL EJERCICIO.**

30 Prioridad:
09.04.2008 US 123753 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**LABOKLIN GMBH & CO. KG
STEUBENSTRASSE 4
97688 BAD KISSINGEN, DE**

72 Inventor/es:
**MICKELSON, James R.;
MINOR, Katie;
TAYLOR, Susan M. y
PATTERSON, Edward Earl**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 375 260 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

Procedimiento de detección de colapso canino inducido por el ejercicio

Antecedentes de la invención

5 Las enfermedades del sistema nervioso son responsables de una proporción significativa de los problemas sanitarios humanos. Se han documentado mutaciones genéticas de varias formas importantes de enfermedad neurológica, incluyendo epilepsias y neuropatías. Debido al nexo humano-animal, los animales de compañía tienen una vigilancia sanitaria solo aventajada por la humana, haciendo de los animales de compañía, y de los perros en particular, modelos ideales para muchas afecciones sanitarias. Los modelos caninos han ayudado a definir la base molecular y el tratamiento de una serie de enfermedades neurológicas incluyendo narcolepsia, enfermedad de Lafora y enfermedad de almacenamiento lisosómico. Aunque la fisiología de los neurotransmisores y sus receptores respectivos se ha detallado extensamente durante décadas, la biología de las vesículas sinápticas neurotransmisoras y las proteínas asociadas está solo empezando a elucidarse. La dinamina 1 (DNM1) es importante de forma crítica para el reciclado de vesículas sinápticas durante la estimulación neurológica a alto nivel.

10 Los cobradores de labrador (Labrador Retriever) son la raza de perro más común del mundo, con más de 123.760 nuevos registros en EE.UU. solo en 2006. Durante los últimos 100 años, con la aparición de los clubes cinológicos, las exposiciones caninas y los estándares de crianza canina muy específicos, la endogamia en razas de perro ha aumentado drásticamente. Se han documentado más de 370 enfermedades mendelianas en perros, con más de un 70% de ellas recesivas autosómicas y un 46% específicas de raza. La alta especificidad de raza es debida lo más probablemente a las mutaciones recesivas nocivas que se propagan y concentran por el efecto fundador o por criar repetidamente sementales populares.

15 El colapso inducido por el ejercicio (CIE) es un síndrome recién caracterizado en perros. La afección se ha descrito mejor en cobradores de labrador, pero es conocido que perros de una serie de otras razas tienen una afección similar. Los perros que se considera que padecen CIE empiezan a desarrollar signos de un episodio habitualmente 5-15 minutos después del inicio de un ejercicio vigoroso "de alta excitación" tal como cobrar muñecos de entrenamiento o pájaros. Al inicio del episodio de CIE, el perro empieza a perder coordinación y desarrolla un paso "tambaleante" que pronto evoluciona a la pérdida del control de las patas traseras. A veces, el episodio afecta a todo el cuerpo, siendo el perro incapaz de moverse. El episodio de colapso dura habitualmente 5-10 minutos, y después de 30 minutos el perro se habrá recuperado casi completamente. El CIE afecta a perros que parecen estar típicamente en excelente condición física y que habitualmente tienen muy buen tono muscular, lo que es diferente de muchas otras causas de intolerancia al ejercicio.

20 A partir del artículo de Internet "EXERCISE INDUCED COLLAPSE IN LABRADOR RETRIEVERS" de Susan M. Taylor (01-03-2008, XP-002544723) recuperado de <http://www.thelabradorclub.com/uploads/file/Exercise%20Induce%20Collapse.pdf>, es conocido que el CIE está causado por una mutación recesiva autosómica que podría detectarse para determinar la predisposición al CIE. Sin embargo, el artículo no proporciona ningún detalle de dónde está localizada la mutación o de cómo puede detectarse en la práctica.

Sumario de la invención

25 La presente invención caracteriza ensayos para determinar si un perro tiene o es susceptible de desarrollar colapso inducido por el ejercicio (CIE). En una realización, el procedimiento comprende determinar si está presente un alelo asociado con la enfermedad en un ácido nucleico del sujeto. En ciertas realizaciones, el alelo es de dinamina 1 (G767T) en la SEQ-ID-No. 1. La detección del alelo de dinamina 1 (G767T) es indicativa de que el perro tiene o está predispuesto al desarrollo de CIE.

30 Los alelos apropiados pueden detectarse mediante cualquiera de una variedad de medios, incluyendo: 1) efectuar una reacción de hibridación entre la muestra de ácido nucleico y una sonda o sondas que sean capaces de hibridación con el alelo; 2) secuenciar al menos una porción del alelo; o 3) determinar la movilidad electroforética del alelo o un componente del mismo. En una realización, el alelo se somete a una etapa de amplificación antes o junto con la práctica de la etapa de detección. En ciertas realizaciones, las etapas de amplificación son reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), clonación y variaciones de las anteriores (por ejemplo, PCR-FI y amplificación específica de alelo). En una realización, la muestra se hibrida con un conjunto de cebadores que hibridan en 5' y 3' con una secuencia codificante o anticodificante de un alelo y se somete a amplificación por PCR.

35 En una realización, la etapa de detección es una hibridación específica de alelo seguida de una extensión específica de cebador. En una realización, antes o junto con la detección, se somete la muestra de ácido nucleico a una etapa de amplificación. En una realización, el análisis de tamaño es precedido por una digestión con enzima de restricción. En una realización, se amplifica dinamina 1 o una porción de la misma. En una realización, se inmoviliza al menos una sonda oligonucleotídica sobre una superficie sólida.

En otro aspecto, la invención caracteriza kits para efectuar los ensayos anteriormente descritos. El kit puede incluir la recogida de muestras de ADN y un medio para determinar un alelo que es indicativo de CIE en un perro. En una realización, el kit contiene un primer oligonucleótido cebador que hibrida en 5' o 3' con un alelo de dinamina 1 (G767T) en la SEQ-ID-No. 1. En una realización, el kit comprende adicionalmente un segundo oligonucleótido cebador que hibrida en 3' o 5' respectivamente con el alelo, de modo que el alelo puede amplificarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En una realización, el primer cebador y el segundo cebador hibridan con una región en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 pares de bases. En una realización, el kit comprende adicionalmente un medio de detección. En ciertas realizaciones, el medio de detección es mediante a) hibridación específica de alelo; b) análisis de tamaño; c) secuenciación; d) hibridación; e) digestión con nucleasa 5'; f) polimorfismo de conformación monocatenaria; g) extensión específica de cebador y/o h) ensayo de ligamiento de oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, el kit comprende adicionalmente un medio de amplificación.

La información obtenida usando los ensayos y kits descritos en la presente memoria es útil para determinar si un perro tiene o es susceptible de desarrollar CIE. Además, la información permite la personalización de la terapia según el perfil genético del perro.

La presente invención proporciona un procedimiento para la detección de la presencia de un biomarcador asociado con colapso canino inducido por el ejercicio (CIE). En una realización de la invención, el procedimiento implica obtener una muestra fisiológica de un perro, en el que la muestra comprende ácido nucleico, y determinar la presencia del biomarcador. Como se usa en la presente memoria, la frase "muestra fisiológica" pretende designar una muestra biológica obtenida de un mamífero que contiene ácido nucleico. Por ejemplo, una muestra fisiológica puede ser una muestra recogida de un perro individual tal como incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo una muestra celular tal como una célula sanguínea, por ejemplo un linfocito o una célula de sangre periférica; una muestra de tejido tal como una muestra de mucosa (por ejemplo, frotis bucal) o tejido muscular, por ejemplo, músculo esquelético; una muestra de órgano, por ejemplo hígado o piel; una muestra de cabello, por ejemplo una muestra de cabello con raíces; y/o una muestra de fluido tal como sangre.

Los ejemplos de razas de perros afectados incluyen, pero sin limitación, cobradores de labrador, cobradores de la bahía de Chesapeake (Chesapeake Bay Retriever), cobradores de pelo rizado (Curly-Coated Retriever), pastores escoceses (Border Collies), u otras razas relacionadas o no relacionadas. El procedimiento de la presente invención incluye también perros de razas cruzadas o mixtas.

La presente invención proporciona además un procedimiento para determinar si un perro tiene o está predispuesto a desarrollar colapso inducido por el ejercicio (CIE) que implica (a) transportar una muestra biológica desde un perro sospechoso de tener o de estar predispuesto a desarrollar CIE hasta un laboratorio de diagnóstico, (b) detectar en una muestra de ácido nucleico del perro un alelo asociado al CIE en la SEQ-ID-No. 1, siendo la detección del alelo de dinamina 1 (G767T) indicativa de que el perro tiene o está predispuesto al desarrollo de CIE, y (c) proporcionar resultados respecto a si el perro tiene un alelo asociado al CIE.

El término "biomarcador" se define generalmente en la presente memoria como un indicador biológico, tal como un rasgo molecular particular que puede afectar o estar relacionado con el diagnóstico o predicción de la salud de un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente invención, el biomarcador comprende un gen *DNM1* canino mutante, tal como un alelo polimórfico de *DNM1* que tiene un nucleótido de timina (T) en posición 767 de la SEQ ID NO:1, un nucleótido de citosina (C) o T en posición 603, un nucleótido C o T en posición 633, un nucleótido de adenina (A) o guanina (G) en posición 1827 y/o un nucleótido C o T en posición 759. El gen *DNM1* que tiene una T en posición 767 codifica una proteína que tiene una sustitución de R (arginina) por L (leucina) en el residuo aminoácido 256.

"Sonda oligonucleotídica" puede designar un segmento de ácido nucleico, tal como un cebador, que es útil para amplificar una secuencia del gen *DNM1* que es complementaria de, y que hibrida específicamente con, una secuencia particular de *DNM1*, o con una región de ácido nucleico que flanquea a *DNM1*.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" y "polinucleótido" designa desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria, compuestos por monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o una pirimidina. A menos que se limite específicamente, el término comprende ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular comprende también implícitamente las variantes modificadas conservativamente del mismo (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codón degenerado pueden conseguirse generando secuencias en que la tercera posición de uno o más de los codones seleccionados (o todos) esté sustituida por residuos de base mixta y/o desoxiinosina.

Un "fragmento de ácido nucleico" es una porción de una molécula de ácido nucleico dado. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético de la mayoría de organismos, mientras que el ácido ribonucleico

(ARN) está implicado en la transferencia de la información contenida en el ADN hasta proteínas. El término "secuencia nucleotídica" designa un polímero de ADN o ARN que puede ser mono- o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas capaces de incorporación a polímeros de ADN o ARN.

- 5 Los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "fragmento de ácido nucleico", "secuencia o segmento de ácido nucleico" o "polinucleótido" pueden usarse también intercambiamente con gen, ADNc, ADN y ARN codificado por un gen, por ejemplo, ADN genómico, e incluso secuencias de ADN sintético. El término incluye también secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

10 En una realización de la presente invención, el procedimiento implica también poner en contacto la muestra con al menos una sonda oligonucleotídica para formar un ácido nucleico hibridado y amplificar el ácido nucleico hibridado. La "amplificación" utiliza procedimientos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por ligamiento (o reacción en cadena de la ligasa, LCR), amplificación por desplazamiento de hebra, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico y procedimientos de amplificación basados en el uso de replicasa Q-beta. Estos procedimientos son bien conocidos y ampliamente practicados en la materia. Los reactivos y aparatos para realizar la PCR están comercialmente disponibles. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente invención, el gen *DNM1*, o una porción del mismo, puede amplificarse por PCR. En otra realización de la presente invención, se inmoviliza al menos una sonda oligonucleotídica sobre una superficie sólida.

15 Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para detectar la presencia de un biomarcador asociado con colapso canino inducido por el ejercicio (CIE) en un perro tal como un cachorro, uno de un par de crianza de perros o cualquier perro en cualquier etapa de la vida.

20 Se proporciona además por la presente invención un procedimiento para diagnosticar colapso inducido por el ejercicio (CIE) en un perro, implicando el procedimiento obtener una muestra fisiológica del perro, comprendiendo la muestra ácido nucleico; y detectar la presencia de un biomarcador en la muestra, siendo la presencia del biomarcador indicativa de la enfermedad. Una realización del procedimiento implica además poner en contacto la muestra con al menos una sonda oligonucleotídica para formar un ácido nucleico hibridado y amplificar el ácido nucleico hibridado. Por ejemplo, en una realización se amplifica el gen *DNM1* o una porción del mismo, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa, amplificación por desplazamiento de hebra, reacción en cadena de la ligasa, procedimientos de amplificación basados en el uso de replicasa Q-beta y/o amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico. En una realización del procedimiento, el biomarcador contiene un gen *DNM1* que tiene una sustitución de G a T en el nucleótido 767, o un gen que codifica una proteína que tiene una sustitución de R a L en el residuo aminoacídico 256. El procedimiento puede usarse para detectar CIE en un perro.

25 Se proporciona además por la presente invención un kit que comprende un ensayo de diagnóstico para detectar la presencia de CIE canino en un perro que comprende: material de envasado que contiene, envasado separadamente, al menos una sonda oligonucleotídica capaz de formar un ácido nucleico hibridado con *DNM1* e instrucciones que dirigen el uso de la sonda según los procedimientos de la invención. En ciertas realizaciones, el kit contiene un segundo oligonucleótido cebador que hibrida en 3' o 5' respectivamente con el alelo, de modo que el alelo puede amplificarse. En ciertas realizaciones, el primer cebador y el segundo cebador hibridan con una región en el intervalo de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 pares de bases. En ciertas realizaciones, el kit contiene adicionalmente un medio de detección. En ciertas realizaciones, el kit incluye adicionalmente un medio de amplificación.

30 Otros rasgos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

35 **Figura 1.** Esta secuencia de ADN codificante de la forma larga de *DNM1* canino contiene 2595 bases (SEQ ID NO:1). La proteína dinamina 1 predicha a partir de esta secuencia de ADN contiene 864 aminoácidos y tiene un peso molecular de 97.383. Se encontraron cuatro polimorfismos de nucleótido único (SNP) en la secuencia de ADN codificante de *DNM1* en los dos perros afectados y dos de control secuenciados totalmente (indicados en **negrita** y subrayados). Dos SNP del exón 5, C o T (concretamente Y) en la posición nucleotídica codificante 603, y C o T (concretamente Y) en la posición nucleotídica codificante 633, eran sinónimos en los codones 201 y 211, respectivamente. Un SNP del exón 6, C o T (concretamente Y) en la posición nucleotídica codificante 759, era sinónimo en el codón 253. Sin embargo, una sustitución G por T en el exón 6 en la posición nucleotídica codificante 767 daba como resultado la conversión del codón 256 de arginina en leucina (mutación R256L). Los perros afectados son homocigóticos del alelo T767, mientras que los perros de control eran heterocigóticos u homocigóticos del alelo G767.

40 **Figura 2.** Secuencia aminoacídica predicha a partir de la secuencia de ADN codificante de la forma larga de *DNM1* de la Figura 1 (SEQ ID NO:2). Los tres primeros SNP eran sinónimos en los codones 201, 211 y 253 respectivamente, ya que no cambiaban la secuencia aminoacídica resultante (indicada en **negrita** y subrayada). Sin embargo, el SNP G767T cambiaba el aminoácido en el codón 256 de R a L.

Figura 3. El alineamiento de especies de las secuencias aminoacídicas de dinamina 1 canina de control y humana en la región de la mutación R256L revela una conservación interespecies e intergénica notable. Esta conservación se compartía por los demás miembros de la familia génica de la dinamina (dinamina 2 y dinamina 3). Se obtuvieron las secuencias a partir de los siguientes números de acceso: DNM1 de perro, este estudio; DNM1 humana, NP_004399.2; DNM2 humana, NP_001005360; DNM3 humana, NP_056384.2; DNM1 de ratón, NP_034195.2; DNM2 de ratón, NP_001034609.1; DNM3 de ratón, NP_001033708.1; DNM1 bovina, NP_001092839.1; pollo, XP_001233250.1; *Danio rerio*, NP_001025299.1; *Drosophila*, NP_727910.1. Las secuencias subrayadas se conservan entre especies o familias génicas en ese grupo. La mutación Arg256Leu asociada con el CIE está marcada. La Figura 3 da a conocer las SEQ ID NO 3-5, 126, 127, 6-9, 3, 10-11 y 124-125, respectivamente, por orden de aparición.

Figura 4. Análisis de asociación de SNP de CFA9 con CIE. Se obtuvieron los genotipos de SNP del cromosoma 9 canino. Se efectuaron estadísticas de chi cuadrado que comparan las frecuencias alélicas y genotípicas para 55 perros afectados y 37 de control que comprendían el subconjunto de individuos mínimamente relacionados.

Figura 5A. Secuencia de ADN codificante de la forma corta de dinamina 1 canina (*DNM1*) y polimorfismos (SEQ ID NO: 12). Se destacan los SNP de CDS identificados en los perros de estudio o entre los perros de estudio y CanFam 2.0. Se subraya y se pone en **negrita** también el SNP de *DNM1* G767T no sinónimo altamente asociado con CIE, y responsable de la mutación R256L. **Figura 5B.** Secuencia aminoacídica de la forma corta de *DNM1* canina. Se destacan los residuos en que se encontraron SNP sinónimos en los CDS. Se subraya y pone en **negrita** también la mutación R256L altamente asociada con CIE (SEQ ID NO:13).

Figura 6. Haplotipos de SNP compartidos de 23 perros afectados (SEQ ID NO:14-35). Se genotiparon los SNP y se sometieron a PHASE. Se generaron haplotipos en 23 perros afectados como se describe en los Materiales y Procedimientos. Estos 23 perros satisfacían los criterios de presuntamente afectados, tuvieron 5 o más episodios de colapso y al menos un año de ningún otro problema médico conocido desde que aparecieron los episodios por primera vez. El número de observaciones de cada haplotipo se indica en la columna más a la derecha. La región de conservación de cada haplotipo respecto al haplotipo más largo común se destaca en amarillo. La mutación G767T de *DNM1* está en naranja.

Figuras 7A-7J. Los exones están en mayúsculas, los intrones en minúsculas. Los SNP están subrayados. **Figura 7A.** Cebadores de exón de *DNM1* y secuencia del producto. Exones 1-4. (SEQ ID NOS:36-47). **Figura 7B.** Secuencia de exón de *DNM1* predicha y polimorfismos. Exones 1-4. (SEQ ID NOS:48-51). **Figura 7C.** Cebadores de exón de *DNM1* y secuencia del producto. Exones 5-9. (SEQ ID NOS:52-57). **Figura 7D.** Secuencia de exón de *DNM1* predicha y polimorfismos. Exones 5-9. (SEQ ID NOS: 58-62). **Figura 7E.** Cebadores de exón de *DNM1* y secuencia del producto. Exones 10-14. (SEQ ID NOS: 63-74). **Figura 7F.** Secuencia de exón de *DNM1* predicha y polimorfismos. Exones 10-14. (SEQ ID NOS:75-79). **Figura 7G.** Cebadores de exón de *DNM1* y secuencia del producto. Exones 15-19. (SEQ ID NOS: 80-94). **Figura 7H.** Secuencia de exón de *DNM1* predicha y polimorfismos. Exones 15-19. (SEQ ID NOS:95-100). **Figura 7I.** Cebadores de exón de *DNM1* y secuencia del producto. Exones 20-22 y exón 6 para genotipado. (SEQ ID NO:101-115). **Figura 7J.** Secuencia de exón de *DNM1* predicha y polimorfismos. Exones 20-21 y exón 6 para genotipado. (SEQ ID NOS:116-119).

Figuras 8A-8C. Análisis de asociación de SNP, haplotipos y genes de la región de CFA9 ligada genéticamente con CIE. Se obtuvieron los genotipos de SNP y los haplotipos derivados como se describe en los Materiales y Procedimientos. **Fig. 8A.** Se muestran las ID de los SNP abreviadas y las posiciones en Mb en la fila superior. Se efectuaron estadísticas de chi cuadrado que comparan las frecuencias alélica y genotípica para 56 perros presuntamente afectados por CIE y 38 no afectados que comprendían el subconjunto de individuos mínimamente relacionados. Se muestra el log negativo del valor de p de los resultados de chi cuadrado. Se destacan los valores de $P < 10^{-04}$ (concretamente, $-\log > 4,00$). **Fig. 8B.** Se indican los genotipos de SNP en el haplotipo de CIE más largo y más común en la fila superior. Siguen ambos haplotipos de 23 perros con la mayor evidencia de CIE. Se proporcionan las regiones de conservación de cada haplotipo respecto al haplotipo más largo más común como barras horizontales para cada cromosoma individual. Estos perros tuvieron todos 5 o más episodios de colapso y al menos un año de ningún otro problema médico conocido desde que aparecieron los episodios por primera vez. Se marcan verticalmente los bloques de 137 kb y 87 kb de homocigosidad mínimamente conservados. Los individuos 21-23 tienen una homocigosidad conservada limitada a estos bloques de 137 y 87 kb. Se destaca la mutación G767T encontrada posteriormente en el gen *DNM1* (SEQ ID NO: 128). **Fig. 8C.** Posiciones en Mb de CFA9 de los genes registrados en ENSEMBL en los bloques de 137 kb y 87 kb.

La **Figura 9** proporciona una lista de los genes conocidos de la región en desequilibrio de ligamiento con *DNM1*. Los genes conocidos incluyen modificador relacionado con la ubiquitina 1 (URM), transportador de ácido graso 4 (SLC27A4), homólogo de coenzima Q4 (COQ4), ARNt pseudouridina sintasa 2 (TRUB2), marco abierto de lectura 119 del cromosoma 9 (COorf119), autoantígeno de Golgi, subfamilia de golgina a, 2 (GOLGA2), dinamina 1 (*DNM1*), proteína de dedo de cinc de interacción con CDKN1A 1 (CIZ1), proteína hipotética C90rf16 (C90rf16) y lipcalina 2 (LCN2).

Descripción detallada de la invención

Cribado de genotipos

Los procedimientos tradicionales para el cribado de enfermedades heredables han dependido de la identificación de productos génicos anormales (por ejemplo, anemia de células falciformes) o de un fenotipo anormal (por ejemplo, retardo mental). Con el desarrollo de la metodología de cribado genético sencilla y económica, es ahora posible identificar polimorfismos que indican la tendencia a desarrollar la enfermedad, incluso cuando la enfermedad es de origen poligénico.

El cribado genético (también llamado genotipado o cribado molecular) puede definirse ampliamente como ensayos para determinar si un paciente tiene mutaciones (o alelos o polimorfismos) que causen un estado patológico o estén "ligadas" con la mutación que causa un estado patológico. Ligamiento designa el fenómeno de que las secuencias de ADN que están cercanas entre sí en el genoma tienen la tendencia a heredarse conjuntamente. Dos secuencias pueden estar ligadas debido a alguna ventaja selectiva de la herencia conjunta. Sin embargo, más típicamente, dos secuencias polimórficas se heredan conjuntamente debido a la infrecuencia relativa con que aparecen eventos de recombinación meiótica en la región entre los dos polimorfismos. Los alelos polimórficos heredados conjuntamente se dice que están en desequilibrio de ligamiento entre sí porque, en una población dada, tienden a aparecer conjuntamente o si no a no aparecer en absoluto en ningún miembro particular de la población. Es más, cuando se encuentra que múltiples polimorfismos en una región cromosómica dada están en desequilibrio de ligamiento entre sí, definen un "haplotipo" genético cuasiestable. En contraposición, los eventos de recombinación que aparecen entre dos loci polimórficos hacen que se separen en cromosomas homólogos distintos. Si aparece la recombinación meiótica entre dos polimorfismos ligados físicamente con suficiente frecuencia, los dos polimorfismos parecerán segregarse independientemente, y se dice que están en equilibrio de ligamiento.

Aunque la frecuencia de la recombinación meiótica entre dos marcadores es generalmente proporcional a la distancia física entre ellos en el cromosoma, la aparición de "puntos calientes", así como de regiones de recombinación cromosómica reprimida, puede dar como resultado discrepancias entre la distancia física y recombinante entre dos marcadores. Por tanto, en ciertas regiones cromosómicas, múltiples loci polimórficos que cubren un amplio dominio cromosómico pueden estar en desequilibrio de ligamiento entre sí, y definir así un haplotipo genético de amplio alcance. Además, cuando se encuentra una mutación causante de enfermedad en o ligada con este haplotipo, pueden usarse uno o más alelos polimórficos del haplotipo como indicador de diagnóstico o pronóstico de la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Esta asociación entre polimorfismos por lo demás benignos y un polimorfismo causante de enfermedad aparece si la mutación patológica surgió en el pasado reciente, de modo que no haya transcurrido suficiente tiempo para conseguir el equilibrio mediante eventos de recombinación. Por lo tanto, la identificación de un haplotipo que cubre o está ligado con un cambio mutacional causante de enfermedad, sirve como medida predictiva de la probabilidad de que individuo haya heredado la mutación causante de enfermedad. Dichos procedimientos de pronóstico o diagnóstico pueden utilizarse sin necesidad de la identificación y aislamiento de la lesión causante de enfermedad real. Esto es significativo, porque la determinación precisa del defecto molecular implicado en un proceso patológico puede ser difícil y laboriosa, especialmente en el caso de enfermedades multifactoriales.

La correlación estadística entre un trastorno y un polimorfismo no indica necesariamente que el polimorfismo cause directamente el trastorno. En lugar de ello, el polimorfismo correlacionado puede ser una variante alélica benigna que está ligada con (concretamente, en desequilibrio de ligamiento con) una mutación causante del trastorno que ha aparecido en el pasado evolutivo reciente, de modo que no haya transcurrido suficiente tiempo para conseguir el equilibrio mediante eventos de recombinación en el segmento cromosómico intermedio. Por tanto, con los fines de los ensayos de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad particular, la detección de un alelo polimórfico asociado con esa enfermedad puede utilizarse sin considerar si el polimorfismo está implicado directamente en la etiología de la enfermedad. Además, cuando un locus polimórfico benigno dado está en desequilibrio de ligamiento con un locus polimórfico aparentemente causante de enfermedad, es probable que aún otros loci polimórficos que están en desequilibrio de ligamiento con el locus polimórfico benigno estén también en desequilibrio de ligamiento con el locus polimórfico causante de enfermedad. Por tanto, estos otros loci polimórficos serán también de pronóstico o diagnóstico de la probabilidad de haber heredado el locus polimórfico causante de enfermedad. Puede orientarse un haplotipo de amplio alcance (que describe el patrón típico de herencia conjunta de alelos de un conjunto de marcadores polimórficos ligados) a fines de diagnóstico una vez se ha establecido una asociación entre una enfermedad o afección particular y el correspondiente haplotipo. Por tanto, la determinación de la probabilidad de un individuo de desarrollar una enfermedad o afección particular puede hacerse caracterizando uno o más alelos polimórficos asociados con la enfermedad (o incluso uno o más haplotipos asociados con la enfermedad) sin determinar ni caracterizar necesariamente la variación genética causante.

Los inventores identificaron los pedigrís de varias generaciones de cobradores de labrador afectados por CIE y efectuaron un cribado genómico con aproximadamente 500 marcadores de ADN de microsatélite. Se identificó un locus del gen de CIE en el cromosoma 9 canino basándose en una puntuación de LOD máxima de 12,2. El análisis de haplotipo con marcadores de SNP en esta región confirmó el locus y estrechó el intervalo que contenía el gen de CIE a <250 kb. Se analizaron en cuatro genes candidatos posicionales de esta región (*DNM1*, *PTGES2*, *AK1* y *SLC2A8*) las posibles mutaciones en varios perros de control y afectados por CIE. Se excluyeron los genes

PTGES2, *AK1* y *SLC2A8*, sin embargo se identificó una mutación nucleotídica de G a T en la posición 767 del gen *DNM1* (**Figura 1**). Esta mutación causa que el residuo aminoacídico de arginina normal en el codón 256 de la proteína dinamina 1 se reemplace por un residuo de leucina (**Figura 2**). Esta mutación génica de *DNM1* de CIE se designará como G767T en la secuencia nucleotídica codificante, dando como resultado la mutación aminoacídica Arg256Leu o R256L en la dinamina 1. Los alelos son por tanto G767 y T767 cuando se designa la secuencia de ADN codificante de *DNM1* y Arg256 y Leu256 cuando se designa la secuencia aminoacídica de la dinamina 1, y los alelos asociados con CIE son los alelos de ADN T767 y de proteína L256.

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de dinamina 1 canina de control y humana completas revela una notable conservación interespecies. 860 de los 864 aminoácidos eran idénticos, y de estas cuatro diferencias, solo dos (Q por H en el codón 128, y A por T en el codón 511) eran sustituciones no conservativas. El alineamiento de secuencia aminoacídica del segmento de residuos 241-270 del *DNM1* canino entre múltiples especies y los otros dos miembros de la familia del gen de dinamina (*DNM2* y *DNM3*) revela también un alto nivel de conservación (**Figura 3**). Los residuos aminoacídicos 250-263 de *DNM1* de vertebrados son idénticos, y los residuos 251-263 de *Drosophila* y los residuos 254-259 de *C. elegans* son idénticos a las secuencias de vertebrados. El *DNM1* de mamífero es también idéntico a las isoformas *DNM1* y *DNM3* en los residuos aminoacídicos 254-263. Estos datos de secuencia combinados indicaban que la sustitución aminoacídica de *DNM1* R256L era el mejor candidato a mutación de CIE para buscar adicionalmente en una población de muestra mayor.

Se formaron seis categorías diferentes de perros cobradores de labrador sometidos al estudio de colapso basándose en la información médica y de cuestionario disponible. Son los siguientes:

Grupo 1. Presuntamente afectados. Perros con un historial de más de un episodio de colapso en que las patas traseras se debilitaron en primer lugar y se volvieron flácidas. Estos episodios cursaron sin dolor y los perros no tenían problemas metabólicos, respiratorios, cardíacos, musculares u ortopédicos detectables basándose en el examen veterinario y en el ensayo de cribado sanguíneo.

Grupo 2. Colapso recurrente. Perros con una descripción incompleta de los episodios de colapso.

Grupo 3. Episodio de colapso único. Estos perros satisfacían por lo demás los criterios de presuntamente afectados.

Grupo 4. Colapso atípico. Perros con episodios recurrentes de colapso, sin embargo la descripción no coincidía exactamente con los criterios de clasificación de presuntamente afectados.

Grupo 5. Colapso alternativo. Perros para los que se identificó otra causa potencial subyacente de colapso.

Grupo 6. Sin colapso. No se observó nunca colapso en estos perros.

La Tabla 2 del ejemplo 1 siguiente presenta la frecuencia de los tres genotipos de *DNM1* en cobradores de labrador que satisfacían los diferentes criterios de clasificación. Un 97% de los perros presuntamente afectados y un 88% de los perros con colapso pero documentación incompleta eran homocigóticos del alelo T767. Los perros en que la probabilidad de padecer verdaderamente CIE era menor (colapso único reseñado, colapso atípico u otra causa potencial identificada) tenían una probabilidad decreciente de ser homocigóticos del alelo T767 (62%, 43% y 20%, respectivamente). Casi una docena de perros que colapsaron solo una vez o que tuvieron episodios de colapso que eran menos típicos o descritos incompletamente eran heterocigóticos. Un 9% de los perros para los que los dueños no reseñaron episodios de colapso eran homocigóticos del alelo T767 asociado con CIE, mientras que un 49% eran heterocigóticos y un 42% eran homocigóticos del alelo G767.

Estaban disponibles para genotipado 35 progenitores de perros homocigóticos de T767. 29 de estos progenitores eran heterocigóticos y no tuvieron informes de colapso. 6 de estos progenitores eran homocigóticos de T767 ellos mismos; 4 de ellos tuvieron informes de colapso y los otros 2 pueden no haberse sometido a las condiciones que causan un colapso. Estos datos, y el hecho de que la mayoría de perros que colapsan son T/T, son indicativos de un rasgo recesivo autosómico. Sin embargo, que un 9% de los perros que no se reseñó que colapsaran fueran también T/T indica que el rasgo puede no ser completamente penetrante o que los perros genéticamente susceptibles no colapsan hasta que se exponen a condiciones extremas (ejercicio y excitación) suficientes para iniciar el colapso. Que 12 de 89 (13%) de los perros G/T experimentaran alguna forma de colapso (habitualmente atípica o un episodio único) podría indicar una dominancia parcial u otro trastorno que causa el colapso. Por último, que una serie de perros que experimentan un colapso tengan un genotipo G/G indica que existen otros fenotipos de colapso atribuibles a otras causas.

Este polimorfismo de *DNM1* G767T es un candidato convincente para mutación causal de CIE debido a la función crítica de la dinamina en la transmisión sináptica en el sistema nervioso central y a la alta conservación evolutiva entre especies. Según el NCBI, este gen codifica un miembro de la subfamilia de dinamina de proteínas de unión a GTP. La proteína codificada posee propiedades mecanoquímicas únicas usadas para tubular y cortar membranas, y está implicada en la endocitosis mediada por clatrina y otros procesos de tráfico vesicular. Los ratones en que se ha eliminado génicamente el gen *DNM1* no son viables y sus neuronas exhiben una pérdida de actividad tras la estimulación repetida. Además, se han observado una serie de fenotipos en *Drosophila* y *C. elegans* que portan mutaciones en los genes homólogos.

El ensayo de ADN posibilita a veterinarios, dueños, entrenadores y criadores determinar más exactamente si un perro con signos clínicos de CIE tiene la forma heredable y “clásica” de la enfermedad que puede atribuirse específicamente a esta mutación del gen *DNM1*. Todo lo necesario es una muestra de tejido que contenga el ADN del individuo (típicamente, frotis bucal o sangre) y una tecnología de PCR y análisis de secuencia apropiada para detectar el cambio nucleotídico único de G a T.

Además, el ensayo de ADN posibilita a dueños y criadores determinar si puede esperarse que cualquier perro, tanto si muestra signos de CIE como si no, produzca descendencia con CIE. Un 100% de los cachorros producidos por el emparejamiento de dos perros T/T serían susceptibles de CIE. Un 50% de los cachorros producidos por el emparejamiento de un perro T/T con un heterocigótico serían susceptibles y un 50% serían heterocigóticos. Un 25% de los cachorros producidos por el emparejamiento de dos heterocigóticos serían susceptibles y un 50% serían heterocigóticos. Los programas de crianza podrían incorporar esta información a la selección de progenitores que podría reducir o evitar la producción de perros homocigóticos afectados que sean susceptibles de CIE, y reducir eventualmente e incluso potencialmente eliminar el CIE.

El diagnóstico actual de CIE en perros por veterinarios requiere un ensayo de ejercicio de cobro estandarizado, pero está basado más a menudo en signos de colapso reseñados durante el entrenamiento o la competición en el campo. Puesto que hay condiciones ambientales y de “excitación” variables en el campo, y que diferentes perros pueden colapsar en condiciones ligeramente diferentes, estos no son diagnósticos altamente fiables. Merece la pena observar que el CIE es una afección enteramente diferente de otra enfermedad neuromuscular heredable y prevalente en cobradores de labrador conocida como miopatía nuclear central o MNC.

Los inventores están estudiando la frecuencia de la mutación de *DNM1* en cobradores y otras razas (Tabla 3). Estos perros se obtuvieron de competiciones de prueba de campo en el medio oeste septentrional y procedían de 20 estados diferentes y 3 provincias canadienses. En este momento, se sabe que casi un 5% de todos los cobradores de labrador que participan en estas pruebas de campo son homocigóticos y un 39% son portadores. Esto refleja un fuerte efecto fundador de los perros campeones que han sido los padres y abuelos de una gran fracción de la población. Sin embargo, no es conocida la incidencia de la mutación de *DNM1* en otras subpoblaciones que probablemente comprendan la mayoría de todos los cobradores de labrador de los EE.UU. La mutación de *DNM1* está también presente en extensiones probablemente variables en otras razas de cobradores, incluyendo cobradores de la bahía de Chesapeake y de pelo rizado, así como pastores escoceses.

Definiciones

El término “alelo” designa las diferentes variantes de secuencia encontradas en diferentes regiones polimórficas. Las variantes de secuencia pueden ser cambios de base únicos o múltiples, incluyendo sin limitación inserciones, deleciones o sustituciones, o pueden ser un número variable de repeticiones de secuencia. Por ejemplo, la presente invención se refiere, entre otros, al descubrimiento de que un alelo del gen *DNM1* está asociado con CIE en perros. Un “alelo de *DNM1*” designa un alelo normal del locus *DNM1* así como un alelo que porta una(s) variación(es) que predispone(n) a un perro a desarrollar CIE. La coexistencia de múltiples alelos en un locus es conocida como “polimorfismo genético”. Cualquier sitio en que existan múltiples alelos como componentes estables de la población es por definición “polimórfico”. Un alelo se define como polimórfico si está presente a una frecuencia de al menos un 1% de la población. Un “polimorfismo de nucleótido único (SNP)” es una variación de la secuencia de ADN que implica un cambio en un solo nucleótido.

“Actividad biológica” o “bioactividad” o “actividad” o “función biológica”, que se usan intercambiamente, significa con los fines de la presente memoria una función efectora o antigénica que es efectuada directa o indirectamente por un polipéptido *DNM1* (tanto en su conformación nativa como desnaturalizada) o por cualquier subsecuencia del mismo. Las actividades biológicas incluyen la unión a un péptido diana, por ejemplo un receptor. Puede modularse una bioactividad de *DNM1* afectando directamente a un polipéptido *DNM1*. Como alternativa, puede modularse una bioactividad de *DNM1* modulando el nivel de polipéptido *DNM1*, tal como modulando la expresión de un gen *DNM1*.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “fragmento bioactivo de un polipéptido *DNM1*” designa un fragmento de un polipéptido *DNM1* completo en el que el fragmento imita específicamente o antagoniza la actividad de un polipéptido *DNM1* de tipo silvestre.

La expresión “una actividad aberrante”, como se aplica a una actividad de un polipéptido tal como *DNM1*, designa una actividad que difiere de la actividad del polipéptido silvestre o nativo o que difiere de la actividad del polipéptido en un sujeto sano. Una actividad de un polipéptido puede ser aberrante debido a que sea más fuerte que la actividad de su contrapartida nativa. Como alternativa, una actividad puede ser aberrante debido que sea más débil o esté ausente respecto a la actividad de su contrapartida nativa. Una actividad aberrante puede ser también un cambio de actividad. Por ejemplo, un polipéptido aberrante puede interactuar con un péptido diana diferente. Una célula puede tener una actividad de *DNM1* aberrante debido a la sobreexpresión o subexpresión de un gen del locus *DNM1* que codifica un polipéptido del locus *DNM1*.

Los términos “control” o “muestra de control” designan cualquier muestra apropiada para la técnica de detección empleada. La muestra de control puede contener los productos de la técnica de detección alélica empleada o el

material para ensayar. Además, los controles pueden ser controles positivos o negativos. A modo de ejemplo, cuando la técnica de detección alélica es amplificación por PCR, seguida por fraccionamiento por tamaño, la muestra de control puede comprender fragmentos de ADN de un tamaño apropiado. Igualmente, cuando la técnica de detección alélica implica la detección de una proteína mutada, la muestra de control puede comprender una muestra de una proteína mutante. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la muestra de control comprende el material para ensayar. Sin embargo, cuando la muestra para ensayar sea ADN genómico, la muestra de control es preferiblemente una muestra altamente purificada de ADN genómico.

"Genotipado" designa el análisis del ADN genómico de un individuo (o un ácido nucleico correspondiente al mismo) para identificar una mutación o polimorfismo que causa o contribuye a una enfermedad particular, directamente o basándose en la detección de una mutación o polimorfismo (un marcador) que está en desequilibrio de ligamiento con el gen causante de o contribuyente a la enfermedad.

El término "haplotipo" como se usa en la presente memoria se pretende que designe un conjunto de alelos que se heredan conjuntamente como un grupo (están en desequilibrio de ligamiento) a niveles estadísticamente significativos ($p_{\text{corr}} < 0,05$). Como se usa en la presente memoria, la frase "un haplotipo de *DNM1*" designa un haplotipo en los loci *DNM1*.

"Riesgo aumentado" designa una frecuencia estadísticamente mayor de aparición de la enfermedad o afección en un individuo que porta un alelo polimórfico particular en comparación con la frecuencia de aparición de la enfermedad o afección en un miembro de una población que no porta el alelo polimórfico particular.

"Desequilibrio de ligamiento" designa la herencia conjunta de dos alelos a frecuencias mayores de lo esperable a partir de las secuencias separadas de aparición de cada alelo en una población de control dado. La frecuencia esperada de aparición de dos alelos que se heredan independientemente es la frecuencia del primer alelo multiplicada por la frecuencia del segundo alelo. Los alelos que aparecen conjuntamente a frecuencias esperadas se dice que están en "desequilibrio de ligamiento". La causa del desequilibrio de ligamiento a menudo no está clara. Puede ser debido a la selección de ciertas combinaciones alélicas o a una mezcla reciente de poblaciones genéticamente heterogéneas. Además, en el caso de marcadores que están muy estrechamente ligados con un gen patológico, se espera la asociación de un alelo (o grupo de alelos ligados) con el gen patológico si la mutación patológica apareció en el pasado reciente, de modo que no haya transcurrido suficiente tiempo para conseguir el equilibrio mediante eventos de recombinación en la región cromosómica específica. Cuando se designan patrones alélicos que comprenden más de un alelo, un primer patrón alélico está en desequilibrio de ligamiento con un segundo patrón alélico si todos los alelos que comprende el primer patrón alélico están en desequilibrio de ligamiento con al menos uno de los alelos del segundo patrón alélico.

Un "gen mutado" o "mutación" o "mutación funcional" designa una forma alélica de un gen que es capaz de alterar el fenotipo de un sujeto que tiene el gen mutado respecto a un sujeto que no tiene el gen mutado. El fenotipo alterado causado por una mutación puede corregirse o compensarse por ciertos agentes. Si un sujeto debe ser homocigótico de esta mutación para tener un fenotipo alterado, se dice que la mutación es recesiva. Si es suficiente una copia del gen mutado para alterar el fenotipo del sujeto, se dice que la mutación es dominante. Si un sujeto tiene una copia del gen mutado y tiene un fenotipo que es intermedio entre el de un sujeto homocigótico y otro heterocigótico (para ese gen), se dice que la mutación es codominante.

La expresión "polimorfismo" designa la coexistencia de más de una forma de un gen o una porción (por ejemplo variación alélica) del mismo. Una porción de un gen del que hay al menos dos formas diferentes, concretamente dos secuencias nucleotídicas diferentes, se designa como una "región polimórfica de un gen". Una secuencia genética específica en una región polimórfica de un gen es un alelo. Una región polimórfica puede ser un solo nucleótido, cuya identidad difiere en diferentes alelos. Una región polimórfica puede ser también de varios nucleótidos de longitud.

El término "tendencia a la enfermedad", también "predisposición" o "susceptibilidad" a la enfermedad o cualquier frase similar significa que se ha descubierto por la presente que ciertos están asociados con o son predictivos de la incidencia de desarrollo de una enfermedad particular en un sujeto (por ejemplo, colapso inducido por el ejercicio). Los alelos están por tanto sobrerrepresentados en frecuencia en los individuos con enfermedad en comparación con los individuos sanos. Por tanto, estos alelos pueden usarse para predecir la enfermedad incluso en individuos presintomáticos o preafectados.

Como se usa en la presente memoria, el término "hibrida específicamente" o "detecta específicamente" designa la capacidad de una molécula de ácido nucleico de hibridar con al menos aproximadamente 6 nucleótidos consecutivos de una muestra de ácido nucleico.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan intercambiamente en la presente memoria.

La divulgación comprende moléculas de ácido nucleico aisladas o sustancialmente purificadas. En el contexto de la presente invención, una molécula de ADN "aislada" o "purificada" es una molécula de ADN que, por intervención humana, existe apartada de su entorno nativo y por lo tanto no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ADN aislada puede existir en forma purificada o puede existir en un entorno no nativo. Por ejemplo, una molécula de

ácido nucleico "aislada" o "purificada", o porción de la misma, está sustancialmente exenta de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización, un ácido nucleico "aislado" está exento de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (concretamente, secuencias localizadas en los extremo 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias nucleotídicas que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico. Están también comprendidos por la presente invención los fragmentos y variantes de las secuencias nucleotídicas dadas a conocer y las proteínas o proteínas parciales codificadas por las mismas.

Se entiende por "fragmento" o "porción" de una secuencia la longitud completa o menos que completa de la secuencia nucleotídica codificante, o de la secuencia aminoacídica de un polipéptido o proteína. En lo referente a una molécula de ácido nucleico, secuencia o segmento de la invención cuando está ligado con otras secuencias para expresión, "porción" o "fragmento" significa una secuencia que tiene, por ejemplo, al menos 80 nucleótidos, al menos 150 nucleótidos o al menos 400 nucleótidos. Si no se emplea para expresión, una "porción" o "fragmento" significa, por ejemplo, al menos 9, 12, 15 o al menos 20 nucleótidos consecutivos, por ejemplo, sondas y cebadores (oligonucleótidos), correspondientes a la secuencia nucleotídica de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Como alternativa, los fragmentos o porciones de una secuencia nucleotídica que son útiles como sondas de hibridación generalmente no codifican fragmentos de proteína que retienen actividad biológica. Por tanto, los fragmentos o porciones de una secuencia nucleotídica pueden estar en el intervalo de al menos aproximadamente 6 nucleótidos, aproximadamente 9, aproximadamente 12 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos o más.

Una "variante" de una molécula es una secuencia que es sustancialmente similar a la secuencia de la molécula nativa. Para las secuencias nucleotídicas, las variantes incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican una secuencia aminoacídica idéntica a la proteína nativa. Las variantes alélicas de origen natural tales como estas pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas como, por ejemplo, con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Las secuencias nucleotídicas variantes incluyen también secuencias nucleotídicas derivadas sintéticamente tales como las generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida a sitio que codifica la proteína nativa, así como aquellas que codifican un polipéptido que tiene sustituciones aminoacídicas. Generalmente, las variantes de secuencia nucleotídica de la invención tendrán en al menos una realización un 40%, 50%, 60% a 70%, por ejemplo, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% a 79%, generalmente al menos un 80%, por ejemplo, 81%-84%, al menos un 85%, por ejemplo, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% a 98% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica nativa (endógena).

Son polinucleótidos "sintéticos" aquellos preparados mediante síntesis química. "Molécula de ADN recombinante" es una combinación de secuencias de ADN que se unen conjuntamente usando tecnología de ADN recombinante y procedimientos usados para unir conjuntamente secuencias de ADN como se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001).

El término "gen" se usa ampliamente para designar cualquier segmento de ácido nucleico asociado con una función biológica. Los genes incluyen secuencias codificantes y/o secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Por ejemplo, gen designa un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm, ARN funcional o una proteína específica, tal como dinamina 1, incluyendo sus secuencias reguladoras. Los genes incluyen también segmentos de ADN no expresados que forman, por ejemplo, secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes, incluyendo la clonación de una fuente de interés o la síntesis a partir de la información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para tener los parámetros deseados. Además, un "gen" o un "gen recombinante" designa una molécula de ácido nucleico que comprende un marco abierto de lectura e incluye al menos una secuencia exónica y (opcionalmente) una intrónica. El término "intrón" designa una secuencia de ADN presente en un gen dado que no se traduce en proteína y se encuentra generalmente entre exones.

"De origen natural", "nativo" o "de tipo silvestre" se usa para describir un objeto que puede encontrarse en la naturaleza en contraposición a producirse artificialmente. Por ejemplo, una secuencia nucleotídica presente en un organismo (incluyendo un virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente en laboratorio, es de origen natural. Además, "de tipo silvestre" designa un gen normal, u organismo encontrado en la naturaleza sin ninguna mutación conocida.

Dinamina 1 ("mutante") (DMN1) designa la proteína o fragmento de la misma que es codificada por un gen *DMN1* que tiene una mutación, por ejemplo, como podría aparecer en el locus *DMN1*. Las mutaciones en *DMN1* pueden ser causantes de enfermedad en un perro heterocigótico del alelo *DMN1* mutante, por ejemplo un perro heterocigótico de una mutación que conduce a un producto génico mutante tal como una mutación de sustitución de *DMN1*, tal como la designada en la presente memoria como G767T.

“Mutaciones somáticas” son aquellas que aparecen solo en ciertos tejidos, por ejemplo en tejido hepático, y no se heredan en la línea germinal. Las mutaciones “de línea germinal” pueden encontrarse en cualquiera de los tejidos del cuerpo y son heredadas. La presente mutación de *DNM1* es una mutación de línea germinal.

5 “Homología” designa la identidad porcentual entre dos polinucleótidos o dos secuencias polipeptídicas. Dos ADN o secuencias polipeptídicas son “homólogos” entre sí cuando la secuencia exhibe al menos aproximadamente un 75% a 85% (incluyendo un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, y 85%), al menos aproximadamente un 90% o al menos aproximadamente un 95% a 99% (incluyendo un 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia contigua a lo largo de una longitud definida de las secuencias.

10 Se usan los siguientes términos para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) “secuencia de referencia”, (b) “ventana de comparación”, (c) “identidad de secuencia”, (d) “porcentaje de identidad de secuencia” y (e) “identidad sustancial”.

15 (a) Como se usa en la presente memoria, “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como base para comparación de secuencia. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de la secuencia especificada; por ejemplo, como segmento de un ADNc o secuencia génica completos, o el ADNc o secuencia génica completos.

20 (b) Como se usa en la presente memoria, “ventana de comparación” hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia polinucleotídica, en la que la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (concretamente huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Generalmente, la ventana de comparación es de al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede ser de 30, 40, 50, 100 o más. Los especialistas en la materia entenderán que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia polinucleotídica, se introduzca típicamente una penalización de hueco y se reste del número de coincidencias.

25 Los procedimientos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la materia. Por tanto, la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias cualesquiera puede lograrse usando un algoritmo matemático.

30 Las instrumentaciones informatizadas de esos algoritmos matemáticos pueden utilizarse en comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas instrumentaciones incluyen, pero sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, versión 8 (disponible en Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Los alineamientos que usan estos programas pueden efectuarse usando los parámetros por defecto.

35 El software para efectuar análisis BLAST está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (véase la www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo implica identificar en primer lugar los pares de secuencia de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud de una secuencia de base de datos. T se designa como el umbral de puntuación de palabra vecina. Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo lo que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Se calculan las puntuaciones acumuladas usando, para las secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa por un par de residuos coincidentes, siempre > 0) y N (puntuación de penalización por residuos no desapareados, siempre < 0). Para secuencias aminoacídicas, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineamiento acumulada cae una cantidad X desde su valor máximo alcanzado, la puntuación acumulada cae a cero o menos debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuo de puntuación negativa o se alcanza el extremo de cualquier secuencia.

40 Además de calcular la identidad de secuencia porcentual, el algoritmo BLAST efectúa también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Es una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST la probabilidad de suma mínima (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que aparezca por casualidad una coincidencia entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de ensayo se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma mínima es menor de aproximadamente 0,1, menor de aproximadamente 0,01 o incluso menor de aproximadamente 0,001.

55 Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos (en BLAST 2.0). Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para efectuar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se usan BLAST, BLAST con huecos o PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN para secuencias nucleotídicas, BLASTX para proteínas). El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa por defecto una longitud de

palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, un corte de 100, M= 5, N= -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias aminoacídicas, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62. Véase la www.ncbi.nlm.nih.gov. El alineamiento puede efectuarse también manualmente por inspección visual.

5 Con fines de la presente invención, la comparación de secuencias nucleotídicas para la determinación de la identidad de secuencia porcentual con las secuencias promotoras dadas a conocer en la presente memoria se realiza preferiblemente usando el programa BlastN (versión 1.4.7 o posterior) con sus parámetros por defecto o cualquier programa equivalente. Se entiende por "programa equivalente" cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento que tiene idénticas
10 coincidencias nucleotídicas o aminoacídicas y una identidad de secuencia porcentual idéntica cuando se compara con el correspondiente alineamiento generado por un programa BLAST.

(c) Como se usa en la presente memoria, "identidad de secuencia" o "identidad", en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido, hace referencia a un porcentaje especificado de residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para correspondencia máxima en una ventana de comparación especificada, como se mide mediante algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia con referencia a las proteínas, se reconoce que las posiciones de residuo que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones aminoacídicas conservativas, en que los residuos aminoacídicos se sustituyen por otros residuos aminoacídicos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, la identidad de secuencia porcentual puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservativas se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los especialistas en la materia. Típicamente, este implica puntuar una sustitución conservativa como un despareamiento parcial en lugar de total, aumentando así la identidad de secuencia porcentual. Por tanto, por ejemplo, cuando se da a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se da a una sustitución no conservativa una puntuación de 0, se da a una sustitución conservativa una puntuación entre 0 y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, como se instrumentaliza en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) Como se usa en la presente memoria, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia nucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (concretamente huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en que aparece la base de ácido nucleico o residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias, proporcionando el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100, proporcionando el porcentaje de identidad de secuencia.

(e)(i) El término "identidad sustancial" de secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o 79%; al menos un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89%; al menos un 90%, 91%, 92%, 93% o 94%; o incluso al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineamiento descritos que usan parámetros estándares. Un especialista en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la correspondiente identidad de las proteínas codificadas por dos secuencias nucleotídicas teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, la colocación del marco de lectura y similares. Identidad sustancial de las secuencias aminoacídicas significa normalmente con estos fines una identidad de secuencia de al menos un 70% o al menos un 80%, 90% o incluso al menos un 95%.

Otra indicación de que las secuencias nucleotídicas son sustancialmente idénticas es si dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas (véase a continuación). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser de aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones rigurosas comprenden temperaturas en el intervalo de aproximadamente 1°C a aproximadamente 20°C, dependiendo del grado deseado de rigor como se califica de otro modo en la presente memoria. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto puede aparecer, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético. Es una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas cuando el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

(e)(ii) El término "identidad sustancial" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos un 70%, 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o 79%; al menos un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89%; o al menos un 90%, 91%, 92%, 93% o 94%; o incluso al menos un 95%, 96%,

97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia en una ventana de comparación especificada. Es una indicación de que dos secuencias peptídicas son sustancialmente idénticas que un péptido sea inmunológicamente reactivo con anticuerpos creados frente al segundo péptido. Por tanto, un péptido es sustancialmente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo en una sustitución conservativa.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia si es necesario y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces la identidad de secuencia porcentual para la(s) secuencia(s) de ensayo respecto a la secuencia de referencia basándose en los parámetros de programa designados.

Como se observa anteriormente, es otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas que las dos moléculas hibriden entre sí en condiciones rigurosas. La frase "hibridar específicamente con" designa la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula solo con una secuencia nucleotídica particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). "Se une(n) sustancialmente" designa la hibridación complementaria entre un ácido nucleico de sonda y un ácido nucleico diana y comprende desapareamientos menores que pueden adaptarse reduciendo el rigor de los medios de hibridación para conseguir la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

"Condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas", en el contexto de experimentos de hibridación de ácido nucleico tales como hibridaciones Southern y Northern, dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Las secuencias más largas hibridan específicamente a mayores temperaturas. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. La especificidad es típicamente función de los lavados de posthibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse por la ecuación de Meinkoth y Wahl:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$$

en que M es la molaridad de los cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de desapareamiento; por tanto, T_m , condiciones de hibridación y/o lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con >90% de identidad, la T_m puede reducirse 10°C . Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser de aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones de alto rigor pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C menos que el punto de fusión térmico (T_m); las condiciones de rigor moderado pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C menos que el punto de fusión térmico (T_m) y las condiciones de bajo rigor pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C menos que el punto de fusión térmico (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T deseada, los especialistas en la materia entenderán que se describen inherentemente variaciones en el rigor de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado de desapareamiento deseado da como resultado una T menor de 45°C (solución acuosa) o de 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que pueda usarse una mayor temperatura. Generalmente, se seleccionan las condiciones de hibridación y lavado fuertemente rigurosas para ser de aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos.

Es un ejemplo de condiciones de rigor alto NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Es un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas un lavado con 0,2X SSC a 65°C durante 15 minutos. A menudo, un lavado fuertemente riguroso es precedido por un lavado de bajo rigor para eliminar la señal de sonda de fondo. Es un ejemplo de lavado de rigor medio para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, 1X SSC a 45°C durante 15 minutos. Es un ejemplo de lavado de rigor bajo para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, 4-6X SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas implican típicamente concentraciones salinas de menos de aproximadamente 1,5 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente de al menos aproximadamente 30°C y al menos de aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, > 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas pueden conseguirse también con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2x (o más) la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto aparece, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

Se seleccionan las condiciones muy rigurosas para ser iguales a la T_m de una sonda particular. Es un ejemplo de condiciones rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro de una transferencia Southern o Northern, un 50% de formamida, por ejemplo, hibridación en 50% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C y un lavado con 0,1X SSC a 60 a 65°C. Las condiciones de bajo rigor ejemplares incluyen hibridación con una solución tampón de 30 a 35% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 37°C y un lavado con 1x a 2x SSC (20X SSC= NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 0,3 M) a 50 a 55°C. Las condiciones de rigor moderado ejemplares incluyen la hibridación en 40 a 45% de formamida, NaCl 1,0 M, 1% de SDS a 37°C y un lavado con 0,5X a 1X SSC a 55 a 60°C.

Se entiende por polipéptido "variante" un polipéptido derivado de la proteína nativa por delección (denominada truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína nativa; delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Dichas variantes pueden ser el resultado, por ejemplo, de polimorfismo genético o manipulación humana. Los procedimientos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la materia.

Por tanto, los polipéptidos de la divulgación pueden alterarse de diversos modos incluyendo sustituciones, delecciones, truncamientos e inserciones aminoacídicas. Los procedimientos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la materia. Por ejemplo, las variantes de secuencia aminoacídica de los polipéptidos pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de la secuencia nucleotídica son bien conocidos en la materia. La orientación sobre las sustituciones aminoacídicas apropiadas que no afecten la actividad biológica de la proteína de interés es bien conocida en la materia. Se prefieren sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido por otro que tenga propiedades similares.

Por tanto, los genes y secuencias nucleotídicas de la divulgación incluyen tanto las secuencias de origen natural como las formas mutantes. Igualmente, los polipéptidos de la invención comprenden proteínas de origen natural así como variaciones y formas modificadas de las mismas. Dichas variantes seguirán poseyendo la actividad deseada. Las delecciones, inserciones y sustituciones de la secuencia polipeptídica comprendida en la presente memoria no se espera que produzcan cambios radicales en las características del polipéptido. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, delección o inserción antes de hacerla, un especialista en la materia apreciará que el efecto se evalúe mediante ensayos de cribado rutinarios.

Las sustituciones, delecciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de un 5%, más típicamente menos de un 1%) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas conservativamente".

"Variaciones modificadas conservativamente" de una secuencia de ácido nucleico particular designa aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias aminoacídicas idénticas o esencialmente idénticas, o cuando la secuencia de ácido nucleico no codifica una secuencia aminoacídica, secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGT, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos el aminoácido arginina. Por tanto, en cada posición en que una arginina se especifique por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar la proteína codificada. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una clase de las "variaciones modificadas conservativamente". Cada secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria que codifica un polipéptido describe también cada posible variación silenciosa, excepto cuando se observa otra cosa. Un especialista en la materia reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto ATG, que es habitualmente el único codón para metionina) puede modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica mediante técnicas estándares. En consecuencia, cada "variación silenciosa" de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

El término "transformación" designa la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de una célula hospedadora, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Las células hospedadoras que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se designan como células "transgénicas" y los organismos que comprenden células transgénicas se designan como "organismos transgénicos".

Una "célula hospedadora" es una célula que se ha transformado, o que es capaz de transformación, por una molécula de ácido nucleico exógena. Por tanto, "transformado", "transgénico" y "recombinante" designan una célula u organismo hospedador en que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heterólogo. La molécula de ácido nucleico puede integrarse establemente en el genoma generalmente conocido en la materia. Los procedimientos conocidos de PCR incluyen, pero sin limitación, procedimientos que usan cebadores apareados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de vector, cebadores parcialmente desapareados y similares. Por ejemplo, las células "transformadas", "transformantes" y "transgénicas" han pasado por el proceso de transformación y contienen un gen extraño integrado en su cromosoma. El término "no transformado" designa células normales que no han pasado por el proceso de transformación.

“Módulo de expresión”, como se usa en la presente memoria, significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica particular en una célula hospedadora apropiada, que comprende un promotor ligado operativamente con la secuencia nucleotídica de interés que está ligada operativamente con señales de terminación. Incluye también típicamente las secuencias necesarias para la traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. La región codificante codifica habitualmente una proteína de interés, pero puede codificar también un ARN de interés funcional, por ejemplo, ARN anticodificante o ARN no traducido, en la dirección codificante o anticodificante. El módulo de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El módulo de expresión puede ser también uno de origen natural, pero que se ha obtenido de forma recombinante, útil para expresión heteróloga. La expresión de la secuencia nucleotídica en el módulo de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solo cuando la célula hospedadora se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor puede ser también específico de un tejido u órgano o etapa de desarrollo particular.

Dichos módulos de expresión tendrán la región de inicio de la transcripción de la invención ligada con una secuencia nucleotídica de interés. Dicho módulo de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción del gen de interés esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El módulo de expresión puede contener adicionalmente genes de marcadores seleccionables.

El módulo de transcripción incluirá, en la dirección 5'-3' de transcripción, una región de inicio de la transcripción y la traducción, una secuencia de ADN de interés y una región de terminación de la transcripción y la traducción funcional en plantas. La región de terminación puede ser nativa de la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa de la secuencia de ADN de interés o puede derivar de otra fuente.

Las expresiones “secuencia de ADN heterólogo”, “segmento de ADN exógeno” o “ácido nucleico heterólogo” designan cada uno una secuencia que se origina en una fuente extraña a la célula hospedadora particular o, si es de la misma fuente, que está modificada desde su forma original. Por tanto, un gen heterólogo en una célula hospedadora incluye un gen que es endógeno de la célula hospedadora particular pero que se ha modificado, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis monocatenaria. Los términos incluyen también múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. Por tanto, los términos designan un segmento de ADN que es extraño o heterólogo de la célula, u homólogo de la célula pero en una posición en el ácido nucleico de la célula hospedadora en que el elemento no se encuentra normalmente. Los segmentos de ADN exógeno se expresan proporcionando polipéptidos exógenos.

Una secuencia de ADN “homóloga” es una secuencia de ADN que está naturalmente asociada con una célula hospedadora en que se introduce.

“Genoma” designa el material genético completo de un organismo.

“Secuencia codificante” designa una secuencia de ADN o ARN que codifica una secuencia aminoacídica específica y excluye las secuencias no codificantes. Por ejemplo, una “secuencia codificante” de ADN o una “secuencia que codifica” un polipéptido particular, es una secuencia de ADN que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se dispone bajo el control de los elementos reguladores apropiados. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción estará habitualmente situada en 3' a la secuencia codificante. Puede constituir una “secuencia codificante ininterrumpida”, concretamente que carece de un intrón, tal como en ADNc, o puede incluir uno o más intrones limitados por las zonas de corte y empalme apropiadas. Un “intrón” es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario pero que se elimina durante la escisión y religamiento del ARN en la célula para crear el ARNm maduro que puede traducirse a una proteína.

Los términos “marco abierto de lectura” y “ORF” designan la secuencia aminoacídica codificada entre los codones de inicio y terminación de la traducción de una secuencia codificante. Los términos “codón de inicio” y “codón de terminación” designan una unidad de tres nucleótidos adyacentes (“codón”) que especifica el inicio y terminación de la cadena, respectivamente, de la síntesis de proteína (traducción de ARNm).

El término “transcrito de ARN” designa el producto resultante de la transcripción de una secuencia de ADN catalizada por ARN polimerasa. Cuando un transcrito de ARN es una copia perfectamente complementaria de la secuencia de ADN, se designa como transcrito primario, o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcrito primario, y se designa como ARN maduro. “ARN mensajero” (ARNm) designa el ARN que no tiene intrones y que puede traducirse a proteína por la célula. “ADNc” designa un ADN mono- o bicatenario que es complementario y derivado de ARNm.

El término “secuencia reguladora” es reconocido en la materia y se entiende que incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias

reguladoras son conocidas por los especialistas en la materia. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora para transfectar y/o la cantidad de proteína de fusión para expresar.

5 El término “elementos de control” de ADN designa colectivamente promotores, sitios de unión a ribosoma, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en dirección 5', potenciadores y similares, que proporcionan colectivamente la transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula hospedadora. No todas estas secuencias de control tienen que estar siempre presentes en un vector recombinante a condición de que el gen deseado pueda transcribirse y traducirse.

10 Un elemento de control, tal como un promotor, “dirige la transcripción” de una secuencia codificante en una célula cuando la ARN polimerasa se une al promotor y transcribe la secuencia de codificación a ARNm, que se traduce entonces al polipéptido codificado por la secuencia codificante.

15 Una célula se ha “transformado” con ADN exógeno cuando dicho ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. El ADN exógeno puede integrarse o no (ligarse covalentemente) con el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariontes y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, es una célula transformada establemente aquella en que el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de modo que se hereda por las células hijas mediante replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariótica de establecer líneas celulares o clones que tienen una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

20 “Ligado operativamente” designa la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una esté afectada por la otra, por ejemplo, una disposición de elementos en que los componentes así descritos se configuran para efectuar su función habitual. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN reguladora está “ligada operativamente con” o “asociada con” una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido si las dos secuencias están situadas de tal modo que la secuencia de ADN reguladora afecta a la expresión de la secuencia de ADN codificante (concretamente, que la secuencia codificante o ARN funcional esté bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar ligadas operativamente con secuencias reguladoras en orientación codificante o anticodificante. Los elementos de control ligados operativamente con una secuencia codificante pueden afectar a la expresión de la secuencia codificante. Los elementos de control no tienen que estar contiguos a la secuencia codificante, a condición de que funcionen dirigiendo la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas aunque transcritas entre un promotor y la secuencia codificante, y el promotor puede considerarse “ligado operativamente” con la secuencia codificante.

35 “Fragmento de terminación de la transcripción” designa secuencias nucleotídicas que contienen una o más señales reguladoras, tales como secuencias señal de poliadenilación, capaces de terminar la transcripción. Los ejemplos incluyen las regiones 3' no reguladoras de genes que codifican nopalina sintasa y la subunidad pequeña de ribulosa bifsosfato carboxilasa.

40 “Fragmento de terminación de la traducción” o “codón de terminación de la traducción” o “codón de terminación” designa secuencias nucleotídicas que contienen una o más señales reguladoras, tal como uno o más codones de terminación en los tres marcos, capaces de terminar la traducción. La inserción de un fragmento de terminación de la traducción adyacente a o cerca del codón de inicio en el extremo 5' de la secuencia codificante dará como resultado una traducción nula o inapropiada. El cambio de al menos un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico puede dar como resultado una interrupción de la secuencia codificante del gen, por ejemplo, un codón de terminación prematuro. Dichos cambios de secuencia pueden causar una mutación en el polipéptido codificado por el gen *DNM1*.

45 **Ensayos y kits de pronóstico**

La invención está basada, al menos en parte, en el hallazgo que se describe con detalle en los siguientes ejemplos de que la *DNM1* (G767T) está significativamente asociada con el desarrollo de colapso inducido por el ejercicio. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos y kits para determinar si un sujeto tiene o es probable que desarrolle CIE.

50 Además de los patrones alélicos descritos anteriormente, como se describe en la presente memoria, un especialista en la materia puede identificar fácilmente otros alelos (incluyendo polimorfismos y mutaciones) que están en desequilibrio de ligamiento con un alelo asociado con CIE. Por ejemplo, puede recogerse una muestra de ácido nucleico de un primer grupo de sujetos sin un trastorno particular, así como ADN de un segundo grupo de sujetos con el trastorno. La muestra de ácido nucleico puede compararse entonces para identificar aquellos alelos que están sobrerrepresentados en el segundo grupo en comparación con el primer grupo, estando dichos alelos presuntamente asociados con un trastorno. Como alternativa, pueden identificarse alelos que están en desequilibrio de ligamiento con un alelo que está asociado con el trastorno, por ejemplo, mediante genotipado de una gran población y efectuando análisis estadístico para determinar cuáles alelos aparecen juntos más comúnmente de lo

- esperado. El grupo puede elegirse para comprender individuos relacionados genéticamente. Los individuos relacionados genéticamente incluyen individuos de la misma raza, o incluso de la misma familia. A medida que aumenta el grado de relación genética entre un grupo de control y un grupo de ensayo, lo hace también el valor predictivo de los alelos polimórficos que están ligados cada vez más distantemente con un alelo causante de enfermedad. Esto es debido al hecho de que ha pasado menos tiempo evolutivo para permitir que los polimorfismos que están ligados a lo largo de un cromosoma en una población fundadora se redistribuyan mediante eventos de cruzamiento genético. Por tanto, pueden desarrollarse ensayos de genotipado de diagnóstico específicos de raza e incluso específicos de familia para permitir la detección de alelos patológicos que surgieron en los tiempos más recientes de la evolución canina.
- El desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores polimórficos o entre un marcador polimórfico y una mutación causante de enfermedad es un estado metaestable. En ausencia de presión selectiva o con la reaparición de eventos mutacionales subyacentes ligados esporádicamente, los polimorfismos se disociarán eventualmente mediante eventos de recombinación cromosómica y alcanzarán así el equilibrio de ligamiento a lo largo del transcurso de la evolución. Por tanto, la probabilidad de encontrar un alelo polimórfico en desequilibrio de ligamiento con una enfermedad o afección puede aumentar con cambios en al menos dos factores: reduciendo la distancia física entre el marcador polimórfico y la mutación causante de enfermedad, y reduciendo el número de generaciones meióticas disponibles para la disociación del par ligado. La consideración del último factor sugiere que, cuanto más estrechamente relacionados estén dos individuos, más probablemente compartirán un cromosoma o región cromosómica progenitora común que contenga los polimorfismos ligados y menos probablemente este par ligado se convertirá en no ligado mediante eventos de cruzamiento meiótico que aparecen cada generación. Como resultado, cuanto más estrechamente relacionados estén dos individuos, más probable será que puedan heredarse conjuntamente polimorfismos ampliamente espaciados. Por tanto, para individuos relacionados por una raza o familia común, puede contarse con la fiabilidad de los loci polimórficos espaciados cada vez más distantemente como indicadora de la herencia de una mutación causante de enfermedad ligada.
- En otro aspecto, el procedimiento dado a conocer puede emplearse para detectar la presencia de un polimorfismo asociado con DNM1 que está en desequilibrio de ligamiento con uno o más alelos predictivos. Los alelos del haplotipo DNM1 que son conocidos por estar en desequilibrio de ligamiento son los genes y regiones intergénicas entre la posición 58,545 y 58,682 Mb en el cromosoma canino 9, según el ensamblaje actual de la secuencia de genoma canino denominado "canFam2". Por ejemplo, véanse los genes mostrados en las Figuras 8A-8C y la Figura 9.
- Pueden diseñarse sondas apropiadas para hibridar con un gen específico del locus DNM1. Como alternativa, estas sondas pueden incorporar otras regiones del locus genómico relevante, incluyendo secuencias intergénicas. Son obtenibles aún otros polimorfismos disponibles para uso con la presente invención a partir de diversas fuentes públicas. Puede encontrarse en dichas fuentes SNP así como otros polimorfismos caninos.
- En consecuencia, los segmentos nucleotídicos pueden usarse por su capacidad de formar selectivamente moléculas de dúplex con tramos complementarios de cromosomas caninos o ADNc de esa región o de proporcionar cebadores para la amplificación del ADN o ADNc de esta región. El diseño de las sondas apropiadas con este fin requiere la consideración de una serie de factores. Por ejemplo, encontrarán utilidad particular los fragmentos que tienen una longitud de entre 10, 15 o 18 nucleótidos a aproximadamente 20 o aproximadamente 30 nucleótidos. Las secuencias más largas, por ejemplo de 40, 50, 80, 90, 100 o incluso completas, son aún más preferidas para ciertas realizaciones. Las longitudes de oligonucleótidos de al menos aproximadamente 18 a 20 nucleótidos son bien aceptadas por los especialistas en la materia como suficientes para permitir una hibridación específica suficiente para que sea útil como sonda molecular. Además, dependiendo de la aplicación pretendida, se desearán emplear diversas condiciones de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieran una alta selectividad, se desearán emplear típicamente condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones salina relativamente bajas y/o de temperatura relativamente altas, tales como las proporcionadas por NaCl 0,02 M-0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Dichas condiciones selectivas pueden tolerar pocos, o ningún, desapareamiento entre la sonda y la hebra molde o diana.
- Pueden detectarse o controlarse otros alelos u otros indicios de trastorno en un sujeto junto con la detección de los alelos descritos anteriormente.
- Están disponibles muchos procedimientos para detectar alelos específicos en loci polimórficos caninos. Ciertos procedimientos para detectar un alelo polimórfico específico dependerán, en parte, de la naturaleza molecular del polimorfismo. Por ejemplo, las diversas formas alélicas del locus polimórfico pueden diferir en un solo par de bases del ADN. Dichos polimorfismos de nucleótido único (o SNP) son contribuyentes importantes a la variación genética, comprendiendo alrededor de un 80% de todos los polimorfismos conocidos, y su densidad en el genoma se estima que es de media 1 por cada 1.000 pares de bases. Los SNP son lo más frecuentemente de aparición bialélica en solo dos formas diferentes (aunque son teóricamente posibles hasta cuatro formas de un SNP, correspondientes a las cuatro bases nucleotídicas diferentes que aparecen en el ADN). No obstante, los SNP son más estables a mutaciones que otros polimorfismos, haciéndolos adecuados para estudios de asociación en que se usa el desequilibrio de ligamiento entre marcadores y una variante desconocida para cartografiar las mutaciones causantes

de enfermedad. Además, debido que los SNP tienen típicamente solo dos alelos, pueden genotiparse mediante un ensayo más/menos sencillo en lugar de una larga medida, haciéndolos más susceptibles de automatización.

Ácidos nucleicos

5 Las fuentes de secuencias nucleotídicas de las que pueden obtenerse las presentes moléculas de ácido nucleico incluyen cualquier fuente procariótica o eucariótica. Por ejemplo, pueden obtenerse de un mamífero, tal como una fuente celular canina. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden obtenerse a partir de una colección.

10 Como se discute anteriormente, los términos "aislado y/o purificado" designan el aislamiento *in vitro* de un ácido nucleico, por ejemplo una molécula de ADN o ARN, de su entorno celular natural y de la asociación con otros componentes de la célula tales como ácido nucleicos o polipéptido, de modo que pueda secuenciarse, replicarse y/o expresarse. Por ejemplo, "ácido nucleico aislado" puede ser una molécula de ADN que es complementaria de o que hibrida con una secuencia en un gen de interés, concretamente, una secuencia de ácido nucleico que codifica dinamina 1 (DNM1) y que permanece unida establemente en condiciones rigurosas (como se define por procedimientos bien conocidos en la materia). Por tanto, el ARN o ADN está "aislado" porque está exento de al menos un ácido nucleico contaminante con el que está normalmente asociado en la fuente natural de ARN o ADN y, en una realización de la invención, está sustancialmente exento de cualquier otro ARN o ADN de mamífero. La frase "exento de al menos un ácido nucleico fuente contaminante con el que está normalmente asociado" incluye el caso en que el ácido nucleico se reintroduce en la fuente o célula natural pero está en una localización cromosómica diferente o está flanqueado de otro modo por secuencias de ácido nucleico no encontradas normalmente en la célula fuente, por ejemplo en un vector o plásmido.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico recombinante", por ejemplo, "secuencia o segmento de ADN recombinante" designa un ácido nucleico, por ejemplo ADN, que se ha derivado o aislado de una fuente celular apropiada, que puede alterarse químicamente *in vitro* posteriormente de modo que su secuencia no sea la de origen natural, o que corresponde con secuencias de origen natural que no están situadas como estarían situadas en un genoma que no se hubiera transformado con ADN exógeno. Sería un ejemplo de un ADN preseleccionado "derivado" de una fuente, una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil en un organismo dado, y que se sintetiza químicamente entonces en forma esencialmente pura. Sería un ejemplo de dicho ADN "aislado" de una fuente, una secuencia de ADN útil que se escinde o retira de la fuente por medios químicos, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de restricción, de modo que pueda manipularse adicionalmente, por ejemplo amplificarse, para uso en la invención, mediante la metodología de la ingeniería genética.

25 Por tanto, la recuperación o el aislamiento de un fragmento dado de ADN a partir de una digestión de restricción puede emplear la separación de la digestión en gel de poliacrilamida o agarosa mediante electroforesis, la identificación del fragmento de interés mediante comparación de su movilidad frente a la de los fragmentos de ADN marcador de peso molecular conocido, la retirada de la sección de gel que contiene el fragmento deseado y la separación del gel del ADN. Por lo tanto, "ADN recombinante" incluye secuencias de ADN completamente sintéticas, secuencias de ADN semisintéticas, secuencias de ADN aisladas de fuentes biológicas y secuencias de ADN derivadas de ARN, así como mezclas de los mismos.

30 Las moléculas de ácido nucleico que tienen sustitución de bases (concretamente variantes) se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de módulo de una variante anteriormente preparada o versión no variante de la molécula de ácido nucleico.

Procedimientos de amplificación de ácido nucleico

35 Según los procedimientos de la presente invención, la amplificación del ADN presente en una muestra fisiológica puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la materia. Los ejemplos de técnicas de amplificación adecuadas incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (incluyendo, para amplificación de ARN, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de hebra, amplificación basada en la transcripción, replicación de secuencia automantenida (o "3SR"), el sistema Q β replicasa, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (o "NASBA"), reacción de reparación en cadena (o "RCR") y amplificación de ADN bumerán (o "BDA").

40 Las bases incorporadas al producto de amplificación pueden ser bases naturales o modificadas (modificadas antes o después de la amplificación), y las bases pueden seleccionarse para optimizar las etapas de detección electroquímica posteriores.

45 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede llevarse a cabo según técnicas conocidas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159 y 4.965.188. En general, la PCR implica, en primer lugar, tratar una muestra de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de una ADN polimerasa termoestable) con un cebador oligonucleotídico por cada hebra de la secuencia específica para detectar en condiciones de hibridación, de modo que se sintetice un producto de extensión de cada cebador que sea complementario de cada

hebra de ácido nucleico, con los cebadores suficientemente complementarios con cada hebra de la secuencia específica para hibridar con ellos de modo que el producto de extensión sintetizado a partir de cada cebador, cuando se separe de su complemento, pueda servir como molde para la síntesis del producto de extensión del otro cebador; y tratar entonces la muestra en condiciones desnaturizantes para separar los productos de extensión de cebador de sus moldes si están presentes la secuencia o secuencias para detectar. Estas etapas se repiten cíclicamente hasta obtener el grado deseado de amplificación. La detección de la secuencia amplificada puede llevarse a cabo añadiendo al producto de reacción una sonda oligonucleotídica capaz de hibridar con el producto de reacción (por ejemplo, una sonda oligonucleotídica de la presente invención), portando la sonda un marcador detectable, y detectando entonces el marcador según técnicas conocidas. Son bien conocidos en la materia diversos marcadores que pueden incorporarse a o ligarse operativamente con ácidos nucleicos, tales como marcadores radiactivos, enzimáticos y fluorescentes. Cuando el ácido nucleico para amplificar es ARN, la amplificación puede llevarse a cabo mediante la conversión inicial en ADN mediante transcriptasa inversa según técnicas conocidas.

La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) puede llevarse a cabo según técnicas conocidas. Por ejemplo, la SDA puede llevarse a cabo con un solo cebador de amplificación o un par de cebadores de amplificación, lográndose la amplificación exponencial con el segundo. En general, los cebadores de amplificación por SDA comprenden, en dirección 5' a 3', una secuencia flanqueante (cuya secuencia de ADN no es crítica), un sitio de restricción para la enzima de restricción empleada en la reacción y una secuencia oligonucleotídica (por ejemplo, una sonda oligonucleotídica de la presente invención) que hibrida con la secuencia diana para amplificar y/o detectar. La secuencia flanqueante, que sirve para facilitar la unión de la enzima de restricción al sitio de reconocimiento y proporciona un sitio de cebador de ADN polimerasa después de mellar el sitio de restricción, es de aproximadamente 15 a 20 nucleótidos de longitud en una realización. El sitio de restricción es funcional en la reacción de SDA. La porción de sonda oligonucleotídica es de aproximadamente 13 a 15 nucleótidos de longitud en una realización de la invención.

La reacción en cadena de la ligasa (LCR) se lleva a cabo también según técnicas conocidas. En general, la reacción se lleva a cabo con dos pares de sondas oligonucleotídicas: un par se une con una hebra de la secuencia para detectar; el otro par se une con la otra hebra de la secuencia para detectar. Cada par conjunto cubre completamente la hebra a la que corresponde. La reacción se lleva a cabo, en primer lugar, desnaturizando (por ejemplo separando) las hebras de la secuencia para detectar, haciendo reaccionar entonces las hebras con los dos pares de las sondas oligonucleotídicas en presencia de una ligasa termoestable de modo que cada par de sondas oligonucleotídicas se ligue conjuntamente, separando entonces el producto de reacción y repitiendo entonces cíclicamente el proceso hasta que la secuencia se haya amplificado en el grado deseado. La detección puede llevarse a cabo de manera similar a la descrita anteriormente con respecto a la PCR.

En una realización de la invención, el gen *DNM1* se amplifica por PCR usando cebadores basados en la secuencia conocida. Se secuencia entonces el gen amplificado usando secuenciadores automatizados. De esta manera, se secuencia el gen *DNM1* de perros sospechosos de tener CIE en su pedigrí hasta encontrar una mutación. La mutación es la sustitución de G por T en la base nucleotídica 767.

Según un procedimiento de diagnóstico de la presente divulgación, se detecta una alteración en el locus *DNM1* de tipo silvestre. "Alteración de un gen de tipo silvestre" comprende todas las formas de mutaciones incluyendo deleciones, inserciones y mutaciones puntuales en las regiones codificantes y no codificantes. Las deleciones pueden ser del gen completo o solo de una porción del gen. Las mutaciones puntuales pueden dar como resultado codones de terminación, mutaciones de desplazamiento de marco o sustituciones aminoacídicas. Los eventos de mutaciones puntuales pueden aparecer en regiones reguladoras, tales como en el promotor del gen, conduciendo a una pérdida o reducción de la expresión del ARNm. Las mutaciones puntuales pueden anular también el procesamiento de ARN apropiado, conduciendo a una pérdida de expresión del producto génico de *DNM1*, o a una reducción de la estabilidad del ARNm o de la eficacia de traducción. El CIE es una enfermedad causada por una mutación puntual en el ácido nucleico 767. Aunque la mayoría de perros predispuestos al CIE tienen dos alelos mutados, unos pocos perros con síndrome de colapso parecido al CIE tienen solo un alelo mutado.

Las técnicas de diagnóstico que son útiles en los procedimientos de la invención incluyen, pero sin limitación, secuenciación de ADN directa, análisis de PFGE, oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), análisis de transferencia puntual y electroforesis en gel en gradiente desnaturizante, y son bien conocidas por el especialista.

Hay varios procedimientos que pueden usarse para detectar la variación de secuencia de ADN. La secuenciación de ADN directa, tanto secuenciación manual como secuenciación fluorescente automatizada, puede detectar la variación de secuencia. Otro enfoque es el ensayo de polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCA). Este procedimiento no detecta todos los cambios de secuencia, especialmente si el tamaño del fragmento de ADN es mayor de 200 pb, pero puede optimizarse para detectar la mayoría de variaciones de secuencia de ADN. La sensibilidad a la detección reducida es una desventaja, pero el rendimiento aumentado posible con el SSCA lo hace una alternativa atractiva y viable a la secuenciación directa para la detección de mutaciones en investigación. Los fragmentos que tienen movilidad desplazada en geles de SSCA se secuencian entonces para determinar la naturaleza exacta de la variación de secuencia de ADN. Otros enfoques basados en la detección de desapareamientos entre las dos hebras de ADN complementario incluyen la electroforesis en gel desnaturizante fijado (CDGE), el análisis de heterodúplex (HA) y la escisión por desapareamiento químico (CMC). Una vez es

conocida una mutación, puede utilizarse un enfoque de detección específico de alelo tal como la hibridación oligonucleotídica específica de alelo (ASO) para cribar rápidamente en grandes cantidades de otras muestras la misma mutación. Dicha técnica puede utilizar sondas que están marcadas con nanopartículas de oro, proporcionando un resultado coloreado visual.

- 5 La detección de mutaciones puntuales puede lograrse mediante la clonación molecular del(de los) alelo(s) de *DNM1* y la secuenciación del(de los) alelo(s) usando técnicas bien conocidas en la materia. Como alternativa, las secuencias génicas pueden amplificarse directamente a partir de una preparación de ADN genómico de tejido canino, usando técnicas conocidas. Puede determinarse entonces la secuencia de ADN de las secuencias amplificadas.
- 10 Hay seis procedimientos bien conocidos para un ensayo más completo, aunque todavía indirecto, de confirmación de la presencia de un alelo mutante: 1) análisis de conformación monocatenaria (SSCA); 2) electroforesis en gel en gradiente desnaturante (DGGE); 3) ensayos de protección de ARNasa; 4) oligonucleótidos específicos de alelo (ASO); 5) el uso de proteínas que reconocen desapareamientos nucleotídicos, tales como la proteína mutS de *E. coli* y 6) PCR específica de alelo. Para la PCR específica de alelo, se usan cebadores que hibridan en sus extremos 3' con una mutación de *DNM1* particular. Si la mutación particular no está presente, no se observa un producto de amplificación. Puede usarse también un sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMS). Las inserciones y deleciones de genes pueden detectarse también mediante clonación, secuenciación y amplificación. Además, pueden usarse sondas de polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) del gen o genes marcadores circundantes para puntuar la alteración de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico. Pueden usarse otras técnicas para detectar inserciones y deleciones como son conocidas en la materia.

En los primeros tres procedimientos (SSCA, DGGE y ensayo de protección de ARNasa), aparece una nueva banda electroforética. El SSCA detecta una banda que migra diferencialmente debido a que el cambio de secuencia causa una diferencia en el apareamiento de bases intramolecular monocatenario. La protección de ARNasa implica la escisión del polinucleótido mutante en dos o más fragmentos menores. La DGGE detecta diferencias en las velocidades de migración de secuencias mutantes en comparación con las secuencias de tipo silvestre usando un gel en gradiente desnaturante. En un ensayo de oligonucleótido específico de alelo, se diseña un oligonucleótido que detecta una secuencia específica, y se efectúa el ensayo detectando la presencia o ausencia de una señal de hibridación. En el ensayo de mutS, la proteína se une solo a secuencias que contienen un desapareamiento nucleotídico en un heterodúplex entre secuencias mutantes y de tipo silvestre.

- 30 Los desapareamientos según la presente invención son dúplex de ácido nucleico hibridados en que las dos hebras no son 100% complementarias. La falta de homología total puede ser debida a deleciones, inserciones, inversiones o sustituciones. La detección del desapareamiento puede usarse para detectar mutaciones puntuales en el gen o en su producto de ARNm. Aunque estas técnicas son menos sensibles que la secuenciación, son más sencillas de efectuar en un gran número de muestras. Es un ejemplo de una técnica de escisión de desapareamiento el procedimiento de protección de ARNasa. En la práctica de la presente invención, el procedimiento implica el uso de una ribosonda marcada que es complementaria de la secuencia codificante del gen *DNM1* de tipo silvestre de perro. La ribosonda y el ARNm o ADN aislado de tejido tumoral se asocian (hibridan) conjuntamente y posteriormente se digieren con la enzima ARNasa A, que es capaz de detectar ciertos desapareamientos en una estructura de dúplex de ARN. Si detecta un desapareamiento la ARNasa A, escinde en el sitio del desapareamiento. Por tanto, cuando la preparación de ARN asociado se separa en una matriz de gel electroforético, si se ha detectado un desapareamiento y escindido por ARNasa A, se observará un producto de ARN que es menor que el dúplex de ARN completo para la ribosonda y el ARNm o ADN. La ribosonda no tiene que tener toda la longitud del ARNm o gen *DNM1* sino que puede ser un segmento de cualquiera de ellos. Si la ribosonda comprende solo un segmento del ARNm o gen *DNM1*, será deseable usar una serie de estas sondas para cribar en toda la secuencia de ARNm los desapareamientos.

De forma similar, pueden usarse sondas de ADN para detectar desapareamientos mediante escisión enzimática o química. Como alternativa, los desapareamientos pueden detectarse mediante desplazamientos en la movilidad electroforética de dúplex con desapareamientos respecto a dúplex coincidentes. Con ribosondas o sondas de ADN, el ARNm o ADN celular que podría contener una mutación puede amplificarse usando PCR antes de la hibridación.

- 50 El análisis de ácido nucleico mediante tecnología de microchips es también aplicable a la presente invención.

Las secuencias de ADN del gen *DNM1* que se han amplificado mediante el uso de PCR pueden cribarse también usando sondas específicas de alelo. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una región de la secuencia del gen *DNM1* que alberga una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede ser de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, correspondiente a una porción de la secuencia del gen *DNM1*. Mediante el uso de una batería de dichas sondas específicas de alelo, pueden cribarse los productos de amplificación por PCR para identificar la presencia de una mutación anteriormente identificada en el gen *DNM1*. Puede efectuarse la hibridación de sondas específicas de alelo con secuencias de *DNM1* amplificadas, por ejemplo, sobre un filtro de nailon. La hibridación con una sonda particular en condiciones de hibridación rigurosas indica la presencia de la misma mutación en el tejido que en la sonda específica de alelo.

La alteración de la expresión de ARNm de *DNM1* puede detectarse mediante cualquier técnica conocida en la materia. Estas incluyen análisis de transferencia Northern, amplificación por PCR y protección de ARNasa. Una expresión de ARNm reducida indica una alteración del gen *DNM1* de tipo silvestre.

5 La alteración de los genes *DNM1* de tipo silvestre puede detectarse también cribando una alteración de la proteína DNMM1 de tipo silvestre, o una porción de la proteína DNMM1. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales inmunorreactivos con DNMM1 (o con una porción específica de la proteína DNMM1) para cribar un tejido. La falta de antígeno asociado indicaría una mutación. Los anticuerpos específicos de productos de alelos mutantes podrían usarse también para detectar un producto del gen *DNM1* mutante. Dichos ensayos inmunológicos pueden realizarse en cualquier formato conveniente conocido en la materia. Estos incluyen transferencias Western, ensayos
10 inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Puede usarse cualquier medio para detectar una proteína DNMM1 alterada para detectar la alteración de los genes *DNM1* de tipo silvestre. Pueden usarse ensayos funcionales, tales como determinaciones de unión de proteína. Además, pueden usarse ensayos que detectan la función bioquímica de DNMM1. Encontrar un producto del gen *DNM1* mutante indica una alteración del gen *DNM1* de tipo silvestre.

15 Los genes o productos del gen *DNM1* mutantes pueden detectarse en una variedad de muestras fisiológicas recogidas de un perro. Por ejemplo, una muestra fisiológica puede ser una muestra recogida de un perro individual, tal como incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo una muestra celular tal como una célula sanguínea, por ejemplo un linfocito o una célula de sangre periférica; una muestra de tejido tal como muestra de mucosa (por ejemplo, frotis bucal) o tejido muscular, por ejemplo, tejido esquelético; una muestra de órgano, por ejemplo, hígado o piel; una muestra de cabello, por ejemplo, una muestra de cabello con raíces y/o una muestra de fluido tal como sangre.

20 Los procedimientos de diagnóstico de la presente divulgación son aplicables a cualquier enfermedad canina en que el *DNM1* tenga un papel. El procedimiento de diagnóstico de la presente invención es útil, por ejemplo, para veterinarios, asociaciones de criadores o criadores individuales, de modo que puedan decidir sobre un curso apropiado de tratamiento y/o determinar si un animal es un candidato adecuado para crianza.

Sondas oligonucleotídicas

25 Como se observa anteriormente, el procedimiento de la presente invención es útil para detectar la presencia de un polimorfismo en ADN canino, en particular, la presencia de una sustitución de G por T en la posición 767 de la secuencia codificante de *DNM1* canino (SEQ ID NO:1). Esta sustitución da como resultado el reemplazo de un aminoácido arginina (R) en el codón 256 por una histidina (L) en la proteína dinamina 1 (SEQ ID NO:2).

30 Los pares cebadores son útiles para la determinación de la secuencia nucleotídica de un alelo de *DNM1* particular usando PCR. Los pares de cebadores de ADN monocatenarios pueden asociarse con secuencias dentro o alrededor del gen *DNM1* para cebar la amplificación de la síntesis de ADN del gen *DNM1* mismo. Un conjunto completo de estos cebadores permite la síntesis de todos los nucleótidos de las secuencias codificantes de *DNM1*, concretamente los exones. El conjunto de cebadores permite preferiblemente la síntesis tanto de secuencias intrónicas como exónicas. Pueden usarse también cebadores específicos de alelo. Dichos cebadores se asocian
35 solo con alelos mutantes de *DNM1* particulares, y por tanto amplificarán solo un producto en presencia del alelo mutante como molde.

La primera etapa del proceso implica poner en contacto una muestra fisiológica obtenida de un perro, conteniendo dicha muestra ácido nucleico, con una sonda oligonucleotídica para formar un ADN hibridado. Las sondas oligonucleotídicas que son útiles en los procedimientos de la presente invención pueden ser cualquier sonda que
40 comprenda entre aproximadamente 4 y 6 bases hasta aproximadamente 80 a 100 bases o más. En una realización de la presente invención, las sondas son de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 bases.

Los cebadores mismos pueden sintetizarse usando técnicas que son bien conocidas en la materia. Generalmente, los cebadores pueden prepararse usando aparatos de síntesis de oligonucleótidos que están comercialmente disponibles. Dada la secuencia de la secuencia codificante de *DNM1* como se expone en la SEQ ID NO:1, el diseño
45 de los cebadores particulares está dentro de las habilidades de la materia.

Pueden prepararse sondas oligonucleotídicas que tienen cualquiera de una amplia variedad de secuencias de bases según técnicas que son bien conocidas en la materia. Las bases adecuadas para preparar la sonda oligonucleotídica pueden seleccionarse de bases nucleotídicas de origen natural tales como adenina, citosina, guanina, uracilo y timina; y bases nucleotídicas de origen no natural o "sintéticas" tales como 7-desazaguanina, 8-oxoguanina, 6-mercaptoguanina, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroxietil)uridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, dihidouridina, 2'-O-metilseudouridina, β ,D-galactosilqueosina, 2'-O-metilguanosa, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilseudouridina, 1-metilguanosa, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, β ,D-manosilqueosina, 5-metiloxycarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9- β -D-ribofuranosil-2-metiltiopurin-6-il)carbamoil)treonina, N-((9- β -D-ribofuranosilpurin-6-il)-N-metilcarbamoil)treonina, éster metílico del ácido uridin-5-oxiacético, ácido uridin-5-oxiacético, wibutoxosina, seudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9- β -D-ribofuranosilpurin-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina,
50
55

2'-O-metiluridina, wibutosina y 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina. Puede emplearse cualquier cadena principal oligonucleotídica, incluyendo ADN, ARN (aunque el ARN es menos preferido que el ADN), azúcares modificados tales como carbociclos y azúcares que contienen sustituciones 2' tales como fluoro y metoxilo. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos en que al menos uno, o todos, los residuos de fosfato puente internucleotídicos son fosfatos modificados, tales como metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos (por ejemplo, cualquier otro de los residuos fosfato puente internucleotídicos puede modificarse como se describe). El oligonucleótido puede ser un "ácido nucleico peptídico" tal como se describe en Nielsen *et al.*, *Science*, 254, 1497-1500 (1991).

El único requisito es que la sonda oligonucleotídica posea una secuencia en la que al menos una porción sea capaz de unirse a una porción conocida de la secuencia de la muestra de ADN.

Puede ser deseable en algunas aplicaciones poner en contacto la muestra de ADN con una serie de sondas oligonucleotídicas que tienen diferentes secuencias de bases (por ejemplo, cuando hay dos o más ácidos nucleicos diana en la muestra o cuando se hibrida un solo ácido nucleico diana con dos o más sondas en un ensayo de "sándwich").

Las sondas de ácido nucleico proporcionadas por la presente invención son útiles para una serie de fines. Las sondas pueden usarse para detectar productos de amplificación por PCR. Pueden usarse también para detectar desapareamientos con el gen *DNM1* o ARNm usando otras técnicas.

Metodología de hibridación

La muestra de ADN (o ácido nucleico) puede ponerse en contacto con la sonda oligonucleotídica de cualquiera manera adecuada conocida por los especialistas en la materia. Por ejemplo, la muestra de ADN puede solubilizarse en solución, y ponerse en contacto con la sonda oligonucleotídica solubilizando la sonda oligonucleotídica en solución con la muestra de ADN en condiciones que permitan la hibridación. Las condiciones adecuadas son bien conocidas por los especialistas en la materia. Como alternativa, la muestra de ADN puede solubilizarse en solución con la sonda oligonucleotídica inmovilizada sobre un soporte sólido, con lo que la muestra de ADN puede ponerse en contacto con la sonda oligonucleotídica sumergiendo el soporte sólido que tiene la sonda oligonucleotídica inmovilizada sobre el mismo en la solución que contiene la muestra de ADN.

La invención se ilustrará ahora mediante el siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplo 1: Procedimiento de detección de una mutación de ADN asociada con colapso canino inducido por el ejercicio

La familia del gen de la dinamina codifica proteínas que son esenciales para la endocitosis de vesícula sináptica. El colapso inducido por el ejercicio (CIE) en perros cobradores de labrador afectados se manifiesta por debilidad muscular, descoordinación y colapso potencialmente mortal después de un ejercicio intenso. Un cribado genómico completo de 143 perros afectados identificó un locus en el cromosoma 9 canino con una puntuación de LOD de 12,2. El análisis de haplotipo de SNP confirmó el locus, y se identificó una mutación de aminoácido fuertemente asociada ($p < 10^{-16}$) en el gen de dinamina 1 (*DNM1*). Este polimorfismo Arg256Leu es un candidato convincente para mutación causal de CIE debido a la función crítica de la dinamina 1 y su fuerte conservación evolutiva. Esta es la primera mutación de *DNM1* de mamífero de origen natural que se identifica, y proporciona una comprensión crítica de la biología de la vesícula sináptica entre muchas especies.

Materiales y procedimientos:

Recogida de muestras. Este estudio se efectuó usando los protocolos aprobados por los Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) de la University of Minnesota y la University of Saskatchewan. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los dueños. Las familias de perros cobradores de labrador afectadas se establecieron mediante la descendencia afectada y se solicitaron los registros médicos, pedigrís y ADN de todos los perros hasta dos generaciones de los perros afectados. Se ensamblaron los pedigrís para análisis de ligamiento usando CRYILIC Software. Se usó el kit de aislamiento de ADN Gentra Puregene™ para extraer ADN genómico de 3-6 ml de sangre entera con EDTA según las instrucciones del fabricante. Se almacenó el ADN a -20°C.

Se identificaron 6 grupos diferentes de perros basándose en los datos médicos disponibles y en la información del cuestionario:

Grupo 1; Presuntamente afectados; perros con un historial bien documentado de más de un episodio de colapso en que los miembros pélvicos se volvieron atáxicos y después flácidos.

Grupo 2. Colapso recurrente. Perros con una descripción incompleta de los episodios de colapso pero que, en su mayor parte, eran consistentes con los criterios de presuntamente afectados.

Grupo 3. Episodio de colapso único. Estos perros satisfacían por lo demás los criterios de presuntamente afectados.

Grupo 4. Colapso atípico. Perros con episodios recurrentes de colapso, sin embargo la descripción no coincidía exactamente con los criterios de clasificación de presuntamente afectados.

Grupo 5. Colapso alternativo, otra causa. Perros para los que se identificó otra causa potencial subyacente de colapso.

5 Grupo 6. Sin colapso. No se observó nunca colapso en estos perros.

Marcadores de microsatélite: Se identificaron microsatélites de los mapas de ligamiento y RH caninos publicados (R. Guyon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A. 100, 5296-5301 (2003); M. Breen *et al.*, BMC Genomics, 13, 65 (2004)) y del mapa de ligamiento canino UC-Davis (encontrado en www.vgl.ucdavis.edu/research/canine/projects/linkage_map/data/) y en varios casos de la secuencia del genoma de CFA9 (marcadores indicados KM/JM en la Tabla 1). Las condiciones de reacción contenían 12,5 ng de ADN, tampón de PCR con MgCl₂ 1,5 mM (QIAGEN®), 5 pmol de cebador de codificación, 1,5 pmol de cebador inverso que contenía una secuencia de cola de 20 unidades, 2 pmol de cebador marcado fluorescentemente que contenía una cola de 20 unidades, 100 μM de cada uno de los dNTP y 0,5 unidades de ADN polimerasa HotStarTaq® (QIAGEN®) en un volumen final de 15 μl. Se efectuaron las reacciones de PCR en placas de 96 pocillos con una desnaturalización inicial a 94°C durante 20 min; 35-40 ciclos de 94°C durante 30 s, 56°C durante 30 s y 72°C durante 30 s; y una extensión final a 72°C durante 15 min. Se separaron los productos por tamaño usando el analizador de ADN automatizado Beckman CEQ 8000.

Análisis de ligamiento: Se seleccionaron 96 perros (71 de ellos afectados) a partir de los pedigrís que contribuyeron más a la potencia estadística en un análisis de ligamiento simulado para el genotipado inicial, y se incluyeron en última instancia 252 perros en la cartografía fina. Se eligieron 444 marcadores de microsatélite distribuidos por los 38 autosomas caninos. Se comprobó en los datos genotípicos de todos los marcadores la herencia mendeliana mediante inspección visual del pedigrí. Se introdujeron entonces los genotipos en el software de análisis genético y se confirmó de nuevo la herencia mendeliana mediante los programas de análisis de ligamiento. Se efectuaron análisis de ligamiento paramétricos de dos puntos con software FASTLINK suponiendo un modo recesivo autosómico de herencia con un 80% de penetración. Se supuso que la frecuencia del alelo normal era de 0,80 y que la frecuencia del alelo afectado era de 0,20. La frecuencia real del alelo y la penetración de la enfermedad no son conocidos para CIE, sin embargo, se supone que la enfermedad no es un 100% penetrante porque los perros colapsan solo después de exposición a eventos desencadenantes conocidos. Se calcularon las frecuencias alélicas y la heterocigosidad del marcador usando 20 progenitores no relacionados en los pedigrís. Los niveles de significación para el ligamiento se basaron en los umbrales propuestos por Lander y Kruglyak (Nature Genet. 11, 241-247 (1995)). Era evidencia significativa de ligamiento una puntuación de LOD de 3,3, y una evidencia indicativa de ligamiento una puntuación de LOD de 1,9. Las puntuaciones de LOD menores de -2,0 excluían ligamiento en el locus.

Asociación del marcador de SNP y análisis de haplotipo: Los marcadores de SNP en la región de 56-61 Mb de CFA9 conocidos por ser informativos en cobradores de labrador se proporcionaron amablemente por la Dra. Claire Wade del Broad Institute of Harvard y el MIT. Se genotipó un subconjunto de estos SNP en 303 cobradores de labrador usando la plataforma Sequenom del University of Minnesota Biomedical Genomics Center. Se diseñaron los cebadores usando el software SpectroDESIGNER (M. Stephens *et al.*, Am. J. Hum. Genet., 68, 978-989 (2001)). Se amplificaron los loci de SNP en cuatro reacciones de PCR múltiples. Las reacciones de PCR contienen 10 ng de ADN, 0,5 μM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM y 3 unidades de ADN polimerasa HotStarTaq® (QIAGEN®). Se filtraron las lecturas de genotipo de SNP y se omitieron las lecturas agresivas del conjunto de datos. Se omitieron los SNP con mal análisis de agrupamiento, frecuencia alélica minoritaria menor de 0,001 y lecturas de genotipado en menos de un 75% de las muestras de ADN, así como las muestras de ADN individuales con menos de un 75% de lecturas de genotipo. Se amplificó un SNP en el intrón 3 del gen PTGES2 con los cebadores 5'-AGCCTGTGCGAAGTCTGG (SEQ ID NO:120) y 5'-CAGATCACCCAGTGAAGGAG (SEQ ID NO:121), dando un producto de 392 pb que se digirió con la enzima de restricción Ava1. Se dedujeron los genotipos y fases de haplotipo faltantes con el software PHASE versión 2.1.1 usando los parámetros por defecto (M. Stephens *et al.*, Am. J. Hum. Genet., 68, 978-989 (2001)). Se efectuó una prueba de chi cuadrado con el subconjunto mínimamente relacionado de perros con Haploview 4.0 CR2 para determinar si existían distribuciones de frecuencia alélica significativamente diferentes para cada SNP entre los casos afectados y las poblaciones de control. Se determinó también el haplotipo mínimamente conservado usando Haploview 4.0 CR2. Se importaron los datos individuales como ficheros de ligamiento de familias. Se extendieron manualmente los bloques de haplotipo por los SNP a cada lado del SNP no sinónimo del exón 6 de *DNM1* para determinar el haplotipo conservado alrededor de los alelos T767 y G767 de *DNM1*.

Secuenciación de ADN genómico: Se diseñaron los cebadores de PCR para amplificar secuencias que contienen los genes candidatos posicionales basándose en los límites intrón/exón conocidos del gen humano y/o canino. En varios casos, los exones caninos no estaban bien registrados en comparación con otras especies, y los inventores usaron su buen criterio en cuanto a su colocación correcta para el diseño y secuenciación de cebador de PCR. Se secuenciaron inicialmente dos perros afectados y uno no afectado. Se proporcionan las secuencias de cebador de PCR para el análisis de *DNM1* en las **Figuras 7A-7J**. La reacción consistía en 25 ng de ADN genómico, dNTP 40 μM, 1,5 μl de tampón de PCR con MgCl₂ 1,5 mM (QIAGEN®), 0,2 unidades de ADN polimerasa HotStarTaq®

(QIAGEN®) y 0,67 µM de cada cebador en un volumen de 15 µl. Las condiciones de ciclación eran una desnaturalización inicial a 94°C durante 20 min; 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 56°C durante 30 s, 72°C durante 30 s y una extensión final a 72°C durante 15 min. Se purificaron los productos de PCR y se secuenciaron en las direcciones de codificación e inversa en el Advanced Genetic Analysis Center de la University of Minnesota. Se alinearon las secuencias con el software Sequencher™ sobre una cadena principal de la secuencia del genoma canino ensamblada (CanFam2.0), y las secuencias de ADN que codifican la RefSeq humana.

Genotipado de la mutación G767T de *DNM1*: Se usaron los cebadores de PCR basados en intrón exón 6F (GTAGGCTCTCCGACCCACTC (SEQ ID NO:122)) y exón 6R (TGAGGACACTAACCCCTGTTG (SEQ ID NO:123)) para generar un fragmento de 337 pb que contenía todo el exón 6. La enzima de restricción Sml I (9,0 U con 3 horas de incubación a 55°C) cortó el alelo T767 generando fragmentos de 165 y 172 pb, que se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

RESULTADOS

Identificación del locus cromosómico: Los inventores efectuaron un cribado del genoma completo con 444 marcadores de microsatélite usando las familias de 71 perros afectados. En este cribado genómico inicial que implicaba a 96 perros, los inventores identificaron un marcador ligado significativamente- FH2885, en la posición 60,4 Mb en el cromosoma 9 canino (CFA09) – con una puntuación de logaritmo de las posibilidades (LOD) de 3,67 y un teta de 0,10. Se genotiparon entonces 15 microsatélites de CFA9 adicionales entre 55,5 y 63,4 Mb que incluían 143 perros afectados y 109 parientes no afectados. Múltiples marcadores en la región correspondiente al segmento de aproximadamente 57-60,5 Mb demostraron un ligamiento significativo con CIE, mientras que los marcadores fuera de esta región excluían el ligamiento (Tabla 1). La puntuación de LOD para FH2885 aumentó a 8,31 con un teta de 0,05 con el análisis de los 252 perros. Las puntuaciones de LOD en varios casos fueron >12,0 a teta <0,05, con una puntuación LOD máxima de 12,24 para el marcador KM/JM3 a 58,5 Mb.

Tabla 1. Ligamiento de EIC con marcadores de microsatélite en CFA09.

Marcador	Mb	Puntuación de LOD y teta	Heterocigosidad del marcador
GALK1	7,849	0,22; 0,05	0,34
FH2263	16,424	-3,39; 0,10	0,88
REN198P23	18,089	-2,1; 0,05	0,50
REN54L20	23,478	-4,8; 0,10	0,64

(CONT.)

G06401	28,720	-2,4; 0,10	0,46
FH2186	34,797	-2,0; 0,20	0,62
FH3835	45,156	-2,7; 0,10	0,55
REN278L10	48,141	-2,4; 0,05	0,65
REN73K24	54,592	-3,0; 0,05	0,47
Davis0941	55,557	1,59; 0,10	0,38
E04008	57,055	-1,02; 0,05	0,39
KM/JM1	57,243	9,98 ; 0,06	0,73
Davis0943	57,470	1,70; 0,07	0,33
KM/JM2	58,087	1,93; 0,10	0,37
Davis0944	58,441	3,00; 0,05	0,26
KM/JM3	58,548	12,24 ; 0,04	0,76
KM/JM4	59,125	9,49 ; 0,05	0,65
Davis0945	59,307	6,49 ; 0,07	0,57

KM/JM5	59,523	10,46 ; 0,04	0,68
KM/JM6	59,676	9,79 ; 0,06	0,67
Davis0946	60,008	12,13 ; 0,03	0,73
KM/JM9	60,287	9,15 ; 0,03	0,73
FH2885	60,428	8,31 ; 0,5	0,73
Davis0947	60,899	1,26; 0,10	0,47
Davis0950	63,400	3,01; 0,09	0,78
CAP09E	64,200	0,49; 0,20	0,49

Se recogieron los genotipos y se analizó el ligamiento con CIE como se describe en los Materiales y Procedimientos. Los marcadores hasta la posición 54,59 se procesaron solo en un grupo de 96 perros; ningún marcador dio puntuaciones de LCD positivas y se reseñan la puntuación de LOD y teta mínima. Se procesaron los marcadores de las posiciones 55,5-64,2 en un grupo de 234 perros y se reseña la puntuación de LOD máxima para cada uno de estos marcadores (las puntuaciones de LOD significativas > 3,3 y sus posiciones se dan en **negrita**).

5 A continuación, los inventores analizaron 57 marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la región de 56-61 Mb de CFA9 en toda la colección de los inventores de 303 cobradores de labrador relacionados y no relacionados. Se efectuó una prueba de chi cuadrado de independencia con el subconjunto mínimamente
 10 relacionado de perros para determinar si existían distribuciones de frecuencia alélica significativamente diferentes para cada SNP entre las poblaciones afectada y de control. 18 SNP de la región de 57,25 a 60,0 Mb tenían valores de $p < 0,001$, con un valor de p mínimo de $1,17 \times 10^{-11}$ (**Figura 4**). La región de 58,4-60,0 Mb se convirtió en el centro de la atención de los inventores debido al agrupamiento de SNP con bajos valores de p , una alta frecuencia de genotipos homocigóticos en la población afectada por CIE y por ser los perros no afectados heterocigóticos u homocigóticos del alelo alternativo. Este dato era consistente con al hipótesis de que el CIE es un rasgo recesivo autosómico altamente penetrante, y el hecho de que el control de población tenía muchos progenitores y hermanos de los perros afectados y se esperaba que esto diera como resultado una alta tasa de heterocigosidad.

15 Los inventores secuenciaron cuatro genes candidatos posicionales de los 48 genes conocidos o predichos en esta región de CFA9 basándose en su función biológica (**Figura 4**). Estos fueron *DNM1* (dinamina 1 en 58,62 Mb), *PTGES2* (prostaglandina E2 sintasa en 58,69 Mb), *AK1* (adenilato cinasa en 58,88 Mb) y *SLC2A8* (transportador de glucosa neuronal en 59,28 Mb). Se identificaron SNP exónicos solo en *DNM1* y *PTGES2* (**Figuras 7A-7J**). Todos los SNP exónicos en *PTGES2* eran sinónimos y no estaban asociados con el fenotipo de CIE, mientras que un SNP intrónico dio un valor de p para asociación con CIE de solo $p = 0,0099$. Sin embargo, varios SNP en el gen *DNM1* eran homocigóticos en el grupo de perros afectados.

20 **Secuencias y polimorfismos de *DNM1***: La proteína dinamina 1 canina completa predicha a partir de los datos de secuencia contiene 864 aminoácidos, mientras que una forma corta predicha a partir de un posible corte y empalme alternativo contiene 845 aminoácidos (**Figuras 1, 2 y 5A-5B**). Se encontraron 5 SNP en la secuencia de ADN codificante de aminoácidos *DNM1*, y 4 de estos SNP de *DNM1* eran sinónimos. Un SNP de G a T en el exón 6 en la posición nucleotídica codificante 767 dio como resultado la conversión del codón 256 de arginina en leucina (Arg256Leu). Se examinó en 24 perros adicionales el SNP G767T: los 12 perros afectados eran homocigóticos del alelo T767, 6 perros no afectados eran homocigóticos del alelo G767 y 6 perros no afectados eran heterocigóticos. Este SNP G767T de *DNM1* produjo una puntuación de LOD de 16,39 a un teta de 0,03, y un valor p de asociación de $1,07 \times 10^{-16}$.

30 El alineamiento de la secuencia aminoacídica de dinamina 1 canina de tipo silvestre con humana revela una conservación notable interespecies. 860 de los 864 aminoácidos eran idénticos, y de las 4 diferencias solo 2 (Q a H en el codón 1228 y A a T en el codón 511) eran sustituciones no conservativas. Había también un alto nivel de conservación en el alineamiento de secuencia aminoacídica del segmento de residuos 241-270 de la dinamina 1 canina entre múltiples especies y las dinaminas 2 y 3 (**Figura 3**).

35 **Frecuencia de genotipo de *DNM1***: La Tabla 2 presenta la frecuencia de los tres genotipos de *DNM1* para cobradores de labrador en los diferentes criterios de clasificación.

Tabla 2. Genotipos de *DNM1* en cobradores de labrador fenotipados

	TT	GT	GG	Total	% de TT
1. Presuntamente afectados	101	0	3	104	97%
2. Colapso pero con datos incompletos	60	3	5	68	88%
3. Colapso único	5	3	0	8	62%
4. Colapso atípico	11	6	9	26	43%
5. Colapso- otra causa	1	2	2	5	20%
6. Sin colapso	12	65	55	132	9%
Progenitores de presuntamente afectados	5	15	0	20	25%

Se evaluaron los perros basándose en los signos clínicos y cuestionarios de datos clínicos y se asignaron en una de las categorías fenotípicas de colapso como se describe en Materiales y Procedimientos. Los genotipos en el nucleótido codificante 767 del gen *DNM1* canino se determinaron como se describe en los Materiales y Procedimientos. En la categoría 5 de otras causas potenciales de colapso repetido, estaban arritmia cardiaca para el genotipo TT, parálisis laríngea y acidemia láctica para los fenotipos GT y miopatía metabólica y arritmia cardiaca para los fenotipos GG.

Un 97% de todos los perros que satisfacían los criterios del estudio para CIE eran homocigóticos del alelo T767 y se supusieron afectados (grupo 1, así como un 88% de los perros con colapso consistente con CIE pero con documentación incompleta (grupo 2). Los perros con una menor probabilidad de tener CIE, colapso único reseñado (grupo 3), colapso atípico (grupo 4) u otra causa potencial identificada (grupo 5) tenían una probabilidad decreciente de ser homocigóticos del alelo T767 (62%, 43% y 20% respectivamente). 12 perros que colapsaron solo una vez, o que tuvieron episodios de colapso que eran menos típicos o descritos incompletamente, eran heterocigóticos. De los 132 perros para los que los dueños no reseñaron episodios de colapso, un 9% eran homocigóticos del alelo T767, un 49% eran heterocigóticos y un 42% eran homocigóticos del alelo G767. Los 20 progenitores de perros afectados eran heterocigóticos u homocigóticos del alelo T767, lo que es consistente con que el CIE sea autosómico recesivo. Una tasa de fenotipado falsa negativa significativa, en que los perros genéticamente susceptibles no se han expuesto a condiciones suficientes para iniciar el colapso, así como la posibilidad de factores modificadores genéticos y ambientales, puede explicar porqué un 9% de los perros sin un historial de colapso son homocigóticos del alelo T767.

Se reseñó que 12 heterocigóticos tuvieron episodios únicos de colapso o episodios de colapso que no satisfacían los criterios más rigurosos para presuntamente afectados (Tabla 2). Esto podría ser consistente con un fenotipo menos grave en portadores que en homocigóticos, e indicar la posibilidad de un rasgo dominante parcialmente penetrante. Hubo, sin embargo, 65 heterocigóticos sin episodios conocidos de colapso, y la alta frecuencia de heterocigóticos en la población vuelve ambiguas las conclusiones referentes a relaciones genotipo-fenotipo en heterocigóticos actualmente. Además, puesto que el CIE es un diagnóstico de exclusión, es posible que los perros heterocigóticos colapsantes, así como los perros homocigóticos G767 que colapsaban, pudieran ser fenocopias.

Tabla 3. Genotipos de *DNM1* en cobrador y otras razas

	TT	GT	GG	Total	% TT
Cobradores de labrador (ensayos de campo)	20	171	246	437	4,5%
Cobradores de la bahía de Chesapeake	1	4	20	25	4,0%
Cobradores de pelo rizado	6	5	19	30	20%
Cobradores dorados (Golden Retriever)	0	0	7	7	0%
Pastores escoceses	0	1	45	56	0%
Leonberger	0	0	36	36	0%
Galgos	0	0	4	4	0%
Spaniel Caballero Rey Carlos	0	0	8	8	0%

Las poblaciones de cobrador se solicitaron asistiendo a eventos de competición de ensayo en campo de Minnesota, Wisconsin y Dakota del Norte. Se enviaron muestras de otras razas por veterinarios y dueños interesados en el CIE o que tuvieran un perro que exhibía una forma de colapso. Los genotipos de *DNM1* se determinaron como se describe en la Tabla 12

Bloque de haplotipo de SNP mínimamente conservado: Los inventores usaron genotipos de SNP de 23 cobradores de labrador con la mayor evidencia de CIE para identificar un bloque de haplotipo mínimamente conservado que comprendía el alelo T767 del gen *DNM1* (**Figura 6**). El haplotipo más común extendió el segmento de 4,5 Mb completo de CFA9 para el que se analizaron los SNP; sin embargo, se observó 5 veces un bloque AAGTGGTG que extendió solo 137 kb de longitud. Los inventores incluyeron entonces los 413 cromosomas de todos los perros con el alelo T767 de *DNM1* y observaron un gran número de longitudes de haplotipo compartidas diferentes, pero se observó esta misma longitud de haplotipo mínimamente conservada de 137 kb un 99% de las veces. No había un haplotipo común observado en este locus para un 6% de los perros afectados (categorías 1 y 2) que no eran homocigóticos de T767. Un análisis similar de los 209 cromosomas que contenían el alelo de tipo silvestre G767 de *DNM1* encontró que el haplotipo AAGTGGGG homólogo no afectado se observaba fácilmente en un bloque ligeramente mayor de 220-328 kb. Este era claramente el haplotipo más habitualmente observado y se observó un 33% de las veces. Colectivamente, los bloques de haplotipo de SNP mínimamente conservados sugieren que el alelo T767 surgió a partir de un haplotipo común en cobradores de labrador.

La probabilidad de que el alelo T767 de *DNM1* haya estado presente e idéntico por ascendencia en poblaciones caninas durante un gran número de generaciones está también apoyada por su detección en varias razas relacionadas. Los inventores han observado el haplotipo de 137 kb idéntico en dos razas relacionadas, cobrador de la bahía de Chesapeake y cobrador de pelo rizado, teniendo ambos homocigóticos del alelo T767 de *DNM1* con episodios reseñados de colapso. Por último, los inventores han genotipado más de 400 labradores de ensayos de campo realizados en el medio oeste septentrional con perros de 20 estados y tres provincias canadienses, y encontraron una frecuencia de portador en esta población de un 30% y una frecuencia de afectación homocigótica de un 3%. Un ensayo de genotipado sencillo puede ayudar ahora a los criadores de labradores a evitar producir cachorros afectados en futuras generaciones.

Estructura, función y mutación de la dinamina: El gen *DNM1* codifica un miembro de la subfamilia de la dinamina de proteínas de unión a GTP que regulan la formación de vesículas endocíticas mediada por clatrina. La dinamina 1 parece expresarse exclusivamente en el cerebro y la médula espinal, donde desempeña un papel clave en la fisión de vesícula sináptica al ensamblarse en estructuras de tipo cuello alrededor de las depresiones recubiertas de la terminal presináptica. Estas estructuras se rompen liberando vesículas recubiertas, reformando así vesículas sinápticas que contienen neurotransmisor y posibilitando una comunicación sináptica continua. Existen 5 dominios de homología estructural importantes en la proteína dinamina 1. Los residuos aminoacídicos de aproximadamente 1-300 contienen un dominio GTPasa, los residuos de aproximadamente 205-505 contienen el dominio central de la familia de la dinamina, los residuos 521-623 contienen un dominio de homología con pleckstrina y los residuos 624-750 contienen un dominio efector de GTPasa implicado en el autoensamblaje (20).

Los ratones con eliminación génica de *DNM1* nacen vivos, pero la viabilidad postnatal es breve, debido a la incapacidad de tolerar la estimulación neurológica de la vida diaria. *DNM2* y *DNM3* pueden expresarse constitutivamente y pueden controlar la estimulación de baja frecuencia. La expresión de *DNM1* se vuelve esencial cuando un estímulo elevado crea una carga grande de endocitosis y solo mientras persiste el estímulo. Los perros con CIE funcionan normalmente en reposo y con ejercicio moderado, pero cuando se ejercitan vigorosamente en un estado de alta excitación, se vuelven descoordinados y colapsan. El descanso da como resultado una recuperación completa, presuntamente porque la dependencia del *DNM1* para la neurotransmisión se ha reducido. La mutación Arg256Leu en *DNM1* asociada con CIE está en la región límite entre la GTPasa y los dominios centrales, para los que la función precisa aún no está clara. Las mutaciones inducidas en el dominio central o su límite con el dominio de GTPasa de los genes *DNM1* ortólogos afectan a la agregación de dinamina y al ensamblaje en membranas, y en algunos casos causan una pérdida de función motora dependiente de la temperatura a altas temperaturas ambientales. Hasta la fecha, excepto para CIE en cobrador de labrador, no hay otra mutación de *DNM1* de origen natural conocida en especies de mamíferos. Las mutaciones de *DNM2* se han asociado ya con miopatía centronuclear y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, que no se parece al CIE.

En conclusión, los inventores han identificado una mutación del gen *DNM1* que está muy asociada con CIE en el perro cobrador de labrador. Este hallazgo llega en rápida sucesión con el descubrimiento de una mutación de inserción de SINE en el gen *PTPLA* responsable de miopatía centronuclear en esta raza, y demuestra adicionalmente la utilidad de la cartografía génica en modelos caninos. La mutación Arg256Leu de *DNM1* es una mutación candidata muy convincente a causante de CIE debido a la función esencial de la proteína dinamina 1 en el reciclado de vesículas sinápticas y a la alta conservación evolutiva de esta proteína entre diversas especies.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la determinación de si un perro tiene o está predispuesto a desarrollar colapso inducido por el ejercicio (CIE), que comprende la etapa de detectar en una muestra de ácido nucleico del perro un alelo G767T de dinamina 1 asociado a CIE en la SEQ-ID-No. 1, en el que la detección del alelo G767T de dinamina 1 es indicativa de que el perro tiene o está predispuesto al desarrollo de CIE.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que antes o junto con la detección, se somete la muestra de ácido nucleico a una etapa de amplificación.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que se amplifica la dinamina 1 o una porción de la misma.
- 10 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de detección es mediante a) hibridación específica de alelo; b) análisis por tamaño; c) secuenciación; d) hibridación; e) digestión con nucleasa 5'; f) polimorfismo de conformación monocatenaria; g) extensión específica de cebador y/o h) ensayo de ligamiento oligonucleotídico.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el análisis por tamaño es precedido por una digestión con enzima de restricción.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos una sonda oligonucleotídica específica del alelo de dinamina 1 (G767T) se inmoviliza sobre una superficie sólida.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el perro es un cobrador de labrador, un cobrador de la bahía de Chesapeake, un cobrador de pelo rizado o un pastor escocés.
- 20 8. Un kit para determinar la existencia o la susceptibilidad de desarrollar colapso inducido por el ejercicio (CIE) en un perro, comprendiendo el kit un primer oligonucleótido que hibrida en 5' o 3' con un alelo de dinamina 1 (G767T) en la SEQ-ID-No. 1 y que comprende adicionalmente un segundo oligonucleótido cebador que hibrida en 3' o 5' respectivamente con el alelo, de modo que el alelo puede amplificarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 25 9. El kit de la reivindicación 8, en el que el primer cebador y el segundo cebador hibridan con una región en el intervalo de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 pares de bases.
10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que comprende adicionalmente un medio de detección.
- 30 11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende adicionalmente un medio de amplificación.

Figura 1

```

1 ATGGGCAACC GCGGCATGGA GGATCTCATC CCGCTAGTCA ACCGGCTGCA GGACGCCTTC
61 TCCGCTATCG GCCAGAACGC GGACCTCGAC CTACCGCAGA TCGCGGTGGT GGGCGGCCAG
121 AGCGCCGGCA AGAGCTCGGT GCTCGAGAAT TTCGTAGGCA GGGACTTCCT GCCCCGAGGG
181 TCAGGCATTG TCACCCGACG GCCCCTGGTC CTGCAGCTGG TCAATGCCAC CACAGAATAT
241 GCCGAATTCC TGCAC TGCAA GGGGAAGAAA TTCACTGACT TCGAGGAGGT ACGCCTGGAG
301 ATCGAGGCTG AGACCGACCG GGTCACTGGC ACCAACAAGG GCATCTCGCC GGTGCCCATC
361 AACCTCCGCG TCTACTCGCC TCAGGTCCTG AATCTGACAC TGGTGGACCT ACCCGGAATG
421 ACCAAGGTCC CAGTGGGGGA CCAACCTCCT GACATCGAGT TCCAGATCCG GGACATGCTT
481 ATGCAGTTCG TCACCAAAGA GAACTGCCTC ATCCTGGCTG TGTCCCCCGC CAACTCCGAC
541 CTGGCCAACT CTGATGCTCT CAAGGTTGCC AAGGAGGTGG ACCCCAGGG TCAGCGCACC
601 ATYGGGGTCA TCACCAAGCT AGATCTGATG GAYGAGGGCA CAGATGCCCG AGATGTGCTA
661 GAGAATAAGC TCCTTCCCCT GCGCAGAGGC TACATAGGGG TGGTAAACCG AAGCCAGAAG
721 GACATTGATG GCAAGAAGGA CATCTCAGCT GCCTTGGCYG CTGAACGCAA GTTCTTTCTC
781 TCCACCCAT CCTACCGCCA CTTGGCGGAC CGCATGGGCA CACCCTACCT ACAGAAGGTC
841 CTCAACCAGC AACTGACCAA CCACATCCGG GACACACTGC CGGGGCTCCG GAACAGGCTG
901 CAGAGCCAGC TACTGTCCAT TGAGAAGGAG GTGGAGGAGT ACAAGAACTT CCGACCTGAT
961 GACCCAGCAC GCAAGACCAA GGCCCTGCTG CAGATGGTCC AGCAGTTGC TGTGGACTTT
1021 GAGAAGCGCA TTGAGGGCTC CGGGGACCAG ATTGACACCT ATGAACTGTC AGGGGGAGCC
1081 CGCATCAACC GGATCTTCCA TGAGCGCTTC CCCTTTGAGC TAGTCAAGAT GGAGTTTGAT
1141 GAGAAGGAGC TCCGGAGAGA GATCAGCTAC GCCATCAAGA ACATCCATGG CATTAGAACG
1201 GGGCTCTTTA CCCAGACAT GGCTTTTGAG ACCATTGTGA AAAAGCAGGT GAAGAAGATC
1261 CGAGAACCGT GTCTCAAGTG TGTGGACATG GTTATCTCGG AACTAATCAG CACGGTTAGA
1321 CAGTGCACCA AGAAGCTGCA GCAGTACCCG CGGCTGCGGG AGGAGATGGA GCGCATCGTG
1381 ACCACCCACA TCCGGGAGCG TGAGGGTCGC ACCAAGGAGC AGGTTATGCT CCTCATCGAT
1441 ATTGAGCTGG CGTACATGAA TACCAATCAT GAGGACTTCA TAGGCTTTGC CAATGCTCAG
1501 CAGAGGAGCA ACCAGATGAA CAAGAAGAAG GCTTCAGGGA ACCAGGATGA GATTCTGGTC
1561 ATCCGGAAGG GCTGGCTGAC CATCAACAAT ATTGGCATCA TGAAGGGGGG CTCCAAGGAG
1621 TACTGGTTTG TCCTGACCGC TGAGAATCTG TCCTGGTACA AGGATGACGA GGAGAAAGAG
1681 AAGAAATACA TGCTCTCCGT GGACAATCTG AAGCTACGGG ACGTGGAGAA AGGTTTCATG
1741 TCAAGCAAGC ACATCTTTGC CCTCTTTAAC ACTGAGCAGA GGAATGTCTA CAAGGATTAT
1801 CGGCAGCTGG AACTGGCCTG TGAGACGCAA GAGGAGGTGG ATAGCTGGAA GGCCTCTTTC
1861 CTGCGGGCTG GCGTATATCC TGAACGCGTT GGGGACAAGG AGAAAGCCAG CGAAACAGAG
1921 GAGAATGGCT CAGACAGCTT CATGCACTCC ATGGACCCAC AGCTAGAGCG GCAGGTGGAG
1981 ACCATCCGGA ACCTGGTAGA CTCATACATG GCCATCGTGA ACAAGACCGT GCGTGACCTC
2041 ATGCCGAAGA CCATCATGCA CCTCATGATC AACAATACGA AGGAATTCAT CTTCTCGGAG
2101 CTGCTCGCCA ACCTGTACTC GTGCGGGGAC CAGAACACAC TGATGGAGGA GTCGGCGGAG
2161 CAGGCGCAAC GCGCGACGA GATGCTGCGC ATGTACCACG CACTGAAGGA GCGGCTCAGC
2221 ATCATCGGCG ATATCAACAC GACCACCGTC AGCACGCCA TGCCCCCGCC CGTGGACGAC
2281 TCCTGGCTGC AGGTGCAGAG CGTACCGGCC GGACGCAGGT CACCCACGTC CAGCCCCACG
2341 CCGCAGCGCC GAGCCCCCGC CGTGCCCCCA GCCCGGCCCG GGTGCGGGG CCTGCTCCT
2401 GGGCTCCGC CTGCTGGGTC CGCCCTGGGG GGGGCGCCCC CCGTGCCCTC CAGGCCGGGG
2461 GCTTCCCCTG ACCCCTTCGG TCCTCCCCC CAGGTGCCCT CGCGCCCCAA CCGCGCCCCG
2521 CCCGGGGTCC CCAGCCGATC GGGTCAGGCA AGTCCGTCCC GTCCTGAGAG CCCAGGCC
2581 CCCTTCGACC TCTAA (SEQ ID NO:1)

```

Figura 2

```

1 MGNRGMEDLI PLVNRLQDAF SAIGQNADLD LPQIAVVGQ SAGKSSVLEN FVGRDFLPRG
61 SGIVTRRPLV LQLVNATTEY AEFLHCKGKK FTDFEEVRLE IEAETDRV TG TNKGISPVI
121 NLRVYSPQVL NLTLDLPGM TKVPVGDQPP DIEFQIRDML MQFVTKENCL ILAVSPANS
181 LANSALKVA KEVDPQGORT IGVITKLDLM DEGTDARDVL ENKLLPLRRG YIGVVNRSQK
241 DIDGKKDISA ALAAERKFFL SHPSYRHLAD RMGTPYLQKV LNQQLTNHIR DTLPLGLRNL
301 QSOLLSIEKE VEYKFRPD DPARKTKALL QMVQQFAVDF EKRIEGSGDQ IDTYELSGGA
361 RINRIFHERF PFELVKMEFD EKELRREISY AIKNIHGIRT GLFTPDMAFE TIVKKQVKKI
421 REPCLKCVDM VISELISTVR QCTKKLQQYP RLREEMERIV TTHIREREGR TKEQVMLLID
481 IELAYMNTNH EDFIGFANAQ QRSNQMNKKK ASGNQDEILV IRKGWLTINN IGIMKGSKE
541 YWFLTAENL SWYKDDEEKE KKYMLSVDNL KLRDVEKGM SSKHIFALFN TEQRNVYKDY
601 RQLELACETQ EEVDSWKASF LRAVYPERV GDKEKASETE ENGSDSFMHS MDPQLERQVE
661 TIRNLVDSYM AIVNKTVRDL MPKTIMHLMI NNTKEFIFSE LLANLYSCGD QNTLMEESE
721 QAQRDEMLR MYHALKEALS IIGDINTTTV STPMPPVDD SWLQVQVPA GRRSPTSPT
781 PQRAPAVPP ARPGSRGPAP GPPAGSALG GAPPVSRPG ASPDPFGPPP QVPSRPNRAP
841 PGVPSRSGQA SPSRPESPRP PFDL (SEQ ID NO:2)

```

Figura 3

DNM1 de perro	241	DIDGKKDISA	ALAAERKFFL	SHPSYRHLAD	(SEQ ID NO:3)
DNM1 de perro (CIE)		DIDGKKDISA	ALAAERKFFL	SHPSYRHLAD	(SEQ ID NO:4)
DNM1 humano		DIDGKKDITA	ALAAERKFFL	SHPSYRHLAD	(SEQ ID NO:5)
DNM1 de ratón		DIDGKKDITA	ALAAERKFFL	SHPSYRHLAD	(SEQ ID NO:126)
DNM1 bovino		DIDGKKDITA	ALAAERKFFL	SHPSYRHLAD	(SEQ ID NO:127)
pollo		DIDGKKDIQA	ALAAERKFFL	SHPAYRHMA	(SEQ ID NO:6)
Danio rerio		DIDGRKDIRA	ALAAERKFFL	SHPAYRHMAE	(SEQ ID NO:7)
Drosophila		DIEGRKDIHQ	ALAAERKFFL	SHPAYRHMA	(SEQ ID NO:8)
C elegans		DIVGRKDIRA	ALDAERKFFI	SHPAYRHMA	(SEQ ID NO:9)
DNM1 de perro	241	DIDGKKDISA	ALAAERKFFL	SHPSYRHLAD	(SEQ ID NO:3)
DNM2 humano		DIEGKKDIRA	ALAAERKFFL	SHPAYRHMA	(SEQ ID NO:10)
DNM3 humano		DIDGKKDIKA	AMLAERKFFL	SHPAYRHIA	(SEQ ID NO:11)
DNM2 de ratón		DIEGKKDIRA	ALAAERKFFL	SHPAYRHMA	(SEQ ID NO:124)
DNM3 de ratón		DIDGKKDIKA	AMLAERKFFL	SHPAYRHIA	(SEQ ID NO:125)

Figura 4

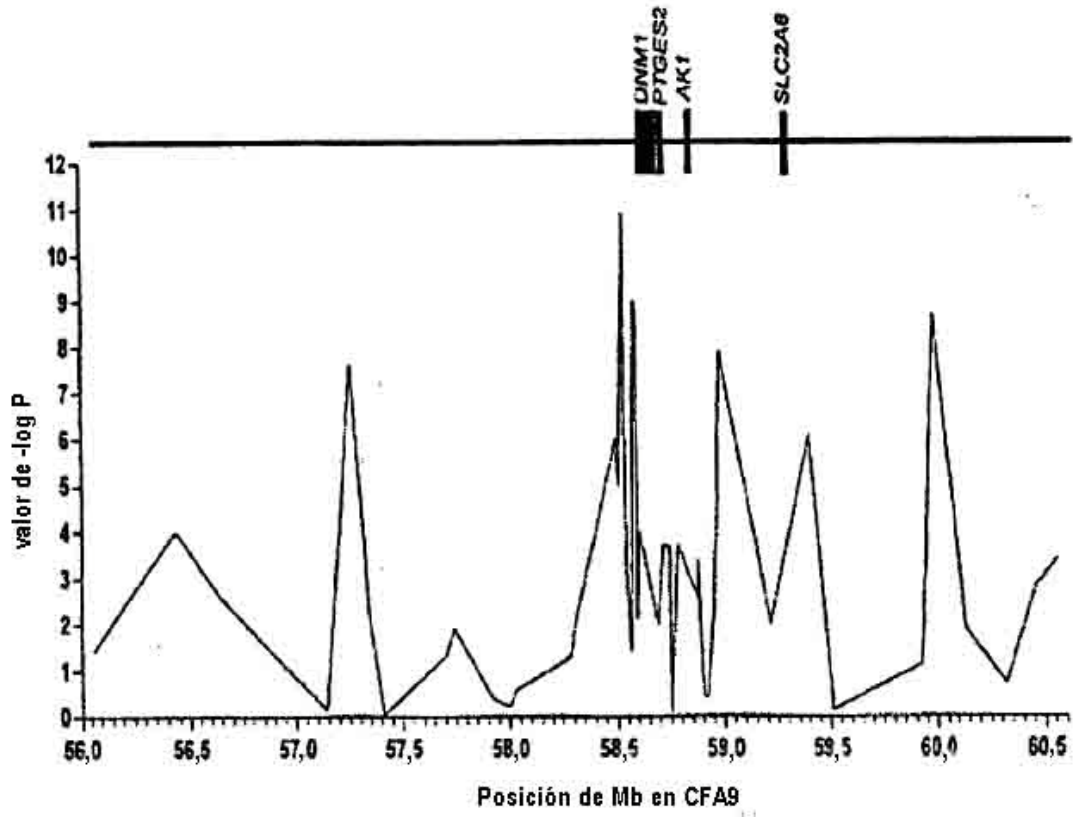


Figura 5A

```

1 ATGGGCAACC GCGGCATGGA GGATCTCATC CCGCTAGTCA ACCGGCTGCA GGACGCCTTC 60
61 TCCGCTATCG GCCAGAACGC GGACCTCGAC CTACCGCAGA TCGCGGTGGT GGGCGGCCAG 120
121 AGCGCCGGCA AGAGCTCGGT GCTCGAGAAT TTCGTAGGCA GGGACTTCCT GCCCCGAGGG 180
181 TCAGGCATTG TCACCCGACG GCCCCTGGTC CTGCAGCTGG TCAATGCCAC CACAGAATAT 240
241 GCCGAATTCC TGCAC TGCAA GGGGAAGAAA TTCACTGACT TCGAGGAGGT ACGCCTGGAG 300
301 ATCGAGGCTG AGACCGACCG GGTCAC TGGC ACCAAC AAGG GCATCTCGCC GGTGCCCATC 360
361 AACCTCCGCG TCTACTCGCC TCAGGTCCTG AATCTGACAC TGGTGGACCT ACCCGGAATG 420
421 ACCAAGGTCC CAGTGGGGGA CCAACCTCCT GACATCGAGT TCCAGATCCG GGACATGCTT 480
481 ATGCAGTTCG TCACCAAAGA GAACTGCCTC ATCCTGGCTG TGTCCCCCGC CAACTCCGAC 540
541 CTGGCCAACT CTGATGCTCT CAAGGTTGCC AAGGAGGTGG ACCCCCAGGG TCAGCGCACC 600
601 ATGGGGTCA TCACCAAGCT AGATCTGATG GAGGAGGCA CAGATGCCCG AGATGTGCTA 660
661 GAGAATAAGC TCCTTCCCCT GCGCAGAGGC TACATAGGGG TGGTAAACCG AAGCCAGAAG 720
721 GACATTGATG GCAAGAAGGA CATCTCAGCT GCCTTGGCG CTGAACCAA GTTCTTTCTC 780
781 TCCCACCCAT CCTACCGCCA CTTGGCGGAC CGCATGGGCA CACCCTACCT ACAGAAGGTC 840
841 CCAACCCAGC AACTGACCAA CCACATCCGG GACACACTGC CGGGGCTCCG GAACAGGCTG 900
901 CAGAGCCAGC TACTGTCCAT TGAGAAGGAG GTGGAGGAGT ACAAGA AACT CCGACCTGAT 960
961 GACCCAGCAC GCAAGACCAA GGCCCTGCTG CAGATGGTCC AGCAGTTTGC TGTGGACTTT 1020
1021 GAGAAGCGCA TTGAGGGCTC CGGGGACCAG ATTGACACCT ATGAACTGTC AGGGGGAGCC 1080
1081 CGCATCAACC GGATCTTCCA TGAGCGCTTC CCCTTTGAGC TAGTCAAGAT GGAGTTTGAT 1140
1141 GAGAAGGAGC TCCGGAGAGA GATCAGCTAC GCCATCAAGA ACATCCATGG CATTAGAACG 1200
1201 GGGCTCTTTA CCCCAGACAT GGCTTTTGAG ACCATTGTGA AAAAGCAGGT GAAGAAGATC 1260
1261 CGAGAACCCT GTCTCAAGTG TGTGGACATG GTTATCTCGG AACTAATCAG CACGGTTAGA 1320
1321 CAGTGCACCA AGAAGCTGCA GCAGTACCCG CGGCTGCGGG AGGAGATGGA GCGCATCGTG 1380
1381 ACCACCCACA TCCGGGAGCG TGAGGGTCGC ACCAAGGAGC AGGTTATGCT CCTCATCGAT 1440
1441 ATTGAGTGG CGTACATGAA TACCAATCAT GAGGACTTCA TAGGCTTTGC CAATGCTCAG 1500
1501 CAGAGGAGCA ACCAGATGAA CAAGAAGAAG GCTTCAGGGA ACCAGATGA GATTCTGGTC 1560
1561 ATCCGGAAGG GTGGCTGAC CATCAACAAT ATTGGCATCA TGAAGGGGGG CTCCAAGGAG 1620
1621 TACTGGTTTG TCCTGACCGC TGAGAATCTG TCCTGGTACA AGGATGACGA GGAGAAAGAG 1680
1681 AAGAAATACA TGCTCTCCGT GGACAATCTG AAGCTACGGG ACGTGGAGAA AGGTTTCATG 1740
1741 TCAAGCAAGC ACATCTTTGC CCTCTTTAAC ACTGAGCAGA GGAATGTCTA CAAGGATTAT 1800
1801 CGGCAGCTGG AACTGGCCTG TGAGACCAA GAGGAGGTGG ATAGCTGGAA GGCCTCTTTC 1860
1861 CTGCGGGCTG GCGTATATCC TGAACCGGTT GGGGACAAGG AGAAAGCCAG CGAAACAGAG 1920
1921 GAGAATGGCT CAGACAGCTT CATGCACTCC ATGGACCCAC AGCTAGAGCG GCAGGTGGAG 1980
1981 ACCATCCGGA ACCTGGTAGA CTCATACATG GCCATCGTGA ACAAGACCGT GCGTGACCTC 2040
2041 ATGCCGAAGA CCATCATGCA CCTCATGATC AACAATACGA AGGAATTCAT CTTCTCGGAG 2100
2101 CTGCTCGCCA ACCTGTACTC GTGCGGGGAC CAGAACACAC TGATGGAGGA GTCGGCGGAG 2160
2161 CAGGCGCAAC GCGCGACGA GATGCTGCGC ATGTACCACG CACTGAAGGA GCGGCTCAGC 2220
2221 ATCATCGGCG ATATCAACAC GACCACCGTC AGCACGCCCA TGCCCCCGCC CGTGGACGAC 2280
2281 TCCTGGCTGC AGGTGCAGAG CGTACCGGCC GGACGCAGGT CACCCACGTC CAGCCCCACG 2340
2341 CCGCAGCGCC GAGCCCCCGC CGTGCCCCCA GCGCGGCCCG GGTGCGGGGG CCCTGCTCCT 2400
2401 GGGCCTCCGC CTGCTGGGTC CGCCCTGGGG GGGGCGCCCC CCGTGCCCTC CAGGCCGGGG 2460
2461 GCTTCCCCTG ACCCCTTCGG TCCTCCCCCC CAGGTGCCCT CGCGCCCCAA CCGCGCCCCG 2520
2521 CCCGGGGTCC CCAGGTGA 2538 (SEQ ID NO:12)

```


Figura 5B

```

1  MGNRGMEDLI  PLVNRLQDAF  SAIGQNADLD  LPQIAVVGGO  SAGKSSVLEN  FVGRDFLPRG   60
61 SGIVTRRPLV  LQLVNATTEY  AEFLHCKGKK  FTDfEEVRL  IEAETDRVtG  TNKGISPVPI  120
121 NLRVYSPQVL  NLTlVDLPGM  TKVPVGDQPP  DIEFQIRDML  MQFVtKENCL  ILAVSPANSD  180
181 LANSdALKVA  KEVDPQgQRT  GvITKLDLm  EGTDARDVL  ENKLLPLRRG  YIGVVNRSQK  240
241 DIDGKKDISA  ALAEKFFL  SHPSYRHlAD  RMGtPYLQKV  LNQQLtNHIR  DTLpGLRNRL  300
301 QSQLLSIEKE  VEEYKNfRPD  DPARKTKALL  QMVQqFAVDF  EKRIEGSGDQ  IDTYELSGGA  360
361 RINRIFHERF  PFELVKMEFD  EKELRREISY  AIKNIHGIRT  GLFTPDMAFE  TIVKKQVKKI  420
421 REPCLKCVDM  VISELISTVR  QCTKKLQOYP  RLREEMERIV  TTHIREREGR  TKEQVMllID  480
481 IELAYMNTNH  EDfIGFANAQ  QRSNQMnKkK  ASGNQDEILV  IRKGWLTINN  IGIMKGGsKE  540
541 YWFVlTAENL  SWYKDDEEKE  KKYMLSVdNL  KLRDVEKGFm  SSKHIFALFN  TEQRNVYKDY  600
601 RQLELACEQ  EEVDSWKASF  LRAgVYPERV  GDKEKASETE  ENGSDSfMHS  MDPQLERQVE  660
661 TIRNLVDSYM  AIVNKTvRDL  MPKTIMHlMI  NNTKEFIFSE  LLANLYSCGD  QNTLMEEsAE  720
721 QAQRrDEMLR  MYHALKEALS  IIGDINTtTV  STPMPPpVDD  SWLQVQSVPA  GRRSPTSSPT  780
781 PQRRApAVPP  ARPGSRGPAP  GPPpAGSALG  GAPPVPSRPG  ASPDPFGPPP  QVPSRPnRAP  840
841 PGVPR 845 (SEQ ID NO:13)

```


Figura 7B

Polimorfismos y comentarios	Secuencias de sitio de corte y empalme predichas	Exón	Secuencia de exón predicha
Existen dos posibles codones de inicio en fase	-----GT	1	ATGGCAACCCGGGCATGGAGGATCTCATCCCGCTAGTCAACCCGGCTGCAGGACG CCTTCTCCGCTATCGGCCAGAACCGGACCTCGACCTACCGCAGATCGGGTGGTG GGCGGCCAGAGCGCCGGCAAGAGCTCGGTGCTCGAGAAATTTTCGTAGGCAG (<i>SEA ID NO: 48</i>)
SNP 1 del intrón 1, 2 perros afectados son A/A, 1 perro no afectado es G/G, el ensamblaje genómico es G/G; SNP 2 del intrón 2, 2 perros afectados y 1 perro no afectado son G/G y el ensamblaje genómico es C/C	AG-----GT	2	GGACTTCTGCCCGGAGGGTCAGGCATTGTCACCCGACGGCCCTGGTCTCTGCAG CTGGTCAATGCCACCACAG (<i>SEA ID NO: 49</i>)
	AG-----GT	3	AATATGCCGAATTCCTGCACTGCAAGGGGAAGAAATTCAGTCTCGAGGAGGTA CGCTGGAGATCGAGGCTGAGACCGACCGGGTCACTGGCACCAACAAGGGCATCT CGCCGGTGCCCATCAACCTCCGGCTACTCGCCTCAGG (<i>SEA ID NO: 50</i>)
	AG-----GT	4	TCCTGAATCTGACACTGGTGACCTACCCGGGAATGACCAAGGTCCAGTGGGGAC CAACTCCTGACATCGAGTTCAGATCCGGGACATGCTTATGCAGTTCGTCAACAAA GAGAACTGCCTCATCCTGGCTGTGCCCGCCCAACTCCGACCTGGCCAACTCTGA TGCTCTCAAGGTTGCCAAGGAGGTGGACCCCGG (<i>SEA ID NO: 51</i>)

Figura 7D

Polimorfismos y comentarios	Secuencias de sitio de corte y empalme predichas	Exón	Secuencia de exón predicha
<p>SNP1 del exón 5, 2 perros afectados son T/T, 1 no afectado es C/T, el ensamblaje genómico es T/T; SNP2 del exón 5, 2 perros afectados son C/C, 1 perro no afectado es C/T, el ensamblaje genómico es C/C; SNP1 del exón 6, 12 perros afectados son C/C, 1 perro no afectado es C/T, 3 perros no afectados son C/C, 8 perros no afectados son C/T, el ensamblaje genómico es C/C; SNP2 del exón 6, 12 perros afectados son T/T, 6 perros no afectados son G/G, 6 perros no afectados son G/T, el ensamblaje genómico es G/G (mutación CIE); SNP1 del intrón 6, 12 perros afectados son C/C, 3 perros no afectados son C/C, 1 perro no afectado es T/T, 8 perros no afectados son C/T, el ensamblaje genómico es C/C</p>	<p>AG-----GT</p>	<p>5</p>	<p>GTCAGCGCACCATYGGGGTCATCACCAAGCTAGATCTGATGGAYGAGGGCACAGAT GCCCGAGATGTGCTAGAGAATAAGCTCCTTCCCTGGCCAGAG (554 10 330: 58)</p>
	<p>AG-----GT</p>	<p>6</p>	<p>GCTACATAGGGGTGGTAAACCGAAGGACGACATTGATGGCAAGAGGACATC TCAGCTGCCTTGGCYGCTGAACGCAAGTTCTTCTCCACCCATCCTACCGCCAC TTGGGGACCGCATGGGCACACCCCTACCTACAGAAAGGTCTCAACCAG (SEQ ID NO:59)</p>
<p>SNP del intrón 7 justo 5' del inicio del exón 8; SNP2 del exón 8, 2 perros afectados son G/G, 1 perro no afectado es G/G, el ensamblaje genómico es C/C</p>	<p>AG-----GT</p>	<p>7</p>	<p>CAACTGACCAACCACATCCGGGACACACTGCCGGGGCTCCGGAACAGGCTGCAGA GCCAGCTACTGTCCATTGAGAAGGAGGTGGAGGAGTACAAGAACTTCCGACCTGAT GACCCAGCACGCAAGACCACCAAGGCCCTGCTGCA (554 10 330: 60)</p>
	<p>AG-----GT</p>	<p>8</p>	<p>GATGGTCCAGCAGTTTGCTGTGGACTTTGAGAAAGCGCATTGAGGGCTCCGGGGACC AGATTGACACCTATGAACACTGCAGGGGGAGCCCGCATCAACCCGGATCTTCCATGAG (SEQ ID NO:61)</p>
<p>El sitio no GT (concretamente GC) está también presente en seres humanos</p>	<p>AG-----GC</p>	<p>9</p>	<p>ATGGAGTTTGATGAGAAAGGAGCTCCGGGAGAGAGATCAGCTACGCCCATCAAGAACAT CCATGGCATTAG (554 10 330: 61)</p>

Figura 7F

Polimorfismos y comentarios	Secuencias de sitio de corte y empalme predichas	Exón	Secuencia de exón predicha
SNP2 del intrón 10, 2 perros afectados son G/G, 1 perro no afectado es G/A, el ensamblaje genómico es G/G	AG-----GT	10	AACGGGCTCTTTACCCAGACATGGCTTTTGGACCATTTGAAAAAGCAGGTGAA GAAGATCCGAGAACCGTGTCTCAAGTGTGGACATGGTTATCTCGGAACATAATCAG CACGGTTAGACAGTGCACCAAGAAG (SEQ ID NO: 75)
SNP1 del intrón 11, 2 perros afectados son C/C, 1 perro no afectado es C/T, el ensamblaje genómico es T/T; SNP2 del intrón 11, ins/del en la secuencia ttttttt	AG-----GT	11	CTGCAGCAGTACCCCGGCTGCGGAGGAGATGGAGCGCATCGTGACCACCCACA TCCGGGAGCGTGAGGGTGCACCAAGGAGCAG (SEQ ID NO: 76)
SNP2 del intrón 11, 2 perros afectados son C/C, 1 perro no afectado es C/C, el ensamblaje genómico es T/T; microsatélite de repetición GT en el intrón 12	AG-----GT	12	GTTATGCTCCTCATCGATATTGAGCTGGCGTACATGAATACCAATCATGAGGACTTC ATAGGCTTTGCCAA (SEQ ID NO: 77)
	AG-----GT	13	TGCTCAGCAGAGGAGCAACCAGATGAACAAGAAGAGGCTTCAGGGAACCCAG (SEQ ID NO: 78)
	AG-----GT	14	GATGAGATTCTG (SEQ ID NO: 79)

Figura 7G

Par cebador	Cebador de codificación	Cebador inverso	Tamaño del producto	Secuencia del producto
Exón 15	<pre> ltagctgaact atgctctac SEQ ID NO: 80 </pre>	<pre> ttctcttccca ocdggatg SEQ ID NO: 81 </pre>	529	<pre> acagggcaggctggcccacaacccctcccccaccaggctcccaaggcttccaggcggagggggggcttggagtggttcctct tgcctaccacatcccaagggaagctctggcctcctccacacagctccctcttatccatcagGAGAAAGAGA GGGCTGGCTGACCATCAACAATATTGGCATCATGAAGGGGGGTCCAAAGGAGTACT GGTTTGTCTGACCGCTGAGAATCTGTCTCTGTGTACAAAGGATGACGAGtgagtaaaagggc cadggcacaagggttggctggggccagatcaggctcagacacactccaaaggcttggagtagatggggcaccaca acaacaagggtttttttttt (SEQ ID NO: 82) </pre>
Exón 16	<pre> actgggaac agaggctc SEQ ID NO: 83 </pre>	<pre> gcaggctctc taggcagag SEQ ID NO: 84 </pre>	474	<pre> gcaggggcactgggtgcccagaacaacaggccggcctcaggctcccccaggctcctcccccaccagcccccaccaccc ctggaaccactcctaggtatagggcatggccagaccccccacatccacccctccacctctatccatcagGAGAAAGAGA AGAAATACATGCTCTCCGTGGACAATCTGAAGCTACGGGACGTGGAGAAAGGTTTCA TGTCAAAGCAAGCACATCTTTGCCCTCTTAAACACTGAGCAGAGGtggttccccaagactgcaag ccacacacactctcctggccagaaagggagggagcctctccaggcccacacagagagagcttggacaaatttc agtcaatcactggiaaggcctgctcctgctcctaaagaacacaccc (SEQ ID NO: 85) </pre>
Exón 17	<pre> ctccaggcaa ggaacaag SEQ ID NO: 86 </pre>	<pre> aggaattgoc atctgtgctc SEQ ID NO: 87 </pre>	501	<pre> ctccaggcaaggaaacaagcttggaggctggggggaccatgcccaggctcacacagctgggaaatgaggaagcaggga ctggcccacaggtgtgatgttcccacagctgtgcatggcccttaacacccctgggtgaggtgctcaggccctcctccctcggggc ctgcccacacttgcagGAATGTCTACAAGGATTAATCGGCAGCTGGAACCTGGCCTGTGAGACR CAAGAGGAGGTGGATAGCTGGAAGGCCTCTTCCCTGCCGGCTGGCCTATATCCCTGA ACCGCTTGGGgtgagtggaagggcaggagggggggcaagtlacitaaataggggggccgaaatccatcctcag cgtgccaagtcatgctacaggtcagaaatagccacagatcctcccctaacctgatgggggtggggtcagggttaagoc (SEQ ID NO: 88) </pre>
Exón 18	<pre> ggtgtctgatt ggtgtg SEQ ID NO: 89 </pre>	<pre> ccacccttc ctgattc SEQ ID NO: 90 </pre>	194	<pre> ggtgtctctgttggctgtctgtgtgtggggggggggtgtgtggtggaaatgctgggtgtctggccctatggcttgggtgtggg octccagGACAAGGAGAAAgtagtgtgtggcctcctcccctctcccaaggtgtctcag (SEQ ID NO: 91) </pre>

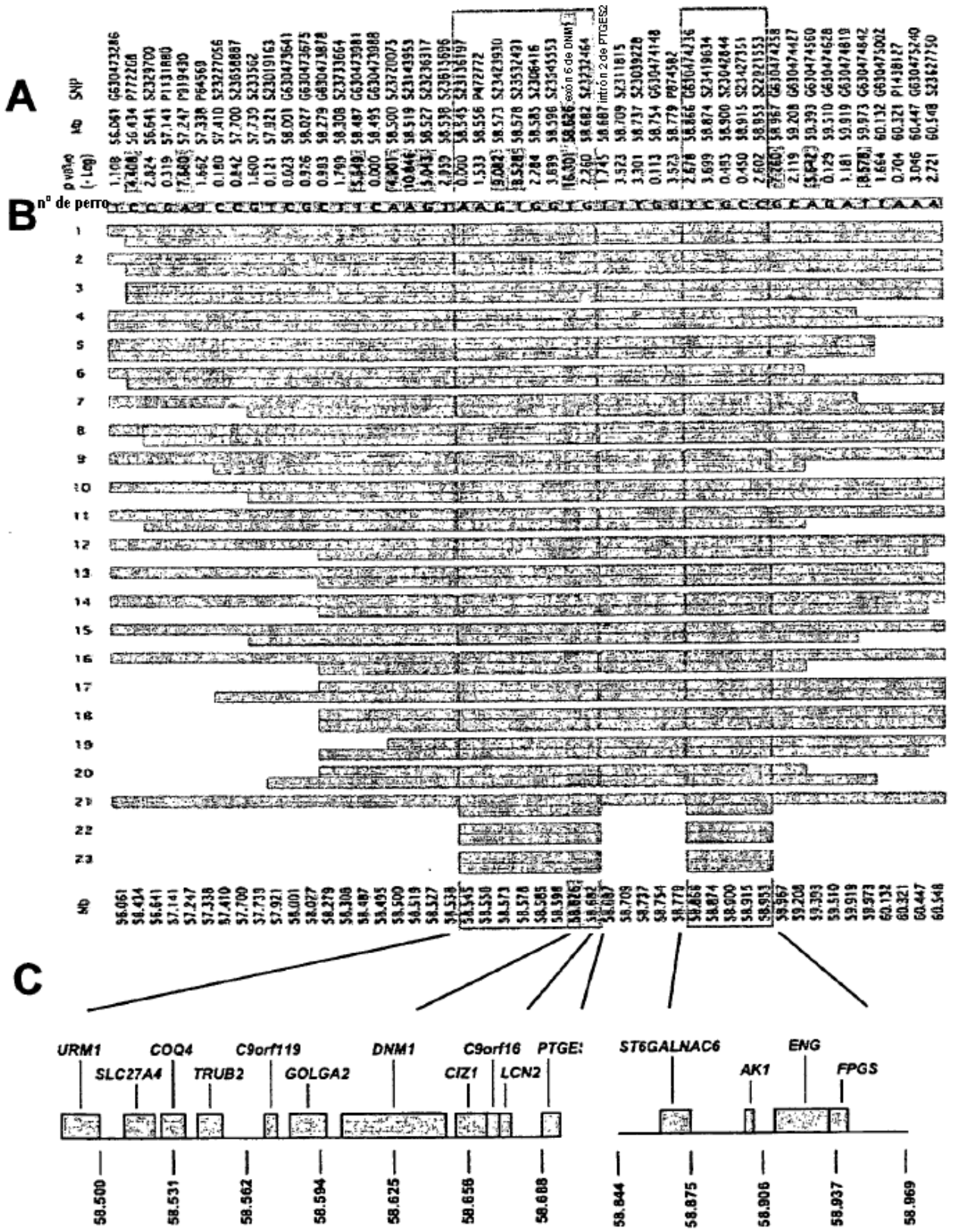
<p>Exón 19</p>	<p>agtttccaggc acodtc SEQ 10 NO: 92</p>	<p>atcccaaggg acfggttg SEQ 10 NO: 93</p>	<p>367</p>	<p>agtttccaggcaccttcaagggtgagaccctggggagtggtggaaacctggdtaoagggggcccaagctctdctgattgccc tctatttcaaggagGCCAGCGAAACAGAGAGGAGAAATGGCTCAGACAGCTTCATGCACTCC ATGGACCCACAGCTAGAGCGGCAAGGTGGAGACCATCCGGAACCTGGTAGACTCATA CATGGCCATCGTGAAACAAGACCGTGCCTGACCTCATGCCGAAGACCATCATGCACC TCATGATCAACAATgggggcaacactygtggcaigtgggtgctcttttgggaccaggaggga (SEQ 10 NO: 94)</p>

Figura 7H

Polimorfismos y comentarios	Secuencias de sitio de corte y empalme predichas	Exón	Secuencia de exón predicha
SNP del intrón 15, ins/del múltiples en la secuencia 3' tttttttt SEQ. D. NO: 95	AG—GT	15	GTCATCCGGAAGGGCTGGCTGACCATCAACAATATTGGCATCATGAAGGGGGGCTC CAAGGAGTACTGGTTTGTCTGACCGCTGAGAAATCTGTCTCTGGTACAAAGGATGACG AG (SEQ. D. NO: 96)
SNP del intrón 15, 2 perros afectados son T/T, 1 perro no afectado es C/C, el ensamblaje genómico es C/C	AG—GT	16	GAGAAAGAGAAGAAATACATGCTCTCCGTGGACAATCTGAAGCTAAGGCTAAGGACGTGGA GAAAGGTTTCATGTCAGCAAGCACATCTTTTGCCTCTTTTAACTGAGCAGAG (SEQ. D. NO: 97)
SNP2 del exón 17, 2 perros afectados son A/A, 1 perro no afectado es G/G, el ensamblaje genómico es A/A	AG—GT	17	GAATGCTACAAAGGATTATCGGCAGCTGGAACTGGCCTGTGAGACGCAAGAGGAGG TGGATAGCTGGAAGGCTCTTTTCTGCGGGCTGGCGTATATCTGAAACGCGTTGGG (SEQ. D. NO: 98)
SNP del intrón 17, 2 perros afectados son G/G, 1 perro no afectado es A/G, el ensamblaje genómico es G/G; SNP del intrón 18, 2 perros afectados son G/G, 1 perro no afectado es T/G, el ensamblaje genómico es G/G	AG—GT	18	GACAAGGAGAAA (SEQ. D. NO: 99)
SNP1 del intrón 18, 2 perros afectados son C/C, 1 perro no afectado es T/T, el ensamblaje genómico es C/C; SNP2 del intrón 18, 2 perros afectados son G/G, 1 perro no afectado es A/A, el ensamblaje genómico es G/G; SNP2 del intrón 19, 2 perros afectados son C/C, 1 perro no afectado es C/T, el ensamblaje genómico es C/C	AG—GT	19	GCCAGCGAAACAGAGGAGATGGCTCAGACAGCTTCATGCACCTCCATGGACCCACA GCTAGAGCGGCGAGGTGGAGACCATCCGGAACCTGGTAGACTCATACATGGCCATCG TGAACAAGACCGTGGTGACCTCATGCCGAAGACCATGCACCTCATGATCAACA AT (SEQ. D. NO: 100)

Figura 7J

Polimorfismos y comentarios	Secuencias de sitio de corte y empalme predichas	Exón	Secuencia de exón predicha
	AG—GT	20	<p>ACGAAGGAATTCATCTTCGGAGCTGCGCAACCTGTACTGGTGGGGACCA GAACACACTGATGGAGGAGTGGGGAGGAGCAAGGCGAAGGGGGAGAGATGCTG CGCATGTACCACGCACTGAAAGGAGGGGCTCAGCATCATCGGGGATATCAACACGAC CACCGTCAAGCACGCCCCATGCCGCCGCCGCTGGACGACTCCTGGCTGCAGGTGCAG AGCGTACCGGGCCGGACGCGAG (SEG 1, D N°: 116)</p>
	AG—	21	<p>GTACCCACGTCAGGCCCCACGCCGACGCCGCCGAGCCCCGGCCGTGCCCCGAGCC CGGCCGGTCCGGGGCCCTGCTCTCGGCCCTCCGGCTGGGTCCGCCCTG GGGGGGGGCCCCCGGTGCCCTCCAGGCCGGGGGCTTCCCTGACCCTTCGGT CCTCCGCCAGGTGCCCTCGGCCGCCCAACCGGCCGCCGCCGGGGTCCCGCAGGT GA (SEG 1, D N°: 117)</p>
<p>Para preparar la forma larga, se rompe el exón 21 en AG GTGA cerca del extremo 3' de la secuencia codificante y se corta y empalma con este extremo alternativo la secuencia después de su 5'ag. El transcrito más largo usa el GT de la forma corta como señal de sitio de corte y empalme para conectar con la secuencia codificante del extremo alternativo en dirección 3' de ag</p>	AG—	Extr. Altern.	<p>CCGATCGGGTCAAGGCAAGTCCGGTCCCGTCTGAGAGGCCGCCAGGCCCTTGGAC CTCCTAA (SEG 1, D N°: 118)</p>
<p>SNP1 del exón 6, los no afectados son Y (C/T). Tasha es C; SNP2 del exón 6, los no afectados son G, los afectados son T (mutación de CIE)</p>	AG—GT	6	<p>GCTACATAGGGTGGTAAACCGAAGCCAGAGGACATTGATGGCAAGAGGACATC TCAGCTGCCTGGCYGCTGAACGCAAGTCTTCTCTCCACCCATCTACCGCCGAC TTGGCCGACCGCATGGGCACACCCTACCCTACAGAGGTTCTCAACCAG (SEG 1, D N°: 119)</p>



Figuras 8A-8C

ES 2 375 260 T3

URM1	58.487	pb: 58486128-58501133 longitud:15006	Gen : ENSCAFG0000002361	0,48"
SLC27A4		pb: 58508896-58520185 longitud:11290	Gen : ENSCAFG0000002006	0,36"
	58.527			
COQ4		pb: 58527495-58537771 longitud:10277	Gen : ENSCAFG0000002006	0,33
TRUB2		pb: 58538202-58547593 longitud:9392	Gen : ENSCAFG0000002006	0,3
C9orf119	58.573	pb: 58573597-58579355 longitud:5759	Gen : ENSCAFG0000002338	0,18
GOLGA2		pb: 58578944-58595033 longitud:16090	Gen : ENSCAFG0000002007	0,52
	58.596			
DNM1		pb: 58599318-58642207 longitud:42890	Gen : ENSCAFG0000002008	1,37
CIZ1		pb: 58648241-58663023 longitud:14783	Gen : ENSCAFG0000002008	0,47
C9orf16		pb: 58664036-58667360 longitud:3325	Gen : ENSCAFG0000002008	0,11
LCN2		pb: 58672530-5867606 longitud:3539	Gen : ENSCAFG0000002008	0,11
LOC389791				
PTGES2		pb: 58687589-58693005 longitud:5417	Gen : ENSCAFG0000002008	0,17
SLC25A25		pb: 58704336-58720909 longitud:16574	Gen : ENSCAFG0000002009	0,53
C9orf90		pb: 58739787-58742489 longitud:2703	Gen : ENSCAFG0000002009	0,09
LOC729758	58.779			
FAM102A		pb: 58794037-58825063 longitud:31027	Gen : ENSCAFG0000002009	0,99
DPM2		pb: 58830285-58832145 longitud:1861	Gen : ENSCAFG0000002009	0,06
PIP5KL1		pb: 58835218-58843177 longitud:7960	Gen : ENSCAFG0000002009	0,25
ST6GALNAC4		pb: 58848210-58857484 longitud:9275	Gen : ENSCAFG0000002010	0,3
LOC609143				
ST6GALNAC4	58.866	pb: 58864573-58876517 longitud:11945	Gen : ENSCAFG0000002010	0,38
AK1		pb: 58887655-58892426 longitud:4772	Gen : ENSCAFG0000002010	0,15
ENG	58.900	pb: 58911399-58933429 longitud:22031	Gen : ENSCAFG0000002010	0,7
FPGS		pb: 58934901-58943393 longitud:8493	Gen : ENSCAFG0000002011	0,27
CDK9		pb: 58960192-58963681 longitud:3490	Gen : ENSCAFG000000201	0,11
	58.967			
SH2D3C		pb: 58970716-59000641 longitud:29926	Gen : ENSCAFG0000002011	0,96

Figura 9