

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 916**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07816051 .2**
96 Fecha de presentación: **25.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2089546**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Métodos de diagnosticar osteoartritis**

30 Prioridad:
25.10.2006 US 854077 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.09.2012

73 Titular/es:
**CHU SAINTE-JUSTINE
3175 CHEMIN DE LA COTE-STE-CATHERINE
MONTREAL QC H3T 1C5, CA**

72 Inventor/es:
MOREAU, Alain

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 386 916 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

Métodos de diagnosticar osteoartritis

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/854.077 presentada el 25 de octubre de 2006.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de pronóstico de la osteoartritis y métodos de seleccionar compuestos.

15 **Antecedentes de la invención**

15 La etiología de la (OA), la forma más frecuente de artritis, sigue no estando clara a pesar de la multiplicidad de factores que se han considerado en la OA primaria (1,2). En la actualidad, cada vez es más evidente que la mayoría de los loci de susceptibilidad genética a la OA se puede atribuir únicamente a genes estructurales o a genes que regulan la masa ósea (3-5). Estos estudios también han destacado la gran heterogeneidad y las diferencias en el grado de heredabilidad entre la OA entre diferentes puntos de articulación (por ejemplo, mano frente a rodilla) y el sexo. Esto también se refleja en la multiplicidad de loci identificados en estudios relacionados con la OA y sus discrepancias. Además, la importancia funcional de estos loci de susceptibilidad todavía no se ha confirmado e ilustra nuestros incompletos conocimientos de la biología de la OA.

25 PITX1 (antes denominada Ptx1) es un factor de transcripción de homeodominio detectado inicialmente con el desarrollo de la hipófisis. La familia de PITX contiene tres miembros relacionados. PITX1, PITX2 y PITX3, que son miembros de la clase apareada de proteínas de homeodominio. Los tres factores Pitx tienen propiedades de transcripción similares (6-8). El gen PITX1 se expresa a niveles elevados en los huesos largos de las patas traseras de ratón durante el desarrollo (5) y la acumulación de niveles elevados de proteínas PITX1 se detectó mediante inmunohistoquímica en secciones de hueso largo de las patas traseras principalmente en la región periarticular, a lo largo del pericondrio (incluidas las articulaciones de la cadera y la rodilla) y también en los núcleos de condrocitos proliferativos (8). La expresión de PITX1 también se detectó en estructuras craneofaciales, tales como la mandíbula y las articulaciones temporo-mandibulares. Los ratones que son homocigotos para la delección de PITX1 nacen con la proporción mendeliana prevista, pero mueren poco después del nacimiento y el análisis fenotípico de los ratones mutantes recién nacidos muestra sorprendentes anomalías craneofaciales y en las extremidades traseras (9). Es interesante el hecho de que los ratones heterocigotos que solamente alojan un alelo mutado eran fenotípicamente normales en el momento del nacimiento, pero una mayoría de los ratones heterocigotos PITX1 +/- en envejecimiento exhibió cambios degenerativos graduales de las articulaciones de la rodilla, mostrando lesiones del tipo OA a los siete meses de edad. La comparación de los análisis histológicos realizados en fémures de ratones silvestres (figura 1a) y PITX1 +/- (figura 1b) de siete meses de edad confirmó un engrosamiento anormal del hueso subcondral, trabecular y cortical, una característica frecuente en la OA. A un aumento mayor, las secciones histológicas teñidas con el método de Goldner reveló una fibrilación y una marcada calcificación que solo afecta al cartílago articular de ratones heterocigotos PITX1 (figura 1d). Estas anomalías eran restos de los cambios clínicos observados habitualmente en los pacientes de OA.

45 Las prohibitinas, prohibitina (también conocida como PHB-1 o BAP32) y prohibitona (también conocida como PHB-2, proteína asociada con los receptores de linfocitos B o BAP37, REA para el represor de los receptores de estrógenos) son proteínas altamente conservadas en las células eucariotas que están presentes en múltiples compartimentos celulares (30-32). La PHB-1 se localiza en la mitocondria donde podría tener un papel en el mantenimiento de la función mitocondrial así como en el núcleo donde facilita la senescencia celular reclutando corepresores específicos para inhibir los genes objetivo E2F (19-21). El papel de la PHB-1 en la regulación del ciclo celular también se demuestra mediante su interacción física con las familias de proteínas del supresor del tumor retinoblastoma (22, 23) y mediante una interacción directa con la región del recuadro marcada altamente conservada de E2F (24), que impide la interacción de E2F con su secuencia afín. No obstante, la función de la PHB-1 en el núcleo sigue siendo controvertida, aunque su localización nuclear se ha encontrado en diversas líneas celulares (24).

60 Para el conocimiento del solicitante, no hay ninguna prueba molecular para evaluar el riesgo de progresión y gravedad de la OA.

60 **Sumario de la invención**

65 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un método de seleccionar un compuesto en el que dicho método comprende las etapas de (a) poner en contacto un compuesto de prueba con al menos una célula que tiene una mutación dentro del sitio similar a E2F del promotor PITX1 y (b) determinar los niveles de transcripción y/o de expresión de PITX1; en el que el compuesto de prueba se selecciona si el nivel de transcripción y/o de

expresión de PITX1 se incrementa en presencia del compuesto de prueba en comparación con aquellos en ausencia del mismo. En una realización específica, la mutación es una mutación correspondiente a -3727 C→T dentro del sitio de tipo E2F del promotor PITX1. En otra realización específica, el compuesto seleccionado es potencialmente útil en el tratamiento de la osteoartritis primaria en una articulación en la que normalmente se expresa PITX1. En otra realización específica, la articulación en la que normalmente se expresa PITX1 se selecciona del grupo consistente en la articulación de la rodilla, la articulación de la cadera y la articulación temporo-mandibular. En otra realización, la articulación en la que normalmente se expresa PITX1 es la articulación de la rodilla. En otra realización, la articulación en la que normalmente se expresa PITX1 es la articulación de la cadera. En otra realización, la articulación en la que normalmente se expresa PITX1 es la articulación temporo-mandibular.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método que comprende: (a) proporcionar una muestra de ADN de un sujeto y (b) comparar la unión de una proteína represora de PITX1 seleccionada del grupo consistente en prohibitina (PHB-1), prohibitona (PHB-2) y correpresión que interacciona con el represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR), a un sitio de tipo E2F del promotor PITX1 en la muestra de ADN del sujeto, con la observada en una muestra de ADN control, en la que un incremento de la unión de la proteína represora de PITX1 al sitio de tipo E2F del promotor de PITX1 en la muestra de ADN del sujeto en comparación con la de la muestra de ADN control, es indicativo de que el sujeto tiene osteoartritis o está en riesgo de desarrollar osteoartritis. En una realización específica, dicha proteína represora es PHB-1. En otra realización específica, dicha proteína represora es PHB-2. En otra realización específica, dicha proteína represora es BCoR. En otra realización específica, dicho sujeto no se diagnosticó clínicamente con osteoartritis.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado de no más de 300 nucleótidos que comprende (a) una secuencia de al menos 20 nucleótidos contiguos de AGTTCCATACTCCCATCTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAAATACATC CTGGCTCT (SEC ID N° 1) incluido un nucleótido en la posición 31, en la que C está sustituida por T; o (b) la complementaria de la secuencia en (a). En una realización específica, la secuencia en (a) es de al menos 30 nucleótidos contiguos de AGTTCCATACTCCCATCTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAAATACATC CTGGCTCT (SEC ID N° 1).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una matriz de moléculas de ácido nucleico unidas a un soporte sólido, en la que la matriz comprende un oligonucleótido hibridable con la molécula de ácido nucleico de la presente invención en condiciones en las que el oligonucleótido no hibridará sustancialmente con una molécula de ácido nucleico consistente en AGTTCCATACTCCCATCTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAAATACATC CTGGCTCT (SEC ID N° 1) o su complementaria.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una sonda de ADN monocatenario de no más de 300 nucleótidos hibridable en condiciones restrictivas con (a) molécula de ácido nucleico que consiste en AGTTCCATACTCCCATCTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAAATACATC CTGGCTCT (SEC ID N° 1) que incluye un nucleótido en la posición 31 en el que C está sustituido por T; o a (b) la complementaria de la molécula de ácido nucleico en (a) pero no, o en menor medida, a una molécula de ácido nucleico que consiste en AGTTCCATACTCCCATCTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAAATACATC CTGGCTCT (SEC ID N° 1) o a su complementaria. En una realización específica, la sonda está marcada de forma detectable.

Se describe un kit que comprende la sonda de la presente invención e instrucciones de uso de la sonda para diagnosticar la osteoartritis en un sujeto.

Se describe un kit que comprende la sonda de la presente invención e instrucciones de uso de la sonda para predecir si un sujeto está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

En una realización específica de los kits, los kits comprenden además un contenedor de una muestra de ADN del sujeto. En otra realización específica, los kits comprenden además un anticuerpo específico de una proteína represora de PITX1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método que comprende: determinar la localización celular de una proteína represora de PITX1 seleccionada del grupo consistente en prohibitina (PHB-1) y prohibitona (PHB-2) en una muestra celular del sujeto seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos. En una realización específica, dicho método comprende además determinar si la concentración nuclear de la proteína represora es superior en la muestra celular del sujeto en comparación con la de la muestra de células control; en la que una concentración nuclear de la proteína represora en la muestra celular del sujeto es indicativa de que el sujeto está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método que comprende: (a) identificar un sujeto del que se sospecha que presenta osteoartritis (OA); y (b) detectar la concentración en sangre de una proteína represora de PITX1 en una muestra de sangre del sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método que comprende: (a) identificar un sujeto del que se sospecha que presenta osteoartritis (OA); y (b) detectar la concentración en fluido sinovial de una proteína represora de PITX1 en una muestra de fluido sinovial del sujeto.

5 En una realización específica de los métodos, la osteoartritis se selecciona del grupo consistente en artritis de la articulación de la rodilla, artritis de la articulación de la cadera y artritis de las la articulaciones temporomandibulares. En otra realización específica, la osteoartritis es artritis de la articulación de la rodilla. En otra realización específica, la osteoartritis es artritis de la articulación de la cadera.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de seleccionar un compuesto en el que dicho método comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una muestra celular seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos y
 15 (b) determinar la localización nuclear de la proteína represora de PITX1 en la muestra celular; en el que el compuesto de prueba se selecciona si la localización nuclear de la proteína represora en la muestra celular disminuye en presencia del compuesto candidato en comparación con en ausencia del mismo. En una realización específica, el compuesto de prueba seleccionado es potencialmente útil en evitar acumulación o retención de una proteína represora de PITX1 en núcleos celulares o en la estimulación de la exportación nuclear de la proteína
 20 represora de PITX1. En otra realización específica, el compuesto seleccionado de prueba es potencialmente útil en el tratamiento de la osteoartritis primaria. En otra realización específica, la proteína represora de PITX1 es PHB-1. En otra realización específica, la proteína represora de PITX1 es PHB-2. En otra realización específica, la proteína represora de PITX1 es BCoR.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de seleccionar un compuesto, dicho método comprende las etapas de (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una muestra celular seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos y (b) medir la unión de una proteína o complejo represor de PITX1 en el sitio de tipo E2F de PITX1 en la
 30 muestra celular, en el que el compuesto de prueba se selecciona si la unión de proteína o complejo represor de PITX1 en el sitio de tipo E2F está disminuida en presencia del compuesto de prueba en comparación con en ausencia del mismo. En una realización específica, el compuesto seleccionado de prueba es potencialmente útil en el tratamiento de la osteoartritis primaria. En otra realización específica, la proteína o complejo represor de PITX1 comprende PHB-1. En otra realización específica, la proteína o complejo represor de PITX1 comprende PHB-2. En
 35 otra realización específica, la proteína o complejo represor de PITX1 comprende BCoR. En otra realización específica, dicha muestra celular procede de un sujeto que padece osteoartritis. En otra realización específica, dicha muestra celular es una muestra de condrocitos articulares. En otra realización específica, dicha muestra de condrocitos articulares procede de un sujeto que padece osteoartritis en una articulación de rodilla.

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificar una mutación que contribuye a osteoartritis, que comprende comparar la secuencia nucleotídica de un gen seleccionado del grupo consistente en el gen de PHB-1 y el gen de PHB-2, o de cualquier gen que codifique una proteína que produzca la acumulación o retención nuclear de PHB-1 o PHB-2 en condrocitos articulares de un sujeto que padece osteoartritis con la del gen correspondiente en un sujeto control. En una realización específica, dicho gen es el gen de PHB-1. En
 45 una realización específica, dicho gen es el gen de PHB-2. En otra realización específica, dicha mutación es una que afecta a la unión del ADN de PHB-1 o PHB-2 y/o a su localización celular.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de diagnóstico de osteoartritis que comprende detectar en un sujeto la presencia de una mutación directa o indirectamente causante de la acumulación o retención nuclear de PHB-1 o PHB-2 en células en las que PHB-1, PHB-2 o PITX1 se expresan de forma normal, en el que la presencia de la mutación es una indicación de que el sujeto tiene osteoartritis o está en riesgo de desarrollar osteoartritis, En una realización específica, dicho método comprende detectar una mutación en CRM-1.

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de diagnóstico de osteoartritis que comprende detectar en un sujeto la presencia de al menos una modificación postraduccional directa o indirectamente causante de la acumulación o retención nuclear de PHB-1 o PHB-2 en células en las que PHB-1, PHB-2 o PITX1 se expresan de forma normal, en el que la presencia de la al menos una modificación postraduccional es una indicación de que el sujeto tiene osteoartritis.

60 Se proporciona un kit que comprende un anticuerpo específico de PHB-1 o de PHB-2 y un anticuerpo específico de BCoR. En una realización específica, el kit comprende además instrucciones de uso de los anticuerpos para predecir si un sujeto está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

65 Se describe un complejo represor purificado que comprende BCoR y al menos uno de PHB-1 y PHB-2. En una realización específica, el complejo represor comprende BCoR y PHB-1. En otra realización específica, el complejo represor comprende BCoR y PHB-2. En otra realización específica, el complejo represor comprende BCoR, PHB-1 y

PHB-2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de uso del complejo represor de una cualquiera de las reivindicaciones 32-34, para unirse al sitio E2F. En una realización específica, el sitio E2F es el del promotor pitx.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método que comprende: determinar la localización celular de una proteína o complejo represor de PITX1 seleccionada del grupo consistente en prohibitina (PHB-1), prohibitona (PHB-2), correpresor de interacción del represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR), complejo que contiene PHB-1, complejo que contiene PHB-2 y complejo que contiene BCoR en una muestra celular del sujeto seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos.

En una realización específica, el método comprende además determinar si la concentración nuclear de la proteína o complejo represor es superior en la muestra celular del sujeto en comparación con la de la muestra de células control; en la que una concentración nuclear de la proteína o complejo represor en la muestra celular del sujeto es indicativa de que el sujeto está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método que comprende: (a) identificar un sujeto del que se sospecha que presenta osteoartritis (OA); y (b) detectar la concentración en sangre de una proteína o complejo represor de PITX1 en una muestra de sangre del sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método que comprende: (a) identificar un sujeto del que se sospecha que presenta osteoartritis (OA); y (b) detectar la concentración en fluido sinovial de una proteína o complejo represor de PITX1 en una muestra de fluido sinovial del sujeto.

En una realización específica, la osteoartritis se selecciona del grupo consistente en artritis de la articulación de la rodilla, artritis de la articulación de la cadera y artritis de las articulaciones temporo-mandibulares. En otra realización específica, la osteoartritis es artritis de la articulación de la rodilla. En otra realización específica, la osteoartritis es artritis de la articulación de la cadera.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de seleccionar un compuesto en el que dicho método comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una muestra celular seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos y (b) determinar la localización nuclear de la proteína o complejo represor de PITX1 en la muestra celular; en el que el compuesto de prueba se selecciona si la localización nuclear de la proteína o complejo represor en la muestra celular disminuye en presencia del compuesto candidato en comparación con en ausencia del mismo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de seleccionar un compuesto en el que dicho método comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una muestra celular seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos y (b) evaluar la sumoilación de una proteína o complejo represor de PITX1 en la muestra celular; en el que el compuesto de prueba se selecciona si la sumoilación de la proteína o complejo represor en la muestra celular aumenta en presencia del compuesto candidato en comparación con en ausencia del mismo.

En una realización específica, el compuesto de prueba seleccionado es potencialmente útil en la prevención de la acumulación o retención de una proteína o complejo represor de PITX1 en núcleos celulares o en la estimulación de la exportación nuclear de la proteína o complejo represor de PITX1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de seleccionar un compuesto en el que dicho método comprende las etapas de (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una muestra celular seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos y (b) medir la unión de una proteína o complejo represor de PITX1 en el sitio de tipo E2F en la muestra celular, en el que el compuesto de prueba se selecciona si la unión de proteína o complejo represor de PITX1 en el sitio de tipo E2F disminuye en presencia del compuesto de prueba en comparación con en ausencia del mismo.

En una realización específica, el compuesto seleccionado de prueba es potencialmente útil en el tratamiento de la osteoartritis primaria. En otra realización específica, la proteína o complejo represor de PITX1 comprende prohibitina (PHB-1). En otra realización específica, la proteína o complejo represor de PITX1 comprende prohibitona (PHB-2). En otra realización específica, la proteína o complejo represor de PITX1 comprende el correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B. En otra realización específica, la proteína represora de PITX1 es prohibitina (PHB-1). En otra realización específica, la proteína represora de PITX1 es prohibitona (PHB-2).

En otra realización específica, la proteína represora de PITX1 comprende el correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR). En otra realización específica, dicha muestra celular procede de un sujeto que padece osteoartritis. En otra realización específica, dicha muestra celular es una muestra de condrocitos articulares. En otra realización específica, dicha muestra de condrocitos articulares procede de un sujeto que padece osteoartritis en una articulación de rodilla.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificar una mutación que contribuye a osteoartritis, que comprende comparar la secuencia nucleotídica de un gen seleccionado del grupo consistente en el gen de prohibitina (PHB-1), de prohibitona (PHB-2), del correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 de linfocitos B (BCoR) o de cualquier gen que codifica una proteína que produce la acumulación o retención nuclear de PHB-1, PHB-2 o BCoR en condrocitos articulares de un sujeto que padece osteoartritis con la del gen correspondiente en un sujeto control.

En una realización específica, dicho gen es el gen de PHB-1. En una realización específica, dicho gen es el gen de PHB-2. En otra realización específica, dicha mutación es una que afecta a la unión del ADN de PHB-1 o PHB-2 y/o a su localización celular.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para predecir el riesgo de desarrollar osteoartritis que comprende detectar en un sujeto la presencia de una mutación directa o indirectamente causante de la acumulación o retención nuclear de prohibitina (PHB-1), de prohibitona (PHB-2) o del correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 de linfocitos B (BCoR) en células en las que PHB-1, PHB-2, BCoR o PITX1 se expresan de forma normal, en el que la presencia de la mutación es una indicación de que el sujeto tiene osteoartritis o está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

En una realización específica, dicho método comprende detectar una mutación en CRM-1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificar una modificación postraduccional que contribuye a osteoartritis, que comprende comparar la modificación postraduccional de una proteína seleccionada del grupo consistente en la prohibitina (PHB-1), la prohibitona (PHB-2), la correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 de linfocitos B (BCoR) o de cualquier proteína que produzca la acumulación o retención nuclear de PHB-1, PHB-2 o BCoR en condrocitos articulares de un sujeto que padece osteoartritis con la del gen correspondiente en un sujeto control.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para predecir el riesgo de desarrollar osteoartritis que comprende detectar en un sujeto la presencia de al menos una modificación postraduccional directa o indirectamente causante de la acumulación o retención nuclear de prohibitina (PHB-1), de prohibitona (PHB-2) o del correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 de linfocitos B (BCoR) en células en las que PHB-1, PHB-2, BCoR o PITX1 se expresan de forma normal, en el que la presencia de la al menos una modificación postraduccional es una indicación de que el sujeto tiene osteoartritis o está en riesgo de desarrollar osteoartritis,

Se proporciona un kit que comprende un anticuerpo específico de la prohibitina (PHB-1) o de la prohibitona (PHB-2) y un anticuerpo específico del correpresor de interacción del represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR).

En una realización específica, el kit comprende además instrucciones de uso de los anticuerpos para predecir si un sujeto está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

Se proporciona un complejo represor purificado que comprende el correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR) y al menos uno de prohibitina (PHB-1) y prohibitona (PHB-2).

En una realización específica, el complejo represor comprende BCoR y PHB-1. En otra realización específica, el complejo represor comprende BCoR y PHB-2. En otra realización específica, el complejo represor comprende BCoR, PHB-1 y PHB-2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de uso del complejo represor para unirse al sitio E2F. En una realización específica, el sitio E2F es en del promotor pitx.

Los artículos “un”, “una” y “el/la” se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

El término “que incluye” o “que comprende” se usan en el presente documento para querer decir y se reutilizan de forma intercambiable con, las frases “incluidos pero no limitados a” y “que comprenden pero no limitados a”.

El término “tal como” se usa en el presente documento para querer decir, y se usa de forma intercambiable con, la frase “tal como pero no limitado a”.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “osteoartritis” se refiere a una forma de artritis que implica el deterioro del cartílago que amortigua los extremos de los huesos con las articulaciones. También se denomina artritis degenerativa, enfermedad articular degenerativa o artritis hipertrófica. Este término incluye el inicio precoz de la osteoartritis. La osteoartritis es el trastorno articular más frecuente en todo el mundo. En los países occidentales, hay pruebas radiográficas de esta enfermedad en la mayoría de las personas a los 65 años de edad y en aproximadamente el 80 por ciento de las personas mayores de 75 años de edad (33). Aproximadamente el 11 por ciento de las personas mayores de 64 años de edad tiene osteoartritis sintomática en la rodilla (34).
- 10 Como se usa en el presente documento “inicio temprano de la osteoartritis” se refiere a una forma de osteoartritis que o bien se diagnostica por primera vez a los 40 años de edad o antes, o bien conduce a la sustitución de la articulación de la rodilla del sujeto antes de los 55 años de edad.
- 15 Como se usa en el presente documento el término “riesgo de desarrollar osteoartritis” se refiere a una predisposición de un sujeto a presentar síntomas de OA primaria y/o síntomas más graves de OA primaria en un futuro. De forma similar, el “riesgo de desarrollar osteoartritis en una articulación en la que normalmente se expresa PITX1” se refiere a un riesgo de un sujeto a presentar síntomas de OA primaria y/o síntomas más graves de OA primaria en un futuro en una articulación en la que Pitx se expresa de forma normal.
- 20 Como se usa en el presente documento la expresión “OA primaria”, cuando se usa para hablar de OA de articulación de rodilla/cadera se refiere a OA de de articulación de rodilla/cadera debido a enfermedad o a degeneración, por ejemplo, en oposición a OA secundaria de articulación de rodilla/cadera resultante de un traumatismo, sobreuso de la articulación, obesidad etc.
- 25 Como se usa en el presente documento el término “sujeto” quiere decir cualquier mamífero, tal como seres humanos, ratones, ratas, perros, gatos, cerdos, monos, caballos, etc. En una realización concreta, se refiere a un ser humano. En otra realización concreta, se refiere a un caballo y más específicamente a un caballo de carreras.
- 30 Como se usa en el presente documento con el término “muestra de ADN control” se quiere decir un ADN genómico que no procede de un sujeto que se sabe que padece osteoartritis (OA) (sujeto control). En referencia a las secciones de cartílago o a los condrocitos articulares obtenidos de sujetos con OA frente a sujetos control, estos sujetos control son individuos con edades equivalentes no afectados por OA, analizado en el momento de la autopsia o en el momento de la biopsia cuando se obtienen articulaciones de rodilla o articulaciones de cadera tras un traumatismo.
- 35 Como se usa en el presente documento el término “predisposición a desarrollar una enfermedad o afección” se refiere a una predisposición de un sujeto a presentar síntomas de la enfermedad o afección y/o síntomas más graves de enfermedad o afecciones en un futuro.
- 40 Como se usa en el presente documento con la expresión “muestra control” se quiere decir una muestra que no procede de un sujeto que se sabe que padece la enfermedad o trastorno o del sujeto en escrutinio pero antes de que el sujeto presentara la enfermedad o el trastorno. En métodos de diagnóstico de una predisposición de un sujeto a desarrollar una enfermedad o trastorno, la muestra puede también proceder del sujeto en escrutinio en un estadio anterior de la enfermedad o trastorno.
- 45 Como se usa en el presente documento con el término “muestra de ADN del sujeto” se quiere hacer referencia a cualquier muestra biológica del sujeto de la que se puede extraer ADN, es decir cualquier tejido o tipo celular del sujeto, incluyendo saliva y sangre.
- 50 Como se usa en el presente documento con el término “muestra celular” se hace referencia a una muestra que contiene cualquier tipo de célula, en la que, en un sujeto afectado por OA, PHB-1, PHB-2 y/o BCoR (también conocido como correpressor de interacción de BCL-6, en el que BCL-6 representa el represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B) se acumulan patológicamente en los núcleos celulares. Sin desear estar limitado de este modo, incluye condrocitos articulares, condrocitos de la placa de crecimiento, osteoblastos, mioblastos del esqueleto y sinoviocitos. Como se usa en el presente documento, con la expresión “condrocito articular” se quiere decir condrocitos que se encuentran en las articulaciones.
- 55 Como se usa en el presente documento con el término “sin diagnóstico clínico de osteoartritis” se quiere hacer referencia a un sujeto al que nunca se le ha diagnosticado OA usando un método clínico tal como un método de obtención de imágenes como rayos X y resonancia magnética (RM). En concreto, para diagnosticar OA de cadera, un método clínico actual recomendado por el Colegio Americano de Reumatología, incluye dolor de cadera y al menos 2 de las siguientes 3 características. ESR < 20 mm/hora; osteofitos femorales o acetabulares en radiografía; y estrechamiento del espacio articular en la radiografía (superior, axial y/o medial). En concreto, para el diagnóstico de la OA de rodilla, actualmente el Colegio Americano de Reumatología recomienda 1) el método clínico y de laboratorio: dolor de rodilla y al menos 5 de las 9 características siguientes: edad > 50 años, rigidez < 30 minutos, crepitación, sensibilidad ósea, aumento de tamaño óseo, sin calor palpable, ESR < 40 mm/hora, RF < 1:40; y OA
- 60
- 65

SF; 2) clínicas y radiográficas: Dolor de rodilla y al menos 2 de las 3 características siguientes, edad > 50 años; rigidez < 30 minutos; crepitación; + osteofitos; y 3) Clínicas: dolor de rodilla y al menos 3 de las 6 características siguientes: edad > 50 años, rigidez < 30 minutos, crepitación, sensibilidad ósea, aumento de tamaño óseo, sin calor palpable.

5 Como se usa en el presente documento la terminología "purificado", "aislado", "purificación" o "aislamiento" en las expresiones "polipéptido purificado", "polipéptido aislado", "proteína aislada", "complejos purificados", "complejos aislados" o "purificación por afinidad en tándem" significa alterado "por la mano del hombre" con respecto a su estado natural (es decir, si se produce en la naturaleza se ha cambiado o eliminado de su ambiente original) o que se ha sintetizado en un ambiente no natural (por ejemplo, sintetizado artificialmente). Estos términos no requieren pureza absoluta (tal como una preparación homogénea), sino que, en su lugar, representa una indicación de que es relativamente más pura que en el ambiente natural. Por ejemplo, una proteína/péptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "purificado" o "aislado", pero la misma proteína separada (aproximadamente 90-95 % de pureza al menos) de los materiales coexistentes de su estado natural está "purificada" o "aislada", como se emplea este término en el presente documento.

20 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo que específicamente se une a (interacciona con) una proteína de la presente invención y no muestra ninguna unión sustancial a otras proteínas naturales distintas de las que comparten los mismos determinantes antigénicos. El término anticuerpo o inmunoglobulina se usa en el sentido más amplio y cubre anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente un fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, de camélidos), anticuerpos de dominio único de NAR de tiburón y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos también hacen referencia a restos de unión que comprenden CDR o dominios de unión a antígeno, incluidos, entre otros, regiones VH (VH, VH-VH), anticalinas, PepBodies™, condensaciones de epítipo de células T-anticuerpo (Troybodies) o Peptibodies. Adicionalmente, cualquier anticuerpo secundario, monoclonal o policlonal, dirigido contra los primeros anticuerpos también estaría incluido dentro del alcance de esta invención.

35 En general, en la técnica se conocen bien las técnicas para preparar anticuerpos (incluidos anticuerpos monoclonales e hibridomas) y para detectar antígenos que usan anticuerpos (Campbell, 1984, en "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Países Bajos) y en Harlow y cols., 1988 (en "Antibody A Laboratory Manual", CSH Laboratories). En el presente documento, el término anticuerpo abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y variantes tales como anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y fragmentos inmunológicamente activos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos Fab y Fab') que inhiben o neutralizan sus dominios de interacción respectivos en Hyphen y/o son específicos de ellos.

Métodos diagnósticos o pronósticos

45 Un método para diagnosticar o seleccionar la presencia de una enfermedad o trastorno o una predisposición a desarrollar la enfermedad o trastorno en un sujeto, en el la enfermedad o trastorno se caracteriza por una cantidad, actividad, composición proteica, localización intracelular y/o formación de un complejo aberrantes, que comprende las etapas de: (1) comparar la cantidad de actividad, la composición proteica, la localización intracelular y/o la formación de dicho complejo en una muestra del sujeto con la de una muestra control, en la que una diferencia en dicha cantidad, actividad, composición proteica, localización intracelular y/o formación de dicho complejo en comparación con la de la muestra control es indicadora de que el sujeto tiene la enfermedad o trastorno o una predisposición a desarrollar la enfermedad o afección.

55 En una realización específica, la muestra control se selecciona de una muestra del sujeto en un estadio anterior de la enfermedad o trastorno o antes de que el sujeto tenga la enfermedad. En otra realización, la muestra control procede de un sujeto diferente que no tiene la enfermedad o trastorno o predisposición a desarrollar de la enfermedad o afección.

60 Como se usan en el presente documento con el término "correspondiente a" en la expresión "una mutación correspondiente a -3727 C→T" se quiere decir que reflejan el hecho de que la mutación C→T que se produce en el sitio de tipo E2F del promotor PITX1 humano se puede encontrar en ciertos sujetos en una posición que está cadena arriba o cadena abajo desde la posición -3727. De hecho, dado el polimorfismo del promotor ptx1 dentro de la población, la mutación C→T puede estar en una posición distinta de los nucleótidos 3727 cadena arriba del punto de transcripción de PITX1. Por ejemplo, si, en comparación con los sujetos en los que la mutación C→T se produce en la posición -3727, un sujeto tiene una delección de un nucleótido entre el punto de transcripción de PITX1 y la posición en la que se produce la mutación en el sitio de tipo E2F del promotor PITX1 humano, la posición de la mutación será -3726 en dicho sujeto. De un modo similar en comparación con los sujetos en los que la mutación

C→T se produce en la posición -3727, un sujeto que posee un nucleótido adicional en la región de interés, la posición de la mutación será -3728 en dicho sujeto. Por tanto, el método de la presente invención abarca determinar si hay una mutación C→T en el sitio de tipo E2F del promotor PITX1 en la posición que corresponde a la encontrada en la posición -3727 C→T en los sujetos analizados en los ejemplos presentados en el presente documento.

5 También como se usa en el presente documento, con la expresión "correspondiente a" en la expresión "una mutación correspondiente a -3727 C→T" se quiere decir que abarca una mutación G→A encontrada en la hebra complementaria a la que contiene la mutación -3727 C-T.

10 Otras mutaciones abarcadas por la presente invención incluyen cualquier otra mutación dentro o adyacente al sitio de unión del núcleo del sitio de tipo E2F encontrado en el promotor PITX1 humano que podría evitar la unión de E2F o potenciar el reclutamiento y/o estabilización de un complejo represor que reduce o anula la expresión del gen PITX1.

15 Como se usa en el presente documento, el término "articulación en la que PITX1 se expresa normalmente" quiere decir, sin quedar limitado así, articulación de la rodilla y articulación de la cadera.

20 La presente invención abarca métodos para identificar una mutación correspondiente a -3727 C→T dentro del sitio de tipo E2F en una hebra del promotor PITX1 del sujeto. Dichos métodos incluyen, sin limitaciones, análisis de fragmentos de ácido nucleico WAVE (dHPLC), secuenciación directa con fragmentos de PCR amplificados a partir de ADN genómico aislado de los sujetos.

25 La presente invención también se refiere a métodos para la determinación del nivel de expresión de transcritos o productos de traducción de un único gen, tal como PITX1. Por tanto, la presente invención abarca cualquier método conocido para dicha determinación, incluida PCR en tiempo real y PCR competitiva, transferencias Northern, protección de nucleasas, hibridación en placas y transferencias por ranuras.

30 La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico aislado, incluidas las sondas. En realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado no tienen más de 300, o no más de 200, o no más de 100 o no más de 90 o no más de 80 o no más de 70 o no más de 60 o no más de 50 o no más de 40 o no más de 30 nucleótidos. En realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 o al menos 30 o al menos 40 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 300 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 200 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 100 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 90 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 80 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 70 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 60 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 50 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 40 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 20 y no más de 30 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 300 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 200 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 100 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 90 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 80 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 70 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 60 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 50 nucleótidos. En otras realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico aislado tienen al menos 30 y no más de 40 nucleótidos.

55 Las sondas de la invención se pueden usar con estructuras de azúcar-fosfato naturales, así como estructuras modificadas, incluidas fosforotioatos, ditonatos, fosfonatos de alquilo y α -nucleótidos y similares. En general se conocen estructuras de azúcar-fosfato modificadas-naturales (62,63). Las sondas de la invención se pueden construir de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) y preferentemente de ADN.

60 Los tipos de métodos de detección en los que se pueden usar las sondas incluyen transferencias Southern (detección de ADN), transferencias puntuales o de tipo ranura (ADN, ARN) y transferencias Northern (detección de ARN). Aunque menos preferidas, también se podrían usar proteínas marcadas para detectar una secuencia de ácido nucleico concreta a la que se unan. Otros métodos de detección incluyen kits que contienen sondas en una configuración de varilla de nivel y similares.

65 Como se usa en el presente documento el término "marcado de forma detectable" se refiere a un marcaje de una sonda de acuerdo con la presente invención que permita la detección de la mutación de la presente invención. Aunque la presente invención no depende específicamente del uso de un marcador para la detección de una

secuencia de ácido nucleico concreta, dicho marcador podría ser beneficioso, incrementando la sensibilidad de la detección. Además, permite la automatización. Las sondas se pueden marcar de acuerdo con numerosos métodos conocidos (64). Ejemplos no limitantes de marcadores incluyen 3H, 14C, 32P, y 35S. Ejemplos no limitantes de marcadores detectables incluyen ligandos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos. Otros marcadores detectables para usar con sondas, que pueden permitir un incremento de la sensibilidad del método de la invención, incluyen biotina y radionucleótidos. Para el experto en la técnica será evidente que la elección de un marcador concreto dicta la manera en la que está unido a la sonda.

Como se sabe habitualmente, los nucleótidos radioactivos se pueden incorporar en las sondas de la invención mediante varios métodos. Ejemplos no limitantes de los mismos incluyen el tratamiento con cinasas de los extremos 5' de las sondas usando 32P ATP y polinucleótido cinasa, usando el fragmento Klenow de Pol I de E. coli en presencia del dNTP radioactivo (por ejemplo, sonda de ADN marcado de forma uniforme usando cebadores oligonucleotídicos aleatorios en geles de fusión baja), usando el sistema SP6/T7 para transcribir un segmento de ADN en presencia de uno o más NTP radioactivos y similares.

La presente invención se refiere también a métodos de seleccionar compuestos. Como se usa en el presente documento, con el término "compuesto" se quiere abarcar compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos, incluidos, sin estar limitados así, sustancias químicas, macromoléculas, extractos de células o tejidos (de plantas o animales), moléculas de ácidos nucleicos, péptidos, anticuerpos y proteínas.

La presente invención también se refiere a matrices. Como se usa en el presente documento, una "matriz" es un conjunto de moléculas creado de forma intencionada que se puede preparar sintética o biosintéticamente. Las moléculas de la matriz pueden ser idénticas o diferentes entre sí. La matriz puede asumir diversos formatos, por ejemplo bibliotecas de moléculas solubles; bibliotecas de compuestos unidos a perlas de resina, chips de sílice u otros soportes sólidos.

Como se usa en el presente documento "matriz de moléculas de ácido nucleico" es un conjunto de ácidos nucleicos creado de forma intencionada que se puede preparar sintética o biosintéticamente en diversos formatos diferentes (por ejemplo, bibliotecas de moléculas solubles y bibliotecas de oligonucleótidos unidos a perlas de resina, chips de sílice u otros soportes sólidos). Adicionalmente, con el término "matriz" se quiere decir que incluye las bibliotecas de ácidos nucleicos que se pueden preparar apuntando a ácidos nucleicos de esencialmente cualquier longitud (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 1000 monómeros nucleotídicos de longitud) sobre un sustrato. Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que comprenden bases de purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, química o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivadas. La estructura del polinucleótido puede comprender grupos de azúcares y fosfatos, como normalmente se pueden encontrar en el ARN o el ADN, o grupos de azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Por tanto, los términos nucleósido, nucleótido, desoxinucleósido y desoxinucleótido incluyen, en general, análogos tales como los descritos en el presente documento. Estos análogos son las moléculas que tienen algunas características estructurales en común con un nucleósido o nucleótido natural, de modo que, cuando se incorporan en una secuencia de ácido nucleico u oligonucleótido, permiten la hibridación con una secuencia de ácido nucleico en solución. Normalmente, estos análogos derivan de nucleósidos y nucleótidos naturales sustituyendo y/o modificando la base, la ribosa o el resto fosfodiéster. Los cambios se pueden adaptar para estabilizar o desestabilizar la formación de híbridos o potenciar la especificidad de la hibridación con una secuencia de ácido nucleico complementaria según se desee.

Como se usa en el presente documento "soporte sólido", "soporte" y "sustrato" se usan de forma intercambiable y se refieren a un material o grupo de materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. En muchas realizaciones, al menos una superficie del soporte sólido será sustancialmente plana, aunque en algunas realizaciones puede ser deseable separar físicamente las regiones de síntesis para diferentes compuestos con, por ejemplo, pocillos, regiones más elevadas, orificios, trenzas grabadas o similares. De acuerdo con otras realizaciones, el(los) soporte(s) sólido(s) tomarán la forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas.

De acuerdo con la presente invención se puede usar cualquier matriz de ácido nucleico conocido. Por ejemplo, dichas matrices incluyen las basadas en sondas oligonucleotídicas cortas o más largas, así como ADNc o productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (52). Otros métodos incluyen análisis en serie de la expresión génica (SAGE), visualización diferencial, (53) así como métodos de hibridación de sustracción (54), detección selectiva diferencial (DS), PCR-cebador arbitrario para ARN, análisis con endonucleasas de restricción de secuencias expresadas de forma diferencial (READS), polimorfismos de longitud del fragmento de restricción amplificado (AFLP).

"Condiciones de hibridación restrictivas" y "condiciones de lavado de hibridación restrictivas" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico, tales como hibridación Southern y Northern, son dependientes de secuencia y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH

definidos) a la que el 50% de una secuencia objetivo complementaria hibrida una sonda perfectamente apareada. La especificidad es típicamente la función de lavados de posthibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl, 1984; $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ forma}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de cationes divalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % de la forma 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 en aproximadamente un 1°C por cada 1% de desapareamiento; así, T_m , hibridación y/o condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $> 90\%$, la T_m se puede disminuir en 10°C . En general, las condiciones estrictas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica y su complementaria a un pH y fuerza iónica definidos. No obstante, las condiciones muy restrictivas pueden usar una hibridación y/o lavado a $1, 2, 3, \text{ o } 4^\circ\text{C}$ menos que el punto de fusión térmica; condiciones moderadamente restrictivas pueden usar una hibridación y/o lavado a $6, 7, 8, 9, \text{ o } 10^\circ\text{C}$ menos que el punto de fusión térmica; condiciones de rigurosidad baja pueden usar una hibridación y/o lavado a $11, 12, 13, 14, 15, \text{ o } 20^\circ\text{C}$ menos que punto de fusión térmica. Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y de lavado y la T deseada, los expertos en la técnica entenderán que se describen de forma inherente las variaciones en la rigurosidad de la hibridación y/o las soluciones de lavado. Si el grado deseado de desapareamiento erróneo da como resultado una T_m de menos de 45°C (solución acuosa) o de 32°C (solución de formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC de tal modo que pueda usarse una temperatura superior. En Tijssen, 1993 se encuentra una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos. En general, las condiciones de hibridación y de lavado muy restrictivas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos.

Un ejemplo de condiciones de lavado muy restrictivas es NaCl $0,15\text{ M}$ a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado con $0,2\text{X SSC}$ a 65°C durante 15 minutos (véase en 64 una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado muy riguroso viene precedido por un lavado poco riguroso para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1X SSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de rigurosidad baja para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es $4\text{-}6\text{X SSC}$ a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones restrictivas comprenden normalmente concentraciones de sales inferiores a aproximadamente $1,5\text{ M}$, más preferentemente de aproximadamente $0,01$ a $1,0\text{ M}$, concentraciones del ion Na (u otras sales) a pH de $7,0$ a $8,3$ y la temperatura suele ser de al menos aproximadamente 30°C y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, > 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una proporción señal-ruido de 2X (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación concreto indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

Se seleccionan condiciones muy restrictivas de modo que sean iguales a la T_f para una sonda concreta. Un ejemplo de condiciones restrictivas para hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o Northern es 50% de formamida, por ejemplo hibridación en 50% de formamida, NaCl 1M , SDS al 1% a 37°C y un lavado en $0,1\text{X SSC}$ a de 60 a 65°C . Ejemplos de condiciones de rigurosidad baja incluyen hibridación con una solución tampón de 30 a 35% de formamida, NaCl 1 M , 1% de SDS (dodecilsulfatosódico) a 37°C y un lavado en de 1X a 2X de SSC ($20\text{X SSC} = \text{NaCl } 3,0\text{ M}/\text{citratato trisódico } 0,3\text{ M}$) a $50 - 55^\circ\text{C}$. Ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen hibridación en 40 a 45% de formamida, NaCl $1,0\text{ M}$, 1% de SDS a 37°C y un lavado en $0,5\text{X}$ a 1X de SSC a $55 - 60^\circ\text{C}$.

El lavado con una solución que contiene cloruro de tetrametilamonio (TeMAC) podría permitir la detección de un solo desapareamiento usando hibridación de oligonucleótidos, ya que dicho desapareamiento podría generar una diferencia de 10°C en la temperatura de hibridación. La formulación para determinar la temperatura de lavado es $T_m (\text{C}) = -682 (L^{-1}) + 97$, en la que L representa la longitud del oligonucleótido que se usará para la hibridación. Cuando el oligonucleótido de la presente invención tiene una longitud de 20 nucleótidos: $5'\text{-TCACTGGTGGCAGTCCTGCT-}3'$ (SEC ID N° 2), en la que el subrayado indica la mutación, la hibridación se realiza 5°C por debajo de la T_m que se calcula usando la fórmula anterior a $6,29^\circ\text{C}$. En principio, un solo desapareamiento generará un descenso de 10°C en la hibridación, de modo que una temperatura de 57°C solo debería detectar mutantes que alojan la mutación de T. Dichas condiciones son condiciones de rigurosidad elevada adecuadas para identificar una mutación de un solo nucleótido en las sondas de 20 nucleótidos de la presente invención (56).

Como se usa en el presente documento el término "proteína represora", cuando se usa en relación con el sitio de tipo E2F de la región promotora PITX1 se refiere a cualquier proteína que, sola y/o en combinación con otras proteínas, disminuye o reprime la expresión de PITX1. Sin estar limitado, incluyen BCoR, PHB-1, PHB-2, combinaciones de los mismos y cualquier pareja de interacción de PHB-1, PHB-2 y/o BCoR incluidos los divulgados en la tabla 1 anterior. Como se usa en el presente documento, con la expresión "actividad de represión de BCoR en

PITX1" o "actividad de represión de PHB-1 en PITX1" o "actividad de represión de PHB-2 en PITX1" se quiere decir la actividad de cualquiera de las proteínas que lleva a la disminución de la expresión de PITX1.

5 Como se usa en el presente documento el término "complejo represor", cuando se usa en relación con el sitio de tipo E2F de la región promotora PITX1 se refiere a una combinación de proteínas represoras que disminuye o reprime la expresión de PITX1.

10 La presente invención también abarca matrices para detectar y/o cuantificar la localización nuclear de proteínas, incluyendo PHB-1, PHB-2 y/o BCoR. Dichas matrices incluyen micro o macromatrices de proteínas, tecnologías de gel, incluyendo las metodologías de gel 2D de alta resolución acopladas posiblemente con espectrometría de masas (55), sistema de imagen al nivel celular, tal como microscopia combinada con un sistema de marcaje fluorescente.

15 La presente invención también incluye el uso de biopsia tisular para determinar la acumulación nuclear de PHB-1, PHB-2 y BCoR dentro de los condrocitos articulares, condrocitos de la placa de crecimiento, osteoblastos, mioblastos esqueléticos y sinoviocitos. Por ejemplo, se podría realizar biopsia de cartílago durante un procedimiento de artroscopia para evaluar la OA o su progresión mediante microscopia de inmunofluorescencia para determinar la localización nuclear de PHB-1, PHB-2 y/o BCoR. Este método podría ser útil cuando, por ejemplo, se requiere un procedimiento de artroscopia para establecer un diagnóstico clínico. Como alternativa, se podría usar una biopsia muscular de las extremidades inferiores para analizar si PHB-1 y/o PHB-2 se han acumulado en los núcleos de los mioblastos. Este método sería, ventajosamente, menos invasivo que una artroscopia normal. La determinación de la localización o concentración celular de una proteína represora de PITX1 normalmente se realiza a) preparando un extracto nuclear de una muestra del sujeto y determinando la concentración de una proteína represora de PITX1 o (b) determinando la localización de la proteína represora de PITX1 mediante inmunohistoquímica.

25 De acuerdo con la presente invención, un incremento de la localización nuclear de la proteína represora de PITX1 en un sujeto puede ser el signo de un incremento de la unión/afinidad de la proteína represora en el sitio de tipo E2F de PITX1, de un incremento de la entrada/importe nuclear de la proteína represora o de una disminución de la exportación nuclear de la proteína represora. La presente invención se refiere también a métodos de seleccionar un compuesto. Por tanto, un compuesto analizado con realizaciones específicas de métodos de seleccionar compuestos de la presente invención que tiene como resultado de una disminución de la localización nuclear de la proteína represora de PITX1 puede ser un compuesto que disminuya la unión/afinidad de la proteína represora en el sitio de tipo E2F de PITX1, que disminuya la entrada/importe nuclear de la proteína represora o que incremente la exportación nuclear de la proteína represora.

35 La presente invención también abarca métodos de identificar mutación(es) específica(s) que afectan directa o indirectamente a la función de PHB-1 y/o PHB-2. Sin estar limitado así, las mutaciones de interés incluyen cualquier mutación que afecta al transporte de estas proteínas fuera del núcleo o la modificación de las interacciones entre PHB-1 y/o PHB-2.

40 Como se usa en el presente documento, el término "mutación que causa, directa o indirectamente, la acumulación o retención nuclear de PHB-1, PHB-2 o BCoR en células en las que PHB-1, PHB-2, BCoR o PITX1 se expresa de forma normal" se quiere decir que se refiere a, sin estar limitado así, una mutación dentro de la NES (secuencias de exportación nuclear) de PHB-1, PHB-2 o BCoR; una mutación que modula la formación de complejos homoméricos y heteroméricos entre PHB-1, BCoR y/o PHB-2 que tiene como resultado el enmascaramiento de sus NES
45 respectivas o la reducción de su accesibilidad a la exportina-1 (también conocida como CRM-1); una mutación que afecta la expresión y/o la función de la exportina-1; una mutación que afecta a la formación de un complejo ternario con CRM-1/exportina 1 y una forma unida a GTP de Ran en el núcleo; una mutación que afecta a la señalización de TGF- β , incluyendo una mutación que afecta a la unión de TGF- β con asporina, una proteína extracelular de cartílago elevada en el cartílago de OA; una mutación que afecta al reclutamiento de PHB-1 o PHB-2 de Brg-1/Brm en promotores que responden a E2F; una mutación que afecta a la capacidad de JNK1 para estimular la asociación de PHB-1 con Brg-1 o Brm sobre promotores que responden a E2F; una mutación que afecta a la unión de Akt a PHB-1-
50 PHB-2 o a la capacidad de Akt para entrar en el núcleo. También se refiere a cualquier mutación en moléculas que interaccionan con PHB-1, BCoR y/o PHB-2, que podrían prevenir la exportación nuclear de PHB-1 y/o PHB-2. La lista de parejas de interacción conocidas de PHB-1 y PHB-2 se indica en la tabla 1, pero no está limitada a las
55 moléculas indicadas en esta tabla 1.

Tabla 1: lista de proteínas que interaccionan con PHB-1 y/o PHB-2

PHB-1	PHB-2
AR(37)	Akt (38)
Brq-1 (39)	ER (40)
Brm(39)	HDAC1(41)
CRM-1(42)	HDAC5(41)

E2F1(4343)	NR2F1 (41)
ER (44)	NR2F2 (41)
HDAC1 (45)	PHB-1 (46)
HP1 (47)	
JNK1(47)	
MLK2(48)	
N-CoR (45)	
p53(49)	
PHB-2 (46)	
Raf (50)	
Rb (51)	

- Como se usa en el presente documento, la expresión "modificación postraduccional causante directa o indirectamente de la acumulación o retención nuclear de PHB-1, PHB-2 o BCoR en células en las que PHB-1, PHB-2, BCoR o PITX1 se expresan de forma normal" incluye, sin limitaciones, una modificación postraduccional que incluye fosforilación con cinasas tales como JNK1, tirosina cinasa tales como MTOR, PAK, EGFR y/o JAK, ubiquitinilación o sumoilación que modulan la formación de complejos homoméricos o heteroméricos entre PHB-1, PHB-2 y/o BCoR que tienen como resultado el enmascaramiento de sus respectivas NES o la reducción de su accesibilidad a la exportina-1.
- 5 Se divulga un kit para diagnosticar la OA y/o predecir si un sujeto está en riesgo de desarrollar OA, que comprende un ácido nucleico aislado, una proteína o un ligando, tal como un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un kit compartimentalizado de acuerdo con la presente invención incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en contenedores separados. Dichos contenedores incluyen contenedores pequeños de vidrio, contenedores de plástico o tiras de plástico o papel. Dichos contenedores permiten la eficiente transferencia de reactivos de un compartimento a otro compartimento de modo que las muestras y los reactivos no sufren contaminación cruzada y los agentes o soluciones de cada contenedor pueden añadirse de un modo cuantitativo de un compartimento a otro. Dichos contenedores incluirán un contenedor que aceptará la muestra del sujeto (ácido nucleico de ADn genómico, muestra celular o muestras de sangre), un contenedor que contiene en algunos kits de la presente invención las sondas usadas en los métodos de la presente invención, contenedores que contienen enzimas, contenedores que contienen reactivos de lavado y contenedores que contienen los reactivos usados para detectar los productos de extensión. También se divulga un kit que comprende los anticuerpos que son específicos de los represores de PITX1. Los kits pueden también contener instrucciones para usar estas sondas y/o anticuerpos para diagnosticar la OA o predecir si un sujeto está en riesgo de desarrollar OA.
- 10
15
20
25 Otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes a partir de la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones específicas de la misma, dadas únicamente en forma de ejemplos con referencias a las figuras anexas.

Breve descripción de los dibujos

30 En las figuras adjuntas:

La figura 1 muestra una histología ósea de un extremo distal del fémur derecho de ratón normal (wt) de 7 meses de edad y PITX1 +/- (ht). La tinción de Goldner muestra en verde los tejidos óseos y calcificados y en rojo las células de cartílago y de médula ósea. Una sección representativa del espesamiento óseo subcondral, cortical y trabecular observado en ratones PITX1 +/- (b) en comparación con los silvestres (a) A un aumento mayor se observa un sustancial incremento de la fibrilación y se observa calcificación en el cartílago articular de ratones heterocigotos (d) en comparación con los silvestres (c). Obsérvese que el aumento original de los pabeles (a) y (b) es x 5 y los paneles (c) y (d) es x 20.

La figura 2 compara la expresión de PITX1 en condrocitos articulares de pacientes con OA y los sujetos control equivalentes. (a) Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa para la expresión del gen PITX1 en condrocitos articulares humanos derivados de cartílago de rodilla de sujetos control (N, n = 4) y pacientes con osteoartritis (OA, n = 7). Se detectaron transcritos de ARNm específicos de PITX1 en todos los tejidos control (N1-N4). La pérdida de expresión del gen PITX1 se observó en todas las muestras de OA analizadas (OA1-OA7) y la expresión de β -actina se usó como control interno. La inmunodetección de proteínas PITX1 en tejidos de cartílago control (b) y de OA (c) humanos se realizó usando un anticuerpo específico contra la proteína PITX1 humana. En secciones de cartílago control (n = 8), la inmunoreactividad específica se demostró mediante tinción de marrón

intenso en el núcleo de los condrocitos de las zonas superficial y profunda (flecha). En el cartílago de OA (n = 8), solo unas pocas células se tiñeron específicamente para PITX1. Estas se localizaban principalmente en la capa superficial (flecha). La especificidad de la tinción se evaluó mediante omisión del anticuerpo principal y mediante sustitución del anticuerpo principal con IgG no inmunitaria (Nordic Immunology, Tilburg, Países Bajos) siguiendo el mismo protocolo experimental. No se observó tinción. (Aumento original x 20) (d) Puntuaciones celulares para condrocitos positivos para PITX1, que indica diferencias significativas entre OA y el cartílago normal (control) y entre las zonas profundas para cada tipo de cartílago, mediante prueba U de Mann-Whitney. Los valores son la media + SEM de 8 muestras normales y 8 muestras de OA.

La figura 3 muestra una alineación del sitio de unión del ADN de tipo E2F de PITX1 humano con los sitios E2F encontrados en los promotores de regulación del ciclo celular en mamíferos. La alineación de diferentes sitios de unión de E2F (núcleo de E2F) y la región de morfología de ciclina adyacente conservada (CHR) se encontró en el promotor de los genes implicados en la regulación del ciclo celular. Los sitios de E2F presentados son ADN Polα (SEC ID Nº 3); p107 (SEC ID Nº 4); Cdc2 (SEC ID Nº 5); Adeno E2a (SEC ID Nº 6); E2F-1 (SEQ ID NO: 7); H2A (SEC ID Nº 8); DHFR (SEC ID Nº 9); HsOrc1 (SEC ID Nº 10); c-Myc (SEC ID Nº 11); CycA (SEC ID Nº 12); Cdc25 (SEC ID Nº 13); TK (SEC ID Nº 14); B-Myb (SEC ID Nº 15); H PITX1 (SEC ID Nº 16). Las posiciones están indicadas y numeradas en función del inicio de la transcripción, mientras que Act y Rep indican un sitio de activación y uno de represión, respectivamente. Obsérvese que el elemento E2F encontrado en el promotor de PITX1 humano está más distal que los genes del ciclo celular habituales.

La figura 4 muestra un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforético (EMSA) de extractos nucleares preparados con condrocitos articulares de OA. EMSA representativos que usan la sonda silvestre (a) o la sonda mutante (b). Obsérvese que los intentos de desplazar los complejos unidos se realizaron con diferentes anticuerpos y la adición de anticuerpos anti-BCoR alteró parcialmente el complejo principal y generó una banda adicional que sugiere la presencia de BCoR en el complejo unido. (c) Autorradiografía de disociación representativa que muestra el efecto de la adición de oligonucleótido bicatenario no marcado correspondiente al sitio E2F encontrado en el promotor PITX1 humano como competidor sobre la unión del complejo E2F al sitio E2F silvestre radiomarcado (sonda silvestre) frente al sitio E2F mutante encontrado en los pacientes de OA (sonda mutante). Se añadió el oligonucleótido bicatenario competidor (exceso molar por 70) ($t = 0$) y se extrajeron alícuotas de las mezclas de reacción de desplazamiento por movilidad del gel a los tiempos indicados tras la adición. (d) La tasa de disociación del E2F silvestre y el sitio mutante (OA) se compararon contando directamente la radioactividad de cada complejo de E2F unido cortando las correspondientes bandas del gel seco. La semivida de la unión para experimentos de disociación se computó representando la desaparición del 50 % cuando se comparó con la unión inicial del complejo E2F. El gráfico representa el valor promedio de la semivida para el complejo de E2F.

La figura 5 muestra la caracterización *in vitro* e *in vivo* de las interacciones de PHB-1, PHB-2 y BCoR en condrocitos articulares de OA primaria. (a) Se realizó co-inmunoprecipitación con anti-PHB-1, anti-PHB-2 (como control interno) y anti-E2F1 e extractos nucleares de OA y normales obtenidos de cultivos de condrocitos articulares humanos primarios. La transferencia Western con anti-PHB-2 realizada muestra que la PHB-2 interacciona físicamente con PHB-1 y E2F1 solamente en extractos nucleares de OA. (b) Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y mostraron que PHB-1 y BCoR se co-localizan *in vivo* con el sitio E2F distal identificado en el promotor PITX1 humano. La amplificación de un fragmento de PCR de 372 pb se obtuvo con datos entrantes (control positivo) y tras inmunoprecipitación con anticuerpos anti-PHB-1 y anti-BCoR. La inmunoprecipitación con anti-E2F1 no generó una amplificación por PCR positiva, lo que indica que E2F1 no se co-localiza en el promotor de PITX1 con PHB-1 y BCoR a pesar del hecho de que PHB-2 puede interaccionar en solución con E2F1 en extractos nucleares de OA. El segundo carril representa un control negativo generado mediante omisión del anticuerpo primario durante la inmunoprecipitación (-Ab).

La figura 6 muestra inmunodetección de proteínas PHB-1 en cartílago articular humano. Los paneles a) y b) representan la sección de cartílago obtenida de sujetos control y de OA inmunotefidas, respectivamente con la proteína PHB-1 anti-humana (nº de cat. RB-292-PO, Lab Vision Corp., Fremont CA, EE.UU.). La señal nuclear para PHB-1 aumentó significativamente en las zonas superficial y profunda (flecha) solamente en el cartílago de OA (aumentos 10X y 40X). También se detectó una inmunotinción inespecífica con ECM en ambos grupos (normal y OA). (c) Puntuaciones celulares para condrocitos nucleares de PHB-1, que indican diferencias significativas entre OA y el cartílago normal (control) y entre las zonas para cada tipo de cartílago, mediante prueba U de Mann-Whitney. Los valores son la media + SEM de muestras normales (n=3) y de OA (n=3).

La figura 7 (tabla S2) muestra los resultados de secuenciación de los péptidos (SEC ID Nº 17-27) que identifican PHB-1, PHB-2 y BCoR como parte del complejo de represión que se une al sitio de tipo E2F-de PITX1.

La figura 8 muestra EMSA usando extracto nuclear total (solo o con anticuerpo de PHB-1 (Prohibitina Ab-2 (RB-292-P0) Lab Vision Corp., Fremont, CA)) y extracto nuclear deplecionado en PHB-1. El uso de un anticuerpo de PHB-1 no permitió ningún superdesplazamiento, pero la depleción de PHB-1 en extractos nucleares de OA anuló toda formación de complejos unidos a la sonda radiomarcada silvestre.

La figura 9 muestra un análisis de la expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de PHB2, PHB-1 y BCoR en

condrocitos articulares humanos (normal frente a OA).

La figura 10 muestra la localización nuclear de PHB-1 en un paciente de OA mediante inmunohistoquímica usando un anti-PHB-1 (Santa Cruz, sc-18196).

5 El panel superior izquierdo de la figura 11 muestra una transferencia western de PHB-1 expresada en el citoplasma (c) y el núcleo (n) de condrocitos articulares humanos de OA. El panel superior derecho muestra dos sitios de supuesta sumoilación próximos a una secuencia de exportación nuclear (SEC ID N° 68) encontrados en la proteína PHB-1 humana. El panel inferior muestra los dos sitios de supuesta sumoilación en las posiciones 202 (SEC ID N° 69) y 204 (SEC ID N° 70).

La figura 12 presenta la expresión proteica nuclear (n) y citoplásmica (c) de PHB-1 y Pan-SUMO en condrocitos articulares de pacientes con OA (C73 y C74) y de pacientes control (C75) analizados mediante transferencia Western. Se presentan 3 marcadores: Lamina (núcleo), GAPDH (citoplasma) y ATP-Sintasa (mitocondria).

La figura 13 presenta gráficamente la represión del promotor mir20a mediante los correpresores BCoR, PHB-1, PHB-2 y combinaciones de los mismos.

La figura 14 presenta gráficamente la represión del promotor del gen PITX1 humano mediante los correpresores BCoR, PHB-1, PHB-2 y combinaciones de los mismos.

La figura 15 muestra la secuencia de una región promotora de PITX1 de 10 kb (SEC ID N° 28) y polimorfismos en dicha región promotora de PITX1 entre sujetos humanos. Los cebadores usados para cubrir los diferentes amplicones para cubrir las regiones de 10 kb se proporcionan en la tabla 2 siguiente.

La figura 16 muestra el nucleótido de ARNm de la PHB-1 humana (obtenido de gi|6031190|ref|NM_002634.2) (SEC ID N1 29) y la secuencia de aminoácidos (obtenida de gi|4505773|ref|NP_002625.1) (SEC ID N° 30).

La figura 17 muestra el nucleótido de ARNm de la PHB-2 humana (obtenido de >gi|31543548|ref|NM_007273.3) (SEC ID N° 31) y la secuencia de aminoácidos (obtenida de gi|6005854|ref|NP_009204.1) (SEC ID N° 32).

La figura 18 muestra a) una secuencia que comprende 30 pb cadena arriba y 30 pb cadena debajo de la mutación C a T encontrada en el promotor de PITX1 humano (SEC ID N° 1); b) fragmento nucleotídico que muestra sitios de restricción que rodean el sitio de tipo E2F de PITX1 silvestre (SEC ID N° 16) y (SEC ID N°: 33); y c) fragmento nucleotídico que muestra sitios de restricción que rodean el sitio de tipo E2F de PITX1 humano mutado de OA (SEC ID N° 2) y (SEC ID N.º: 34).

Descripción de realizaciones ilustrativas

El solicitante observó una correlación entre la acumulación de PHB-1, PHB-2 y BCoR en los núcleos de los condrocitos articulares y la OA.

La presente invención se ilustra con detalles adicionales mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ratones

Los ratones PITX1 +/- se prepararon como se ha indicado anteriormente (65).

Muestras humanas

Se recogieron tejidos humanos con el consentimiento de los pacientes. El Comité de Ética Institucional de los hospitales de Sainte Justine y Notre Dame Hospitals en Montreal, Canadá aprobó el protocolo del estudio. Todos los sujetos de OA (n=58), RA (n=39) y control (n=18) se evaluaron por un reumatólogo certificado según los criterios de OA del Subcomité diagnóstico del Colegio Americano de Reumatología (25). De ellos, 93 pacientes (43 OA, 39 RA y 11 controles sanos) se usaron para el estudio genético. Otros pacientes (OA y controles) se usaron para análisis EMSA, análisis de expresión o estudios de inmunohistoquímica usando secciones de cartílago.

Cultivos de condrocitos articulares

El cartílago se seccionó de la meseta tibial, se lavó, se cortó finalmente y las células se liberaron mediante digestión enzimática realizada como se ha descrito anteriormente (26).

Las células se sembraron en matraces de cultivo Falcon a densidad alta (10^8 células por matraz de 175 cm²) y se cultivaron hasta confluencia en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canadá) que contiene 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (FCS; Hyclone, Logan, UT) y 1% de penicilina / estreptomycin (Gibco BRL). Solo se usaron las células cultivadas de primer pase. El análisis de expresión se realizó

usando ARN preparado de cartílago articular aislado de pacientes de OA y sujetos control de edad y sexo equivalentes.

Aislamiento del ARN total y RT-PCR

5 El ARN total se preparó mediante extracción en fenol/cloroformo. Para la RT-PCR, 2 µg de ARN total se sometieron a transcripción inversa usando la transcriptasa inversa ThermoScript™ (Invitrogen), y el equivalente de 0,1 µg de ARN sometido a transcripción inversa se usó para las reacciones de PCR. Estas se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl que contienen dNTP 200 micromolar, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pM de cada cebador y 1U de Pfx ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron usando los siguientes cebadores y condiciones: PITX1 humano (960-pb, producto de PCR), cebador directo 5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3' (SEC ID N° 35); cebador inverso 5'-GTCAGCTGTTGTAAGGACTT-3' (SEC ID N° 36) (35 ciclos: 94°C/45 segundos, 65°C/45 segundos, 68°C/1 minuto), β-actina humana (233-pb, producto de PCR), cebador directo 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3' (SEC ID N° 37), cebador inverso 5'-TCATGATGGAGTTGAATGT AGTT-3' (SEC ID N° 38) (32 ciclos: 94°C/1 minuto, 55°C/1 minuto, 72 °C/1 minuto), PHB2 humana (730-pb, producto de PCR), cebador directo 5'-GCCCAGAACTTGAAGGACTT-3' (SEC ID N° 39); cebador inverso 5'-TCTTGCTCAGTGCTTCTCCA-3' (SEC ID N° 40) (30 ciclos: 94°C/45 segundos, 66°C/45 segundos, 72°C/1 minuto), PHB-1 humana (546-pb, producto de PCR), cebador directo 5'-AGTATGTGTGGTTGGGAAT-3' (SEC ID N° 41); cebador inverso 5'-GCTCGCTCTGTAAGGTCGTC-3' (SEC ID N° 42) (30 ciclos: 94°C/45 segundos, 65°C/45 segundos, 72°C/1 minuto) y BCoR humano (640-pb, producto de PCR), cebador directo 5'-*AAAGAGCCGGATCGCAGG-3' (SEC ID N° 43); cebador inverso 5'-CACCATTTGATGTTGAGAGGGC-3' (SEC ID N° 44) (35 ciclos: 94°C/45 segundos, 72°C/45 segundos, 72°C/1 minuto). Para análisis cuantitativo y semicuantitativo, todas las amplificaciones se normalizaron contra el gen doméstico de la β-actina. El producto amplificado por PCR se separó en gel de agarosa al 1,5 % (1,0 % para análisis semicuantitativo) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio.

Secuenciación del promotor de PITX1

30 Cien (100) ng de ADN genómico se mezcló en un volumen final de 25 µl que contiene dNTP 200 micromolar, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pM de cada cebador (véase la tabla 2 siguiente para una lista completa de los cebadores usados) y 1U de Pfx ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron usando las siguientes condiciones (35 ciclos: 94°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, 68°C/1 minuto 20 segundos) y cebadores.

Tabla 2: cebadores del promotor de PITX

PP1 (962 pb)	cebador directo 5'-CTGTTTGTCTCAAGACGCTGA-3' (SEC ID N° 45) cebador inverso 5'-CTCGGCCTCACAAAAGAAAC-3' (SEC ID N° 46)
PP2 (966 pb)	cebador directo 5'-CTGTCTGCATTCAGGCTGTTC-3' (SEC ID N° 47) cebador inverso 5'-GATTCCCTCCTCGAGTCCTT-3' (SEC ID N° 48)
PP3 (1039 pb)	cebador directo 5'-CAAGTGAGCTGGATGCTGAA-3' (SEC ID N° 49) cebador inverso 5'-AGGGAGTGCCCTTACAGA-3' (SEC ID N° 50)
PP4 (1085 pb)	cebador directo 5'-GCTCAGCCATTCTCAGGAAC-3' (SEC ID N° 51) cebador inverso 5'-GCCATTGTCCCAGTCAAGAT-3' (SEC ID N° 52)
PP5 (1011 pb)	cebador directo 5'-TCGCGTCAAGAGGGTATTTT-3' (SEC ID N° 53) cebador inverso 5'-TAGGACCCATGGCTCTACCC-3' (SEC ID N° 54)
PP6 (1098 pb)	cebador directo 5'-CACGAGTCAGGTGGGAAACT-3' (SEC ID N° 55) cebador inverso 5'-GACGTCTGCTGCTTTTCTGC-3' (SEC ID N° 56)
PP7 (963 pb)	cebador directo 5'-AGGCACGGACTAGCAGGAC-3' (SEC ID N° 57) cebador inverso 5'-ATGCGGACGAAGCCAGAG-3' (SEC ID N° 58)
PP8 (986 pb)	cebador directo 5'-TTAGCATTACGCCCTCTGT-3' (SEC ID N° 59) cebador inverso 5'-TTCATGAGATGCAGTCAGCAG-3' (SEC ID N° 60)
PP9 (951 pb)	cebador directo 5'-ACAACTGGTAGGGGCAACAG-3' (SEC ID N° 61) cebador inverso 5'-TGTGTGGCTTTGGCAAATAA-3' (SEC ID N° 62)
PP10 (990 pb)	cebador directo 5'-GCACTGTGCTCCAAGTGTGT-3' (SEC ID N° 63) cebador inverso 5'-GGGGGAGTGTCTTTTCTT-3' (SEC ID N° 64)

Ensayos de inmunohistoquímica

Los ensayos de IHQ para PITX1 se realizaron usando secciones de cartílago obtenidos de 8 pacientes con OA (2 varones y 6 mujeres, 59± 10 años, media ± SEM) sometidos a sustitución total de rodilla, y de 8 donantes sin antecedentes conocidos de trastornos de las articulaciones. Estos tejidos se obtuvieron posmortem de cóndilos de rodilla en las 24 horas posteriores a la muerte (2 varones y seis mujeres de 67±8 años, media ± SEM). Para ensayos de IHQ con el anticuerpo frente a PHB-1, el cartílago se obtuvo de 3 pacientes con OA (61 ± 8 años, media ± SEM) y 3 pacientes control (57 ± 28 años, media ± SEM). Las muestras de tejido se incluyeron en parafina, se seccionaron y analizaron mediante IHQ para PITX1 o PHB-1 (y se realizó contratincción con hematoxilina para experimentos por PHB-1). La gravedad de la OA se evaluó anteriormente en secciones adyacentes usando la escala histológica/histoquímica de Mankin (27).

Extracción de proteína nuclear y EMSA

Para la extracción de proteínas nucleares, las células se lavaron con 1X PBS frío y se rasparon en un tampón que contiene hepes 10 mM (pH 7,9), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, 1% de NP40, DTT 0,5 mM, PMSF 1mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina y 10 µg/ml de pepstatina. Se dejaron en hielo durante 10-20 minutos mientras se mezclaron regularmente usando un vórtex. Tras una centrifugación de 3 minutos a 3.000 rpm, el sedimento se suspendió en un tampón que contiene hepes 20 mM (pH 7,9), 25 % de glicerol, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDRA 0,2 Mm. DTT 0,5 mM, PMSF 2mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina y 10 µg/ml de pepstatina. Tras una incubación de 20 minutos en hielo y una centrifugación de 2 minutos a 12500 rpm se recogió el sobrenadante.

Para el análisis de los complejos de ADN de E2F formados en presencia de condrocitos articulares de OA se realizaron reacciones de desplazamiento de movilidad de gel esencialmente como se ha descrito anteriormente (28). Los extractos nucleares (5 µg de proteínas) se incubaron durante 30 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 20-25 °C en 20 µl de una solución que contiene HEPES 20 mM (pH 7,5), KCl 40 mM, glicerol al 5 %, espermidina 5 mM y 100 ng de poli(dA-dT) y 4 µg de anticuerpos anti-BCoR (Abcam, ab5276) se añadieron a muestras específicas (con un signo +). Después se añadieron las sondas siguientes y se incubaron durante otros 30 minutos a T ambiente: silvestre 5'-CTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAA-3' (SEC ID N° 65); y mutante 5'-CTGTGCCTCACTGGTGGCAGTCCTGCTCAA-3' (SEC ID N° 66). Después, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida nativa al 7 % (acrilamida:bis 29:1 en 0,5 x Tris-borato EDTA). Los geles se pasaron a 180 V durante 3 h con una bomba de recirculación para el tampón y un tanque de enfriamiento.

En presencia de la sonda radiomarcada (14 ng/100.000 cpm) se añadió un competidor en frío tal como se ha indicado. Para el análisis de superdesplazamiento, los extractos nucleares se pre-incubaron durante 30 minutos en hielo, después se incubaron en presencia de anticuerpos frente a E2F (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.; enumerados en la tabla 3 siguiente) y se incubaron en hielo durante 1 hora.

Tabla 3: lista de anticuerpos usados

Anticuerpos usados para los resultados presentados en la figura 4:	
E2F1	(KH95, sc-251 X) Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA, USA
E2F3	(C-18, sc-878 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
E2F4	(A20, sc-1082 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
E2F5	(C-20, sc-1083) X Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
E2F6	(K-20, sc-8176 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
DP1	(K-20, sc-610 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Sp1	(1C6, sc-420 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Sp3	(D-20, sc-644 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
BCoR	(ab5276) Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
RXRα	(D-20, sc-553 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Otros no mostrados:	
E2F1	(H-137, sc-22820 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
E2F2	(L-20, sc-632 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
E2F3	(N-20, sc-879 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
E2F8	(H00079733-M01) Abnova Corporation, Taipei, Taiwan
DP-2	(C-20, sc-829 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Sp1	(H-225, sc-14027 X) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
-----	---

Las secuencias de las sondas oligonucleotídicas fueron: de tipo E2F (silvestre) 5'-CTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAA-3' (SEC ID N° 65); y de sitio mutante similar a E2F (OA) 5'-CTGTGCCTCACTGGTGGCAGTCCTGCTCAA-3' (SEC ID N° 66). Después, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida nativa al 7 % (acrilamida:bis 29:1 en 0,5 x Tris-borato EDTA). Los geles se pasaron a 180 V durante 3 h con una bomba de recirculación para el tampón y un tanque de enfriamiento. Para el análisis de la tasa de disociación se añadió un exceso de 70 del oligonucleótido competidor no marcado correspondiente al sitio de E2F silvestre encontrado en el promotor PITX1 humano tras 30 minutos de incubación en hielo con cualquier sonda marcada. Las alícuotas de la misma mezcla de unión se tomaron a diferentes tiempos y se congelaron en hielo seco para detener la reacción antes de cargar en el gel.

Precipitación de complejos nucleares por avance de ADN

Los extractos nucleares (300 mg de proteína) preparados de condrocitos articulares de OA humanos cultivados de articulaciones de rodilla se incubaron inicialmente en presencia de 25 ml de suspensión espesa de perlas magnéticas con estreptavidina (BioClone Inc. San Diego, CA, EE.UU.) con el fin de eliminar las interacciones proteicas inespecíficas. Tras ello, se incubaron extractos nucleares pre-lavados con 5 mg de sonda ds biotinilada (5'-CTGTGCCTCACTGGTGGCAGTCCTGCTCAA-3' (SEC ID N° 66)) durante 2 horas a 4 °C con agitación lenta en tampón de unión 1X EMSA. Se añadieron 50 ml de suspensión espesa de perlas magnéticas con estreptavidina y, tras 1 hora de incubación a 4 °C, los complejos unidos se recuperaron usando un pie magnético y varios lavados de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después, los complejos se desprendieron de las perlas en una mezcla de ebullición de tampón de carga de NuPAGE™ 4x LDS (Invitrogen) y β-mercaptoetanol. Tras la centrifugación, el sobrenadante se cargó en un gel de SDS-PAGE y se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie.

Co-inmunoprecipitación

Extractos nucleares y citoplásmicos obtenidos de condrocitos de pacientes normales u OA se incubaron durante la noche con anticuerpos anti-PHB-1 (Santa Cruz, sc-18196); Las proteínas inmunoprecipitadas se recogieron usando perlas de proteína A-sefarosa. 50 µg de proteínas se cargaron y pasaron por SDS-PAGE. Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100V durante 70 minutos. Para transferencia se usaron anticuerpos anti-PHB-1 de conejo (Santa Cruz, sc-28259) en una dilución de 15:10000.

Transfección

Se siguió el protocolo para Lipofectamine™ 2000 de Invitrogen (www.invitrogen.com): Todas las cantidades y volúmenes se dan por pocillo. Se usó una proporción de ADN (µg) y Lipofectamine™ 2000 (µl) de 1:2 a 1:3. Las células se transfectaron a una densidad celular elevada para obtener una eficiencia alta, niveles de expresión altos y para minimizar la citotoxicidad. Un día antes de la transfección se sembraron $0,5-2 \times 10^5$ células en 500 µl de medio de crecimiento sin antibióticos de modo que las células llegaran a un 90-95% de confluencia en el momento de la transfección. Para cada muestra de transfección, los complejos se prepararon del siguiente modo: a. el ADN se diluyó en 50 µl de medio de suero Opti-MEM® I reducido sin suero y se mezclaron suavemente. Lipofectamine™ 2000 se mezcló suavemente antes de usar, después se diluyó la cantidad adecuada en 50 µl de medio Opti-MEM® I y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación de 5 minutos, el ADN diluido se combinó con Lipofectamine™ 2000 diluida (volumen total= 100 µl), se mezcló suavemente y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los 100 µl de complejos se añadieron a cada pocillo que contiene células y medio. La placa se mezcló suavemente mediante balanceo hacia delante y hacia detrás. Las células se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ durante 18-48 horas antes de analizar la expresión del transgén.

Análisis de secuenciación peptídica

Las bandas que contenían proteínas del ensayo de avance de ADN y EMSA se cortaron, se lavaron, se laminaron, se secaron y se rehidrataron en tampón de bicarbonato amónico. Las proteínas se digirieron con tripsina y se extrajeron de las piezas de gel usando 50 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico. Las muestras se evaporaron hasta sequedad y se resuspendieron en 3 % de acetonitrilo-0,1 % de ácido fórmico en un volumen final de 20 µl.

Análisis por espectroscopia de masas

Las muestras (volumen de 10 µl) se analizaron usando un sistema de CL-EM/EM consistente en un sistema de cromatografía de líquidos en nanofluido Agilent™ 1100 Series y espectrómetro de masas con trampa de iones 1100 Series LC MSD SL (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Los péptidos se enriquecieron en una columna de atrapamiento Zorbax™ 300SB-C18 (5 µm, 5 x 0,3 mm) y se separaron mediante fase inversa en una columna analítica Zorbax™ 300SB-C18 (3,5 µm, 150 x 0,075 mm, Agilent) con un gradiente de 5-90% de acetonitrilo en 0,1 % de ácido fórmico a un caudal de 300 nl/min. El eluyente de la columna se roció directamente en el espectrómetro de

masas. Los espectros se interpretaron usando el software Spectrum Mill™ (Agilent) y la base de datos del NCBI NR de mamíferos.

Parámetros de extracción con el software Spectrum Mill™

5 Modificación de cisteína: carbamidometilación; longitud de la marca de secuencia > 1; intervalo de masas de los iones precursores: 600,0 a 4000,0 Da; intervalo del tiempo de barrido: 0 a 300 minutos; los barridos se fusionaron para el mismo precursor m/z: +/- 15 segundos; +/- 1,4 m/z.

10 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

El experimento CHIP se llevó a cabo con el kit ChIP-IT™ kit (Active Motif, Carlsbad, CA, EE.UU) ChIP-IT™ kit. En pocas palabras, las células se reticularon con 1 % de formaldehído y se recogieron en solución de raspado celular. Después se realizó la extracción nuclear usando tampón de lisis y el ADN total se sometió a cizalladura hasta una longitud aproximada de 0,3-1,5 kb (Branson Sonifier™ 450). La cromatina se lavó previamente con perlas de Proteína G y se separó del siguiente modo: entradas totales, control negativo sin anticuerpo y CHIP con anticuerpos anti-PHB-1 (Santa Cruz), anti-BCoR (Abcam) o anti-E2F1 (Santa Cruz). Tras una incubación durante la noche con el anticuerpo adecuado se añadieron las perlas de proteína G y se realizaron varios lavados cuidadosamente. La cromatina se eluyó de las perlas usando tampón de elución CHIP. Se realizó la inversión de reticulación mediante calentamiento de las muestras a 65 °C durante 4 horas y el ADN se purificó usando las columnas proporcionadas en el kit. El análisis mediante PCR se realizó usando los siguientes cebadores y condiciones: Promotor de PITX1 humano que aloja el sitio E2F (372-pb, producto de PCR), cebador directo 5'-GCTCAGCCATTCTCAGGAAC-3' (SEC ID N° 51); cebador inverso 5'-CCACCTACCTCTTTCTGCCT-3' (SEC ID N° 67) (35 ciclos: 94 °C/45 segundos, 68 °C/45 segundos, 68 °C/1 minuto).

25 Análisis estadístico

Los intervalos de confianza del 95% para sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo presentados en la tabla 4 se calcularon de acuerdo con Deeks y Altman (29). La asociación entre la presencia de mutación y el diagnóstico se evaluó usando la prueba exacta de Fisher (prueba de dos colas). Un valor de P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 1

35 Comparación de la expresión de PITX1 en condrocitos articulares de sujetos con OA con la de los condrocitos articulares de controles equivalentes

Se realizó un análisis de la expresión del gen PITX1 determinando si PITX1 desempeña un papel en el control genético del inicio de la OA usando ARN preparado de cultivos de condrocitos articulares derivados de cartílago de rodilla de pacientes con OA (n = 7) y de sujetos control de edad y sexo equivalentes (n = 4). La expresión de PITX1 se detectó solamente en condrocitos articulares derivados de controles equivalentes, mientras que en condrocitos articulares de OA, la expresión de PITX1 se anuló o era escasamente detectable por RT-PCR (figura 2a). El análisis de los niveles de proteína PITX1 y su distribución en las secciones de la articulación de rodilla humana mostró las proteínas de PITX1 solamente en los cartílagos control (n = 8), mientras que las proteínas PITX1 apenas se detectaron en secciones de cartílago de OA (n = 8) (figura 2bcd).

Ejemplo 2

Identificación de la mutación del promotor PITX1

50 Analizando los mecanismos que desactivan la expresión del gen PITX1 en pacientes con OA, la región reguladora en 5' del gen PITX1 humano se analizó detectando mutaciones específicas que conducen a una pérdida progresiva de expresión de PITX1 durante la edad adulta. El análisis de la secuencia del ADN genómico obtenido de sujetos de OA, artritis reumatoide (RA) y control equivalentes reveló, junto con la región promotora de 10 kb del gen PITX1 humano, una única mutación homocigótica (-3727 C→T) (la posición corresponde a la distancia desde el punto de transcripción) que solo afecta a pacientes de OA (11/43) con una frecuencia alta (25 %), mientras que ninguno de los pacientes de RA (0/29) y de los sujetos control equivalentes (0/11) tenía la mutación homocigótica. La especificidad, los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos de la mutación se calcularon para cada grupo como se indicó en la tabla 4 más adelante. Se calculó una asociación estadísticamente significativa entre la mutación y el diagnóstico (prueba de dos colas) comparando pacientes de OA frente a RA (p = 0,002) o combinando los sujetos con RA y control (p < 0,001). La mutación heterocigótica estaba presente en pacientes con OA (3/43), sujetos de RA (6/29) y sujetos control (3/11), aunque la asociación entre la mutación heterocigótica y el diagnóstico no era estadísticamente significativo (p = 0,14 para OA frente a RA y p = 0,09 para OA frente al control).

65 TABLA 4: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo* (PPV) y valor predictivo negativo** (NPV) de la mutación PITX1 (-3727 C→T) para OA

Mutación	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Homocigótica				
OA-Control	25,6 (13,8-39,5)	100,0 (71,5-100,0)	100,0 (71,5-100,0)	25,6 (13,8-39,5)
OA-RA		100,0 (88,1-100,0)	100,0 (71,5-100,0)	
OA-(Control y RA)		100,0 (97,6-100,0)	100,0 (71,5-100,0)	47,5 (35,2-60,0)
				55,6 (44,0-66,8)
Heterocigótica				
OA-Control	7,0 (1,4-16,4)	72,7 (39,0-94,0)		
OA-RA		79,3 (60,3-92,0)		
OA-(Control y RA)		77,5 (63,4-88,9)		

El análisis de la secuencia promotora realizado con el programa de búsqueda ALGGEN PROMO™ (usando la versión 8.3 de TRANSFAC™; (35, 36) reveló que la mutación homocigótica se localizaba dentro del núcleo de un sitio de tipo E2F (10, 11). La secuencia abarca el sitio de tipo E2F encontrada cadena arriba del gen PITX1 humano está más distal, aunque muestra un solapamiento con varios sitios de E2F funcionales y también con una región adyacente denominada región de homología de ciclina (CHR) encontrada en el promotor de los genes implicados en la regulación del ciclo celular 12 (figura 3). La relación transcripcional entre PITX1 y E2Fs está reforzada además por los trabajos de Muller y cols. que muestra que E2F1, E2F2 y E2F3 regulan por aumento la expresión de PITX1 varias veces en la línea celular de osteosarcoma U2OS (13). Hasta la fecha, se han clonado ocho E2F diferentes de mamífero; cada una de ellas puede heterodimerizar con las proteínas DP1 o DP2/3 y se unen con una afinidad similar al mismo conjunto de sitios objetivo (14). Estos factores podrían dividirse ampliamente en dos clases: activadores (E2F1-3) y represores (E2F4-8) de la transcripción (15), que podría explicar por qué los sitios E2F en un promotor no siempre indican que están inducidos por E2F sino que, por el contrario, pueden reprimirse a través de dichos sitios también (16-18).

Ejemplo 3

Determinación de las consecuencias funcionales de la mutación en el sitio de tipo E2F en la unión del complejo

Determinando las consecuencias funcionales de la mutación homocigótica encontrada en pacientes de OA, se investigó si los E2F podían unirse a este sitio de tipo E2F usando extractos nucleares preparados con condrocitos articulares de OA como se ha descrito anteriormente. Los análisis EMSA usando sitios de tipo E2F radiomarcados (silvestre, figura 4a frente a la mutante, figura 4b) no mostraron superdesplazamiento del complejo unido con cualquier anticuerpo contra E2F o sus parejas de dimerización DP-1 o DP-2 (E2F2, E2F8 y DP2, datos no mostrados). Los factores de transcripción Sp1 y Sp3 también se analizaron, ya que se unen a regiones ricas en GC, tal como el sitio de tipo E2F encontrado en el promotor PITX1 humano. Por desgracia, no se produjo ningún superdesplazamiento con anticuerpos anti-Sp1 o anti-Sp3. La adición de anticuerpos BCoR generaron la unión de un complejo inferior adicional unido en presencia de las sondas, aunque la unión aumentó con el mutante, como es evidente en la comparación de las calles 4 a 6. El análisis funcional mediante EMSA reveló una tasa de disociación más lenta cuando el complejo se unió a la sonda E2F mutante, que indica que la mutación C→T aumentaba la estabilidad del complejo unido.

Ejemplo 4

Identificación de BCoR como miembro del complejo represor de PITX1

Con el fin de caracterizar la naturaleza del complejo identificado en el ejemplo 3 se cortaron las bandas correspondientes al complejo unido y se extrajeron de un gel húmedo de EMSA efectuando un análisis de secuenciación peptídica combinado con una espectrometría de masas en tándem.

Este experimento condujo a la identificación de péptidos correspondientes a BCoR, un correpresor conocido (Véase la figura 7). La presencia de BCoR en el complejo unido se confirmó también mediante la detección de una banda inferior adicional en el EMSA cuando se añadieron anticuerpos de BCoR (véase el ejemplo 3 y la figura 4a, 4b).

Ejemplo 5

Identificación de PHB-1 y PHB-2 como miembros del complejo represor de PITX1

Se usó un método de avance de ADN como se ha descrito antes, con un oligonucleótido bicatenario biotinilado que aloja el sitio de tipo E2F mutante permitiendo la identificación de los péptidos correspondientes a la prohibitina (PHB-

1) y la prohibitona (PHB-2) (figura 7). Para confirmar la presencia de PHB-1 en el complejo unido se realizó inmunodepleción de PHB-1 en extractos nucleares preparados de condrocitos articulares de OA y no se observó unión en EMSA con extractos nucleares con depleción de PHB-1 usando las sondas radiomarcadas (figura 8).

5 **Ejemplo 6**

Identificación de la localización en el núcleo de PHB-1 y PHB-2 en condrocitos articulares de OA y normales

10 La localización celular de PHB-1 se comparó en los condrocitos articulares normales y de OA mediante ensayos de IHQ usando anticuerpos anti-PHB-1. Como se puede ver en la figura 6, se observó un incremento de la localización nuclear de PHB-1 en cartílagos de PA en comparación con los cartílagos control de edad equivalente. Véase también la figura 10 para un aumento mayor usando diferentes anticuerpos anti-PHB-1. La localización celular de PHB-2 se comparó en los condrocitos articulares normales y de OA mediante ensayos de IHQ usando anticuerpos anti-PHB-2.

15 **Ejemplo 7**

Ensayo de co-inmunoprecipitación de PHB-1, PHB-2 y E2F1

20 El ensayo de co-inmunoprecipitación de PHB-1, PHB-2 y E2F1 se realizó como se ha descrito anteriormente. Las interacciones físicas entre PHB-1, PHB-2 y E2F1 se detectaron en extractos nucleares preparados a partir de condrocitos articulares humanos de OA, mientras que los controles no mostraron ninguna interacción con PHB-2 (figura 5a).

25 **Ejemplo 8**

Ensayo en chip para demostrar la funcionalidad del sitio EF2 en condrocitos de OA y coocupación de PHB-1 y BCoR

30 Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron como se ha descrito anteriormente con los cultivos de condrocitos articulares de OA primaria analizando la co-ocupación de PHB-1, BCoR y E2F1 sobre el elemento respondedor de E2F identificado en el promotor PITX1 humano. PHB-1 y BCoR se colocalizaban solo *in vivo* en los condrocitos de OA, lo que confirma también la funcionalidad y especificidad de este sitio de E2F, aunque no se detectó E2F1 (figura 5b). No obstante, la interacción no dependía de la mutación -3727 C→T, dado que el silvestre también interactúa con el complejo represor.

35 **Ejemplo 9**

Identificación de la mutación homocigótica -3727 C a T en una muestra del sujeto

40 El ADN genómico se aísla (directamente usando kits comerciales disponibles o tras la extracción de los linfocitos) de la saliva o la sangre del sujeto. La región promotora de PITX1 humana que aloja la mutación homocigótica -3727 C→T se amplifica después mediante PCR usando cebadores específicos. Los productos amplificados se identifican mediante secuenciación directa usando el ADN genómico extraído de linfocitos. También se pueden digerir con las enzimas de restricción Acil o Fnu4H detectando la presencia de la mutación. Dado que la sustitución de C por T en
45 pacientes de OA anula los sitios de restricción Acil y Fnu4HI habitualmente presentes e la secuencia silvestre, la presencia de la mutación se evalúa por la ausencia de fragmentos de restricción relevantes.

Ejemplo 10

50 Ensayo para identificar los niveles de concentración en sangre y sinovial de PHB-1, PHB-2 o antagonistas peptídicos nativos de PHB-1 de la superficie celular en los sujetos

PHB-1 y PHB-2 también se encuentran en la circulación sanguínea (Mishra y cols. 2006). La obesidad inducida con dieta se invirtió con éxito en ratones por inyección subcutánea de un péptido proapoptótico quimérico que se une a
55 PHB-1 en la superficie de la célula de la vasculatura de grasa blanca (57). El péptido cortó el suministro de sangre al tejido graso que conduce a su reabsorción. La mayoría de los pacientes con OA son obesos. La dosificación de PHB-1 en fluidos biológicos como plasma/suero, orina o fluidos sinoviales se realiza usando un método de ELISA (véase, por ejemplo, 58).

60 **Ejemplo 11**

Ensayo para identificar los niveles de ARN de PHB-1, PHB-2 y BCoR entre condrocitos articulares humanos normales y de OA

65 El análisis de expresión se realizó como se ha descrito anteriormente mediante RT-PCR semicuantitativa de PHB2, PHB-1 y BCoR en condrocitos articulares humanos (normal frente a OA); El ARN se extrajo de 4 pacientes normales

y 10 pacientes con OA. No se observaron cambios significativos entre los condrocitos articulares normales y de OA, como se puede ver en la figura 9.

Ejemplo 12

5 Detección de bandas inmunorreactivas de PHB-1 en núcleo y citoplasma de fracciones de condrocitos articulares humanos de sujetos con OA

El ensayo de co-inmunoprecipitación de PHB-1 se realizó como se ha descrito anteriormente.

10 La detección usando un anticuerpo anti-PHB-1 reveló (panel superior izquierdo de la figura 11) una banda inmunorreactiva de PHB-1 mayoritaria de 32 kDa, que corresponde al peso molecular de la PHB-1 sola. Las bandas inmunorreactivas de PHB-1 de peso molécula mayor sugieren modificaciones postraduccionales de PHB-1 que modifican su peso.

15 En la figura 11 se detecta un patrón de bandas de peso molecular mayor en su mayoría en la fracción nuclear de pacientes con OA. Este patrón no se encuentra en la fracción nuclear del sujeto control.

Ejemplo 13

20 Comparación de la sumoilación de PHB-1 entre los condrocitos articulares humanos normales y de OA

La sumoilación es la unión de una o más proteínas pequeñas de 12kDa, designadas SUMO, a otra proteína. Las proteínas SUMO conducirán a un perfil escalonado de la proteína a la que se están uniendo en una transferencia western. Por tanto, se comprobó si la hipótesis de que el escalonado de las bandas inmunorreactivas de OHB-1 observadas en la figura 11 se debía a la sumoilación.

30 SUMOsp (SUMOsp: servidor web para la predicción del sitio de sumoilación. Yu Xue, Fengfeng Zhou, Chuanhai Fu, Ying Xu, and Xuebiao Yao. Nucl Acids Res 34: W254-W257, 2006.) predijo que la PHB-1 contiene dos sitios de supuesta sumoilación cerca de una secuencia de exportación nuclear (NES), es decir en las posiciones 204 y 240. El panel superior derecho de la figura 11 presenta la posición de estos supuestos sitios y la secuencia de la NES (SEC ID N° 68). La tabla en el panel inferior de la figura 11 presenta las secuencias de estos sitios, es decir 202 (SEC ID N° 69) y 240 (SEC ID N° 70).

35 Las proteínas totales de las fracciones nuclear y citoplásmica de condrocitos articulares de pacientes de OA (C73 y C74) y pacientes control de edad equivalente (C75) se analizaron después mediante transferencia Western contra PHB-1 y Pan-SUMO. Se cargaron y pasaron por SDS-PAGE. Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF a 100V durante 70 minutos. Los 3 marcadores usados, es decir lamina (núcleo), GAPDH (citoplasma) y ATP-Sintasa (mitocondria), muestran que la muestra se ha separado de un modo eficaz en una fracción nuclear (X-N) y una fracción citoplásmica (Cyto). Estos anticuerpos se usaron para transferencia: anti-PHB-1 (Santa Cruz, sc-28259), anticuerpos Pan SUMO (ABGENT, AP1299a), anti-Lamina A/C (Cell Signaling, n.º 2032), anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-20357) y anti-F1-ATPasa (Santa Cruz, sc-16689).

45 Las bandas inmunorreactivas Pan-SUMO de la figura 12 revelan proteínas (diferentes proteínas o una sola proteína) modificadas mediante la unión de una o más proteínas SUMO, como reflejan las bandas con pesos moleculares crecientes.

50 La figura 12 muestra que los dos sujetos con OA tienen el mismo patrón de sumoilación en la fracción nuclear y que este patrón está ausente del sujeto control. Las flechas (excepto las bandas de 32 kDa) apuntan a bandas que son inmunorreactivas a PHB-1 y PAN SUMO y se detectan en la fracción nuclear de los sujetos con OA, pero no en la fracción nuclear control. Estos resultados sugieren que la sumoilación contribuye a la localización nuclear de PHB-1 en pacientes de OA.

55 Clínicamente, esto sugiere que el incremento de la sumoilación es el acontecimiento principal que conduce a la acumulación nuclear de PHB-1 y la represión de PITX1 en la OA primaria. Las consecuencias biológicas de la sumoilación incluyen el incremento de la estabilidad proteica, incremento de las proteínas como objetivo (incluyendo factores de transcripción) desde el citoplasma hasta el núcleo, regula las actividades de transcripción de las proteínas, media en la unión de la proteína a otras proteínas e incrementa la actividad represora de ciertos factores de transcripción. Estudios recientes han relacionado la sumoilación de varias proteínas con enfermedades importantes (enfermedades neurodegenerativas, leucemia promielocítica aguda, diabetes de tipo 1 y otros trastornos). La regulación de estas modificaciones postraduccionales puede proporcionar nuevos objetivos para intervención quirúrgica en varias enfermedades humanas.

65 PHB-1 es una molécula que tiene un peso molecular inferior a 50kDa y puede penetrar de forma pasiva en el núcleo de la célula. En sujetos normales, la PHB-1 se exporta rápidamente fuera del núcleo celular a través del sistema de exportina mediante el reconocimiento de una señal de exportación del núcleo (NES). Sin quedar limitado por dicha

hipótesis, la proximidad de los 2 supuestos sitios de sumoilación a la NES podría contribuir a la retención nuclear de PHB-1 en sujetos con OA escondiendo la NES y, de este modo, previniendo el reconocimiento de la PHB-1 por la exportina.

5 **Ejemplo 14**

Determinación de la represión del promotor mir20a mediante los correpresores PHB-1, PHB-2, BCoR y combinaciones de los mismos

10 Las células MG-63 se transfectaron como se ha descrito anteriormente con Lipofectamine™ 2000 durante 6 horas. Tras la transfección se añadió medio fresco a las células durante 24 horas y se añadió a las células 4-OH-tamoxifeno 10^{-7} M 4 durante 24 horas.

15 Después se realizó el ensayo de la luciferasa. Los resultados se presentan en la figura 13. Los resultados se expresan mediante la multiplicación de la inducción de la señal de la luciferasa de la construcción indicadora en comparación con la de un control. La actividad de la luciferasa control (CTRL) se midió en células MG-63 osteoblásticas cotransfeccionadas con el promotor indicador de mir20A, que se sabe que está regulada por E2F, de Sylvestre Y y cols. Vactores 2007, pBAPE-ER y pLPC NEP-Flag. El E2F1 era la condición en la que las células se co-transfeccionaban con vector de sobreexpresión de E2F1-ER. Toda señal de luciferasa se normalizó mediante un vector indicador beta-gal. El eje X representa los nombres de cada represor co-sobreexpresado en las condiciones analizadas. Este ensayo de transfección transitoria muestra que BCoR solo o en combinación con PHB-1 (designado PHB en la figura 13) y/o PHB-2 es suficiente para reprimir la inducción de una construcción indicadora de E2F como mir20a, incluso en presencia del agonista de E2F1 mir20a.

25 **Ejemplo 15**

Determinación de la represión del promotor PITX1 mediante los correpresores PHB-1, PHB-2, BCoR y combinaciones de los mismos

30 Las células MG-63 se transfeccionaron como se ha descrito anteriormente con un vector que contiene 3000 o 2000 pb del promotor del gen PITX1 cadena arriba de un gen de la luciferasa de luciérnaga, Las células se sincronizaron 16 h mediante inanición de suero. Se añadió suero fresco durante 48 horas y se realizó en ensayo de la luciferasa. La señal de la luciferasa se normalizó contra beta-gal. Los resultados se expresan mediante las veces que se induce la señal de la luciferasa en comparación con una señal de luciferasa de un vector vacío. Los resultados se presentan en la figura 14. Estos resultados muestran la represión dirigida cuando BCoR, PHB-1 y PHB2 se combinan usando un fragmento del promotor de PITX1 humano (fragmento -3000 pb). Esto demuestra la actividad represora de este complejo. Sin quedar ligado a esta hipótesis, se sugiere que más de un sitio de tipo E2F puede estar presente en el gen PITX1.

40 **Ejemplo 16**

Análisis de la interacción Prohibitina-CRM-1 en condrocitos articulares normales y de OA

45 La interacción física de PHB-1 con CRM-1 se mide mediante ensayos co-IP como se ha descrito anteriormente, mientras que la transferencia Western con anticuerpos anti-CRM-1 (Santa Cruz) se realiza con extractos nucleares preparados con condrocitos articulares normales y con OA evaluando los cambios en los niveles de CRM-1 en células de cartilago normal frente a OA. En paralelo, la funcionalidad de CRM-1 se analiza mediante un método de inmunotinción. Las células son no tratadas o tratadas con camptotecina 30 μ M (Sigma) durante 4 horas, un inhibidor de la topoisomerasa I que estimula la exportación nuclear de PHB-1 a través de un mecanismo dependiente de CRM-1. La localización subcelular de p53 se usa como control interno, dado que p53 normalmente se colocaliza con PHB-1 y migra hacia el citoplasma tras el tratamiento con camptotecina. Las células se fijan en 4 % de PFA durante 5 minutos y se bloquean en 5 % de BSA en tampón PBS a TA durante 1 hora, seguido de incubaciones con el anticuerpo principal durante la noche a 4 °C, Después de lavar, se realiza la incubación del anticuerpo secundario con IgG Alexa™ Fluor-488 (verde) anti-ratón de cabra y IgG Alexa™ Fluor-546 (rojo) anti-conejo de cabra durante 55 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se visualizaron con un microscopio confocal Zeiss™ LSM 510. Por último, la contribución de la señalización de TGF- β para la exportación nuclear de PHB-1 se investiga, ya que se indicó que el TGF- β 1 media en la exportación nuclear de PHB-1 en una línea celular de cáncer de próstata.

60 **Ejemplo 17**

Estudios de asociación genética de OA

65 El genotipado de la (-3727 C→T) encontrado en el promotor del gen PITX1 humano se realiza en una cohorte grande que actualmente comprende gene 1.400 casos (510 varones y 890 mujeres) y 750 controles (350 mujeres y 400 varones) bien caracterizada. Los casos han sufrido cada uno cirugía programada de sustitución de articulación (de cadera o de rodilla) debido a OA primaria grave en estado final. Los controles no tienen síntomas de OA ni de

ninguna otra enfermedad musculoesquelética. Los casos y los controles tienen todos 45 años o más, no son familiares y son de origen caucásico del Reino Unido. El ADN de los casos y los controles se dispone en placas de microtitulación de 96 pocillos a concentraciones de 100 ng/μl y 10 ng/μl. Los resultados se analizan en función de las diferencias en el genotipo o de las frecuencias de los alelos entre los casos de OA y los controles. Los casos se clasifican por sexo, edad, articulación sustituida o por sexo combinados con articulación sustituida o edad combinada con articulación sustituida.

La asociación genética y el equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución de genotipos se analizan mediante análisis χ^2 con corrección de Yates. Los cocientes de probabilidades se calculan con intervalos de confianza del 95 por ciento. El coeficiente de desequilibrio del enlace pareado (r^2)² se calcula usando el programa GOLD™(59). Las frecuencias de los haplotipos entre variantes que muestran evidencia de desequilibrio del enlace a $r^2 > 0,2$ se estiman usando el programa EH-PLUS™ (60). Las diferencias en la frecuencia del haplotipo se comparan después usando χ^2 .

15 Ejemplo 13

Caracterización de los factores nucleares conocidos que interactúan con PHB-1 y/o PHB-2

Cabe esperar que existan parejas de PHB-1 y PHB-2, ya que no hay indicaciones en la literatura de que cualquier molécula se pueda unir directamente al ADN ejerciendo su represión transcripcional. Se demostró que la prohibitina recluta Brg-1/Brm a los promotores respondedores a E2F y que este reclutamiento se requiere para la represión de la transcripción mediada por E2F mediante PHB-1. Aunque la PHB-1 se asocia y recluta Brg-1 y Brm de forma independiente de pRb, la represión transcripcional mediada por prohibitina/Brg-1/Brm requiere pRb. La represión transcripcional mediada por PHB-1 y PHB-2 requirió también actividad de histona-desacetilasa (HDAC1), pero, al contrario que pRb, también están implicados correpresores adicionales como N-CoR (24,41). Además, la PHB-2 también se asocia con la histona-desacetilasa de clase II HDAC5. Por último, se comunicó que la PHB-2 interactúa específicamente con los factores de transcripción de unión a la ovoalbúmina de pollo cadena arriba I y II (COUP-TFI y COUP-TF-II). Se descubrió que el factor de transcripción I de unión a la ovoalbúmina de pollo cadena arriba del receptor nuclear colabora con la PHB-2 y las histonadesacetilasas en la represión de los genes objetivo. Por tanto, parece que PHB-1 y PHB-2 reprimen la transcripción mediada por E2F usando diferentes mediadores moleculares y facilitan la formación de canales de vías de señalización específicas a la maquinaria del ciclo celular.

Se está investigando si la represión de PITX1 está mediada por el reclutamiento de Brg-1/Brm a este sitio de E2F. La contribución de las histonas desacetilasas (HDACs) específicas también se está investigando. Analizando si Brg-1, Brm y prohibitina interactúan físicamente con los extractos nucleares de OA se llevan a cabo estudios de co-inmunoprecipitación usando extractos nucleares de condrocitos articulares de OA, que contienen PHB-1 y PHB-2 de forma endógena. Después se realiza inmunoprecipitación con anticuerpos anti-cmyc (control negativo), anti-Brg-1 o anti-Brm y las proteínas precipitadas se someten después a inmunotransferencia para PHB-1 o PHB-2. Los condrocitos articulares normales obtenidos de sujetos control o adquiridos (PromoCell) se analiza en paralelo como controles negativos. Los controles positivos se generan con el uso de anticuerpos anti-E2F1, anti-E2F2 y anti-E2F3, ya que el ARNm de E2F1 y E2F3 se detectó en condrocitos articulares normales y de OA.

El mismo abordaje se usa determinando si parejas conocidas adicionales de [PHB-1 y PHB-2 están presentes en el complejo represor detectado en los pacientes de OA (las proteínas candidatas se indican en la tabla 1 anterior). Notablemente, la presencia de pRb o de uno de los miembros de su familia (p107 y p130) se investigan ya que se demostró que la represión transcripcional mediada por prohibitina/Brg-1/Brm requería pRb. Evaluando si la PHB-1 se co-localiza *in vivo* con Brg-1 y Brm con el elemento respondedor de E2F encontrado en el promotor PITX1 humano se realiza inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) usando anticuerpos anti-Brg-1 y anti-Brm. Los ensayos CHIP se realizan con condrocitos articulares de OA derivados de al menos diez pacientes distintos de OA de acuerdo con las especificaciones del fabricante (ActiveMotif, Carlsbad CA, EE.UU.). Los cultivos de condrocitos articulares se obtienen de distintos pacientes de OA con el fin de investigar su estos factores y el mecanismo de represión se encuentran predominantemente únicamente en una subpoblación específica de pacientes de OA o si se conservan entre todos los pacientes de OA primarios (excluyendo la OA secundaria de la articulación de la rodilla). La presencia de la mutación se determina mediante secuenciación directa de la región promotora que aloja el sitio de tipo E2F para cada sujeto de OA y control, evaluando si la mutación observada en el promotor de PITX1 humano tiene efectos en el reclutamiento de diferentes parejas de interacción nuclear. También se está investigando si pRb o uno de los miembros de su familia (p107 y p-130) también se recluta *in vivo* con Brg-1 y Brm. Los experimentos control se llevan a cabo en paralelo con condrocitos articulares humanos normales usando anticuerpos anti-E2F1, anti E2F-2 y anti-E2F3 como controles positivos demostrando que este sitio E2F también está sometido a una regulación transcripcional positiva por E2F en células de cartílago normal. Los controles negativos serán proporcionados por anticuerpos anti-PHB-1 y anti-PHB-2.

65 Ejemplo 18

Determinación de los mecanismos que modulan las interacciones de prohibitivas con Brg-1/Brm en la OA

Varios informes han mostrado que JNK1 estimula la asociación de PHB-1 con Brg-1 o Brm con los promotores respondedores a E2F y reprimen la actividad transcripcional de E2F. El hallazgo de que JNK1 fosforila PHB-1 (*in vitro*) y regula las asociaciones de prohibitina/Brg1/Brm *in vivo* añade ahora un potencial enlace mecanístico analizable a esta vía. Además, PHB-1 interacciona con MLK2, una pareja de unión, activador y sustrato de JNK1. Determinando si JNK1 podría afectar a la asociación física entre PHB-1 y Brg-1/Brm, se usan métodos de co-IP con cultivos de condrocitos articulares normales y de OA sin tratar o tratados con 100 µM de SP600125, un inhibidor específico de JNK1 durante dos horas (Stressgene Bioreagents, Ann Arbor, MI, USA). El efecto de JNK1 sobre el reclutamiento de PHB-1, PHB-2, Brg-1 y Brm sobre el sitio E2F endógeno y mutante en el promotor PITX1 humano se analiza después mediante ensayos CHIP.

La localización subcelular de Akt se compara en condrocitos normales y de OA mediante métodos IHQ, así como mediante análisis de transferencia Western con los correspondientes extractos citoplásmicos y nucleares. La detección de Akt y fosfo-Akt (pAkt) se realiza con anticuerpos específicos (Santa Cruz). En caso de que se detecte predominantemente Akt citoplasmático en células de OA, la fosforilación de Akt se estimulan añadiendo dosis fisiológicas de 17-β-estradiol (10⁻¹⁰M, Sigma) , ya que se ha indicado que la estimulación estrogénica estimulando la acumulación de actividad Akt en el núcleo (61).

Las parejas de interacción adicionales de PHB-1 y PHB-2, tales como HDAC1 y HDAC5 se analizan, mientras que otras se determinan mediante el método de avance del ADN. El análisis de las proteínas en complejo se lleva a cabo mediante secuenciación peptídica acoplada con la espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente. El papel de los estrógenos en la activación de Akt y la localización nuclear es de interés en la patogenia de la OA porque la OA afecta más a las mujeres posmenopáusicas que a los varones con más de 65 años de edad.

25 Ejemplo 19

Determinación de las modificaciones postraduccionales que enmascaran/interfieren con la NES de PHB-1

Existen pruebas de que PHB-1 y PHB-2 pueden sufrir una modificación postraduccional, tal como fosforilación y ubiquitinación, pero el papel de las modificaciones postraduccionales en la modulación de varias funciones de las prohibitinas todavía se tiene que determinar. El análisis *in-silico* reveló que la NES de PHB-1 se puede fosforilar por tirosina cinasas, MTOR, PAK, EGFR y JAK. El efecto de las cinasas individuales se analiza añadiendo inhibidores específicos de cinasas a las células antes de analizar la interacción de PHB-1 con CRM-1 como se ha descrito anteriormente.

Si la NES de PHB-1 es un sustrato de una cinasa desconocida o cualquier otra acción enzimática que reduzca su interacción con CRM-1 también se analiza. Un péptido correspondiente al NES de PHB-1 se sintetiza y conjuga con un péptido vehículo, penetratin™ (Q-Biogene), para liberación dentro de las células (citoplasma y núcleo). El efecto de liberar este péptido sobre la exportación nuclear de PHB-1 se evalúa mediante experimentos de inmunofluorescencia doble. Los cambios conformacionales en los heterodímeros u homodímeros PHB-1-PHB-2 también se analizan por análisis de reticulación y transferencia de tipo western.

Referencias

- 45 1. Loughlin, J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 111-116 (2001).
2. Spector, T.D. & MacGregor, A.J. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis. Cartilage.* 12 Suppl A, S39-S44 (2004).
- 50 3. Peach, C.A., Carr, A.J., & Loughlin, J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol. Med.* 11, 186-191 (2005).
4. Reginato, A.M. & Olsen, B.R. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res.* 4, 337-345 (2002).
- 55 5. Loughlin, J. Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17, 629-633 (2005).
- 60 6. Drouin, J., Lanctôt, C., & Tremblay, J.J. La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *Médecine/Sciences* 14, 335-339 (1998).
7. Drouin, J., Lamolet, B., Lamonerie, T., Lanctôt, C., & Tremblay, J.J. The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol. Cell Endocrinol.* 140, 31-36 (1998).
- 65 8. Lanctôt, C., Lamolet, B., & Drouin, J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124, 2807-2817 (1997).

9. Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., & Drouin,J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 126, 1805-1810 (1999).
- 5 10. Messeguer,X. y cols. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*. 18, 333-334 (2002).
11. Farre,D. y cols. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 31, 3651-3653 (2003).
- 10 12. Tommasi,S. & Pfeifer,G.P. Constitutive protection of E2F recognition sequences in the human thymidine kinase promoter during cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 272, 30483-30490 (1997).
13. Muller,H. y cols. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* 15, 267-285 (2001).
- 15 14. Zheng,N., Fraenkel,E., Pabo,C.O., & Pavletich,N.P. Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev.* 13, 666-674 (1999).
- 20 15. Takahashi,Y., Rayman,J.B., & Dynlacht,B.D. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14, 804-816 (2000).
16. Bremner,R. y cols. Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins. *Mol. Cell Biol.* 15, 3256-3265 (1995).
- 25 17. Hamel,P.A., Gill,R.M., Phillips,R.A., & Gallie,B.L. Transcriptional repression of the E2-containing promoters EllaE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol. Cell Biol.* 12, 3431-3438 (1992).
18. Lam,E.W. & Watson,R.J. An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *EMBO J* 12, 2705-2713 (1993).
- 30 19. McClung,J.K., Jupe,E.R., Liu,X.T., & Dell'Orco,R.T. Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Exp. Gerontol.* 30, 99-124 (1995).
- 35 20. Dell'Orco,R.T., McClung,J.K., Jupe,E.R., & Liu,X.T. Prohibitin and the senescent phenotype. *Exp. Gerontol.* 31, 245-252 (1996).
21. Rastogi,S. y cols. Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol. Cell Biol.* 26, 4161-4171 (2006).
- 40 22. Campisi,J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11, S27-S31 (2001).
23. Martin,J.A. & Buckwalter,J.A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2, 106-110 (2003).
- 45 24. Wang,S., Fusaro,G., Padmanabhan,J., & Chellappan,S.P. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 21, 8388-8396 (2002).
25. Altman,R. y cols. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 29, 1039-1049 (1986).
- 50 26. Roy-Beaudry,M. y cols. Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. *Arthritis Rheum.* 48, 2855-2864 (2003).
- 55 27. Mankin,H.J., Dorfman,H., Lippiello,L., & Zarins,A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* 53, 523-537 (1971).
- 60 28. Moreau,A., Yotov,W.V., Glorieux,F.H., & St Amand,R. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide- associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol. Cell Biol.* 18, 1312-1321 (1998).
29. Deeks,J.J. & Altman,D.G. Sensitivity and specificity and their confidence intervals cannot exceed 100%. *BMJ* 318, 193-194 (1999).
- 65

30. Mishra S., Murphy L.C., The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med.* 10(2): 353-63 (2006).
- 5 31. Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1):143-155.
32. Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, Murphy LJ. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* 2005; 11 (4):192-197.
- 10 33. Lawrence RC, Hochberg MC, Kelsey JL, McDuffie FC, Medsger TA Jr, Felts WR, y cols. Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol* 1989;16:427-41.
34. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343-55.
- 15 35. Xavier Messeguer, Ruth Escudero, Domènec Farré, Oscar Nuñez, Javier Martinez, M.Mar Albà. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18, 2, 333-334, 2002;
- 20 36. Domènec Farré, Romà Roset, Mario Huerta, José E. Adsuara, Llorenç Roselló, M.Mar Albà, Xavier Messeguer. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res*, 31, 13, 3651-3653, 2003.
37. Gamble SC, Odontiadis M, Waxman J y cols. Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene* 2004; 23(17):2996-3004.
- 25 38. Sun L, Liu L, Yang XJ, Wu Z. Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 14):3021-3029.
- 30 39. Wang S, Zhang B, Faller DV. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J* 2002; 21 (12):3019-3028.
40. Montano MM, Ekena K, age-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6947-6952.
- 35 41. Kurtev V, Margueron R, Kroboth K, Ogris E, Cavailles V, Seiser C. Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem* 2004; 279(23):24834-24843.
- 40 42. Rastogi S, Joshi B, Fusaro G, Chellappan S. Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2006: 281 (5):2951-2959.
43. Wang S, Nath N, Fusaro G, Chellappan S. Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol* 1999; 19(11):7447-7460.
- 45 44. Wang S, Zhang B, Faller DV. BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists. *EMBO J* 2004; 23(11):2293-2303.
45. Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, Chellappan SP. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 2002; 21 (55):8388-8396.
- 50 46. Bacher S, Achatz G, Schmitz ML, Lamers MC. Prohibitin and prohibitone are contained in high-molecular weight complexes and interact with alpha-actinin and annexin A2. *Biochimie* 2002; 84:1205-1218.
- 55 47. Rastogi S, Joshi B, Dasgupta P, Morris M, Wright K, Chellappan S. Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol Cell Biol* 2006; 26(11):4161-4171.
48. Rasmussen RK, Ji H, Eddes JS y cols. Two-dimensional electrophoretic analysis of mixed lineage kinase 2 N-terminal domain binding proteins. *Electrophoresis* 1998; 19(5):809-817.
- 60 49. Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2003; 278(48):47853-47861.
- 65 50. Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V y cols. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol* 2005; 7(8):837-843.

51. Wang S, Nath N, Adlam M, Chellappan S. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 1999; 18(23):3501-3510.
52. Lyons P., 2003. Advances in spotted microarray resources for expression profiling. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2, 21-30.
53. Ding G. and Cantor C.R., 2004. Quantitative analysis of nucleic acids - the last few years of progress. *J Biochem Biol* 37, 1-10.
- 10 54. Scheel J., Von Brevem M.C., Horlein A., Fisher A., Schneider A., Bach A. 2002. Yellow pages to the transcriptome. *Pharmacogenomics* 3, 791-807.
- 15 55. Lopez M.F., Pluskal M.G., 2003. Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. *J Chromatography B* 787, 19-27.
56. Wood, W.I. y cols. 1985. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex gene library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82. 1585-1588.
- 20 57. Kolonin y cols. 2006., *Nature Medicine* Advance online publication of June issue.
58. United States Patent 5,401,635.
59. Abecasis GR, Cookson WO., 2000. GOLD--graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics* 16:182-3.
- 25 60. Ott, J. 2002. Predicting the range of linkage disequilibrium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 2-3.
61. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A y cols. Myocardial Akt activation and gender: increased Nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 2001; 88(10):1020-1027.
- 30 62. Miller, 1988. *Ann. Reports Med. Chem.* 23:295.
63. Moran y cols., 1987. *Nucleic Acids Res.*, 14:5019.
- 35 64. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).
65. Lanctot y cols., 1999. *Development* 126, 1805-1810.

REIVINDICACIONES

1. Un método de predecir el riesgo de desarrollar osteoartritis, que comprende:

5 determinar la concentración nuclear de una proteína o complejo represor de PITX1 seleccionada del grupo consistente en prohibitina (PHB-1), prohibitona (PHB-2), correpresor de interacción del represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR), complejo que contiene PHB-1, complejo que contiene PHB-2 y complejo que contiene BCoR en una muestra celular del sujeto seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos del esqueleto y una muestra de sinoviocitos, y

determinar si la concentración nuclear de la proteína o complejo represor es mayor en la muestra celular del sujeto en comparación con la de una muestra celular control;

15 en el que la concentración nuclear de una proteína o complejo represor en la muestra celular del sujeto es indicativa de que el sujeto está en riesgo de desarrollar osteoartritis.

2. Un método de predecir el riesgo de desarrollar osteoartritis, que comprende:

20 (a) identificar un sujeto que se sospecha que sufre osteoartritis (OA); y

(b) detectar la concentración en sangre, la concentración tisular o la concentración en el fluido sinovial de una proteína o complejo represor de PITX1 seleccionada del grupo consistente en prohibitina (PHB-1), prohibitona (PHB-2), correpresor de interacción del represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR), complejo que contiene PHB-1, complejo que contiene PHB-2 y complejo que contiene BCoR en una muestra de sangre, una biopsia tisular o una muestra de fluido sinovial del sujeto.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la osteoartritis se selecciona del grupo consistente en artritis de la articulación de la rodilla, artritis de la articulación de la cadera y artritis de las articulaciones temporo-mandibulares.

4. El método de seleccionar un compuesto, en el que dicho método comprende:

35 (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una muestra celular seleccionada del grupo consistente en una muestra de condrocitos articulares, una muestra de condrocitos de la placa de crecimiento, una muestra de osteoblastos, una muestra de mioblastos esqueléticos y una muestra de sinoviocitos, y

(b) determinar la localización nuclear de la proteína o complejo represor de PITX1 o evaluar la sumoilación de una proteína o complejo represor de PITX1 o medir la unión de una proteína o complejo represor de PITX1 sobre el sitio de tipo E2F de PITX1 en la muestra celular, en la que dicha proteína o complejo represor de PITX1 se selecciona del grupo consistente en prohibitina (PHB-1), prohibitona (PHB-2), correpresor de interacción del represor transcripcional 6 del linfoma de linfocitos B (BCoR), complejo que contiene PHB-1, complejo que contiene PHB-2 y complejo que contiene BCoR;

45 en el que el compuesto de prueba se selecciona si 1) la localización nuclear de la proteína o complejo represor de PITX1 en la muestra celular está disminuida en presencia del compuesto de prueba en comparación con en ausencia del mismo; 2) la sumoilación de la proteína o complejo represor de PITX1 en la muestra celular está disminuida en presencia del compuesto de prueba en comparación con en ausencia del mismo; o 3) la unión de la proteína o complejo represor de PITX1 en el sitio de tipo E2F de PITX1 en la muestra celular está disminuida en presencia del compuesto de prueba en comparación con en ausencia del mismo.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el compuesto de prueba seleccionado es potencialmente útil en impedir acumulación o retención de la proteína o el complejo represor de PITX1 en núcleos celulares o en estimular la exportación nuclear de la proteína o complejo represor de PITX1.

55 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la proteína o complejo represor de PITX1 comprende prohibitina (PHB-1) y preferentemente en el que la proteína represora es PHB-1.

60 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la proteína o complejo represor de PITX1 comprende prohibitona (PHB-2) y preferentemente en el que la proteína represora es PHB-2.

65 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la proteína o complejo represor de PITX1 comprende el correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 del linfoma de células B (BCoR) y preferentemente en el que la proteína represora es BCoR.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-8, en el que dicha muestra celular es de un sujeto que

padece osteoartritis.

5 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-9, en el que dicha muestra celular es una muestra de condrocitos articulares, preferentemente de un sujeto que tiene osteoartritis en una articulación de la rodilla, una articulación de la cadera o una articulación temporo-mandibular.

10 11. Un método *in vitro* para predecir el riesgo de desarrollar osteoartritis que comprende detectar en un sujeto la presencia de al menos una modificación postraducciona directa o indirectamente causante de la acumulación o retención nuclear de prohibitina (PHB-1), de prohibitona (PHB-2) o del correpresor de interacción con el represor transcripcional 6 de linfocitos B (BCoR) en células en las que PHB-1, PHB-2, BCoR o PITX1 se expresan de forma normal, en el que la presencia de la al menos una modificación postraducciona es una indicación de que el sujeto tiene osteoartritis o está en riesgo de desarrollar osteoartritis,

15 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho método comprende detectar en un sujeto la presencia de al menos una modificación postraducciona que causa directa o indirectamente la acumulación o retención nuclear de la prohibitina (PHB-1).

13. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que dicha modificación postraducciona es la sumoilación.



Pitx1 +/+

FIG. 1A



FIG. 1B



Pitx1 +/-

FIG. 1C



FIG. 1D

N1 N2 N3 N4 OA1 OA2 OA3 OA4 OA5 OA6 OA7



FIG. 2A



FIG. 2B

FIG. 2C

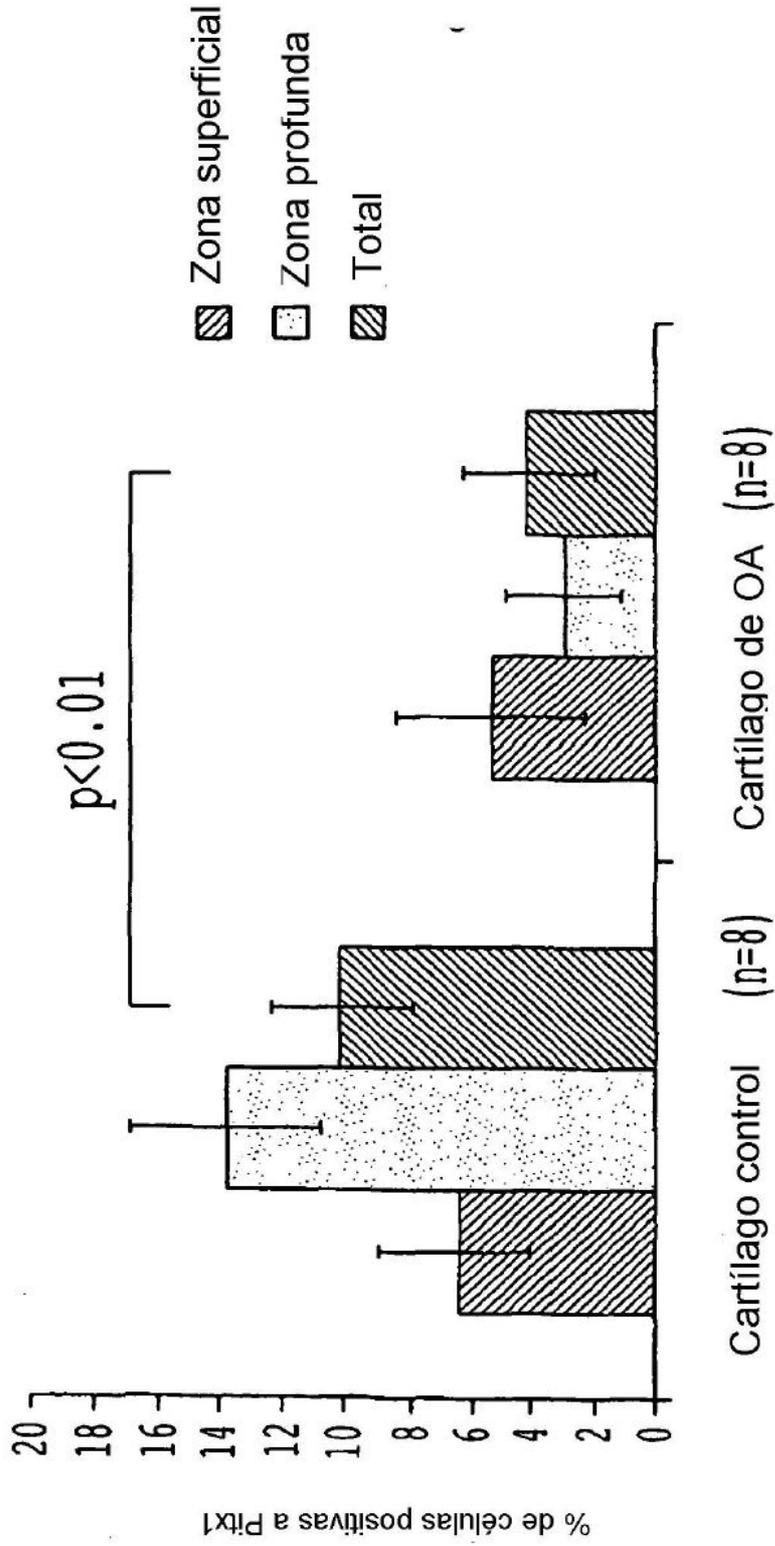


Fig. 20

	E2F core	CHR	
DNA Pol α	CGTTGGCGCC----TGTGAT		-143 Act
p107	ATTTTCGGCGC----TTTGGC		-1 Rep
Cdc2	TTTAGCGCGGT--GAGTTTGAA		-8 Rep
Adeno E2a	GTTTTCGGCGT-TAAATTTGAG		-49 Act
E2F-1	GATTGGCGCG-TAAAACTGCC		+5 Rep
H2A	TTTTTCGGCGCCAA-TAGTGT		-31 Act
DHFR	AAATTCGGCGC--AAACTTGGG		+18 Act
HsOrc1	AACTTCGGCGC----AATCGCC		-14 Rep
c-Myc	TTTTTCCCGCCAAGCCTCTGAG		-77 Act
CycA	ATAGTCGCGG--GATACTTGAA		-22 Rep
Cdc25	GGGCTGGCGGA--AGGTTTGAA		-2 Rep
TK	GACCTGGCGGG--AGATTTGCC		-106 Act
B-Myb	CACTTGGCGGG--AGATAGGAA		-32 Rep
hPitx1	TCACTGGCGGC--AGTCCTGCT		-3715 Act/Rep

* ** *

FIG. 3

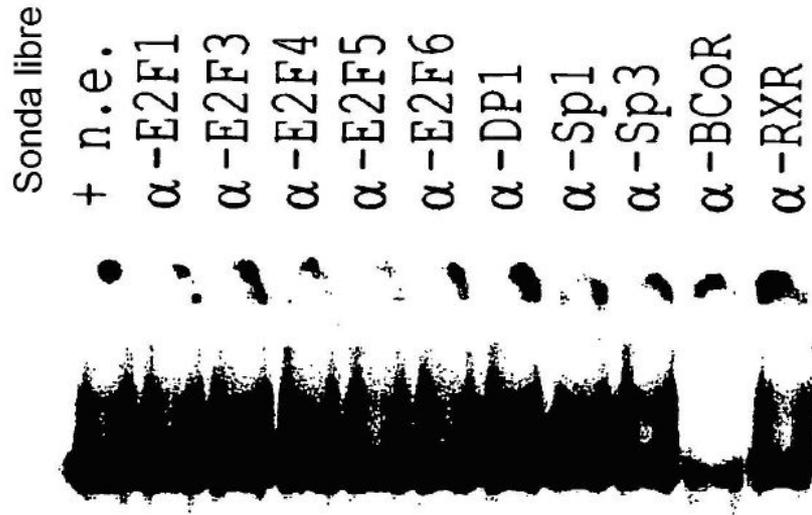


FIG. - 4A

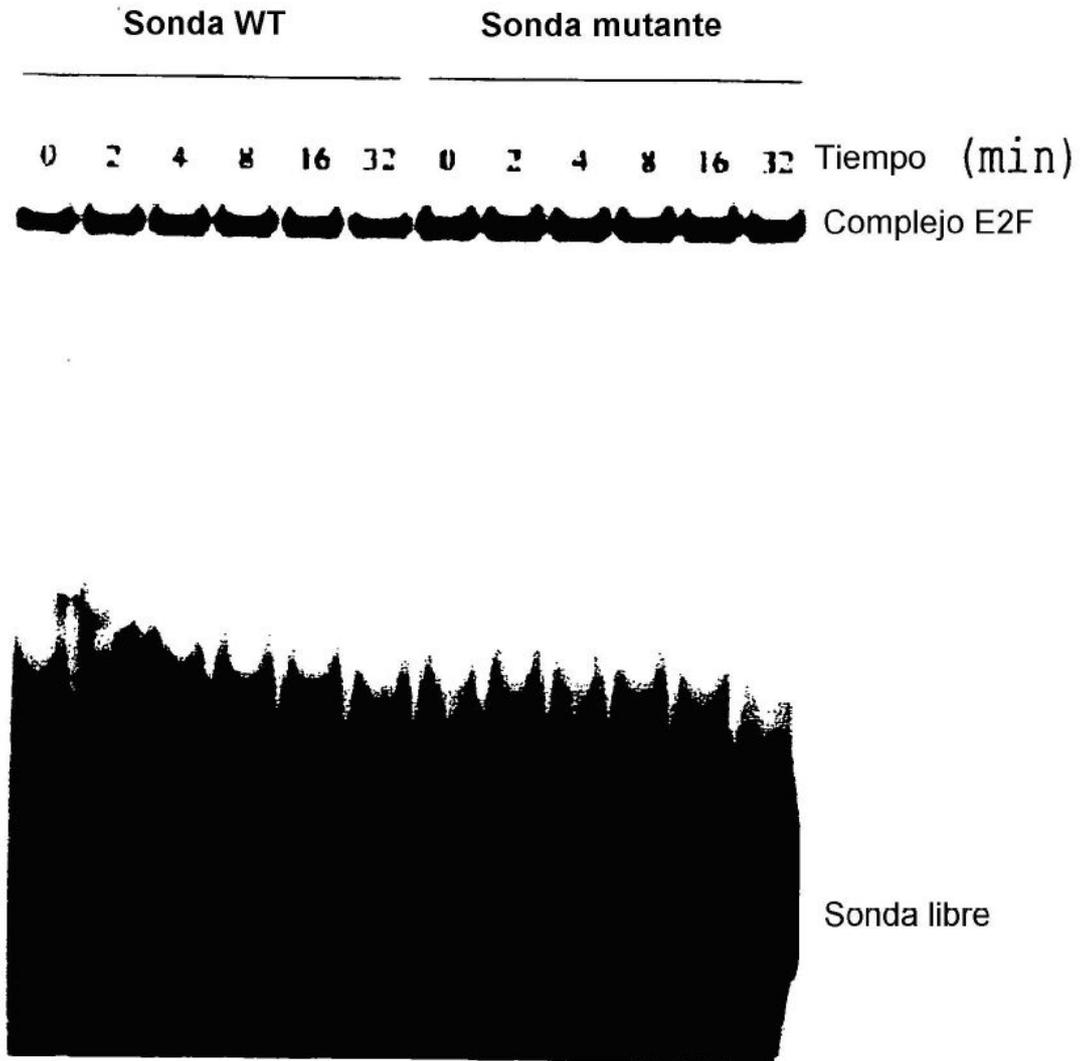


FIG. 4C

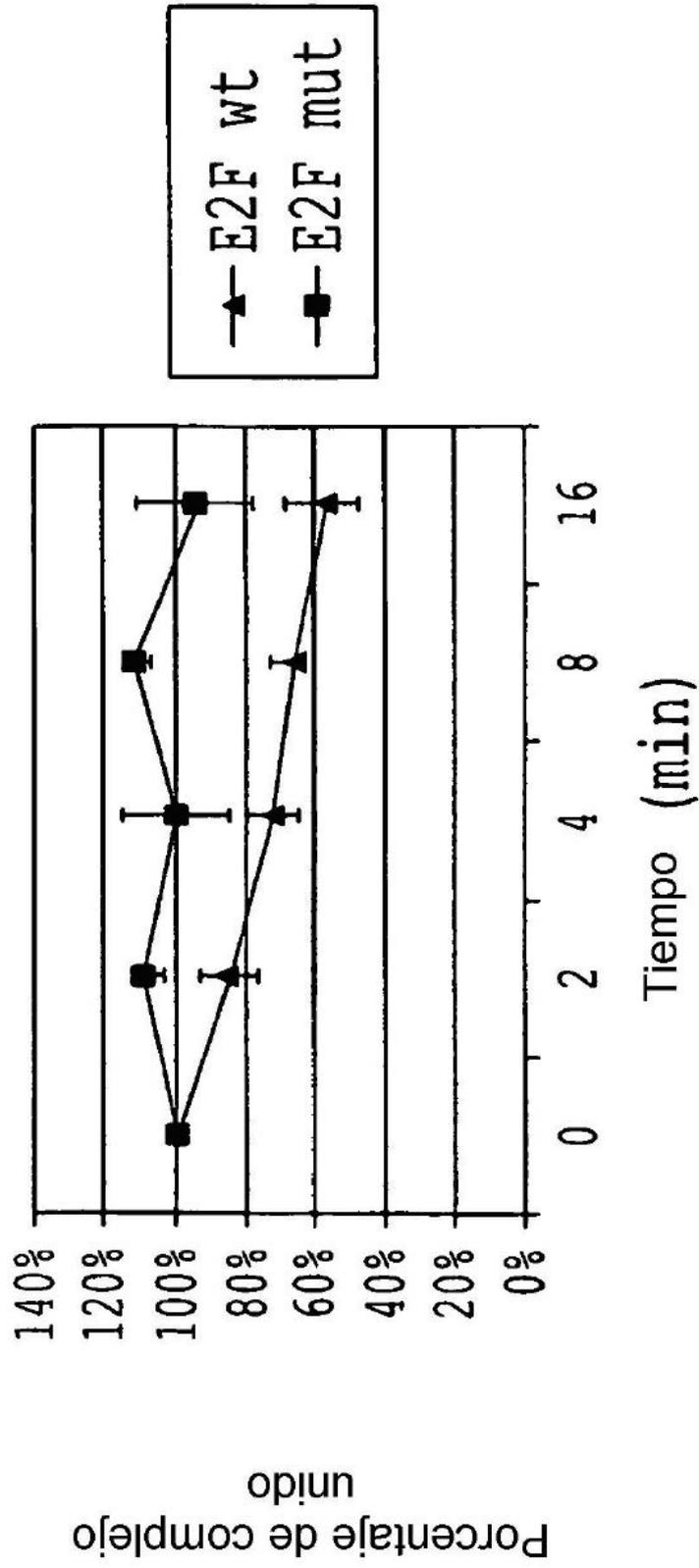
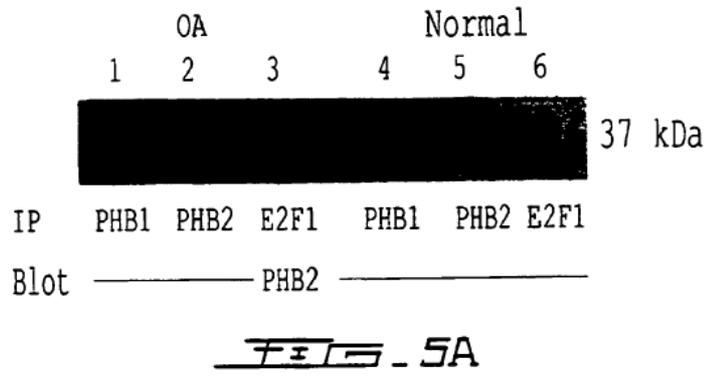


FIG. 4D



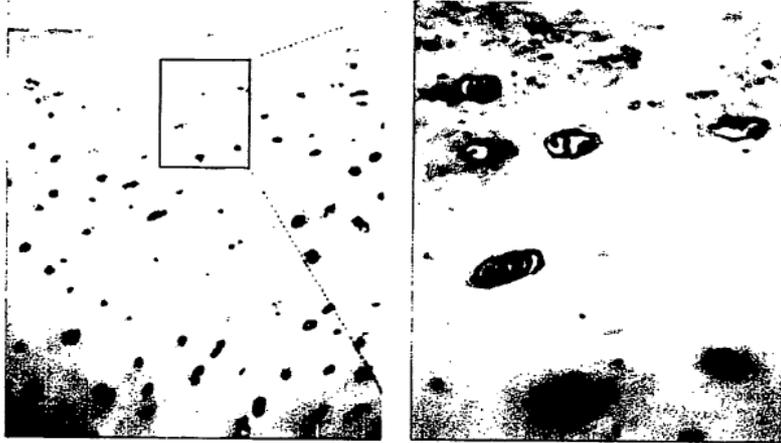


FIG. 6A

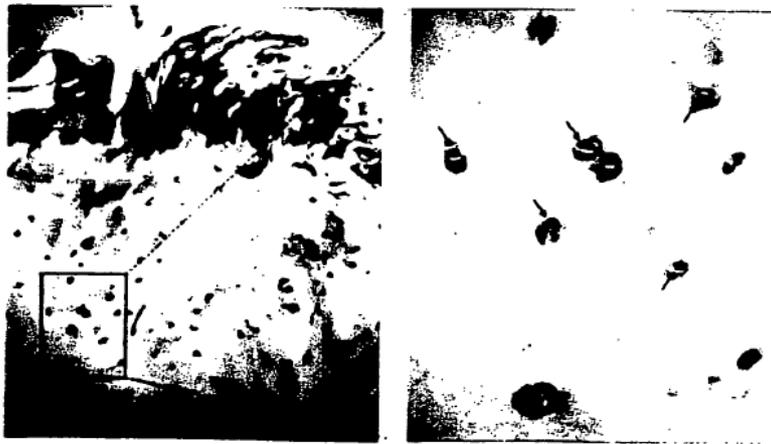
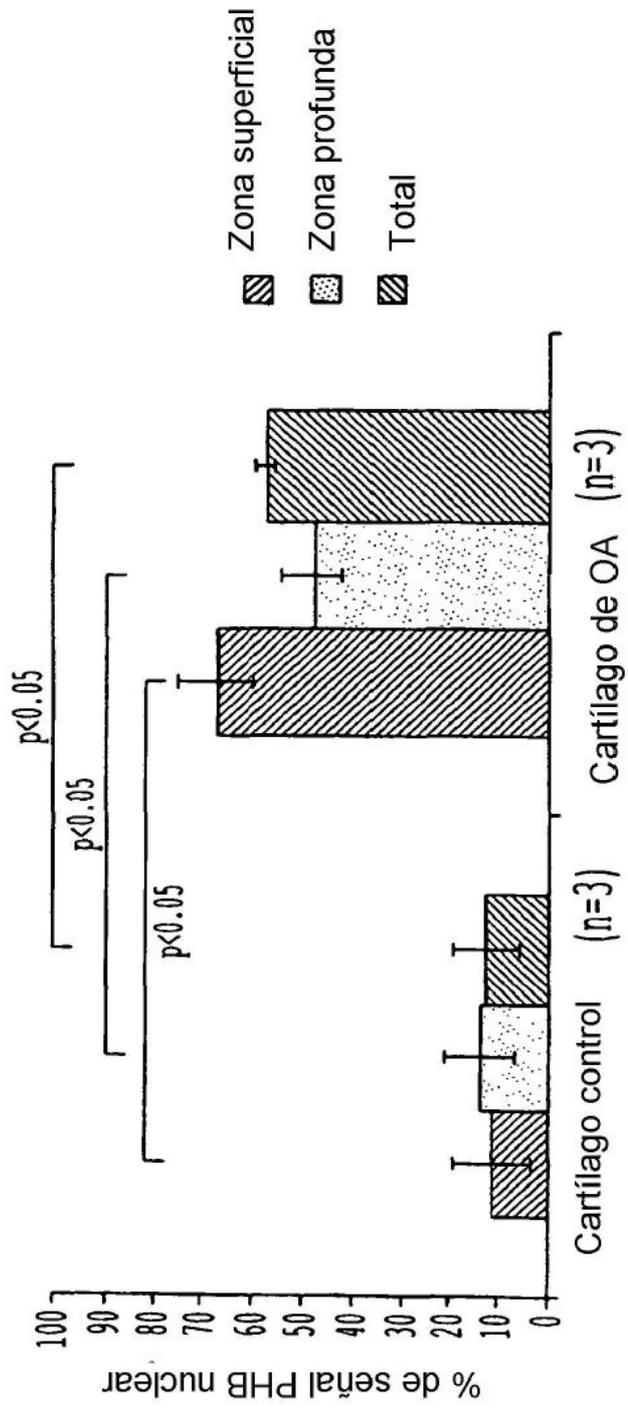


FIG. 6B



FEB-8C

Tabla S2. Identificación de los péptidos correspondientes a los factores nucleares de interacción con el sitio E2F mutante encontrado en el promotor Pitx1 humano en condrocitos articulares de OA

Grupo	Espectros	Distinto	Distinto	%AA	Media	Base de datos
(#)	(#)	Péptidos	Sumado	Cobertura	Péptidos	Especie
(#)	(#)		MS/MS		Espectros	Proteína
1	1	1	9.35	2	1.41e+009 Homo sapiens	Isoforma 2 del correpresor de interacción
1	1	1	9.35	1	1.41e+009 Homo sapiens	Isoforma 2 del correpresor de interacción
1	1	1	9.35	1	1.41e+009 HUMAN	57012588 proteína BCoR (correpresor CBCL-6)
			Search Score		Intensidad	
						20149302 BCoR
						21071037 BCoR
						57012588 proteína BCoR (correpresor CBCL-6)
#	Nombre de archivo	Puntuación	Coincidencia	MH*	Espectros	Especie
1	1 CellShift_0273_04371.3	3	9.35	2781.563	1.41e+009	(A) VPSNAVTSCLGSGTALLPPSPSPK(V) SEQ ID NO: 17
				(Da)		

Fig. 7

Grupo	Espectro	Distinto	Distinto	%AA	Media	Base de datos
(#)	(#)	péptidos	Sumado	cobertura	péptido	Nº de registro
						Nombre de la proteína
						Especie
	(#)		EI/MS		Espectro	
			Búsqueda			
			Puntuación		Intensidad	
1	5	5	65.87	21	3.73e+006	Homo sapiens
						46360168
						prohibitina
1	5	5	65.87	21	3.73e+006	Homo sapiens
						49456373
						PHB
#	Nombre de archivo	Z	Puntuación	Apareado	Espectro	Secuencia
				(Da)		
1	18030600010.0625.0635.2	2	16.01	1149.590	4.59e+006	(R)FDAGELTQR(E) SEQ ID NO: 18
2	18030600010.0990.0993.2	2	14.96	1855.033	5.95e+006	(R)NITYLEPAGSVLLQIQ(-) SEQ ID NO: 19
3	18030600010.0613.0617.0	2	13.46	1185.659	3.13e+006	(K)DEANNVLR(I) SEQ ID NO: 20
4	18030600010.0925.0929.0	3	13.44	2098.166	4.00e+006	(R)SRNITYLEPAGSVLLQIQ(-) SEQ ID NO: 21
5	18030600010.1023.1023.0	2	8.00	1998.087	9.55e+005	(K)AELLTANSIATPAGGCLIELR(K) SEQ ID NO: 22

FEF - 7 (continuación)

Grupo	Espectro	Distinto	Distinto	%AA	Media	Base de datos
(#)	(#)	péptidos	Sumado	cobertura	péptido	Nº de registro
						Nombre de la proteína
		(#)	EM/EM		Espectro	
			Búsqueda			
			Puntuación	Intensity		
1	5	5	42.96	26	1.76e+006	Proteína asociada al receptor de células B
						1673514
#	Nombre de archivo	Z	Puntuación	Apareado	Intensidad	Secuencia
					MH ⁺	Espectro
				(Da)		
1	18030600012.0390.0401.0	3	9.23	1602.856	1.34e+005	(R)AQNISKTTATSONR(I) SEQ ID NO: 23
2	18030600012.0382.0385.2	2	9.15	1471.776	4.74e+005	(R)QKIVAGEGEERAK(N) SEQ ID NO: 24
3	18030600012.0498.0501.0	2	8.96	994.485	5.02e+006	(R)IGDYER(V) SEQ ID NO: 25
4	18030600012.0621.0626.0	2	8.16	899.568	2.24e+006	(R)AQSLLIR(R) SEQ ID NO: 26
5	18030600012.0890.0890.0	2	7.46	1210.741	9.33e+005	(R)VESINNEVLS(S) SEQ ID NO: 27

Fig 7 (continuación)

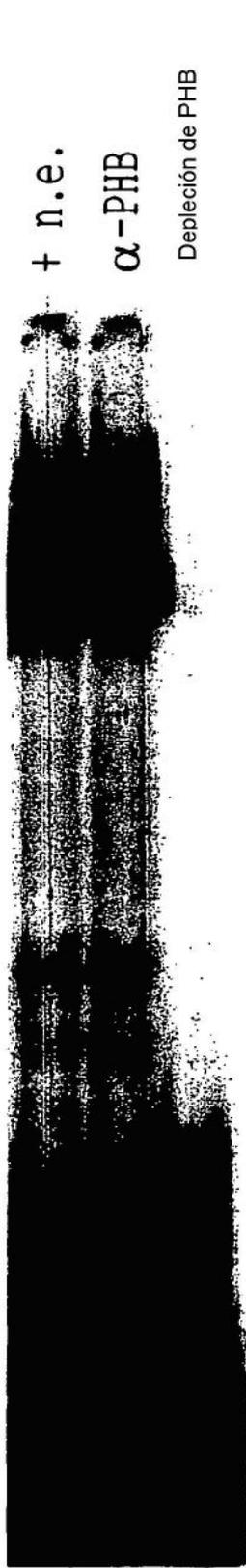


Fig. 8

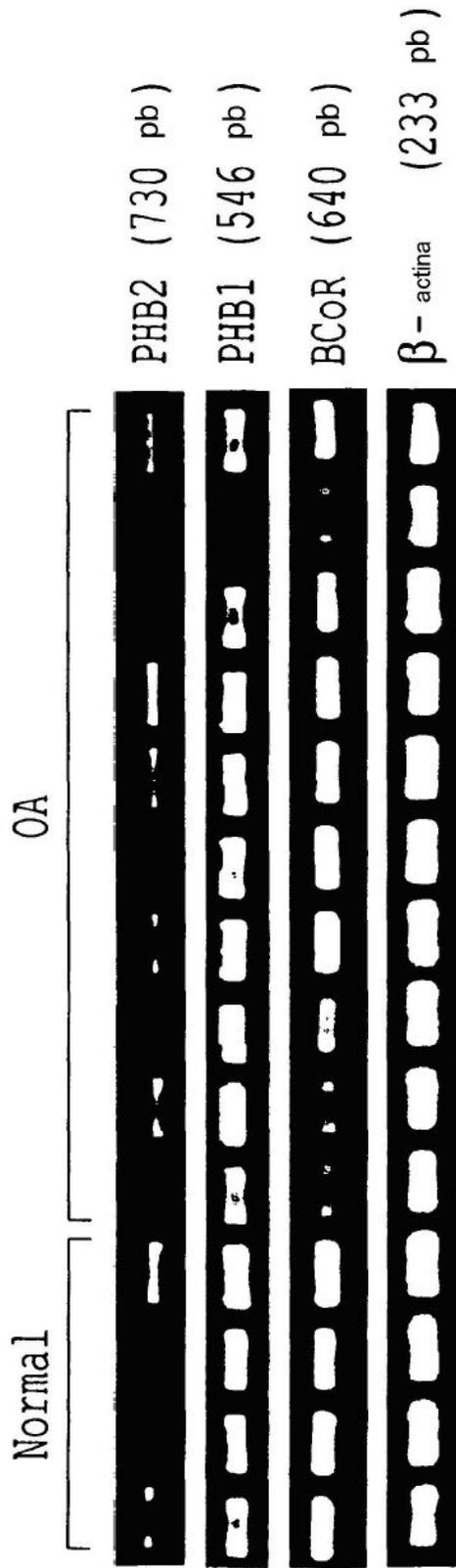


Fig. 9

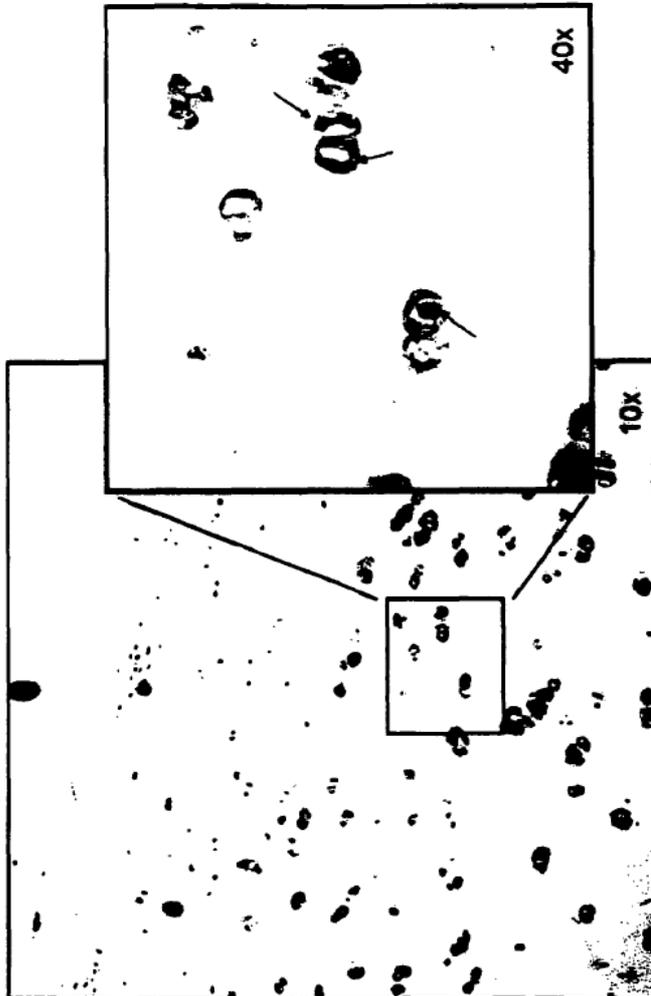
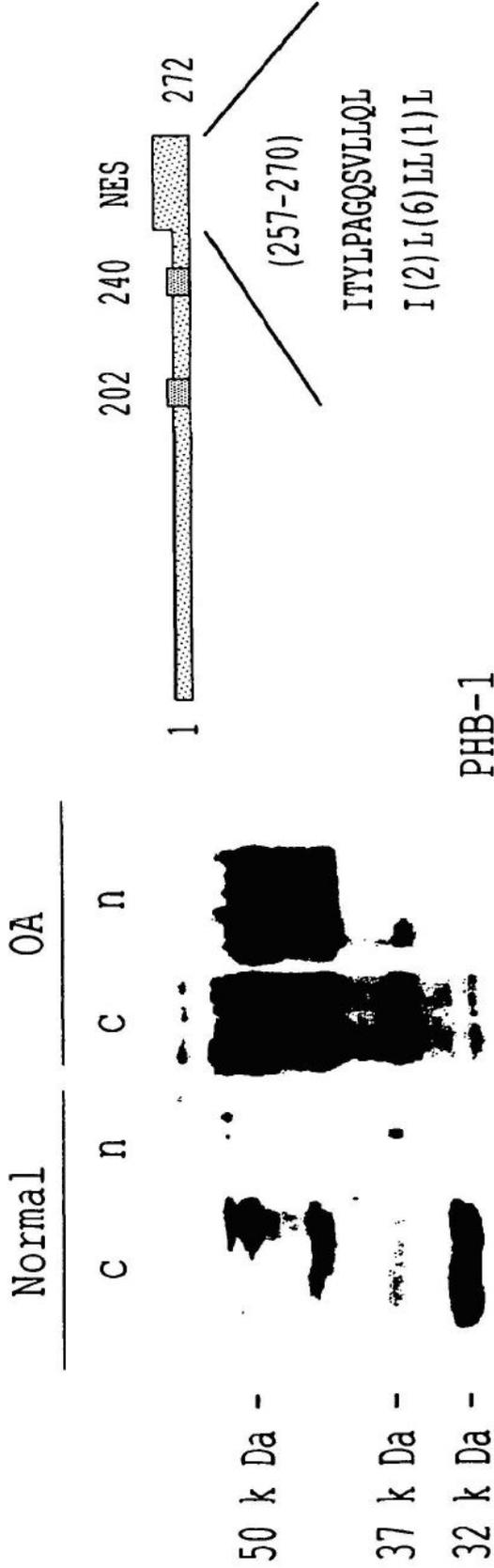


FIG. 10



Posición	Péptido flanqueante	Puntuación GPS	Corte	¿Apareamiento motivo?
202	RAREVVEKAEQQKKA	4.00	18	Apareado
240	DGLIELRLEAEDI	1.52	18	Apareado

FIG. 11

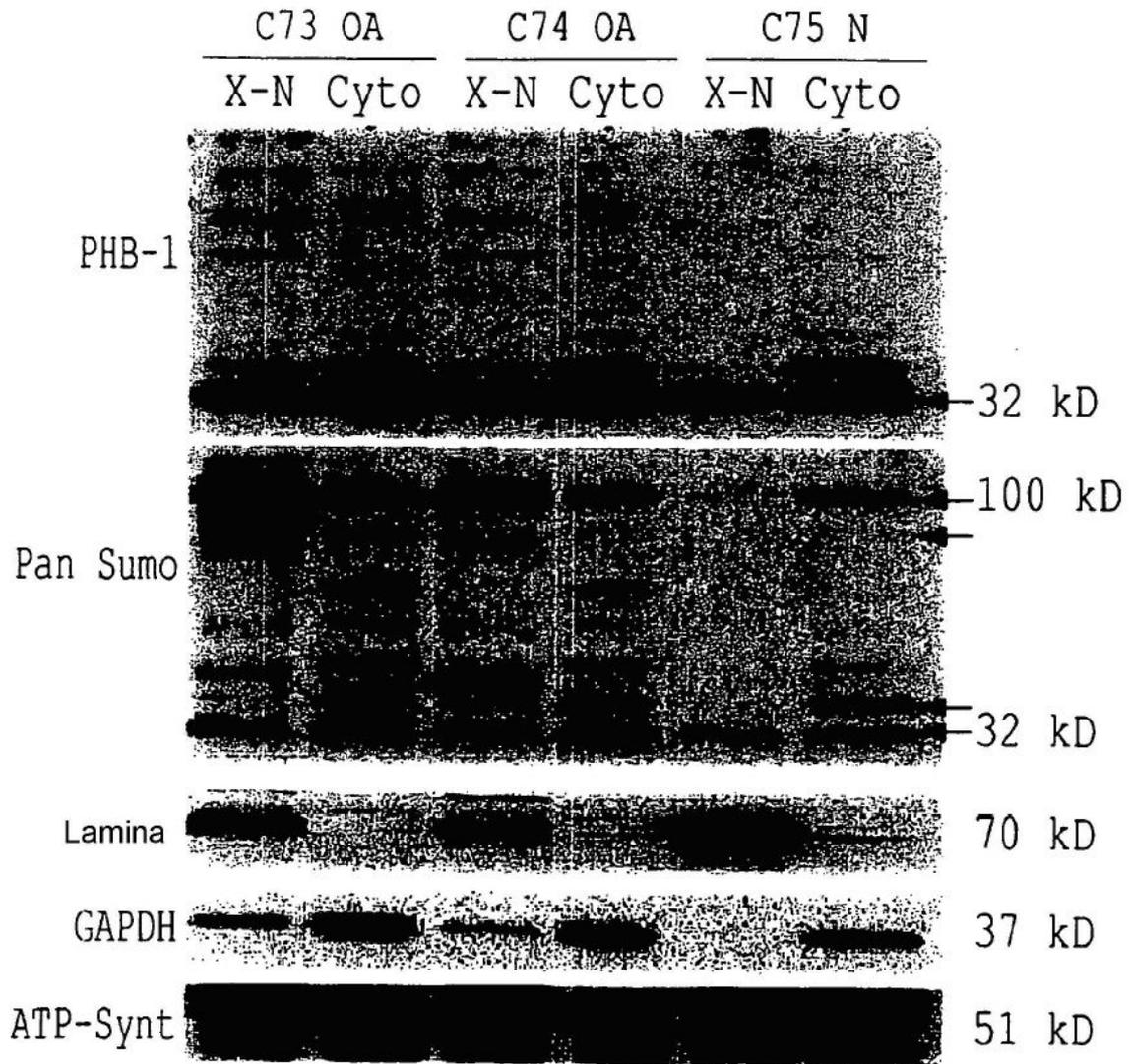


FIG. 12

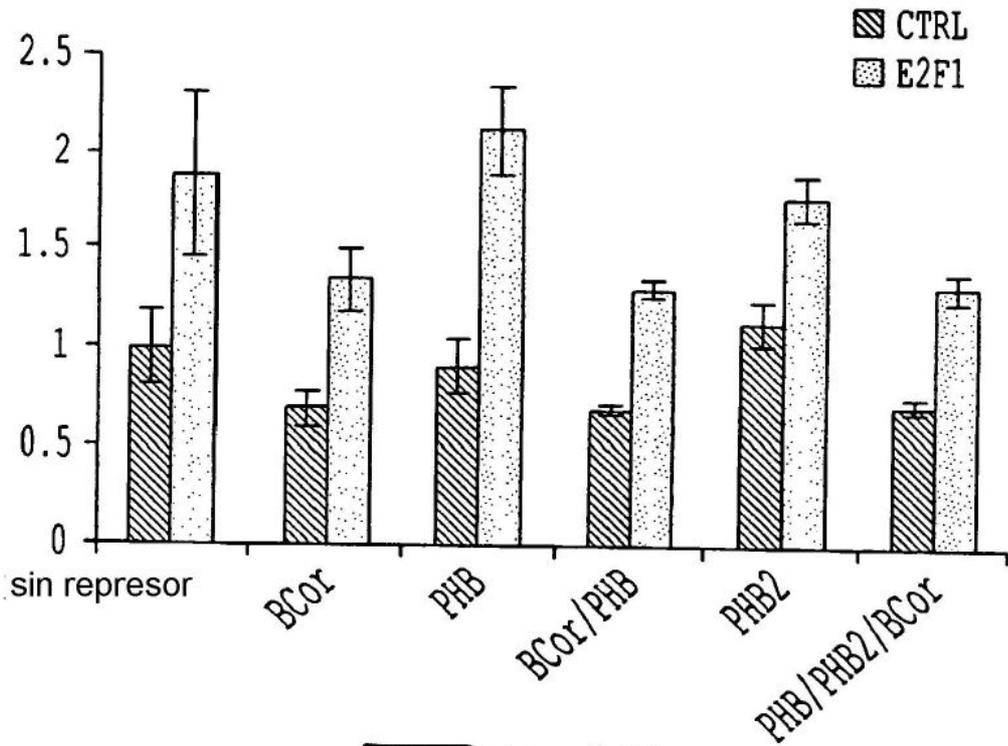


FIG. 13

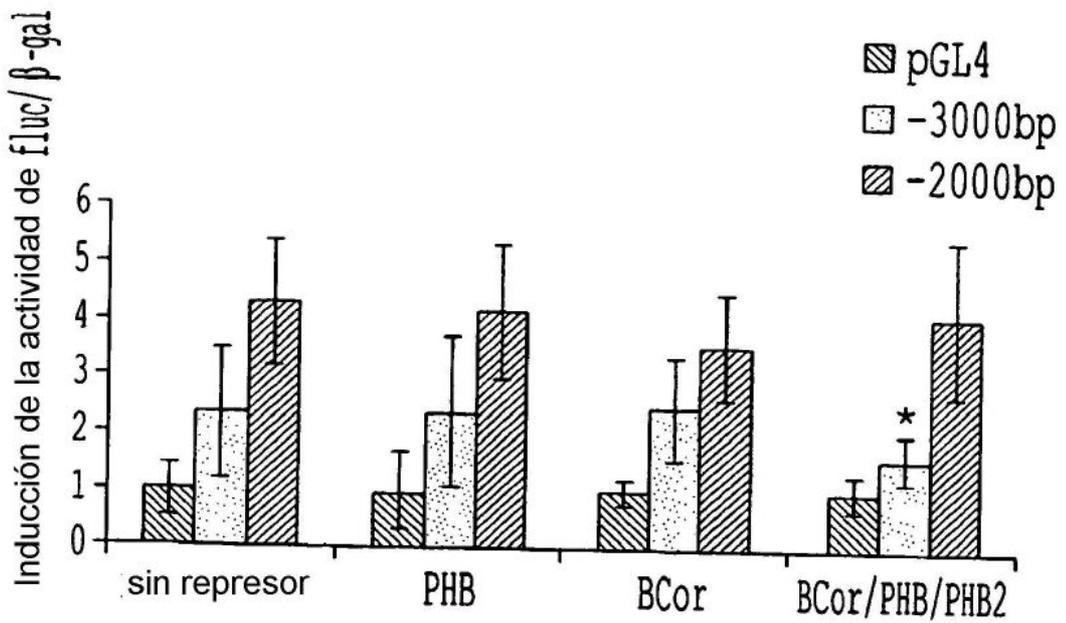


FIG. 14

CCCAAATTGTCCTATCTGTGATAGTGGCTGTGCCCTTCGGGCCCTGAGCACCTGTGTCCTGTGCA
-10006
GCAGTCAGATATCTGGAGGGAGACTGAGGCACTGGCTGCAGAGCTTGTGATCATGAGAGAGACTCACTAGG
-9940
ACTACAGATGGGTAAACTGAGGCCTTCGAGGGGGCAGCTCCAGAAAGGCAGGGGCCATAATGTCTCACCTT
-9869
CATATTTCCCGTGCCAAGCTGTGGCCTTCTGCATTTCATGGCAGATGAGTGGACAAAGGCTGATGGACTGAT
-9798
GGAGAAACAAAGGGATAGATGGAGCAGCTGGGCAGCTCAGCAAATGATGCTGCAATGATCTGCTTCCA
-9727
CACCTCAAATCCATCCTTCTCTCTCCAGGCAGAGTGGGCTTTTAAGATACACATCTGGCCAGGTCTCTCAC
-9656
TGTTCAAACCTTCATCTGCTCCTTTTTGCCTTCAGGATAACAATCCCACCCTCCTATCAAGGACTATGGAG
-9585 (-9543)G
CCCTGTGGGATCTGGTCCCCTTGATTCTCCAATTCCTCTCCCCTATGCCCTGCCTTCTCATCTGTTC
-9514
CAGTGTATTATGAAGCCACACGTTCTCCTTTATTATCAAGCATACCACAGTTTATCTCACCTCAGAGGC
-9443
TTTGACAGTATATTTTCCCTAGGGAGGGTCCCCAGGTGGTAGAAAAACGGTTACAGCCAACTCCTCCATG
-9372 (-9323)T
TGTCCTCAAGACCCTTCAACAGCAGGCTGCAGATTTCTCTCCAGCACGTGCTCCAATGTGTAATGGA
-9301

PP11

F15 . 15

TTTCTGTGTCTGCCTCCTTGACTCAACCCAAATGAACAAGAGCCATCTATCTCTGTATCTCTGCAATCACA
 -9230
 GGCACAAAATAGGTGCTCTACATTTTTTCCAACCTGAGAGGCCATTCTAGAAGGGTCTCAGGCCACGGT
 -9159
 TCTGTCCAGTATTCCATGCAGATGCTGACAGGACTGCAATTAAAAAATACTTGAGATGCCCAAATGCCCA
 -9088
 AATAGCTTCTCATTGCTTTGACTACCAATAATTGCACAGTCAATAGAATAATGCTCAAATACATTAAC
 -9017 (-8969)C
 ATCTTACTTGATCCTAGGGGGTCTCTACTTTTAAAGCCTCAAACCTCCTCCCTCTCACAGGTGAAAAG
 -8946
 GGGAGTACAAATACATTCCCTCCCTGCTCTGCGGATCCATTCTACAGGTAGTCAAGACTCTGAGCTTCC
 -8875
 CCTCTGACTTTCTGGCAGTGCTTCACCTCTCCCCACAGATGAGTGCAGGAACAATTCTAACAGACTTCAGA
 -8804
 CTCTTCCAACAGAGCCAATCCCTCCCATCACGTTGGAGTGGACTTGCTACCCACACCATCAACAGGCCCC
 -8733
 TGAGAACTTACAGGGCAGGGGCTTCTTTGGTAAAACCAACCCTTTCCTTCCACCAGCTCAGAGAAGTTG
 -8662
 TTCCAGATAGATGCCAGGATTCTTGGAGGAGCATGGTGATTCTGGGGTGGAGCCTCTGACCCTGGCCAACC
 -8591

PP10

Fig. 15 (continuación)

AAAGGCCTGAGCCACTCTTCCCCACAAAGTGATTGGCGCAGGAGTGGGCATGTAAGCTGGACCCAGCCAA
 -8520
 TCAGCATAACCAAATCCCTTGCCACCCCTGGGGAGGGTCTATAGTTGTTGCCAAGAGAGGCTCACCCCTG
 -8449
 TTCTCAAGAAGCTTTCAACTGGTAGGGGCAACAGGTTTTAATCTATCATTACACAAATATTTAATTTCAAT
 -8378
 ACTGTTGCAATAAGAGCTATGAAGGAAAAGAACTCCCTTACTTTTACTTGGTGTTAAGATTTGAAGAA
 -8307
 GAAAAAAAAAAAAACTGCCTGAAGGATTGTTATGGCCTTCTATATAATAGTGGCTGCAGACATTTGCCCA
 -8236
 TTATGTTCAGCATGAACCCATGTGACAAATTCATCAAAGCGTTTTGCACTAGGGAGAAAAATTTGTATTAG
 -8165

 AGGAAGCACAGCAGTTTGGACTGAAAGACAAAGAAAATTCAGCCAATTCTGCTGATCTTTTTTGATGGGGC
 -8094
 ACCTGGAAGCTGAAAGCTAAAGTGGTACTCAGGAACAGGGACTGCTACTTCTGTTCCCTGGTGAATCCTGCC
 -8023
 CCAAACCTCCTCTCTCTGATTCCCTGATTCCACTGTGCCAGTGGGAATATATGCTCCCAAGATGTCAA
 -7952
 ACTAAAGGAAATTCAAAAAATATATACATATATTTTTAGAGAAAAAATAAGATTATAAAAAATGTGTTT
 -7881
 (-7842)+ACTG +ACTG(-7839)

PP9

Fig. 15 (continuación)

TGTACCCCCAAGTTTCACTAAGAACTTCCTGACTTCCAGGCCCTGGTTGTGCCCCACGCACCAGCCTGCC
 -7810 (-7784)C
 CAGCTTTCCTGGACCAAACCTCCTAGCACCTAAGCAGGGGATGAGGGCAGATAAACTAAATCAGAAAAGGG
 -7739
 ATCTGTTCTCCTAGACTCAACCAACATGACCACCGTGGGGAAAGAAGAAACAAAAACAAGAGCAAACCTCT
 -7668
 CTTAAAGAGCAGCCTGGCAGCTATCACCATTAGCATTCAGCCCCTCTGTCCACAGGACTCAGGACCAAACC
 -7597
 CCTCACCTTCACTATCCCATCCGTTTCCCAAGAAGCAGAAATACTTATTCTCACATTTACAGATGGGGAA
 -7526 (-7509)T
 GCTGAGGCTAGGAGAGGTTATGTTATTTGCCAAAGCCACACAACTAGTAAAAGCCACTGACAAGATTCTGG
 -7455
 CTCAGGCCATCAGGTGCCAGAGGCAGCATTTTTTGGCACCACAGGCCCTGCCTGGGAACAAGAGCATGCAG
 -7384
 AAAATCTCACAAGAGATGGGAACAAAATTTGGAAAATTGCTAGCGTGCAGGGAGGGGGGAAGGTGTGATTT
 -7313
 CCTGCTACAGACGCCAGAGTAAAAGCCACCCAGGAGTGCCTGTGCAGCCCTCCATAGTAAGGTCCAGCGG
 -7242
 CTGCATTTATGCCCAAAGATGCCCTGGTGCCTGGAGTGAAGGAAGATTCCAGAGACAAGATTAGAACT
 -7171

PP8

Fig. 15 (continuación)

ES 2 386 916 T3

TCTCAGCTTAGCAGCTCTAGGGCTGGACCCGCCAACAAGCCATTTTACACATAAAGCAGTCAATGGGAGGG
-7100
GGTAGACGTAGGGGGCTAAACTCCCCACAGCACAGGGTCCAAGTTGGTAGACTGCACTTTCTCCAGGCGCA
-7029
GGTCCGCTAGTGCCGGCATCGGGGACTCGTTATCTTAACTTGCACCCTGGGTGCACAGAGCCCTGCACAC
-6958
ACCACTGGAGAGGGGTTCTGTGTGCGAGGGTTGAGAGGAGGGTATGGAGTCCCTGGAACAGCAGCAGG
-6887
GTGCAGAGGCCACCTGGCAGGGCTGAACACCGAGGCTCTGTGAGCTGGGTGGGCGGGCTTCCCGCTT
-6816
CGGAGGTTGGGAGGGGGTCTGCGGTCTTCCAGGCCAAGCGCCCTGGAGGCACGGACTAGCAG
-6745
GACGCCGAGGTGGCGGGTCTCGGCCTCTCCCGCAGCAGCTGTGGCGAGAACCAGGCAGGGAGGCGCCG
-6674
CTGCTGACTGCATCTCATGAAAGATTAGATTCAGGCCCGGCTGCCGCGCTGCCATCTCCCGGCACCTTGCGCCGA
-6603
AACGGTCGCTCTGGAGCCCGTGGCCGTGGCGGGCAGGCTTAGCCGCTCCAGTCCCTGAGAAAGGCAGGCC
-6532
ACAGCCCGACCTGCCCTGTGGTCCCATCCATAATCCCAACAGCAAGCAGGCTCAGGCTGGGCACTTCGGG
-6461
GTACCAGGAGTAGGTTCCGCCAACTGGTTTCCACCATGAGGCTTCGCGCACAGGGTTATCTGGCCACGAGG
-6390 (-6345)C (-6322)G

Fig. 15 (continuación)

CAACGCTGGGGAGCCCTGTGGCCTGAGGGTGGGCAAAGGACAGGCTCCCAGTTCCTTGCGTCCAGCCCGT
 -6319
 CTCCCAGCGGCAGCCAGCCAGGAACGGCCTGCGGGGCCACAGGGGTGGAGGCGTCACCGTTCGCAGGCCCG
 -6248
 CAGCAGGATGGTCGCTGGGGATGTGCAGGCATAGGGGTGGACAAGGGGCCCCAGAAGTGTCTGTCCCTGA
 -6177
 GGGGTGGTGTGCCCTTTCCTCACCAGCCAGCCCTGAGGAGAGGGAAGAAGGCAATCCCCCAACCAGG
 -6106
 GCAGGTCGGGCGGTGCCCCACCCTAACACCCCTACCCCCAACACAGAAAACCTGGGGTCTGTCCCTCAA
 -6035
 ACCTCCCTGGCTGCCACGCTCTGGGCAGCGGACTCTCCCTGCCAACACGCAAGACCAGCTCCCTCCCGCAG
 -5964
 GCTGAGCAGAAAGAAGAAAGGTCCAATCTCAAACCCCAAACCTCGACCACCAGCCCCGTCTAAACGGAAG
 -5893
 TAGGGCCAGCCCTCACGAGTCAGGTGGGAAACTGGGCCCAGGGAGAGAAAGTGCCCCAGGGCCAGGCTGG
 -5822
 GACCCGCTCTGGCTTCGTCCGCATGCGGCAGGGCCCTCCACGGAGGTCCCAGGGCGCGCTCCCCGGCCTC
 -5751
 GAGGCCCGGCCAGCCGCGGGACCCAGCCTACGCCCCGAGGGAGGCCAGGACCCCTAGCCGGCGGGA
 -5680
 CTGCGCGCCGCCCTCTCCCGCAGGTCCCGGCGAACACCTAGCTTCCCCTCCCCCACCCCTCCCGCCTC
 -5609 (-5591)A

PP7

Fig. 15 (continuación)

CCGGCCAGTGTCCCCGCCTTCCCCGCGGGCGACGGGCGGCGGGCGGGAGGAGCGGGCCGAGCCGAGGAA
 -5538
 GCCCCGGCCTCGCGCGCTGGGATGTAGCGAACCAGCAGGGGCCGAAGAACCCTGCAGTGCCAGAGCCAGAG
 -5467
 CTGGATCCGGGGCCCCAGCCGGAGCCGAAACCTGAGCCAGAGTCCGCGGGCGGGGAGCCCGGAGCCCACGA
 -5396 (-5330)G PP6
 GCCGCAGACGCAGCGCTGCCAGGTGGGGTAAGAGACGCTGGGCTAGGGGCGCAGGGTCTCCGCGGTGGAG
 -5325
 GGGCGCAGGGAGGTGGCGGCCAGTCTTGCAGTTTGTCTCTGGCGTGTGTGGGTCCACCCGGCGGGCGG
 -5254 (-5185)+G
 GGACAGCGCAAGGCGCGGAAGGTGAGGAGCCTTCGAGGCAGCGCAGGAGCTCGTTCTGCGCCAGGGCA
 -5183
 CAGTCATAGCCGCCGTACCCGGGTGCTACCTCACCAACCGGCGGGATCAACCCTCTGCTTTGGCTCCGGG
 -5112
 CACCTCAAGAGGGTAGCAGCCTCGGGGGCACGGGCCACGGCCCCGGAAGGGCACAACCTGAGAAGCCCGT
 -5041
 GGCAGCCCCTCGCAGCGTCGGGTGACACAGGGCTCCCCACCCCCAGGAGAAGTGGGCAGGAGAGAGGGCC
 -4970
 GCCCGTGTCTCCCCGTGCGTCCAGGGATGGAGGGCCCCACCACCATGGAATTGCTGGCCCCTCTGCGTG
 -4899 T(-4889)
 GCCCCGGACTTCAGCCGTGGCTTCGCGTCAAGAGGGTATTTTCCTAAACGAAACCGCTTCGTTTCGTTTCGT

Fig. 15 (continuación)

TCGTTTCGTTTCGTTTCGGGCAGCAATGCCGCAGAAAAGCAGCAGACGTCGGTCCGGCCCTGGCTCTCTTCGC
 -4757 (-4719)A (-4692)T
 CCCGGACCCCGACGTCCCGCCGAGCGCTCGGAGGTGCCCCAGCCCAAGGCAGCCTGCTCTCGCCGGCAC
 -4686 (-4626)G
 AGGTCGGGCTTTTTCTTCCCAGGAGAGAAACCCCAATTCCTTCGTAACGTCCAATAAAGACATTCCC
 -4615
 GCTTCTCCAGGTTTGGTTGTTGACGCAGGGTCCCGGAGCACGCAGTCGTTCTCAAGAACCGGGTCTCGG
 -4544
 ATTTCTGAAATTGACCAGCTTCGTAATTGGAGCCTATTCTCCCGCGCAAAGGCAGGGCCCCAAAGCCGG
 -4473
 GATCGCAGTAATGGGAACCCAGGCTGGAATCCGGGTCCAAGCTTTTCCGATTTAGGAATCCCCGAATC
 -4402
 TACAAATATTTAGTCCACTTTTCTGAAAACTAAATTCTGAAAAACACAAATCTCTTGACATCCCTGTGA
 -4331 T(-4329)
 CCTCTGAAAGCCACCAGGGCCAGGGGAGGAAATCCAGGTTGCTGTCCACTGGGGGAGGATTCAGGTCTA
 -4260 (-4238)C (-4211)G
 GGGTTCAGGTCTACGGTAGTCAGGGCAAAGCTACAGGCAGCAGGGGCAGCACAGGAGACTTGCTGTCCCC
 -4189 (-4120)G

PP5

Fig. 15 (continuación)

GTGCCCTTTCCCGGGGCTGCTTTCGGCCTCCCGCATCTCTCCAGGGAAAGGAAAAGAGGTGGGCTGGGGC
 -4118
 TTGGAGACCAGGCTGTCTGGACTCTAGGATGCAGAGGCCTCCAGACAGGCTCAGGGTGCTTCTCCCATG
 -4047 G(-4039)
 AAAGCAGCCGCTGGGAGGAGGAGGCTATGGTGCATCCATAAGTTGCCCTCTGCTCCCCAGTTGTGCGACC
 -3976 A(-3966)
 AGCTGCTACCTCCTTCCCTAGTCTTCTTCCCCACAGCTCAGCCATTCTCAGGAACCAGACAGCGTCCATGGA
 -3905
 CTTAGGTGAGAGATGGGCCGGGTAGAGCCATGGGTCTACCAGCCGCTGACTGAGCGGCCACGGCACAGA
 -3834
 GTCCTGAGTTCATACTCCCATCTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCTGCTCAAATACATCTGGCTCTCCCC
 -3763 (-3727) T
 GGGACAGGCTGGGGATCCCCATTTGGCAGGAAGCCTCAGACTGGGGTCCCAGGAAGCCTAAAGGAGCCAGT
 -3692 PP5
 GAGGTCTTTCCAGCCCCTACCTGAGCACCCCTCCTCCCACCTACCCAGTAATTGCTGTATTCAAAGAAACG
 -3621
 GGAGCTTTTATTGGGGAGGGGTGTTAGATCAGGCAGAAAGAGGTAGGTGGTCCAAACCTGCACTCCCAA
 -3550
 ACAGGGTTTCAAGTTGAACTTCTCCACGGACTAAGAGGCTTAGGGCTGGAATGTCCAGAGATCATGG
 -3479 (-3415) ACT
 ATAGCCCTGGTGGCAGGCCATGGCACATTCCTTCTTTTCCAAAATACCTTGATTCTGGGAGCAAGGAT PP4
 -3408

Fig. 15 (continuación)

TAGGGCACGGTGCCCCGTGGGTGGGTAGAAGGATGCCCCCCTGAGAGCCTTCCAACCACCCTTCCA
 -3337
 AATTACATTACTAAACCATTCTTGGGCACAGGGTGTTCCTTAGTGAGCCAGGCTTCAGGAAGGGTCCTCATG
 -3266
 GTGACTACTTCAACCCACAACAGCCCAAGCTCTTCTGCTCAGCCAGCCAAGACCCTAAACTCCAAAATT
 -3195
 CTTGAAAATCAGAGAATCATTGCTGGCTTTGTGTGGTCACGGAGGGTGGGGAACAGGGCACATGGTTCCA
 -3124
 GCTCCACTAAGCCCCCTTCCCTCCTCTCTTCGTGTCCCATCAGCAAGTGAGCTGGATGCTGAAAGCAGCAGG
 -3053
 CAGAGTCCGGTGTGGACATGGGAACTGAGGCACAGTGCAGATCAAGCCTTAACCTTGAGGGAAACACAGG
 -2982
 TCACATAGCACAGCTGGGGGAACACAAAGCCTCTGCTTACTCCTGAAAGAGTGCTGTTTTCTGTCTGTAT
 -2911
 GTGTGACGTGTCTGTGAGCGTGCAAGAAGCCCCATCTTGACTGGGACAATGGCCAGTGAGTGTAGCTGGG
 -2840 T(-2833)
 GAAGAATTGAGAGCATGTCCAGGTCCCTTCCCCAGCCAACGCCAAGATCAGGCCACAGCCTCCTCACAAT
 -2769
 CAATTGCCTCCTCACTCCTTGATCACTCAGTGCTGCCAGGCCAGCAGAACAGACTCTGCCAGCAGGCC
 G(-2697)
 CACTAGCCCCAGCTCCTTTGGGTCTCAGGTCCCTGAGGATATGGGGCTTCACCTGAAATGGTCTGAGG
 -2627

Fig. 15 (continuación)

GCTTTTCCTTCTACACAGCAGGCATCAAGATCACCAAATAAAGGGACTATTGTGCCTGCCTGGAGCCCTGC
 -2556
 CAGAGGTTTGGGCCAGAGGGGCACACAGCAGGTGCTCAATAACTGCATTAATGCACTAACAGTGAGGAA
 -2485
 ACACGCCCCCTCAGACTAAGCAGTGAGTGCTGCTCACAGAATAGTCCCCATTGGGGGATGGCCAAAGAGTC
 G(-2412)
 ACTTTGGTCCCTCTGGGAAGTGAGAAGGCAAGTGAGAAGGCTGTGAGTCTTAACCTCCTCTAGAGGCCAC
 -2343
 AGACAGACCATTCAATTTCTAAGTCTCTACCCAGAGACGCACTGTGCTTCCCACCTTGGCCTGACATGTGGC
 -2272
 AGGGTTAGAACACACCTCCTATCCCCTGCCAGCCCGCTTCATGCCAAGTAGCACATATATGCCTAAACTC
 -2201
 AGCACTTCCATAGTGCAGTGAATACATGTGTGTGTACAGCATCTCCGCATGGATGTACAGGATGTGTGTGT
 -2130
 GTGTGCGTGCCCCATGCTGCTGCATTCAGGCTGTTCTTTTTGGTAAGACAGCTAAAAAAGAATGGTC
 -2059 (-1999) G
 GTGAAGGGACACTCCCTAGCACGCTGCAACACCTGAATATCTCCTTGAAAGGAGGGATCTTCTACTGCAGG
 -1988
 AGACTCGTGGTAAAGGTGGCCAAGAAACATGGCAACGGTGGGGCTGAGGGCAAATGCTGGGCAACTGTGCT
 -1917 (-1882) A

PP3

Fig. 15 (continuación)

TCCCCATGTTCCCCTCCCCGTAGCCAAGACTCATTTCATGGAGGGAGATCTCAGCTTGAAGAAGGCAGGA
 -1846
 GTCAGTGGAGCTCCCAATCAAACCCCTGAGAAGTGTCTCCCTCTGGCCTCAGACCCTGCATCCTGTGG
 -1775
 TCACAGACCCACAGTGAGAAAGGACCAGGCCCTAAGGAGCTGTGCTGTCTCTCCACGGCCCAGAGCGGGGG
 -1704 (-1648) A
 ATGGGGATGGGGATGGGGATGGGGATGGGGATGGGGATGGGGGTAGGGGTGGGGGTGCTTTGGACTAACGT PP2
 -1633
 GGAGGGAATGGAAGGCAGGCCTGGTTCCACCCTGCATGCCCGACCCTGGCCCCAGCAGCCCCACAAGGAG
 -1562
 CTCAGCTGACCCTGGGTGTCTCCCTGTGATGGGAAGGGGTAAGACGAGGACTCAAAGGCAGAACCTGCAGA
 -1491
 GTGCCCCAGACGCTGATACCTGCACAGTCAGTGCCACCCACCCAGGAGTTGAGGAGGCACTGGGTTTTGGG
 -1420
 GTGAGGACACTGGACACCTCCCTGCTTCTTTCCAGGCAGACAATCCTGGCGCAGCTCCCTTGGGTTGCTG
 T (-1345)
 TGTCTGGTGGAGCTGATCACAGGTGAGGGGCAGAGGGCAGTCTGGGGTCCGCCTATGGCCAGAGGAGCAGG
 -1278
 TCAGGGCGGCGCCTTGCCGCCCCAGCTGTGGCCTGTTTGCTCAAGACGCTGAGGTCTCGGGGCCAGCTAAC
 -1207 A (-1200) (-1149) C

Fig. 15 (continuación)

AATTGTTGAGCAAAATCCTTCGACAACTTCACCTACGTGCAAGGACTCGAGGAGGGAATCACTCTTAGGA
-1136
GTGGGAGAGTAATGTCTTTGCCTGTGCCAGTGAAGGCCATTGGAGCTGCAGCTCAGCTACCACTGTGTG
-1065
GGAGAGAAGCTGGAAGACTGAGGGCTTCCTGGGCTGCTGGCCAGGGTTGGGAGACAGCAGTCACCTGGCT
-994
TACCAGGCCATATGCCTGAAGCCCTGGGAAGCCAGGACGCAGGCCCCAGGCTGGGACAAAGCTACCCTGAAG
-923
GAGGGCAAAGGCTGCCAAGGCCAACCCCATGCCTGCCAAGGCCAGGCCTGGCCATTTGGCCAAGGCCTAA
-852
GGTGTAACAAGGGGAGAGGTACAAGAGGCTGTGGGGTCTGGCTGGGATCCTTGGGGTCTTCCTTCTGCA
-781
TTCTCCAACGCCTAGAGCCAGCAGAAACGTTTCGTCTGATTAGAAGCCATCATTCTATCCAATCCCGG
-710
AAAATTGACTGCGGTGCAGAGAGGGAGGCCTGAGAAGCAGCCGTAGGGGAGAAGGTCCAAGCTAATTAGGA PPI
-639

Fig. 15 (continuación)

GGCAGCATCCGGGGGCCATTAGAGCGCAGGCTGCTGTCACTCAGCCGGGCTGAGTTCCCGGAGAAGAGG
-568
CTGGAGAAGGAGGGGCAGGCGGCCCTCGACGAGGACACCGCTGGGAGCTGCCGGAACGGGCCCCGGGCTC
-497 (-460)G
TGCCCCCGCCCCGGCGCTGGCTCGAAGGCGCCCGCTCGGTGCGATCCTGTTCCGGCAAACATTCACTCATCC
-426
TGGGCTGTTCTCGCCAGGGCTGGGGACTTCGAGGCGGCCGAGACGGGAGTTGATTCTAGGCGAAACAAGTC
-355
ATTTGAGGCCTGAGGTGTGCACGAGCCGCCCGGGACTCGCAGGCCAGATCGTTTCTTTTGTGAGGCCGAG
-284
GGAGAACTCGGTGTGTACCGGGGAAGGAGGGAGAGGCGCGGCAGGCCGCGGGGGCGGGGAGGCGGGCG
-213
GAAGGTGGCTGCGGAGGGGGAGGGCGGGCGAGGCAGGGAGGGAGGGAGGGCGGCAGTGAGGGCGGGCG
-142
GCGCGGGCGGCTTGGGGCTGGATTCCGCCCCGCGCTCCCTCGCTCGCTCCCTCCCCAGCCCCCTCCA
-71 -1

Fig. 15 (continuación)

AGTATGTGTGGTTGGGGAATTCATGTGGAGGTCAGAGTGGAAAGCAGGTGTGAGAGGGTCCAGCAGAAGG
AAACATGGCTGCCAAAGTGTGTTGAGTCCATTGGCAAGTTTGGCCTGGCCTTAGCTGTGTCAGGAGGGCGT
GGTGAACCTCTGCCCTTATATAATGTGGATGCTGGGCACAGAGCTGTCATCTTTGACCGATTCGGTGGAGT
GCAGGACATTGTGGTAGGGGAAGGGACTCAITTTCTCATCCCGTGGGTACAGAAACCAATTATCTTTGA
CTGCCGTTCTCGACCACGTAATGTGCCAGTCATCACTGGTAGCAAAGATTTACAGAATGTCAACATCAC
ACTGCGCATCCTCTTCGGCCTGTCGCCAGCCAGCTTCCTCGCATCTCACCAGCATCGGAGAGGACTA
TGATGAGCGTGTGCTGCCGTCCATCACAACCTGAGATCCTCAAGTCAGTGGTGGCTCGCTTTGATGCTGG
AGAACTAATCACCCAGAGAGAGCTGGTCTCCAGGCAGGTGAGCGACGACCTTACAGAGCGAGCCGCCAC
CTTTGGGCTCATCCTGGATGACGTGTCCITGACACATCTGACCTTCGGGAAGGAGTTTACAGAAGCGGT
GGAAGCCAAACAGGTGGCTCAGCAGGAAGCAGAGAGGGCCAGATTTGTGGTGGAAAAGGCTGAGCAACA
GAAAAAGGCGGCATCATCTCTGCTGAGGGCGACTCCAAGGCAGCTGAGCTGATTTGCCAACTCACTGGC
CACTGCAGGGGATGGCCTGATCGAGCTGCGCAAGCTGGAAGCTGCAGAGGACATCGCGTACCAGCTCTC
ACGCTCTCGGAACATCACCTACCTGCCAGCGGGCAGTCCGTGCTCTCCAGCTGCCOCAGTGAGGGCC
CACCTGCCCTGCACCTCCGCGGGCTGACTGGGCCACAGCCCCGATGATTCTTAACACAGCCTTCCTTCT
GCTCCACCCAGAAATCACTGTGAAATTTATGATTGGCTTAAAGTGAAGGAAATAAAGGTAATAATCA
CTCAGATCTCTAATTAGTCTATCAAATGAAACTCTTTCACTCTCTCACATCCATCTACTTTTTTATC
CACCTCCCTACCAAAAATGCCAAGTGCCTATGCAAACCAGCTTTAGGTCCCAATTCGGGGCCTGCTGG
AGTTCGGCCTGGGCACCAGCATTGCGCAGCAGCAGGGCGGGCAGTATGTGATGGACTGGGGAGCACA
GGTGTCTGCCTAGATCCACGTGTGGCCTCCGTCTGTCACTGATGGAAGGTTTCCGGATGAGGGCATGT
GCGGCTGAACTGAGAAGGCAGGCCTCCGTCTTCCAGCGGTTCCCTGTGCAGATGCTGCTGAAGAGAGGT
GCCGGGAGGGGCAGAGAGGAAGTGGTCTGTCTGTTACCATAGTCTGATTCTCTTTAACTGTGTGACC
AGCGGAAACAGGTGTGTGTGAACTGGGCACAGATTGAAGAATCTGCCOCTGTTGAGGTGGGTGGGCTG
ACTGTTGCCCCCAGGGTCTAAAACITGGATGGACTTGTATAGTGAAGAGGAGGCGCTGGACCGAGAT
GTGAGTCTGTGAAGACTTCTCTCACCCCACCTTGGTCCCTCTCAGATACCCAGTGGAAATTTCCA
ACTTGAAGGATTCATCCTGCTGGGGCTGAACATGCCTGCCAAAGACGTGTCCGACCTACGTTCTGCGC
CCCCCGTTCAGAGACTGCCCTTCTCACGGGCTCTATGCTGCACTGGGAAGGAAACAAATGTGTATAA
ACTGCTGTCAATAAATGACACCCAGACCTTCC

FES . 16A

MAAKVFESIGKFGLALAVAGGVNSALYNVDAGHRAVIFDRFRGVQDIVVGEETHFLIPWVQKPIIFDC
RSRPRNVPVITGSKDLQNVNITLRILFRPVASQLPRIFTSIGEDYDERVLPSTTEILKSVVARFDAGE
LITQRELVSRQVSDDLTERAATFGLILDDVSLHLTFGKEFTEAVEAKQVAQQAERARFVWEKAEQQK
KAAIISAEGDSKAAELIANSLATAGDGLIELRKLEAAEDIAYQLSRSRNITYLPAGQSVLLQLPQ

FES . 16B

AAGTTCCGGTCCGTAGTGGGCTAAGGGGGAGGGTTTCAAAGGGAGCGCACTTCCGCTGCCCTTTCCTTC
GCCAGCCTTACGGGCCCCGAACCCCTCGTGTGAAGGGTGCACTAAGCCGGAGCGGGGTAGAGGGGG
CCGGCACCOCCTTCTGACCTCCAGTGCOCGGCCCTCAAGATCAGACATGGCCAGAACTTGAAGGACT
TGGCGGGAOCGGCTGCCCGCCGGGCCCCGGGCATGGGCACGGCCCTGAAGCTGTTGCTGGGGGCCGGC
CCGTGGCCTACGGTGTGCGGAATCTGTGTTCAACCGTGGAAAGGGGGCACAGAGCCATCTTCTCAATC
GGATCGGTGGAGTGACGAGGACACTATCCTGGCCGAGGGCCTTCACTTCAGGATCCCTTGGTTCCAGT
ACCCCATTTATCTATGACATTCGGGCCAGACCTCGAAAAATCTCCTCCCTACAGGCTCCAAGACCTAC
AGATGGTGAATATCTCCCTGCGAGTGTGTCTCGACCCCAATGCTCAGGAGCTTCTAGCATGTACCAGC
GCCTAGGGCTGGACTACGAGGAACGAGTGTTCOCGTCCATTGTCAACGAGGTGCTCAAGAGTGTGGTGG
CCAAGTTCATGCTCAGACTGATCACCAGCGGGGCCAGGTATCCCTGTTGATCCGCGGGGAGCTGA
CAGAGAGGGCCAAGGACTTCAGCCTCATCCTGGATGATGTGGCCATCACAGAGCTGAGCTTTAGCCGAG
AGTACACAGCTGCTGTAGAAGCCAACAAGTGGCCAGCAGGAGGCCAGCGGGCCCAATTTTGGTAG
AAAAAGCAAAGCAGGAACAGCGGCAGAAAATTGTGCAGGCCGAGGGTGAGGCCGAGGCTGCCAAGATGC
TTGGAGAAGCACTGAGCAAGAACCCCTGGCTACATCAAACCTTCGCAAGATTCGAGCAGCCAGAAATCT
CCAAGACGATCGCCACATCAGAAATCGTATCTATCTCACAGCTGACAACTTGTGCTGAACCTACAGG
ATGAAAGTTTACCAGGGGAAGTGACAGCCTCATCAAGGGTAAGAAATGAGCCTAGTACCAAGAAGTCTC
CACCCCGAGAGGAAGTGGATCTGCTTCTCCAGTPTTTTGGAGGCCAGCCAGGGGTCCAGCACAGCCCTA
CCCCCCCCAGTATCATGCGATGGTCCCCACACCGGTTCCCTGAACCCCTCTTGATTAAGGAAGACT
GAAGACTAGCCCTTTTCTGGGAAATTACTTTCCTCCTCCCTGTGTTAACTGGGGCTGTTGGGGCAGT
GCGTGATTTCTCAGTGATTTCTTACAGTGTGTTCCCTCCCTCAAGGCTGGGAGGAGATAAACACCAAC
CCAGGAATTCATAATAAATTTTATTACTTAACCTG

FIG. 17A

MAQNLKDLAQRLPAGPRGMGTALKLLLGAGAVAYGVRESVFTVEGGHRAI FFNRIIGVQDDTILAEGLH
FRI PWFQYPIIYDIRARPRKISSPTGSKDLQMVNISRVLRSRPAQELPSMYQRLGLDYEERVLPSIVN
EVLKSVVAKFNASQLITQRAQVSLIRRELTERAKDFSLILDDVAITELSFREYTA AVEAKOVAQQA
QRAQFLVEKAKQEQRQKI VQAEGEAEAAKMLGEALSKNPGYIKLRKIRAAQNI SKTIATSQNR IYLTAD
NLVNLQDESFRGSDSLIKGKK

FIG. 17B

