

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 067**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/475** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.1999 E 05112473 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1640381**

54 Título: **Factor de crecimiento neurotrófico**

30 Prioridad:

**14.07.1998 GB 9815283**

**12.02.1999 US 248772**

**08.06.1999 US 327668**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.07.2014**

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)**  
**TURNHOUTSEWEG 30**  
**2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:

**GEERTS, HUGO ALFONS GABRIEL;**  
**MASURE, STEFAN LEO JOZEF;**  
**MEERT, THEO FRANS;**  
**CIK, MIROSLAV y**  
**VER DONCK, LUC**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 479 067 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

Factor de crecimiento neurotrófico

- 5 La presente invención se refiere a un factor neurotrófico y, en particular, a la clonación y expresión de un miembro novedoso de la familia GDNF de factores neurotróficos, denominado en el presente documento como "enovina" (EVN, "enovin").

## Introducción

- 10 Los factores neurotróficos están implicados en la diferenciación, desarrollo y mantenimiento neuronal. Estas proteínas pueden prevenir la degeneración y promover la supervivencia de diferentes tipos de células neuronales y por tanto son agentes terapéuticos potenciales para enfermedades neurodegenerativas. El factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) fue el primer miembro de una subfamilia creciente de factores neurotróficos estructuralmente diferenciados de las neurotrofinas. El GDNF es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento del factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), caracterizada por un patrón específico de siete residuos de cisteína sumamente conservados dentro de la secuencia de aminoácidos (Kingsley, 1994). El GDNF se purificó originalmente usando un ensayo basado en su capacidad para mantener la supervivencia y la función de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral embrionario *in vitro* (Lin y otros, 1993). Otros tipos de células neuronales en los sistemas nerviosos central (SNC) o periférico (SNP) también responden a los efectos de supervivencia del GDNF (Henderson y otros, 1994, Buj-Bello y otros, 1995, Mount y otros, 1995, Oppenheim y otros, 1995). El GDNF se produce por células en una proforma inactiva, que se escinde específicamente en un sitio de reconocimiento de la RXXR furina para producir GDNF activo (maduro) (Lin y otros, 1993). La administración exógena de GDNF tiene potentes efectos neuroprotectores en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, un trastorno neurodegenerativo común caracterizado por la pérdida de hasta el 70% de las células dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro (Beck y otros, 1995, Tomac y otros, 1995, Gash y otros, 1996, Choi-Lundberg y otros, 1997, Bilang-Bleuel y otros, 1997).

- 30 Recientemente, se han descubierto factores neurotróficos adicionales de la familia del GDNF. La neuriturina (NTN) se purificó a partir de medio condicionado de células ovario de hámster chino (CHO) usando un ensayo basado en su capacidad para promover la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo (Kotzbauer y otros, 1996). La proteína NTN madura es similar en un 57% al GDNF maduro. La persefina (PSP) se descubrió mediante clonación usando PCR de cebador degenerado con ADN genómico como molde. La PSP madura, como el GDNF maduro, promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral y de neuronas motoras en cultivo (Milbrandt y otros, 1998). La similitud de la proteína PSP madura con GDNF maduro y NTN es = 50%. La artemina (ARTN) se descubrió mediante búsqueda en base de datos de ADN y es un factor de supervivencia de neuronas simpáticas y sensoriales en cultivo (Baloh y otros, 1998b).

- 40 GDNF, NTN, PSP y ARTN requieren un complejo de receptor heterodimérico con el fin de llevar a cabo la transducción de señales intracelular en sentido 3'. El GDNF se une a la subunidad alfa 1 del receptor de la familia de GDNF (GFR $\alpha$ -1; GFR $\alpha$  Nomenclature Committee, 1997), una proteína de membrana fijada a glicosil-fosfatidil-inositol (glicosil-PtdIns) (Jing y otros, 1996, Treanor y otros, 1996, Sanicola y otros, 1997). El complejo GDNF/GFR $\alpha$ -1 se une posteriormente a, y activa, el protooncogen cRET, una tirosina cinasa unida a membrana (Durbec y otros, 1996, Trupp y otros, 1996), dando como resultado la fosforilación de residuos de tirosina en cRET y posterior activación de las rutas de transducción de señal en sentido 3' (Worby y otros, 1996). Se han caracterizado varios otros miembros de la familia de GFR $\alpha$  de receptores de unión a ligando (Baloh y otros, 1997, Sanicola y otros, 1997, Klein y otros, 1997, Buj-Bello y otros, 1997, Suvanto y otros, 1997). Se han identificado GFR $\alpha$ -2 y GFR $\alpha$ -3 (Jing y otros, 1997, Masure y otros, 1998, Woby y otros, 1998, Naveilhan y otros, 1998, Baloh y otros, 1998a) por varios grupos diferentes. GFR $\alpha$ -1 y GFR $\alpha$ -2 se expresan ampliamente en casi todos los tejidos y la expresión puede regularse mediante el desarrollo (Sanicola y otros, 1997, Widenfalk y otros, 1997).

- 55 GFR $\alpha$ -3 no se expresa en el sistema nervioso central en desarrollo o adulto, pero se expresa ampliamente en diversos ganglios simpáticos y sensoriales en desarrollo y adultos del sistema nervioso periférico (Widenfalk y otros, 1998, Naveilhan y otros, 1998, Baloh y otros, 1998a). Un cuarto miembro de la familia, GFR $\alpha$ -4, se clonó a partir de ADNc de pollo (Thompson y otros, 1998). GFR $\alpha$ -1 es el receptor preferido para GDNF, mientras que GFR $\alpha$ -2 se une preferiblemente a NTN (Jing y otros, 1996, Treanor y otros, 1996, Klein y otros, 1997). El GFR $\alpha$ -4 de pollo forma un complejo de receptor funcional para PSP en combinación con cRET (Enokido y otros, 1998). Se mostró que las células que expresan tanto GFR $\alpha$ -3 como cRET no respondían a GDNF, NTN ni PSP (Worby y otros, 1998, Baloh y otros, 1998a). Recientemente, se ha mostrado que ART señala a través de cRET utilizando GFR $\alpha$ -3 como el receptor de unión a ligando preferido (Baloh y otros, 1998b). La superposición entre los factores neurotróficos y receptores GFR $\alpha$  es posible *in vitro*, ya que el GDNF puede unirse a GFR $\alpha$ -2 o GFR $\alpha$ -3 en presencia de cRET (Sanicola y otros, 1997, Trupp y otros, 1998) y NTN puede unirse a GFR $\alpha$ -1 con baja afinidad (Klein y otros, 1997). En resumen, GDNF, NTN, PSP y ART son parte de un sistema de señalización neurotrófico mediante el cual diferentes subunidades de unión a ligando (GFR $\alpha$ -1 a -4) pueden interactuar con la misma subunidad de tirosina cinasa (cRET). La relevancia fisiológica de estos hallazgos *in vitro* se mostró recientemente en estudios de

deficiencia génica (revisado por Rosenthal, 1999), que muestran claramente que el GDNF interacciona con GFR $\alpha$ -1 *in vivo*, mientras que NTN es el ligando preferido para GFR $\alpha$ -2.

Los presentes inventores han identificado, clonado, expresado, localizado cromosómicamente y caracterizado enovina (EVN), el cuarto miembro de la familia de GDNF. El conocimiento de la proteína de EVN madura se ha ampliado con el descubrimiento de diferentes variantes de corte y empalme de ARNm funcionales y no funcionales. Además, se presentan datos de expresión, datos de unión de EVN a GFR $\alpha$ -3 y efectos *in vitro* de EVN sobre el crecimiento en exceso de neurita y la protección frente a la neurotoxicidad inducida por taxol en cultivos celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciado por estaurosporina.

## Sumario de la invención

En la presente solicitud, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para un factor de crecimiento neurotrófico humano novedoso, "enovina", un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico, una célula huésped transformada con dicho vector, factor de crecimiento neurotrófico codificado por dicha molécula de ácido nucleico, enovina aislada, compuestos que actúan como agonistas o antagonistas de enovina y composiciones farmacéuticas que contienen el ácido nucleico o la proteína de enovina o los agonistas o antagonistas de la misma.

## Descripción detallada de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para un factor de crecimiento neurotrófico humano, denominado en el presente documento como enovina, que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la figura 21, o que codifica para un bioprecursor, derivado o equivalente funcional de dicho factor de crecimiento. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico es ADN y aún más preferiblemente una molécula de ADNc.

Preferiblemente, el ácido nucleico según la invención comprende la secuencia desde las posiciones 81 hasta 419 de la secuencia ilustrada en figura 1 y más preferiblemente desde las posiciones 81 hasta 422 y aún más preferiblemente la secuencia completa ilustrada en la figura 1.

Se cree que la molécula de ácido nucleico desde la posición 81 hasta 419 codifica para la secuencia de la proteína de enovina madura tras el tratamiento de la proforma de la proteína en el sitio de tratamiento RXXR presente en la proforma estable de dicha proteína de enovina.

Ventajosamente, la molécula de ácido nucleico según la invención puede usarse para expresar el factor de crecimiento neurotrófico humano según la invención, en una célula huésped o similar usando un vector de expresión apropiado.

Un vector de expresión incluye vectores que pueden expresar el ADN unido de manera funcional a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que pueden efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN.

Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras para unir ARN polimerasa y secuencias de inicio de la transcripción para la unión de ribosomas. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano puede incluir un promotor tal como el promotor lac y para el inicio de la transcripción la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG. De manera similar, un vector de expresión eucariótico puede incluir un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación en sentido 3', el codón de inicio AUG, y un codón de terminación para la separación del ribosoma. Los vectores de este tipo pueden obtenerse comercialmente o montarse a partir de las secuencias descritas mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Por tanto, un vector de expresión se refiere a un constructo de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que al introducirse en una célula huésped apropiada da como resultado la expresión de los fragmentos de DNA o ARN. Los vectores de expresión apropiados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que pueden replicarse en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que se integran dentro del genoma de la célula huésped.

La molécula antisentido que puede hibridarse con el ácido nucleico puede usarse como sonda o como medicamento o en una composición farmacéutica.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden insertarse dentro de los vectores descritos en una orientación antisentido con el fin de proporcionar la producción de ARN antisentido. El ARN antisentido u otros ácidos nucleicos antisentido pueden producirse mediante medios sintéticos.

La incorporación de ADN clonado en un vector de expresión adecuado para la posterior transformación de células y posterior selección de las células transformadas se conoce bien por los expertos en la técnica, tal como se proporciona en Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning, A Laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory

Press.

El término "transgén que puede expresar" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos adecuada que conduce a la expresión de un factor neurotrófico que tiene la misma función y/o actividad que un factor neurotrófico según la invención. El transgén puede incluir, por ejemplo, ácido nucleico genómico aislado a partir de células humanas o ácido nucleico sintético incluyendo ADNc, integrado dentro del cromosoma o en un estado extracromosomal.

Preferiblemente, el transgén comprende un vector, vector que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho factor neurotrófico, o un fragmento funcional de dicha molécula de ácido nucleico. Un "fragmento funcional" de dicho ácido nucleico debe considerarse como que significa un fragmento del gen o ADNc que codifica para dicho factor neurotrófico o un equivalente funcional del mismo, fragmento que puede expresarse para producir un factor de crecimiento neurotrófico funcional según la invención. Por tanto, por ejemplo, los fragmentos del factor de crecimiento neurotrófico según la invención que corresponden a residuos de aminoácidos específicos que interaccionan con el receptor correspondiente también forman parte de la presente invención y son fragmentos que pueden servir para funcionar como agonistas que activan el receptor correspondiente del factor de crecimiento según la invención de modo que provocan sus efectos de promoción del crecimiento y mantenimiento de la supervivencia sobre las células. Este aspecto también incluye isoformas diferenciadas mediante corte y empalme e inicios transcripcionales de los ácidos nucleicos según la invención.

Según la presente invención, un ácido nucleico definido incluye no sólo el ácido nucleico idéntico sino también cualquier variación menor de bases incluyendo en particular, sustituciones de bases que dan como resultado un codón sinónimo (un codón diferente que especifica el mismo residuo de aminoácido) debido al código degenerado en sustituciones de aminoácidos conservativas. El término "molécula de ácido nucleico" también incluye la secuencia complementaria a cualquier secuencia de cadena única dada con respecto a variaciones de bases.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona un factor de crecimiento neurotrófico humano aislado, codificado por una molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, el factor de crecimiento comprende una secuencia de aminoácidos desde la posición 27 hasta 139 de la secuencia de aminoácidos de la figura 1 o un bioprecursor, derivado o equivalente funcional de la misma.

Un "equivalente funcional" tal como se define en el presente documento debe considerarse como que significa un factor de crecimiento que muestra todas las propiedades de crecimiento y funcionalidad asociadas con el factor de crecimiento enovina. Un "derivado" de enovina tal como se define en el presente documento se pretende que incluya un polipéptido en el que se han alterado o eliminado o sustituido ciertos aminoácidos con otros aminoácidos y polipéptido que conserva la actividad biológica de la enovina y/o polipéptido que puede reaccionar con anticuerpos preparados usando enovina según la invención como antígeno de exposición.

Se abarcan dentro del alcance de la presente invención los híbridos y formas modificadas de enovina, incluyendo fragmentos y proteínas de fusión. Los híbridos y formas modificadas incluyen, por ejemplo, cuando se han sometido ciertos aminoácidos a alguna modificación o sustitución, tal como por ejemplo, mutación puntual, pero modificaciones que todavía dan como resultado una proteína que conserva la actividad biológica de la enovina, según la invención. Las secuencias de ácidos nucleicos específicas pueden alterarse por aquellos expertos en la técnica para producir un factor de crecimiento que muestra las mismas o sustancialmente las mismas propiedades que la enovina.

Tal como se sabe bien en la técnica, muchas proteínas se producen *in vivo* con una secuencia (pre)señal en el extremo N-terminal de la proteína. Además, tales proteínas pueden comprender una prosequencia adicional que representa un precursor estable para la proteína madura. Tales pre y prosequencias no son generalmente necesarias para la actividad biológica. La molécula de enovina según la invención incluye no solo la secuencia de longitud completa ilustrada en la figura 21 sino también desde la posición 27 hasta 139, que sigue al sitio de tratamiento proteolítico RXXR presente en factores de crecimiento de este tipo y que se cree que representa la secuencia madura de enovina.

Una proteína, polipéptido o secuencia de aminoácidos definidos según la invención incluyen no sólo la secuencia de aminoácidos idéntica sino también isómeros de la misma además de variaciones menores de aminoácidos a partir de la secuencia natural de aminoácidos incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas (una sustitución por un aminoácido que está relacionado en sus cadenas laterales). También se incluyen secuencias de aminoácidos que varían del aminoácido natural pero dan como resultado un polipéptido que es inmunológicamente idéntico o similar al polipéptido codificado por la secuencia que se produce en la naturaleza.

Los factores de crecimiento neurotrófico expresados por las células huésped según la invención también están abarcados dentro de la presente invención.

La presente invención se refiere adicionalmente a la inhibición del factor de crecimiento neurotrófico según la invención *in vivo* mediante el uso de tecnología antisentido. Puede usarse la tecnología antisentido para controlar la

- expresión génica a través de la formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, ambos métodos basados en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte de la secuencia de ADN que codifica para la proteína madura de la presente invención se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de desde 10 hasta 50 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee y otros Nucl. Acids. Res., 6:3073 (1979); Cooney y otros, Science, 241:456 (1988); y Dervan y otros, Science, 251: 1360 (1991), impidiendo de este modo la transcripción y la producción de enovina. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de una molécula de ARNm para dar enovina.
- Debido a la similitud de secuencia entre el factor de crecimiento descrito en el presente documento con factores de crecimiento previamente identificados de la familia de GDNF, también se cree que la enovina puede promover el crecimiento y la supervivencia celular y en tratamientos de trastornos que resultan de defectos en la función o expresión de dicho factor neurotrófico.
- Ventajosamente, las moléculas de ácido nucleico o el factor neurotrófico según la invención pueden, usarse por tanto para tratar o prevenir trastornos neurales en un sujeto administrando a dicho sujeto una cantidad de una molécula de ácido nucleico o factor de crecimiento según la invención a una concentración suficiente para reducir los síntomas de dicho trastorno. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden usarse para promover el mantenimiento y la supervivencia de las células neuronales y para tratar trastornos neuronales o estados neurodegenerativos incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo nervioso periférico y central o lesión y exposición a neurotoxinas.
- Ventajosamente, se ha observado que el factor de crecimiento neurotrófico según la invención confiere un efecto neurotrófico o neuroprotector sobre poblaciones de células o células neuronales, particularmente las poblaciones de células o células neuronales que se han inducido para experimentar apoptosis. En consecuencia, el ácido nucleico o el propio factor de crecimiento de enovina según la invención pueden usarse adicionalmente en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, neuropatía periférica, lesión cerebral aguda, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo nervioso periférico, lesión por exposición a neurotoxinas, neoplasia endocrina múltiple, enfermedad de Hirschsprung familiar, enfermedades asociadas con prión, enfermedad de Creutzfeld-Jacob mediante la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad de dicho ácido nucleico o enovina a una concentración suficiente para reducir o prevenir los síntomas de los trastornos neurales descritos en el presente documento.
- Un método alternativo para tratar los trastornos nerviosos descritos anteriormente comprende implantar en células sujeto que expresan un factor de crecimiento neurotrófico humano según la invención tal como la célula transgénica descrita en el presente documento.
- Las moléculas de ácido nucleico y factor de crecimiento neurotrófico según la invención también pueden incluirse en una composición farmacéutica junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para la misma.
- Ventajosamente, pueden prepararse anticuerpos frente al factor neurotrófico de la presente invención mediante técnicas que se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos policlonales inoculando en un animal huésped, tal como un ratón, el factor de crecimiento o un epítipo del mismo y recuperando el suero inmunitario. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales según técnicas conocidas tales como las descritas por Kohler R. y Milstein C., Nature (1975) 256, 495-497.
- Ventajosamente, los anticuerpos según la invención pueden usarse en un método de detección para la presencia de un factor de crecimiento según la invención, método que comprende hacer reaccionar el anticuerpo con una muestra e identificar cualquier proteína unida a dicho anticuerpo. También se proporciona un kit para realizar dicho método que comprende un anticuerpo según la invención y medios para hacer reaccionar el anticuerpo con dicha muestra.
- Las proteínas que interactúan con el factor neurotrófico de la invención, tales como por ejemplo su receptor celular correspondiente, pueden identificarse investigando las interacciones proteína-proteína usando el sistema de vector de dos híbridos que se conoce bien por los biólogos moleculares (Fields y Song, Nature 340:245 1989). Esta técnica se basa en la reconstitución funcional *in vivo* de un factor de transcripción que activa un gen indicador. Más particularmente la técnica comprende proporcionar a una célula huésped apropiada un constructo de ADN que comprende un gen indicador bajo el control de un promotor regulado por un factor de transcripción que tiene un dominio de unión a ADN y un dominio de activación, expresar en la célula huésped una primera secuencia de ADN híbrido que codifica para una primera fusión de un fragmento o toda una secuencia de ácidos nucleicos según la invención y o bien dicho dominio de unión a ADN o bien dicho dominio de activación del factor de transcripción, expresar en el huésped al menos una segunda secuencia de ADN híbrido, tal como una biblioteca o similar, que codifica para posibles proteínas de unión que van a investigarse junto con el dominio de activación o de unión a ADN del factor de transcripción que no se incorpora en la primera fusión; detectar cualquier unión de las proteínas que van a investigarse con una proteína según la invención detectando la presencia de cualquier producto de gen indicador en la célula huésped; aislar opcionalmente segundas secuencias de ADN híbrido que codifican para la

proteína de unión.

Un ejemplo de una técnica de este tipo utiliza la proteína GAL4 en la levadura. GAL4 es un activador transcripcional del metabolismo de la galactosa en la levadura y tiene un dominio separado para la unión a activadores en sentido 5' de los genes del metabolismo de la galactosa así como un dominio de unión a proteína. Pueden construirse vectores de nucleótido, uno de los cuales comprende los residuos de nucleótido que codifican para el dominio de unión a ADN de GAL4. Estos residuos de dominio de unión pueden condensarse con una secuencia de codificación de proteínas conocida, tal como por ejemplo los ácidos nucleicos según la invención. El otro vector comprende los residuos que codifican para el dominio de unión a proteína de GAL4. Estos residuos se condensan con residuos que codifican para una proteína de prueba, preferiblemente de la ruta de transducción de señales del vertebrado en cuestión. Cualquier interacción entre el factor neurotrófico codificado por el ácido nucleico según la invención y la proteína que va a someterse a prueba conduce a la activación transcripcional de una molécula indicadora en una célula de levadura deficiente para la transcripción de GAL-4 en la que se han transformado los vectores. Preferiblemente, una molécula indicadora tal como  $\beta$ -galactosidasa se activa con la restauración de la transcripción de los genes del metabolismo de la galactosa de la levadura.

Se ha identificado el receptor para la enovina por los presentes inventores como GFR $\alpha$ 3. Por tanto pueden prepararse ensayos para identificar compuestos agonistas o antagonistas de enovina. Este ensayo también puede usarse en asociación con otros factores de crecimiento neurotróficos y sus correspondientes receptores. Los compuestos identificados pueden usarse para tratar o prevenir trastornos tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, trastornos neuronales asociados con secuencias de poliglutamina extendidas, tales como la enfermedad de Huntingdon, neuropatía periférica, lesión cerebral aguda, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo nervioso periférico o lesión por exposición a neurotoxinas, neoplasia endocrina múltiple y enfermedad de Hirschsprung familiar, enfermedades asociadas con prión, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, accidente cerebrovascular, síndromes del dolor con un componente sustancialmente neurógeno central o periférico, enfermedades reumáticas/inflamatorias así como trastornos de la conducta mediante la administración a un individuo de una cantidad de dicho agonista o antagonista en una concentración suficiente para prevenir o tratar dichos trastornos neuronales. Tales compuestos también pueden incluirse en composiciones farmacéuticas junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para la misma.

Los agonistas o antagonistas de un factor de crecimiento (tal como por ejemplo enovina) pueden identificarse en una realización poniendo en contacto una célula, tejido u organismo que expresa un receptor apropiado y cRET con un compuesto candidato en presencia del factor de crecimiento y comparando los niveles de activación de RET activación en dicha célula, tejido u organismo con un control que no se ha puesto en contacto con dicho compuesto candidato.

Tal como se observará en más detalle a partir de los siguientes ejemplos, la enovina ha reducido satisfactoriamente los déficits sensoriales inducidos por taxol. Por tanto, la enovina puede desempeñar un posible papel en síndromes del dolor con un componente sustancialmente neurógeno central y periférico, enfermedades reumáticas así como trastornos de la conducta y pueden desempeñar un papel modulador en procesos sensoriales tras la aplicación transdérmica, tópica, central local (tal como epidural, intratecal, icv, intraplexo, intraneuronal) por vía oral, rectal y sistémica. Por tanto, de la misma manera en que se describió en el presente documento para otros estados mediados por enovina, estos estados pueden aliviarse o incluso prevenirse mediante la administración de o bien una molécula antisentido, un ácido nucleico, proteína de enovina, composición farmacéutica, o bien un compuesto identificado como un agonista o un antagonista, según sea apropiado, según la invención, en concentraciones suficientes para aliviar o prevenir los síntomas de dicho(s) trastorno(s).

Las composiciones farmacéuticas o terapéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica incluyendo por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intratecal o intracerebral o administración a células en protocolos de tratamiento *ex vivo*. La administración puede ser o bien rápida tal como por inyección o bien a lo largo de un periodo de tiempo tal como mediante infusión lenta o administración de formulación de liberación lenta. Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede ser mediante inyección o infusión dentro del líquido cefalorraquídeo (LCR).

La enovina también puede unirse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacodinámicas o farmacéuticas deseables. Por ejemplo, puede acoplarse con cualquier sustancia conocida en la técnica para promoverse la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica tal como un anticuerpo frente al receptor de transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa.

La enovina, las moléculas antisentido pueden usarse en forma de una composición farmacéutica, que puede prepararse según procedimientos bien conocidos en la técnica. Las composiciones preferidas incluyen un vehículo o diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como por ejemplo, una solución salina fisiológica. Pueden usarse otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyendo sales no tóxicas, agua estéril o similares. También puede estar presente un tampón adecuado que permite que se liofilicen y almacenen las composiciones en condiciones estériles antes de la reconstitución mediante la adición de agua estéril para su posterior administración.

Puede llevarse a cabo la incorporación de enovina dentro de una matriz sólida o semisólida biológicamente compatible, la cual puede implantarse dentro de tejidos que requieren tratamiento.

5 El vehículo también puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar otras condiciones tales como pH, osmolaridad, viscosidad, esterilidad, lipofiliidad, solubilidad o similares. También pueden incluirse excipientes farmacéuticamente aceptables que permiten la liberación sostenida o retrasada tras la administración.

10 La proteína de enovina o las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse por vía oral. En esta realización, pueden encapsularse y combinarse con vehículos adecuados en formas farmacéuticas sólidas que se conocerán bien por los expertos en la técnica.

15 Tal como conocerán bien los expertos en la técnica, la pauta posológica específica puede calcularse según el área superficial del corporal del paciente o el volumen del espacio corporal que va a ocuparse, dependiendo de la vía particular de administración que va a usarse. Sin embargo, la cantidad de la composición realmente administrada se determinará por un médico, basándose en las circunstancias relacionadas con el trastorno que va a tratarse, tales como la gravedad de los síntomas, la composición que va a administrarse, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual y la vía de administración elegida.

20 La presente invención puede entenderse más claramente mediante los siguientes ejemplos que se facilitan puramente a modo de ejemplo y mediante referencia a los dibujos que se acompañan en los que:

25 La figura 1: es una secuencia de ADNc parcial de un factor neurotrófico según la invención denominada enovina. Esta secuencia consenso se obtuvo mediante amplificación por PCR con cebadores PNHsp3 y PNHap1 sobre diferentes ADNc y sobre ADN genómico seguido de clonación y análisis de secuencias y comparación de las secuencias obtenidas. La secuencia de aminoácidos en código de una letra prevista se muestra encima de la secuencia de ADN. El número de residuo de nucleótido se muestra a la derecha de la secuencia de ADN, mientras que el número del residuo de aminoácido se muestra a la derecha de la secuencia de proteínas traducida. El posible sitio de escisión RXXR para el prodominio se indica en **negrita** y subrayado. El posible inicio de la proteína madura se indica mediante una flecha. Los siete residuos de cisteína conservados característicos de todos los miembros de la familia de TGF- $\beta$  se indican en **negrita**. Se subraya dos veces un sitio de N-glicosilación potencial.

35 La figura 2: es una alineación de las secuencias de proteína madura prevista de GDNF humano, NTN, PSP y EVN. Estas secuencias se alinean utilizando el programa de alineación ClustalW. Los residuos de aminoácidos conservados entre las tres proteínas se incluyen en las zonas en negro. Los residuos conservados entre dos o tres de las secuencias se sombrean en gris. Los 7 residuos de cisteína conservados característicos para los miembros de la familia de TGF- $\beta$  se indican mediante asteriscos sobre la secuencia. Los residuos de aminoácidos se enumeran a la derecha. Los guiones indican huecos introducidos en la secuencia para optimizar la alineación.

40 La figura 3: es una secuencia de ADNc parcial de enovina. La secuencia consenso se obtuvo mediante amplificación por PCR (PCR primaria con los cebadores PNHsp1 y PNHap1 y PCR anidada con los cebadores PNHsp2 y PNHap2) sobre diferentes ADNc seguido de la clonación y análisis de secuencia y comparación de las secuencias obtenidas. La secuencia de aminoácidos en código de una letra traducida de los nucleótidos 30 a 284 (marco de lectura A) se muestra sobre la secuencia y se numera a la derecha (de A1 a A85). Este marco de lectura contiene un posible codón de inicio de la traducción ATG. La secuencia de aminoácidos en código de una letra traducida de los nucleótidos 334 a 810 (marco de lectura B) se muestra encima de la secuencia y se numera a la derecha (de B1 a B159). Este marco de lectura contiene la región de homología con GDNF, NTN y PSP. El número de residuo de nucleótido se muestra a la derecha de la secuencia de ADN. El posible sitio de escisión RXXR para el prodominio se indica en **negrita** y subrayado. El posible inicio de la proteína madura se indica mediante una flecha. Los siete residuos de cisteína conservados característicos para todos los miembros de la familia de TGF- $\beta$  se indican en **negrita**. Se subraya dos veces un sitio de N-glicosilación potencial.

55 La figura 4: es una ilustración de la ubicación cromosómica de la enovina humana. (A) Diagrama de los resultados de mapeo mediante FISH para la enovina. Cada punto representa las dobles señales de FISH detectadas sobre el cromosoma humano 1, región p31.3-p32. (B) Ejemplo de mapeo mediante FISH de la enovina. El panel izquierdo muestra las señales de FISH sobre el cromosoma 1. El panel derecho muestra la misma figura mitótica teñida con 4',6-diamidino-2-fenilindol para identificar el cromosoma 1.

60 La figura 5: es una ilustración de la expresión de la enovina en diferentes tejidos humanos. (A), (B), (C) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Northern de la expresión de la enovina. La expresión del ARNm de enovina en diferentes tejidos humanos se evaluó usando una sonda correspondiente a parte de la región codificante de la enovina (incluyendo la región que codifica para la proteína de enovina madura) para analizar las inmunotransferencias de ARN rico en poli(A) humano. (A) Inmunotransferencia de tipo Northern de tejidos múltiples ("Multiple Tissue Northern") (MTN); (B) inmunotransferencia de tipo MTN II; (C) inmunotransferencia de tipo MTN fetal II. El panel (D) muestra una autoradiografía de la inmunotransferencia master ("master blot") de ARN humano usando como sonda el mismo fragmento de ADNc de la enovina. El panel (E) muestra la ubicación de las muestras de

ARNm de tejido humano sobre la inmunotransferencia master de ARN de (D).

La figura 6: es una ilustración gráfica de la supervivencia total de las células SH-SY5Y tras 72 horas de tratamiento con taxol  $10^{-6}$  M y el efecto de aumentar las dosis de enovina sobre esta supervivencia, normalizado para la condición del disolvente. Se diferencian las células SH-SY5Y durante 5 días con estaurosporina 25 nM antes de la aplicación de taxol. Los datos son de dos experimentos independientes repetidos seis veces. Se muestran la desviación estándar y la media.

La figura 7: es una representación gráfica del efecto de concentraciones crecientes de enovina a lo largo de 48 horas sobre el crecimiento de neurita de células SH-SY5Y diferenciadas con estaurosporina, normalizado para la condición del disolvente. Las células SH-SY5Y se diferencian durante 5 días con estaurosporina 25 nM antes de iniciar el experimento de 48 horas. Como control positivo, se muestra el efecto de diferenciación de estaurosporina 25 nM. Se calcula la longitud de neurita sobre al menos 5.000 células. Los datos se proporcionan a partir de experimentos realizados por duplicado. Se muestran la desviación estándar y la media.

Las figuras 8 a 18: son representaciones gráficas del efecto de la enovina sobre la proliferación de diversos tipos de células.

La figura 19: es una representación gráfica de los efectos de la enovina sobre déficits sensoriales inducidos por taxol usando la prueba de pinchazo ("pin prick"). Se facilitan las puntuaciones acumulativas promedio ( $\pm 1$  EEM) a lo largo del tiempo de ratas tratadas o bien con 2 dosis diferentes de enovina (23 ó 130  $\mu\text{g/ml}$ ;  $n = 10$  ratas/grupo) o vehículo/solución salina ( $n = 20$  ratas) tras taxol. La enovina o solución salina/vehículo se inyectaron en un volumen de 75  $\mu\text{l}$  en la zona subplantar de la pata trasera derecha.

La figura 20: es una representación gráfica de los efectos de la enovina sobre los déficits sensoriales inducidos por taxol usando la prueba de pinchazo. Se facilitan las puntuaciones acumulativas promedio ( $\pm 1$  EEM) a lo largo del tiempo de ratas tratadas o bien con 2 dosis diferentes de enovina (23 ó 130  $\mu\text{g/ml}$ ;  $n = 10$  ratas/grupo) o vehículo/solución salina ( $n = 20$  ratas) antes del taxol. La enovina o solución salina/vehículo se inyectaron en un volumen de 75  $\mu\text{l}$  en la zona subplantar de la pata trasera derecha.

La figura 21: es una secuencia de ADN de la enovina. La secuencia consenso se obtuvo mediante amplificación por PCR usando los cebadores PNHsp5 y PNHap1 sobre ADNc de la corteza frontal humana y sobre ADN genómico humano seguido por la clonación, análisis de secuencias y comparación de las secuencias resultantes. La secuencia de aminoácidos prevista se muestra sobre la secuencia de ADN sólo para la variante de corte empalme secuencia que da una proteína de enovina funcional tras la traducción. El número de residuo de nucleótido se muestra a la izquierda de la secuencia de ADN, mientras que el número de residuo de aminoácido se muestra a la derecha de la secuencia de la proteína traducida. Los sitios de corte y empalme en 5' y 3' detectados mediante comparación de los fragmentos de ADNc secuenciados con la secuencia genómica se indican mediante líneas verticales que se doblan hacia la izquierda o la derecha, respectivamente, y se numeran de manera consecutiva. El posible sitio de escisión de furina RXXR para el prodominio se indica en negrita y subrayado. El posible inicio de la proteína madura se indica mediante una flecha. Los siete residuos de cisteína conservados característicos para todos los miembros de la familia de TGF- $\beta$  se indican en negrita. Se subraya dos veces un sitio de glicosilación unido a N potencial. Los sitios de corte y empalme en 5' y 3' se numeran y rodean con un círculo.

La figura 22: es una ilustración de la expresión de diferentes variantes de corte y empalme de la enovina en tejidos humanos. (A) Diagrama esquemático de las variantes de corte y empalme de la enovina identificadas mediante experimentos de RT-PCR con cebadores específicos para enovina sobre ARN derivado de diferentes tejidos humanos seguido por la clonación y análisis de secuencias de los productos de PCR. La línea superior muestra una escala (en pb). La segunda línea representa la secuencia genómica de enovina. Se indica la posición de los codones de inicio y detención de la traducción, del inicio de la secuencia que codifica para la enovina madura y de los sitios de corte y empalme de 5' y 3' (véase la figura 21). La parte derecha de la figura muestra los productos de PCR obtenidos mediante RT-PCR sobre ARN de ovarios y de corteza frontal junto con un marcador ("ladder") de ADN de 100 pb. La posición de las diferentes variantes de ARNm se indica junto con su tamaño (desde el codón de inicio hasta el de detención). Las proteínas traducidas se muestran en la parte izquierda. Las cajas delimitan regiones representadas en el ADNc. Las líneas discontinuas representan ADN genómico eliminadas mediante corte y empalme. La región sombreada representa la secuencia que codifica para enovina madura. La línea de puntos marca el inicio de la secuencia que codifica para enovina madura. Los dos transcritos que pueden dar proteína de enovina funcional se indican mediante un asterisco en la parte izquierda. (B) Distribución en tejidos de las variantes de corte y empalme principales. La fotografía muestra fragmentos de PCR obtenidos mediante RT-PCR con cebadores específicos para enovina sobre diferentes ADNc humanos. Las 4 variantes de corte y empalme principales (A a D) se indican mediante flechas en la parte izquierda. Los tamaños se indican en la parte derecha basándose en el marcador ("ladder") de ADN de 100 pb usado como referencia de tamaño en el gel.

La figura 23: Secuencia de proteína prevista de la variante de corte y empalme larga de enovina, obtenida eliminando mediante corte y empalme los dos intrones de la secuencia de ADN de la figura 21. Se usan los sitios de

corte y empalme 5'-1 y 3'-1 para eliminar el primer intrón y se usan los sitios de corte y empalme 5'-2 y 3'-3 para eliminar el segundo intrón. Esto da como resultado una secuencia de ADNc que tiene un marco de lectura abierto que codifica para la proteína de 228 residuos de aminoácidos mostrada anteriormente.

5 La figura 24: Secuencia de proteína prevista de una variante de corte y empalme alternativa (corta) de enovina, obtenida eliminando mediante corte y empalme los dos intrones de la secuencia de ADN de la figura 21. Se usan los sitios de corte y empalme 5'-1 y 3'-2 para eliminar el primer intrón y se usan los sitios de corte y empalme 5'-2 y 3'-3 para eliminar el segundo intrón. Esto da como una secuencia de ADNc que tiene un marco de lectura abierto que codifica para la proteína de 220 residuos de aminoácidos mostrada anteriormente. Esta secuencia de proteína  
10 carece de 8 residuos de aminoácidos comparada con la secuencia de la figura 23.

La figura 25: es una representación gráfica de los resultados obtenidos de experimentos diseñados para comparar los niveles de expresión de enovina en tejido normal enfermo. La expresión de enovina y GAPDH se representa en tejido cerebral, con respecto a esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer.

15 La figura 26: es una representación gráfica de los resultados obtenidos para detectar los niveles de expresión de enovina y GAPDH en la enfermedad de Parkinson y el cáncer.

### DEPÓSITOS

20 El plásmido EVNmat/pRSETB que incluye la secuencia de ADN que codifica para la enovina, se depositó el 6 de mayo de 1999 con el número de registro LMBP3931, en la Colección Coordinada Belga de Microorganismos ("Belgian Coordinated Collections of Micro-Biologie") (BCCM) en el "Laboratorium voor Moleculaire – Plasmidencollectie" (LMBP) B9000, Ghent, Bélgica, de acuerdo con las estipulaciones del Tratado de Budapest del  
25 28 de Abril de 1997.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Materiales

30 Taq polimerasa nativa, ampicilina, IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) y todas las enzimas de restricción usadas eran de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). La mezcla de dNTP 10 mM se compró a Life Technologies (Gaithersburg, MD, EE.UU.). El kit de clonación TOPO-TA cloning se compró a Invitrogen BV (Leek, Países Bajos). El mini o midi kit de purificación de ADN de plásmido  
35 Qiagen, el kit Qiaprep Spin Miniprep y el kit de extracción en gel Qiaquick se compraron a Qiagen GmbH (Dusseldorf, Alemania). Las bibliotecas de ADNc, kits de ADNc Maratón® Ready, inmunotransferencias de tipo Northern de tejido múltiple de paneles I y II de ADNc de tejido múltiple (MTC®) humano y el kit de PCR de ADNc Advantage-GC se obtuvieron de Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, EE.UU.). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador 9600 de sistema de PCR GeneAmp (Perkin Elmer, Foster City, CA, EE.UU.). El medio LB (Luria-Bertani) consiste en 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl. Las placas de 2x  
40 YT/ampicilina consisten en 16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar y 100 mg/l de ampicilina.

#### Búsqueda de homología en base de datos y comparación de secuencias

45 Usando secuencias de proteínas derivadas de ADNc del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial humana completa (GDNF; número de registro Q99748), de neurturina (NTN; número de registro P39905) y de persefina (PSP; número de registro AF040962) como secuencias de consulta, se realizó una búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul y otros, 1990) sobre la actualización diaria de etiquetas de secuencia expresada (EST) humanas de EMBL/GenBank y bases de datos genómicos.  
50

Se realizaron búsquedas BLAST adicionales usando la secuencia genómica con número de registro AC005038 y se detectaron varias EST presentes en la base de datos GenBank y que mostraban homología con esta secuencia.

55 Se calculó el porcentaje de identidad y porcentaje de similitud entre miembros de la familia de GDNF mediante comparación por parejas de las secuencias usando el programa BESTFIT (paquete de software Genetics Computer Group sequence analysis, versión 8.0, University of Wisconsin, Madison, WI, EE.UU.). Las alineaciones de secuencias de proteína o ADN se realizaron con el programa de alineación ClustalW (EMBL, Heidelberg, Alemania).

#### Síntesis de oligonucleótidos para PCR y secuenciación de ADN

60 Todos los cebadores de oligonucleótidos se encargaron a Eurogentec (Seraing, Bélgica). Los cebadores de secuenciación específicos de insertos (15 y 16 -meros) y cebadores para su uso para reacciones de PCR se diseñaron manualmente. Se preparó el ADN en columnas de intercambio aniónico Qiaquick-20 ó -100 o de centrifugado Qiaquick (Qiagen GmbH, Dusseldorf, Alemania) y se recuperaron de las columnas en 30 µl de tampón  
65 TE (Tris.HCl 10 mM, EDTA 1 mM (sal de sodio), pH 8,0).

Las reacciones de secuenciación se realizaron sobre ambas cadenas usando el kit de secuenciación ABI prism BigDye Terminator Cycle y se ejecutaron en un secuenciador Applied Biosystems 377XL (Perkin Elmer, ABI Division, Foster City, CA, EE.UU.). Se usó el *software* Sequencher® para un montaje secuencial y edición manual (GeneCodes, AnnArbor, MI, EE.UU.).

Clonación de un homólogo de GDNF novedoso

Se usó una región de ADN que abarca de los nucleótidos 67411 a 68343 de EMBL, número de registro AC005038, cuya secuencia de proteína traducida era homóloga a la PSP y NTN maduras, para diseñar cebadores de oligonucleótidos para la amplificación por PCR. Los diferentes cebadores usados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Cebadores usados para la amplificación por PCR de fragmentos de AC005038

Nombre de cebador	Secuencia de cebador
PNHsp1	5'-CGGTGCACTCAGGTGATTCCTCC-3'
PNHsp2	5'-GGCAGCAAACCCATTATACTGGAACC-3'
PNHsp3	5'-CGCTGGTGCAGTGGAAGAGCC-3'
PNHsp4	5'-CTGCACCCCATCTGCTCTTCC-3'
PNHap1	5'-GCAGGAAGAGCCACCGGTAAGG-3'
PNHap2	5'-CCAGTCTGCAAAGCCCTGGAGC-3'

Los cebadores PNHsp3 y PNHap1 se usaron para amplificar un fragmento de 502 pb sobre ADNc derivado de diferentes tejidos humanos (ADNc Marathon-Ready® de cerebro fetal, feto completo, próstata o pulmón (Clontech Laboratories), ADNc de corteza frontal, hipocampo y cerebelo) y sobre ADN genómico humano. Basándose en la secuencia genómica de la base de datos EMBL/GenBank (número de registro AC005038), se previó que el fragmento que iba a amplificarse tenía un contenido de G+C del 76%. Por tanto, se realizaron las amplificaciones usando el kit de PCR para ADNc Advantage-GC (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE.UU.) optimizado para la amplificación de la secuencia de ADN rica en GC. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón de reacción de PCR para ADNc con GC 1x, dNTP 0,2 mM, GC-MELT® 1 M, 200 nM de cebadores PNHsp3 y PNHapl, 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage KlenTaq y de 1 a 5 µl de ADNc o 0,5 µg de ADN genómico. Se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5 min y se realizó la ciclización durante 45 s a 95°C, 1 min a 58°C y 40 s a 72°C durante 35 ciclos, con una etapa final de 7 min a 72°C. Finalmente, se trataron las muestras con 2,5 U de ADN polimerasa Taq nativa para añadir una proyección de A. Se analizaron los productos de PCR sobre un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (sal de sodio), pH 8,3). Los fragmentos de PCR del tamaño esperado (495 pb) se escindieron del gel y se purificaron con el kit de extracción en gel Qiaquick. Los fragmentos de PCR se secuenciaron para confirmar su identidad y se clonaron en el vector de plásmido pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA según las instrucciones del fabricante. Se combinaron aproximadamente 20 ng de fragmento purificado con 1 µl de vector pCR2.1-TOPO en un volumen total de 5 µl. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min. Se transformaron 2 µl de la reacción en células competentes TOP10F' (Invitrogen BV) usando la transformación por choque térmico y se recubrieron en placas sobre placas de 2x YT/ampicilina complementadas con IPTG 10 mM y X-gal al 2% (p/v) para la selección de azul-blanco. Se recogieron las colonias blancas de las placas tras el crecimiento durante la noche, se dejaron crecer en 5 ml de medio LB complementado con 100 mg/l de ampicilina y ADN de plásmido preparado usando el kit Qiaprep Spin Miniprep. Se confirmó la presencia de un inserto del tamaño esperado mediante digestión de restricción con *EcoRI*. El inserto de plásmido de varios clones positivos se secuenció y se compararon las secuencias obtenidas usando el programa de alineación ClustalW.

Para obtener una secuencia codificante adicional para el homólogo de GDNF novedoso, se amplificó un fragmento con un tamaño esperado de 931 pb basándose en la secuencia de EMBL/GenBank (número de registro AC005038) mediante PCR usando los cebadores PNHspl y PNHapl. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón de reacción de PCR para ADNc con GC 1x, dNTP 0,2 mM, GC-MELT® 1 M, 200 nM de cebadores PNHspl y PNHapl, 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage KlenTaq y de 1 a 5 µl de ADNc del cerebelo, corteza frontal o hipocampo o 0,5 µg de ADN genómico. Se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5 min y se realizó la ciclización durante 45 s a 95°C, 1 min a 58°C y 1 min 30 s a 72°C durante 35 ciclos, con una etapa final de 7 min a 72°C. Se analizaron los productos de PCR sobre un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (sal de sodio), pH 8,3). Se realizó una segunda ronda de amplificación con cebadores anidados (PNHsp2 y PNHap2). Se usó 1 µl de la primera ronda de reacción de amplificación en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón de reacción de PCR para ADNc con GC 1x, dNTP 0,2 mM, GC-MELT® 1 M, 200 nM de cebadores PNHsp2 y PNHap2 y 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage KlenTaq. Se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5 min y se realizó la ciclización durante 45 s a 95°C, 1 min a 58°C y 1 min 30 s a 72°C durante 35 ciclos, con una etapa final de 7 min a 72°C. Se analizaron las muestras sobre un gel de agarosa al

1% (p/v) en tampón TAE 1x. Se escindieron los fragmentos de PCR del tamaño esperado (870 pb) del gel y se purificaron con el kit de extracción en gel Qiaquick. Se secuenciaron los fragmentos de PCR para confirmar su identidad, se trataron con 2,5 U de polimerasa Taq y se clonaron dentro del vector de plásmido pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA según las instrucciones del fabricante. Se combinaron aproximadamente 20 ng de fragmento purificado con 1 µl de vector pCR2.1-TOPO en un volumen total de 5 µl. Se incubaron los reactivos a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min. Se transformaron 2 µl de las reacciones dentro de células competentes TOP10F' usando la transformación mediante choque térmico y se recubrieron en placas sobre placas de 2x YT/ampicilina complementadas con IPTG 10 mM y X-gal al 2% (p/v) para la selección de azul-blanco. Se recogieron las colonias blancas de las placas tras el crecimiento durante la noche, se hicieron crecer en 5 ml de medio LB complementado con 100 mg/l de ampicilina y ADN de plásmido preparado usando el kit Qiaprep Spin Miniprep. Se confirmó la presencia de un inserto del tamaño esperado mediante digestión de restricción con EcoRI. Se secuenció el inserto de plásmido de diversos clones positivos y se compararon las secuencias usando el programa de alineación ClustalW.

#### 15 Análisis de la expresión génica de enovina mediante análisis de RT-PCR

Se usaron los cebadores de oligonucleótidos PNHsp3 y PNHapl (véase la tabla 1) para la amplificación por PCR específica de un fragmento de 502 pb de enovina. Las amplificaciones por PCR se realizaron sobre un panel de ADNc de tejido múltiple (MTC®) humano normalizados para los niveles de expresión de ARNm de seis genes de mantenimiento diferentes. Las reacciones de PCR con cebadores específicos para enovina se realizaron en un volumen total de 50 µl, que contenía 5 µl de ADNc, tampón de reacción de PCR para ADNc con GC 1x, dNTP 0,2 mM, GC-MELT TM 1 M, 400 nM de cebadores PNHsp3 y PNHapl y 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage KlenTaq. Se calentaron las muestras hasta 95°C durante 30 s y se realizó la ciclización durante 30 s a 95°C y 30 s a 68°C durante 35 ciclos. Se analizaron las muestras sobre un gel de agarosa al 1,2 % (p/v) en tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (sal de sodio), pH 8,3) y se obtuvieron imágenes de los gels teñidos con bromuro de etidio usando un sistema de vídeo Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.).

La búsqueda de similitud de la actualización diaria de la base de datos EMBL/GenBank con las secuencias de proteína de persefina y neurtrina humanas dio una secuencia de ADN genómico que codificaba para una posible proteína novedosa similar a los factores neurotróficos GDNF, NTN y PSP que se ha denominado enovina (EVN). La búsqueda de homología en bases de datos adicionales usando la secuencia de ADN genómico que rodea a la región que codifica para la enovina dio varios clones de etiquetas de secuencia expresada (EST) a partir de diferentes tejidos humanos (epitelio de la próstata [número de registro AA533512 (ID1322952)], carcinoma de pulmón [número de registro AA931637] y tumor paratiroideo [número de registro AA844072]). Estos clones contienen una secuencia de ADN fuera de la región de homología con GDNF, PSP o NTN, pero confirmaron que el ARNm de enovina se expresa en tejidos normales y tumorales.

La amplificación por PCR inicial usando cebadores (PNHsp3 y PNHapl) basados en la secuencia genómica dio un fragmento de ≈ 500 pb de ADNc de feto, cerebro fetal, próstata, corteza frontal, hipocampo, cerebelo y de ADNc genómico, pero no de ADNc de pulmón. La clonación y análisis de secuencias de estos fragmentos dio una secuencia de ADN de 474 pb que se traducía en una secuencia de proteína prevista de 139 residuos de aminoácido incluyendo siete residuos de cisteína conservados característicos de todos los miembros de la familia de proteínas del factor de crecimiento β transformante (TGF-β) (Kingsley, 1994) (figura 1). La secuencia también contenía un motivo RXXR para la escisión del prodominio (RAAR, posición de aminoácidos 23 a 26) (Barr, 1991). Un sitio de escisión similar está presente en las secuencias de proteína de GDNF, NTN y PSP, en una posición comparable de la secuencia de prodominio. Asumiendo que la escisión del prodominio de enovina se produce en este sitio *in vivo*, la secuencia de proteína de EVN madura contiene 113 residuos de aminoácidos (residuos 27 a 139 en la figura 1) y tiene una masa molecular calculada de 11965 Da y un punto isoelectrónico de 11,8. Hay un sitio de N-glicosilación potencial presente en la secuencia madura (NST en la posición de aminoácidos 121-123). Además, varias regiones conservadas entre las formas maduras de los factores neurotróficos conocidos GDNF, NTN y PSP también estaban presentes en la enovina (figura 2). La tabla 2 resume los resultados de la comparación de las secuencias de proteína maduras de los miembros de la familia de GDNF mediante el programa BESTFIT. Se muestran el porcentaje de identidad y el porcentaje de similitud. Las secuencias maduras de GDNF, NTN, PSP y EVN usadas en esta comparación comenzaban en el primer residuo de aminoácido tras el sitio de escisión RXXR.

Tabla 2: Comparación por parejas de miembros de la familia de GDNF humana maduros usando el programa BESTFIT

Comparación	% de identidad	% de similitud
EVN frente a GDNF	38,8	47,2
EVN frente a NTN	51	56,1
EVN frente a PSP	53,3	57,8
GDNF frente a NTN	44,8	57,3

GDNF frente a PSP	44,3	50
NTN frente a PSP	50	54,4

A partir de estas comparaciones, resulta claro que la proteína de enovina madura está más próximamente relacionada con persefina y neurturina que con GDNF.

5 La amplificación, clonación y análisis de secuencias de un fragmento más grande de la secuencia de ADN de enovina a partir de ADNc de corteza frontal usando cebadores basados en la secuencia genómica de EMBL/GenBank (número de registro AC005038) dio una secuencia de 819 pb (figura 3). Esta secuencia contiene un posible codón de inicio ATG en las posiciones de nucleótidos 30-32 y da un marco de lectura abierto (marco de lectura A en la figura 3) que se extiende hasta el codón de detención en las posiciones de nucleótidos 285-287. La  
10 secuencia de proteína traducida de esta región no muestra similitud con ninguna proteína conocida en las bases de datos. La traducción de la secuencia de ADNc en el segundo marco de lectura (marco de lectura B en la figura 3) da una secuencia de proteína prevista de 159 residuos de aminoácidos. Esta secuencia contiene el sitio de escisión RXXR (posición B43 a B46; posición de nucleótidos 460-471) y la secuencia correspondiente a la secuencia de enovina madura (posición B47 a B159; posición de nucleótidos 472-810). El marco de lectura abierto incluye el sitio  
15 de escisión RXXR y la secuencia que codifica para la enovina madura se extiende desde la posición de nucleótido 334 (precedida por un codón de detención en el marco) hasta un codón de detención en la posición 811-813, pero no contiene un codón ATG para iniciar un residuo de metionina. En analogía con la persefina (Milbrandt y otros, 1998) se realiza la hipótesis de que está presente un intrón sin corte ni empalme en la mayoría de los transcritos de ARNm del gen EVN. GDNF y NTN también tienen un intrón en sus regiones respectivas que codifican para el  
20 prodominio (Matsushita y otros, 1997, Heuckeroth y otros, 1997).

Para evaluar la existencia de diferentes transcritos de ARNm para la enovina, se realizaron experimentos de RT-PCR usando cebadores situados en el extremo 5' de la secuencia que codifica para enovina justo en 5' de un posible codón de inicio ATG en sentido 5' (cebador PNHsp5 [5'-GCA AGC TGC CTC AAC AGG AGG G-3'] y  
25 cebador anidado PNHsp6 [5'-GGT GGG GGA ACA GCT CAA CAA TGG-3']) y en el extremo 3' (cebador PNHap1 y cebador anidado PNHap2 [véase la tabla 1]). Los experimentos se realizaron sobre paneles de ADNc de tejido múltiple humano (paneles I y II de MTC de Clontech), sobre una biblioteca de ADNc de corazón fetal (Clontech) y sobre ADNc derivado de cerebelo, hipocampo o corteza frontal humanos (Masure y otros, 1998). Las reacciones de PCR primaria se realizaron con cebadores PNHsp5 y PNHap1 en condiciones ricas en GC (kit Advantage GC-PCR, Clontech) durante 30 ciclos (95°C - 30s, 60°C - 30s, 72°C - 1 min) tal como se describió. Las reacciones de PCR  
30 anidada se realizaron sobre 1 µl del producto de PCR primaria usando cebadores PNHsp6 y PNHap2 en las mismas condiciones durante 30 ciclos. Los productos de PCR resultantes se analizaron sobre un gel de agarosa al 1,5% y se ordenaron en el intervalo de tamaño desde ± 350 pb hasta ± 800 pb. Se purificaron varias bandas del gel y se secuenciaron directamente los fragmentos de PCR. Algunos productos de PCR purificados también se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (kit de clonación TOPO-TA, Invitrogen) y luego se secuenciaron. El análisis de secuencia confirmó la existencia de diferentes moléculas de ARNm que contenían la secuencia de la enovina. Las secuencias de fragmento obtenidas se compararon con la secuencia de la enovina genómica. Esto permitió identificar varios posibles sitios de corte y empalme 5' y 3' en la secuencia genómica (figura 21). Todos estos sitios de corte y empalme correspondían a las secuencias consenso para sitios de corte y empalme donadores y aceptores  
40 (Senapathy, P., Shapiro, M.B. y Harris, N.L. (1990)) zonas de unión exón-intrón, sitios de puntos de ramificación, y exones: estadística de secuencia, identificación y aplicaciones al proyecto del genoma. *Methods Enzymol.* 183,252-278). Las diferentes variantes de enovina identificadas y su presencia en tejidos humanos se resumen en la figura 22. Sólo dos de los 5 transcritos secuenciados dan una proteína de enovina funcional al traducirse a partir del codón de inicio ATG. Estos dos transcritos codifican para proteínas de 228 o 220 aminoácidos, respectivamente,  
45 con péptidos señal previstos de 47 y 39 residuos de aminoácido. Las secuencias de proteína previstas de estas dos variantes se muestran en la figura 23 (variante larga) y la figura 24 (variante corta). La variante larga puede deducirse de la secuencia de ADN de la figura 21 eliminando mediante corte y empalme el primer intrón en las ubicaciones 5'-1 y 3'-1 y el segundo intrón en 5'-2 y 3'-3. Al traducir el marco de lectura abierto, se obtiene la secuencia de proteína prevista de la figura 23. La variante más corta puede deducirse a partir de la secuencia de  
50 ADN de la figura 21 eliminando mediante corte y empalme el primer intrón en las ubicaciones 5'-1 y 3'-2 y el segundo intrón en 5'-2 y 3'-3. Al traducir el marco de lectura abierto, se obtiene la secuencia de proteína prevista de la figura 24.

El transcripto más largo parece ser el más abundante en la mayoría de los tejidos basándose en la intensidad de banda de la figura 22B. Los transcritos más cortos dan como resultado desviaciones del marco que dan una proteína traducida que carece de la secuencia de aminoácidos de la enovina homóloga a GDNF, NTN y PSP. Los dos transcritos más pequeños carecen incluso de la parte de la secuencia codificadora madura, incluyendo dos de los siete residuos de cisteína sumamente conservados. La figura 22B muestra la distribución de las variantes de corte y empalme principales en diferentes tejidos humanos. El ARNm de la enovina funcional se expresa en casi  
60 todos los tejidos probados, incluyendo cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, músculo esquelético, colon, intestino delgado, leucocitos de sangre periférica, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, placenta y corazón fetal. En algunos tejidos humanos (por ejemplo, cerebelo, hipocampo), sólo pudieron amplificarse los transcritos no

funcionales mediante PCR. Según nuestro conocimiento, no se ha descrito con anterioridad la aparición de transcritos de ARNm no funcionales en un grado de este tipo. Sigue debiendo estudiarse la significación biológica de este hallazgo. Aunque la expresión de NTN y PSP en diferentes tejidos no se ha caracterizado completamente, sus niveles de expresión parecen muy inferiores y la expresión más restringida a ciertos tejidos (Kotzbauer y otros, 1996, Milbrandt y otros, 1998).

#### Expresión recombinante de enovina en *E. coli*

##### Construcción de un plásmido de expresión de enovina

Se amplificó un fragmento de PCR de 414 pb a partir de ADN genómico humano con cebadores PNHsp4 y PNHap2 (tabla 1) y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO usando TA-cloning (Invitrogen). Se confirmó la secuencia del inserto mediante análisis de secuencia. Se usó un clon que contenía un inserto con la secuencia consenso de la enovina (clon 36) para la construcción posterior de un plásmido de expresión. Se diseñaron dos cebadores que contenían sitios de restricción apropiados en sus extremos 5'. El cebador directo PNHexp-sp1 (5'- GCG GAT CCG GCT GGG GGC CCG GGC A -3') contenía un sitio de restricción BamHI (subrayado) y el cebador inverso PNHexp-ap1 (5'- GCC TCG AGT CAG CCC AGG CAG CCG CAG G -3') contenía un sitio de restricción XhoI (también subrayado). Usando estos cebadores, se amplificó el fragmento de 343 pb que codificaba para la enovina madura (posición 81 a 422 en la figura 1) a partir del clon 36. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón de reacción de PCR para ADN con GC 1x, dNTP 0,2 mM, GC-MELT® 1 M, 200 nM de cebadores PNHexp-sp1 y PNHexp-ap1, 1 µl de mezcla de polimerasa Advantage KlenTaq y 10 ng de ADN de plásmido ADN del clon 36. Se calentaron las muestras hasta 94°C durante 5 min y se realizó la ciclización durante 45 s a 94°C, 1 min a 58°C y 30 s a 72°C durante 25 ciclos, con una etapa final de 7 min a 72°C. El producto de 50 µl resultante se purificó usando el kit de purificación mediante PCR Qiaquick (Qiagen) y se eluyó el ADN en 30 µl. Entonces se digirieron 25 µl de este producto purificado en una reacción de 30 µl con 10 U de BamHI y 10 U de XhoI en tampón B 1x (Boehringer Mannheim) durante 1 h a 37°C. Tras la electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1 x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (sal de sodio), pH 8,3), se escindió la banda de 353 pb esperada del gel y se purificó usando el kit de extracción en gel Qiaquick. Se ligó el fragmento resultante en el vector pRSET B (Invitrogen) linearizado con BamHI y XhoI. Se confirmó el inserto del constructo de plásmido resultante (hEVNmat/pRSETB) mediante análisis de secuencia completa. El constructo resultante codifica para una proteína de 146 aminoácidos con una masa molecular prevista de 15704 Da incluyendo una etiqueta de 6 His NH2-terminal en marco con la secuencia que codifica para la enovina madura. La secuencia NH2-terminal de aminoácidos de la proteína resultante es por tanto MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPAGGPGS (secuencia de enovina madura en negrita, etiqueta de 6 His subrayada).

##### Expresión de enovina en células *E. coli* BL21(DE3)

La producción recombinante de proteína de enovina se realizó esencialmente tal como se describe para la neuriturina por Creedon y otros (1997), con modificaciones. Para la producción de la proteína de enovina recombinante, se transformó el plásmido hEVNmat/pRSETB en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen) y se hizo crecer en medio YT/ampicilina 2x (16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 100 mg/l de ampicilina) a 30°C (225 rpm) o 37°C (300 rpm) hasta una DO600 de aproximadamente 0,5 antes de la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM para inducir la expresión. Se recogieron los sedimentos celulares mediante centrifugación tras un periodo de inducción de 3 h, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, se centrifugaron y se almacenaron congelados. Para la purificación y replegamiento, se resuspendieron los sedimentos celulares en un tampón de sonicación (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, inhibidores de proteasa (comprimidos de cocktail de inhibidor de proteasa Complete® (Boehringer Mannheim, 1 comprimido por 50 ml de tampón) y 1 mg de lisozima por 500 mg sedimento celular). Se rompieron las células mediante sonicación y se recogieron los cuerpos de inclusión mediante centrifugación. Se disolvieron los cuerpos de inclusión y se incubaron en tampón A (urea 8 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 200 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM) durante 30 min a 37°C antes de añadirlos a resina Ni-NTA (ácido nitrilotriacético de níquel, Qiagen). Tras 40 min de agitación a 37°C, se lavaron las muestras una vez con tampón A y se cargaron sobre una columna de Ni-NTA de 5 ml. Se lavó la columna sucesivamente con 10 volúmenes de columna de tampón A, 10 volúmenes de columna de tampón A a pH 7,2 y 10 volúmenes de columna de tampón A a pH 7,2 + imidazol 10 mM. Se eluyó la enovina de la columna en 4 volúmenes de columna de tampón A a pH 7,2 + imidazol 200 mM.

Se realizó el replegamiento de la enovina mediante diálisis durante la noche gradual a 4°C en tampón de renaturalización (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, cisteína 3 µM, Tween-20 al 0,02%, glicerol al 10%, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,3) que contenía cantidades decrecientes de urea en cada etapa (urea de 6 M a 4 M a 3 M a 2 M a 1 M a 0,5 M a 0 M). Se formaron alícuotas de la proteína purificada, se almacenaron a -20°C y se usaron adicionalmente para los ensayos funcionales.

##### Ubicación cromosómica del gen de la enovina

Se amplificó un fragmento de 3,3 kb del gen de la enovina a partir de ADNc del cerebelo usando cebadores EVN(7)-

sp1 (5'- TTC GCG TGT CTA CAA ACT CAA CTC CC -3') y PNHap1 (5'- GCA GGA AGA GCC ACC GGT AAG G -3') diseñados sobre la secuencia de EMBL de número de registro AC005038. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón de reacción de PCR 1x "Expand Long Template" (plantilla larga de gran expansión) (Boehringer Mannheim), dNTP 0,5 mM, GC-MELT 1 M (Clontech Laboratories), 400 nM de cebadores EVN(7)-sp1 y PNHap1 y 1 µl de ADNc de cerebelo. Tras 2 min iniciales a 94°C, se añadieron 0,75 µl de polimerasa Expand Long Template (Boehringer Mannheim) y se realizó la ciclización durante 10 s a 94°C, 30 s a 58°C y 3 min a 68°C durante 10 ciclos. Luego, se realizaron 20 ciclos adicionales aumentando el tiempo de extensión a 68°C en 20 s cada ciclo. También se incluyeron 7 min finales a 68°C. Se purificó el fragmento de 3,3 kb resultante tras electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%/TAE y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO usando TA-cloning (Invitrogen). El análisis de secuencia completa del inserto de 3,3 kb de un clon confirmó que la secuencia de ADNc obtenida correspondía con la secuencia genómica en la base de datos EMBL (número de registro AC005038). No se eliminó mediante corte y empalme ningún intrón del ADNc obtenido a partir de ADNc de cerebelo.

Se llevaron a cabo estudios de mapeo cromosómico usando análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) esencialmente tal como se describe (Heng y otros, 1992, Heng y Tsui, 1993). Se cultivaron linfocitos humanos a 37°C durante 68-72 h antes del tratamiento con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) 0,18 mg/ml para sincronizar los ciclos celulares en la población de células. Se lavaron las células sincronizadas y volvieron a cultivarse a 37°C durante 6 h. Se recogieron las células y se prepararon portaobjetos usando procedimientos habituales incluyendo el tratamiento hipotónico, fijación y secado al aire. Se biotiniló la sonda de 3,3 kb para enovina y se usó para la detección por FISH. Se cocieron los portaobjetos a 55°C durante 1 h, se trataron con ARNasa y se desnaturalizaron en formamida al 70% en NaCl/Cit 2x (siendo NaCl/Cit 20x NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7,0) durante 2 min a 70°C seguido por deshidratación con etanol. Se desnaturalizó la sonda antes de cargarla sobre los portaobjetos cromosómicos desnaturalizados. Tras la hibridación durante la noche, se lavaron los portaobjetos y se registraron las señales de FISH y el patrón de bandas de 4',6-diamidino-2-fenilindol por separado sobre una película fotográfica, y se logró la asignación de los datos de mapeo de FISH con las bandas cromosómicas mediante superimposición de las señales de FISH con los cromosomas en las bandas de 4',6-diamidino-2-fenilindol (Heng y Tsui, 1993). En las condiciones usadas, la eficacia de hibridación fue de aproximadamente el 72% para esta sonda (entre 100 figuras mitóticas comprobadas, 72 de ellas mostraron señales en un par de los cromosomas). Dado que se usaron las bandas de 4',6-diamidino-2-fenilindol para identificar el cromosoma específico, se obtuvo la asignación entre la señal de la sonda y el brazo corto del cromosoma 1. La posición detallada se determinó adicionalmente basándose en el resumen de 10 fotografías (figura 4A). No hubo locus adicionales captados mediante la detección FISH en las condiciones usadas, por tanto, se concluyó que la enovina se localiza en el cromosoma humano 1, región p31.3-p32. En la figura 4B se presenta un ejemplo de los resultados del mapeo.

A partir de los datos del mapa génico en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>), puede deducirse que el clon genómico que contiene la secuencia de enovina (EMBL, número de registro AC005038) se localiza en el cromosoma 1, entre los marcadores D1S2843 y D1S417. Esto corresponde al cromosoma 1, región p31.1 a p32.3, lo que confirma los datos obtenidos mediante análisis FISH.

Distribución de tejidos de enovina según se determinó mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Northern y puntual

Se hibridaron inmunotransferencias de tipo Northern que contenían 2 µg de ARN rico en poli(A) derivado de diferentes tejidos humanos (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE.UU.; inmunotransferencia MTN®, inmunotransferencia MTN® II e inmunotransferencia MTN® fetal II) según las instrucciones del fabricante con un fragmento de enovina de 897 pb marcado con cebador aleatorio  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (kit HighPrime, Boehringer Mannheim). Este fragmento se obtuvo mediante amplificación por PCR con cebadores PNHsp1 y PNHap1 sobre ADNc de corteza frontal y clonación posterior en el vector pCR2.1-TOPO. El fragmento contiene 897 pb de la secuencia de enovina hasta el codón de detención e incluye la secuencia codificante completa para la proteína de enovina madura.

Se detectó el ARNm de enovina como un transcripto principal de aproximadamente 4,5 kb (figura 5A-C). Se expresó el ARNm de enovina en una gama de tejidos, de la manera más prominente en corazón, músculo esquelético, páncreas y próstata. Algunos transcritos de menor tamaño están presentes en, por ejemplo, la placenta (4 kb, 2,4 kb y 1,6 kb) y la próstata (4 kb y 1,6 kb). En el tejido fetal, está presente un transcripto de 2,4 Kb prominente en el hígado y en menor grado en el pulmón. Otros transcritos también están presentes en el cerebro, pulmón, hígado y riñón fetal.

Además, también se hibridó una inmunotransferencia master de ARN (Clontech Laboratories) que contenía ARN rico en poli(A) a partir de diferentes tejidos humanos y fases de desarrollo con la sonda de enovina de 897 pb. Las muestras de ARN rico en poli(A) usadas para realizar esta inmunotransferencia se había normalizado a los niveles de expresión de ARNm de ocho genes de mantenimiento diferentes por parte del fabricante. El ARNm de enovina se expresó de manera ubicua, pero los niveles superiores de ARNm resultaron claros en la próstata, glándula pituitaria, tráquea, placenta, pulmón fetal, páncreas y riñón (figura 5D+E).

Construcción de vectores de fusión GFR $\alpha$ -IgG-Fc

5 Las regiones de ADNc de GFR $\alpha$ -1, GFR $\alpha$ -2 y GFR $\alpha$ -3 (que codifican para los aminoácidos 27 a 427, 20 a 431 y 28 a 371, respectivamente), excluyendo las secuencias que codifican para el péptido señal y para la región hidrófoba COOH-terminal implicada en la fijación de GPI, se clonaron en marco dentro del vector de expresión Signal plg plus (R&D Systems Europe Ltd). Las proteínas resultantes expresadas a partir de esos constructos contenían un péptido señal CD33 NH<sub>2</sub>-terminal de 17 aminoácidos, la región de la proteína GFR $\alpha$  y un dominio de fusión IgG1-Fc humano  
 10 COOH terminal de 243 aminoácidos. Se transfectaron células CHO con constructos de fusión de GFR $\alpha$  y se seleccionaron las células transfectadas de manera estable usando 500  $\mu$ g de G418. Se seleccionaron los clones permanentes usando anticuerpo anti-Fc. Para la purificación de las proteínas de fusión de GFR $\alpha$ , se hicieron crecer las células en medio libre de suero y se recogió el medio tras cada 3 días. Se centrifugó el medio y se aplicó a una columna de proteína A (Protein A Sepharose, Pharmacia Biotech). Se eluyó la proteína unida con citrato de Na 0,1 M, pH 3,0 y se recogió en tampón Tris 1 M, pH 8,4. Se estimó la concentración de proteína mediante absorbancia a  
 15 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,5. Estas proteínas de fusión de GFR $\alpha$ -1 a -3 Fc solubles purificadas se usaron para estudios de unión posteriores.

Análisis de resonancia de plasmón superficial

20 Se realizaron experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) a 25°C usando un instrumento BIAcore 3000. Se realizaron los análisis con enovina y NGF como ligandos inmovilizados. La matriz carboxilada de un chip detector F1 se activó en primer lugar con una mezcla 1:1 de N-etil-N-(dimetilaminopropil)-carbodiimida 400 mM y N-hidroxisuccinimida 100 mM durante 10 min. Luego, se aplicaron enovina recombinante y NGF sobre la superficie activada en tampón acetato 10 mM, pH 4,5 con una velocidad de flujo de 5  $\mu$ l/min. Los grupos reactivos sin ocupar  
 25 se inactivaron con clorhidrato de etanolamina 1 M. Para los experimentos de unión, se sometieron a lavado superficial ("superfusión") GFR $\alpha$ 1-3-Fc solubles a concentraciones de 10-100 nM en solución salina tamponada con HEPES (NaCl 150 mM, EDTA 3,5 mM, P-20 al 0,05%, HEPES 10 mM, pH 7,4) con una velocidad de flujo de 10  $\mu$ l/min. Se monitorizó la asociación durante 3 min y la disociación durante 1 min, seguido de la regeneración con NaOH 5 mM. Se inició la disociación mediante lavado superficial con solución salina tamponada con HEPES. Se usó  
 30 un software de evaluación BIAcore, 3.0 para calcular las constantes de la velocidad de asociación ( $k_a$ ), velocidad de disociación ( $k_d$ ) y de disociación en el equilibrio ( $K_D$ , calculada como  $k_d/k_a$ ).

Resultados

35 Se usó la SPR para medir la unión de GFR $\alpha$ 1-3 soluble a enovina inmovilizada. Sólo pudo detectarse la unión específica a enovina con GFR $\alpha$ 3 soluble. GFR $\alpha$ 1 y GFR $\alpha$ 2 no se unieron a la enovina inmovilizada. La unión observada de GFR $\alpha$ 3 fue específica ya que no hubo unión a NGF. En el experimento de control por separado se detectó unión específica de TrkA-Fc (receptor de NGF) al NGF inmovilizado sin unión a la enovina inmovilizada.  
 40 A partir de las curvas de unión obtenidas usando tres concentraciones diferentes de GFR $\alpha$ , se derivaron las siguientes constantes en la tabla 3. Estos resultados demuestran que GFR $\alpha$ 3 se une específicamente a enovina.

Tabla 3

	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
GFR $\alpha$ 3	$1,65 \cdot 10^5$	$5,08 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-9}$

45 Dado que GDNF, NTN y PSP promueven el mantenimiento y supervivencia de diferentes tipos de células neuronales, se anticipa que la enovina tiene efectos biológicos similares sobre las células nerviosas y, posiblemente, también sobre otros tipos celulares. Por tanto, se considera que la proteína de enovina pueda ser útil en el tratamiento de trastornos neuronales en general, incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, lesión cerebral aguda, tumores  
 50 en el sistema nervioso, esclerosis múltiple, traumatismo nervioso periférico o lesión y exposición a neurotoxinas.

La enovina también podría ser útil en diversos aspectos de la neuroprotección. Considerando su efecto sobre la supervivencia de diferentes poblaciones de células neuronales y sobre las extensiones de neuritas observadas en el modelo de células SHSY5Y, se propone que este compuesto pueda tener aplicaciones neuroprotectoras y neuroregeneradoras.  
 55

Esto se basa en las siguientes observaciones. El taxol induce la apoptosis neuronal en células de feocromocitoma de rata PC12 diferenciado por NGF (Nuydens y otros, presentado). Por tanto, la citotoxicidad inducida por taxol tiene características de apoptosis neuronal, según se monitoriza mediante fragmentación de ADN, marcaje de anexina V y protección de bcl-2. Por tanto, como extensión, puede deducirse que el taxol induce la apoptosis en células SH-SY5Y diferenciadas. Ahora se muestra que la enovina puede reducir esta muerte celular y  
 60

por tanto puede invertir la apoptosis neuronal en general.

Por tanto, el compuesto puede ser útil en los siguientes estados neurodegenerativos en los que se ha observado apoptosis, accidente cerebrovascular (Hakim 1998), enfermedad de Parkinson (Marsden y otros, 1998), enfermedad de Alzheimer (Nagy y otros, 1998), enfermedad de Huntington (Wellington y otros, 1997), traumatismo neuronal (Smirnova y otros, 1998), neuropatías periféricas, (Srinivisan y otros, 1998).

Como ejemplo para la última indicación clínica, se ha mostrado que este factor neurotrófico protege realmente células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas contra la toxicidad celular inducida por taxol.

#### Metodología de mediciones de viabilidad

Se determinó la viabilidad celular añadiendo 100 µl de una disolución de 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT, Sigma) 1 mg/ml en DMEM (37°C) complementada con metosulfato de fenazina 0,02 mM (PMS, Sigma) en cada pocillo. Entonces se incubaron las placas a 37°C durante 2,5 horas. Se leyeron las densidades ópticas (Molecular devices) a 450 nm, usando 650 nm como referencia. El ensayo de XTT se basa en la conversión de la sal de tetrazolio de XTT en un producto de formazán de color rojo. Esta reacción se realiza mediante enzimas mitocondriales.

#### Metodología de diferenciación neuronal

##### 1. Diferenciación en células SHSY5Y de neuroblastoma humano

Se diferencian las células SHSY5Y durante 5 días con estaurosporina 25 nM. Se mide el efecto de la enovina 72 horas tras iniciar el experimento. (Referencia: Jalava y otros "Protein Kinase inhibitor staurosporine induces a mature neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells through an a,b,z PKC independent pathway" Journ cell Physiol 155, 301-312 (1993)).

##### 2. Medición de la extensión de neurita

Se cuantificaron automáticamente los cambios morfológicos de las neuronas tal como sigue. Resumidamente, en momentos apropiados, se añadió glutaraldeído directamente al medio y se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esto garantizó que la morfología de la célula en el punto de tiempo reflejaba la situación real. Se observaron las células mediante modo de luz transmitida en un microscopio Axiovert (Zeiss Oberkochen, Alemania), equipado con una fase de barrido Marzhauser accionada por una estación de trabajo Indy (Silicon Graphics, Mountain View, EE.UU.). Se capturaron imágenes usando una cámara de video MX5 (HGS). Se evaluaron aproximadamente 3000 células en 64 imágenes alineadas, formando una matriz cuadrada de imágenes de 8 x 8. La alineación exacta de las imágenes garantizó que podían seguirse las neuritas de un campo de imagen al siguiente. Se realizó la detección automática de las extensiones de neuritas, marcadas mediante anticuerpo tau policlonal, usando un detector sin sesgo de estructuras curvilíneas (Steger 1998). El *software* de análisis calculó automáticamente el área de cuerpo celular total, el número de cuerpos celulares y la longitud de neurita total.

Para investigar el efecto de la enovina sobre diferentes tipos de células, se realizaron dos ensayos, un ensayo de síntesis de ADN y un ensayo de quimiotaxia.

#### Ensayo de síntesis de ADN

Se mantuvieron células, incluyendo fibroblastos dérmicos humanos (39SK), células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC), células del músculo liso humanas (HSMC), condrocitos humanos, y osteoblastos de rata, en DMEM que contenía FBS al 10% (39-SK, HSMC, osteoblastos de rata) o medio definido (condrocitos y HUVEC) a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%. Para el ensayo de síntesis de ADN, se sembraron las células en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con una densidad de 5.000 células/pocillo en DMEM que contenía FBS al 10% y se incubaron durante 24 h. Entonces se sustituyó el medio de cultivo con DMEM que contenía diversas concentraciones de enovina y BSA al 0,1% (para 39-SK, osteoblastos, HSMC, condrocitos) o DMEM que contenía diversas concentraciones de enovina y FBS al 0,5% (para HUVEC) y se incubaron las células durante 24 h. Posteriormente, se sustituyó el medio de cultivo con 100 µl de DMEM que contenía FBS al 5% y 0,1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina. Tras 2 h de marcado por pulsaciones, se fijaron las células con metanol/ácido acético (3:1, vol/vol) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las células fijadas dos veces con metanol al 80%. Se solubilizaron las células en tripsina al 0,05% (100 µl/pocillo) durante 30 min y luego en SDS al 0,5% (100 µl/pocillo) durante 30 min adicionales. Se combinaron alícuotas de lisados celulares (180 µl) con 2 ml de cóctel de centelleo y se midió la radioactividad de los lisados celulares usando un recuento de centelleo en líquido (Wallac 1409).

#### Ensayo de quimiotaxia

Se mantuvieron las células tal como se describe en "Ensayo de síntesis de ADN". Se analizó la actividad quimiotáctica de la enovina usando una cámara Boyden modificada de 12 pocillos (McQuillan, D.J., Handley, C.J.,

Campbell, M.A., Bolis, S., Milway, V.E., Herington, A.C., (1986), "Stimulation of Proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage", *Biochem. J.* 240:423-430). Se digirieron con tripsina las células usando tripsina al 0,05% y EDTA 0,5 mM y se resuspendieron en DMEM. A los pocillos del fondo de una cámara Boyden, se les añadieron alícuotas de 150 µl de medio que contenían diversas concentraciones de enovina. Se colocó una membrana de policarbonato (8 µm) recubierta con 0,1 mg/ml de colágeno de tipo I sobre la parte superior de los pocillos del fondo, seguido de montaje de los pocillos superiores. A los pocillos superiores, se les añadieron alícuotas de 100 µl de células (70.000 células/ml). Tras un periodo de incubación de 6 h, se desmontó el aparato. Se retiraron las células que quedaban sobre la superficie de la membrana. Se fijó la membrana con formaldehído al 10% durante 15 min, seguido por tinción con hematoxilina según Gill. Se contaron las células con un microscopio (aumento de 250 x), y se usó el promedio de los recuentos de células de cinco zonas de cada pocillo. Cada experimento se repitió al menos cuatro veces. Los resultados se expresaron como veces del control (DMEM que contiene BSA al 0,1%).

Tal como ilustra por los resultados en las figuras 8 a 18, la enovina no tiene ningún efecto sobre la proliferación en cada uno de los tipos de células usados, ni sobre la migración de las células HUVEC (figura 14) tal como se describió anteriormente. No hubo efecto de la enovina sobre las células de neuroblastoma SH-SY-5Y. Esto demostró el efecto selectivo de la enovina sobre las células neuronales.

Se ha mostrado que tanto GDNF como NTN señalizan mediante un complejo de señalización compuesto por una subunidad de unión a ligando, o bien GFR $\alpha$ -1 o bien GFR $\alpha$ -2, y una subunidad de señalización, la proteína tirosina cinasa cRET. Se espera que la enovina ejerza sus efectos biológicos mediante un complejo de señalización similar compuesto por un reactivo de unión de GFR $\alpha$  (ya sea GFR $\alpha$ -1, GFR $\alpha$ -2, el recientemente caracterizado receptor huérfano GFR $\alpha$ -3 u otro miembro aún no caracterizado de la familia de GFR $\alpha$ ) en combinación con cRET u otro reactivo de señalización. De hecho, nuestros datos de unión muestran que la enovina puede unirse específicamente a GFR $\alpha$ -3.

En seres humanos, las mutaciones de líneas germinales en GDNF o cRET pueden conducir a varios fenotipos de enfermedades incluyendo neoplasia endocrina múltiple y enfermedad de Hirschsprung familiar (HSCR) (Romeo y otros, 1994, Ederly y otros, 1994, Angrist y otros, 1996). Ambas enfermedades están asociadas con dismotilidad del intestino, siendo la enfermedad de Hirschsprung la causa más común de obstrucción intestinal en bebés. De manera interesante, los ratones deficientes para GDNF y cRET muestran patologías sorprendentemente similares a la agenesia renal y la aganglionosis intestinal (Sánchez y otros, 1996; Moore y otros, 1996; Pichel y otros, 1996). La enovina puede estar implicada en trastornos similares del intestino o de los riñones o, dado que se expresa de manera ubicua, puede ser importante en el desarrollo de otros órganos periféricos en el cuerpo.

La interacción de ligandos con sus receptores se logra generalmente mediante la interacción de enlaces específicos de residuos particulares en ambas proteínas. Los fragmentos de una proteína pueden servir como agonistas que activan el receptor para provocar sus efectos de promover el crecimiento y mantener la supervivencia sobre las células. Por tanto, partes de enovina o péptidos sintéticos basados en la secuencia de proteína de la enovina pueden ser útiles como agonistas o antagonistas para regular a su receptor GFR $\alpha$ 3. Usando técnicas recombinantes o de síntesis de péptidos, pueden producirse factores de crecimiento híbridos compuestos de partes de GDNF, NTN o PSP o cualquier otro factor neurotrófico o de crecimiento con partes de enovina para dar un factor de crecimiento sintético novedoso con nuevas propiedades.

Se realizaron dos ensayos piloto para probar si la enovina puede cambiar los déficits sensoriales inducidos por taxol en ratas tras inyecciones subplantares en ratas. En un primer experimento, se probó si un único tratamiento con enovina podía invertir el déficit sensorial inducido por taxol, mientras que en un segundo ensayo se probó si la enovina podía evitar el desarrollo de los déficits inducidos por taxol.

#### Inversión con el tiempo de la disfunción sensorial inducida por taxol

##### Procedimiento

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 300 - 340 gramos. Se alojaron los animales individualmente con comida y agua a voluntad. Antes de iniciar el experimento, se colocaron los animales en jaulas de observación habituales y tras un periodo de habituación de 15 min, se evaluó el reflejo de pinchazo. Para ello, se estimuló la superficie de la planta de la pata derecha del animal con una aguja y se puntuó la reactividad frente a este pinchazo como presente (puntuación = 1) o ausente (puntuación = 0). En una sesión, se repitió el procedimiento tres veces con un intervalo de tiempo de 1 min entre 2 presentaciones de estímulo consecutivas; como tal, la prueba de pinchazo consistía en 3 mediciones de reactividad frente a pinchazo. Sólo las ratas que tenían reacciones normales en los 3 pinchazos se incluyeron en el experimento.

En los 3 días consecutivos por la mañana, los animales recibieron diariamente una inyección subplantar de 50 µl de taxol (3 mg/ml de paclitaxel disuelto en cremophor y alcohol deshidratado más agua) en la pata trasera derecha. Durante la siguiente mañana, volvió a evaluarse el reflejo de pinchazo y se seleccionaron los animales que no

mostraban ninguna reactividad frente a las 3 presentaciones de estímulos. Estos animales se dividieron aleatoriamente en subgrupos ( $n = 10/\text{grupo}$ ) que recibían una inyección subplantar en la pata trasera derecha de 75  $\mu\text{l}$  o bien de vehículo, solución salina o bien de 23 ó 130  $\mu\text{g/ml}$  de enovina. Debido a que no se observaron diferencias entre los resultados de los animales tratados con vehículo y solución salina, se combinaron ambos grupos (grupo control). En los días 1, 4, 5 y 7 tras el último tratamiento, se realizó la prueba del pinchazo tanto por la mañana (entre las 8 y 9 a.m.) como por la tarde (entre las 3:30 y 4:30 p.m.). El día 8, se realizó una última prueba del pinchazo durante la mañana. Para cada animal, se midió la puntuación acumulativa de la reactividad frente al pinchazo con el tiempo. Dado que se realizaron 9 pruebas del pinchazo en total (consistiendo cada una en 3 presentaciones de pinchazo) tras el último tratamiento con el fármaco, la puntuación máxima que puede alcanzarse a lo largo del periodo de tiempo total del experimento es 27.

#### Resultados

Las inyecciones subplantares repetidas de taxol a lo largo de 3 días consecutivos dan como resultado una reacción inflamatoria aguda con falta de respuesta frente a un estímulo de pinchazo en la mayoría de los animales. Una inyección subplantar de solución salina o vehículo no afectó al déficit inducido por taxol. En la primera medición, sólo 4 de los 20 controles mostró al menos 1 reacción frente a los tres pinchazos y la puntuación de pinchazo media ( $\pm\text{EEM}$ ) de los controles en la primera medición fue de 0,25 ( $\pm 0,12$ ); esto está en contraste con el inicio del experimento cuando la puntuación media fue de 3,0 ( $\pm 0,0$ ) debido a que todos los animales respondían al pinchazo. Incluso tras 8 días de medición, la reactividad en los controles todavía estaba afectada respondiendo 11 de las 20 ratas al menos una vez y con una puntuación de pinchazo media de 0,75 ( $\pm 0,18$ ). Dentro de este grupo de control, ninguna de las ratas mostró una reactividad normal a los 3 estímulos. La puntuación de pinchazo acumulativa de los controles con el tiempo se presenta en la figura 19. Debido a que se sometieron a prueba los animales 9 veces a lo largo de un periodo de 8 días, la puntuación máxima que puede alcanzarse con 3 pinchazos en cada prueba es de 27. Tal como se observa en la gráfica, una inyección subplantar de solución salina o vehículo no pudo invertir el déficit inducido por taxol en el periodo de tiempo probado. La puntuación acumulativa total media de los controles al final del experimento fue de 5,10 ( $\pm 0,87$ ); siendo el 18,9% de la puntuación máxima que puede alcanzarse.

Una única inyección subplantar de 75  $\mu\text{l}$  de enovina 23  $\mu\text{g/ml}$ , dio como resultado tras la primera medición que 4 de las 10 ratas respondieron al menos una vez, con una puntuación de pinchazo media de 0,70 ( $\pm 0,33$ ). El día 8, los 10 animales respondieron al menos una vez al pinchazo, y había una reactividad normal presente en 5 de las 10 ratas. La puntuación de pinchazo promedio de este grupo el día 8 fue de 2,20 ( $\pm 0,29$ ). En comparación con los controles, la puntuación acumulativa promedio al final de los 8 días de medición aumentó significativamente (prueba de la U de Mann - Whitney, de dos colas,  $p < 0,01$ ), alcanzando una puntuación de pinchazo media de 14,50 ( $\pm 1,96$ ) (figura 19). Es decir, el 53,7% de la puntuación máxima.

También con una inyección subplantar de enovina de 130  $\mu\text{g/ml}$  hubo una eficacia mejorada con respecto a los controles. En la primera medición tras enovina 130  $\mu\text{g/ml}$ , 6 de las 10 ratas respondió al menos una vez con una puntuación de pinchazo media de 1,10 ( $\pm 0,35$ ). En el día 8, los 10 animales respondieron a al menos un pinchazo con una puntuación media de 2,60 ( $\pm 0,22$ ). Estuvo presente una reactividad normal frente a los 3 pinchazos en 8 de las 10 ratas. La puntuación de pinchazo total acumulativa promedio al final del experimento en este grupo fue de 17,20 ( $\pm 1,94$ ). Es decir, el 63,7% de la puntuación total posible y significativamente mejorada en comparación con el grupo de control ( $p < 0,01$ ).

#### 45 Prevención con el tiempo de la disfunción sensorial inducida por taxol

##### Procedimiento

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 300 - 340 gramos. Se alojaron los animales individualmente con comida y agua a voluntad. Antes del inicio del experimento, se colocaron los animales en jaulas de observación habituales y tras un periodo de habituación de 15 min, se evaluó el reflejo de pinchazo. Para ello, se estimuló la superficie de la planta de la pata derecha del animal con una aguja y se puntuó la reactividad frente a este pinchazo como presente (puntuación = 1) o ausente (puntuación = 0). En una sesión, se repitió el procedimiento tres veces con un intervalo de tiempo de 1 min entre 2 presentaciones de estímulo consecutivas; como tal, la prueba de pinchazo consistía en 3 mediciones de reactividad frente a pinchazo. Sólo las ratas que tenían reacciones normales en los 3 pinchazos se incluyeron en el experimento (puntuación de pinchazo = 3). Tras esta medición de control, los animales se dividieron aleatoriamente en subgrupos ( $n = 10/\text{grupo}$ ) que recibían una inyección subplantar en la pata trasera derecha de 75  $\mu\text{l}$  o bien de vehículo, solución salina o bien de 23 ó 130  $\mu\text{g/ml}$  de enovina. Debido a que no se observaron diferencias entre los resultados de los animales tratados con vehículo y solución salina, se combinaron ambos grupos (grupo control). Durante los 3 días consecutivos por la mañana, los animales recibieron diariamente una inyección subplantar de 50  $\mu\text{l}$  de taxol (3 mg/ml de paclitaxel disuelto en cremophor y alcohol deshidratado más agua) en la pata trasera derecha. En los días 1, 4, 5 y 7 tras el taxol, se realizó la prueba del pinchazo tanto por la mañana (entre las 8 y 9 a.m.) como por la tarde (entre las 3:30 y 4:30 p.m.). En el día 8, se realizó una última prueba del pinchazo durante la mañana. Para cada animal, se midió la puntuación acumulativa de la reactividad frente al pinchazo con el tiempo. Dado que se realizaron 9 pruebas del pinchazo en total (consistiendo

cada una en 3 presentaciones de pinchazo) tras el tratamiento con taxol, la puntuación máxima que puede alcanzarse a lo largo del periodo de tiempo total del experimento es 27.

## Resultados

5 Una inyección subplantar de solución salina o vehículo antes del taxol no evitó el déficit inducido por taxol en la prueba de pinchazo. En la primera prueba tras el taxol, 8 de las 20 ratas respondió al menos una vez al pinchazo, con una puntuación de pinchazo media de 0,60 ( $\pm 0,18$ ). En el día 8, el déficit inducido por taxol todavía estaba presente, respondiendo sólo 8 de los 20 animales y teniendo una puntuación media de 0,8 ( $\pm 0,25$ ). En dos animales, estaba presente un reflejo de pinchazo normalizado. Con el tiempo, la puntuación de pinchazo promedio también se redujo, dando como resultado un valor medio de 6,55 ( $\pm 1,08$ ), que es el 24,3% de la puntuación máxima (figura 20).

15 El tratamiento previo con enovina 23  $\mu\text{g/ml}$  redujo los déficits inducidos por taxol sobre el pinchazo. En el día 1, 8 de los 10 animales respondieron al menos una vez, y la puntuación de pinchazo promedio fue de 1,70 ( $\pm 0,40$ ). En el día 8, todos los animales respondían con una puntuación media de 2,50 ( $\pm 0,27$ ). Aquí, 7 animales mostraron una reactividad normal en todas las exposiciones a pinchazo. Con respecto a la respuesta acumulativa con el tiempo (figura 20), la puntuación total media mejoró significativamente ( $p < 0,01$ ) sobre el nivel de control hasta 18,40 ( $\pm 1,73$ ); es decir, el 68,1% del valor máximo.

20 Se obtuvieron resultados comparables tras un tratamiento previo con enovina 130  $\mu\text{g/ml}$ . Aquí, 6 de los 10 animales respondieron durante la primera prueba con una puntuación de pinchazo media de 1,70 ( $+0,31$ ). En el día 8, todos los animales reaccionaban al menos una vez a un estímulo de pinchazo con una puntuación media de 2,40 ( $+0,22$ ) y las 3 reacciones fueron normales en la mitad de los animales. Con respecto a la puntuación acumulativa, la puntuación media obtenida en el día 8 es de 17,70 ( $\pm 1,92$ ), representando el 65,5% de la puntuación total.

25 La presente serie de experimentos indica que una única inyección subplantar de enovina puede reducir los déficits sensoriales inducidos por taxol según se mide mediante una prueba de pinchazo. Se observa actividad cuando se aplica el fármaco tanto antes como después del taxol.

30 La enovina es un posible candidato para síndromes del dolor con un componente neurógeno principalmente central y periférico, enfermedades reumáticas/inflamatorias así como trastornos de la conducta, y puede desempeñar un papel modulador en los procesos sensoriales tras la aplicación transdérmica, tópica, local, central (tal como epidural, intratecal, y similares) y sistémica. Además, merece la pena usar la enovina como herramienta de diagnóstico para detectar cambios fisiopatológicos en las áreas mencionadas anteriormente.

## 35 Comparación de la expresión de ARNm de enovina en tejidos normales frente a enfermos

Se analizó la expresión de ARNm de enovina cuantitativamente usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (TaqMan; Perkin Elmer) usando tecnología patentada desarrollada y llevada a cabo en Pharmagene Laboratories Ltd, Royston, Reino Unido. El sistema usa una sonda fluorogénica para generar señales fluorescentes específicas de secuencias durante la PCR. La sonda es un oligonucleótido con tintes de extinción e indicador fluorescentes unidos, está ubicado entre los cebadores de PCR directa e inversa. Mientras está intacto, la intensidad de fluorescencia del indicador se suprime por el extintor. Si la sonda forma parte de un complejo de replicación, se escinde el indicador fluorescente del extintor mediante una actividad exonucleasa de 5' a 3' inherente en la polimerasa Taq. El aumento en la señal del indicador fluorescente dentro de una reacción es una medición directa de la acumulación de producto de PCR. El número de copias iniciales de una secuencia diana de ARNm (Cn) se establece determinando el número de ciclos de PCR fraccional (Ct) en el que se detecta por primera vez un producto de PCR (el punto en el que la señal de fluorescencia pasa por encima de un umbral de nivel inicial). La cuantificación de la cantidad de ARNm diana en cada muestra se establece mediante comparación de los valores de Ct experimentales con una curva patrón.

## Preparación de ARN y control de calidad

55 Se aisló ARN total de tejido completo y sub-disecado, usando reactivo Tri-Zol (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según el protocolo del proveedor. Los procedimientos de control de calidad para todas las muestras de ARN incluían una evaluación de la integridad (ARN ribosómico 18S y 28S intacto) y determinación de la presencia de transcritos de abundancia elevada (actina) y de poca abundancia (receptor de transferrina).

## Diseño de cebador/sonda

60 Se diseñó un par de cebadores y una sonda TaqMan para amplificar una secuencia específica de enovina.

Cebador 1: 5' ACGGTTCTCCAGGTGCTGT 3'

65 Cebador 3: 5' TGCTGCCGACCCACG 3'

Sonda 5: 5' CTACGAAGCGGTCTCCTTCATGGACG 3'

Además, se diseñó un par de cebadores y una sonda TaqMan que abarcan un intrón y amplifican una parte del gen de GAPDH humano.

Cebador 2: 5' CAGAGTAAAAGCAGCCCTGGT 3'

Cebador 4: 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC 3'

Sonda 6: 5' TTTGGTCCGTATTGGGCGCCT 3'

La sonda 5 se marca con el flúor FAM mientras que la sonda 6 está marcada con el flúor VIC.

15 Tratamiento con ADNasa de ARN total

Para cada tejido sometido a prueba, se digirieron 2,2 µg de ARN total con 2 unidades de ADNasa libre de ADNasa (Gibco BRL) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un volumen de 20 µl de tampón de ADNasa 1x (Gibco BRL). Se detuvo la reacción mediante adición de 2 µl de disolución de EDTA 25 mM. Entonces se incubaron las muestras a 65°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

Síntesis de ADNc de primera cadena

Para cada tejido sometido a prueba, se usaron 100 ng de ARN total como plantilla para la síntesis de ADNc de primera cadena. Se calentó el ARN en un volumen de 4 ml y en presencia de cebadores 1 y 2 50 nM, tampón de PCR II 1x (Perkin Elmer) y MgCl<sub>2</sub> 5 mM hasta 72°C durante 5 minutos y se enfrió lentamente hasta 55°C. Tras la adición de todos los demás reactivos, se incubaron los 6 ml de reacción a 48°C durante 30 minutos seguido por una etapa de inactivación enzimática de 90°C durante 5 minutos. Las condiciones de reacción finales eran las siguientes: tampón de PCR II 1x, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, dATP 1 mM, dTTP, dGTP, dCTP, 12,5 unidades de transcriptasa inversa MuLV (Gibco BRL).

Amplificación por PCR de productos de ADNc de primera cadena

Se sometió el ADNc derivado de 100 ng de ARN total para cada muestra a amplificación por PCR en una única reacción para identificar transcritos tanto diana como de GAPDH. Las concentraciones finales de cebador/sonda para la diana eran de cebador 1 300 nM, cebador 3 300 nM y sonda 5 200 nM, las de GAPDH eran de cebador 2 20 nM, cebador 4 20 nM y sonda 6 100 nM. La concentración final de otros reactivos en la reacción era del 4,5% de glicerol, tampón TaqMan A 1 x (Perkin Elmer), MgCl<sub>2</sub> 6,25 mM, dATP 430 M, dUTP, dGTP, dCTP, 2,5 unidades de AmpliTaq Gold. Se llevó a cabo la amplificación por PCR en el sistema de detección de secuencias ABI 7700, una etapa de activación enzimática inicial de 94°C durante 12 min se siguió por 45 ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min (tiempo de rampa mínimo).

Enfermedades y tejidos sometidos a prueba

45 Se comparó la expresión del ARNm de enovina en tejidos derivados de pacientes enfermos e individuos control normales (figuras 25 y 26). La tabla siguiente muestra las enfermedades y tejidos correspondientes que se han investigado. Para cada estado, se analizaron tres muestras enfermas y tres control.

Patología	Tejido 1	Tejido 2	Tejido 3
Enfermedad de Alzheimer	Corteza temporal	Hipocampo	Corteza occipital
Esclerosis múltiple	Médula espinal	Materia blanca periventricular	Cerebelo
Enfermedad de Parkinson	Sustancia negra	Putamen	Cerebelo
Cáncer	Adenocarcinoma de colon	Adenocarcinoma ductal de mama	Carcinoma de célula escamosa del pulmón

50 Análisis estadístico

Para cada grupo de 3 tejidos, se calcularon la media y la desviación estándar sobre los valores de Ct (que están normalmente distribuidos) y se convirtieron en valores de Cn según la fórmula  $Cn = 10^{((Ct-40,007)/-3,623)}$ . Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) sobre los valores de Ct también para comparar los niveles de expresión de ARNm

de enovina medios en tejidos normales frente a enfermos.

Las figuras 25 y 26 muestran los números de copias de ARNm de enovina medios ( $\pm$ DE; n=3) en tejidos enfermos frente a control. El análisis estadístico mostró un aumento significativo en el nivel de expresión de enovina en la materia blanca periventricular de pacientes con esclerosis múltiple ( $p = 0,013$ ). El control de GAPDH interno no

5 mostró ninguna diferencia significativa ( $p = 0,79$ ). Aunque el nivel de expresión de enovina en la materia blanca periventricular es bastante bajo en tejidos normales (270 copias por 100 ng de ARN total de promedio frente a 200000 copias de GAPDH), el nivel es tres veces superior (825) en pacientes con esclerosis múltiple.

10 Sólo otro tejido enfermo mostró una diferencia significativa frente al control normal: en adenocarcinoma ductal de mama, el nivel de expresión de ARNm de enovina es 6 veces superior (6000 frente a 1000;  $p = 0,007$ ), pero el valor de control de GAPDH también está significativamente aumentado (165000 frente a 44000;  $p = 0,03$ ), representando probablemente un aumento general en los niveles de ARNm.

15 En conclusión, se ha encontrado que los niveles de ARNm de enovina se regulan por incremento en la materia blanca periventricular de pacientes con esclerosis múltiple.

Uso de ELISA basada en células de anticuerpos fosfoespecíficos para la detección de enovina mimética en complejo receptor GFR $\alpha$ 3/cRET

20 El método también puede usarse para la identificación de agonistas o antagonistas de otros receptores neurotróficos, tales como GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 4, TrkA, TrkB y TrkC

Ensayo

25 Usando este ensayo pueden identificarse compuestos agonistas o antagonistas de factores de crecimiento neurotróficos midiendo la activación de cinasas de señalización clave activadas en la ruta neurotrófica o midiendo la activación de receptor cinasa cRET. La activación se mide detectando la cantidad de cinasa fosforilada o receptor cinasa usando anticuerpos fosfoespecíficos. Se usarán células NIH 3T3 que expresan transitoria o

30 permanentemente TrkA, TrkB, TrkC, GFR $\alpha$ 1/cRET, GFR $\alpha$ 2/cRET, GFR $\alpha$ 3/cRET o GFR $\alpha$ 4/cRET.

La activación de p42/p44 MAP cinasa, PKB cinasa, c-jun, CREB, JNK/SAPK cinasa y otras cinasas se detecta usando anticuerpos fosfoespecíficos comercialmente disponibles. Además, la activación de cRET puede eliminarse usando anticuerpo cRET fosfoespecífico.

35 El protocolo usado fue tal como sigue:

- Recubrir en placas células NIH 3T3 en 96 pocillos con suero de ternero al 10%, las células tienen que ser confluentes al 80% antes de la estimulación.

40 - Al día siguiente, sustituir el medio con medio libre de suero y dejar en ayunas a las células durante 18-24 h.

- Tras el ayuno, estimular las células con compuestos y factores neurotróficos como control positivo (10 ng/ml para los factores neurotróficos).

45 - Fijar las células con formaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 20 min.

- Lavar las células 3 veces con 200  $\mu$ l PBS/Triton al 0,1% durante 5 min.

50 - Extinguir las células con 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,6% en PBS/Triton al 0,1% durante 20 min.

- Lavar las células 3 veces con 200  $\mu$ l PBS/Triton al 0,1% durante 5 min.

- Bloquear las células con 100  $\mu$ l de suero de ternero fetal al 10% en PBS/Triton al 0,1% durante 60 min.

55 - Incubar las células con anticuerpo fosfoespecífico en 50  $\mu$ l de BSA al 5%/PBS/Triton al 0,1%, durante la noche a 4°C. La dilución del anticuerpo debe determinarse experimentalmente, el intervalo sugerido es de 1:100-1:250.

- Lavar las células 3 veces con 200  $\mu$ l PBS/Triton al 0,1% durante 5 min.

60 - Incubar con anticuerpo secundario unido con HRP, dilución de 1:100 en 50  $\mu$ l de BSA al 5%/PBS/Triton al 0,1%, durante 1 h a temperatura ambiente.

- Lavar las células 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS/Triton al 0,1% durante 5 min.

65

- Disolver un comprimido de OPD (Sigma) en 25 ml de tampón (3,65 g de ácido cítrico-H<sub>2</sub>O y 5,9 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O en 0,5 l de H<sub>2</sub>O, pH 5,6) y añadir 12,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Añadir 50 µl a cada pocillo e incubar durante 15 min en un agitador (200 rpm), cubrir con lámina de aluminio.

5 - Detener la reacción con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

- Medir la DO<sub>490-650</sub> en el lector ELISA.

Cultivo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

10 Cultivo neuronal

15 Se prepararon cultivos neuronales a partir del mesencéfalo anterior de rata fetal mediante dispersión enzimática y mecánica. Se recogió el tejido, se lavó en solución salina tamponada con fosfato libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> enhiada en hielo que contenía glucosa al 0,6% (PBSG) y se incubó durante 30 min con PBSG que contenía tripsina al 0,1% a 37°C. Se recubrió en placas la suspensión celular con una densidad de 2,5 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> sobre placas de cultivo tisular NUNC de 96 pocillos. Previamente, se recubrieron las placas de cultivo con poli-L-ornitina y CDM que contenían suero de ternero fetal al 10%. Se mantuvieron los cultivos en medio químicamente definido (CDM), compuesto por una mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y nutriente F12 complementado con glucosa (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sodio (3 mM), HEPES (5 mM), insulina (25 µg/ml), transferrina humana (100 µg/ml), putrescina (60 µg/ml), selenito de sodio (30 nM), estreptomycin (100 µg/ml) y penicilina (100 UI/ml).

25 Tratamiento con factores neurotróficos

Se disolvieron neurotrofinas en albúmina de suero bovino al 0,5% como disolución madre. Se añadieron neurotrofinas 3 h tras el recubrimiento en placas inicial y tras 5 días en cultivo. Se añadió la misma cantidad de albúmina de suero bovino al 0,5% a los pocillos control.

30 Captación de dopamina de alta afinidad

35 Se midió la captación de dopamina tras 10 días. Para la captación, se lavaron las células dos veces con PBS calentado previamente complementado con glucosa (5 mM), ácido ascórbico (100 mM) y pargilina (100 mM) y se incubaron previamente durante 10 min con la misma disolución. La disolución de incubación previa se sustituyó con la misma disolución que contenía [<sup>3</sup>H]DA 50 nM y se continuó la incubación durante 15 min a 37°C. Se detuvo la captación mediante 3 lavados rápidos con PBS enhiado en hielo. Se liberó la [<sup>3</sup>H]dopamina acumulada incubando con etanol acidificado durante 30 min a temperatura ambiente. Se determinó la radioactividad tras la adición de 4 ml de líquido de centelleo (Packard ultima gold MV) usando un contador de centelleo Packard. Se determinó captación no específica añadiendo cocaína 20 µM.

40 Tabla 4: Efecto de enovina sobre la captación de [<sup>3</sup>H]dopamina

Tratamiento	Porcentaje de la captación de [ <sup>3</sup> H]dopamina del control	n
Control	100	5
enovina 300 ng/ml	111	4
enovina 1000 ng/ml	127	5
enovina 2000 ng/ml	152	5
enovina 4000 ng/ml	161	1
enovina 10000 ng/ml	165	2

45 Se hicieron crecer las células durante 10 días en presencia o ausencia de enovina. Se fijaron los controles sin tratar como el 100 %. Los resultados se obtienen en 1-5 experimentos independientes.

**Referencias**

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215, 403-410.

50 Angrist, M., Bolk, S., Halushka, M., Lapchak, P.A. & Chakravarti, A. (1996) Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. Nature Genetics 14, 341-344.

- Baloh, R.H., Tansey, M.G., Golden, J.P., Creedon, D.J., Heuckeroth, R.O., Keck, C.L., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1997) TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron* 18, 793-802.
- 5 Baloh, R.H., Gorodinsky, A., Golden, J.P., Tansey, M.G., Keck, C.L., Popescu, N.C., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1998) GFR $\alpha$ 3 is an orphan member of the GDNF/neurturin/persephin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5801-5806.
- 10 Barr, P.J. (1991) Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* 66,1-3.
- Beck, K.D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, RA., Rosenthal, A. & Hefti, F. (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373, 339-341.
- 15 Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert J.J., Mallet, J. & Horellou, P. (1997) Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,8818-8823.
- 20 Buj-Bello, A., Buchman, V.L., Horton, A., Rosenthal, A. & Davies A.M. (1995) GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* 15,821-828.
- Buj-Bello, A., Adu, J., Piñón, L.G.P., Horton, A., Thompson, J., Rosenthal, A., Chinchetru, M., Buchman, V.L. & Davies, A.M. (1997) Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 387, 721-724.
- 25 Choi-Lundberg, D.L., Lin, Q., Chang, Y.N., Chiang, Y.L., Hay, C.M., Mohajeri, H., Davidson, B.L. & Bohn, M.C. (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science*. 275, 838-841.
- 30 Creedon, D.J., Tansey, M.G., Baloh, R.H., Osborne, P.A., Lampe, P.A., Fahrner, T.J., Heuckeroth, R.O., Milbrandt, J. & Johnson, E.M. (1997) Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7018-7023.
- 35 Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C.V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M., Sariola, H. & Pachnis, v. (1996) GDNF signalling through the RET receptor tyrosine kinase. *Nature* 381, 789-793.
- 40 Edery, P., Lyonnet, S., Mulligan, L.M., Pelet, A., Dow, E., Abel L., Holder S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B.A. & Munnich, A. (1994) Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367, 378-380.
- Gash, D.M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., Hoffer, B.J. & Gerhardt, G.A. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380,252-255.
- 45 GFR $\alpha$  Nomenclature Committee (1997) Nomenclature of GPI-linked receptors for the GDNF ligand family. *Neuron* 19, 485.
- Hakim A "Ischemic penumbra: the therapeutic window." *Neurology*. 1998 Sep; 51 (3 Suppl 3): S44-6.
- 50 Henderson, C.E., Phillips, H.S., Pollock, R.A., Davies, A.M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R.A., Koliatsos, V.E. & Rosenthal, A. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062-1064.
- 55 Heng, H.H.Q., Squire, J. & Tsui, L.-C. (1992) High resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9509-9513.
- Heng, H.H.Q. & Tsui, L.-C. (1993) Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization. *Chromosoma* 102, 325-332.
- 60 Heuckeroth, R.O., Kotzbauer, P., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1997) Neurturin, a novel neurotrophic factor, is localized to mouse chromosome 17 and human chromosome 19p13.3. *Genomics* 44, 137-140.
- 65 Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J.-C., Hu, S., Altrock, B.W. & Fox, G.M. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- $\alpha$ , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-1124.

- Jing, S., Yu, Y., Fang, M., Hu, Z., Holst, P.L., Boone, T., Delaney, J., Schultz, H., Zhou, R. & Fox, G.M. (1997) GFR $\alpha$ -2 and GFR $\alpha$ -3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J. Biol. Chem.* 272, 33111-33117.
- 5 Kingsley, D.M. (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* 8, 133-146.
- Klein, R.D., Sherman, D., Ho, W.-H., Stone, D., Bennett, G.L., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Gu, Q., Hongo, J.-A., Devaux, B., Poulsen, K., Armanini, M., Nozaki, C., Asai, N., Goddard, A., Phillips, H., Henderson, C.E.,  
10 Takahashi, M. & Rosenthal, A. (1997) A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 387, 717-721.
- Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1996)  
15 Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384, 467-470.
- Lin, L.-F.H., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S. & Collins, F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132.
- Mandel, R.J., Spratt, S.K., Snyder, R.O. & Leff, S.E. (1997) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus  
20 encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14083-14088.
- Marsden y otros "The causes of Parkinson's disease are being unraveled and rational neuroprotective therapy is close to reality." *Ann Neurol.* 1998 Sep; 44 (3 Suppl 1): S189-96  
25
- Masure, S., Cik, M., Pangalos, M.N., Bonaventure, P., Verhasselt, P., Lesage, A.S., Leysen, J.E. & Gordon R.D. (1998) Molecular cloning, expression and tissue distribution of glial-cell-line-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ -3 (GFR $\alpha$ -3). *Eur. J. Biochem.* 251, 622-630.
- 30 Matsushita, N., Fujita, Y., Tanaka, M., Nagatsu, T. & Kiuchi, K. (1997) Cloning and structural organization of the gene encoding the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF. *Gene* 203,149-157.
- Milbrandt, J., de Sauvage, F.J., Fahrner, T.J., Baloh, R.H., Leitner, M.L., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Kotzbauer, P.T., Simburger, K.S., Golden, J.P., Davies, J.A., Vejsada, R., Kato, A.C., Hynes, M., Sherman, D.,  
35 Nishimura, M., Wang, L.C., Vandlen, R., Moffat, B., Klein, R.D., Poulsen, K., Gray, C., Garces, A., Henderson, C.E., Phillips, H.S. & Johnson, E.M. Jr. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20, 245-253.
- Moore, M.W., Klein, R.D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L.F., Ryan, A.M., Carver-Moore, K. & Rosenthal, A. (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76-79.  
40
- Mount, H.T., Dean, D.O., Alberch, J., Dreyfus, C.F. & Black, I.B. (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9092-9096.
- 45 Nagy Z y otros "The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease." *Neuroscience.* 1998 Dec; 87(4): 731-9.
- Naveilhan, P., Baudet, C., Mikaels, A., Shen, L., Westphal, H. & Ernfors, P. (1998) Expression and regulation of GFR $\alpha$ 3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1295-1300.  
50
- Nuydens R, Dispersyn G, Van den Kieboom G, De Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H "Bcl-2 protects neuronal cells against taxol-induced apoptosis by inducing multi-nucleation", submitted
- Oppenheim, R.W., Houenou, L.J., Johnson, J.E., Lin, L.F., Li, L., Lo, A.C., Newsome, A.L., Prevetie, D.M. & Wang, S. (1995) Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373, 344-346.  
55
- Pichel, J.G., Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., Sariola, H. & Westphal, H. (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 73-76.  
60
- Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., Kaariainen, H. y otros (1994) Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367, 377378.  
65
- Sanchez, M.P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S.A. & Barbacid, M. (1996) Renal agenesis and the

absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70-73.

Sanicola, M., Hession, C., Worley, D., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Walus, L., Robinson, S., Jaworski, G., Wei, H., Tizard, R., Whitty, A., Pepinsky, R.B. & Cate, R.L. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6238-6243.

Smirnova y otros "Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons". *J Neurobiol.* 1998 Jul; 36 (1): 64-80.

Srinivisan y otros "Serum from patients with type 2 diabetes with neuropathy induces complement-independent, calcium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells." *J Clin Invest.* 1998 Oct 1; 102 (7): 1454-62

Steger C "An unbiased detector of curvilinear structures "IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence, 20, 2, 113-125 (1998)

Suvanto, P., Wartiovaara, K., Lindahl, M., Arumäe, U., Moshnyakov, M., Horelli-Kuitunen, N., Airaksinen, M.S., Palotie, A., Sariola, H. & Saarma, M. (1997) Cloning, mRNA distribution and chromosomal localisation of the gene for glial cell line-derived neurotrophic factor receptor  $\beta$ , a homologue to GDNFR $\alpha$ . *Human Mol. Genet.* 6, 1267-1273.

Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.F., Ogren, S.O., Young, D., Hoffer, B.J. & Olson, L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373, 335-339.

Treanor, J.J.S., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D.M., Poulsen, K.T., Beck, C.D., Gray, C., Armanini, M.P., Pollock, R.A., Hefti, F., Phillips, H.S., Goddard, A., Moore, M.W., Buj-Bello, A., Davies, A.M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C.E. & Rosenthal, A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382, 80-83.

Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A.S., Sieber, B.A., Grigoriou, M., Kilkenny, C., SalazarGrueso, E., Pachnis, V., Arumäe, U., Sariola, H., Saarma, M. & Ibanez, C.F. (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381, 785-788.

Wellington y otros "Toward understanding the molecular pathology of Huntington's disease." *Brain Pathol.* 1997 Jul; 7 (3): 979-1002.

Widenfalk, J., Nosrat, C., Tomac, A., Westphal, H., Hoffer, B. & Olson, L. (1997) Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor- $\beta$  (GDNFR- $\alpha$ ), novel proteins related to GDNF and GDNFR- $\alpha$  with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J. Neurosci.* 17, 8506-8519.

Widenfalk, J., Tomac, A., Lindqvist, E., Hoffer, B. & Olson, L. (1998) GFR $\alpha$ -3, a protein related to GFR $\alpha$ -1, is expressed in developing peripheral neurons and ensheathing cells. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1508-1517.

Worby, C.A., Vega, Q.C., Zhao, Y., Chao, H. H.-J., Seasholtz, A.F. & Dixon, J.E. (1996) Glial cell line derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates nitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 23619-23622.

Worby, C.A., Vega, Q.C., Chao, H.H.J., Seasholtz, A.F., Thompson, R.C. & Dixon J.E. (1998) Identification and characterization of GFR $\alpha$ -3, a novel co-receptor belonging to the glial cell line-derived neurotrophic receptor family. *J. Biol. Chem.* 273, 3502-3508.

Yan, Q., Matheson, C. & Lopez, O.T. (1995) In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373, 341-344.

55 **Lista de abreviaturas**

BLAST	herramienta de búsqueda mediante alineación local básica
pb	pares de bases
ADNc	ADN complementario
SNC	sistema nervioso central
EST	marcador de secuencias expresadas
EVN	enovina

GDNF	factor neurotrófico derivado de la línea celular glial
GFR $\alpha$	receptor $\alpha$ de la familia GDNF
GPI	glucosil fosfatidil inositol
MTC	ADNc de tejidos múltiples
NTN	neurturina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
SNP	sistema nervioso periférico
PSP	persefina
RT-PCR	PCR de transcripción inversa
TGF- $\beta$	factor $\beta$ de crecimiento transformante
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
MTN	Northern de múltiples tejidos
NGF	factor de crecimiento nervioso
SPR	resonancia de plasmón superficial

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un factor de crecimiento neurotrófico codificado por una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico desde la posición 81 hasta la 419 de la secuencia ilustrada en la figura n.º 1 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos neurales.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno neural se selecciona de cualquiera del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, trastornos neuronales asociados con secuencias de poliglutamina extendidas, tales como la enfermedad de Huntingdon, neuropatía periférica, lesión cerebral aguda, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo nervioso periférico o lesión por exposición a neurotoxinas, neoplasia endocrina múltiple y enfermedad de Hirschsprung familiar, enfermedades asociadas con prión, enfermedad de Creutzfeld-Jacob y accidente cerebrovascular.
- 15 3. Uso de una molécula de ácido nucleico que codifica para un factor de crecimiento neurotrófico humano denominado enovina y que tiene la secuencia de ácido nucleico desde la posición 81 hasta la 419 de la secuencia ilustrada en la figura n.º 1 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos neurales.
- 20 4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicho trastorno neural se selecciona de cualquiera del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, trastornos neuronales asociados con secuencias de poliglutamina extendidas, tales como la enfermedad de Huntingdon, neuropatía periférica, lesión cerebral aguda, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo nervioso periférico o lesión por exposición a neurotoxinas, neoplasia endocrina múltiple y enfermedad de Hirschsprung familiar, enfermedades asociadas con prión, enfermedad de Creutzfeld-Jacob y accidente cerebrovascular.

FIG. 1.

P P Q P S R P A P P P P A P P S	16
cgccgcccgcagccttctcggccccgcgcccccgccgctgcacccccatct	50
A L P R G G <u>R A A R</u> A G G P G S R	33
gctcttcccccgsggggcccgcgcccgggctgggggcccgggcagccg	100
A R A A G A R G C R L R S Q L V	49
cgctcgggcagcggggcgccggggctgccgcctgcgctcgcagctgggtgc	150
P V R A L G L G H R S D E L V R F	66
cggtgcgcgcgctcggcctggggccaccgctccgacgagctggcgcttc	200
R F C S G S C R R A R S P H D L S	83
cgcttctgcagcggctcctgccgcgcgcccgcctctccacacgacctcag	250
L A S L L G A G A L R P P P G S	99
cctggccagcctactggcgcccggggccctgcgaccgccccgggctccc	300
R P V S Q P C C R P T R Y E A V S	116
ggcccgtcagccagccctgctgccgacccacgcgctacgaagcggctctcc	350
F M D V <u>N S T</u> W R T V D R L S A T	133
ttcatggacgtcaacagcacctggagaaccgtggaccgcctctccgccac	400
A C G C L G *	139
cgccctgcggctgcctgggctgagggctcgcctccagggctttgcagactgg	450
acccttaccgggtggcctctccctgc	474

FIG. 2.

hGDNF	:	SPDKQMAVLP	RRERNRQAAA	PENSRGKGR	RRQGRK	NRCV	IAIHLN	VTDLGLG	YETKEE	LIFRYC	SG	:	70		
hNTN	:	-----	-----	-----	ARLGR	PCG	IELEVR	SEDLGLG	YASDE	TWLF	RYCAG	:	37		
hPSP	:	-----	-----	-----	-----	ALSGP	COIWSL	TSVAEL	GLGYA	SEK	WIFRYC	:	35		
hEVN	:	-----	-----	ACGPG	SRARA	AGAR	CRIR	SQLV	VRALGL	GHR	SDEL	VRER	FCSSG	:	45

\*

hGDNF	:	SCDA	AE	TYDK	IKNI	SRNR	RI	VS	---	DKVG	QAC	CR	PIA	FDD	DL	SF	LD	DN	L	V	Y	H	I	R	K	H	S	A	K	R	C	G	G	I	-	:	134																									
hNTN	:	ACEA	AR	VYDI	GLR	RL	R	RR	RI	RR	---	ER	VRA	Q	CC	CR	P	T	A	Y	E	D	E	V	S	E	L	P	A	H	S	R	Y	H	T	V	H	E	L	S	A	R	E	C	A	C	V	-	:	102												
hPSP	:	SCPR	GA	TQ	H	G	L	A	L	A	R	L	Q	G	Q	---	RA	H	G	G	P	C	C	R	P	T	R	Y	T	-	D	V	A	F	L	D	D	R	H	R	Q	R	L	P	Q	L	S	A	A	A	C	G	C	G	G	:	96					
hEVN	:	SCRR	AR	SP	H	D	S	L	S	L	L	G	A	G	A	I	R	P	P	P	P	S	P	Q	P	C	C	R	P	T	R	I	E	-	A	V	S	E	M	D	V	N	S	T	W	R	T	V	D	R	L	S	A	T	A	C	G	C	L	G	:	113

\*\*

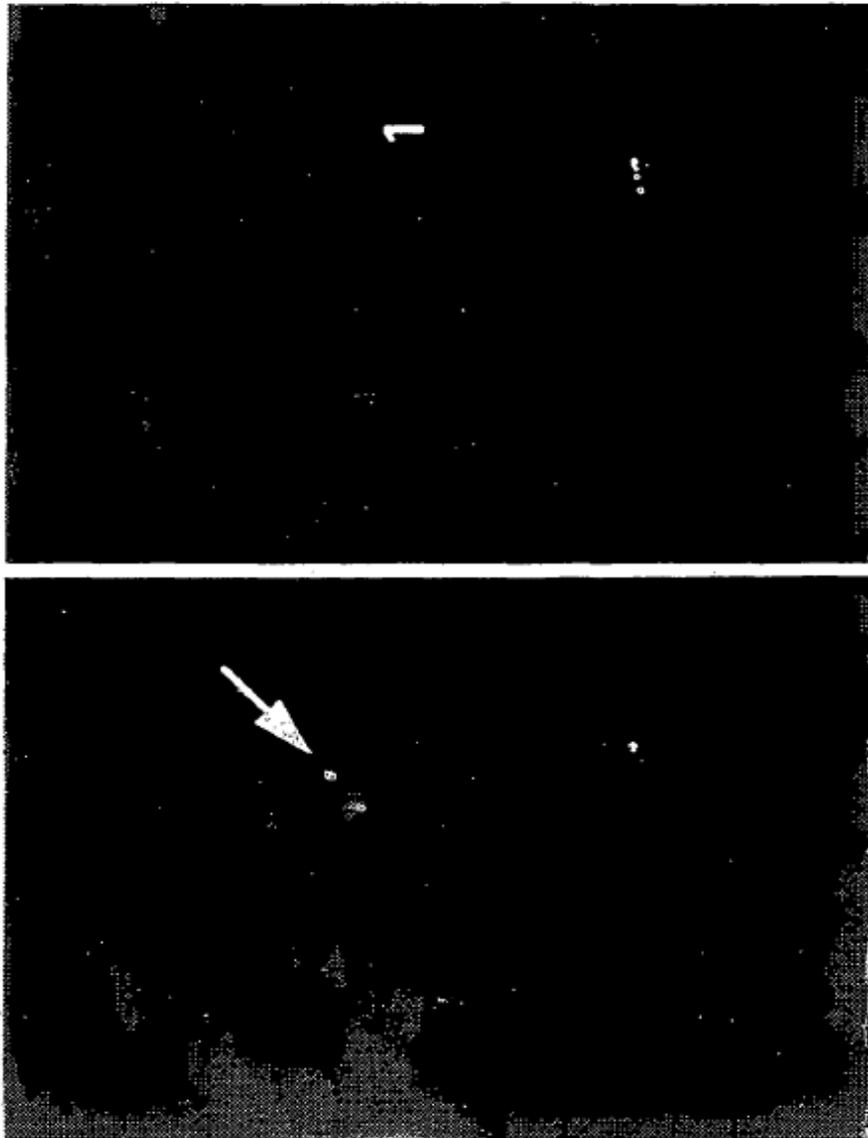
FIG. 3.

marco de lectura A	M P G L I S A	7
gagtttccccctccacacagctaggagcccctgcccggcctgatctcagcc		50
R G Q P L L E V L P P Q A H L G A		24
cgaggacagccccctccttgaggctccttcctcccccaagcccacctgggtgc		100
L F L P E A F L G L S A Q P A L		A40
cctctttctccctgaggctccacttggtctctccgcgcagcctgcctgt		150
W P T L A A L A L L S S V A E A S		A57
ggccccacctggccgctctggctctgctgagcagcgtcgcagaggctctcc		200
L G S A P R S P A P R E G F P P V		A74
ctgggctcccgcccccgagccctgccccccgggaggccccccgctgt		250
L A S P A G H L P G R *		A85
cctggcgtcccccgccggccacctgcccggtaggtgagagggcgaggggg		300
marco de lectura B	* L G L I P G	B6
cggggcggggctggccccgggacaccgcgctgactgggtctcattccagg		350
G R T A E W C S G R A R R P P P		B22
gggacgcacggccccgctggtgcagtgggaagagccccggcggccgcccgcgc		400
Q P S R P A P P P P A P P S A L P		B39
agccttctcggccccggcccccgccctgcacccccatctgctcttccc		450
R G G <u>R A A R</u>   A G G P G S R A R A		B56
cgccggggcccgcgccggccgggtctggggggccccgggacagccgctcggggc		500
A G A R G C R L R S Q L V P V R		B72
agcggggggccggggctgcccgcctgcgctcgcagctggtgcccgggtgcgcg		550
A L G L G H R S D E L V R F R F C		B89
cgctcggcctggggccaccgctccgacgagctggtgcgttcccgcttctgc		600
S G S C R R A R S F H D L S L A S		B106
agcgggtcctgcccgcgcgcgctctccacacgacctcagcctggccag		650
L L G A G A L R P P P G S R P V		B122
cctactggggcgcggggccctgacaccgccccgggctcccggcccgtca		700
S Q P C C R P T R Y E A V S F M D		B139
gccagccctgctgcccacccacgcgctacgaagcgggtctccttcctggac		750
V <u>N S T</u> W R T V D R L S A T A C G		B156
gtcaacagcacctggagaaccgtggaccgcctctccgcccaccgctcggg		800
C L G *		B159
ctgcctggggctgagggtc		819

FIG. 4A.



FIG. 4B.



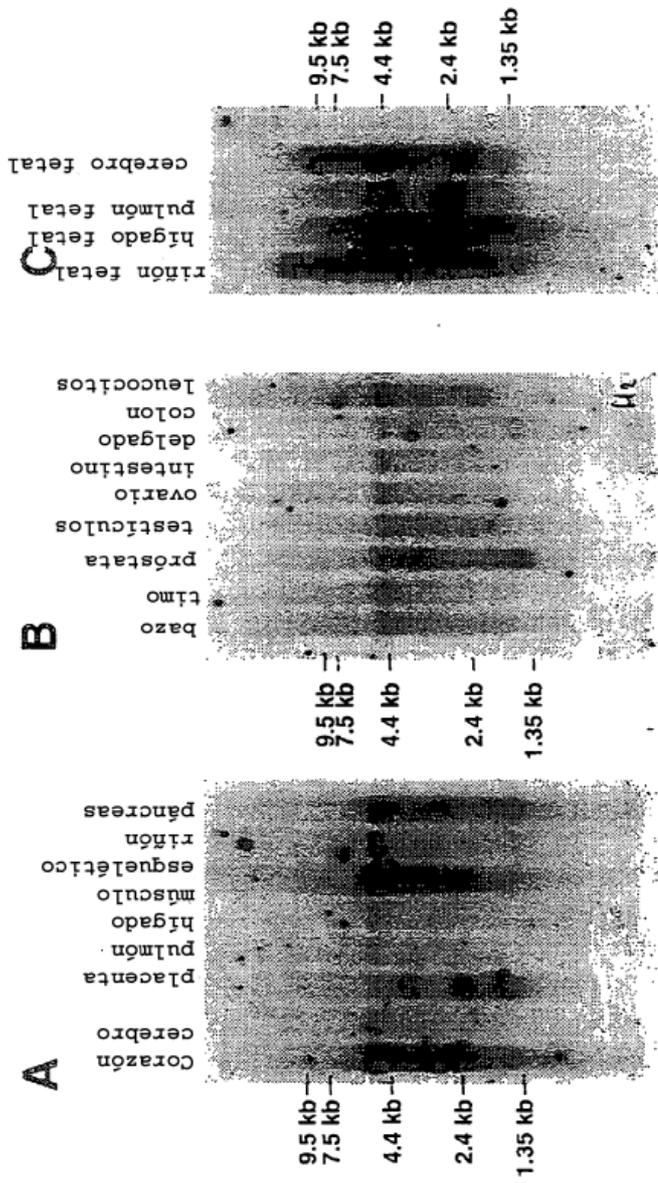


FIG. 5.

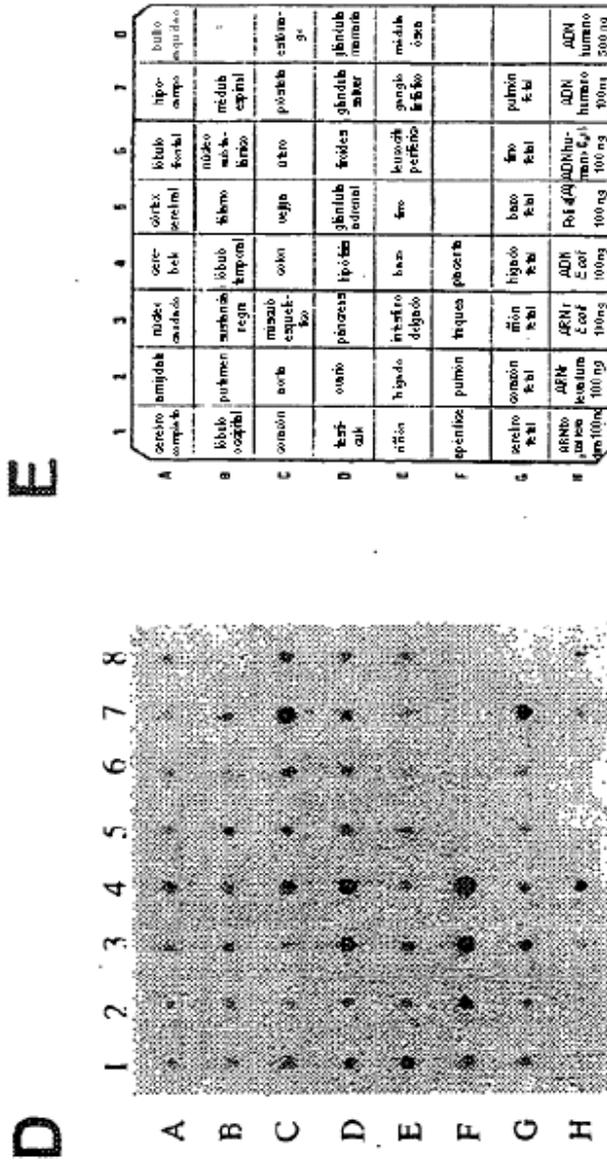


FIG. 5 (CONTINUACIÓN)

FIG. 6.

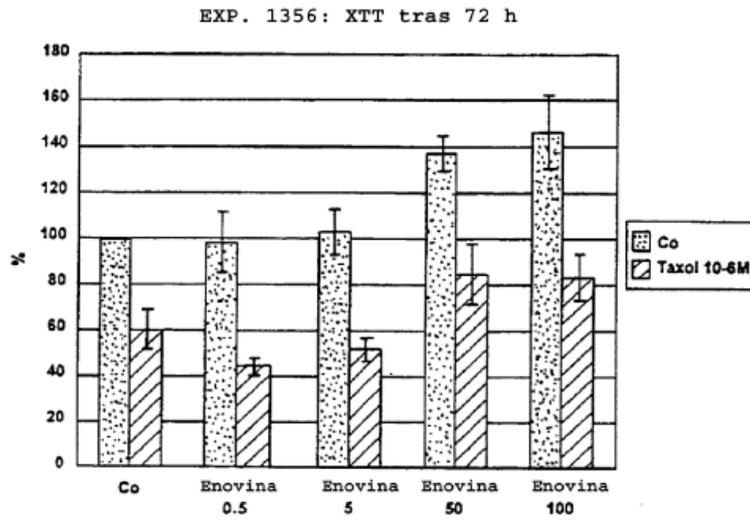


FIG. 7

Enovina sobre la morfología de las células SHSY5Y diferenciadas con estaurosporina

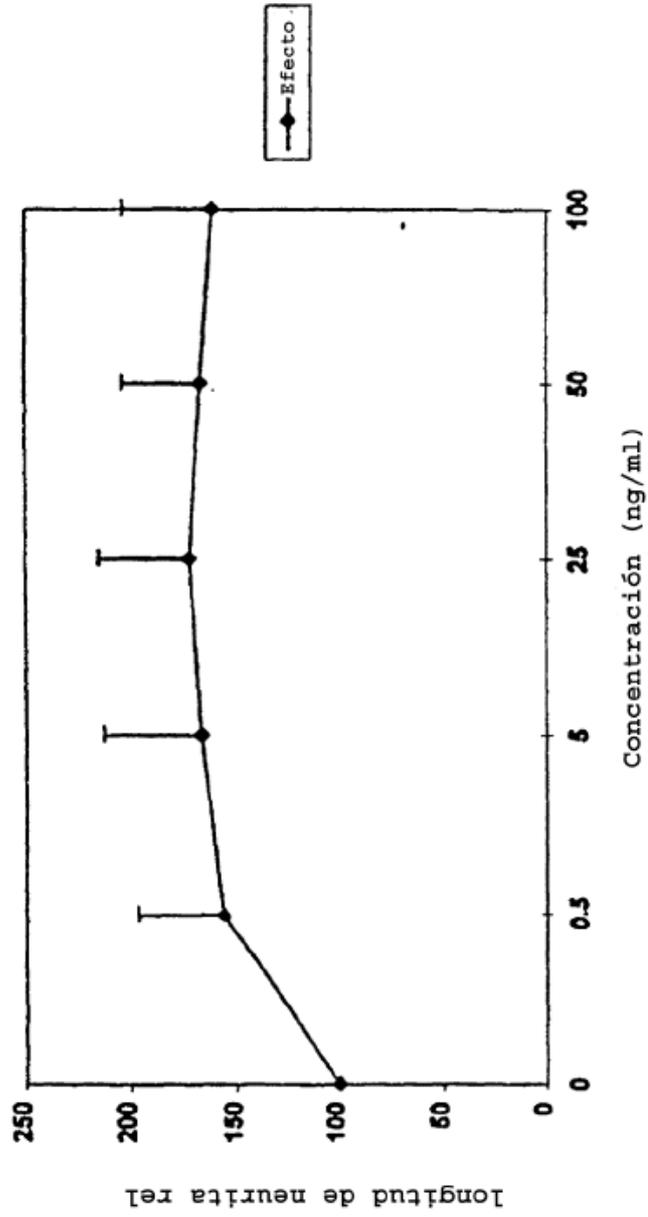


FIG. 8.

Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de células de fibroblastos dérmicos humanas (39SK) (tratamiento de un día)

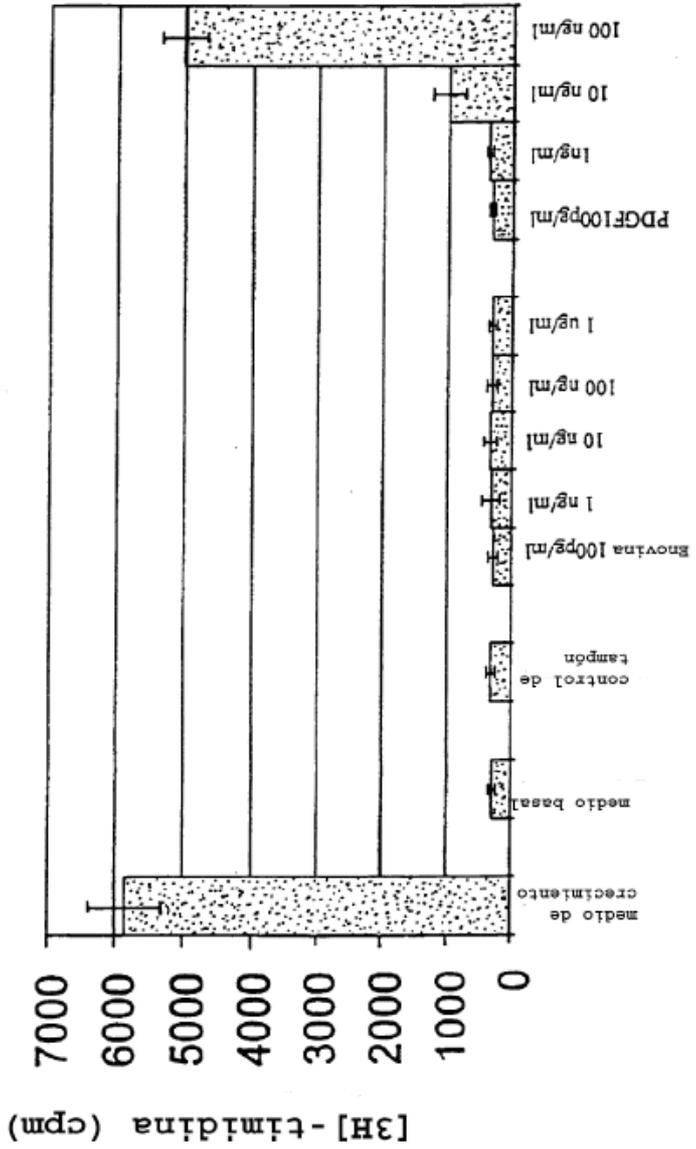
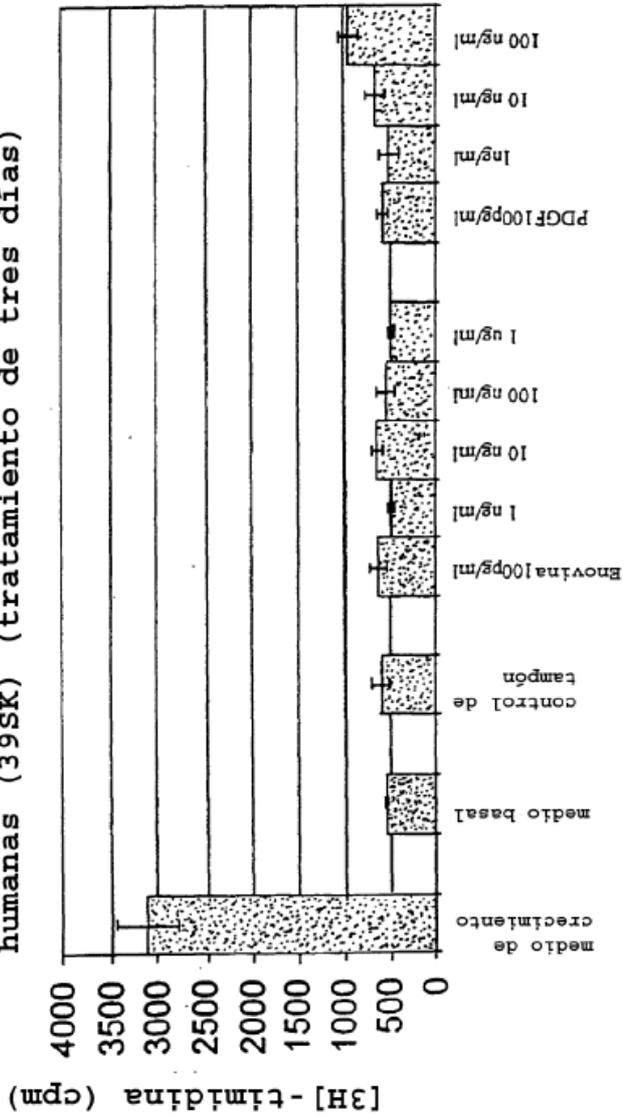


FIG. 9.

Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de células de fibroblastos dérmicos humanas (39SK) (tratamiento de tres días)



*FIG. 10.*  
 Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de condrocitos humanos (tratamiento de dos días)

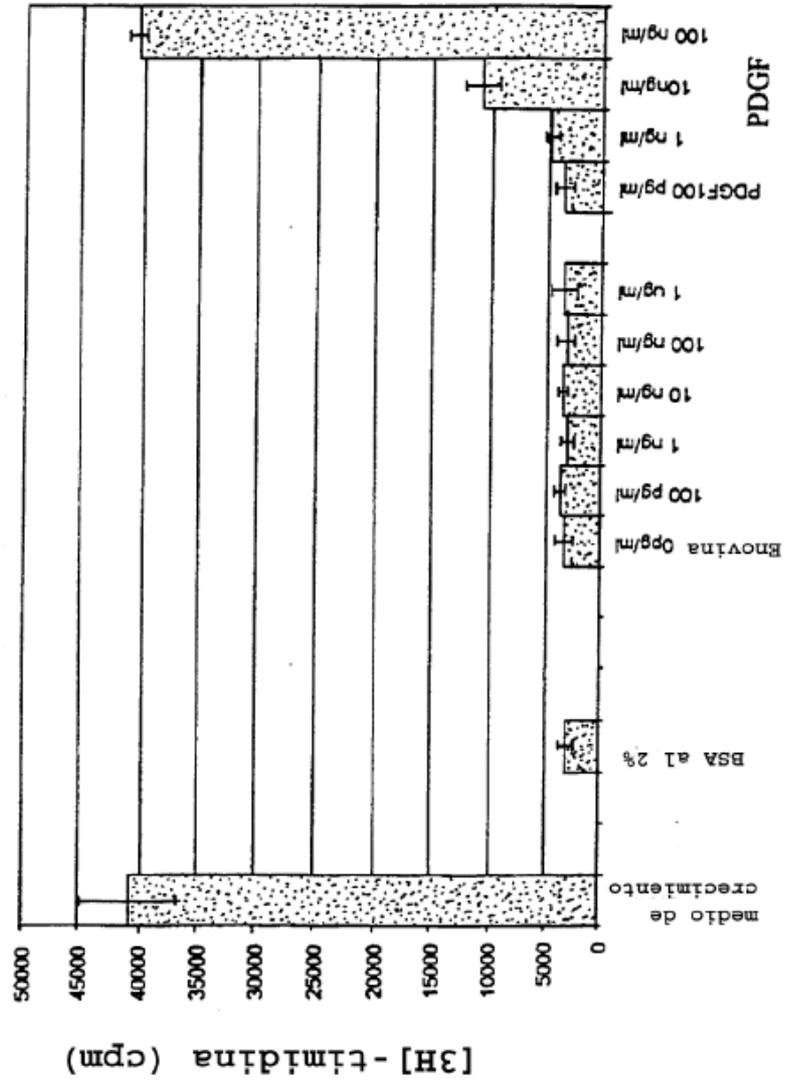
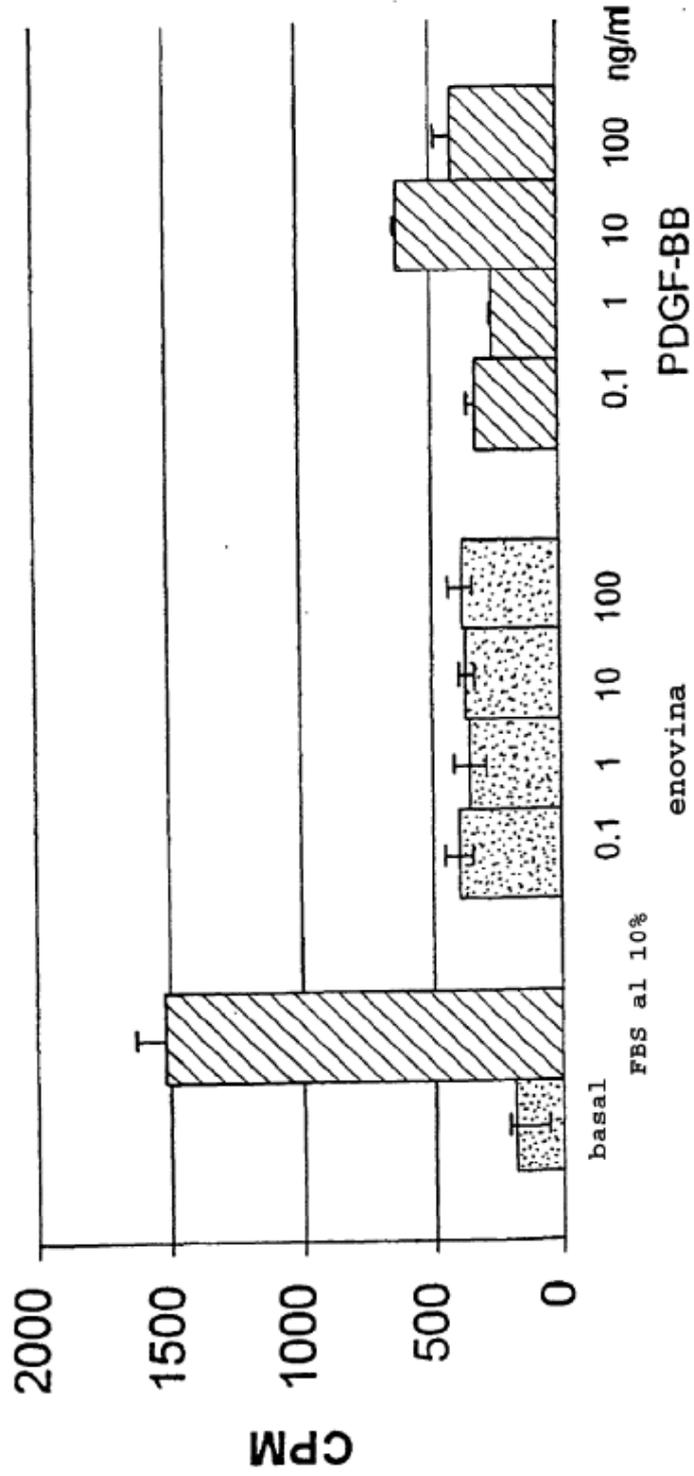
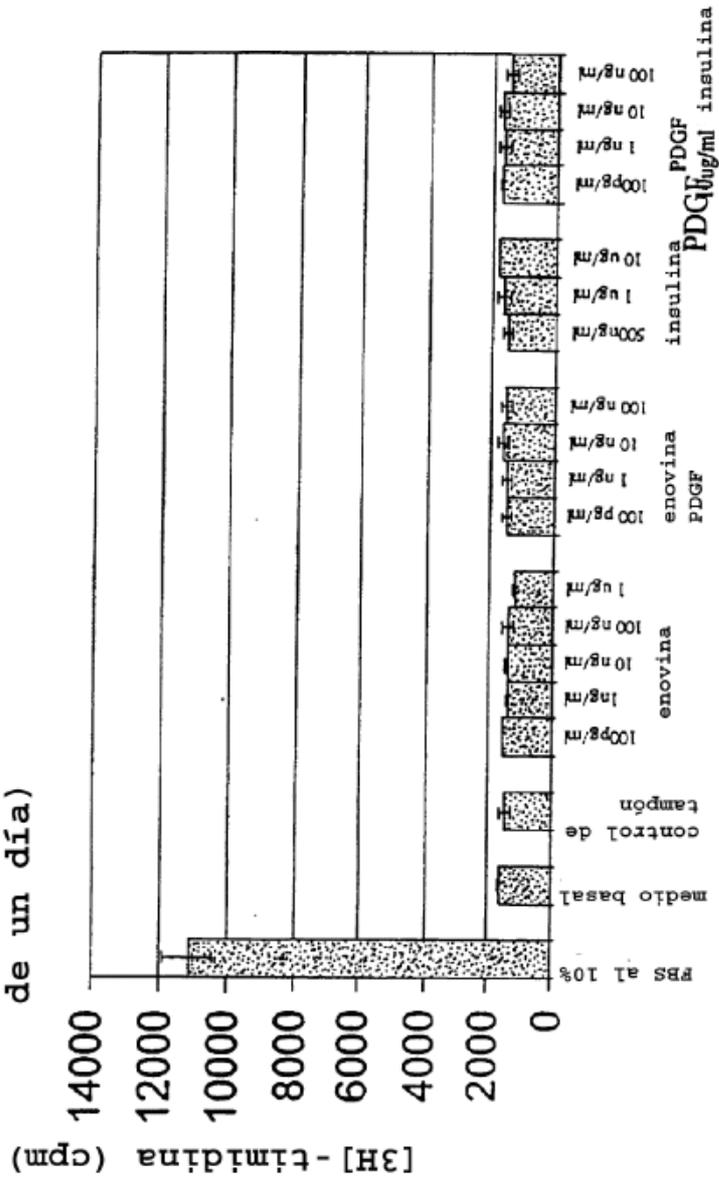


FIG. 11.

El efecto de enovina sobre la tasa de proliferación de fibroblastos dérmicos humanos



*FIG. 12.*  
 Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (tratamiento de un día)



*FIG. 13.*  
 Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (tratamiento de un día)

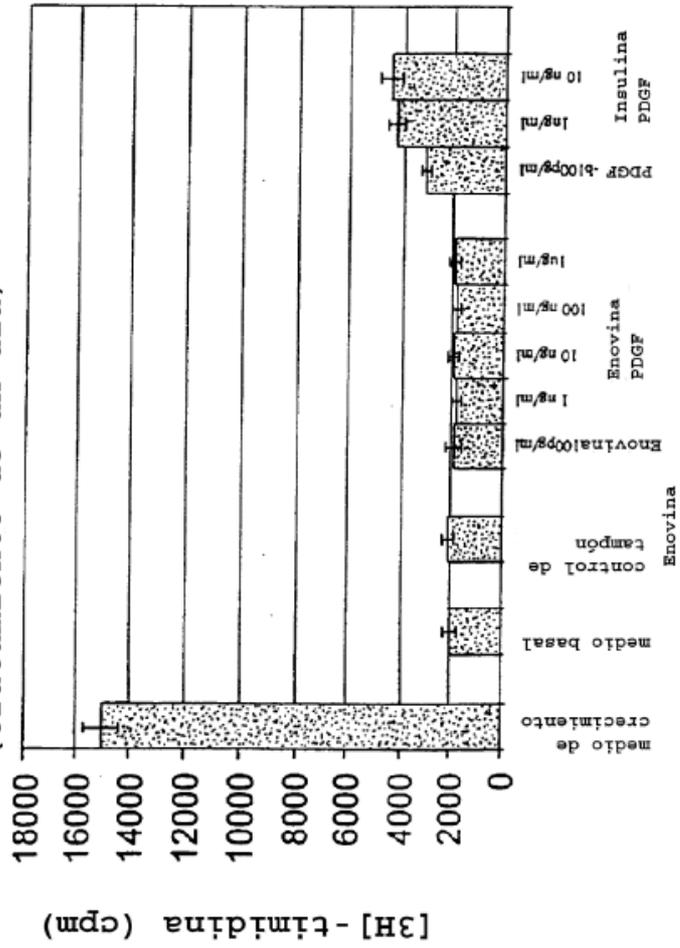


FIG. 1A

Los efectos de enovina sobre la migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana

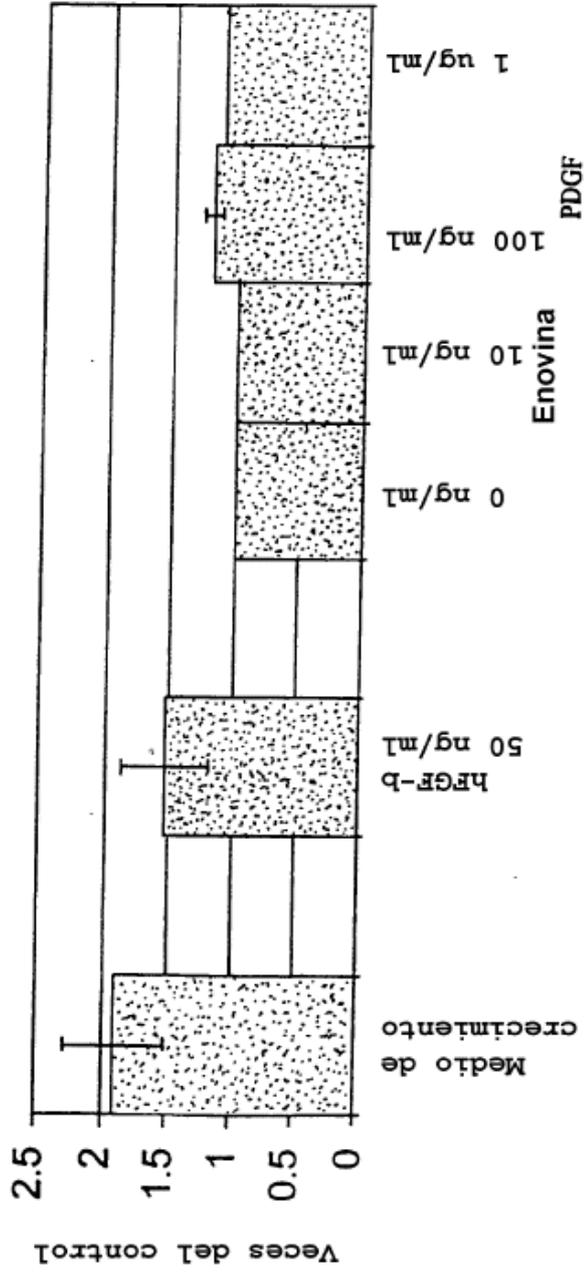


FIG. 15.

Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de osteoblastos de rata (tratamiento de un día)

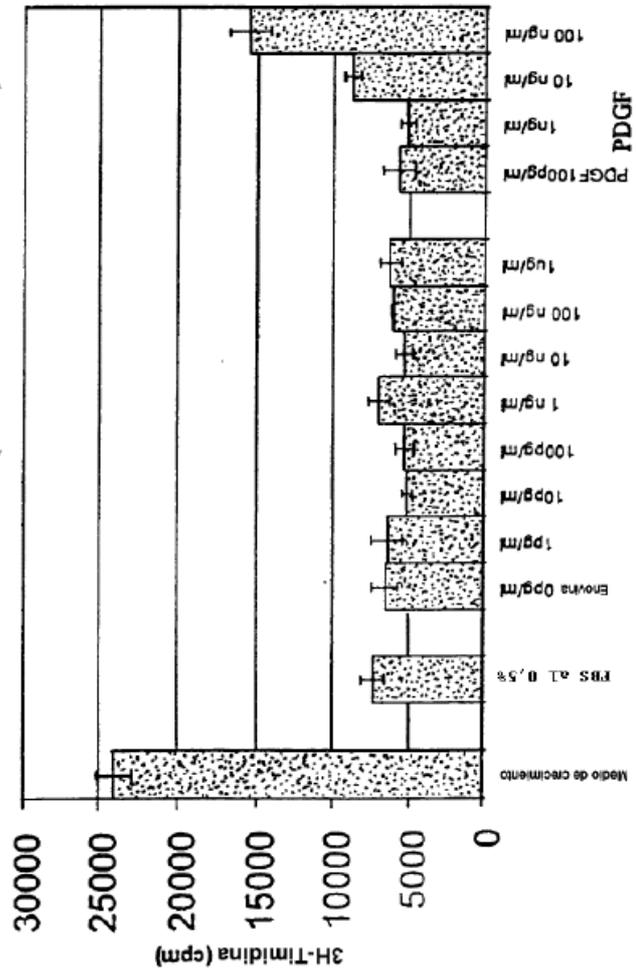


FIG. 16.

Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de células de músculo liso (HSMC) humanas (un día de tratamiento)

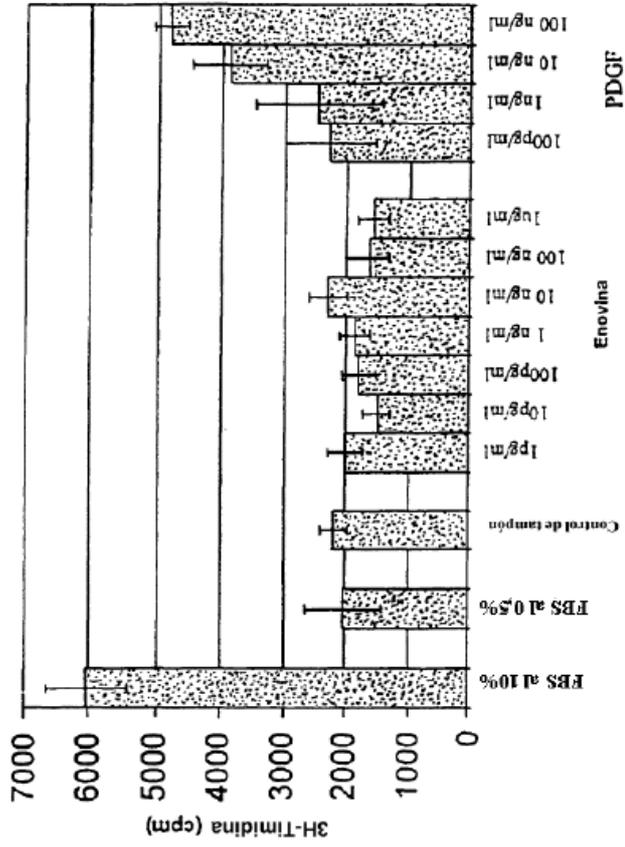


FIG. 17

Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de las células del músculo liso humanas (HSMC) (tratamiento de tres días)

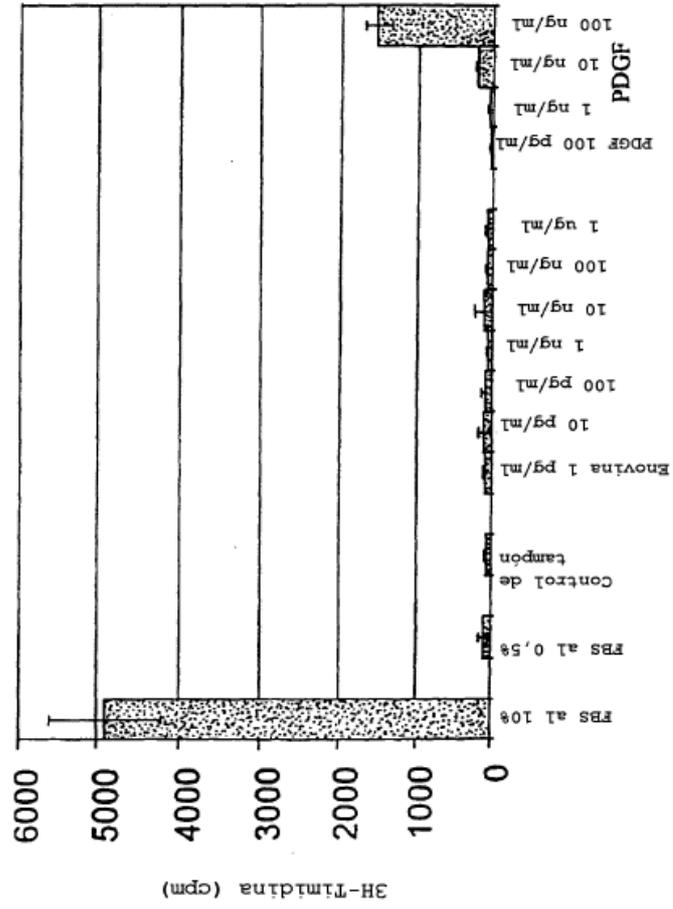


FIG. 18.

Los efectos de enovina sobre la tasa de proliferación de las células del músculo liso humanas (HSMC) (24 horas en ayunas seguido por un día de tratamiento)

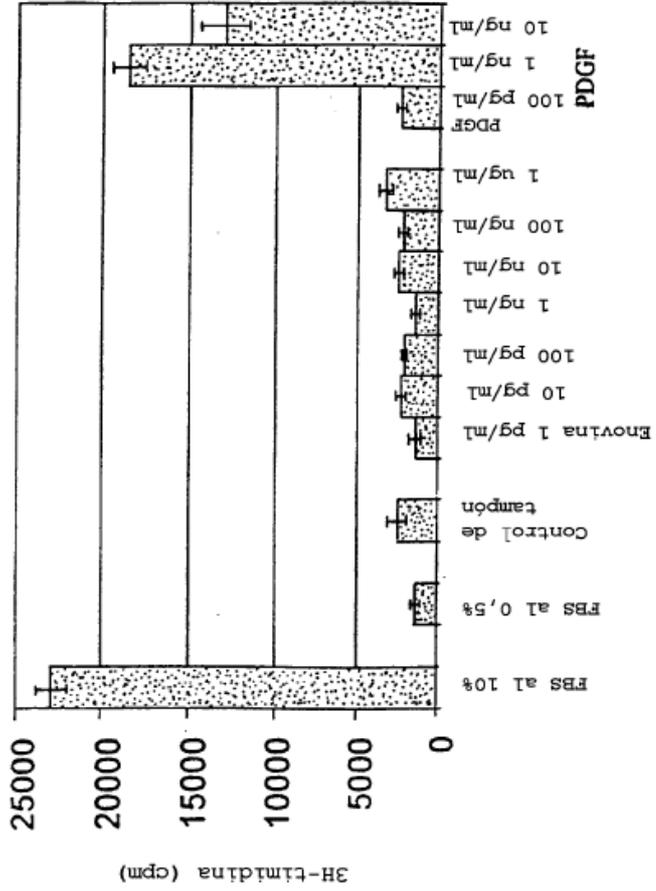


FIG. 19.

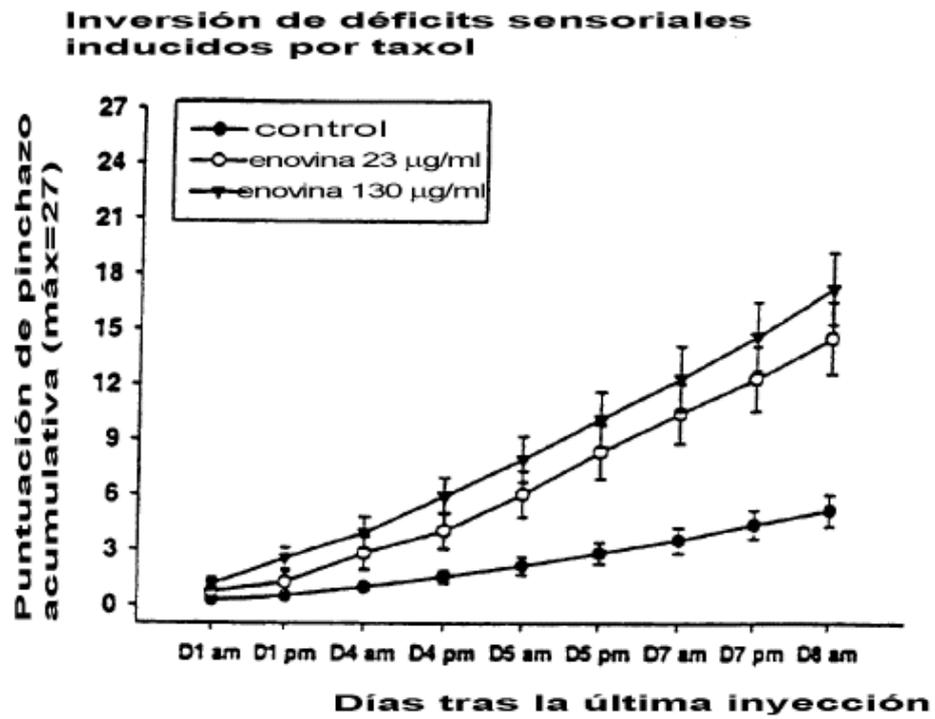


FIG. 20.

**Prevención de déficits sensoriales inducidos por taxol**

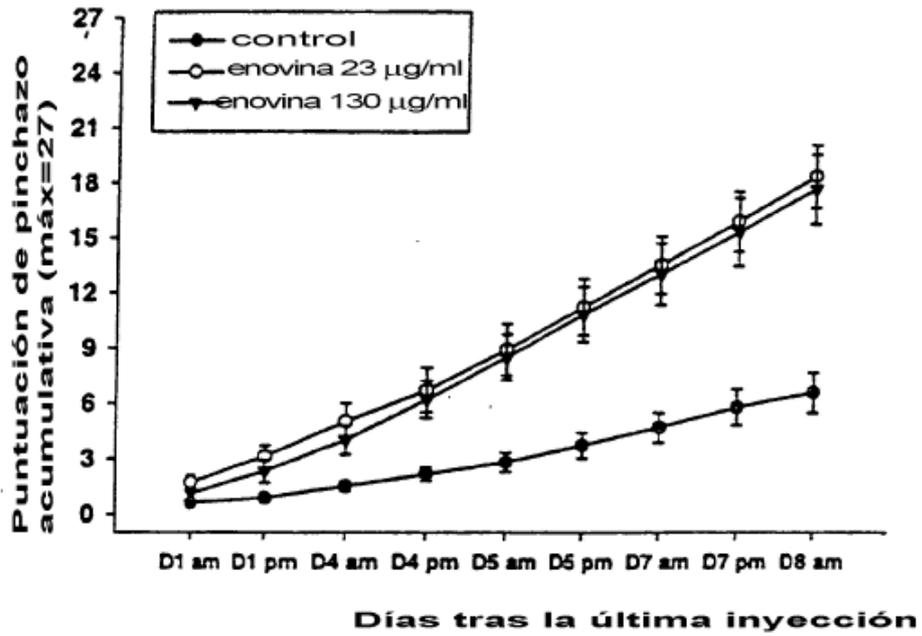


FIG. 21.

1 CTGATGGGCGCTCCTGGTGTGATAGAGATGGAACTTGGACTTGGAGGCTCTCCACGCT 11  
     M E L G L G G L S T L  
     S H C P W P R R Q 5'-3'  
 61 GTCCCACTGCCCTGGCCTAGGCGGCAGGTGAGTGGTTCTCCAGTGACTCCTACCTGGT 20  
 121 ACTGAGGAAAGGCGGCTTGACTGGTGAGGGAGAGCAGGGCTTGGCTTGGGCAGCGGTTAG  
 181 GTGTGGGAGGGAATGGTCAGGGAGGGACCAGGTGAATGGAGGAGGAGCGGGACTTCT  
 241 CTGAATGGTCGGTGCACCTCAGGTGATTCTCCCTGGGCTCCCAGAGGCAGCAAACCCAT  
 301 TATACTGGAACCTAGGCCCTTCTGAGTTCCCTCCACACAGCTAGGAGCCCATGCCCCG  
 361 GCCTGATCTCAGCCCGACGACAGCCCTCCTTGAGGTCTCTCCCAAGCCACCTGG 33  
     A P L G L S A Q 5'-3'  
     P A L W P  
 421 GTGCCCTCTTCTCCCTGAGGCTCCACTTGGTCTCTCCGCGCAGCTGCGCTGTGGCCCA 33  
     T L A A L A L L S S V A E A S L G S A P 53  
 481 CCTGGCCGCTCTGGCTCTGCTGAGCAGCGTCGCAGAGGCTCCCTGGGCTCCGCGCCCG  
     R S P A P R E G P P P V L A S P A G H L 73  
 541 GCAGCCCTGCCCCCGGAAGGCCCGCCGCTGTCTGGCGTCCCCCGCGGCCACCTGC 73  
     P 5'-3'  
 601 CGGTTAGGTGAGAGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGCTGGCCCGGACACCGCGCTGACTG 74  
     G G R T A R W C S G R A R R P P 90  
 661 GGTCTCATTCCAGGGGACGCACGGCCCGCTGGTGCAGTGAAGAGCCCGCGCGCCCGC  
     P Q P S R P A P P P P A P P S A L P R G 110  
 721 CCGCAGCCTTCTCGGCCCGCGCCCCGCGCCTGCACCCCATCTGCTCTTCCCGCGGG  
     G R A A R A G G P G S R A R A A G A R G 130  
     enovina madura  
 781 GGCCGCGCGCGCGCTGGGGGCCCGGCAGCCGCTCGGCAGCGGGGCGCGGGGC  
     C R L R S Q L V P V R A L G L G H R S D 150  
 841 TGCCGCTGCGCTCGCAGCTGGTCCCGGTGCGCGCGCTCGGCCTGGGCCACCGCTCCGAC  
     E L V R F R F C S 5'-4'  
     G S C R R A R S P H D 170  
 901 GAGCTGGTGCCTTCCGCTTCTGCAGCGGCTCTGCGCCGCGCGCTCTCCACAGAC  
     L S L A S L L G A G A L R P P P G S R P 190  
 961 CTCAGCCTGGCCAGCCTACTGGGCGCCGGGGCCCTGCGACCGCCCCGGGCTCCCGGCC  
     V S Q P C C R P T R Y E A V S F M D V N 210  
 1021 GTCAGCCAGCCCTGCTGCCGACCCACGCTACGAAGCGGTCTCCTTCATGGACGTCAAC  
     S T W R T V D R L S A T A C G C L G \* 228  
 1081 AGCACCTGGAGAACCCTGGACCGCCTCTCCGCCACCGCCTGCGGCTGCCTGGGCTGAGG  
 1141 CTCGCTCCAGGGCTTTCAGACTGGACCCTTACCGGTGGCTCTTCTCTG



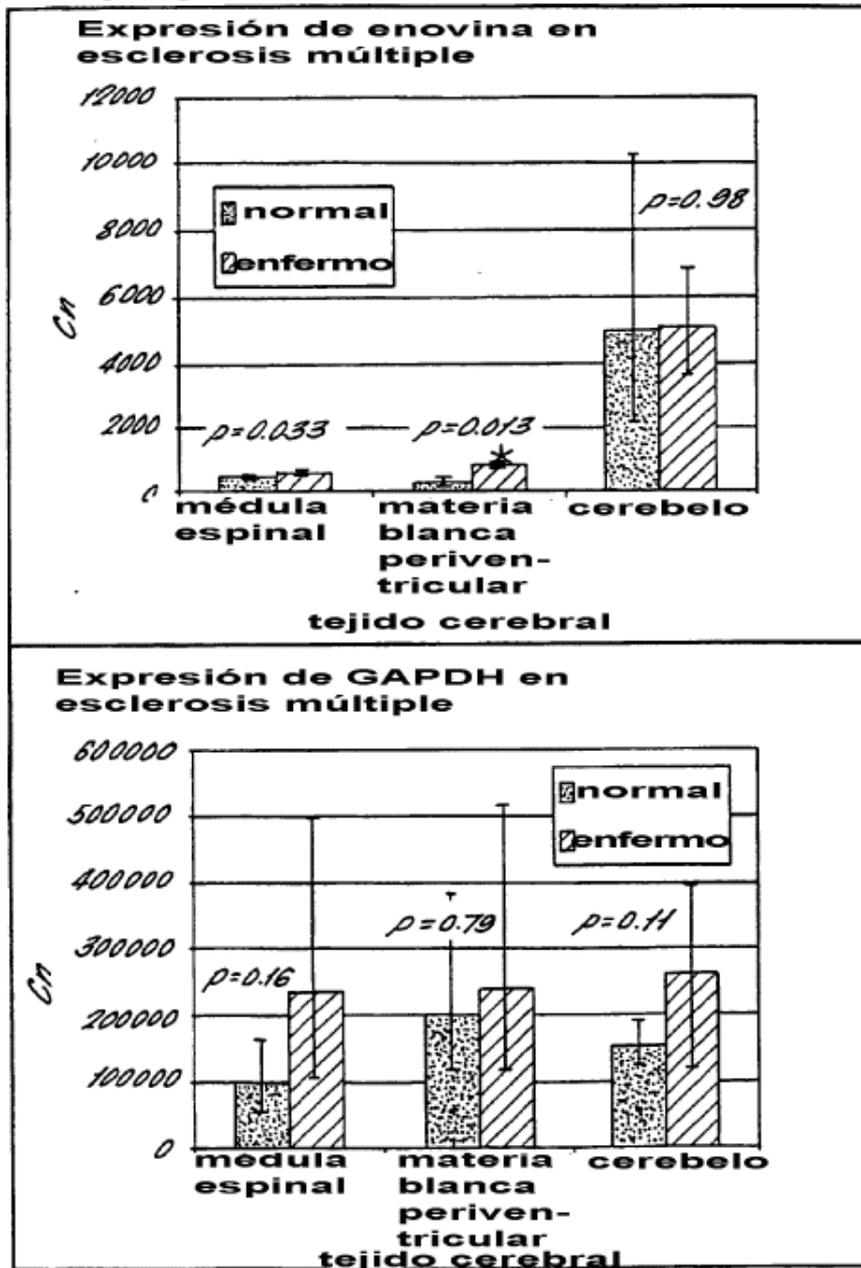
*FIG. 23.*

1 MELGLGGLST LSHCPWPRRQ APLGLSAQPA LWPTLAALAL LSSVAEASLG  
51 SAPRSPAPRE GPPPVLASPA GHLPGGRTAR WCSGRARRPP PQPSRPAPP  
101 PAPPSALPRG GRAARAGGPG SRARAAGARG CRLRSQLVPV RALGLGHRSD  
151 ELVRFRCFG SCRRARSPHD LSLASLLGAG ALRPPPGSRP VSQPCCRPTR  
201 YEAVSFMDVN STWRTVDRLS ATACGCLG

*FIG. 24.*

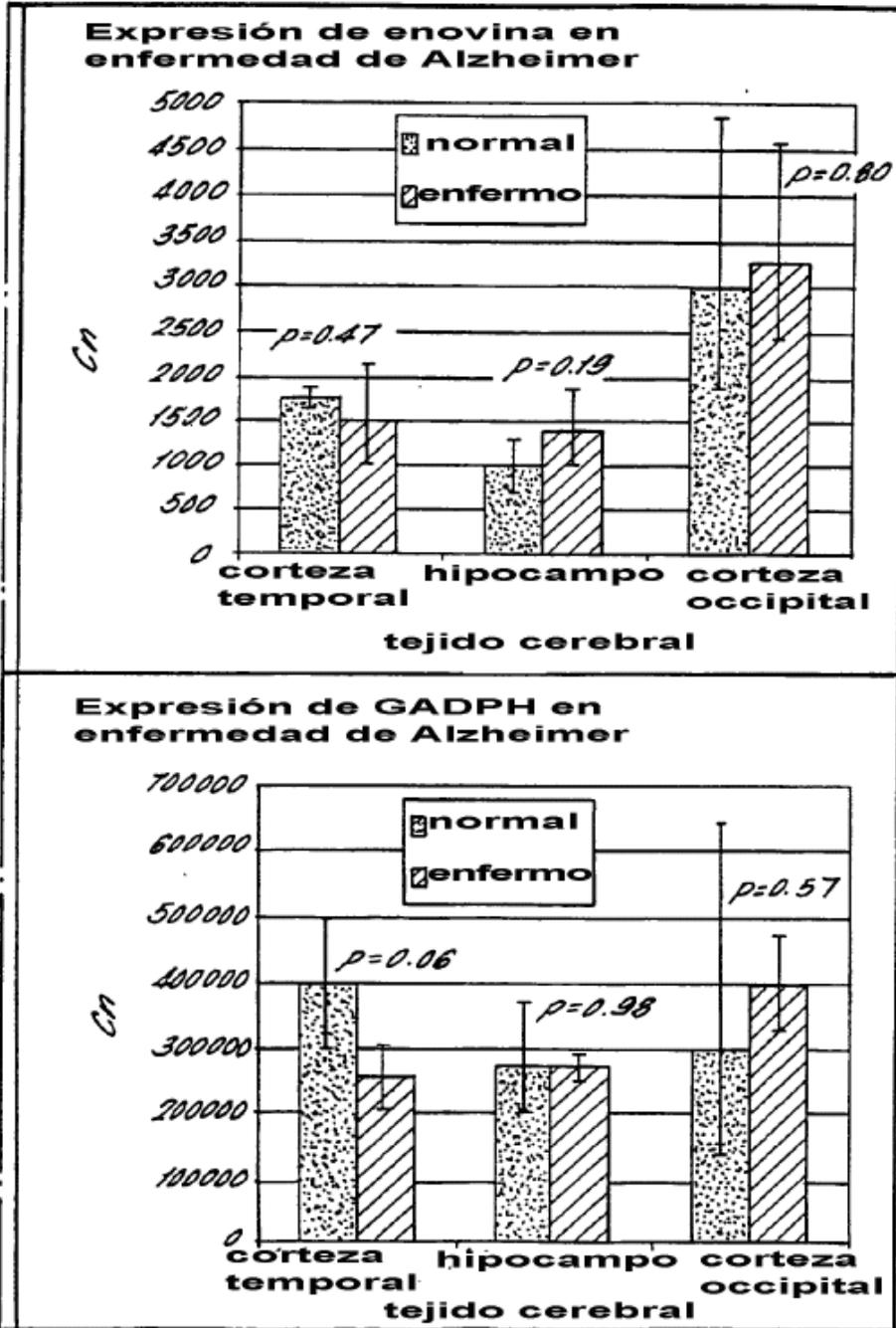
1 MELGLGGLST LSHCPWPRRQ PALWPTLAAL ALLSSVAEAS LGSAPRSPAP  
51 REGPPPVLAS PAGHLPGGRT ARWCGRARR PPPQPSRPAP PPPAPPSALP  
101 RGGRAARAGG PGSRARAAGA RGCRLRSQLV PVRALGLGHR SDELVRFRC  
151 SGSCRRARSP HDLSLASLLG AGALRPPPGS RPVSQPCCRP TRYEAVSFMD  
201 VNSTWRTVDR LSATACGCLG

**Expresión de enovina y GAPDH en esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer**



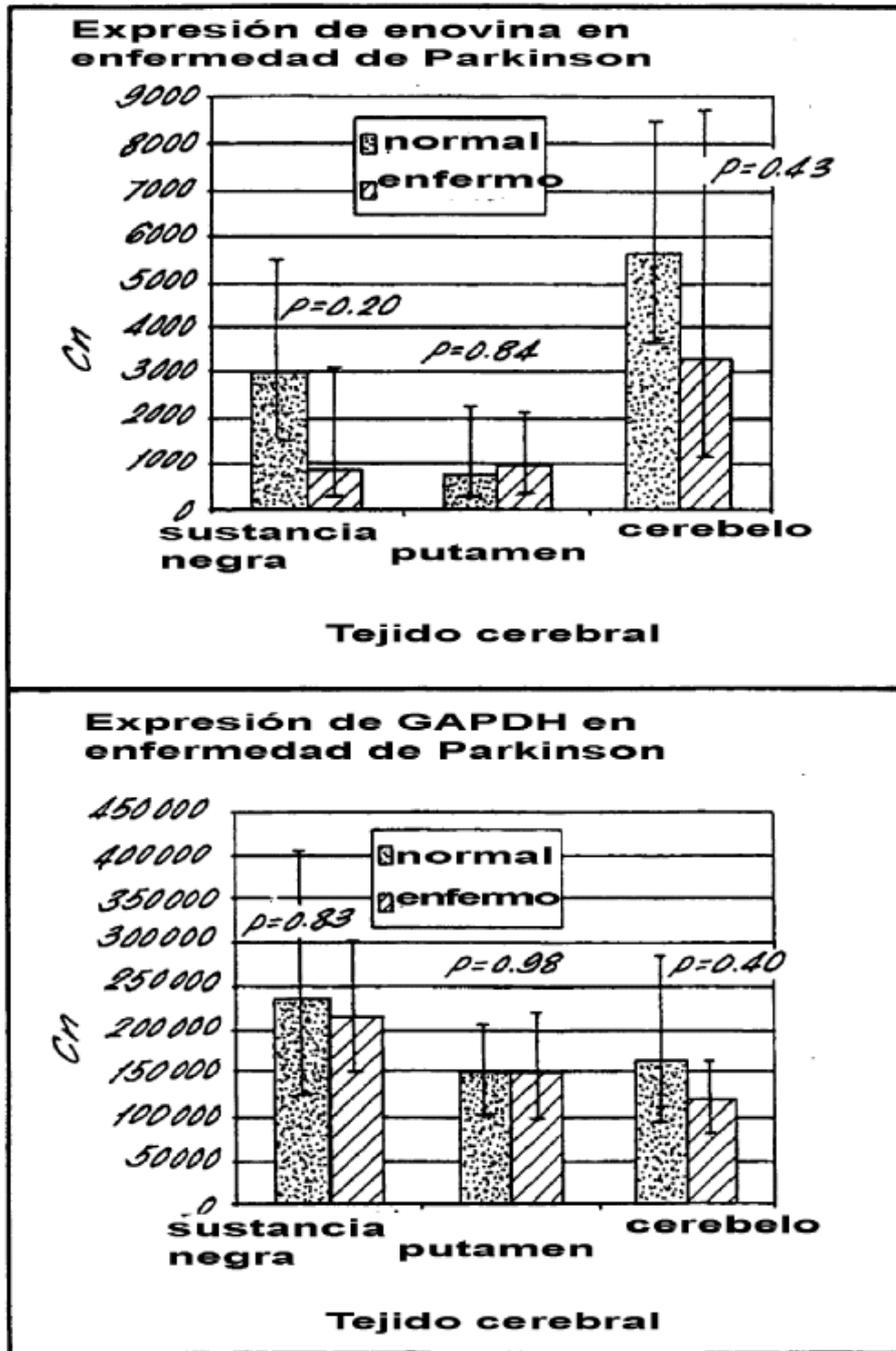
**Fig 25. La media y DE se calcularon usando valores Ct y convirtiéndolos en Cn. Se realizaron comparaciones por parejas mediante análisis ANOVA**

Fig 25 (continuación)



\* = diferencia estadísticamente significativa

**Fig 26. Expresión de enovina y GAPDH en enfermedad de Parkinson y cáncer**



La media y DE se calcularon usando valores Ct y luego se convirtió en Cn. Se realizaron comparaciones por parejas mediante análisis ANOVA

Fig 26 (continuación)

