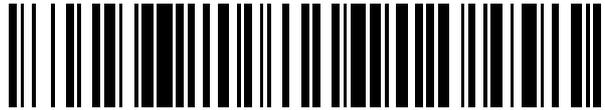


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 311**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12167334 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2522744**

54 Título: **Una microdelección en BCAN canino asociada con Síndrome de Caída Episódica**

30 Prioridad:

11.05.2011 EP 11165620

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

09.04.2015

73 Titular/es:

**LABOKLIN GMBH & CO. KG (50.0%)
Steubenstrasse 4
97688 Bad Kissingen, DE y
UCL BUSINESS PLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HARVEY, ROBERT JUSTIN;
GILL, JENNIFER LOUISE y
CLARK, LEIGH ANNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 311 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

Una microdelección en BCAN canino asociada con Síndrome de Caída Episódica

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar síndrome de caída episódica (EFS) o predisposiciones al mismo en mamíferos.

El síndrome de caída episódica (EFS) es un trastorno paroxístico bien reconocido encontrado en los Cavalier King Charles spaniels (CKCS). Los episodios comienzan entre las catorce semanas y los cuatro años de edad y se activan por ejercicios, estrés, aprensión o excitación (Herrtage y Palmer, 1983). Los episodios son de frecuencia y gravedad variables pero se caracterizan por hipertonicidad progresiva que involucra a los miembros torácicos y pélvicos (Figura 1a) hasta que los perros se inmovilizan definitivamente en una posición característica de "rececho de venado" o de "rezo" (Figura 1b). La rigidez de todos los cuatro miembros durante el ejercicio causa caída (Figura 1c), aunque no hay ninguna pérdida de consciencia o cianosis. Otros signos clínicos pueden incluir rigidez muscular facial, tropezar, una marcha de "conejo saltando", arqueado de la espalda o vocalización. Curiosamente, entre episodios, los perros parecen ser completamente normales neurológicamente. No se observó actividad espontánea en realización de pruebas de electrodiagnóstico muscular, descartando miotonía congénita (Wright et al. 1986, 1987). Las biopsias musculares son típicamente normales a nivel de microscopía óptica, excluyendo muchas miopatías congénitas. Sin embargo, EFS se ha ligado a defectos ultraestructurales en el músculo esquelético incluyendo dilatación y proliferación del retículo sarcoplásmico, hinchazón y degeneración mitocondriales (Wright et al. 1986, 1987). EFS se ha comparado también (Rusbridge, 2005) con enfermedad del sobresalto/hiperekplexia, caracterizada típicamente por hipertonicidad neonatal provocada por sonido o por toque debida a defectos en el receptor de glicina inhibitorio (*GLRA1*, *GLRB*; Shiang et al. 1993; Rees et al. 2002) o en genes del transportador de glicina GlyT2 (*SLC6A5*) (Rees et al. 2006; Harvey et al. 2008). Sin embargo, una microdelección en el gen GlyT2 en lóberos irlandeses da como resultado rigidez muscular neonatal grave y temblor en respuesta a manipulación (Gill et al. 2011), lo que no es consistente con los signos clínicos observados de EFS. Se han podido realizar comparaciones con la enfermedad del sobresalto debido a que los perros afectados a menudo respondían bien a la benzodiacepina clonazepam (Garosi et al. 2002), un anticonvulsivante, ansiolítico y relajante muscular efectivo que es el tratamiento más efectivo conocido para la hiperekplexia humana (Thomas et al. 2011). Sin embargo, el inhibidor de anhidrasa carbónica acetolamida, usado para tratar ciertos tipos de ataxia episódica humana (Tomlinson et al. 2009) y la parálisis periódica hipercalemica (Matthews y Hanna 2010), también parece tener valor terapéutico en el tratamiento de EFS (http://www.cavalierhealth.org/episodic_falling).

Dado que una investigación dirigida por criadores de diez años de la herencia de EFS sugirió un modelo autosómico recesivo de herencia (<http://cavalierepisodicfalling.com/>), los inventores presentes usaron una estrategia de asociación del genoma completo (Karlsson et al. 2007) para mapear el locus de EFS en una región definida del cromosoma 7 canino. El análisis de los genes candidatos permitió a los inventores presentes identificar una microdelección que afecta al gen brevican (*BCAN*), confirmar el punto de ruptura de la deleción y desarrollar pruebas de genotipado rápidas para EFS.

Es, por lo tanto, un objeto de la presente invención proporcionar un análisis de un genotipo de un mamífero con respecto a síndrome de caída episódica por medio de una prueba genética. Por medio de una prueba genética tal se puede analizar la predisposición genética de un mamífero.

Este objetivo se logra por las invenciones según las reivindicaciones independientes. Se describen realizaciones ventajosas en las reivindicaciones dependientes.

Incluso si no se recogen referencias de apoyo múltiples, se desvelarán en las reivindicaciones todas las combinaciones razonables de las características.

Este objetivo se logra por una prueba genética para la identificación de la presencia o ausencia de una deleción en el gen brevican (*BCAN*).

El término "deleción", cuando se hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos, tiene el significado usual en genética de un alelo en el que una o más bases están perdidas en comparación con una secuencia de referencia o de tipo silvestre. Las deleciones pueden ser tan cortas como un par de bases. Las deleciones detectadas en la presente invención pueden ser más largas. Una deleción en un gen puede no comprender una secuencia del gen en sí mismo como es el caso de una deleción dentro de un gen. Una deleción en un gen puede también extenderse a secuencias próximas al gen. Por ejemplo la deleción puede comprender el comienzo del gen y prolongarse adicionalmente corriente arriba. Como un resultado se pierde el comienzo completo del gen junto con las secuencias corriente arriba. El gen está truncado. Una deleción tal se refiere también a una deleción de un gen específico, dado que el gen está afectado por la deleción. Adicionalmente la región corriente arriba de un gen comprende usualmente elementos reguladores importantes del gen.

En otra realización de la invención la deleción es una microdeleción. Una microdeleción es la pérdida de un pedazo diminuto de un cromosoma, un pedazo tan pequeño que su ausencia no es patente en examen ordinario (usando un

microscopio óptico regular para mirar a los cromosomas preparados de modo usual). La detección de microdeleciones requiere usualmente técnicas especiales tales como bandeo de cromosomas de alta resolución, análisis molecular de cromosoma (con FISH), o análisis de ADN. Por lo tanto una microdelección tal es de un tamaño de solo varias kilobases, por ejemplo 15,7 kb (kilobases).

- 5 En un análisis tal la presencia de la delección indica la predisposición genética para síndrome de caída episódica (EFS).
La presencia o ausencia de la delección puede detectarse de varias formas. Por ejemplo la secuencia sin la delección o la secuencia que comprende la delección puede detectarse. Especialmente si la delección se hereda en un modo autosómico recesivo un análisis cuantitativo puede revelar no solo mamíferos afectados y no afectados, sino también portadores de la delección solo de un cromosoma por una detección reducida de la secuencia analizada.
- 10 El procedimiento más común para la detección de la presencia o ausencia de la delección es PCR. La presencia o ausencia de un producto amplificado puede estar relacionada con la presencia o ausencia de la delección.
Para un análisis cuantitativo, se pueden usar los procedimientos modernos como PCR cuantitativa o amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA).
- 15 La invención se refiere al síndrome de caída episódica. Hay enfermedades con presentaciones clínicas similares al síndrome de caída episódica. En el caso de trastornos humanos esto es por ejemplo las discinesias inducidas por el ejercicio. Típicamente estos son trastornos nerviosos de los mamíferos.
En otra realización de la invención la delección comprende al menos uno de los siguientes elementos de *BCAN*: secuencias reguladoras, exón 1, exón 2 y/o exón 3. El exón 1 según se usa en esta memoria descriptiva se refiere a la región UTR 5'.
- 20 Las secuencias reguladoras son promotores y sitios de unión u otras secuencias reguladoras del gen *BCAN*, que se localiza corriente arriba del exón 1.
En otra realización de la invención la delección comprende al menos exón 1, exón 2 y exón 3.
En otra realización de la invención la delección comprende al menos exón 1, exón 2 y exón 3, pero no exón 4 del gen *BCAN*. La delección por lo tanto comprende solamente una parte del gen que incluye los tres primeros exones.
- 25 En otra realización de la invención la delección comprende al menos una de las secuencias de acuerdo con SEC ID N.º: 14, SEC ID N.º: 15 y/o SEC ID N.º: 16, preferentemente SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9 y/o SEC ID N.º: 12.
En otra realización la delección comprende una secuencia de acuerdo con SEC ID N.º: 13. Esta secuencia comprende el comienzo del gen *BCAN* que incluye los tres primeros exones así como secuencias corriente arriba del gen *BCAN*.
- 30 En otra realización la delección consiste en una secuencia de acuerdo con SEC ID N.º: 13.
En otra realización de la invención la delección es del tamaño de 15,7 kb, preferentemente 15722 bases.
En otra realización de la invención la delección comienza 1,56 kb corriente abajo de *HAPLN2* y finaliza 85 pb corriente abajo del exón 3 de *BCAN*.
- 35 En combinación con la delección la secuencia delecionada puede intercambiarse por otra secuencia. Una nueva secuencia puede insertarse en lugar de la secuencia delecionada. Una secuencia tal puede ser de varios pares de bases de longitud. En una realización preferida de la invención la secuencia muestra una microhomología de 1 a 7 pb en una región de 30 pb que comprende los puntos de ruptura. Una microhomología es la misma secuencia corta de bases en diferentes genes o en diferentes posiciones dentro de un gen. En otra realización de la invención esta es una secuencia de 6 pb preferentemente con la secuencia GGCTT.
- 40 En otra realización de la invención la delección conduce a una secuencia de acuerdo con SEC ID N.º: 1 o SEC ID N.º: 2. En este caso una secuencia corta se inserta conjuntamente con la delección. Los detalles se muestran en la figura 4d.
En otra realización de la invención la presencia o ausencia de la delección se detecta por la detección de la presencia o ausencia bien de la secuencia sin o bien de la secuencia con la delección, por ejemplo la SEC ID N.º: 1 o la SEC ID N.º: 2.
- 45 En otra realización de la invención esta detección se logra por la detección de la presencia o ausencia de cualesquiera de SEC ID N.º: 14, SEC ID N.º: 15 y/o SEC ID N.º: 16, preferentemente SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9 y/o SEC ID N.º: 12, más preferentemente SEC ID N.º: 13. La detección se puede lograr también por la detección de una parte específica de estas secuencias (secuencia específica). Como un control positivo la presencia o ausencia de exón 4, preferentemente la secuencia SEC ID N.º: 17, o cualquier otro gen también presente en la sonda se puede usar
50 como control interno también para procedimientos cuantitativos.

En otra realización de la invención el mamífero es un perro, preferentemente *Canis lupus familiaris*. En una realización preferida de la invención el mamífero es un Cavalier King Charles spaniel. En este caso el gen *brevican* y la deleción están localizados en el cromosoma 7.

5 La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para determinación de la predisposición genética para síndrome de caída episódica (EFS) o trastornos nerviosos similares en un mamífero en el que una deleción en el gen *brevican* (*BCAN*) se detecta en una muestra.

En lo que sigue, se describirán en más detalle etapas individuales de un procedimiento. Las etapas no necesariamente se han llevado a cabo en el orden dado en el texto. Además, etapas adicionales no indicadas explícitamente pueden ser parte del procedimiento.

10 La muestra puede ser cualquier muestra de un mamífero de la que se pueda recuperar información. Esta puede ser fluidos corporales como sangre, orina o plasma así como otras sondas como pelo, piel, células bucales.

15 La detección de la deleción puede lograrse por diversas formas. Tales técnicas que se basan preferentemente en PCR se conocen por la persona experta en la técnica. En principio la presencia o ausencia de una secuencia o una parte de la secuencia, que es específica para la presencia o ausencia de la deleción, se analiza. En el caso de mamíferos la deleción puede estar presente en un cromosoma pero no en el otro. En este caso el procedimiento puede revelar tres posibles resultados. La secuencia específica puede estar presente en ambos cromosomas, solo en un cromosoma o en ninguno de los dos cromosomas. Dependiendo del procedimiento usado para la detección esto puede dar como resultado la presencia o ausencia de diferentes productos de PCR, como en PCR múltiple, o en una cantidad diferente de un producto de PCR, como en PCR cuantitativa o en amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple.

20 Dependiendo de la secuencia específica elegida la presencia o ausencia de la secuencia puede estar conectada con la predisposición genética del mamífero que está afectado por el trastorno, que es un portador o que no está afectado por el trastorno.

25 Una parte de una secuencia se considera como parte específica de una secuencia si su detección permite un juicio si la secuencia probada está presente o ausente en la sonda. Por lo tanto no es necesario que esta secuencia específica sea completamente única para todos los organismos. Solo es necesario que la parte específica de la secuencia sea única para el mamífero sometido a examen y/o sometido a las condiciones del procedimiento de detección. Procedimientos para derivar tales partes específicas de una secuencia dependiendo del procedimiento de la detección usado se conocen por la persona experta en la técnica.

30 Una parte específica tal de una secuencia puede ser cualquier secuencia de la que pueda deducirse la presencia de la secuencia parental. Estas son típicamente secuencias con la longitud de 20, 30, 40 o 50 pares de bases o más. La persona experta en la técnica conoce procedimientos para diseñar sondas para la detección de una secuencia tal. El diseño de las sondas también depende del procedimiento de detección. Típicamente estas sondas son capaces de hibridar de una manera específica con la secuencia específica elegida. Tales sondas son usualmente oligonucleótidos. Dependiendo del procedimiento de detección estas sondas pueden modificarse, por ejemplo con etiquetas como tintes
35 fluorescentes o etiquetas radiactivas. Las sondas pueden comprender en sí mismas nucleótidos modificados o un armazón modificado. Para PCR se han diseñado un par de cebadores, que son específicos en condiciones de PCR. Para otros procedimientos como qPCR o MLPA las sondas pueden consistir en uno o más oligonucleótidos, por ejemplo dos oligonucleótidos, que solo en combinación conducen a una prueba positiva. La detección de la presencia de la parte específica de la secuencia se relaciona también con la ausencia o presencia de la deleción. Ejemplos para
40 las sondas o los cebadores oligonucleotídicos pueden encontrarse en los ejemplos de la presente solicitud. Por lo tanto no es necesario detectar la secuencia completa. La parte específica de la secuencia es suficiente.

45 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido de cadena simple capaz de actuar como un punto de iniciación de síntesis de ADN dirigida por plantilla en condiciones apropiadas, en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. La longitud apropiada de un cebador depende del uso deseado del cebador pero típicamente varía desde 15 hasta 30 nucleótidos. Una secuencia de cebador no necesita ser exactamente complementaria a una plantilla pero debe ser suficientemente complementaria para hibridar con una plantilla. El término "par cebador" significa un conjunto de cebadores que incluyen un cebador 5' corriente arriba, que hibrida con el extremo 5' de la secuencia de ADN a amplificarse y un cebador 3' corriente abajo, que hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia a amplificarse.

50 En otra realización de la invención la presencia o ausencia de la deleción se detecta por la detección de una secuencia que comprende SEC ID N.º: 13 o una parte específica de SEC ID N.º: 13. La detección de la secuencia también se puede llevar a cabo por un producto de PCR que comprende esta secuencia o una parte de esta secuencia, por ejemplo si solo uno de los cebadores hibrida con la secuencia a detectarse. La presencia de la secuencia se relaciona con la ausencia de deleción.

55 En otra realización de la invención la presencia o ausencia de la deleción se detecta por la detección de al menos una secuencia que comprende la secuencia o una parte específica de la secuencia seleccionada del grupo que comprende secuencias reguladoras, exón 1, exón 2 y/o exón 3 del gen *BCAN*. En una realización preferida la presencia o ausencia de la deleción se detecta por la detección de al menos una secuencia que comprende la secuencia o una parte

específica de la secuencia seleccionada del grupo que comprende exón 1, exón 2 y/o exón 3 del gen *BCAN*.

En otra realización de la invención la presencia o ausencia de la delección se detecta por la detección de al menos una secuencia que comprende la secuencia o una parte específica de la secuencia seleccionada del grupo que comprende secuencias reguladoras de acuerdo con SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9 y/o SEC ID N.º: 12.

5 En otra realización de la invención la presencia o ausencia de la delección se detecta por la detección de al menos una secuencia que comprende la secuencia o una parte específica de la secuencia seleccionada del grupo que comprende secuencias reguladoras de acuerdo con SEC ID N.º: 11, exón 1 de acuerdo con la SEC ID N.º: 14, exón 2 de acuerdo con la SEC ID N.º: 15 y/o exón 3 de acuerdo con la SEC ID N.º: 16. La presencia de al menos una de estas secuencias detectadas de este modo indica la ausencia de delección.

10 La detección de la secuencia también se puede llevar a cabo por un producto de PCR que comprende la secuencia o una parte de la secuencia, por ejemplo si solo uno de los cebadores hibrida dentro de la secuencia. La presencia de todas las secuencias detectadas indica la ausencia de la delección. Usualmente el examen de una secuencia específica es suficiente.

15 En otra realización de la invención la detección de la delección se logra por la detección de la presencia o ausencia de al menos una de las secuencias reguladoras de *BCAN*, exón 1, exón 2 y/o exón 3 del gen *BCAN* o una secuencia específica del mismo. La presencia de las secuencias indica por este medio la ausencia de la delección.

En otra realización de la invención la detección de la delección se logra por la detección de la presencia o ausencia de al menos uno de exón 1, exón 2 y/o exón 3 del gen *BCAN* o de una secuencia específica del mismo. La presencia de las secuencias indica por este medio la ausencia de la delección.

20 En otra realización de la invención la detección de la delección se logra por la detección de una secuencia específica por la ausencia de la delección así como por la detección de una secuencia específica para la presencia de la delección. Esto puede lograrse por PCR múltiple usando conjuntos de cebadores que dan como resultado productos de PCR de longitud específica para cada caso (ausencia o presencia de la delección). Usualmente los productos de PCR comparten un cebador, que hibrida con una parte del gen no afectado por la delección. Los otros cebadores hibridan con la delección con el fin de detectar la presencia de la delección. El otro cebador puede hibridar con la secuencia creada por la delección o una parte del gen después de la delección (con respecto del otro cebador). En un ensayo afectado, el portador y los genotipos no afectados pueden detectarse debido al patrón de los productos de PCR. Un ejemplo para un ensayo tal se muestra en la figura 3b.

25

30 En otra realización de la invención la detección de la delección se logra por la cuantificación de la presencia de al menos una secuencia que comprende la secuencia o una parte específica de la secuencia seleccionada a partir del grupo que comprende las secuencias reguladoras de *BCAN*, exón 1, exón 2 y/o exón 3, preferentemente exón 1, exón 2 y/o exón 3. Típicamente la cuantificación se logra por la comparación con la cuantificación de la presencia de una secuencia diferente dentro del mismo ejemplo, por ejemplo exón 4 u otro gen, que no está influenciado por la delección.

35 Tal cuantificación se lleva a cabo usualmente con procedimientos basados en PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. En estos procedimientos se mide la cantidad de producto de una reacción de PCR. A partir de esto se puede calcular la cantidad del objetivo de la PCR (la secuencia a detectarse). Dependiendo del procedimiento este objetivo no es necesario que sea el gen en sí mismo. En MLPA, el producto ligado de dos sondas hibridadas se amplifica. La cantidad del objetivo se relaciona después con la cantidad de este producto ligado.

40 En otra realización de la invención la detección de la delección se logra por la cuantificación de la presencia de al menos una secuencia que comprende la secuencia o una parte específica de la secuencia seleccionada a partir del grupo que comprende SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9 y/o SEC ID N.º: 12, preferentemente SEC ID N.º: 14, SEC ID N.º: 15 y/o SEC ID N.º: 16. Típicamente la cuantificación se logra por la comparación con la cuantificación de la presencia de un producto de amplificación de una secuencia diferente dentro del mismo ejemplo, por ejemplo exón 4 u otro gen, que no está influenciado por la delección.

45 En otra realización de la invención la detección de la delección se logra por la detección de una secuencia o una parte específica de una secuencia de acuerdo con la SEC ID N.º: 1 o con la SEC ID N.º: 2. La ausencia de la secuencia indica la ausencia de la delección.

En otra realización de la invención el mamífero es un perro, preferentemente un Cavalier King Charles spaniel. En este caso la detección se lleva a cabo en el cromosoma 7, donde reside el gen *BCAN*.

50 La invención también se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de acuerdo con la SEC ID N.º: 1 o 2.

La invención también se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos aislada, que codifica el gen *BCAN* y que comprende una delección que comprende al menos una de las secuencias reguladoras, exón 1, exón 2 y exón 3.

La invención también se refiere a un gen brevican (*BCAN*), que comprende una secuencia de acuerdo con la SEC ID

N.º: 1 o 2. Como se muestra en la figura 3c y 3d la delección comprende el comienzo del gen. Las primeras 14 bases de la SEC ID N.º: 1 o las últimas 14 bases de la SEC ID N.º: 2 se localizaron corriente arriba del gen *BCAN* antes de la delección. Por la delección esta secuencia se considera como parte del gen truncado *BCAN*.

5 En otra realización de la invención el gen *BCAN* es el gen brevican de un perro, preferible un Cavalier King Charles spaniel. En el caso de un perro, se localiza en el cromosoma 7. La delección se localiza dentro del intervalo 44310000 y 44290000 sobre este cromosoma, preferentemente la delección comienza 1,56 kb corriente abajo de *HAPLN2* y finaliza 85 pb corriente abajo del exón 3 de *BCAN*.

10 Un "ácido nucleico", "polinucleótido" u "oligonucleótido" es una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, puede ser ADN o ARN y puede ser de cadena individual o de cadena doble. Los ácidos nucleicos pueden incluir promotores u otras secuencias reguladoras. Los oligonucleótidos se preparan usualmente por procedimientos de síntesis. Una referencia a la secuencia de una cadena de un ácido nucleico bicatenario define la secuencia complementaria y salvo donde otra cosa es evidente a partir del contexto, una referencia a una hebra de un ácido nucleico también se refiere a su complemento.

15 Un ácido nucleico "aislado" quiere decir una especie de ácido nucleico que es la especie predominante presente en una composición. Aislado significa que el ácido nucleico está separado de al menos un compuesto con el que está asociado en la naturaleza. Un ácido nucleico purificado comprende (en una base molar) al menos aproximadamente 50, 80 o 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes.

20 La invención adicionalmente se refiere al uso del análisis descrito o del procedimiento para la selección para cría, preferentemente la cría de perros y más preferentemente Cavalier King Charles spaniels. Esta prueba genética permite especialmente la identificación de portadores, que no son distinguibles de los perros normales por otros procedimientos.

Breve resumen de la invención

25 El síndrome de caídas episódicas (EFS) es un trastorno de hipertonicidad paroxística encontrada en Cavalier King Charles spaniels. Los episodios se disparan por el ejercicio, el estrés o la excitación y se caracterizan por hipertonicidad progresiva por todos los miembros torácicos y pélvicos, dando como resultado una posición característica de "rechecho de venado" y/o un colapso. Los inventores presentes usaron una estrategia de asociación del genoma completo para mapear el locus del EFS hasta un intervalo crítico de 3,48 Mb en el cromosoma 7 canino. Priorizando genes candidatos en base a la plausibilidad biológica, los inventores presentes encontraron que una delección de 15,7 kb en *BCAN*, que codifica el proteoglicano brevican de la matriz extracelular específico de cerebro, está asociada con EFS. Esto representa una mutación casual convincente para EFS, dado que brevican tiene un papel esencial en la formación de redes perineuronales que gobiernan la estabilidad de las sinapsis y la velocidad de la conducción nerviosa. El mapeo del punto de ruptura de la delección permitió el desarrollo de pruebas de genotipado de PCR múltiple y de amplificación por sondas dependiente de ligación múltiple (MLPA) que pueden distinguir de forma precisa animales normales, portadores y afectados. La realización de pruebas más amplia de una población mayor de perros CKCS sin un historial de EFS de los EE.UU. reveló que los portadores son extremadamente comunes (al 12,9 %). El desarrollo de pruebas genéticas moleculares para la delección de EFS que permiten la implementación de programas de cría dirigidos ayudó a minimizar el número de animales con EFS y permitió el diagnóstico confirmatorio y la farmacoterapia de perros afectados.

Discusión

40 La arquitectura genómica de líneas de perros de pura raza es ideal para la identificación de loci responsables de rasgos recesivos autosómicos usando mapeo de asociación del genoma completo (Karlsson et al. 2007, Drögemüller et al. 2009). En este estudio, los inventores presentes demuestran que esta técnica puede usarse exitosamente en conjuntos de muestras mínimos, dado que los inventores presentes localizaron el locus de EFS usando muestras de ADN de solo cinco perros afectados y siete perros control emparejados para cría. Dado que un haplotipo homocigoto que se extiende 6,35 Mb se identificó en animales afectados, es cuestionable si tipificación de SNP adicionalmente habría generado datos útiles adicionales. De hecho, un evento de recombinación individual en un portador obligado permitió a los inventores presentes estrechar el intervalo crítico a 3,48 Mb. Esta región contenía > 100 genes, incluyendo canales iónicos de apertura regulada por ligandos, canales de K⁺, transportadores, proteínas mitocondriales conocidos por estar implicados en trastornos neurológicos en seres humanos. Por ejemplo, mutaciones en *CHRNA2* están asociadas con epilepsia del lóbulo frontal nocturna (De Fusco et al. 2000) y mutaciones en *TPM3* están asociadas con miopatía nemalínica (Laing et al. 1995). Sin embargo, muchos de estos genes se eliminaron rápidamente como candidatos debido bien a: i) correlación pobre entre signos clínicos de EFS con los trastornos humanos equivalentes o bien a ii) resecuenciación sistemática de los genes. De acuerdo con los signos clínicos únicos observados en perros afectados, los inventores presentes descubrieron que una microdelección homocigótica que afecta *BCAN* está asociada con EFS en perros CKCS, confirmando que este trastorno está heredado de una manera autosómica recesiva. Esta mutación no se detectó en muestras de ADN control a partir de 53 razas de perro distintas, confirmando la naturaleza única de este reordenamiento genómico.

Brevican pertenece a la familia lectican de proteoglicanos de la matriz extracelular que forman agregados (ECM), que

comprende aggrecan, brevican, neurocan y versican. Aunque mutaciones en los genes aggrecan y versican (*ACAN*: 15q26.1 y *VCAN*: 5q14.2-14.3) se han vinculado a diferentes trastornos de tejidos conectivos (Gleghorn et al. 2005; Stattin et al. 2010; Miyamoto et al. 2005; Fig. 5), no se ha identificado hasta la fecha ninguna mutación en los genes brevican o neurocan genes (*BCAN*: 1q23.1 y *NCAN*: 19p13.11). Brevican y neurocan se expresan altamente en el sistema nervioso central, donde se encuentran en estructuras de la matriz extracelular especializadas llamadas redes perineuronales que juegan un papel en adhesión celular, migración, guía de los axones y plasticidad neuronal (Brakebusch et al. 2002). Brevican, versican, HAPLN2/BRAL1, tenascina-R y fosfacan están también presentes en los nódulos de Ranvier en axones mielinizados de diámetros grandes (Bekku et al. 2009, 2010) donde los cationes se acumulan y se deplecionan en la región nodal extracelular durante la propagación potencial de acción. Se piensa que el complejo ECM en nódulos de Ranvier juega un papel fundamental en mantener un microambiente local, actuando como una barrera de difusión para K^+ y Na^+ alrededor del espacio extracelular perinodal (Oohashi et al. 2002; Bekku et al. 2010). Así, la disrupción de complejos ECM que gobiernan la estabilidad sináptica y la velocidad de conducción nerviosa es probable que sean subyacentes al fenotipo EFS. Ciertamente, dado que EFS parece resultar de un defecto del sistema nervioso central más que de un defecto muscular, la patología del retículo sarcoplásmico adecuado es probable que sea una manifestación secundaria de sobreestimulación muscular (Engel, 2004).

De forma interesante, no se comunicó que ratones inactivados en *BCAN* (Brakebusch et al. 2002) tuvieran un fenotipo similar a EFS -aunque se notó una fuerza de agarre incrementada, que podría ser indicadora de tono muscular incrementado. Sin embargo, es cuestionable si las pruebas de fenotipado de ratones actuales revelarán trastornos neurológicos provocados por ejercicio extenuante, estrés, aprensión o excitación dado que estas afecciones se evitan generalmente en el cuidado de ratones. Es también notable que EFS muestre claramente una edad de aparición variable y penetrancia variable en perros CKCS. En realización de pruebas a poblaciones más amplias, los inventores presentes identificaron dos perros que eran homocigotos para la microdelección *BCAN* que nos mostraron signos clínicos de EFS en presencia de sus dueños. De forma interesante, se comunicaron hallazgos similares para la mutación dinamina (*DNM1*) (p.R256L) que subyace al colapso inducido por ejercicio en los Labrador retrievers (Patterson et al. 2008). Es plausible que estos perros no se hayan expuesto a ejercicio suficiente o a excitación suficiente para desencadenar un episodio de EFS, o que factores modificadores genéticos o ambientales afecten la aparición de EFS. Es notable que los dos perros asintomáticos en nuestro estudio se describieran como "perezoso" e "inseguro" por sus respectivos dueños, sugiriendo que en perros con EFS puede darse comportamiento adaptativo.

En resumen, los inventores presentes han mostrado que una microdelección inactivadora que afecta *BCAN* está asociada con EFS en perros CKCS. La identificación del punto de ruptura de la delección ha permitido el desarrollo de pruebas diagnósticas que han revelado una amplia prevalencia de portadores (12,9 %) en perros clínicamente no afectados de los EE.UU. Estas pruebas genéticas posibilitarán identificación futura de animales heterocigotos (que no tienen diferencia fenotípica discernible con animales de tipo silvestre) permitiendo que se implementen programas de cría dirigida y diagnosis confirmatoria y farmacoterapia apropiada de animales afectados. Aunque esto también representa la primera comunicación de un trastorno genético que implica un proteoglicano de ECM específico neuronal, los inventores presentes sugieren que *BCAN* y *NCAN* deben considerarse como genes candidatos para análisis genético en casos no resueltos de trastornos humanos con presentaciones clínicas similares a EFS, tales como discinesias paroxísticas inducidas por el ejercicio (Weber y Lerche 2009) o ataxias episódicas (Tomlinson et al. 2009).

Breve descripción de las figuras y tablas

Otros objetos y ventajas de la presente invención se pueden comprobar a partir de una lectura de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas en conjunción con los dibujos en ella.

Para una comprensión más completa de la presente invención, se estableció referencia a la siguiente descripción realizada en relación con los dibujos adjuntos en los que:

Figura 1. Signos clínicos de síndrome de caída episódica y patología muscular. Un Cavalier King Charles Spaniel hembra de 5 meses de edad presentaba episodios típicos de rigidez muscular inducida por excitación o inducida por ejercicio (a, hipertonicidad) que implicaría todos los cuatro miembros y progresaría a una postura de "rececho del venado" o de "rezo" usual (b), que resulta eventualmente en caída (c). Mientras que el músculo fue normal histológicamente por microscopía óptica, el microscopio electrónico reveló que el retículo sarcoplásmico (sr) apareció dilatado y contenía material finamente granular. La mitocondria (m) y las miofibrillas fueron normales en apariencia. Barra de escala = 0,31 μ m.

Figura 2. Mapear el locus del síndrome de caídas episódicas (a) $-\log_{10}$ de valores de P_{raw} (eje Y) para asociación del genoma completo usando cinco EFS y siete perros control para cada cromosoma (eje de las X). Se detectó en el cromosoma 7 una señal principal individual. (b) Un intervalo crítico de 3,48 Mb que comprende SNP 43389066 se define por eventos de recombinación en un CKCS afectado y en un portador obligado.

Figura 3. (a) Paneles de PCR para exones 1-4 de *BCAN* que muestran que amplicones para los tres primeros exones del gen brevican pueden generarse a partir de ADN genómico a partir de muestras normales (+/+) o de portadores obligados (+/-), pero no pueden amplificarse a partir de una muestra de EFS equivalente (-/-). En contraste, el exón 4 de *BCAN* se puede amplificar para todos los genotipos. (b) PCR múltiples con cebadores que flanquean la

microdelección *BCAN* de 15,7 kb permitieron detección simultánea del alelo de *BCAN* de tipo silvestre (cebadores EFS1 y EFS2, 393 pb) en animales normales (+/+) o portadores de EFS (+/-), mientras que el alelo EFS (cebadores EFS1 y EFS3, 279 pb) se detecta tanto en perros portadores de EFS como en perros afectados (-/-). Nótese que los dos portadores mostraron tener tanto amplicones de tipo silvestre como amplicones de EFS, como se esperaba para un genotipo heterocigoto. (c) Diagrama esquemático que muestra la organización genómica del *HAPLN2* y del *BCAN*, la posición de la delección (rectángulo sombreado de gris con líneas de puntos) y cebadores de EFS1-3. (d) Secuencia que abarca el punto de ruptura de delección de *BCAN*, mostrando una secuencia insertada no homóloga adicional indicada por flechas (secuencia superior SEC ID N.º: 1; secuencia inferior SEC ID N.º: 2). (e) Alineamiento de la secuencia de ADN que flanquea de forma inmediata el punto de ruptura de la delección que indica microhomología local (secuencia izquierda superior SEC ID N.º: 3; secuencia derecha superior SEC ID N.º: 4; secuencia izquierda inferior SEC ID N.º: 5; secuencia derecha inferior SEC ID N.º: 6).

Figura 4. Posición de la microdelección de EFS. ADN genómico a partir de exones 1-4 destacados del cromosoma 7 canino de *BCAN* (mostrados en negrita) y la posición de la microdelección de EFS de 15,7 kb (sombreada en gris). La primera secuencia de la figura 1 es SEC ID N.º: 7 (secuencia sombreada en gris: SEC ID N.º: 11). La segunda secuencia que comprende exón 1 (SEC ID N.º: 14) es SEC ID N.º: 8. La tercera secuencia que comprende exón 2 (SEC ID N.º: 15) es SEC ID N.º: 9. La cuarta secuencia que comprende exones 3 (SEC ID N.º: 16) y 4 (SEC ID N.º: 17) es SEC ID N.º: 10. La secuencia sombreada en gris en la cuarta secuencia se muestra en SEC ID N.º: 12.

Figura 5. Confirmación de la microdelección *BCAN* usando amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple. (a) análisis de MLPA reveló detección robusta de una sonda control (*CFTRa*) y de sondas para la región promotora/reguladora (PR) de *BCAN* y exones 1-4. Sin embargo, señales para sondas PR y exones 1-3 se redujeron en un 46-55 % en animales heterocigotos (+/-) y se suprimieron en animales homocigotos (-/-), de forma consistente con una pérdida de sitios de unión a sondas en ADN genómico.

Figura 6. Organización modular de la superfamilia de proteínas de unión a hialuronano y trastornos asociados. Mutaciones en *ACAN*, que codifican aggrecan -un componente principal de cartilago, se han implicado en displasia espondiloepifisaria de tipo Kimberley (Gleghorn et al. 2005) y osteocondritis disecante familiar (Stattin et al. 2010). Mutaciones en *VCAN*, que codifican versican, están asociadas con síndrome de Wagner y vitreoretinopatía erosiva, trastornos que afectan al tejido conectivo del ojo (Miyamoto et al. 2005). Modificado a partir de Maeda et al. 2010.

Tabla 1. Genotipos de *BCAN* en cohortes de CKCS y en otras razas de perros

Tabla 2. Secuencias de cebadores para amplificación de exones de *BCAN* y *HAPLN2* caninos.

Tabla 3. Polimorfismos de nucleótidos individuales de cromosoma 7 asociados con EFS. Un total de 17 SNP en el cromosoma canino 7 estaban asociados con EFS (valores de $P_{raw} \leq 0,0001$).

Tabla 4. Sondas para MLPA; clave: P- = grupo fosfato 5', **Negrita**: objetivo cebador de PCR 5', Subrayado: objetivo cebador de PCR 3', *cursiva* = relleno; Tm: puntos de fusión; Tamaño: tamaño del producto resultante. Migración observada: *BCAN* Ex4 86 pb; *BCAN* Ex3 94 pb; control de *CFTRa* 98 pb; *BCAN* PR 102 pb; *BCAN* Ex1 113 pb; *BCAN* Ex2 118 pb.

Los genotipos revelados por PCR múltiples se determinaron según se describe en los procedimientos. Los perros se evaluaron en base a datos clínicos disponibles y se situaron en una de las categorías fenotípicas anteriores. Obsérvese que todos los animales clínicamente afectados era homocigotos para la delección *BCAN*, mientras que los portadores obligados eran heterocigotos. Así como animales de tipo silvestre y portadores de la delección de *BCAN*, dos perros homocigotos para la delección de *BCAN*, que no se comunicó que tuvieran EFS, se detectaron en una cohorte de animales emparentados con perros de EFS conocidos. Se detectaron también portadores en CKCS sin ningún historial de EFS, pero no en muestras de ADN control de 53 razas de perros distintas. que incluyen: airedale terrier, akita basenji, staffordshire terrier americano, cócker spaniel americano, perro esquimal americano, pastor australiano, boyero de Berna, bluetick coonhound, collie de la frontera, boston terrier, bóxer, boykin spaniel, briard, bull mastiff, bulldog, cairn terrier, catahoula leopard dog, chihuahua, collie, dachshund, dálmata, setter inglés, springer spaniel inglés, flat coated retriever, pastor alemán, schnauzer gigante, golden retriever, gran danés, bichón habanero, husky siberiano, setter irlandés, galgo italiano, labrador retriever, pinscher miniatura, caniche enano, schnauzer miniatura, pero cantor de Nueva Guinea, cazador de alces noruego, petit basset griffon vendeen, pomerania, podenco portugués pequeño, doguillo, pastor del Pirineo, schipperke, shetland sheepdog, Vallhund sueco, terrier tibetano, toy fox terrier, wei-maraner, welsh terrier, west highland white terrier, wire fox terrier y yorkshire terrier. Donde fue posible, se pusieron a prueba dos perros no emparentados por cada raza.

Materiales y procedimientos

Microscopía óptica y electrónica: Para microscopía óptica, se recogieron biopsias sin fijar de los músculos bíceps femorales, vastos laterales y tríceps braquiales a partir de cinco perros afectados de CKCS sometidos a anestesia general y se congelaron en isopentano preenfriado en nitrógeno líquido. Las criosecciones se cortaron (8 mm) y las siguientes tinciones histoquímicas y reacciones se llevaron a cabo: hematoxilina y eosina, Gomori colorante tricrómico modificado, ácido peryódico de Schiff, fosforilasa, esterasa, reacciones de ATPasa a pH de 9,8 y 4,3, dinucleótido nicotinamida adenina-tetrazolio reductasa, succínico deshidrogenasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y rojo aceite

O. Para microscopía electrónica, especímenes musculares fijados con glutaraldehído se post-fijaron en tetróxido de osmio y se deshidrataron en soluciones seriadas de alcohol y óxido de propileno antes de incrustar en resina araldita. Se tiñeron secciones gruesas (1 mm) con azul de toluidina para microscopía óptica y se tiñeron secciones ultrafinas (60-90 nm) con acetato de uranilo y citrato de plomo para microscopía electrónica.

5 Preparación de ADN genómico:

Se recogieron células sanguíneas completas o células bucales a partir de perros afectados de EFS, perros clínicamente normales familiares de los afectados y perros CKCS control no emparentados clínicamente normales. El ADN genómico se aisló usando el kit de sangre Gentra Puregene (QIAGEN, Valencia, EE.UU.). Muestras de ADN adicionales aisladas de células sanguíneas o bucales completas de otros perros de raza pura estaban disponibles a partir de estudios no relacionados y otras fuentes.

10 Mapeo de asociación del genoma completo:

Treinta muestras de ADN genómico de CKCS aisladas de sangre (cinco casos, un portador obligado y siete controles) se genotiparon para 127.000 SNP en el Affymetrix Canine SNP Array versión 2 (<http://www.broadinstitute.org/mammals/dog/caninearrayfaq.html>). Se procesaron ensayos en el Clemson University Genomics Institute (<http://www.genome.clemson.edu/>) usando el kit de ensayo 250K Sty de mapeo humano de chip de ADN (Affymetrix, Santa Clara, EE.UU.). Se siguió el protocolo de ensayo 500K de mapeo humano de chip de ADN, pero con un volumen de hibridación de 125 ml (Karlsson et al. 2007). Los ficheros Raw CEL se genotiparon usando el programa Affymetrix Power Tools. SNP que tenían > 10 % de datos perdidos y = 60 % de heterocigosis se eliminaron. Los datos para 58.873 SNP se formatearon por PLINK (Purcell et al. 2007) y los análisis de caso/control con 100.000 permutaciones se llevaron a cabo para cinco casos y siete controles (el portador obligado se excluyó de análisis).

20 PCR y secuenciación de ADN:

Los cebadores de PCR se diseñaron para amplificar exones y flanquear sitios donadores de ajustamiento, sitios aceptores de ajustamiento y sitios de puntos de ramificación de ajustamiento, a partir de estructuras genéticas derivadas mediante simulación computacional usando el UCSC Genome Browser. Para cebadores específicos de exón para amplificación de exones *BCAN* y *HAPLN2* véase Tabla 2. PCR se llevó a cabo usando 50 ng de ADN genómico como plantilla y AccuPrime Pfx SuperMix suplementadas con betaína para 40 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, de 60 °C durante 1 minuto, de 68 °C durante 1 minuto. Los productos de PCR se purificaron en gel usando un kit de extracción de gel QiaQuick (QIAGEN, Crawley, Reino Unido) para reacción TOPO cloning (pCR4Blunt-TOPO; Invitrogen, Renfrew, Reino Unido). Se llevó a cabo secuenciación de ADN por el procedimiento de Sanger por DNA Sequencing & Services (MRCPPU, College of Life Sciences, Universidad de Dundee, Escocia) usando la química de Applied Biosystems Big-Dye versión 3.1 en un secuenciador de ADN ABI 3730 capilar automatizado, las secuencias de ADN se analizaron usando Sequencher 4.10 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EE.UU.). Para PCR múltiples, el conjunto de cebadores diagnóstico es: EFS1 5'-aaggtccta-cacctgcaatgaatag-3' (SEC ID N.º: 18), EFS2 5'-g-caaatgtaaagtctgtgacat-3' (SEC ID N.º: 19) y EFS3 5'-agttcacattgtgctctctactg-3' (SEC ID N.º: 20). Análisis de amplificación de sondas dependiente de ligación múltiple (MLPA):

Se diseñaron cinco conjuntos de sondas de MLPA que corresponden a la región promotora (PR) y a los exones 1 (5' UTR), 2, 3 y 4 del gen brevican canino (*BCAN*; NC-006589 en el cromosoma 7; Tabla 4). Los criterios para diseño de sondas MLPA fueron como se describieron previamente (Schouten et al. 2002). Un par de sondas control se diseñó para reconocer un gen no relacionado (*CFTR*: NC-006596 en cromosoma 14). Las sondas generaron productos de amplificación que oscilaron en tamaño desde 88 hasta 115 pb y tuvieron temperaturas de fusión de 70 °C como se recomienda en el programa RAW Probe (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) usando condiciones de MLPA estándar (Schouten et al. 2002). Los productos de PCR se analizaron en un aparato de electroforesis capilar ABI 3130XL (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica). Se llevó a cabo normalización de sonda específica de *BCAN* dividiendo los valores obtenidos por la señal combinada de las sondas control.

45 Resultados

Microscopía óptica y electrónica:

Las criosecciones no fijadas de biopsias musculares fueron histológicamente normales a nivel del microscopio óptico con ninguna anomalía detectada siguiendo cualquiera de las tinciones histoquímicas y reacciones enzimáticas empleadas. Al contrario que las comunicaciones anteriores (Wright et al. 1986, 1987) la microscopía electrónica reveló morfología microfibrilar y miofibrilar normal, aunque se confirmó la hinchazón del retículo sarcoplásmico (Fig. 1d).

Mapeo de asociación del genoma completo y resecuenciación de genes candidatos:

Un total de 17 polimorfismos de un único nucleótido (SNP) estaban asociados con EFS (valores de $P_{\text{raw}} = 0,0001$) (Tabla 3). El resultado más significativo fue para SNP 43389066 ($P_{\text{raw}} = 5,10 \times 10^{-7}$, $P_{\text{genoma}} = 2,68 \times 10^{-3}$) (Fig. 2a). Todos los SNP significativos estaban localizados dentro de una región de 7,2 Mb en el cromosoma canino 7. Un intervalo crítico de 3,48 Mb (desde 7.42838021 hasta 7.46320904) se delimitó por cromosomas recombinantes identificados en un perro con EFS y un portador obligado (Fig. 2b). Con el fin de identificar la mutación asociada con

EFS, los inventores presentes priorizaron varios genes para resecuenciación basada en plausibilidad biológica. Estos codifican proteínas de canales iónicos de apertura regulada por ligando o de apertura regulada por voltaje (*CHRNA2*, *HCN3*, *KCNN3*), proteínas mitocondriales (*MRPL24*, *MTSO1*, *MTX1*, *SLC25A44*), proteínas musculares (*MEF2D*, *TPM3*) o proteínas expresadas en el cerebro (*ARHGEF11*, *BCAN*, *GBA*, *HAPLN2*, *NES*, *RIT1*, *SYT11*, *UBQLN4*).

Curiosamente, la amplificación de exones 1, 2 y 3 de *BCAN* falla consistentemente con grupos de cebadores múltiples cuando se usa ADN genómico de animales afectados, mientras que los ADN de perros portadores e inafectados se amplificaron de forma fiable (Fig. 3a). Debido a que no se observó amplificación preferente para el gen adyacente, *HAPLN2*- que codifica la proteína 2/Bral1 de unión a hialuronano y proteoglicano (Hirakawa et al. 2000; Oohashi et al. 2002; Bekku et al. 2010) -los inventores presentes sospecharon que una microdelección que afectaba a secuencias reguladoras de *BCAN* y a exones 1-3 estaba asociada con EFS.

Identificación del punto de ruptura de delección y desarrollo de pruebas diagnósticas:

Experimentos de secuenciación por paseo adicionales permitieron a los inventores presentes clonar y secuenciar un fragmento de ADN conteniendo el punto de ruptura de delección y desarrollar un ensayo de PCR múltiple que distingue entre perros afectados, portadores y normales (Fig. 3b). El análisis de secuencia del amplicón del punto de ruptura reveló una microdelección de 15,7 kb comenzando 1,56 kb corriente abajo de *HAPLN2*, abarcando elementos de promotores de *BCAN* y exones 1 (5' no traducido), 2 y 3 de *BCAN*, finalizando 85 pb corriente abajo del exón 3 de *BCAN* (Fig. 3c). El amplicón de microdelección también contenía una secuencia insertada de 6 pb (GGCCTT; Fig. 3d) típica de delecciones que resultan de la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o de la unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ). Se identificaron varias regiones de microhomología (1-7 pb) en una región de 30 pb que comprende los puntos de ruptura (Fig. 3e). De forma interesante, 5 de 6 pb de la secuencia insertada complementada reversa se alinean con la región más grande de microhomología. Los inventores presentes también notaron una abundancia de inserciones de elemento interdisperso corto (SINE) en el extremo 5' de la secuencia delecionada, que podría causar la formación de estructuras secundarias que faciliten el reordenamiento cromosómico (Chuzhanova et al. 2003). Los inventores presentes también detectaron la presencia de la microdelección de *BCAN* (Fig. 4) usando MLPA (Schouten et al. 2002) y secuencias de sondas específicas caninas (Tabla 4). Este análisis cuantitativo también confirmó que EFS está asociado con una pérdida de elementos promotores/reguladores de *BCAN* y de exones 1-3 en animales portadores heterocigotos y en animales afectados homocigotos (Fig. 5).

Genotipado rápido usando genotipado múltiple en diferentes poblaciones de perros:

Para valorar la prevalencia de la microdelección de EFS, los inventores presentes usaron ensayo de PCR múltiple para poner a prueba varias poblaciones de CKCS y otras razas de perros (Tabla 1). Todos los perros del estudio de EFS del Reino Unido (n = 2), EE.UU. (n = 6) y Nueva Zelanda (n = 2) fueron homocigotos para la microdelección y todos los portadores obligados fueron heterocigotos (n = 8, perros de EE.UU. y Nueva Zelanda). En animales emparentados con perros afectados, los inventores presentes encontraron 9 animales normales y 10 portadores. De forma interesante, en este grupo, dos perros sin un historial clínico de EFS fueron homocigotos por la microdelección. Por último, en perros con ningún historial clínico conocidos de EFS procedentes de los EE.UU., la frecuencia de portadores fue del 12,9 % (20/155) sugiriendo que la microdelección de EFS está presente a una frecuencia alta en esta población. De forma notable, la mutación no se detectó en PCR múltiples llevadas a cabo en muestras de ADN de controles a partir de 53 razas de perro distintas (Tabla 1).

Aunque las presentes invenciones se han descrito e ilustrado junto con un número de realizaciones específicas, aquellos expertos en la técnica apreciarán que se pueden hacer variaciones y modificaciones sin apartarse de los principios de las invenciones como se ilustran en el presente documento, según se describe y reivindica. Se considera a todos los aspectos que las realizaciones descritas son ilustrativas y no restrictivas. El alcance de las invenciones está, por lo tanto, indicado por las reivindicaciones adjuntas, en vez de por la descripción precedente. Todos los cambios que entran dentro del significado y el intervalo de equivalencia de las reivindicaciones se están abarcando dentro de su alcance.

Tabla 1

Fenotipo	Normal	Portador	Afectado
CKCS afectados con EFS	0/10	0/10	10/10
Portadores de EFS de CKCS de estudio	0/8	8/8	0/8
CKCS de estudio emparentados con CKCS afectado o portadores	9/21	10/21	2/21
CKCS sin historial de EFS	135/155	20/155	0/155

ES 2 533 311 T3

53 razas de perro sin historial de EFS	93/93	0/93	0/93
--	-------	------	------

Tabla 2

Gen	Exón	Cebador directo	Cebador reverso
<i>B CAN</i>	1	cttctctccagaacctatgtcctac SEC ID N.º: 21	acacagcaagtaagtggcagagtt SEC ID N.º: 22
	2	gagttaacggtagggtgggacagt SEC ID N.º: 23	cccacagtccctctatctatctc SEC ID N.º: 24
	3	aagattggggagagatctggagag SEC ID N.º: 25	ccccaaagagagaaggaggaatacaa SEC ID N.º: 26
	4	ctttctcctgggggtggacagact SEC ID N.º: 27	ggctctggatgggtgacctgag SEC ID N.º: 28
	5	gggtgtctctgcagaagaaaacaat SEC ID N.º: 29	gaagacctctggacagaccg SEC ID N.º: 30
	6	ggcccagagaagccagccta SEC ID N.º: 31	gggaaactcagagctcaagtctgt SEC ID N.º: 32
	7	ccacaggaagatgagtgagaattg SEC ID N.º: 33	ccagcatcactctggacacctt SEC ID N.º: 34
	8	ctcaccctccacagcccctt SEC ID N.º: 35	ccagagatcatgtgacctcagagctt SEC ID N.º: 36
	9	gtgatagctccaagacaaggagat SEC ID N.º: 37	gcagggtccaggctcagggtcta SEC ID N.º: 38
	10	ctctgctggctctctggcat SEC ID N.º: 39	tgagtgggagagagcagggtga SEC ID N.º: 40
	11	acggacaggaagcagggaa SEC ID N.º: 41	gcgaggcagaagtgtctgg SEC ID N.º: 42
	12	tgccctccactctcatcc SEC ID N.º: 43	ttacacacatgctggctgggtc SEC ID N.º: 44
	13	atcccgggtctccagatca SEC ID N.º: 45	gagcccagggtactgttgata SEC ID N.º: 46
	14	ccagggtagtggttgatgagat SEC ID N.º: 47	ccctcacgtggtcactctcatg SEC ID N.º: 48
<i>HAPLIN2</i>	1-2	gacattccccacacaccaag SEC ID N.º: 49	cgctgtttcgctcatagtaattg SEC ID N.º: 50
	3-5	tgtctgccggctctccctaa SEC ID N.º: 51	aggatacagacctctgaagcac SEC ID N.º: 52

Tabla 3

SNP	Valor de P
7,43389066	$5,10 \times 10^{-7}$
7,46204875	$5,61 \times 10^{-6}$
7,46283892	$5,61 \times 10^{-6}$
7,42051505	$7,65 \times 10^{-6}$
7,3915202	$6,12 \times 10^{-5}$
7,39142101	$6,12 \times 10^{-5}$
7,43140878	$6,73 \times 10^{-5}$
7,43197311	$6,73 \times 10^{-5}$
7,43230030	$6,73 \times 10^{-5}$
7,43298329	$6,73 \times 10^{-5}$
7,43302986	$6,73 \times 10^{-5}$

ES 2 533 311 T3

7,43867010	$6,73 \times 10^{-5}$
7,43917092	$6,73 \times 10^{-5}$
7,44014865	$6,73 \times 10^{-5}$
7,44059025	$6,73 \times 10^{-5}$
7,41416845	$7,19 \times 10^{-5}$
7,42027729	$7,19 \times 10^{-5}$

Tabla 4

Sonda	Secuencia	Tm °C	GC en %	Tamaño
<i>CFTRa</i>	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAG CTCCATTGCA ATCTACCTAG CCATTG SEC ID N.º: 53	72	48	100
	P-GCTTATGCCT TCTCTTTATC ATGAGGCCGC <u>TCTAGATTG GATCTTGCTG GCAC</u> SEC ID N.º: 54	75	48	
PR de <i>BCAN</i>	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAG GATTGGGTGC CCTGTTTGG SEC ID N.º: 55	72	60	104
	P-CTCGCCACAG GGAGCCTTCT GCGCATTCC <i>AAGTGGTCAC TGTCTAGATT</i> <u>GGATCTTGCT</u> <u>GGCAC</u> SEC ID N.º: 56	72	65	
Exón 1 de <i>BCAN</i>	GGGTTCCCTA AGGGTTGAC TGGTCTAGCC TCTAGGAACC GACGCAGAG SEC ID N.º: 57	70	62	111
	p-GAGGCAGCGG TAGCGTGACA GGCTGGGGAA GAGCAAAAAT CACGGAGTCT <u>CTAGATTGGA</u> <u>TCTGCTGGC AC</u> SEC ID N.º: 58	71	68	
Exón 2 de <i>BCAN</i>	GGGTTCCCTA AGGGTTGAC TATGCAAGGT GTGGCCTTAG CTGATGCCCT G SEC ID N.º: 59	72	59	115
	p-GAAGGGGACA GCTCAGGTAA GCAGGAGCCC <i>GAGGGGTGTC</i> <u>CTCTAGATTG GATCTTGCTG</u> <u>GCAC</u> SEC ID N.º: 60	70	59	

Exón 3 de <i>BCAN</i>	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAG CCATTCTACCG CTGCGAGGTC CAGCACG SEC ID N.º: 61	77	64	96
	p-GCATAGATGA CAGCAGCGAT <u>GCCGTATCTA</u>	72	57	
	GATTGGATCT TGCTGGCAC SEC ID N.º: 62			
Exón 4 de <i>BCAN</i>	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAG GGGCTATGAA CAGTGTGAGATG CTG SEC ID N.º: 63	72	54	88
	p-GCTGGCTATC TGACCAGACC GTTCTAGATT <u>GGATCTTGCT GGCAC</u> SEC ID N.º: 64	71	59	

Referencias citadas

- 5 Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T. Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem* 2009; 108:1266-1276.
- Bekku Y, Vargová L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M et al. Bral1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J Neurosci* 2010; 30:3113-3123.
- 10 Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Böckers TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED, Fässler R. Brevican deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7417-7427.
- Chuzhanova N, Abeysinghe S, Krawczak M, Cooper D. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: Potential involvement of repetitive sequence elements in secondary structure formation between DNA ends. *Hum Mut* 2003; 22: 245-251.
- 15 De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, Annesi G, Gambardella A, Quattrone A et al. The nicotinic receptor β 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 2000; 26: 275-276.
- Drögemüller C, Becker D, Brunner A, Haase B, Kircher P, Seeliger F, Fehr M, Baumann U, Lindblad-Toh K, Leeb T. A missense mutation in the *SERPINH1* gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000579.
- 20 Engel AG, Banker BQ. Ultrastructural changes in diseased muscle. En: Engel AG, Franzini-Armstrong CF (eds.). *Myology* 3^a ed. McGraw-Hill, Nueva York, 2004, pp. 749-887.
- Garosi LS, Platt SR, Shelton GD. Hypertonicity in Cavalier King Charles spaniels. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 330.
- Gill JL, Capper D, Vanbellinthen JF, Chung SK, Higgins RJ, Rees MI, et al. Startle disease in Irish wolfhounds associated with a microdeletion in the glycine transporter *GlyT2* gene. *Neurobiol Dis* 2011; 43: 184-189.
- 25 Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P, Wallis G. A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (*AGC1*) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 484-490.
- Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI. The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends Genet* 2008; 24: 439-447.
- Herrtage ME & Palmer AC. Episodic falling in the cavalier King Charles spaniel. *Vet Rec* 1983; 112: 458-459.
- 30 Hirakawa S, Oobashi T, Su WD, Yoshioka H, Murakami T, Arata J, Ninomiya Y. The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 276: 982-989.

- Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM, Salmon Hillbertz NH, Zody MC, Anderson N et al. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet* 2007; 39: 1321-1328.
- Laing NG, Wilton SD, Akkari PA, Dorosz S, Boundy K, Kneebone C et al. A mutation in the alpha tropomyosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy NEM1. *Nat Genet*. 1995; 9: 75-79.
- 5 Maeda N, Fukazawa N, Ishii M. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. *Front Biosci* 2010; 15: 626-644.
- Matthews E, Hanna MG. Muscle channelopathies: does the predicted channel gating pore offer new treatment insights for hypokalaemic periodic paralysis? *J Physiol* 2010; 588: 1879-1886.
- 10 Miyamoto T, Inoue H, Sakamoto Y, Kudo E, Naito T, Mikawa T et al. Identification of a novel splice site mutation of the CSPG2 gene in a Japanese family with Wagner syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 2726-2735.
- Oohashi T, Hirakawa S, Bekku Y, Rauch U, Zimmermann DR, Su WD et al. Bral 1, a brainspecific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. *Mol Cell Neurosci* 2002; 19: 43-57.
- 15 Patterson EE, Minor KM, Tchernatynskaia AV, Taylor SM, Shelton GD, Ekenstedt KJ, Mickelson JR. A canine DNMT1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse. *Nat Genet* 2008; 40: 1235-1239.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559-575. Rusbridge C. Neurological diseases of the Cavalier King Charles spaniel. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 265-272.
- 20 Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG et al. Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the β -subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum Mol Genet* 2002; 11: 853-860.
- Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P et al. Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet* 2006; 38: 801-806.
- 25 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijjer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
- Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ. Mutations in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat Genet* 1993; 5: 351-358.
- Stattin EL, Wiklund F, Lindblom K, Onnerfjord P, Jonsson BA, Tegner Yet al. A missense mutation in the aggrecan C-type lectin domain disrupts extracellular matrix interactions and causes dominant familial osteochondritis dissecans. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 126-137.
- 30 Thomas RH, Stephenson JBP, Harvey RJ, Rees MI. Hyperekplexia: Stiffness, startle and syncope. *J Ped Neurol* 2010; 8:11-14. Tomlinson SE, Hanna MG, Kullmann DM, Tan SV, Burke D. Clinical neurophysiology of the episodic ataxias: insights into ion channel dysfunction in vivo. *Clin Neurophysiol*. 2009; 120: 1768-1776.
- Weber, Y.G., Lerche, H., 2009. Genetics of paroxysmal dyskinesias. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 9, 206-211.
- 35 Wright JA, Brownlie SE, Smyth JB, Jones DG, Wotton P. Muscle hypertonicity in the Cavalier King Charles spaniel-myopathic features. *Vet Rec* 1986; 118: 511-512.
- Wright JA, Smyth JB, Brownlie SE, Robins M. A myopathy associated with muscle hypertonicity in the Cavalier King Charles spaniel. *J Comp Pathol* 1987; 97: 559-565.

Listado de secuencias

- 40 <110> Laboklin GmbH & Co. KG
- <120> Una microdelección en BCAN canino asociada con Síndrome de Caída Episódica
- <130> ADTPT12017EP
- <150> EPEP11165620.3
- <151> 11-5-2011
- 45 <160> 64
- <170> BiSSAP 1.0

ES 2 533 311 T3

<210> 1
<211> 34
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris

5 <220>
<221> fuente
<222> 1..34
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 3d secuencia superior"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<400> 1

10 aagtacaacc gccaggcctt agtagaaaa ggag 34
<210> 2
<211> 34
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris

15 <220>
<221> fuente
<222> 1..34
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 3d secuencia inferior"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<400> 2

20 ctcttttct agctaaggcc tggcggtgt actt 34
<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 3d secuencia superior izquierda"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<400> 3

30 ctcagacctg gaagtacaac cgcca 25
<210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris

35 <220>
<221> fuente
<222> 1..25

ES 2 533 311 T3

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 3d secuencia superior derecha"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<400> 4
gtatgtacag gatcagcccc agttc 25
<210> 5
5 <211> 25
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris
<220>
<221> fuente
10 <222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 3d secuencia inferior izquierda"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<400> 5
caaatgctct ggaaggcacc cagtg 25
<210> 6
15 <211> 25
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris
<220>
<221> fuente
20 <222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 3d secuencia inferior izquierda"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<400> 6
agctagaaaa ggagtgggta gagac 25
<210> 7
25 <211> 350
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris
<220>
<221> fuente
30 <222> 1..350
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 4 primera secuencia"/organismo = "Canis lupus familiaris"
<220>
<221> misc_característica
<222> 181..350
35 <223> /nota = "comienzo de la deleción"
<400> 7

ES 2 533 311 T3

cagaagggaa aagtaagaag agctctgaaa ggtcttacac ctgcaatgaa tagctgcagc 60
gcagagagac acctgtctct cccctcgaca gctgtttctc tagaacgaat cccatggcct 120
tgcttaacca aaagggggca gaaaagagca acctactcag acctggaagt acaaccgcca 180
gtatgtacag gatcagcccc agttccacca caggcatcag ggcgggcaga ctggtgggca 240
cccactcctc cccggctctt ctgggttttc tgagttacag tctgtacgga gtcagagccc 300
cagaaagcca agacgctgga cccagaagct tccctgaagg aagatggctt 350

<210> 8

<211> 490

<212> ADN

5 <213> Canis lupus familiaris

<220>

<221> fuente

<222> 1..490

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 4 segunda secuencia incluido exón 1"/organismo = "Canis lupus familiaris"

10 <220>

<221> exón

<222> 82..417

<223> /nota = "exón 1"

<400> 8

gcactcgctc ccgcccctcc agccctcccc cctactccaa gtccccggct tctctccaga 60
accatgtcct acttcgcacg tccttgctct ctctgctgcc tctaggaacc gacgcagagg 120
aggcagcggg agcgtgacct tcccagagccc cctgctgcc tggacagggg gcgggggagg 180
ccccggggag gagcggggcg gggacgggag ggggagtgga gaaaggggtt ttgtgcgagc 240
ccggcgggccc ggcgccctct tccgaacgct ctgcggggccc ggccctccct gcgcccgcgc 300
agtcctcgcc gcagtcggcc gcagccgag gacggagcgt ggacccggag gagagcccgg 360
aggaggctgc aaacttggcg gtgcagcacc ctgcagccc cggccgcctg caggtaggtg 420
gagcacgagc gcagccggac caccgggacc cgagaggcag ggagcccggg gcgcccgtcg 480
ccgcccgtgg 490

15

<210> 9

<211> 280

<212> ADN

<213> Canis lupus familiaris

20 <220>

ES 2 533 311 T3

<221> fuente

<222> 1..280

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 4 tercera secuencia incluido exón 2"/organismo = "Canis lupus familiaris"

<220>

5 <221> exón

<222> 84..181

<223> /nota = "exón 2"

<400> 9

```
    agtccacatg gatgtggtca ggagccgggg gaagtccatc ctaaagtcta accccagctt      60
    tcctcctcaa gtccctccac cagcctgagc atggccccc tgttcctgcc cctgctggta      120
    gccttggccc tggcccgggg ccctgtggcc ttagctgatg ccctggaagg ggacagctca      180
    ggtaagcaac cgcactcagc atcactgtct ctgtctcctg catctcctct atggaagagg      240
    gtggccttgg aggaccgggg gagagatagg atagagggca      280
```

10 <210> 10

<211> 1050

<212> ADN

<213> Canis lupus familiaris

<220>

15 <221> fuente

<222> 1..1050

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 4 cuarta secuencia incluido exón 3 y 4"/organismo = "Canis lupus familiaris"

<220>

<221> exón

20 <222> 113..487

<223> /nota = "exón 3"

<220>

<221> exón

<222> 782..956

25 <223> /nota = "exón 4"

<400> 10

ES 2 533 311 T3

tggggccctg ggagcagtgg tggctgggat cctggggcgg gcttgggagac caggtgggac 60
cctgtggatc aggtgccaag ttctagccac cggcctgccc gccacccac agaggaccgg 120
gccttccacg tgcgcatcgc gggtgacgca cactgcagg gcgtgctggg cggcgccctc 180
accatccctt gccacgttca ctacctacgg ccgctgccgg gccaccgggc cgtgctgggc 240
tccccgcggg tcaagtggac cttcctgtcc gggggccgtg aggccgaagt attggtggct 300
cgggggctgc gcgtcaaggt gagcgaggcc taccgtttcc gtgtggcact gcctgcctac 360
ccggcatcac tcaccgacgt gtccctgggt ctgagtgagc ttcggcccaa cgactccggc 420
atctaccgct gcgaggtcca gcacggcata gatgacagca gcgatgccgt ggaggtcaag 480
gtcaaaggtg aggggcagga cccaggaagg ttccccagg gtgggagccc acagtgtgag 540
gggggagcaa atgctctgga aggcacccag tgagctagaa aaggagtggg tagagacaga 600
cctttgttac ctcttttctc tcttgggggtg gacagactcc tgagcacagc ctggggcagg 660
cccctcagca gtagagagag cacaatgtga actttaccct cgtgtacagg ggagtgccaa 720
ggaggggtgag aggaggtcag ggtgggggtga tcatgcctca gggctcctct ctgccctca 780
ggggtcgtct ttctctaccg ggaaggctct gcccgctatg ctttctcttt cgctggggcc 840
caggaggcct gtgcccgcac tggagcccgc attgccaccc cggagcagct ctatgccgcc 900

tacctcgggg gctatgaaca gtgtgatgct ggctggctat ctgaccagac cgtgaggtga 960
gcagggttgg gacgggggat cctgtggacc aggagcttct agttgtgtct ggaagtggca 1020
gtggggccctg gttctgccag gggctgctgg 1050

<210> 11

<211> 170

<212> ADN

5 <213> Canis lupus familiaris

<220>

<221> fuente

<222> 1..170

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 4 delección de la primera secuencia"/organismo = "Canis lupus familiaris"

10 <400> 11

gtatgtacag gatcagcccc agttccacca caggcatcag ggcgggcaga ctggtgggca 60
cccactcctc cccggctctt ctgggttttc tgagttacag tctgtacgga gtcagagccc 120
cagaaagcca agacgctgga cccagaagct tccctgaagg aagatggctt 170

<210> 12

<211> 572

ES 2 533 311 T3

<212> ADN

<213> Canis lupus familiaris

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..572

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "Fig. 4 delección de la cuarta secuencia"/organismo = "Canis lupus familiaris"

<400> 12

tggggccctg ggagcagtgg tggctgggat cctggggcgg gcttggagac caggtgggac	60
cctgtggatc aggtgccaaag ttctagccac cggcctgccc gccacccac agaggaccgg	120
gccttccacg tgcgcatcgc gggtgacgca ccaactgcagg gcgtgctggg cggcgccctc	180
accatccctt gccacgttca ctacctacgg ccgctgccgg gccaccgggc cgtgctgggc	240
tccccgcggg tcaagtggac cttcctgtcc gggggccgtg aggccgaagt attggtggct	300
cgggggctgc gcgtcaaggt gagcgaggcc taccgtttcc gtgtggcact gcctgcctac	360
ccggcatcac tcaccgacgt gtccctggtg ctgagtgagc ttcggccaa cgactccggc	420
atctaccgct gcgaggtcca gcacggcata gatgacagca gcgatgccgt ggaggtcaag	480
gtcaaaggtg aggggcagga cccaggaagg ttccccaggt gtgggagccc acagtgtgag	540
gggggagcaa atgctctgga aggcaccag tg	572

<210> 13

10 <211> 15722

<212> ADN

<213> Canis lupus familiaris

<220>

<221> fuente

15 <222> 1..15722

<223> /mol_tipo = "ADN"/organismo = "Canis lupus familiaris"

<220>

<221> exón

<222> 10684..11019

20 <223> /nota = "exón 1"

<220>

<221> exón

<222> 14604..14701

<223> /nota = "exón 2"

25 <220>

<221> exón

ES 2 533 311 T3

<222> 15263..15637

<223> /nota = "exón 3"

<400> 13

gtatgtacag gatcagcccc agttccacca caggcatcag ggcgggcaga ctggtgggca	60
cccactcctc cccggctctt ctggggtttc tgagttacag tctgtacgga gtcagagccc	120
cagaaagcca agacgctgga cccagaagct tcctgaagg aagatggctt cccttctgtg	180
tgatgcctc gactttgtca agaaactgca taaaaaatgg tcacaggact ttacatttgc	240
tgcaaatctt tctctctctc tctctctttt taaagatttt atttacttat tcacgagaga	300
cacacagaga ggcagagaca taggcagagg gataagcagg ctccctgcgg gtagcccgat	360
gcaggactcg atcccaggac cccaggatca tgacctgagc caaaggcaga cactgaacca	420
ctgagccatc caggcatccc aaagctttat attttcaccc atgatagcac atgcccacta	480
atctctacaa ctacgcccc cactactatt acaatgtttt tattacggag aacttcaaac	540
atagcaaga aaagagagaa aggatagtga accacttcat catccagctt gaccacttca	600
aaattccacc tttctggttt catgaagtcc ctcaactgtg gtcgtttgtg gtggagtatg	660
atTTTTTtaa gatTTTtattt atttattcat gagagacaca gagagaagca gagacacagg	720
cggagggaga agcaggctcc atgcagggag cccaatgtgg gactcagtcc tgggtctcca	780
ggatcacacc ctggcggaag gcggcactaa acccctgagc caccocgggct gcccatgctg	840
gagtatttta aagcaaatct cagacagctt attattttct attaatcttc acatacatgc	900
tatgcatttc taacatacgg tgactttaaa agataactaa ttctgttatc atattcccc	960
aattgacggt atctaataa tacttcatga tcagtttccc ttaaagtctt aaaaaatacc	1020
atTTTtatagt tgatttgccc aaaccagcat ccaagggcta tacattgcat ttgattaact	1080
ttgTTTtattt tttaaaatat tttatttatt catttagaga gcatgagaga gagagagagt	1140
aagcacacgc aagtgagaga aggggcagag tgagaatctc aagcagactc ctctctgagt	1200
gtctggatct caggatctca tgacctgagc caaaatcaag agttggatgc taaaccaact	1260

ES 2 533 311 T3

tagccactcc tgcgcctctt ggtaatttc ttaaaaatat ctttttaggg atccctgggt 1320
ggcgcagcgg gttagcgcct gcctttggcc cagggcgcca tcctggagac ccgggatcaa 1380
atcccacatc gggctctcgg tgcattggagc ctgcttctcc ctctgcctgt gtctctgcct 1440
ctctctctct ctgtgactat cataaataaa taaaattaaa aaaaaatatac ttttttagact 1500
gtaatacttt ttocctttatg ttttctatgc catttttggt tgtttaggaa actgggctgt 1560
ttccctgtcg agtctcccat gttctagatc tggctgtgag tgtatccctg ttgtgtcatt 1620
tcacatgttc ctctgtccct gtcattatat ttcactgttt gtttttctaa gattttattt 1680
atztatcat aagagacaca cacacagaga ggcagagaca taggcaaagg gagaagcaga 1740
ctccatgcag aaagcctgat gtgggactca atcctgggac tccaggatca caccctgacc 1800
gaaaggcaga cactcaacca ctgagccacc caggagtccc atatatttca cagtttgatt 1860
aaacatgcat taactttttt cccaggagta tttcataagt aagactgtat ttctctgtt 1920
gtcagatccg gaggtatgcg gtgtctgggt gttgatgcta cgactgggtca gtttaattctg 1980
ctgctgtcag cctgatccac tcacaaagtt gcttgtacca gttatgcagg ctgctgcaac 2040
acattaccac aaacgtgggt gtttatgagc cagaaatata ttcttctact gttctggagg 2100
ccagaagtct aaactcagag tgttggcatt atggccctcc ctctgtgtag actctgagag 2160
aattcttctt tgcttcttcc atcttcagtg gcaggtggca ttctctcagt tctctggctg 2220
cattgctcct atctctgtgt ctgtggctcat gttgcctcct ccttttcatg caatacgacc 2280
acagacagag ataggagcaa tgcagacaca ttaaaactgaa ttttggaat aaattcatgt 2340
aatgaattac atccacagag accctttttc caaacaaggg tttcagggat taggatgcag 2400
acacatcttt acccatcacc tttttatctg atggctactg gtgacctgg tctagatgca 2460
ttatttcatt aggagcacia aatggagatg ttctaatttt gtctctcctc ttcttttatt 2520
attatgaatt gtcccatatg gaaaaatata cctcatcaat tactgtcact ctggcttaga 2580
accattcag gaaagataga gttaatgcct ggttctctcc catttgcctt attttttttc 2640
ccatttgtct tagataggta ctgtggaatg agtgtttgca tcacccaaat ccatatatta 2700
aagccctaat cccagtggtg gtggtttttg acatggggcc tttggaagg aatcccacga 2760
tgacattagt gcccttataa gaagagatgt gggagagctt gctctctcct tgcagacttc 2820
agtgagaagg cagcgtctg caggaagcca gccctacca gacaccagg ctcttggcct 2880
ccaggatga gagaaatag tgtttgtgt ttaaaccatc caggctgggg cacctgggtg 2940
gctcagttgg ttgagcatct gcctttggct caggctgaga tcccggggtc ctgggatcca 3000
gtcccacatt ggacttctg cgcggagcct gcttttccct ctgcctatgt ctctgcctct 3060
ctgtgtcttt catgaataaa taaataaaat cttaaataaa ataaacaaa aaacaaataa 3120
ataaacaaac catccaggct atggtaactt gttacagcag cctgagctga ctaagaccat 3180

ES 2 533 311 T3

ggggttccct gaaaccaacg ttgagtcaaa gatttcagta caagcagttt atctgggggg 3240
 tcaggtaaaa cgcaccagtg ggggactggg gaagcaaggc aggagggagg aggaagctgg 3300
 caaaggctgt gagacagagt ggccggagcg attggcccag tcctgccaag ggatccctgg 3360
 aaggcagtgt ggagcctgtc tcagagaatc ccacctgatg gacagacagc agggtcatat 3420
 gtgtcaactt cctgcctgaa agccgagggc tgcttctggg agcactgacc cgtagcatt 3480
 cctggctagc tctgagtgca cacatgctcc cacagtgaga aaaaagccac cagacagaat 3540
 cccagatgct accgtctgcc tatggagaca aatactggag ggtcgggtca cagctgtggt 3600
 ccaccctccc cactgctcag acccatgtgt cccctgtcc accgtgtcct gtcactgact 3660
 ctccaaggct gtggctgggc accattttta attcttgaaa agagagtttt atgggcagcc 3720
 ccagggggcc cagtggttta gcatggcctt cagcccaggg ccttcagccc agggcgtgat 3780
 cctggagacc cgggatcgag tctcacttca ggctccctgc atggagcctg cttctccctc 3840
 tgctgtgtc tctgcctctc tctctctctc tctctctgtg tctctcatgg ataaataaat 3900
 aaaatcttaa aaaagaaaga aagaaaacag agtcttatga caggagggtt agtgggacaa 3960
 gttccaatag ttgctgcagc ggggtggctcc ggggctgtga ccattatcaa tattccacat 4020
 cttcctccat ggttcatctg ttgtccacag ggctttcaca gaaaaaccca gaccttcac 4080
 cctgaaggcc tttacttccc atgcccttga caggccagca tggctgcacc tgccatcata 4140
 cttaccacog gatatgggct cgtcaagagt aaatgttttg gggcgcctgg gtggctcagt 4200
 gattgagcgt ctgcctttgg cttgggttgt gatcctgggg tcctgggatt gggcgcctg 4260
 tttggctcgc cacagggagc cttcttctcc cactgcctgt atctctgcct ctctctgggt 4320
 gtctctcgtg aataaataca cttttaaaat cttaaaaaag ggcagcccca gtggcgcagc 4380
 ggtttggcgc cacctgcagc ctgggggtgtg atcctggaga cccgggatca agtcccacat 4440
 caggcttct gcatggagcc tgcttctccc tctgtgtctc tgcccctctc tctgtgtcta 4500
 tgaataaaca aataaaatct taacaataaa ataaaataaa ataaaatctt taaaaaaga 4560
 acaaaagtct ttgccagtat aactcttttc tttgcgtgtt ggtgaattgg catgaggtac 4620
 ccaaaaggac ccagaggctg ctagtacctt aggtctgggtg gtacccttat agtagcctct 4680
 ggagacaca tctcccaccc taaggactag ggcttctaata cctacagagt ctacatttat 4740
 aggtacagga agcacgaatc ttcacatggg tcaactggga tgatggggg aaattattgc 4800
 tctttccaac ccttgggtct tgtatccatg acttctagct ctgtgggcta cagcaccata 4860
 taatagccat tggttcaaaa tgtagactgc attttgaagt ccagtactct tgatttcaga 4920
 ggatgttttc cccaaactgg tatttagatg tgctgtaacg aggtcatact aaagcactcc 4980
 cagggttggc aatttcaagg tcatgtaata catggtaggg acaatggatg cgggtgtctt 5040
 gtggccattg tcgcatctcc tttactttaa agtgtatccc cttgggtaga agtgatacta 5100
 tatggggtct cataagtata agccatctcc ttcacatgacct tgaatattgg tactggccaa 5160

ES 2 533 311 T3

ggcacttggg caggggaaggc aaattcatac ccagaatgtg catagtccca ggaaggaaac 5220
 attgccctcc catccagact gaaagagaga cactgtagtc aacatgcttc ccagtggctg 5280
 gttgatctcc ctgagggatg gcgccatgtg agggctcagc acctgtctgt gctgccgaca 5340
 cgtcaggtgg ccttagtgag agggaacat gcagacttct acccactgcc atagccactc 5400
 cattcatggg ccctcacgca ggcactggca tgggggaagg acagagtctg gctggtatcc 5460
 cctggagtct cctgtctcct ggctgtccaa cgttcccctg cagtgaatgc tccttaatgg 5520
 tactgctgta aaaacaatgc ccgctcctgc aagtccatcc atggctctcc ctccacttcc 5580
 ttatctccac ccttcctgtc ctgccctttc ctggcctgac cagccagcca aacctgtgac 5640
 caccgctcaa gagtccaata gacctctctc aagtcacctc tccccctgca ggcaaggggtg 5700
 gccagcgtgc tgcctgaact ccctcccag cctccatccc gggtcagctc acatcagtgc 5760
 accagactga tccatccatg aagtaggcct ggacttcctc ctctgaagcc tgattggcct 5820
 gatcacagag gcactgagag agagggcatgg gtgccacaga cacagggcat ctgggagcct 5880
 ggcttcctgc tctctgagca gtctcaccca atcacacatt ccacctggga ttgccgttgt 5940
 gtccacccat atgtatgtgc aggctttgaa ccccaggtc ttaataagac agtgagtcca 6000
 ggaagggaga gaatccaaca aatcattgag caaacagtcc aatcacctgg aacaggtgcc 6060
 cagctggagc tcaaagctgc tgagagtgaa gggagagggg ggcgggggtg ggcttctagt 6120
 ctgcgggctc cccttctgtc actggccgaa gctgtttcca ggccatcaac tcctacatgc 6180
 gtctgactcg ctgtgttctt gggcccagtg tacctgccca ttcagaaaaa atcctcagga 6240
 agtcttcagc ctgtggcctg tctaggtggc cagtaagggg acataggcca gtaaggggac 6300
 actgacaggg tctgctacac cctcttaatc ttcacaactg tgagtccatg cccccatcag 6360
 tgtgcaaagg tgatcagggg ttttcttgtt tagtatcatg atgaattctt ggactttata 6420
 gatttgatgt gcttccatct cttatgggat ttattcattt aatgctgaca tgtcaccttg 6480
 ccagtgagag tctccacaat gtggctactg ggtccctttg acatgatctg acctgagacc 6540
 ccaaacttcc tttatttgca agtgtgatga gctgtcctgc ccctgactgg gacatcctga 6600
 agagggcctgg ttcttggaaag tggaaagtac tatttagaga cggtcgtctg gaccccagga 6660
 gcactcagca ttaacggggg ggggtggggg tagtgtcact gcttctaagc ctttttcaca 6720
 gacatacaaa tcgtgagctc atgctgttgt cttcagttca cgtgaaagat tagcagttta 6780
 gcttaactct cctttcctca cactgaaact cagagttcca aacaccatta ctataattat 6840
 ttgtttgcat tatcccaata aatagtgctt tttgaaatgc caagccaaca ttatgatttc 6900
 tctgcagttc ttttcattct tagggatgaa tagtcaaaat gctcagtttc ataactactt 6960
 gaaagaaaat tcttccatgt ggctttgctt ccagctccaa gtacaatcac gggcccttgt 7020
 ctcaactttgt ttcagatttt taggaattgc atccctgttc tgcttcttaa tttagcctaa 7080

ES 2 533 311 T3

aattaacttc attattotga acttaattct gtttcaatta tataatata ttatgtagtt 7140
ccaatgtcaa agccagaaag caagctgctg ccattttaca ggtgaagaaa caggcctgca 7200
gcctgctctt cagaaaacct gagaggtctc tggccctggg ctgtagggaa gggggctgcg 7260
aggagcctgc agatgggacg gctttctcca gaaggagatc tggatgttct cagggccgag 7320
ccctccagtt ccttcagctg ttctttgggg aacagtctgg gatgcccttt gagcatagga 7380
ctttgctccc tggccgaaa gttctgtcca ctgagggct ccctagatg tggtgccgtt 7440
cagcctgcct cctcgccacc cccctcccc taccaccct gaggccttca gctgcaggag 7500
ccctccctca tctgggccag ggtcccgcgc ttctggccc ctttcagaag ttctcaaagc 7560
caccattctg ccagcacagc tgtggcagcg cttggagctg tgcgcatgca gccccactcc 7620
cacgtcccc tgcaaggac ccaggtgccc acatgacgtg cagggccttg agaggatctg 7680
agctgctggg ccccaccccc acgtctgggg aagtggaaac aggtgctcaa gggaccagaa 7740
ggatgggctc tcccagtggc cactgtggct gggagtccag tgaccagtgg ctaacactgg 7800
aggcgggggc gccagggacg ccaggacctt ggggagggtc tgtttcctca acttgggtca 7860
tggcctcagc gttggccttg gtgggggggc cgtgggggtg agggagaggg aggagactga 7920
ttattctcct ccacagagac tggaaagctc cccaggacctt agggagctgg gaggccagcc 7980
agctgggctg caacccctc ccccccacct ccaccatttc tgtcccctga gagacagctg 8040
gggccttggc aagaacctg gcctgggcgt ccatcaggag acttgctttt ggtcatggtc 8100
agcctgtgac atgctgtgtg accccagata actttccacc tctgggtctg tttccttgtc 8160
cagaagatat ttcagtttcc ctgagacatt ctcttctgt tattagggca ggaagttcta 8220
cgtgaaatca gacttgaatt cttcctgctt ccattggtcc tgtttgcttt cagccagtct 8280
ccgagggctc ctttctgaga cctcagggag gtcttggttc ttcttgctc tttctaggaa 8340
gggatagaaa tgggtgatgg tgactgtcac atggccaggg gacaagatgc aggtaaaaat 8400
agtacagaag gtccctgccc agcaagtgcc agctagactg cagtatgagt cttcagagct 8460
gtaagtgttg gaagagtctc gggggcgagg gggcactcat tgccctccc gaaattcct 8520
cagggcggac tcctctctca gataacaaac gctccgtctc acccacagga gactggttca 8580
ctggcctcct ggccaggaga tctgtgcaca ctgggcatgt gtgtatgtgc gtgcatgact 8640
agcaaagaga aagaactaga ttttgctgag ctcgccatg ggccaggtgc agtacacatt 8700
accagtgcc attgatactc ttcagcccgt tgttcagaag aggaaagagt ttcagagaaa 8760
ggaagccctg cacaaggttt ggccgctgca gatggcaaac cagggctttg acctcagggc 8820
cggagcctct ggagtccctg ctctcaccag ccttcacagc agcagctccc tgttcccgca 8880
ccacgtctgg tttcccacca ggggactgc ctcttggaa agactgtctg gtaccagccc 8940
cagtccagac ccagctgctt ctggcctcga tcaaggtcag actctttcag gatgccacgt 9000
gtgccacac ttctagtcat gaggggaggt gacaaggaag gtcactttct cttctttccc 9060

ES 2 533 311 T3

catcacagcc aggtttcccc acagcaagaa ctgtgggttac ctgggagcca ccaactgagat 9120
 taaatttcag ccacatgggtt gcctggctct gcctggctgg gcttaagacc cgggtggagc 9180
 tgatcccagc cctgggtggag gcaggctggc tgcattggacc tatgctgaga ctggtggggt 9240
 gggggggatg tctctttcag ttgggttgca aggtccgagg ggagcaaagg gaggtcctag 9300
 ggctgccagg tgctgcttag atctgcccc aaggccagatc cctctggcct ccatcagagg 9360
 acttgggtgct gaaatagtgc ctggtccata gtgggcattc agttagtatt tattaatga 9420
 aatgaataaa cagaggtctc tccttcccc aactctgcca ggcaccttgt tctgtcctct 9480
 ttaggctcac ctccccgctt ggttcatttc tttactaaa agaccctacc acccaccacc 9540
 cccaggactt cctgtcctgt ctctacagta tatgggtgct caaggattgg ccagagctct 9600
 accttaggtc cttgaggatt tagggaggag tttattgtga gcttctgaaa agcgctttgg 9660
 aagccagtcc acagcatttg aagtagaatc cagacagtgg taagactggg acagttaggg 9720
 catcagcaga gggcagcca gactccata caggaggagg ggacttgggt gccgtctaaa 9780
 tggaaggaca gggacctgtc ctgaggttga tttgactgc aggcacccc catgacttgg 9840
 gatattttcg ggggtgtgctg gagattatgg ggatcaaatt ccccaacaag ctatccttgg 9900
 tgccaccaca gttatccggg gagagaattc aagcatctag ctgtcctgcc cacagtcaat 9960
 gccaggggct ctgcttcaag tcccaggagg gacaggggga gtgagaagag ggaggggagc 10020
 agagagcctg ggaaagcaga ggaagggga ggctgtggag ctgaagaggg ggggtgtcat 10080
 tggattttcg aggagtcctc cagtgtcagg cagcactcaa ggcccacccc ctggcaccag 10140
 gctgcacatt catcagcaac agccctggcc agtgggccct ctgggctccc agcaacgcct 10200
 gtgttttgca cattggtttt tgtgaccagt gtgtccattc acagtgccgc tcctccccca 10260
 cacggcatcc agagagtccc tgacttgctt ttcttaacct ctgaatccgc tgtctaacct 10320
 ccatctgtcc agctgcaaag tcagctctc ctctgtgcag ggagcaggag caccaccaga 10380
 ggcaaaacct aatcagggtc tccaacaggg atgtggttgt ggtcctttgc ccctcatcct 10440
 gcctcaaaa aagagcttcc ctccccact ctcatgcttc tggatcctg tcctattgt 10500
 ccaattocca ggccctctc ctgcacctg gcccacggg aagtccctct ggctgtctaa 10560
 cttccatccg tccagttgca gcagcatcct ccagctccgc gagcactgc tcctccctct 10620
 ccagccctcc cccctactcc aagtccccgg cttctctcca gaacctgtc ctacttcgca 10680
 cgtccttgtc ctctctgctg cctctaggaa ccgacgcaga ggaggcagcg gtagcgtgac 10740
 cttcccgagc cccctgcgtc cctggacagg gggcgggggc ggccccgggg aggagcgggg 10800
 cggggagcgg cgggggagtg gagaaaggg ttttgtgcga gcccggcggc ccggcgcct 10860
 cttccgaacg tcctgcgggc ccggccctcc ctgcgcccgc gcagtctctg ccgcagtcgg 10920
 ccgcagccgc aggacggagc gtggacctcg aggagagccc ggaggaggct gcaaacttgg 10980

ES 2 533 311 T3

cgggtgcagca ccctcgcagc cccggccgcc tgcaggtagg tgagcacgag cgcagccgga 11040
 ccacccgggac ccgagaggca gggagcccgg ggcgcctcgg gccgcccgtg gtccgcgccc 11100
 ccccctcccg cccccgcccc gcagctctgg cctcccgggg ctccggcgca ggccacctgc 11160
 tgaccctgac agccccagc gcacctccg ctgtgtgagg cccctcccgc gccccgagt 11220
 ccacggatga taggaacgcc ccccgctact gcggcctcct tgctgcgccc tcgggcgcca 11280
 gccccggct caggcttccg acctgtgagc gggcaggcgg gcggcgggag gagcaggaag 11340
 cagcccctca ttggaggccc cttcggggag ccccgggaca gccgacagcg gagcgggtgg 11400
 tcggggcgga ctggcgctgg agtcccaact ctgccactta cttgctgtgt gacctggggc 11460
 aagttagttg acctccctga acctcgggtt cctcttcagt gtgatgcata gaccatattt 11520
 ttctcaaagt taaggttatc catgccaagc ctggataaga ggcctgactc aggtggatgg 11580
 tcagtcacca gtagccagag ctccagttac cctcctgctt tcctctctag cactgccagg 11640
 gggctggaga ccccccccc aggtcctttc ccctcacctt cctatgggaa tagctctgcc 11700
 cacacgcttc caacaggacc aagagatttg ccatcagttt tgtagcacc gttaatatct 11760
 gcatgacttc tattccagat aagagcagta agatcaaggg aactgttac ccatggacca 11820
 cccaccccc ctcaccctgg cccacagca ttaccagcac ctgtgttttc atggctaact 11880
 tggcatcatc cacctttcag attctgaact aggaggagct gcagtagctc agctgtgatg 11940
 tcgctaatag tattactagt tgtgcgtcca ataaatagga ctatttatgc aatgtcttta 12000
 gctggtccca caagctctgc taatgcctgg ctgctgtcgt gtaaggtcag gttgctgctt 12060
 gcacggccac taaggggacc ataagagctt ccctcctgct gaccctgcta gctacaggag 12120
 cctggttcct atggggcaga ctctgcacag ccagcagggg aggggggggc atttagcatg 12180
 gagatggcag gtattggatg tgtgtacgca tatgcatgga cacacacaca cacacacaca 12240
 cacacacaca cacacacaaa ccctggctcct gatcttaatc ctctgtggat tgggtctacg 12300
 aagcctgtga gaaagatggg ctccgtgatc agacaggaat aacatatcaa gagagaagtt 12360
 tcctgaacag cttgggaagc tcaaggcaag gcagaaaatc ctggagctgg agcaggaaaag 12420
 gatgagctgg agagagggat ggtgtggatc agggaagggg caggaagcct gtcgatgccg 12480
 aaactctcca ggttagggat ggagagggta tcctgctctg gaggacagca gaggggtgaa 12540
 ggccaagtct gttttccctt tccccacccc aggtctgaca ctggtggcag aggaggggat 12600
 gcagtagtgt tctcaggaca cttggctgta ccaggatggg gctgaggccc aagcaatggg 12660
 gtgggggcaa tgcagatgtc tctgatcatg agaaccatgt aatccaggtg ccctcttggc 12720
 ccctctggtt agtgactccc cttcctggaa gtgggatggc tcccatattt cagggtacca 12780
 ggtcttcatc agcctcagac tttctccctt cattccctca cttcaaaaac agaggtaaaa 12840
 gggcaggcca ggggtgctgt cccagagtgg ctccaaatat atgggtttct gggccgtctg 12900
 tcagagagct gggaccagc tctatgagca gctccagctc cagcctgaag agaggggagg 12960

ES 2 533 311 T3

gagggcgcca gaaagggggcc tggcccagga cctggcacag ctccagatgca aggcaaacag 13020
tctgcccagt acccagctgg caccggcttc ttaaaccaaa tggccctcc ttctaccca 13080
gaaggcagtc ctccaagtg ccctatacc cagagctggt ctccagcacc tctgatctgg 13140
ccccacaag agacaccctg gacatctggc tcctgtcact ccttctcaa gtctaaccct 13200
gaggaaatga agcccagcca tagcgggagg gatggagggt ttgtagggtg ggaggcattc 13260
caaggaggat ctccagatccc tgggaggatt tgggagaaga gaggtttccc agcagttcag 13320
gctcagaaag gggaacacat gcatgaaggc agagcctaag agggcaaaga agatggagggt 13380
tgaacctggt gcctggagtg ggaatgagcc tctaggaaat cctgcctcta gactaacctg 13440
catccctcct gctgcgcat tggcctatgc catggcagac ctgggtctct gtgcttttct 13500
actagccctt acagatggtg ttggctacta gctctgaagc cttccctcct gcaggcacat 13560
tggcctggta cctgacttgg ctttctggg aaccagagtc agccctatcc ttctctgggt 13620
cccatttctc agtgtcacc cccaacacc ccatctctcc attatgaaag tgtaagtgct 13680
ttgagatctt cagaggacta ttctgggttc tcagggtgtc tgagagccaa gggcaagagg 13740
gagatgacc ctcccattta gtctccccct cccttagccc accccccag cctagggtctg 13800
tgggtggggga agggagaggc tggatggagg ccagactggc agagacaggg gctttgtccc 13860
agctggtttc tgagccagga gatccggtg gaaagcccgt gccaggcaga aaggaaggct 13920
gggaagaagt gagaaggcag ccaaggcgg aggggagtg aggatgctaa gggtaaagag 13980
aagagtttcc ttataagtac tgggtgggta gggggaggtc aaggaggggt atagctagag 14040
agaagggtg catcaccag gttcagtcta ggaggcctc ctggaagagg ctgggtgggt 14100
atggtactca gggaggaagg ggcgggaagg aaaagttggc agggtcctgg ggctctgggt 14160
tcaaggaagg agtctggcac tgtgaagacc agagggaatg aagtatgata gcacctacca 14220
ctcatgctat aagcatttat tgagctccta cgggtgtgcct ggttctgtgc atctgtgcag 14280
cgcttatagg ataaaaggc ctctagaacc cggagcctca tcaccacca ggtgctgtcc 14340
tacaagttag gaaacaaagg cctacagagg ttaatgaatt agccttaagt cacacaggaa 14400
gttgactaga acccaggtct tggttccaag gaagatcct ctggtgggga gacagaatca 14460
aaaacaagg agttaacggt gaggttggga cagtgggctt cttggaccac catatgtgtg 14520
agtccacatg gatgtggtca ggagccgggg gaagtccatc ctaaagtcta accccagctt 14580
tcctcctcaa gtccctccac cagcctgagc atggccccc tgctcctgcc cctgctggta 14640
gccttggccc tggcccgggg ccctgtggcc ttagctgatg ccctggaagg ggacagctca 14700
ggtaagcaac cgcactcagc atcactgtct ctgtctcctg catctcctct atggaagagg 14760
gtggccttgg aggaccggg gagagatagg atagagggca ctgtgggaa tgatgtggtc 14820
tgggatgctt ggaaataagg gataagctgc tggctctggg tagggcaggc aaaattagtg 14880

ES 2 533 311 T3

gtaggactgc caaccctag ggcattgggac caatgaaggg ggctggaaga cagaacaggg 14940
 atagagtggg gagaaatccc aaaggtgagt ctgagggaaa ctgaggggaa actttaaggc 15000
 cagggctggg gccagcttag atctggagtg ggccccaggg agtcctggga tggtagctac 15060
 caggccactg tccacaggaa cagactggaa gatttgggga cagatctgga gagggagtgg 15120
 gatgggcctg gggcctaga ggcaagcatg tggggccctg ggagcagtgg tggctgggat 15180
 cctggggcgg gcttggagac caggtgggac cctgtggatc aggtgccaag ttctagccac 15240
 cggcctgccc gccacccac agaggaccgg gccttccacg tgcgcatcgc gggtagcga 15300
 cactgcagg gcgtgctggg cggcgcctc accatccctt gccacgttca ctacctacgg 15360
 ccgctgccgg gccaccgggc cgtgctgggc tccccgctgg tcaagtggac cttcctgtcc 15420
 gggggccgtg aggccgaagt attggtggct cgggggctgc gcgtcaaggt gagcgaggcc 15480
 taccgtttcc gtgtggcact gcctgcctac ccggcatcac tcaccgacgt gtccttgggtg 15540
 ctgagtgagc ttcggcccaa cgactccggc atctaccgct gcgaggtcca gcacggcata 15600
 gatgacagca gcgatgccgt ggaggtcaag gtcaaaggtg aggggcagga cccaggaagg 15660
 ttccccagg gtgggagccc acagtgtgag gggggagcaa atgctctgga aggcaccag 15720
 tg 15722

<210> 14

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Canis lupus familiaris

<220>

<221> fuente

<222> 1..336

<223> /mol_tipo = "ADN"/organismo = "Canis lupus familiaris"

10 <400> 14

ccttgctctc tctgctgcct ctaggaaccg acgcagagga ggcagcggta gcgtgacctt 60
 cccgagcccc ctgcgtccct ggacaggggg cggggggcgg cccggggagg agcggggcgg 120
 ggacgggcgg gggagtggag aaaggggttt tgtgcgagcc cggcggcccc gcgccctctt 180
 ccgaacgtcc tgcgggcccc gccctccctg cggccgcgca gtccctgccg cagtgcggccg 240
 cagccgcagg acggagcgtg gacccggagg agagcccgga ggaggctgca aacttggcgg 300
 tgcagcacc tcgcagcccc ggccgcctgc aggtag 336

<210> 15

<211> 98

ES 2 533 311 T3

<212> ADN
 <213> Canis lupus familiaris
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..98
 <223> /mol_tipo = "ADN"/organismo = "Canis lupus familiaris"
 <400> 15
 cctgagcatg gccccctgt tcctgcccct gctggtagcc ttggccctgg cccggggccc 60
 tgtggcotta gctgatgccc tggaagggga cagctcag 98

<210> 16
 10 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Canis lupus familiaris
 <220>
 <221> fuente
 15 <222> 1..375
 <223> /mol_tipo = "ADN"/organismo = "Canis lupus familiaris"
 <400> 16
 aggaccgggc cttccacgtg cgcacgcgcg gtgacgcacc actgcagggc gtgctgggcg 60
 ggcgccctcac catcccttgc cacgttcaact acctacggcc gctgccgggc caccggggccg 120
 tgctgggctc cccgcggggtc aagtggacct tcctgtccgg gggccgtgag gccgaagtat 180
 tgggtggctcg ggggctgcgc gtcaaggtga gcgaggccta ccgtttccgt gtggcactgc 240
 ctgcctaccg ggcacactc accgacgtgt ccctggtgct gactgagctt cggcccaacg 300
 actccggcat ctaccgctgc gaggtccagc acggcataga tgacagcagc gatgccgtgg 360
 aggtcaaggt caaag 375

<210> 17
 20 <211> 175
 <212> ADN
 <213> Canis lupus familiaris
 <220>
 <221> fuente
 25 <222> 1..175
 <223> /mol_tipo = "ADN"/organismo = "Canis lupus familiaris"
 <400> 17

ES 2 533 311 T3

gggtcgtctt tctctaccgg gaaggctctg cccgctatgc tttctctttc gctggggccc 60
aggaggcctg tgcccgcatt ggagcccga ttgccacccc ggagcagctc tatgccgcct 120
acctcggggg ctatgaacag tgtgatgctg gctggctatc tgaccagacc gtgag 175

<210> 18

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..25

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador de PCR múltiple de EFS1"/organismo = "secuencia artificial"

10 <400> 18

aaggtcttac acctgcaatg aatg 25

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..25

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador de PCR múltiple de EFS2"/organismo = "secuencia artificial"

20 <400> 19

agcaaatgta aagtcctgtg accat 25

<210> 20

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..25

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador de PCR múltiple de EFS3"/organismo = "secuencia artificial"

30 <400> 20

agttcacatt gtgctctctc tactg 25

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 5 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 1 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
 <400> 21
 cttctctcca gaaccatgct ctac 24
 <210> 22
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 15 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 1 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
 <400> 22
 acacagcaag taagtggcag agtt 24
 <210> 23
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 25 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 2 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
 <400> 23
 gagttaacgg tgaggtggg acagt 25
 <210> 24
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 35 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 2 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
 <400> 24
 cccacagtgc cctctatcct atctc 25

ES 2 533 311 T3

<210> 25
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 3 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 25

10 aagattggg gacagatctg gagag 25
<210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 3 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 26

20 cccaagaga gaaaggagt acaa 25
<210> 27
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 4 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 27

30 ctttctctt tggggtggac agact 25
<210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<222> 1..22

ES 2 533 311 T3

<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 4 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 28
ggctctggat ggttgacctg ag 22
<210> 29
5 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
10 <222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 5 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 29
gggtgtctct gcagaagaaa acaat 25
<210> 30
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
20 <222> 1..21
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 5 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 30
gaagacctct ggacagcacc g 21
<210> 31
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
30 <222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 6 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 31
ggcccagaga agccagccta 20
<210> 32
35 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 533 311 T3

<220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 6 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
5 <400> 32
gggaaacttc agagctcaag tctgt 25
<210> 33
<211> 25
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 7 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
15 <400> 33
ccacagggaa gatgagtgaatg 25
<210> 34
<211> 22
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..22
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 7 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
25 <400> 34
ccagcatcac tctggacacc tt 22
<210> 35
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 8 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
35 <400> 34
ctcaccctc acagcccctt 20
<210> 36

ES 2 533 311 T3

<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 8 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 36
ccagagatca tgtgacccag agctt 25
10 <210> 37
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 9 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 37
gtgatagctc ccaagacaag gagat 25
20 <210> 38
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <221> fuente
<222> 1..23
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 9 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 38
gcagggtcca ggcttcaggt cta 23
30 <210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 10 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"

ES 2 533 311 T3

<400> 39
ctctgctggc tctctggcat 20
<210> 40
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
10 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 10 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 40
tgagtgggag agagcaggtg a 21
<210> 41
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
20 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 11 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 41
acggacaggg aagcagggaa 20
<210> 42
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
30 <223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 11 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 42
gctggaggcag aagtgttgg 20
<210> 43
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 533 311 T3

<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 12 BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 43
5 tgggcctcca ctcctcatcc 20
<210> 44
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 12 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 44
15 ttacacacat gcggttggg tc 22
<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 13 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 45
25 atcccgggtc tccaggatca 20
<210> 46
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<221> fuente
<222> 1..23
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 13 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 46
35 gagcccaggg ctactgttgg ata 23
<210> 47
<211> 24

ES 2 533 311 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
5 <222> 1..24
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 14 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 47
ccagggcatg tgtttggatg agat 24
<210> 48
10 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
15 <222> 1..23
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 14 de BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 48
ccctcacgtg gtcacttct atg 23
<210> 49
20 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
25 <222> 1..22
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 1-2 de HAPLN2"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 49
gacattcccc acacacacca ag 22
<210> 50
30 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
35 <222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 1-2 de HAPLN2"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 50

ES 2 533 311 T3

cgctgttc gctcatagt aattg 25
<210> 51
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador directo de exón 3-5 de HAPLN2"/organismo = "secuencia artificial"
10 <400> 51
tgtctgccgg ctctccctaa 20
<210> 52
<211> 25
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "cebador reverso de exón 3-5 de HAPLN2"/organismo = "secuencia artificial"
20 <400> 52
aggatacaga cccatcctga agcac 25
<210> 53
<211> 46
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..46
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 1 de MPLA CFTRa"/organismo = "secuencia artificial"
30 <400> 53
gggtcccta aggggtggag ctccattgca atctacctag ccattg 46
<210> 54
<211> 54
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente

ES 2 533 311 T3

<222> 1..54
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 2 de MPLA CFTRa; grupo 5' fosfato"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 54
gcttatgct tctcttatac atgaggccgc ttctagattg gatcttgctg gcac 54

5 <210> 55
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

10 <221> fuente
<222> 1..39
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 1 de PR de MPLA BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 55
gggttccta agggttggag gattgggtgc cctgtttgg 39

15 <210> 56
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

20 <221> fuente
<222> 1..65
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 2 de PR de MPLA BCAN; grupo 5' fosfato"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 56
ctcgccacag ggagccttct ggcatttcc aagtggtcac tgtctagatt ggatcttgct 60
ggcac 65

25 <210> 57
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

30 <221> fuente
<222> 1..49
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 1 de exón 1 de MPLA BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 57
gggttccta agggttggac tggcttagcc tctaggaacc gacgcagag 49

35 <210> 58

ES 2 533 311 T3

<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <221> fuente
<222> 1..72
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 2 de exón 1 de MPLA; grupo 5' fosfato"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 58
 gagggcagcgg tagcgtgaca ggctggggaa gagcaaaaat cacggagtct ctagattgga 60
 tcttgctggc ac 72
10 <210> 59
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <221> fuente
<222> 1..51
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 1 de exón 2 de MPLA BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 59
gggtcccta aggggtggac tatgcaaggt gtggccttag ctgatgcct g 51
20 <210> 60
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <221> fuente
<222> 1..64
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 2 de exón 2 de MPLA BCAN; grupo 5' fosfato"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 60
 gaaggggaca gctcaggtaa gcaggagccc gaggggtgtc ctctagattg gatcttgctg 60
30 gcac 64
<210> 61
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>

ES 2 533 311 T3

<221> fuente
<222> 1..47
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 1 de exón 3 de MPLA BCAN;"/organismo = "secuencia artificial"
<400> 61
5 gggttcccta agggttggag ccatctaccg ctgcgaggtc cagcacg 47
<210> 62
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<221> fuente
<222> 1..49
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 2 de exón 3 de MPLA BCAN; grupo 5' fosfato"/organismo = "secuencia artificial"
15 <400> 62
gcatagatga cagcagcgat gccgtatcta gattggatct tgctggcac 49
<210> 63
<211> 43
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..43
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 1 de exón 4 de MPLA BCAN"/organismo = "secuencia artificial"
25 <400> 63
gggtcccta agggttggag gggctatgaa cagtgtgatg ctg 43
<210> 64
<211> 45
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..45
<223> /mol_tipo = "ADN"/nota = "sonda 2 de exón 4 de MPLA BCAN; grupo 5' fosfato"/organismo = "secuencia artificial"
35 <400> 64
gctggctatc tgaccagacc gttctagatt ggatcttgcg ggcac 45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la predisposición genética para síndrome de caída episódica en un mamífero **caracterizado porque** la presencia o ausencia de una deleción en el gen brevican (*BCAN*) se detecta en una muestra.
- 5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la deleción comprende al menos uno de los siguientes elementos de *BCAN*: secuencias reguladoras, exón 1, exón 2 y/o exón 3.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la deleción comprende al menos exón 1, exón 2 y exón 3.
- 10 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la deleción es del tamaño de 15,7 kbases.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la deleción comienza 1,56 kb corriente abajo de *HAPLN2* y termina 85 pb corriente abajo del exón 3 de *BCAN*.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 to 5, **caracterizado porque** la deleción conduce a una secuencia de acuerdo con la SEC ID N.º: 1 o la SEC ID N.º: 2.
- 15 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 to 6, **caracterizado porque** el mamífero es un perro.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el mamífero es un Cavalier King Charles spaniel.

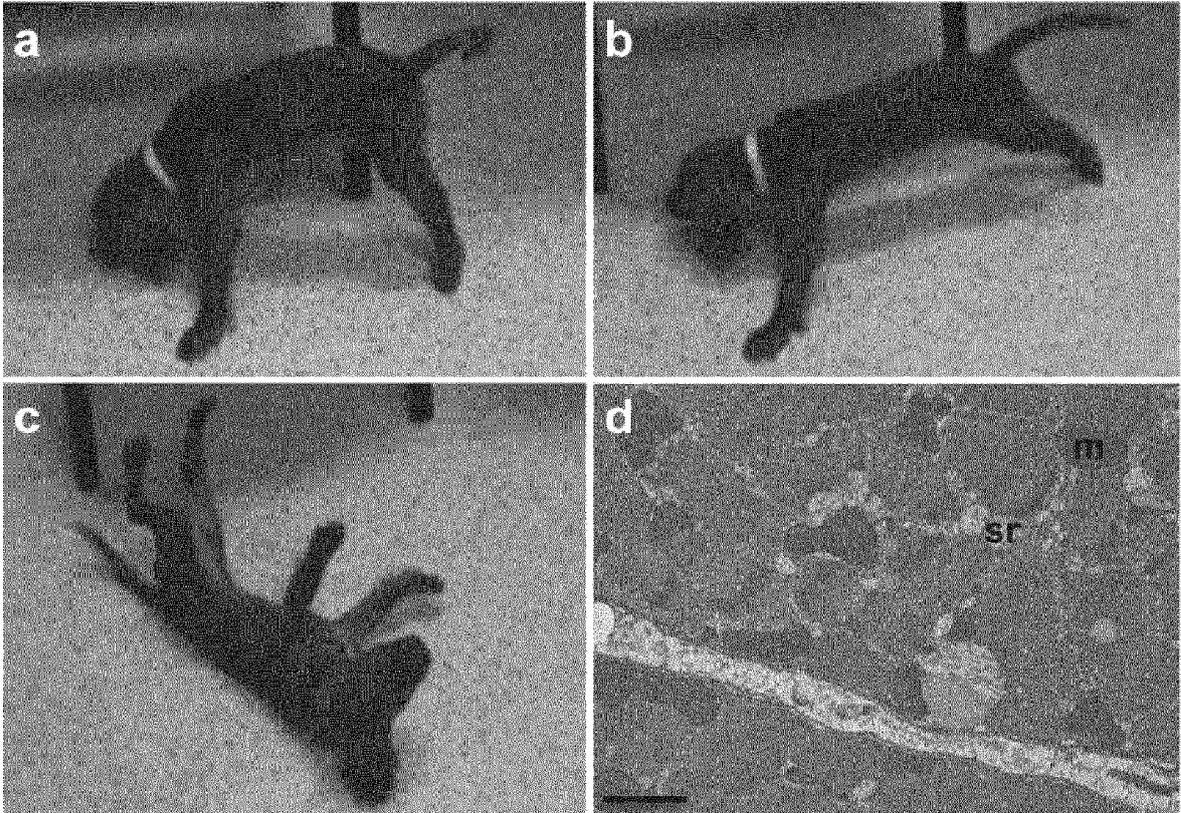


Fig. 1

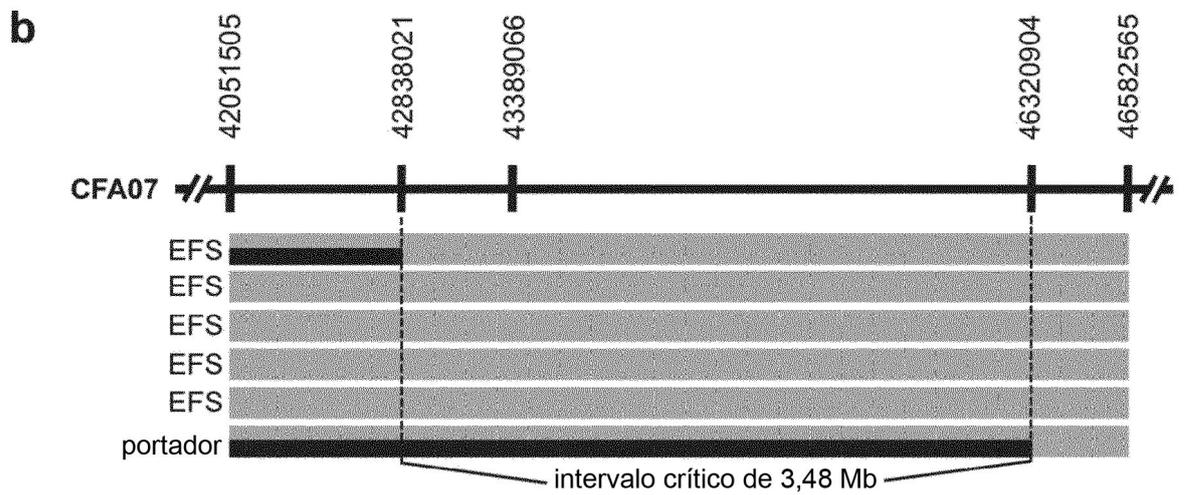
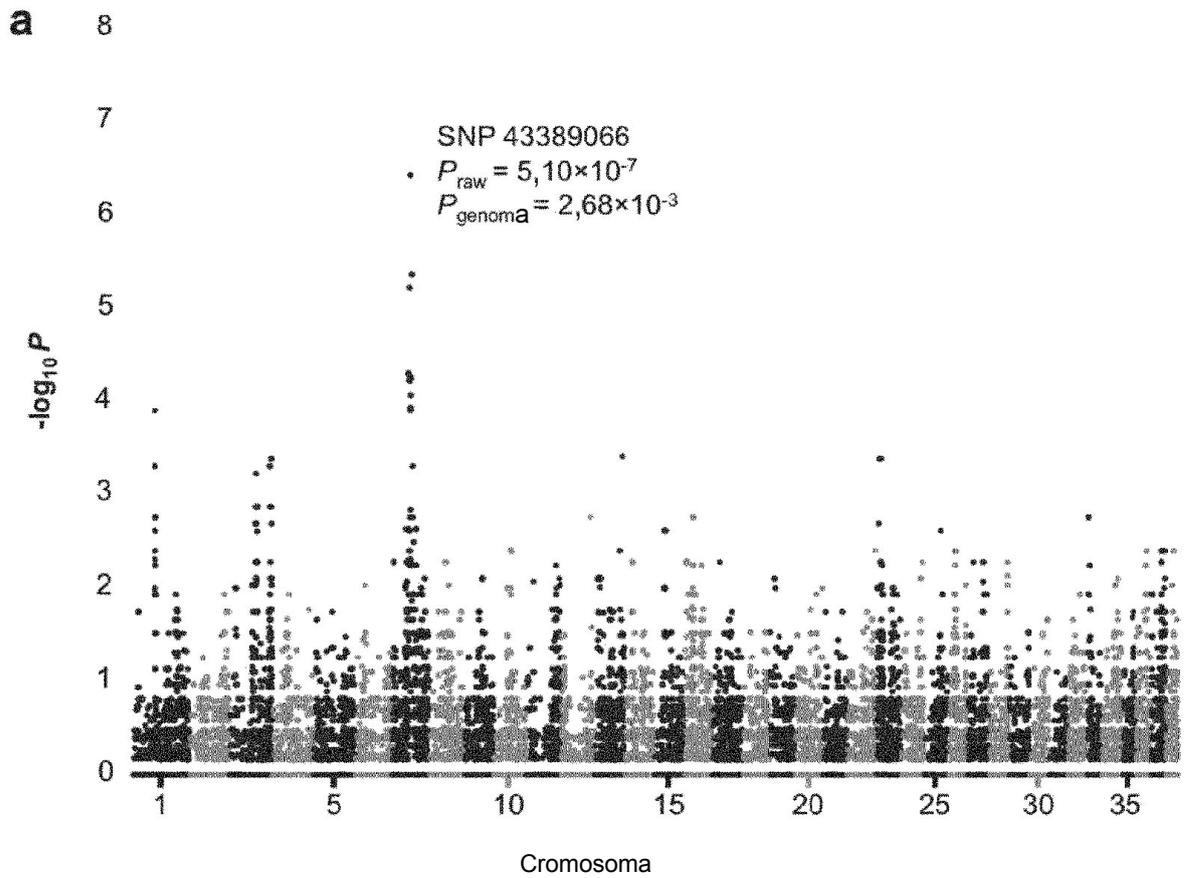


Fig. 2

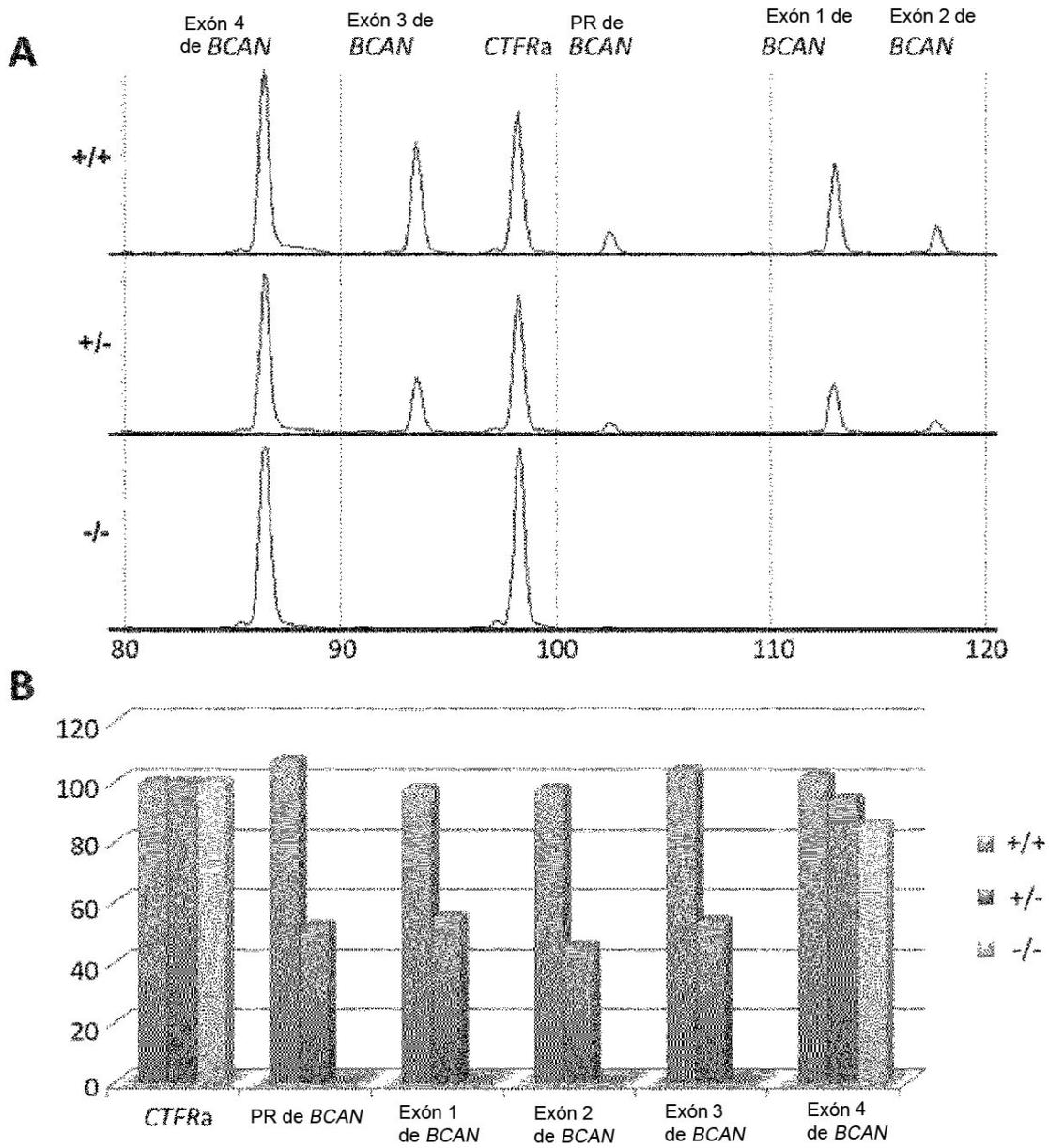


Fig. 5

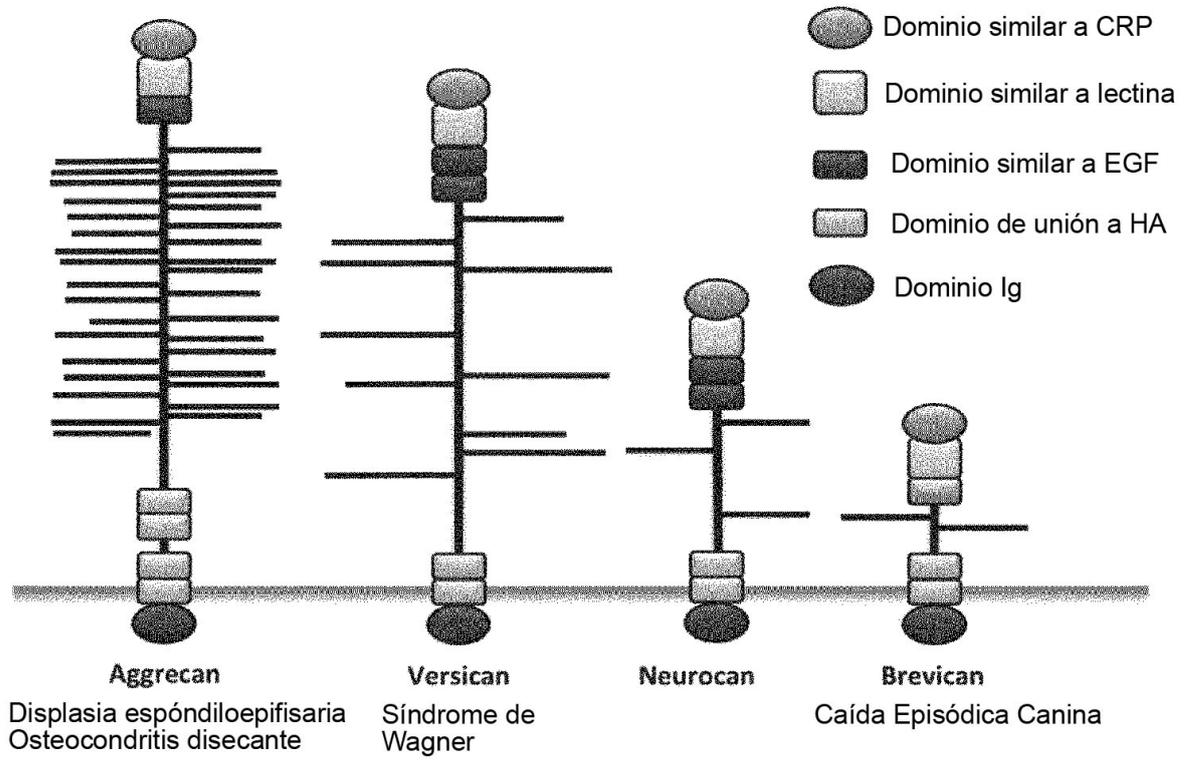


Fig. 6