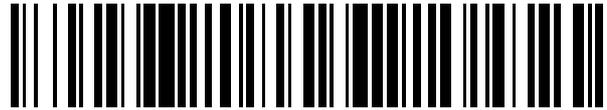


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 578**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0735** (2010.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2008** **E 08796270 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2185695**

54 Título: **Diferenciación de las células madre de embriones humanos**

30 Prioridad:

**18.07.2007 US 779311**

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

**09.06.2015**

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)  
1000 GIBRALTAR DRIVE  
MILPITAS, CA 95035, US**

72 Inventor/es:

**REZANIA, ALIREZA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 537 578 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

Diferenciación de las células madre de embriones humanos

5 **ÁMBITO DE LA INVENCION**

Esta es, en parte, la continuación de la solicitud de EE.UU. nº 11/736.908, presentada el 18 de abril del 2007 que reclama la prioridad para: la solicitud provisional de EE.UU. nº 50/745.899, presentada el 28 de abril del 2006; la solicitud provisional de EE.UU. nº 50/827.695, presentada el 30 de abril del 2006 y la solicitud provisional de EE.UU. nº 50/882.670, presentada el 29 de diciembre del 2006.

La presente invención se refiere a los métodos para promover la diferenciación de las células madre pluripotentes. La presente invención se refiere, en particular, al método mejorado para la formación del endodermo pancreático, de células que expresan la hormona pancreática y de la hormona pancreática que segrega células. La presente invención se refiere también a los métodos para promover la diferenciación de las células madre pluripotentes, sin hacer uso de una monocapa sustentadora celular.

**ANTECEDENTES**

Los avances en la terapia de sustitución celular para la diabetes *mellitus* tipo 1 y la escasez de islotes de Langerhans trasplantables han hecho que el interés se centre en el desarrollo de fuentes de células productoras de insulina o de células  $\beta$ , apropiadas para los injertos. Una manera de enfocarlo consiste en la generación de células  $\beta$  funcionales a partir de células madre pluripotentes como, por ejemplo, células madre embrionarias.

En el desarrollo vertebrado embrionario, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células compuestas de tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Tejidos como, por ejemplo, el tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado se desarrollarán a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso consiste en la formación de un endodermo definitivo. Las células del endodermo definitivo expresan un número de marcadores como, por ejemplo, HNF-3 beta, GATA4, Mix11, CXCR4 y Sox-17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en el interior del endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen Pdx1 de la homeosecuencia pancreático duodenal. En ausencia de Pdx1, el páncreas no consigue desarrollar la formación de esbozos ventrales ni dorsales. Por tanto, la expresión de Pdx1 marca una fase crítica en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene tejido exocrino y tejido endocrino, entre otros tipos de células. Ambos tejidos surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

Las células que soportan las propiedades de los islotes se han derivado, según se informa, de células embrionarias del ratón. Por ejemplo, Lumelsky y otros autores (*Science* 292,1.389, 2001) señalan que la diferenciación de las células madre de embriones de ratón en estructuras secretoras de insulina es similar a la de los islotes pancreáticos. Soria y otros autores (*Diabetes* 49, 157, 2000) señalan que las células secretoras de insulina derivadas de las células madre de embriones de ratón normalizan la glucemia en ratones sometidos a la diabetes inducida por estreptozotocina.

En un ejemplo, Hori y otros autores (*PNAS*, 99-16.105, 2002) divulgan que el tratamiento de las células madre de embriones de ratón con inhibidores de fosfoinositido 3-quinasa (LY294002) produjo células que se parecían a las células  $\beta$ .

En otro ejemplo, Blyszczuk y otros autores (*PNAS*, 100-998, 2003) señalan que la generación de células productoras de insulina a partir de células madre de embriones de ratón expresan, constitutivamente, el Pax4.

Micallef y otros autores señalan que el ácido retinoico puede regular la implicación de las células madre embrionarias en la formación de endodermos de Pdx1 pancreático positivos. El ácido retinoico es el más efectivo a una expresión inducida de Pdx1 cuando se añade a cultivos en el día 4 de la diferenciación de la célula madre embrionaria, durante un período que se corresponde con el final de la gastrulación en el embrión (*Diabetes* 54-301, 2005).

Miyazaki y otros autores señalan que una línea de células madre de embrión de ratón sobre expresa el Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 potencia claramente la expresión de los genes de la insulina, somatostatina, glucoquinasa, Neurogenin 3, P48, Pax6 y HNF-6 en las células diferenciadas resultantes (*Diabetes* 53-1.030, 2004).

Skoudy y otros autores señalan que la activina A (miembro de la superfamilia TGF $\beta$ ) activa la expresión de los genes exocrinos pancreáticos (p48 y amilasa) y de los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre de

embrión de ratón. Se observó que se alcanzaba el máximo efecto utilizando para ello la activina A InM. También observaron que la expresión del nivel de insulina y de mRNA de Pdx1 no se veían afectados por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con FGF7 de 3nM dio como resultado un incremento en el nivel de la transcripción Pdx1 (*Biochem, J.* 379-749, 2004).

5 Shiraki y otros autores estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que potencian, específicamente, la diferenciación de las células madre embrionarias en el interior de las células de Pdx1 positivas. Observaron que la reproducibilidad de TGFβ2 producía una mayor proporción de células de Pdx1 positivas (*Genes Cells*, Jun. 2005; 10(6)-503-16).

10 Gordon y otro autores demostraron la inducción de Brachyury+/HNF-3beta+ células del endodermo a partir de células madre de embriones de ratón, en ausencia de suero y en presencia de activina, junto con un inhibidor de señalización de Wnt (EE. UU. 2006/0003446A1).

15 Gordon y otro autores (*PNAS*, vol. 103, página 16.806, 2006) manifiestan que "se requirieron, simultáneamente, Wnt y TGFβ/Nodal/señalización de activina para la generación de la anterior línea primitiva".

Sin embargo, el desarrollo del modelo de células madre de embriones de ratón puede no mimetizar exactamente el programa de desarrollo en mamíferos superiores como, por ejemplo, los seres humanos.

20 Thomson y otros autores aislaron las células madre embrionarias de los blastocitos humanos (*Science* 282,114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y sus colaboradores derivaron gérmenes embrionarios humanos (hEG) y líneas celulares a partir del tejido gonadal fetal (Shamblott y otros autores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE. UU. 95, 13.726, 1998). A diferencia de las células madre de embriones de ratón a las que se les impidió la diferenciación simplemente mediante el cultivo con el factor inhibidor de la leucemia (LIF), las células madre de embriones humanos deben conservarse bajo unas condiciones muy especiales (Pat. de EE. UU. nº 6.200.806; WO 99/20.741; WO 01/51.616).

25 D'amour y otros autores describen la producción de cultivos enriquecidos con células madre de embriones humanos derivadas del endodermo definitivo, en presencia de una elevada concentración de activina y baja de suero (D'amour KA y otros autores, 2005). Trasplantar estas células bajo la cápsula renal de los ratones dio como resultado la diferenciación en el interior de más células maduras con las características de algunos órganos endodérmicos. Las células madre de embriones humanos derivadas de las células del endodermo definitivo pueden diferenciarse mejor en el interior de células de Pdx1 positivas tras la adición de FGF10 (EE. UU. 2005/0266554A1)

30 D'amour y otros autores (*Nature Biotechnology-24*, 1.392-1.401 (2006) manifiestan: " hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte las células madre de embriones humanos (hES) en células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas: insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso mimetiza *in vivo* la organogénesis pancreática conduciendo las células a través de varias etapas que se parecen al endodermo definitivo, endodermo del tubo intestinal, endodermo pancreático y al precursor endocrino, en ruta hacia las células que expresan hormonas endocrinas".

35 En otro ejemplo, Fisk y otros autores señalan un sistema para producir células de los islotes pancreáticos a partir de células madre de embriones humanos (EE. UU. 2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Primero, las células madre de embriones humanos se diferenciaron del endodermo utilizando para ello una combinación de butirato y activina A. Luego, se cultivaron las células con los antagonistas de TGFβ como, por ejemplo, Noggin combinado con EGF o betacelulina para generar células de Pdx1 positivas. La diferenciación terminal se indujo por nicotinamida.

40 En un ejemplo, Benvenistry y otros autores manifiestan: "concluimos que la sobre expresión de Pdx1 potenciaba la expresión de los genes pancreáticos enriquecidos y que la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que solo están presentes *in vivo*" (Benvenistry y otros autores, *Stem Cells*, 2006, 24-1.923-1.930).

45 En consecuencia, sigue faltando una necesidad significativa para desarrollar las condiciones que permitan establecer líneas de células madre pluripotentes que puedan expandirse para así responder a las necesidades clínicas actuales, mientras que se mantiene el potencial para su diferenciación en el interior de las células pancreático endocrinas, células que expresan hormonas pancreáticas o células que segregan hormonas pancreáticas. Hemos adoptado una manera alternativa de enfocarlo para mejorar la eficiencia de la diferenciación de células madre de embriones humanos hacia células pancreático endocrinas.

60 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino y que comprende las fases de:

65 a. cultivo de las células madre pluripotentes,

- b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio químicamente definido que se compone del medio suplementado con B27 y mediante el tratamiento de las células pluripotentes con activina A.
- 5 c. diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto o ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto y
- 10 d. diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con un inhibidor de la gamma secretasa.
- La invención también proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y que comprende las fases de:
- 15 a. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio químicamente definido que se compone del medio suplementado con B27,
- b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, mediante el tratamiento de las células pluripotentes con activina A y
- 20 c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto o ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.
- 25 La invención también proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores que son característicos del linaje del endodermo definitivo y que comprende las fases de:
- a. recubrimiento de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y
- 30 b. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio químicamente definido que se compone del medio suplementado con B27 y tratamiento de las células pluripotentes con activina A.

#### RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

- 35 En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes y que comprende las fases de:
- a. cultivo de las células madre pluripotentes y
- b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,
- 40 c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y
- d. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino.
- 45 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se diferencian de las células madre pluripotentes mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes con cualquiera de los siguientes métodos:
- a. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A, en ausencia de suero y, luego, cultivar las células con la activina A y el suero de una concentración diferente o
- 50 b. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A, en ausencia de suero y, luego, cultivar las células con la activina A y con suero de otra concentración o
- c. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y un ligando Wnt, en ausencia de suero y, luego, extraer el ligando Wnt y cultivar las células con activina A, con suero o
- 55 d. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt o
- e. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego, cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y, luego, cultivar las células madre pluripotentes con activina A, en un segundo medio de cultivo que contiene suero o
- 60 f. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y, luego, cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un segundo medio de cultivo que contiene suero de una concentración diferente o
- 65 g. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio suplementado con B27 y que contiene un ligando Wnt y activina A o

h. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular en un medio suplementado con B27 y que contiene activina A.

5 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con cualquiera de los siguientes métodos:

- 10 a. tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con un factor de crecimiento de fibroblasto y un inhibidor de la vía de señalización Hedgehog, luego extraer el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblasto y el inhibidor de la vía de señalización Hedgehog y, posteriormente, cultivar las células en un medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblasto y el inhibidor de la vía de señalización Hedgehog o
- 15 b. tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico y, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto o
- c. tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico, luego extraer el ácido retinoico y, posteriormente, tratar las células con al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

20 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino se diferencian de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con cualquiera de los siguientes métodos:

- 25 a. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene DAPT y Exendin-4, luego extraer el medio que contiene DAPT y Exendin-4 y, posteriormente, cultivar las células en un medio que contiene Exendin-1, IGF-1 y HGF o
- b. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene Exendin-4, luego extraer el medio que contiene Exendin-4 y, posteriormente, cultivar las células en un medio que contiene Exendin-1, IGF-1 y HGF o
- 30 c. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene DAPT y Exendin-4 ó
- d. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene Exendin-4 o
- e. tratar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización Notch.

35 En una materialización, la presente divulgación describe un método para tratar a un paciente que sufre diabetes y que comprende las fases de:

- a. cultivo de las células madre pluripotentes,
- 40 b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,
- c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático,
- d. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células del linaje celular  $\beta$  y
- 45 e. implantación de las células del linaje celular  $\beta$  en el paciente.

#### 45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 El panel de la **figura 1** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo: CXCR4, GATA4, HNF-3beta, Mix11 y Sox-17 en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo el tratamiento con 100ng/ml de activina A durante dos, cinco y ocho días. Se ensayó la expresión de los marcadores del endodermo definitivo al nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel b muestra la expresión de los marcadores Cerberus y Otx-I del endodermo anterior y los genes Hox en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo el tratamiento con 100 ng/ml de activina A durante tres y cinco días.

55 La **figura 2** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo el tratamiento con 100 ng/ml de activina A durante cinco días. La expresión de los marcadores del endodermo definitivo se detectó mediante inmunohistoquímica. El panel (a) muestra la expresión de Sox-17. El panel (b) muestra la expresión de HNF-3beta. El panel (c) muestra la expresión de Oct3/4.

60 La **figura 3** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo un protocolo de diferenciación escalonada. La expresión de los marcadores del endodermo definitivo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de GATA4. El panel (b) muestra la expresión de Sox-17. El panel (c) muestra la expresión de HNF-3beta. El panel (d) muestra la expresión de Mix11. Los datos con la indicación 'AA' aluden a un tratamiento con activina A durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o

siete días (7 d). Los datos con la indicación 'UT' aluden a cultivos controles no tratados durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d).

5 La **figura 4** muestra la expresión de marcadores extraembrionarios del endodermo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo un protocolo de diferenciación escalonada. La expresión de los marcadores extraembrionarios del endodermo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel (a) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de AFP. El panel (b) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de Sox-17. Los datos con la indicación 'AA' aluden a un tratamiento con activina A durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d). Los datos con la indicación 'UT' aluden a cultivos controles no tratados durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d).

15 La **figura 5** muestra la expresión de marcadores del mesodermo y ectodermo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo un protocolo de diferenciación escalonada. La expresión de los marcadores del mesodermo y ectodermo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel (a) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de Brachyury. El panel (b) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de Zic 1. Los datos con la indicación 'AA' aluden a un tratamiento con activina A durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d). Los datos con la indicación 'UT' aluden a cultivos controles no tratados durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d).

25 La **figura 6** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo: Brachyury (panel a), CXCR4 (panel b), Mix11 (panel c), Sox-17 (panel d), HNF-3beta (panel e), Oct4 (panel f), en la línea H7 de células madre de embriones humanos y siguiendo un tratamiento con 100 ng/ml de activina A durante uno, tres, cinco y siete días. La expresión de marcadores del endodermo definitivo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias.

30 La **figura 7** muestra la expresión de marcadores del endodermo definitivo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo definitivo se detectó mediante inmunohistoquímica. Los paneles (a) y (b) muestran la expresión de Sox-17. Los paneles (c) y (d) muestran la expresión de HNF-3beta. Los paneles (e) y (f) muestran la expresión de GATA4. Los paneles (b), (d) y (f) muestran la contratinción de los núcleos con DAPI. Las columnas con la indicación 'tratado' aluden al tratamiento con activina A (100 ng/ml) durante cinco días. Las columnas con la indicación 'no tratado' aluden a controles no tratados.

35 La **figura 8** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de Pdx1. El panel (b) muestra la expresión de GLUT-2. El panel (c) muestra la expresión de PTF1.

40 La **figura 9** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un segundo protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se detectó mediante inmunohistoquímica. El panel (a) muestra la expresión de Pdx1 en el control no tratado y el panel (b) muestra la expresión de Pdx1 en el cultivo tratado mediante el protocolo de diferenciación escalonada.

45 La **figura 10** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un tercer protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de NeuroD1. El panel (b) muestra la expresión de NGN-3. El panel (c) muestra la expresión de insulina. El panel (d) muestra la expresión de Hes-1, se normaliza el nivel de expresión para las células del endodermo pancreático.

50 La **figura 11** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de Nkx2.2. El panel (b) muestra la expresión de Pdx1.

55 La **figura 12** muestra, con cada párrafo (P0, P1 y P2), la expresión de Pdx1 en células en cultivo. La expresión de Pdx1 se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias.

60 La **figura 13** muestra la expresión de marcadores de hepatocitos en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un tercer protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores

de hepatocitos se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de AFP. El panel (b) muestra la expresión de albúmina.

- 5 La **figura 14** muestra la expresión de marcadores de pluripotencia en la línea H9 de células madre de embriones humanos. La expresión de los marcadores de pluripotencia se ensayó mediante inmunohistoquímica. El panel (a) muestra la expresión de Oct4. El panel (b) muestra la expresión de fosfatasa alcalina.
- 10 La **figura 15** muestra el cariotipo de la línea H9 de células madre de embriones humanos. El cariotipo se determinó en células, párrafo número P36, que se cultivaron en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón.
- La **figura 16** representa el esquema de un protocolo de diferenciación en esta invención, donde las células madre de embriones humanos se diferencian en el interior del endodermo definitivo, en un sistema de alimentación libre.
- 15 La **figura 17** representa el perfil FACS de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 44, cultivado en concentraciones variables de Matrigel y expuesto, durante cinco días, a baja concentración de suero (0,5-2%) y a una alta concentración de activina A (100 ng/ml). La expresión del marcador CXCR4 (CD 184) del endodermo definitivo se muestra en el eje Y y la expresión del marcador CD9 de ES se muestra en el eje X.
- 20 La **figura 18** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR para los marcadores del endodermo definitivo a partir de los cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 44, cultivada en una dilución de Matrigel (■) 1:10, dilución de Matrigel (■) 1:20 ó dilución de Matrigel (□)1:30 y expuesta al protocolo de diferenciación divulgado en la referencia 14. La inducción cruzada está vinculada con las células indiferenciadas de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 44 y cultivadas en un medio acondicionado, utilizando para ello fibroblastos embrionarios de ratón.
- 25 La **figura 19** muestra los diagramas de dispersión para la expresión génica global en células madre pluripotentes e indiferenciadas y las células del endodermo definitivo obtenidas a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes. Los datos mostrados proceden de cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 44, cultivados en fibroblastos embrionarios de ratón (panel de la derecha) y cultivados en Matrigel (panel de la izquierda), párrafo 83.
- 30 La **figura 20** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS en el quinto día para: la línea H1 de células madre de embriones humanos (panel a), la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel b) y la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel c), cultivadas en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón y expuestas al protocolo de diferenciación del endodermo definitivo, divulgado en la referencia 4.
- 35 La **figura 21** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR de la expresión de los marcadores del endodermo definitivo ya indicados, en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel a) y de la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel b), cultivados en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.
- 40 La **figura 22** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS en el quinto día para: la línea H1 de células madre de embriones humanos (panel a), la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel b) y la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel c), cultivados en Matrigel (dilución de 1:30) y expuestos al protocolo de diferenciación del endodermo definitivo, divulgado en la referencia 4.
- 45 La **figura 23** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR de la expresión de los marcadores del endodermo definitivo ya indicados, en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel a), la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel b) y la línea H1 de células madre de embriones humanos (panel c). Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas. Las células se trataron según los métodos divulgados en la referencia 4.
- 50 La **figura 24** representa la etapa de contraste de imágenes de cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 46, en presencia de 100 ng/ml de activina A (panel a) ó 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml Wnt-3a (panel b). Las células se trataron durante cinco días.
- 55 La **figura 25** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos, párrafo 44 (paneles a y b) y H9, párrafo 46 (paneles c y d), siguiendo el tratamiento según los métodos divulgados en la referencia 4. Los paneles b y d muestran el efecto de 20 ng/ml Wnt-3a en la expresión del CXCR4. Los paneles a y c muestran la expresión del CXCR en ausencia de Wnt-3a. Los resultados se obtuvieron cinco días después del tratamiento.
- 60 La **figura 26** demuestra, en tiempo real, los datos de la PCR para la expresión de los genes indicados en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel a) y H9 (panel b). Los cultivos se trataron con el protocolo de diferenciación divulgado en la referencia 4. También se examinaron los efectos de los agonistas de
- 65

Wnt; Wnt-3a (20 ng/ml), Wnt-5a (20 ng/ml), Wnt-7a (20 ng/ml), tal y como se indica en los paneles. Las células se trataron durante cinco días. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.

5 La **figura 27** representa la expresión del CXCR4 en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 46, mediante FACS, cinco días después del tratamiento. El panel (a) representa la expresión del CXCR4 en ausencia de Wnt-3a. El panel (b) representa la expresión del CXCR4 siguiendo el tratamiento con 10 ng/ml de Wnt-3a. El panel (c) representa la expresión del CXCR4 siguiendo el tratamiento con 20 ng/ml de Wnt-3a y el panel (d) representa la expresión del CXCR4 siguiendo el tratamiento con 50 ng/ml de Wnt-3a.

10 La **figura 28** representa la expresión de los marcadores definitivos ya indicados, en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, tras cinco días de tratamiento. Los resultados se muestran como un incremento en la expresión con respecto a las células indiferenciadas, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR. El panel (a) muestra el efecto de 10, 20 y 50 ng/ml de Wnt-3a en la expresión de los genes marcadores del endodermo definitivo ya indicados. El panel (b) muestra el efecto de 1,5 ó 10 ng/ml de Wnt-3a (etiquetas del eje x: 10, 5, 1) en la expresión en Goosecoid (■) y la expresión del CXCR4 (□), dos (2 d) y cinco días (5 d) después del tratamiento. El panel (c) muestra el efecto de 1,5 ó 10 ng/ml de Wnt-3a en el número de célula, dos (□) o cinco días (■).

15 La **figura 29** representa la expresión del CXCR4 en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, mediante FACS y siguiendo un tratamiento de cinco días con el protocolo de diferenciación divulgado en la referencia 4. Las células se cultivaron en ausencia de Wnt-3a o del inhibidor de GSK-3B (panel a), 20 ng/ml de Wnt-3a durante todo el período de cinco días (panel b), 1000 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel c), 500 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel d), 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel e), 10 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel f), 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los días 1 y 2 (panel g), 10 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los días 1 y 2 (panel h).

20 La **figura 30** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo mediante PCR y en tiempo real. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas. El panel (a) muestra los datos obtenidos a partir de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 48, tratadas con el protocolo del endodermo definitivo divulgado en la referencia 4 que contiene Wnt-3a o el inhibidor de GSK-3B, en las concentraciones y los tiempos indicados. El panel (b) muestra los datos obtenidos a partir de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 46, tratadas con el protocolo del endodermo definitivo divulgado en la referencia 4 que contiene Wnt-3a o el inhibidor de GSK-3B, en las concentraciones y los tiempos indicados.

25 La **figura 31** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS para las líneas de células madre de embriones humanos utilizadas en la presente invención. Los paneles (a-d) muestran los datos obtenidos a partir de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 49. Los paneles (e-f) muestran los datos obtenidos a partir de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo número 46. Los datos se obtuvieron en los cinco días posteriores al tratamiento. Las células se trataron en las siguientes condiciones: panel (a): 10 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días; panel (b): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días; panel (c): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días; panel (d): 10 ng/ml de activina A durante los cinco días más 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días; panel (e): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días y panel (f): 10 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días.

30 La **figura 32** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 49, tratadas con 10, 50 ó 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (Oct4); panel (b): Sox-17 y GATA4. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.

35 La **figura 33** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS para la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 53. Los datos se obtuvieron en los cinco días posteriores al tratamiento. Las células se trataron en las siguientes condiciones: panel (a): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días y 25 ng/ml de BMP-4 durante los días 3 y 5 ; panel (b): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días; panel (c): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días; panel (d): 20 ng/ml de de Wnt-3a + 25 ng/ml de BMP-4 durante los cinco días; panel (e): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a + 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días y panel (f): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 25 ng/ml de BMP-4 durante los cinco días. Para todos los paneles, el eje X representa la expresión de CD9 y el eje Y representa la expresión del CXCR4 (CD184).

65

- 5 La **figura 34** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo 46, tratadas con 10 ó 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a ó 100 nM del inhibidor de GSK-3B. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC y POU5F (Oct4); panel (b): Sox-17, HNF-3B y GATA4. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.
- 10 La **figura 35** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 49, tratadas con 50 ó 100 ng/ml de activina A más 10 ó 100 nM del inhibidor de GSK-3B. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (Oct4); panel (b): Sox-17 y GATA4. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.
- 15 La **figura 36** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 53, tratadas con combinaciones de activina A , Wnt-3a, inhibidor de GSK-3 y BMP-4, durante cinco días. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y Sox-7; panel (b): Sox-17, HNF-3B y GATA4.
- 20 La **figura 37** representa el porcentaje de la expresión del CXCR4, determinada mediante FACS en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, tratadas en las condiciones enumeradas en la referencia 22.
- 25 La **figura 38** representa la expresión de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, mediante FACS, en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, cultivadas en fibronectina (panel a) o Matrigel <sup>TM</sup> (panel b).
- 30 La **figura 39** representa la expresión de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR, en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, cultivadas en fibronectina( □) o en una dilución de factor de crecimiento reducido Matrigel (■) 1:10.
- 35 La **figura 40** representa el efecto de varias concentraciones de Matrigel en presencia de baja concentración de suero, 100 ng/ml de activina A y 20 ng/ml de Wnt-3a, en la diferenciación de células madre de embriones humanos en el interior del endodermo definitivo. Las células se trataron según los métodos divulgados en la referencia 4. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de los genes ya indicados, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR.
- 40 La **figura 41** representa la función de Wnt-3a en la formación del endodermo definitivo mediante las células madre de embriones humanos conservadas en Matrigel pero diferenciadas en fibroblastos embrionarios de ratón. Los paneles (a-d) muestran, en tiempo real, los datos de la PCR para los genes ya indicados. Los paneles (e-g) muestran los datos del FACS para las condiciones ya indicadas.
- 45 La **figura 42** muestra la diferenciación de las células madre de embriones humanos cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con Matrigel <sup>TM</sup> para el endodermo definitivo, siguiendo el tratamiento con el inhibidor de Wnt DKK-1. Los resultados mostrados son la expresión de los genes ya indicados, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR en las células H9 tratadas según los métodos divulgados en la referencia 4, en presencia de 20 ng/ml de Wnt-3a más 100 ng/ml de DKK-1(DE + DKK-1) o en ausencia de DKK-1 (DE).
- 50 La **figura 43** muestra la tinción de inmunofluorescencia de los marcadores del endodermo definitivo en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con Matrigel y diferenciadas en baja concentración de suero más 100 ng/ml de activina A sin (panel a) o con (panel b) 20 ng/ml de Wnt-3a Ecad=E-cadherina, NCAM=N-cadherina.
- 55 La **figura 44** muestra la diferenciación de la línea SA002 de células madre de embriones humanos, párrafo 38, en el interior del endodermo definitivo. Las células se trataron durante cinco días en las condiciones ya indicadas y la expresión génica se determinó, en tiempo real, mediante PCR para los genes ya indicados en los paneles.
- 60 La **figura 44** muestra la expresión del CXCR4 mediante FACS en la línea SA002 de células madre de embriones humanos, párrafo 38, siguiendo el tratamiento con 100 ng/ml de activina A (panel a), 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml de Wnt-3a (panel b) ó 100 ng/ml de activina A + 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B (panel c). Las células se trataron durante cinco días.
- 65 La **figura 46** muestra la diferenciación de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo 55, en el interior del endodermo definitivo, en sustrato de cultivo de tejido recubierto con suero humano. Las células se trataron en las condiciones ya indicadas y la expresión génica se determinó, en tiempo real, mediante PCR para los genes indicados en los paneles.
- La **figura 47** muestra la diferenciación de los cultivos de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo 54, en sustrato de cultivo de tejido recubierto con Matrigel <sup>TM</sup> para el endodermo definitivo. Se examinaron

los efectos de varios inhibidores GSK-B siguiendo un protocolo DE de cinco días. Se evaluaron los siguientes inhibidores GSK-3B, a 100 nM, durante los dos primeros días del tratamiento: GSK-3B, VIII, IX, XI y XII.

5 La **figura 48** muestra la expresión de AFP (panel a), Pdx1 (panel b), Cdx-2 y GLUT-2 (panel c) y HNF-3beta, HNF-3beta, HNF-6 y somatostatina (panel d) en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 49, cultivadas y tratadas según los métodos divulgados en la referencia 4, en presencia de 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días de tratamiento. Se siguió el tratamiento de manera que las células se trataron durante tres días adicionales con 2% de FBS más 1 mM de ácido retinoico, 0,1 a 1mM TTNPB (4[(E)- 2-(5, 6, 7, 8 tetrahidro- 5, 5, 8, 8- tetrametilo-2- naftalenilo) -1 propenilo] ácido benzoico, ácido arotinoide ó 0,1 mM AM-580 (4- [(5, 6, 7, 8- tetrahidro- 5, 5, 8, 8- tetrametilo-2- naftalenilo) carboxamida] ácido benzoico). Después, las células se trataron durante tres días adicionales con 2% de FBS más 20 ng/ml de bFGF.

10 La **figura 49** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR de la expresión de los marcadores del endodermo definitivo indicados en los paneles a y b, en los cultivos de la línea H1 de células madre de embriones humanos, tratadas con activina A y Wnt-1 para los tiempos y las concentraciones indicadas.

15 La **figura 50** representa la expresión del CXCR4 y CD9 mediante FACS, en los días 4 y 5, para EXPRES 01, BGO1V y las líneas celulares H1, párrafo 50, expuestas a los medios de diferenciación definidos o a baja concentración de suero basada en los medios de diferenciación.

20 La **figura 51** demuestra, en tiempo real, los datos de la PCR para EXPRES 01, BGO1V y cultivos H1 tratados con baja concentración de suero o definidos como medios + activina A + Wnt-3a en los días 4 y 5.

25 La **figura 52** representa las imágenes de inmunofluorescencia de EXPRES 01, párrafo 49, células diferenciadas en el interior de DE utilizando para ello 1% de b27 + DM-F12 + activina A + Wnt-3a + inhibidor de GSK-3B durante cinco días.

30 La **figura 51** demuestra, en tiempo real, los datos de la PCR para las células H1 expuestas a cualquier baja concentración de suero + activina A o medio definido + activina A, en los días 1-5.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 Para mayor claridad de la divulgación y a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en subsecciones que describen o ilustran algunas propiedades, materializaciones o puestas en práctica de la presente invención y divulgación.

### Definiciones

40 Las células madre son células indiferenciadas que se definen por su capacidad, en el nivel de células individuales, para que ambas se auto-renueven y se diferencien para así producir células progenitoras que incluyan progenitores de auto-renovación, progenitores de no renovación y células completamente diferenciadas. Las células madre se caracterizan también por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en el interior de células funcionales de varios linajes celulares y a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), además de dar lugar, tras el trasplante, a tejidos de múltiples capas germinales y para contribuir considerablemente, tras las inyecciones, a la mayoría, si no todos, de los tejidos en el interior de los blastocitos.

45 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, que significa que son capaces de dar lugar a todo tipo de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, que significa que son capaces de dar lugar a todo tipo de células embrionarias; (3) multipotentes, que significa que son capaces de dar lugar a un subgrupo de linajes celulares pero todos dentro de un tejido en particular, órgano o sistema fisiológico (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) y que pueden generar descendencia que incluye HSC (auto-renovación), células sanguíneas restringidas a los progenitores oligopotentes y todo tipo de células y elementos (p. ej., plaquetas) que son componentes habituales de la sangre; (4) oligopotentes, que significa que son capaces de dar lugar a un subgrupo de linajes celulares más restringidos que las células madre multipotentes y (5) unipotentes, que significa que son capaces de dar lugar a un linaje celular individual (p. ej., células madre espermatogénicas).

50 La diferenciación es el proceso mediante el cual unas células no especializadas (no comprometidas) o menos especializadas adquieren las propiedades de unas células especializadas como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida a diferenciación es aquella que ha adoptado una posición más especializada (comprometida) dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica en el proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha actuado en la vía de diferenciación hasta un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en el interior de un tipo de célula específica o subgrupo de tipos de células y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en el interior de un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciado. La desdiferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal y como se utiliza aquí, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué célula procede y a qué células puede

dar lugar. El linaje de una célula la sitúa dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a características asociadas específicamente con el fenotipo de células de un linaje de interés y puede utilizarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

5 La AFP o alfa-fetoproteína, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un antígeno producido al inicio del desarrollo hepático. La AFP también puede expresarse en células extraembrionarias.

10 La albúmina es una proteína monomérica soluble que constituye alrededor de la mitad de todas las proteínas séricas en adultos.

15 El linaje celular  $\beta$  se refiere a las células con expresión génica positiva para el factor de transcripción Pdx1 y para, al menos, uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2,2, Nkx6,1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 y Pax6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje celular  $\beta$  contienen células  $\beta$ .

Brachyury, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia génica T-box. Es el marcador para la línea primitiva y para las células del mesodermo.

20 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, tal y como se utilizan aquí, se refieren a las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: Sox-17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, Cer1, Nodal, FGF8, Brachyury, la proteína de homosecuencia similar al Mix, FGF4, CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-kit, CD99 ó OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo contienen células precursoras de la línea primitiva, células de la línea primitiva, células del mesodermo y células del endodermo definitivo.

25 Tanto el C-kit como el CD117 se refieren a una superficie celular receptora de tirosina quinasa que tiene una secuencia divulgada en el número de entrada X06182 del Genbank o una secuencia que se da de forma natural y que es una variante de la misma (p. ej., variante alélica).

30 El CD99, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la proteína codificada mediante el gen con el número de entrada NM\_002414.

35 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, tal y como se utilizan aquí, se refieren a las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: Pdx1, HNF-1 beta, PTF1 alfa, HNF-6 ó HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático contienen células del endodermo pancreático.

40 Las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, tal y como se utilizan aquí, se refieren a las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, islote-1, Pdx1, Nkx6,1, Pax4, NGN-3 o PTF1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino contienen células pancreático endocrinas, células que expresan hormonas pancreáticas, células que segregan hormonas pancreáticas y células del linaje celular  $\beta$ .

45 El Cer 1 o Cerberus, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la superfamilia de proteínas del nudo de cisteína.

El CXCR4, tal y como se utiliza aquí, se refiere al receptor del factor 1 de células derivadas del estroma (SDF-1), también conocido como LESTR o fusin. En el embrión gastrulante de ratón, el CXCR4 se expresa en el endodermo definitivo y mesodermo pero no en el endodermo extraembrionario.

50 El endodermo definitivo, tal y como se utiliza aquí, se refiere a las células que soportan las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células del endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: HNF-3 beta, GATA4, Sox-17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y Mix11.

55 El endodermo extraembrionario, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la población de células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: Sox-17, AFP y SPARC.

El FGF2, FGF4, FGF8, FGF10 y FGF17, tal y como se utilizan aquí, son miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto.

60 El GATA4 y GATA6 son miembros de la familia de factores de transcripción GATA. Esta familia de factores de transcripción se induce mediante señales de TGF $\beta$  y contribuye a la conservación de los marcadores tempranos del endodermo.

65 El GLUT-2, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la molécula transportadora de glucosa que se expresa en numerosos tejidos fetales y adultos y que incluye el páncreas, hígado, intestino, cerebro y riñón.

El goosecoide o GSC, tal y como se utiliza aquí, se refiere al factor de transcripción del homeodominio que se expresa en el labio dorsal del blastopore.

5 El HB9, tal y como se utiliza aquí, se refiere al gen 9 de la homeosecuencia.

El HNF-1 alfa, HNF-1 beta, HNF-3 beta y el HNF-6 pertenecen a la familia de factores nucleares hepáticos de los factores de transcripción que se caracteriza por un dominio de unión al ADN muy bien preservado y dos dominios carboxilo-terminales.

10 El islote-1 o Isl-1, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia del homeodominio LIM de los factores de transcripción y se expresa en el páncreas en desarrollo.

15 El MAFA, tal y como se utiliza aquí, es un factor de transcripción que se expresa en el páncreas y controla la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis y secreción de insulina.

20 Los marcadores, tal y como se utilizan aquí, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan de manera diferente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial viene a significar un nivel incrementado para un marcador positivo y un nivel reducido para un marcador negativo. El nivel detectable del marcador de ácido nucleico o polipéptido es suficientemente superior o inferior en las células de interés, si se compara con otras células, por lo cual la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células, utilizando para ello cualquier variedad de métodos conocidos en la materia.

25 La célula del mesendodermo, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa, al menos, uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermin (EOMES), Sox-17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17 y GATA6.

El Mix11, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un gen de homeosecuencia que es marcador para las células en la línea primitiva, mesodermo y endodermo.

30 El NeuroD, tal y como se utiliza aquí, es un factor de transcripción de hélice-bucle-hélice básica (bHLH) implicado en la neurogénesis.

El NGN-3, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia neurogenin de los factores de transcripción de hélice-bucle-hélice básica.

35 El Nkx-2,2 y Nkx.6,1, tal y como se utilizan aquí, son miembros de la familia de los factores de transcripción Nkx.

El Nodal, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la superfamilia TGF beta de proteínas.

40 El Oct4 es un miembro del factor de transcripción del dominio POU y es ampliamente reconocido como una señal de identidad de las células madre pluripotentes. La relación de Oct4 con las células madre pluripotentes se sugiere mediante su expresión estrictamente restringida de células madre pluripotentes indiferenciadas. Al diferenciarse de linajes somáticos, la expresión de Oct4 desaparece rápidamente.

45 La célula pancreática endocrina o la célula que expresa la hormona pancreática, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de expresar, al menos, una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

50 La célula que segrega la hormona pancreática, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de segregar, al menos, una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

El Pax4 y Pax6, tal y como se utilizan aquí, son factores de transcripción específicos de las células  $\beta$  pancreáticas que están implicadas en el desarrollo del islote.

55 El Pdx1, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un factor de transcripción del homeodominio implicado en el desarrollo del páncreas.

La célula de la línea preprimitiva, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa, al menos, uno de los siguientes marcadores: Nodal o FGF8.

60 La célula de la línea primitiva, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa, al menos, uno de los siguientes marcadores: Brachyury, la proteína de homeosecuencia similar al Mix o FGF4.

65 El PTF1 alfa, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la proteína de hélice-bucle-hélice básica de 48 kD que es una subunidad de unión a la secuencia específica del ADN del factor 1 de transcripción (PTF1) del páncreas trimérico.

El Sox-1, Sox-2, Sox-7 y Sox-17, tal y como se utilizan aquí, son unos miembros de la familia de factores de transcripción Sox y están implicados en la embriogénesis.

5 La SPARC, tal y como se utiliza aquí, también conocida como proteína segregada ácida y rica en cisteína.

El SSEA-1 (antígeno embrionario específico de estado 1) es un antígeno glucolípidico de superficie presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma murino (EC), células germinales de embrión murino y humano (EG) y de las células madre de embriones murinos (ES).

10 El SSEA-3 (antígeno embrionario específico de estado 3) es un antígeno glucolípidico de superficie presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

15 El SSEA-4 (antígeno embrionario específico de estado 4) es un antígeno glucolípidico de superficie presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

20 EL TRAI-60 es un sulfato de queratina que se refiere al antígeno que se expresa en la superficie de las células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

25 EL TRAI-81 es un sulfato de queratina que se refiere al antígeno que se expresa en la superficie de las células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

La TRA2-49 es una isoenzima de la fosfatasa alcalina que se expresa en la superficie de las células madre de teratocarcinoma humano (EC) y de las células madre de embriones humanos (ES).

30 El UTF-1, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un coactivador transcripcional que se expresa en células madre embrionarias pluripotentes y en células extraembrionarias.

El Zic1, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia de factores de transcripción Zic. El Zic1 regula la expresión de los genes específicos de la cresta neural y se expresa en las células del tubo dorsal neural y de la cresta neural premigratoria.

35 **Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes**  
Caracterización de las células madre pluripotentes

40 Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los estados 3 y 4 de los antígenos embrionarios específicos (SSEA) y los marcadores detectables que utilizan anticuerpos designados como: Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson y otros autores, *Science* 282, 1.145, 1998). La diferenciación de las células madre pluripotentes *in vitro* se traduce en la pérdida de la expresión del SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81 (en su caso) y un incremento de la expresión del SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas tienen, por lo general, actividad de fosfatasa alcalina que puede detectarse mediante la fijación de las células con 4% de paraformaldehído y, luego, mediante su desarrollo con el Vector Red como sustrato, tal y como lo describe el fabricante (Laboratorios Vector, Burlingame – California-). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan, por lo general, el Oct4 y TERT, tal y como se detecta mediante RT-PCR.

50 Otro fenotipo conveniente para las células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciar en el interior de células de las tres capas germinales: tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en el interior de ratones que padecen inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas a esa forma utilizando para ello 4% de paraformaldehído y, luego, examinándolos histológicamente para obtener pruebas de los tipos de células procedentes de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede determinarse mediante la creación de cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados a las tres capas germinales.

60 Las líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden estar cariotipadas, utilizando para ello una técnica estándar de anillamiento G y pueden compararse con los cariotipos publicados de las correspondientes especies de primates. Es conveniente obtener células que tengan un cariotipo normal, lo cual significa que las células son euploides, donde todos los cromosomas humanos están presentes sin que se encuentren especialmente alterados.

Fuentes de las células madre pluripotentes

65 Los tipos de células madre pluripotentes que pueden utilizarse en la presente divulgación contienen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas del tejido formado tras la gestación y contienen tejido preembrionario (como, por ejemplo, un blastocito) y tejido embrionario o fetal tomado durante cualquier momento de la gestación,

- por lo general (aunque no necesariamente), antes de, aproximadamente, 10-12 semanas de gestación. Los ejemplos no exhaustivos son líneas establecidas de células madre de embriones humanos o células germinales de embriones humanos como, por ejemplo, las líneas H1, H7 y H9 de células madre de embriones humanos (WiCell). También se contempla el uso de las composiciones de esta divulgación durante el establecimiento inicial o la estabilización de dichas células, en cuyo caso la fuente de las células sería las células pluripotentes primarias tomadas directamente a partir de la fuente de los tejidos. También resultan adecuadas las células tomadas a partir de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas, en ausencia de células sustentadoras. También resultan adecuadas en esta divulgación las líneas de células madre de embriones humanos mutantes como, por ejemplo, BG01 v (BresaGen, Atenas, GA).
- En esta divulgación, las células madre de embriones humanos pueden prepararse tal y como lo describen Thomson y otros autores (Pat. de EE. UU. n° 5.843, 780; *Science* 282, 1.145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38, 133 ff., 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 92, 7.844, 1995).
- Cultivo de las células madre pluripotentes
- En una materialización, las células madre pluripotentes se cultivan, por lo general, en una capa de células sustentadoras que sostiene a las células madre pluripotentes de varias maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está, esencialmente, libre de células sustentadoras pero, no obstante, sostiene la proliferación de células madre pluripotentes sin que experimenten una diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo libre de sustentadores y sin diferenciación se sostiene utilizando un medio acondicionado mediante el previo cultivo con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo libre de sustentadores y sin diferenciación se sostiene utilizando un medio definido químicamente. En una materialización, el crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo libre de sustentadores y sin diferenciación se sostiene utilizando un medio definido químicamente que consiste en un medio suplementado con B27.
- Por ejemplo, Reubinoff y otros autores (*Nature Biotechnology* 18, 399-404 (2000)) y Thompson y otros autores (*Science*, 6 de noviembre de 1998, vol. n°: 282, 5.391, páginas: 1.145-1.147) divulgan el cultivo de las líneas de células madre pluripotentes a partir de blastocitos humanos utilizando una monocapa sustentadora celular de fibroblasto de embriones de ratón.
- Richards y otros autores (*Stem Cells* 21, 546-556, 2003) evaluaron un grupo de 11 adultos humanos diferentes y monocapas sustentadoras celulares fetales y neonatales por su capacidad para sostener el cultivo de células madre pluripotentes humanas. Richards y otros autores, manifiestan: "las líneas de células madre de embriones humanos cultivadas en la piel de un adulto con sustentadores de fibroblasto mantienen la morfología de las células madre de embriones humanos y permanecen pluripotentes".
- La patente de EE. UU. 20020072117 divulga las líneas celulares que producen medios que sostienen el crecimiento de las células madre pluripotentes de primates en un cultivo libre de sustentadores. Las líneas celulares empleadas son mesenquimales y similares a los fibroblastos obtenidos a partir de tejido embrionario o diferenciado de las células madre embrionarias. La patente de EE. UU. 20020072117 también divulga el uso de líneas celulares como una monocapa sustentadora celular primaria.
- En otro ejemplo, Wang y otros autores (*Stem Cells* 23, 1.221-1.227, 2005) divulgan los métodos para el crecimiento a largo plazo de las células madre pluripotentes de humanos en monocapas sustentadoras celulares derivadas de células madre de embriones humanos.
- En otro ejemplo, Stojkovic y otros autores (*Stem Cells* 2005 23, -306-314, 2005) divulgan un sistema sustentador celular derivado de la diferenciación espontánea de células madre de embriones humanos.
- En un ejemplo más, Miyamoto y otros autores (*Stem Cells* 22, 433-440, 2004) divulgan una fuente de células sustentadoras obtenidas a partir de placenta humana.
- Amit y otros autores (*Biol. Reprod.* 68, 2.150-2.156, 2003) divulgan una monocapa sustentadora celular derivada del prepucio humano.
- En otro ejemplo, Inzunza y otros autores (*Stem Cells* 23, 544-549, 2005) divulgan una monocapa sustentadora celular a partir de fibroblastos del prepucio humano postnatal.
- La patente de EE. UU. 6642048 divulga los medios que sostienen el crecimiento de las células madre pluripotentes de primates (pPS) en un cultivo libre de sustentadores, así como líneas celulares aptas para la producción de dichos medios. La patente de EE. UU. 6642048 manifiesta: "esta invención contiene mesenquimales y líneas celulares similares a los fibroblastos obtenidos a partir de tejido embrionario o diferenciado de las células madre embrionarias. Los métodos para derivar dichas líneas celulares son: procesar los medios y conseguir que las células madre crezcan utilizando para ello los medios acondicionados que se describen e ilustran en esta divulgación.

5 En otro ejemplo, el WO 2005014799 divulga un medio acondicionado para la conservación, proliferación y diferenciación de las células de mamíferos. El WO 2005014799 manifiesta: "el medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención se acondiciona mediante la actividad secretora celular de las células de murino y, en particular, aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortales denominados MMH (*Met Murine Hepatocyte*).

10 En otro ejemplo, Xu y otros autores (*Stem Cells* 22, 972-980, 2004) divulgan un medio acondicionado obtenido a partir de derivados de células madre de embriones humanos que han sido modificados genéticamente para sobreexpresar la telomerasa transcriptasa inversa humana.

En otro ejemplo, la patente de EE. UU 20070010011 divulga un medio de cultivo definido químicamente para la conservación de las células madre pluripotentes.

15 En un sistema de cultivo alternativo se emplea un medio libre de suero y suplementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon y otros autores (*BioReprod DOI*, 10.1095/biolreprod. 105.046870, 19 de octubre, 2005) divulgan un sistema de cultivo libre de suero y de sustentadores en el cual las células madre embrionarias se conservan en un medio no acondicionado de reemplazo de suero (SR) suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar la auto-renovación de  
20 células madre embrionarias.

En otro ejemplo, Levenstein y otros autores (*Stem Cells* 24, 568-574, 2006) divulgan métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias, en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado y utilizando para ello medios suplementados con bFGF.  
25

En otro ejemplo, la patente de EE. UU 20050148070 divulga un método de cultivo de células madre de embriones humanos en medios definidos sin suero y sin células sustentadoras de fibroblasto, el método comprende: el cultivo de las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina y al menos una insulina o sustituto de insulina. El medio de cultivo debe estar, esencialmente, libre de suero fetal de mamíferos y debe contener al menos unos 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto que sea capaz de activar un receptor de señalización del factor de crecimiento de fibroblasto, donde no solo la monocapa sustentadora de fibroblasto, sino también otra fuente proporcionan el factor de crecimiento; el medio sostuvo la proliferación de células madre en un estado indiferenciado, sin células sustentadoras ni medio acondicionado.  
30

En otro ejemplo, la patente de EE. UU. 20050233446 divulga unos medios definidos aptos para el cultivo de células madre y que incluyen células madre primordiales e indiferenciadas de primate. En la solución, los medios son considerablemente isotónicos si se comparan con las células madre que han venido siendo cultivadas. En un cultivo dado, el medio particular se compone de un medio base y de una cantidad de cada de: bFGF, insulina y ácido ascórbico, necesarios para sostener considerablemente el crecimiento indiferenciado de las células madre primordiales.  
35  
40

En otro ejemplo, en la patente de EE. UU. 6800480 se manifiesta: "en una materialización, un medio de cultivo celular para el crecimiento de las células madre primordiales derivadas de primates en un estado que se proporciona y que se encuentra considerablemente indiferenciado, el cual incluye una baja presión osmótica, un medio básico con baja endotoxina que es efectivo para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates. El medio básico se combina con un suero nutriente efectivo para sostener el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates y un sustrato seleccionado a partir del grupo consistente en células sustentadoras y un componente de matriz extracelular derivado de células sustentadoras. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante y un primer factor de crecimiento seleccionado a partir del grupo consistente en nucleósidos y sal piruvato".  
45  
50

En otro ejemplo, en la patente de EE. UU. 20050244962 se manifiesta: " en un aspecto, la invención proporciona un método de cultivo de células madre de embriones de primates. En uno, las células madre se cultivan en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamíferos (preferiblemente que también esté esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia del factor de crecimiento de fibroblasto que se proporciona a partir de, no solo la monocapa sustentadora de fibroblasto, sino también a partir de otra fuente. En la forma elegida, la monocapa sustentadora de fibroblasto, requerida previamente para preservar un cultivo de células madre, deja de ser necesaria mediante la adición de factor de crecimiento de fibroblasto en cantidad suficiente.  
55  
60

En un ejemplo adicional, el WO 2005065354 divulga un medio de cultivo definido e isotónico que está esencialmente libre de sustentadores y de suero y que comprende: a. un medio basal, b. una cantidad suficiente de bFGF para sostener el crecimiento de células madre de mamíferos considerablemente indiferenciadas, c. una cantidad suficiente de insulina para sostener el crecimiento de células madre de mamíferos considerablemente indiferenciadas y d. una cantidad suficiente de ácido ascórbico para sostener el crecimiento de células madre de mamíferos considerablemente indiferenciadas.  
65

5 En otro ejemplo, el WO 2005086845 divulga un método para la conservación de una célula madre indiferenciada, dicho método comprende la exposición de una célula madre a un miembro de la familia de factores de crecimiento transformantes beta (TGF $\beta$ ) de proteínas, un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto (FGF) de proteínas o una cantidad suficiente de nicotinamida (NIC) para conservar la célula en un estado indiferenciado durante el tiempo suficiente para alcanzar el resultado deseado.

10 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en un sustrato de cultivo adecuado. En una materialización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de matriz extracelular como, por ejemplo, aquel derivado de una membrana basal o que puede formar parte de la unión de los ligandos de moléculas de adhesión receptoras. En una materialización, el sustrato de cultivo adecuado es Matrigel® (Becton Dickeson). Matrigel® es una preparación soluble a partir de las células tumorales Engelbreth- Holm-Swarn que, a temperatura ambiente, queda en estado de gel para formar una membrana basal reconstituida.

15 Una alternativa adecuada consiste en otros componentes de matriz extracelular y mezclas de componentes. En función del tipo de célula que viene proliferando, esta puede contener laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y análogos, solos o en varias combinaciones.

20 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en el sustrato, en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueva la supervivencia celular, la propagación y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención para la distribución de la siembra y uno de los expertos en la materia puede determinarlas fácilmente.

25 Los medios de cultivo adecuados pueden estar hechos de los siguientes componentes: como, por ejemplo, el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Gibco # 11.965-092, medio de Eagle modificado de Dulbecco de Knockout (KO DMEM), Gibco # 10.829-018, medio basal de Ham F12/50%, 200 mM de L-glutamina, Gibco # 15.039-027, solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11.140-050,  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma # M7522, factor de crecimiento básico humano recombinante del fibroblasto (bFGF) y Gibco # 13.256-029.

30 **Diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino**

35 Las células madre pluripotentes adecuadas para su uso en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, la línea H9 de células madre de embriones humanos (código NIH: WA09), la línea H1 de células madre de embriones humanos (código NIH: WA01), la línea H7 de células madre de embriones humanos (código NIH: WA07) y la línea SA002 de células madre de embriones humanos (Cellartis, Suecia). También son adecuadas para su uso en la presente invención las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores característicos de las células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FoxD3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

40 Los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se seleccionan a partir del grupo consistente en: Sox-17, GATA4, HNF-3beta, GSC, Cerl, Nodal, FGF8, Brachyury, Mix similar a la proteína de homeosecuencia, FGF4 CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Existe una célula adecuada para su uso en la presente invención y que expresa, al menos, uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula precursora de la línea primitiva. En otro aspecto, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del mesendodermo. En otro aspecto, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del endodermo definitivo.

50 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan a partir del grupo consistente en: Pdx1, HNF-1beta, PTF1A, HNF-6, HB9 y PROX1. Existe una célula adecuada para su uso en la presente invención y que expresa, al menos, uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es una célula del endodermo pancreático.

55 Los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino se seleccionan a partir del grupo consistente en: NGN-3, NeuroD, islote-1, Pdx1, NKX6.1, Pax4, NGN-3 y PTF1alfa. En una materialización, una célula pancreático endocrina es capaz de expresar, al menos, una de las siguientes hormonas: insulina, glugagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Existe una célula adecuada para su uso en la presente invención y que expresa, al menos, uno de los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje pancreático endocrino es una célula pancreático endocrina. La célula pancreático endocrina puede ser una hormona pancreática que exprese células. Alternativamente, la célula pancreático endocrina puede ser una hormona pancreática que segregue células.

65 En un aspecto de la presente invención, la célula pancreático endocrina es una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular  $\beta$  y que expresa Pdx1 y, al menos, uno de los siguientes factores de transcripción:

NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, isl-1, HNF-3beta, MAFA, Pax4 y Pax6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

5 Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante cualquier método existente en la materia o cualquier otro propuesto en esta invención.

10 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en D'amour y otros autores, *Nature Biotechnology* 23, 1.534-1.541 (2005).

15 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en Shinozaki y otros autores, *Development* 131, 1.651-1.662 (2004).

20 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en McLean y otros autores, *Stem Cells* 25, 29-38 (2007).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en D'amour y otros autores, *Nature Biotechnology* 24, 1.392-1.401 (2006).

25 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y en ausencia de suero; luego, mediante el cultivo de las células con activina A y suero y, finalmente, mediante el cultivo de las células con activina A y suero de una concentración diferente. En la obra *Nature Biotechnology* 23, 1.534-1.541 (2005) se recoge un ejemplo de este método.

30 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y en ausencia de suero; luego, mediante el cultivo de las células con activina A y suero de otra concentración. En la obra *Nature Biotechnology* 23, 1.534-1.541 (2005) se recoge un ejemplo de este método.

35 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y un ligando Wnt, en ausencia de suero; luego, mediante la extracción del ligando Wnt y el cultivo de células con activina A y suero. En la obra *Nature Biotechnology* 24, 1.392-1.401 (2006) se recoge un ejemplo de este método.

40 En un aspecto de la presente divulgación, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el recubrimiento de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y durante un período de tiempo y, finalmente, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A en un segundo medio de cultivo que contiene una gran concentración de suero, durante otro período de tiempo.

45 La concentración de suero en el primer medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de cero a, aproximadamente, un 0,5% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días. La concentración de suero en el segundo medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de, aproximadamente, un 0,5% a un 2% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a cuatro días.

50 En otra materialización de la presente divulgación, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el recubrimiento de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y durante un período de tiempo y, finalmente, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt en un segundo medio de cultivo que contiene una gran concentración de suero, durante otro período de tiempo.

55 La concentración de suero en el primer medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de, aproximadamente, cero a un 0,5% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días. La concentración de suero en el segundo medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de, aproximadamente, un 0,5% a un 2% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a cuatro días.

En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo y que comprende las fases de:

- 5 a) recubrimiento de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y  
 b) cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt.

10 El cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt puede realizarse en un medio de cultivo individual. El medio de cultivo individual puede suplementarse con suero. Alternativamente, el medio de cultivo individual puede definirse químicamente y se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt puede realizarse de forma separada o conjunta, en más de un medio de cultivo. En una materialización, el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt se realiza en dos medios de cultivo. Más de un medio de cultivo puede suplementarse con suero. Alternativamente, más de un medio de cultivo puede definirse químicamente y se compone de medios suplementados con B27.

Matriz extracelular

20 En un aspecto de la presente invención, las células madre pluripotentes se cultivan y diferencian en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular. La matriz extracelular puede ser una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de células de ratón (que comercializa BD Biosciences bajo el nombre comercial de Matrigel). Alternativamente, la matriz extracelular puede ser un factor de crecimiento reducido Matrigel. Alternativamente, la matriz extracelular puede tener fibronectina. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan y diferencian en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con suero humano.

25 La matriz extracelular puede diluirse antes de recubrir el sustrato de cultivo de tejido. En las obras de Kleinman, H.K. y otros autores (*Biochemistry* 25, 312 (1982) y Hadley, M.A. y otros autores (*J.Cell. Biol.* 101, 1.511(1985) pueden encontrarse ejemplos de métodos adecuados para diluir la matriz extracelular y para recubrir el sustrato de cultivo de tejido.

30 En una materialización, la matriz extracelular es Matrigel. En una materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:10. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:15. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:30. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:60.

35 En una materialización, la matriz extracelular es un factor de crecimiento reducido Matrigel. En una materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:10. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:15. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:30. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:60.

40 Diferenciación de células madre pluripotentes que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en una matriz extracelular, utilizando para ello un medio de cultivo individual

45 Cuando se utiliza un medio de cultivo individual, este debería contener las suficientes concentraciones en baja cantidad de algunos factores para permitir la diferenciación de células madre pluripotentes en el endodermo definitivo como, por ejemplo, la insulina y el IGF (tal y como se divulga en el WO 2006020919). Esto puede alcanzarse mediante la disminución de la concentración de suero o, alternativamente, mediante el uso de medios químicamente definidos que carecen de insulina e IGF. En la obra de Wiles y otros autores (*Exp Cell Res.*, 25 de febrero de 1999, 247 (1)- 241 – 8) se recogen ejemplos de medios definidos químicamente.

50 El medio de cultivo puede tener una concentración de suero en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 10%. En otra materialización, la concentración puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 5%. En otra materialización, la concentración puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 2%. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, el 2%.

55 Alternativamente, el medio de cultivo puede suplementarse con B27 en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 1%.

60 El tiempo de cultivo con activina A y un ligando Wnt puede oscilar entre, aproximadamente, uno y siete días. En otra materialización, el tiempo de cultivo puede oscilar entre, aproximadamente, uno y tres días. En otra materialización, el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, tres días.

65

- La activina A puede utilizarse en cualquier concentración adecuada para causar la diferenciación de las células madre pluripotentes. La concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 1 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 50 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml.
- La elección del ligando Wnt puede optimizarse para mejorar la eficiencia del proceso de diferenciación. El ligando Wnt puede seleccionarse a partir del grupo consistente en: Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una materialización, el ligando Wnt es Wnt-1. En otra materialización, el ligando Wnt es Wnt-3a.
- El ligando Wnt puede estar en una concentración de, aproximadamente, 1 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 10 ng/ml a 100 ng/ml.
- El medio de cultivo individual también puede contener un inhibidor de GSK-3B. El inhibidor de GSK-3B puede seleccionarse a partir del grupo consistente en el IX inhibidor de GSK-3B y el XI inhibidor de GSK-3B. En una materialización, el inhibidor de GSK-3B es el IX inhibidor de GSK-3B.
- Cuando se cultivan células madre pluripotentes con un inhibidor de GSK-3B, la concentración del inhibidor de GSK-3B puede ser de 1 nM a, aproximadamente, 1.000 nM. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan con el inhibidor de GSK-3B en una concentración de, aproximadamente, 10 nM a 100 nM.
- El medio de cultivo individual también puede contener, al menos, otro factor adicional que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes. Alternativamente, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.
- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede ser, por ejemplo : la nicotinamida, miembros de la familia TGF-β (incluye TGF-β1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β- mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butirato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.
- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241) y células primarias o endoteliales transformadas.
- Diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en un matriz extracelular, utilizando para ello dos medios de cultivo
- La diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células de un linaje del endodermo definitivo puede llevarse a cabo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, utilizando para ello dos medios de cultivo. Por tanto, la diferenciación de las células madre pluripotentes puede llevarse a cabo como sigue:
- se recubren las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular ,
  - se cultivan las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo y
  - se cultivan las células madre pluripotentes con activina A, en un segundo medio de cultivo.
- El primer medio de cultivo puede contener suero en baja concentración y el segundo medio de cultivo puede contener *scrum* en una mayor concentración que en el primer medio de cultivo.

El segundo medio de cultivo puede contener un ligando Wnt.

- 5 Primer medio de cultivo: el primer medio de cultivo debería contener suficientes concentraciones en baja cantidad de algunos factores para permitir la diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo como, por ejemplo, la insulina e IGF (tal y como se divulga en el WO 20006020919). Esto puede alcanzarse mediante la disminución de la concentración de suero o, alternativamente, mediante el uso de medios químicamente definidos que carecen de insulina e IGF. En la obra de Wiles y otros autores (*Exp Cell Res.*, 25 de febrero de 1999, 247 (1)- 241 – 8) se recogen ejemplos de medios definidos químicamente.
- 10 En el primer medio de cultivo puede haber una concentración de suero más baja en relación con el segundo medio de cultivo. Al incrementar la concentración de suero en el segundo medio de cultivo, se incrementa la supervivencia de las células o, alternativamente, se puede potenciar la proliferación de las células. La concentración de suero del primer medio puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 10%. Alternativamente, la
- 15 concentración de suero del primer medio puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 2%. Alternativamente, la concentración de suero del primer medio puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 1%. Alternativamente, la concentración de suero del primer medio puede ser de, aproximadamente, un 0,5%.
- 20 Cuando se cultivan las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt utilizando, al menos, dos medios de cultivo, el tiempo de cultivo en el primer medio puede oscilar entre, aproximadamente, uno y tres días.
- 25 La activina A puede utilizarse en cualquier concentración adecuada para causar la diferenciación de las células madre pluripotentes. La concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 50 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml.
- 30 La elección del ligando Wnt puede optimizarse para mejorar la eficiencia del proceso de diferenciación. El ligando Wnt se puede seleccionar a partir del grupo consistente en: Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una materialización, el ligando Wnt es Wnt-1. En otra materialización, el ligando Wnt es Wnt-3a.
- 35 El ligando Wnt puede estar en una concentración de, aproximadamente, 1 ng/ml a 1.000 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml a 100 ng/ml.
- 40 El primer medio de cultivo también puede contener un inhibidor de GSK-3B. El inhibidor de GSK-3B puede añadirse al primer medio de cultivo, al segundo medio de cultivo o a ambos (a los medios primero y segundo).
- 45 El inhibidor de GSK-3B puede seleccionarse a partir del grupo consistente en el IX inhibidor de GSK-3B y el XI inhibidor de GSK-3B. En una materialización, el inhibidor de GSK-3B es el IX inhibidor de GSK-3B.
- 50 Cuando se cultivan células madre pluripotentes con un inhibidor de GSK-3B, la concentración del inhibidor de GSK-3B puede ser de, aproximadamente, 1 nM a 1.000 nM. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan con el inhibidor de GSK-3B en una concentración de, aproximadamente, 10 nM a 100 nM.
- 55 El primer medio de cultivo también puede contener, al menos, otro de los factores adicionales que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.
- 60 Al menos uno de los otros factores adicionales puede ser, por ejemplo: la nicotinamida, miembros de la familia TGF-β (incluye TGF-β1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β- mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butirato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a
- 65

la. neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.

5 Al menos uno de los otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).

10 Segundo medio de cultivo: el segundo medio de cultivo debería contener algunos factores como, por ejemplo, la insulina e IGF (tal y como se divulga en el WO 20006020919) en una concentración suficiente como para promover la supervivencia de las células cultivadas. Esto puede alcanzarse mediante el incremento de la concentración de suero o, alternativamente, mediante el uso de medios químicamente definidos donde las concentraciones de insulina e IGF se incrementan en relación con el primer medio de cultivo. En la obra de Wiles y otros autores (*Exp Cell Res.*, 25 de febrero de 1999, 247 (1)- 241 – 8) se recogen ejemplos de medios definidos químicamente.

15 En un segundo medio de cultivo con mayores concentraciones de suero, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 10%. Alternativamente, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 5%. Alternativamente, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 2%. Alternativamente, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede ser de, aproximadamente, un 2%. Cuando se cultivan células madre pluripotentes con el segundo medio de cultivo, el tiempo de cultivo puede oscilar entre, aproximadamente, uno y cuatro días.

20 Al igual que en el primer medio de cultivo, la activina A puede utilizarse en cualquier concentración adecuada para causar la diferenciación de las células madre pluripotentes. La concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 1 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 50 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml.

25 El ligando Wnt puede estar en una concentración de, aproximadamente, 1 ng/ml a 1.000 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 10 ng/ml a 100 ng/ml.

30 El ligando Wnt puede seleccionarse a partir de un grupo consistente en: Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una materialización, el ligando Wnt es Wnt-1. En otra materialización, el ligando Wnt es Wnt-3a.

35 El segundo medio de cultivo también puede contener un inhibidor de GSK-3B. El inhibidor de GSK-3B puede añadirse al primer medio de cultivo, al segundo medio de cultivo o a ambos (a los medios primero y segundo).

40 El inhibidor de GSK-3B puede seleccionarse a partir del grupo consistente en el IX inhibidor de GSK-3B y el XI inhibidor de GSK-3B. En una materialización, el inhibidor de GSK-3B es el IX inhibidor de GSK-3B.

45 Cuando se cultivan células madre pluripotentes con un inhibidor de GSK-3B, la concentración del inhibidor de GSK-3B puede ser de, aproximadamente, 1 nM a 1.000 nM. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan con el inhibidor de GSK-3B en una concentración de, aproximadamente, 10 nM a 100 nM.

50 Al igual que en el primer medio de cultivo, el segundo medio de cultivo también puede contener, al menos, otro de los factores adicionales que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

55 Al menos uno de los otros factores adicionales puede ser, por ejemplo: la nicotinamida, miembros de la familia TGF-β (incluye TGF-β1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β- mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butirato, activina, betacelulosa, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a

la. neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.

5 Al menos uno de los otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).

10 Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo

La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo puede determinarse examinando la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Por lo general, las células madre pluripotentes no expresan dichos marcadores. Por tanto, la diferenciación de células pluripotentes se detecta cuando las células empiezan a expresarlos.

15 La eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

20 Los métodos para valorar la expresión de los marcadores de ácido nucleico y proteico en células aisladas o cultivadas son estándar en la materia. Estos incluyen: reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR), ensayo Northern, hibridación *in situ* (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y otros autores, Ediciones Suplemento, 2001) e inmunoensayos como, por ejemplo, el análisis de inmunohistoquímica del material seccionado, Western blot y, para marcadores accesibles en células intactas, el análisis de la citometría de flujo (FACS) (véase, p. ej., la obra de Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

30 Los ejemplos de anticuerpos aptos para detectar algunos marcadores de proteínas se enumeran en la **tabla 1A**. Cabe señalar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores, que se reconocen en los anticuerpos enumerados en la **tabla 1A**, están disponibles o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para valorar la expresión de marcadores en las células aisladas, de acuerdo con la presente invención.

35 Por ejemplo, las características de las células madre pluripotentes son bien conocidas por los expertos en la materia y las características adicionales de las células madre pluripotentes continúan siendo identificadas. Los marcadores de las células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FoxD3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

40 Tras tratar células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas pueden purificarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas como, por ejemplo, el CXCR4, expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

45 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático**

Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático mediante cualquier método existente en la materia o mediante cualquier otro propuesto en esta invención.

50 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, según los métodos divulgados en la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology-24*, 1.392-1.401 (2006).

55 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con un factor de crecimiento de fibroblasto y el inhibidor KAAD-ciclopamina por la vía señalizadora del erizo, luego se extrae el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblasto y la KAAD-ciclopamina y, posteriormente, las células se cultivan en un medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblasto y la KAAD- ciclopamina. En la obra *Nature Biotechnology-24*, 1.392-1.401 (2006) se recoge un ejemplo de este método.

65 En un aspecto de la presente divulgación, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del

linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico y, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante un período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser de, aproximadamente, uno a seis días.

5 En otro aspecto de la presente divulgación, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de células con ácido retinoico durante un período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días. Posteriormente, se extrae el ácido retinoico y se tratan las células con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante otro período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días.

10 En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y que comprende las fases de:

- 15 a. cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo y  
b. tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico y, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

20 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

25 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, uno a seis días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, seis días.

30 Al menos un factor de crecimiento de fibroblasto se selecciona a partir del grupo consistente en: FGF2, FGF4 y FGF10.

35 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

40 En otra materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y que comprende las fases de:

- 45 a. cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo y  
b. tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, tratándolas con ácido retinoico y  
c. extracción del ácido retinoico y, posteriormente, tratamiento de las células con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

50 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

55 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico durante, aproximadamente, uno a tres días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico durante, aproximadamente, tres días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, uno a tres días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, tres días.

60 Al menos un factor de crecimiento de fibroblasto se selecciona a partir del grupo consistente en: FGF2, FGF4 y FGF10.

65 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que

se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

5 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico. Alternativamente, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con FGF2 o, alternativamente, con FGF4 o FGF10. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con, al menos, uno de los siguientes factores: ácido retinoico, FGF2, FGF4 o FGF10. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con, al menos, uno de los siguientes factores de crecimiento de fibroblasto: FGF2, FGF4 o FGF10. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con FGF-2. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con FGF4. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con FGF10.

15 El ácido retinoico puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 1 nM a 1mM. En una materialización, el ácido retinoico se utiliza en una concentración de 1  $\mu$ M.

20 El FGF2 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 50 pg/ml a 50  $\mu$ g/ml. En una materialización, el FGF2 se utiliza en una concentración de 50 ng/ml.

El FGF4 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 50 pg/ml a 50  $\mu$ g/ml. En una materialización, el FGF4 se utiliza en una concentración de 50 ng/ml.

25 El FGF10 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 50 pg/ml a 50  $\mu$ g/ml. En una materialización, el FGF10 se utiliza en una concentración de 50 ng/ml.

30 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se pueden tratar con, al menos, otro de los factores adicionales que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, formado por los métodos de la presente invención. Alternativamente, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

40 Al menos uno de esos otros factores adicionales puede ser, por ejemplo : la nicotinamida, miembros de la familia TGF- $\beta$  (incluye TGF- $\beta$ 1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina,  $\beta$ - mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butirato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.

55 Al menos uno de esos otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo., PANC-1 (ATCC n° CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC n° HTB- 79), BxPC-3 (ATCC n° CRL -1.687), HPAF-II (ATCC n° CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC n° HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC n° CCL -241).

Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático

60 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático son bien conocidos por los expertos en la materia y las características adicionales de los marcadores del linaje del endodermo pancreático continúan siendo identificadas. Estos marcadores pueden utilizarse para confirmar que las células que se tratan de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje del endodermo pancreático. Los marcadores específicos del linaje del endodermo pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo: Hlx9, PTF1a, PDX-1, HNF-6 y HNF-1beta.

La eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático.

5 Los métodos para valorar la expresión de los marcadores de ácido nucleico y proteico en células aisladas o cultivadas son estándar en la materia. Estos incluyen: reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR), ensayo Northern, hibridación *in situ* (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y otros autores, Ediciones Suplemento, 2001) e inmunoensayos como, por ejemplo, el análisis de inmunohistoquímica del material seccionado, Western blot y, para marcadores accesibles en células intactas, el análisis de la citometría de flujo (FACS) (véase, p. ej., la obra de Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

10 Los ejemplos de anticuerpos aptos para detectar algunos marcadores de proteínas se enumeran en la **tabla 1A**. Cabe señalar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores, que se reconocen en los anticuerpos enumerados en la **tabla 1A**, están disponibles o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para valorar la expresión de marcadores en las células aisladas, de acuerdo con la presente invención.

20 **Formación de las células que expresan marcadores del linaje pancreático endocrino:**

Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante cualquier método existente en la materia o mediante cualquier otro divulgado en esta invención.

25 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, según los métodos divulgados en la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology-24*, 1.392-1.401 (2006).

30 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene DAPT y Exendin-4; luego, se extrae el medio que contiene DAPT y Exendin y, posteriormente, se cultivan las células en un medio que contiene Exendin-4, IGF-1 y HGF. En la obra *Nature Biotechnology-24*, 1.392-1.401 (2006) se recoge un ejemplo de este método.

35 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene Exendin-4; luego, se extrae el medio que contiene Exendin-4 y, posteriormente, se cultivan las células en un medio que contiene Exendin-4, IGF-1 y HGF. En la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology* (2006) se recoge un ejemplo de este método.

40 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene DAPT y Exendin-4. En la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology* (2006) se recoge un ejemplo de este método.

45 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene Exendin-4. En la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology* (2006) se recoge un ejemplo de este método.

50 En un aspecto de la presente divulgación, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con un factor que inhibe la vía señalizadora de Notch, El factor que inhibe la vía señalizadora de Notch puede ser antagónico al receptor extracelular de Notch. Alternativamente, el factor puede inhibir la actividad biológica del receptor de Notch. Alternativamente, el factor puede inhibir o ser el antagonista de un elemento en la vía de transducción de señales Notch, dentro de una célula. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

65

En una materialización, el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch es un inhibidor y-secretasa. En una materialización, el inhibidor de y-secretasa es: 1SBencilo-4R-[1-(1S-carbamoil-2-carbamoil fenillico)-IS-3-metilbuticarbamoil]-5 2R-hidroxy-5- fenilpentil] carbámico], éster de ácido terc-butilo, también conocido como L-685,458.

5 El L-685,458 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 0,1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 90  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 80  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 70  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 60  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 50  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 40  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 30  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 20  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 10  $\mu\text{M}$ .

En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino y que comprende las fases de:

- 20 a. cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y  
b. tratamiento de las células con un factor que inhibe la vía señalizadora de Notch.

Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

25 En una materialización, el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch es un inhibidor y-secretasa. En una materialización, el inhibidor de y-secretasa es: 1SBencilo-4R-[1-(1S-carbamoil-2-carbamoil fenillico)-IS-3-metilbuticarbamoil]- 2R-hidroxy-5- fenilpentil] carbámico], éster de ácido terc-butilo, también conocido como L-685,458.

35 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se tratan con el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch durante, aproximadamente, uno a cinco días. Alternativamente, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se tratan con el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch durante, aproximadamente, tres a cinco días. Alternativamente, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se tratan con el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch durante, aproximadamente, cinco días.

40 En una materialización, el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch es un inhibidor y-secretasa. En una materialización, el inhibidor de y-secretasa es: 1SBencilo-4R-[1-(1S-carbamoil-2-carbamoil fenillico)-IS-3-metilbuticarbamoil]- 2R-hidroxy-5- fenilpentil] carbámico], éster de ácido terc-butilo, también conocido como L-685,458.

45 El L-685,458 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 0,1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 90  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 80  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 70  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 60  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 50  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 40  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 30  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 20  $\mu\text{M}$ . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 10  $\mu\text{M}$ .

55 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden tratarse con, al menos, otro factor adicional que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

60

65

- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede ser, por ejemplo : la nicotinamida, miembros de la familia TGF- $\beta$  (incluye TGF- $\beta$ 1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina,  $\beta$ - mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butirato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.
- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).
- Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino
- Los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino son bien conocidos por los expertos en la materia y los marcadores adicionales característicos del linaje pancreático endocrino continúan siendo identificados. Se pueden utilizar estos marcadores para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje pancreático endocrino. Los marcadores específicos del linaje pancreático endocrino incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo, NGN-3, NeuroD e islote-1.
- Los marcadores característicos del linaje celular  $\beta$  son bien conocidos por los expertos en la materia y los marcadores adicionales característicos del linaje celular  $\beta$  continúan siendo identificados. Se pueden utilizar estos marcadores para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje celular  $\beta$ . Las características específicas del linaje celular  $\beta$  incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo: Pdx1 (gen de homeosecuencia 1 pancreático duodenal), Nkx2.2, Nkx6.1, isl1, Pax6, Pax4, NeuroD, HNF-1b, HNF-6, HNF-3beta y MAFA, entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la materia para la identificación de células endocrinas, véase, p. ej., la obra de Edlund (*Nature Reviews Genetics* 3, 524-632 (2002)).
- La eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. Alternativamente, la eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje celular  $\beta$ .
- Los métodos para valorar la expresión de los marcadores de ácido nucleico y proteico en células aisladas o cultivadas son estándar en la materia. Estos incluyen: reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR), ensayo Northern, hibridación *in situ* (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y otros autores, Ediciones Suplemento, 2001) e inmunoensayos como, por ejemplo, el análisis de inmunohistoquímica del material seccionado, Western blot y, para marcadores accesibles en células intactas, el análisis de la citometría de flujo (FACS) (véase, p. ej., la obra de Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).
- Los ejemplos de anticuerpos aptos para detectar algunos marcadores de proteínas se enumeran en la **tabla 1A**. Cabe señalar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores, que se reconocen en los anticuerpos enumerados en la **tabla 1A**, están disponibles o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para valorar la expresión de marcadores en las células aisladas, de acuerdo con la presente invención.
- En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente que sufre o tiene riesgo de desarrollar una diabetes de tipo 1. Este método conlleva el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células madre pluripotentes *in vitro*, en el interior de un linaje celular  $\beta$  y la implantación de las células del linaje celular  $\beta$  en un paciente.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente que sufre o tiene riesgo de desarrollar una diabetes de tipo 2. Este método conlleva el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación

de las células madre pluripotentes *in vitro*, en el interior de un linaje celular  $\beta$  y la implantación de las células del linaje celular  $\beta$  en un paciente.

5 Si procede, se puede tratar adicionalmente al paciente con agentes farmacéuticos o bioactivos que faciliten la supervivencia y la función de las células trasplantadas. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo: insulina, miembros de la familia TGF- $\beta$  (incluye TGF- $\beta$ 1, 2 y 3), proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores 1 y 2 de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -7, -8, -10 y -15), factor de crecimiento celular derivado del endotelio vascular (VEGF), pleiotrophin y endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo: nicotinamida, péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea e inhibidores de MAPK como, por ejemplo, los componentes que se divulgan en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0209901 y en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0132729.

15 Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de una célula productora de insulina, antes de trasplantarlas dentro de un recipiente. En una materialización específica, las células madre pluripotentes están completamente diferenciadas en el interior de células  $\beta$ , antes de trasplantarlas dentro de un recipiente. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden trasplantarse dentro de un recipiente en un estado indiferenciado o parcialmente diferenciado. Otra diferenciación puede tener lugar en el recipiente.

20 Las células del endodermo definitivo o, alternativamente, las células del endodermo pancreático o, alternativamente, las células  $\beta$  pueden implantarse como células dispersas o formadas en el interior de clústeres que pueden administrarse en la vena porta hepática. Alternativamente, las células se pueden proporcionar en soportes poliméricos degradables y biocompatibles o bien en dispositivos porosos no degradables o encapsulados para protegerse de la respuesta inmune del huésped. Las células pueden implantarse en un lugar apropiado del receptor. Los lugares de implantación comprenden, por ejemplo, el hígado, el páncreas innato, el espacio subcapsular renal, el epiplón, el peritoneo, el espacio subserosal, el intestino, el estómago o un bolsillo subcutáneo.

25 Para potenciar una mayor diferenciación, supervivencia o actividad de las células implantadas, los factores adicionales como, por ejemplo, los factores de crecimiento o los agentes antioxidantes o antiinflamatorios pueden administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de las células. En algunas materializaciones, los factores de crecimiento se utilizan para diferenciar las células administradas *in vivo*. Las células endógenas pueden segregarse estos factores los cuales se exponen a las células administradas *in situ*. Las células implantadas pueden inducirse para diferenciarse mediante cualquier combinación de factores de crecimiento administrados de forma endógena o exógena y que son conocidos en la materia.

30 La cantidad de células utilizadas en la implantación depende de un número de varios factores que incluyen la condición del paciente y su respuesta a la terapia y que un experto en la materia puede llegar a determinar.

35 En un aspecto, esta divulgación describe un método para tratar a un paciente que sufre o tiene riesgo de desarrollar una diabetes. Este método conlleva el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células cultivadas *in vitro*, en el interior de un linaje celular  $\beta$  y la incorporación de las células en un soporte tridimensional. Las células pueden conservarse *in vitro* en este soporte antes de su implantación en el paciente. Alternativamente, el soporte que contiene las células puede implantarse directamente en el paciente, sin un cultivo adicional *in vitro*. Opcionalmente, el soporte puede incorporarse con, al menos, un agente farmacéutico que facilite la supervivencia y la función de las células trasplantadas.

40 Los materiales de soporte adecuados para utilizarlos con los fines de la presente invención incluyen modelos de tejido, conductos, barreras y depósitos aptos para la reparación del tejido. En particular, los materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas que se han utilizado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar el tejido biológico, así como para llevar agentes quimiotácticos para inducir el crecimiento del tejido, son aptos para utilizarlos en la práctica de los métodos de la presente invención. Véanse, por ejemplo, los materiales divulgados en las patentes de EE. UU.: n° 5.770.417, n° 6.022.743, n° 5.567.612, n° 5.759.830, n° 6.626.950, n° 6.534.084, n° 6.306.424, n° 6.365.149, n° 6.599.323, n° 6.656.488, n° 4.557.264, n° 6.333.029 y en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0062753 A1.

45 Para formar un soporte con un agente farmacéutico incorporado, el agente farmacéutico puede mezclarse con la solución polimérica antes de formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico podría recubrirse sobre un soporte fabricado, preferiblemente en presencia de un portador farmacéutico. El agente farmacéutico puede estar presente como un líquido, un sólido minuciosamente dividido o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, se pueden añadir excipientes al soporte para alterar la tasa de liberación del agente farmacéutico. En otra materialización, se incorpora al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente antiinflamatorio como, por ejemplo, los componentes divulgados en la patente de EE. UU n° 6.509.369.

50 Se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente antiapoptótico como, por ejemplo, los componentes divulgados en la patente de EE. UU n° 6.793.945.

También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente inhibidor de la fibrosis como, por ejemplo, los componentes divulgados en la patente de EE. UU nº 6.331.298.

5 También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es capaz de potenciar la angiogénesis como, por ejemplo, los componentes divulgados en la solicitud de EE. UU publicada en 2004/0220393 y en la solicitud de EE. UU publicada en 2004/0209901.

10 También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente inmunosupresor como, por ejemplo, los componentes divulgados en la solicitud de EE. UU publicada en 2004/0171623.

15 También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un factor de crecimiento como, por ejemplo: miembros de la familia TGF- $\beta$  (incluye TGF- $\beta$ 1, 2 y 3), proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores 1 y 2 de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -15), factor de crecimiento celular derivado del endotelio vascular (VEGF), pleiotrophin y endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo: nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1 alfa, péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1, GLP-2 y 3, Exendin-4, Nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascin C, tropoelastina, péptidos derivados de la trombina, cathelicidins, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen células y dominios de unión a la heparina de proteínas adhesivas de la matriz extracelular como, por ejemplo, la fibronectina y la vitronectina, inhibidores de MAPK como, por ejemplo, los componentes que se divulgan en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0209901 y en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0132729.

25 La incorporación de las células de la presente invención en el interior de una matriz puede lograrse depositando, simplemente, las células en la matriz. Las células pueden introducirse en el interior de la matriz por simple difusión, *J. Pediatr. Surg.* 23 (1Pt 2), 3-9, 1988. Se han venido desarrollando otros enfoques para potenciar la eficiencia de la siembra celular. Por ejemplo, se han utilizado frascos de agitación en la siembra de condrocitos en matrices de ácido poliglicólico (*Biotechnol. Prog.* 14 (2), 139-202, 1998). Otro enfoque para las células de siembra es el uso de la centrifugación que produce un esfuerzo mínimo en las células sembradas y potencia la eficiencia de la siembra. Por ejemplo, Yang y otros autores desarrollaron un método de siembra celular (*J. Biomed. Mater. Res.* 55(3), 379-86, 2001) que se refiere a la inmovilización celular por centrifugación (CCI).

30 La presente invención se ilustra mejor aunque no queda limitada a los siguientes ejemplos.

35 **EJEMPLOS**

**Referencia: ejemplo 1**

40 **Cultivo de células madre de embriones humanos**

Las líneas H1, H7 y H9 de células madre de embriones humanos se obtuvieron en el Centro de Investigación WiCell, Inc., (Madison, Wisconsin) y se cultivaron según las instrucciones proporcionadas por el centro de origen. Resumiendo, las células se cultivaron en unas células sustentadoras de fibroblasto embrionario de ratón (MEF) en un medio celular ES que consiste en DMEM/F12 (Invitrogen/Gibco) suplementado con 20% de suero sustituto, 100 nM (MEM) de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina con 4 ng/ml de factor de crecimiento básico humano de fibroblastos (bFGF) (todos de Invitrogen/Gibco). Las células MEF, derivadas de E13 a 13,5 embriones de ratón, se adquirieron en Charles River. Las células MEF se expandieron en un medio DMEM suplementado con 10% de FBS (HyClone), 2 mM de glutamina y 100 mM (MEM) de aminoácidos no esenciales. Los cultivos de células MEF subconfluentes se trataron con 10  $\mu$ g/ml de mitomicina C (Sigma, St. Louis, Misuri) durante 3 horas de detención de la división celular, luego se tipsinizaron y se recubrieron a  $2 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup> en 0,1% de platos recubiertos de gelatina bovina. Las células MEF, que pasaron de ser dos a cuatro, se utilizaron como capas sustentadoras. Las células madre de embriones humanos recubiertas en capas sustentadoras celulares se cultivaron a 37° C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, en una incubadora de cultivo de tejido humidificado. Cuando confluyen (aproximadamente 5-7 días tras el recubrimiento), las células madre de embriones humanos se trataron con 1 mg/ml de colagenasa de tipo IV (Invitrogen/Gibco) durante 5-10 minutos y luego se raspó suavemente de la superficie utilizando para ello una pipeta de 5ml. Las células giraron durante 5 minutos a 900 rpm y el sedimento volvió a quedar suspendido y recubierto a una proporción de 1:3 a 1:4 células en un medio de cultivo fresco.

60 **Referencia: ejemplo 2**

**Formación del endodermo definitivo**

65 Se examinaron los efectos de la activina A en la expresión de los marcadores del endodermo definitivo. Se añadió activina A (100 ng/ml) a poblaciones de células madre de embriones humanos cultivadas en fibroblastos

embrionarios de ratón. Las células se cultivaron de forma continuada en presencia de activina A y se cosecharon en los tiempos indicados. Se examinó el nivel de expresión de los marcadores del endodermo definitivo mediante PCR (**figura 1**), FACS (resultados resumidos en la **tabla II**) e inmunohistoquímica (**figura 2**).

5 La activina A provocó un incremento dependiente del tiempo en la expresión del CXCR4, GATA4, HNF-3beta, Mixl-1 y Sox-17 mRNA en la línea H9 (**figura 1, panel a**). También se observó una regulación significativa hasta los marcadores del endodermo anterior: Cerberus, Otx-1 y los genes de Hex (**figura 1, panel b**). Se observó un incremento en la proteína CXCR4 mediante análisis por FACS, siguiendo un tratamiento con activina A. La expresión de E-cadherina y N-cadherina no cambió el tratamiento que se seguía con activina A (**tabla 11A**). Las células positivas del CXCR4 también fueron sumamente positivas para C-kit, EPCAM y CD99 y negativas para CD9. La pauta de expresión para estos marcadores fue constante entre las tres líneas hEs examinadas (**tabla 11B** para H7 y **tabla 11C** para H1). La inmunocitoquímica llevada a cabo en las células tratadas durante cinco días con activina A reveló que el 30%-40% de las células en el cultivo tratado eran positivas para Sox-17 y HNF-3beta. Paralelamente, casi el 100% de las células diferenciadas eran todavía positivas para Oct4 (**figura 2**). Con la reducción en la expresión de los marcadores de superficie de pluripotencia, combinada con un incremento en la expresión de los marcadores del endodermo definitivo, estos datos sugieren que la activina A promueve la diferenciación de las células madre de embriones humanos del endodermo definitivo.

20 **Referencia: ejemplo 3**

25 **Formación del endodermo pancreático**

Se añadieron los factores de crecimiento, conocidos por inducir la diferenciación de células madre de embriones humanos del endodermo pancreático, a los cultivos celulares. En particular, se añadieron a los cultivos celulares: activina A, bFGF y ácido retinoico, conocidos por inducir la formación del endodermo pancreático.

30 En las primeras series de experimentos se añadió activina A a las poblaciones de células madre de embriones humanos cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón y hasta siete días en DMEM/F12, suplementado con un 0% a 2% de suero y activina A (100 ng/ml). Las células se cosecharon en los momentos indicados en la **figura 3** y se ensayaron mediante PCR para la expresión de los genes mostrados (**figuras 3, 4 y 5**). En la **figura 3** el análisis de PCR indicó que las células tratadas con activina expresaron un amplio espectro de genes asociados con el desarrollo del endodermo y que incluye: GATA4 (**figura 3, panel a**), Sox-17 (**figura 3, panel b**), HNF-3beta (**figura 3, panel c**) y Mixl-1 (**figura 3, panel d**). Sin embargo, no se observó la expresión génica de Pdx1. Se observó la misma pauta de expresión de los marcadores del linaje del endodermo en activina A tratada con células H7 (**figura 6, paneles a al f**). En esta etapa no hubo una reducción significativa de la expresión de Oct4.

40 La activina A provocó una reducción dependiente del tiempo en la expresión de los marcadores Sox-7 del endodermo extraembrionario (**figura 4, panel a**) y AFP (**figura 4, panel b**). La activina A redujo la expresión de Brachyury (**figura 5, panel a**) pero no tuvo efecto en la expresión del marcador neuronal Zic1 (**figura 5, panel b**).

45 Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que la expresión incrementada de Sox-17, Mixl-1, GATA4 y HNF-3beta juntos, con la sobreexpresión de los anteriores marcadores del endodermo (Otx1, Cer1 y los genes de Hex), corresponde a la formación del endodermo definitivo en respuesta al tratamiento con activina A. El análisis de los marcadores del endodermo definitivo mediante inmunocitoquímica revelaron que la expresión de la proteína para estos genes reflejaba también las tendencias observadas en la expresión de mRNA. Los niveles de expresión para HNF-3beta, Sox-17 y GATA4 fueron bajos en las células sin tratar de, aproximadamente un 10% a un 20% de todas las células. El tratamiento durante cinco días con activina A (100 ng/ml) incrementó la expresión de HNF-3beta, Sox-17 y GATA4 hasta, aproximadamente, un 50% a un 90% de todas las células (**figura 7**).

50 En una segunda serie de experimentos, los cultivos de células madre de embriones humanos se conservaron en condiciones de cultivo indiferenciado durante 2-3 días, según los métodos descritos en el ejemplo 1. Una vez que las células fueron confluentes en un 70-80%, el medio cambió a DMEM/F12 con un 0 a un 2% de FB, con la adición de 100 ng/ml de activina A y se cultivaron en presencia de activina A durante cualquiera de los tres, cinco o siete días. Tras este intervalo de tiempo, las células se trataron adicionalmente durante cinco a seis días con combinaciones de ácido retinoico y bFGF, tal y como se muestra en la **figura 8**. Se cosecharon los cultivos y se recogieron muestras de mRNA para su análisis. También se incluyeron cultivos de control consistentes en células tratadas solo con activina A.

60 El análisis de expresión génica reveló que esa activina A o el ácido retinoico solos no inducían la expresión de Pdx1. Se observaron resultados similares en cultivos de células tratadas con ácido retinoico combinado con FGF y en presencia de activina A (**figura 8, panel a**). Sin embargo, el tratamiento de las células con ácido retinoico y FGF en ausencia de activina A incrementó todavía más la expresión de Pdx1 (**figura 8, panel a**). Se trataron las células, durante tres días, con activina A, luego se trataron durante cinco días con 1 µM de ácido retinoico y 50 ng/ml de bFGF (también conocido como FGF-2) en ausencia de activina A y se mostró un nivel de expresión de Pdx1 que fue de, aproximadamente, 3.500 veces superior que la observada en muestras con tratamiento de solo activina A

durante cinco días (**figura 8, panel a**). La inmunocitoquímica mostró que de un 5 a un 20% de todas las células expresaron Pdx1 (**figura 9**).

5 El tratamiento con con 1  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico y bFGF, en ausencia de activina A, también causó un incremento en la expresión de GLUT-2 y PTF1a (**figura 8, panel c**) que no se había observado en células tratadas en presencia de solo activina A. El mayor incremento en la expresión de GLUT-2 y PTF1a se observó en células tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico y 50 ng/ml de bFGF. Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que se potenció más la formación del endodermo pancreático mediante la extracción de la activina A de los cultivos celulares, tras la formación del endodermo definitivo.

10

**Referencia: ejemplo 4**

#### **Formación de las células endocrino pancreáticas**

15 Los cultivos de células madre de embriones humanos se conservaron en condiciones de cultivo indiferenciado durante 3-4 días, según los métodos descritos en el **ejemplo 1**. Una vez que las células fueron confluentes en un 50%-60%, el medio, que contiene 100 ng/ml de activina A, cambió a DMEM/F12 sin FBS y las células se cultivaron en este medio durante un día. Tras el primer día de cultivo, se extrajo el medio y se volvió a colocar con el medio que contiene 0,5% de FBS con 100 ng/ml de activina A y las células se cultivaron durante un día. Tras el segundo día de cultivo, se extrajo el medio y se volvió a colocar con el medio que contiene 2% de FBS con 100 ng/ml de activina A y las células se cultivaron durante un día. Tras este intervalo de tiempo, las células se trataron durante seis días con combinaciones de ácido retinoico y FGF, tal y como se recoge en la referencia 2, luego se extrajo el medio de cultivo y se volvió a colocar con el medio que se compone de DMEM/F12 con 2% de FBS y que contiene los inhibidores de  $\gamma$ -secretasa L-685,458, a 10  $\mu\text{M}$  durante tres días. Se cosecharon los cultivos y se recogieron muestras de mRNA para su análisis. También se incluyeron los cultivos de control consistentes en células tratadas solo con activina A durante cinco días.

20

25

Los análisis de expresión génica revelaron que esa activina A, sola o combinada con ácido retinoico y FGFs, no indujo la expresión de Ngn3 o insulina (**figura 10, paneles a y c**). También se observó una reducción en la expresión de Hes-1, siguiendo el tratamiento con L- 685,458. La máxima inhibición se observó el tercer día posterior al tratamiento (**figura 10, panel d**). Sin embargo, el tratamiento de células con L-685,458 indujo la expresión de Ngn3 a , aproximadamente, un nivel 50 veces superior que el observado en las muestras tratadas solo con activina A o ácido retinoico combinado con FGFs. Se observó un incremento de 70 veces en la expresión de insulina en las muestras tratadas con el inhibidor de  $\gamma$ -secretasa. La expresión de NeuroD1 también se incrementó más gracias al tratamiento con L- 685,458 (**figura 10, panel a**). Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que la formación de las células endocrinas se potencia más mediante la extracción del ácido retinoico y FGFs del cultivo celular y por la adición de inhibidores de  $\gamma$ -secretasa tras la formación del endodermo pancreático.

30

35

**Referencia: ejemplo 5**

40

#### **Formación de las células endocrino pancreáticas que expresan Nkx2,2**

Las células del endodermo definitivo se obtuvieron según los métodos que se recogen en la referencia (ejemplo) 2 donde se trataron como sigue: las células se cultivaron en un medio basal que se compone de DMEM/F12 con 2% de FBS más 50 ng/ml de activina A, 50 ng/ml de FGF básico y 1  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico durante tres a cinco días. Las células se cultivaron de forma continuada durante otros tres a cinco días, en un medio basal con solo 1  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico o con bFGF. Las muestras de RNA se cosecharon a partir de células en varios momentos de este proceso para ayudar a evaluar la diferenciación dirigida de las células. Además, el medio de cultivo y los factores se extrajeron regularmente y se repusieron a lo largo del protocolo de diferenciación. La adición de activina A mostró un incremento de unas 35 veces en la expresión de Nkx2,2, si se compara con las muestras sin activina A. Las muestras tratadas con activina A durante los tres primeros días de cultivo conservaron la expresión de Pdx1a un nivel similar al de las muestras que no contienen activina A (**figura 11**). Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que la expresión del marcador endocrino pancreático Nkx2,2 se potencia más mediante la adición de activina A en los tres primeros días del tratamiento con ácido retinoico y bFGF.

45

50

55

#### **Ejemplo 6**

##### **Paso y expansión de las células del endodermo pancreático en cultivo**

60 Este ejemplo demuestra que las células del endodermo pancreático derivadas de células madre de embriones humanos descritas aquí pueden conservarse en un cultivo celular y pasar sin mayor diferenciación. Las células del endodermo pancreático se diferenciaron en presencia de 100 ng/ml de activina A y en baja concentración de suero DMEM/F12. La baja concentración de suero DMEM/F12 contenía 0% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) en el día 1, 0,5% (v/v) de FBS en el día 2 y 2% (v/v) de FBS cada día que siguió. Tras cuatro días de diferenciación, las células se cultivaron en baja concentración de suero DMEM/F12 que contenía 2% (v/v) de FBS, 1  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico y 50 ng/ml de bFGF durante un total de más de seis días. Tras los seis días de diferenciación, las células se

65

conservaron en cultivo con baja concentración de suero DMEM/F12 y que contenía 2% (v/v) de FBS, en presencia de 50 ng/ml de FGF10 y durante un total de seis días. Durante el período de cultivo de seis días, las células del endodermo pancreático pasaron dos veces y el tiempo de duplicación de la población celular es de unas 36 a 48 horas durante este sexto día de cultivo. En los días 0, 3 y 6 de cultivo, el Q-PCR se utilizó para medir la expresión de los genes marcadores indicativos del endodermo pancreático. La **figura 12** muestra que las células que crecieron en presencia de 50 ng/ml de FGF10 conservaron la expresión del marcador del endodermo pancreático Pdx1 durante el período de cultivo del sexto día posterior a su derivación.

#### Referencia: ejemplo 7

#### Derivación de los hepatocitos a partir de células madre de embriones humanos

Los cultivos de células madre de embriones humanos se conservaron en condiciones de cultivo indiferenciado durante 2-3 días, según los métodos descritos en la referencia (ejemplo) 1. Una vez que las células fueron confluentes en un 70-80%, el medio cambió a DMEM/F12 con 2% de FBS que contiene 100 ng/ml de activina A y las células se cultivaron en presencia de activina A durante siete días. Tras siete días de tratamiento con activina A, las células se trataron durante cinco días en las condiciones mostradas en la **figura 13**. Tras este tiempo, se cosecharon las células y se recogieron muestras de mRNA para su análisis.

Se observó un incremento en la expresión de la alfa-fetoproteína (AFP) y de la albúmina (**figura 13, panel a**) para células cultivadas en ausencia de activina A. Este incremento fue mayor por el ácido retinoico y el FGF-4 (**figura 13, panel b**). Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que los cultivos de células madre de embriones humanos son capaces de expresar marcadores de hepatocitos siguiendo el tratamiento descrito más arriba. Además, las células madre de embriones humanos son capaces de diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores que son característicos de los hepatocitos.

#### Referencia: ejemplo 8

#### Caracterización de la línea H9 de células madre de embriones humanos

La calidad de las células H9 se monitorizó a lo largo del tiempo mediante la evaluación de la expresión de varios marcadores expresados por células ES (células madre de embriones humanos), Carpenter y otros autores, 2001; Reubinoff y otros autores, 2000; Thomson y otros autores, 1998a. Las células H9 manifestaron una expresión recíproca de antígenos embrionarios de etapa específica (**tabla III**). Las células H9 representan una fuerte inmunoreactividad para SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, AP y antígenos CD9, todos los cuales son característicos de las células madre indiferenciadas de embriones humanos.

La RT-PCR se realizó para valorar la expresión de los genes característicos de las células madre embrionarias como, por ejemplo, Oct3/4, Sox-2, UTF-1, REX-1, Cx43, Cx45, ABCG-2 y TERT que confirman que las células que crecieron en este ejemplo parecían similares a las células madre indiferenciadas embrionarias descritas previamente (**tabla III**). La expresión de la proteína Oct3/4 y la actividad fosfatasa alcalina (Chemicon) se confirmaron mediante inmunotinción. Una mayoría de células de H9 fueron positivas para Oct3/4 y AP (**figura 14**). Generalmente, estos resultados demuestran que las células H9 utilizadas en este ejemplo no eran significativamente diferentes en su morfología, inmunotinción de antígenos o expresión del marcador de pluripotencia cuando se compararon con los informes de otros laboratorios.

#### Referencia: ejemplo 9

#### Análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

Se extrajeron las células adheridas de la placa de cultivo mediante una incubación de cinco minutos con la solución TrypLE™ Express (Invitrogen, California). Las células liberadas se volvieron a suspender en un medio de cultivo de células madre de embriones humanos y se recuperaron mediante centrifugación, seguida del lavado y la resuspensión de las células en un tampón de tinción consistente en 2% de BSA y 0,05% de ázida sódica en PBS (Sigma, Missouri). Según proceda, las células se bloquearon durante 15 minutos con el receptor de Fc utilizando un 0,1% de solución de y-globulina (Sigma). Las alícuotas (aproximadamente 105 células) se incubaron con cualquier anticuerpo monoclonal conjugado de ficoeritrina (PE) o alofocianina (APC) (5µl de anticuerpos por 106 células), tal y como se indica en la **tabla I** o con anticuerpos primarios no conjugados. Los controles incluyeron anticuerpos de isotipo combinados apropiados, células no teñidas y células teñidas solo con anticuerpos secundarios no conjugados. Todas las incubaciones con anticuerpos se realizaron durante 30 minutos a 4°C, después de lo cual se lavaron las células con el tampón de tinción. Las muestras que se tiñeron con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante otros 30 minutos a 4°C con anticuerpos secundarios conjugados marcados con PE o APC. Véase la **tabla I** con una lista de los anticuerpos secundarios utilizados. Las células lavadas se sedimentaron y se volvieron a suspender en el tampón de tinción y se identificaron las moléculas de la superficie celular utilizando para ello un instrumento de FACS Aria (BD Biosciences) que recoge, al menos, 10.000 pruebas.

**Referencia: ejemplo 10****Inmunocitoquímica**

5 Las células que se sembraron en platos recubiertos de 0,1% de Matrigel (BD) se fijaron con 4% de paraformaldehído, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Se bloquearon las células fijadas, durante una hora y a temperatura ambiente, con 0,1% de PBS, 10% de BSA, 0,5% de suero normal de pollo Triton-X-100 y luego se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios en suero normal de pollo, con 0,1% de PBS y 10% de BSA a 4°C. En la **tabla IB** se muestra la lista de los anticuerpos primarios y sus diluciones de trabajo. Tras tres lavados en 0,1% de PBS y BSA, los anticuerpos secundarios fluorescentes en una dilución de 1:100 en PBS se incubaron con células, durante una hora y a temperatura ambiente, para permitir la unión. Las muestras de control incluyeron reacciones donde se omitió el anticuerpo primario o se sustituyó por las correspondientes inmonoglobulinas combinadas de control negativo en la misma concentración que los anticuerpos primarios. Se aclararon las muestras teñidas; se añadió una gota de PROLONG® (Invitrogen, California), que contiene diamino-2-fenilindol, dihidroclorido (DAPI), a cada muestra para la contratiñencia del núcleo y para su función como reactivo antifade. Las imágenes se tomaron utilizando para ello una Nikon Confocal Eclipse C-1 con microscopio invertido (Nikon, Japón) y con un objetivo de 10-60x.

**Referencia: ejemplo 11****Análisis de PCR de las células indiferenciadas**

25 Extracción de RNA, purificación y síntesis del ADNc. Las muestras de RNA se purificaron mediante la unión con una membrana de gel de sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, California) en presencia de un etanol que contiene un tampón hipersalino, seguido del lavado para extraer contaminantes. Se purificó más el RNA utilizando para ello un kit TURBO libre de ADN (Ambion, Inc.) y luego, se eluyó en agua un RNA de alta calidad. El rendimiento y la pureza se valoraron mediante las lecturas de A260 y A280 en un espectrofotómetro. Los ADN copia (ADNc) se hicieron a partir de RNA purificados, utilizando para ello un kit de archivo ABI (ABI, California) de ADNc de alta capacidad.

30 Amplificación de PCR en tiempo real y análisis cuantitativo. A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos se adquirieron en Applied Biosystems. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando para ello el sistema de detección secuencial ABI PRISM®7900. Se utilizó el TAQMAN® UNIVERSAL PCT MASTER MIX® (ABI, California) con 20 ng de transcriptasa inversa de RNA, en un volumen de reacción total de 20 µl. Cada muestra de ADNc se ensayó por duplicado para corregir errores de la pipeta. Los iniciadores y las sondas TAQMAN® marcadas con FAM se utilizaron en concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen diana se normalizó utilizando para ello gliceraldehído humano-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), control endógeno previamente desarrollado por Applied Biosystem. Los juegos de iniciadores y sondas se enumeran como sigue: Oct3/4 (Hs00742896), Sox-2 (Hs00602736), UTF-1 (Hs00747497), Rex-1 (Hs00399279), Connexin 43 (Hs00748445), Connexin 45 (Hs00271416), ABCG2 (Hs00184979), Tert (Hs00162669), HNF- 3β (Hs00232764), GATA4 (Hs00171403), Mixl1 (Hs00430824), Sox-7 (Hs00846731), AFP (Hs00173490), Brachyury (Hs00610080), GSC (Hs00418279\_ml), Pdx-1 (Hs00426216), PTF1a (Hs00603586), Ngn3(Hs00360700), NeuroD1 (Hs00159598), insulina (Hs00355773) y Glu2 (Hs00165775). Los iniciadores Sox-17 se diseñaron utilizando para ello el programa de iniciadores (ABI, California) y donde se encuentran las siguientes secuencias: TGGGGCAGCAGATACCA (ID SEC. n°:1), AGCGCCTTCCACGACTTG (ID SEC. n°: 2) y CCAGCATCTTGCTCAACTCGGCG (ID SEC. n°: 3). Tras una incubación inicial a 50°C durante 2 minutos le siguió otra a 95°C durante 10 minutos, las muestras se sometieron 40 veces a ciclos en dos etapas: una fase de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, seguida de una fase de hibridación-extensión a 60°C durante 1 minuto. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando para ello el programa de sistema de detección secuencial GENEAMP®7000. Para cada juego de iniciadores y sondas se determinó un valor C<sub>t</sub> como número de ciclo al cual la intensidad fluorescente alcanzó un valor específico en mitad de la región exponencial de la amplificación. Los niveles de la expresión génica relativa se calcularon utilizando el método comparativo C<sub>t</sub>. Resumiendo, para cada muestra de ADNc, el control endógeno de valor C<sub>t</sub> se sustrajo a partir del gen de interés C<sub>t</sub> para dar el valor delta C<sub>t</sub> (ΔC<sub>t</sub>). La cantidad normalizada de la diana se calculó como 2<sup>-ΔC<sub>t</sub></sup>, suponiendo que la amplificación es 100% eficiente. Los datos finales se expresaron en relación a una muestra de calibrador.

**Referencia: ejemplo 12****Análisis de cariotipos**

60 El cariotipo de las células H9 se determinó mediante un análisis estándar de cariotipos con bandeado G. Se evaluaron un total de 100 metafases extendidas (Laboratorios Applied Genetics, Inc.). En las 100 células analizadas no se encontraron aberraciones cromosómicas. El análisis citogenético demostró que las células tenían un número normal de autosomas y un número modal de cromosomas de 46. La figura 15 representa un ejemplo típico de cariotipo obtenido a partir de la línea celular H9 de células madre de embriones humanos.

**Referencia: ejemplo 13**

### **Cultivo de células madre de embriones humanos en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular**

5 Las líneas H1, H7 y H9 de células madre de embriones humanos se obtuvieron en el Centro de investigación WiCell, Inc. (Madison, Wisconsin) y se cultivaron según las instrucciones proporcionadas por el centro de origen. Resumiendo, las células se cultivaron en células sustentadoras del fibroblasto embrionario de ratón (MEF) en un medio celular ES consistente en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) complementado con un 20 % de sustitución de suero por explosión, 100 nM MEM de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM beta-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina con factor de crecimiento de fibroblasto básico humano de 4ng/ml (bFGF). Las células MEF, derivadas de embriones de ratón de E13 a 13,5, se adquirieron a Charles River. Las células MEF se expandieron en un medio DMEM complementado con un 10 % de FBS (Hyclone), 2mM de glutamina y 100 mM MEM aminoácidos no esenciales. Los cultivos de células MEF sub-confluentes se trataron con 10 µg/ml de mitomicina C (Sigma, St. Louis, MO) durante 3 horas para detener la división celular y a continuación se tripsinizaron y prensaron a 2x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> en placas con cobertura de gelatina bovina al 0,1 %. Las células MEF del fragmento dos al cuatro se usaron como capas sustentadoras. Las células madre embrionarias humanas prensadas en capas sustentadoras de células MEF se cultivaron a 37 ° C en una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada de cultivos de tejidos humanos. Cuando se trataron células madre embrionarias humanas confluyentes con 1 mg/ml de colagenasa tipo IV (Invitrogen/GIBCO) durante 5-10 min y a continuación se raspó la superficie con cuidado usando una pipeta de vidrio de 5 ml. Las células se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos y el sedimento se volvió a suspender y prensar a una proporción de 1:3 a 1:4 de células sobre placas cubiertas con una dilución de 1:30 de MATRIGEL™ (BD Biosciences) reducido por factor de crecimiento. A continuación, las células se cultivaron en un medio condicionado por MEF complementado con 8 ng/ml de bFGF y colagenasa pasada por placas con capa de MATRIGEL por lo menos cinco veces. Las células cultivadas en MATRIGEL™ se pasaron rutinariamente con colagenasa IV (Invitrogen/GIBCO), Dispase (BD Biosciences) o enzima Liberase (Roche, IN).

#### **Referencia: Ejemplo 14**

### **Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos cubierto con matriz extracelular a endodermo definitivo**

30 La diferenciación de células madre embrionarias a endodermo definitivo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (diciembre de 2005). Brevemente, se expusieron cultivos de H9 con una confluencia de 60 a 70% a un medio de DMEM:/F12 complementado con un 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días, y a continuación se trataron con medio DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Las células de H9 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL reducido por factor de crecimiento a una dilución de 1:30 a 1:10 o en MATRIGEL normal a una dilución a 1:30 a 1:10. Las placas se recubrieron con MATRIGEL durante 1 hora a temperatura ambiente.

40 El día 5 se analizaron los cultivos por medio de FACS por expresión de CXCR4, E-cadherina, CD9, y N-cadherina y en PCR de tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (Bry), goosecoide (GSC), HNF-3 beta y GATA4. AFP y SOX-7 se ven como marcadores endodérmicos viscerales, mientras que GATA4, HNF-3 beta y SOX-17 representan marcadores endodérmicos definidos y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de línea primitiva. La **Figura 17** describe la expresión de CXCR4 por FACS. Ha habido un aumento significativo en la expresión de CXCR4 por células cultivadas en placas cubiertas con MATRIGEL a una dilución de 1:10 en comparación con concentraciones más bajas de MATRIGEL. Además, el MATRIGEL reducido por factor de crecimiento no ha sido tan eficaz en la formación de células endodérmicas definitivas en comparación con el MATRIGEL normal.

50 La **Figura 18** muestra los resultados de PCR en tiempo real que demuestran que las células cultivadas en placas recubiertas con una dilución de 1:10 de MATRIGEL mostraron un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con las células cultivadas en una dilución de 1:30 de MATRIGEL.

#### **Referencia: Ejemplo 15**

### **Análisis de micromatriz de los cambios en la expresión genética de las células madre embrionarias tras la formación de endodermo definitivo**

60 El ARN total se aisló de los siguientes cultivos de células madre embrionarias usando un mini kit RNeasy (Qiagen): células H9P83 cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL y expuestas a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 suplementado con 2 % FBS y 100 ng/ml Activina A (AA) tres días más; células H0P44 cultivadas en MEFs y expuestas a medio DMEM/F12 complementadas con 0,5 % FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A otros tres días. Los controles para cada grupo incluyeron células prensadas en placas recubiertas con MATRIGEL y cultivadas en un medio condicionado por MEF o células prensadas en MEFs y cultivadas en un medio ES.

La preparación, hibridización de la muestra y el análisis de la imagen se llevaron a cabo de acuerdo con la matriz Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0. Tras la normalización y transformación logarítmica, se llevó a cabo el análisis de datos usando software OmniViz® (MA) y GENESIFTER (VizXLabs, WA). La variabilidad dentro de cada tratamiento y entre los diferentes tratamientos se comparó usando el coeficiente de correlación Pearson. La variación en los perfiles de expresión genética entre los diferentes tratamientos junto con el coeficiente de correlación entre las líneas se muestra en la **Figura 19**. Se evaluaron diferencias significativas en la expresión genética entre las muestras usando el análisis de la variación y un test-F con un valor-P ajustado (corrección de Benjamini y Hochberg) de  $\leq 0,05$ . Solo se incluyeron en el análisis genes que figuraron. La **Tabla IV** muestra los genes que se expresan de forma diferencial con una diferencia de por lo menos 5 entre los varios ejemplos. Se muestra el valor de intensidad normalizada de los genes que se expresan de forma significativa junto con el valor estándar del medio (SEM) para cada gen.

#### Referencia: Ejemplo 16

#### 15 **Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos cubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo**

La diferenciación de células madre embrionarias a endodermo definitivo se llevó a cabo como se ha descrito previamente en Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (diciembre de 2005). Brevemente, las células H9, H7 o H1 sembradas en cultivos de MATRIGEL™ reducido por factor de crecimiento (dilución 1:30) a una confluencia de aproximadamente 60 a 70 % se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) durante dos días, tras tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. En todos los ejemplos posteriores, a no ser que se indique lo contrario, este régimen de tratamiento se denominará protocolo de endodermo definitivo (DE). Paralelamente, células H9, H7 o H1 cultivadas en distribuidores MEF también se expusieron al mismo protocolo DE indicado anteriormente.

El día 5, los cultivos se analizaron con FACS para expresión de CXCR4, E-cadherina, CD9, CD99 y N-cadherina (CD56) y con PCR en tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (BRy), goosecoide (GSC), HNF-3 beta y GATA4. AFP y SOX-7 se consideran marcadores endodérmicos viscerales, mientras que GATA4, HNF-3beta y SOX-17 representan marcadores endodérmicos definitivos y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de línea primitiva.

Las líneas H cultivadas en distribuidores de ratón y expuestas al protocolo DE tuvieron como resultado una expresión robusta de marcadores DE y expresión de CXCR4 por FACS (**Figura 20**). La **Figura 21** muestra un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con H7 sin tratar (**Figura 21, panel a**) y células H9 (**Figura 21, panel b**).

A diferencia de las líneas H cultivadas en distribuidores MEF, las líneas H cultivadas en MATRIGEL™ (dilución 1:30) y tratadas con el protocolo endodérmico definitivo no mostraron expresión robusta de marcadores endodérmicos definitivos. En concreto, la expresión de CXCR4 por FACS y PCR en tiempo real fue considerablemente más baja para las células cultivadas en MATRIGEL™ en comparación con las células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón. La expresión de marcadores endodérmicos definitivos sigue a un patrón general de respuesta en el que H1 es mayor que H9, que es mayor que H7 (**Figuras 22 y 23**). A partir de la **Figura 22**, las células H1 mostraron un aumento significativo en la expresión de CXCR4 en comparación con las líneas H7 y H9. Nótese que en todos los casos la expresión de CXCR4 fue menor para células cultivadas en MATRIGEL™ (dilución 1:30) en comparación con células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón. La **Figura 23 (paneles a-c)** muestra los resultados del PCR en tiempo real que muestran que ha habido un incremento modesto del aumento de los marcadores endodérmicos definitivos en las líneas de H7 (**Figura 23, panel a**) y H9 (**Figura 23, panel b**). De todas formas, la línea de H1 (**Figura 23, panel c**) mostró un aumento más sólido de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con las líneas H7 y H9.

#### Referencia: Ejemplo 17

#### 55 **Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo (DE)- papel de los ligandos Wnt**

Las células madre embrionarias H7P44 y H9P46 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:10) y se expusieron a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. En algunos de los cultivos, se añadió 20 ng/ml Wnt-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN), 20 ng/ml Wnt-5a (Catálogo# 3008-WN-025, R&D Systems, MN) o 25 ng/ml Wnt-5b (Catálogo# 3006-WN-025, R&D Systems, MN) a lo largo del tratamiento de cinco días. La **Figura 25** muestra imágenes de contraste de las fases del cultivo de endodermo definitivo de H9P46 en presencia de altas concentraciones de (a) AA o (b) AA+20 ng/ml Wnt-3a. La **Figura 25** muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 para H7P44 y líneas H9P46 cultivadas en MATRIGEL™ (dilución 1:30) y expuestas al protocolo DE + Wnt-3a

(Figura 25, paneles b y d) y Wnt-3a (Figura 25, paneles a y c). La presencia de Wnt-3a en cultivos DE tuvo como resultado la expresión sólida de CXCR4 (CD184) en comparación con cultivos DE tratados con bajo nivel de suero de más alta concentración de AA. La Figura 26 muestra los datos de PCR en tiempo real para los cultivos de a) H7 y b) H9 tratados con ligandos de + AA +/- Wnt de bajo suero. Para las dos líneas H, la adición de WNT-3a tuvo como resultado un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos. En contraste, Wnt 5a, Wnt-5b y Wnt-7a tuvieron un impacto mínimo sobre la expresión de los marcadores endodérmicos definitivos.

#### Referencia: Ejemplo 18

#### 10 Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos con MATRIGEL™ a endodermo definitivo: dosis eficaz de Wnt-3a

15 Las células madre embrionarias se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (1:10) y se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de Activina A (AA) y 10-50 ng/ml de Wnt-3a (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) y 10-50 ng/ml de Wnt-3a otros tres días. Los cultivos de control no se trataron con Wnt-3a. La Figura 27, panel a muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 en ausencia de Wnt-3a, b) 10 ng/ml Wnt-3a, c) 20 ng/ml Wnt-3a y d) 50 ng/ml Wnt-3a. En ausencia de Wnt-3a, la expresión de CXCR4 fue muy baja. En contraste, la adición de 10-50 ng/ml de Wnt-3a incrementó de forma significativa el número de células positivas CXCR4. Además, la adición de 10 ng/ml de Wnt-3a fue tan eficaz como la adición de 50 ng/ml de Wnt-3a. Los resultados de PCR en tiempo real (Figura 28, panel a) también confirman este resultado.

25 En un estudio independiente, las células H9p52 se prensaron en MATRIGEL™ de factor de crecimiento bajo 1:30. Los primeros 2 días del protocolo DE, se usó un rango de dosis de Wnt3a: 10 ng/ml, 5 ng/ml y 1 ng/ml. La Figura 28, panel b muestra el análisis por PCR de los marcadores DE tras 5 días de tratamiento. El número de células al final del experimento se indica en la Figura 28, panel c. Esto indica que las células proliferan cuando se usan dosis más altas de Wnt-3a. La extensión de 5 días de tratamiento Wnt3a (5D) tuvo escaso efecto sobre los marcadores DE por PCR y no tuvo un aumento significativo de los números celulares (Figura 28, panel c). Estos datos indican que 10 ng/ml Wnt3a durante dos días es suficiente para obtener una expansión celular óptima y una diferenciación endodérmica definitiva.

#### Referencia: Ejemplo 19

#### 35 Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos con MATRIGEL™ a efecto de endodermo definitivo (DE) de inhibidor GSK-3B

40 Para confirmar que el efecto de Wnt-3a se llevó a cabo por la vía de Wnt, se usó un inhibidor de GSK-3 para activar los objetivos inferiores de Wnt, como la catenina beta. Las células madre embrionarias H9P46-48 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:10) y se expusieron a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de activina-A (AA) y un inhibidor IX 10-100 nM GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA), durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % FBS, 100 ng/ml activina A (AA) y 0-1000 nM GSK-3B inhibidor IX (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA) otros tres días. Los cultivos de control se trataron con una dosis de suero bajo más otra de suero alto de activina A +/- Wnt-3a. La Figura 29, panel a muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 en ausencia de Wnt-3a o inhibidor de GSK-3B, b) +20 ng/ml Wnt-3a, c) +1000 nM GSK-3B inhibidor IX, d) +500 nM GSK-3B inhibidor IX, e) +100 nM GSK-3B inhibidor IX, f) +10 nM GSK-3B inhibidor IX, g) +100 nM GSK-3B inhibidor IX para los días 1-2 y h) +10 nM GSK-3B inhibidor IX los días 1-2.

50 En ausencia de Wnt-3a o en un inhibidor 10 nm GSK-3B, la expresión de CXCR4 fue muy baja. En contraste, la adición de 20 ng/ml de Wnt-3a o inhibidor de 100-1000 nM GSK-3B aumentó de forma significativa el número de células positivas CXCR4. Además, la adición de inhibidor de 100 nM GSK-3B los días 1-2 fue tan eficaz como la adición de inhibidor 100 nM GSK-3B durante el período de cinco días completo. La Figura 30 muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos para células H9P48 del (panel a) y células H9P46 del (panel b).

55 La Figura 16 muestra el esquema de un protocolo de diferenciación en esta invención, mientras que las células madre embrionarias se diferencian en el endodermo definitivo en un sistema sin distribuidor.

#### Referencia: Ejemplo 20

#### 60 Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a dosis eficaz de endodermo definitivo (DE)- de Activina A en presencia de inhibidor de GSK-3B o Wnt-3A

65 Las células madre embrionarias H9P49 y H1P46 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (Dilución 1:10) y se expusieron a un medio DMEM/F12 complementadas con 0,5 % FBS, 10-100 ng/ml de activina A (AA) y

100 nM de inhibidor IX GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA) o 20 ng/ml de Wnt-3a durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS, 10-100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los cultivos de control se trataron con suero bajo más 100 ng/ml de activina A. La **Figura 31** muestra la expresión de CXCR4 por FACS para H9P49 y H1P46 el día 5 con a) 10 ng/ml activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los primeros dos días, b) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días c) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días d) 10 ng/ml de activina A los cinco días más 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días, e) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días, y f) 10 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días. La **Figura 31 paneles a-d** se refiere a las células H9P49 y los **paneles e-f** se refieren a las células H1P46. La **Figura 32** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos para cultivos de H9P49 tratados con 10, 50 o 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a: **panel a**: expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (oct-4) y **panel b**: SOX-17 y GATA4, que no suman. Parece ser un problema con las cifras o podría ser un problema derivado de cortar y pegar. Parece que la expresión sólida de los marcadores endodérmicos sólidos puede obtenerse usando 50 ng/ml de AA + 20 ng/ml de Wnt-3A o inhibidor 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B. Las dosis más bajas de activina A provocan la formación de endodermo extraembrionario.

#### Referencia: Ejemplo 21

#### 20 Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a combinación (DE)- de endodermo definitivo de Wnt-3a e inhibidor GSK-3B

Las células madre embrionarias H9P53 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) y 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA), +/- 20 ng/ml de Wnt-3a durante dos días seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS, 10-100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Paralelamente, los cultivos de H9P53 se trataron con 25 ng/ml de PMP-4 (Catálogo# 314-PB-010, R&D Systems, MN) +/- 20 ng/ml de Wnt-3A +/- 100 ng/ml de activina A. Los cultivos de control se trataron con suero bajo más 100 ng/ml de activina A. La **Figura 33** muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 con a) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días y 25 ng/ml de BMP-4 los días 3-5, b) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los primeros dos días c) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días d) 20 ng/ml de Wnt-3a + 25 ng/ml de BMP-4 los cinco días, e) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A + 100 nm de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días y f) 100 ng/ml de activina A + 25 ng/ml de BMP-4 los cinco días. La **Figura 34** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos, como viene determinado por PCR en tiempo real para los cultivos de la línea H1 de células madre embrionarias humanas en el pasaje 46, tratado con 10 o 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a o 100 nM de inhibidor de GSK-3B: panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC y POU5F (Oct-4) y panel (b): SOX-17, HNF-3B y GATA4. Los resultados se expresan en forma de aumento a respecto de las células no tratadas. La **Figura 35** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos, como determina el PCR en tiempo real para los cultivos de la línea H9 de células madre embrionarias en el pasaje 49, tratado con 50 o 100 ng/ml de activina A más 10 o 100 nM de inhibidor de GSK-3B: panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (Oct-4) y panel (b): SOX-17 y GATA4. Los resultados se expresan en forma de aumento a respecto de las células no tratadas. La **Figura 36** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos para el cultivo de H9P53 tratado con combinaciones de activina A, Wnt-3a, inhibidor de GSK-3 y BMP-4: a) expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y SOX7 y b) SOX-17, HNF-3B y GATA4. La adición de BMP-4 al protocolo DE parece inducir la formación de marcador mesodérmico BRY y la combinación de Wnt-3A e inhibidor GSK-4B no produce un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con la adición de cada agente por sí mismo en presencia de activina A.

#### 50 Referencia: Ejemplo 22

#### Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en MEFs a combinación de endodermo definitivo (DE)- de Wnt-3a, Activina A, Wnt-5a, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, IL-4 y SDF-1 en suero bajo

Las células H9P44 se prensaron en 6 placas previamente recubiertas con fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (MEF). Las células se cultivaron hasta confluencia de 70 a 80 % en un medio de célula ES que consiste en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) complementado con 20 % de sustitución de suero desactivado, 100 nM MEM de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de beta-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina (todos a partir de Invitrogen/GIBCO) y 8 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico humano (bFGF) (R&D Systems).

Para la formación de DE, se trataron células en presencia o ausencia de Activina A (100 ng/ml) además de otros factores de crecimiento que se detallan a continuación. Se añadieron factores de crecimiento a la concentración en aumento de FBS paso a paso de la forma que se indica a continuación:

Día 0: 0 % FBS en DMEM/F12  
 65 Día 1: 0,5 % FBS en DMEM/F12  
 Día 2: 2 % FBS en DMEM/F12

Día 3: Las células se recogieron para análisis FACS y RT-PCR.

Todos los factores de crecimiento se adquirieron a R&D Systems, MN. A continuación se muestra una descripción y concentración detallada de los factores de crecimiento para cada uno de los grupos de tratamiento:

- 5 1. Control – no se ha añadido factor de crecimiento
2. Activina A (100 ng/ml)
3. Activina A (100 ng/ml) + Wnt-3a (10 ng/ml) + Wnt5a (10 ng/ml)
4. Activina A (100 ng/ml) + Wnt-3a (10 ng/ml) + Wnt5a (10 ng/ml) + BMP2 (100 ng/ml)
- 10 5. Activina A (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml)
6. Activina A (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml)
7. Activina A (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
8. Activina A (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
9. IL-4 (10 ng/ml)
10. SDF1a (20 ng/ml)
- 15 11. Activina A (100 ng/ml) + IL-4 (10 ng/ml) + SDF1a (20 ng/ml)
12. BMP2 (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
13. Activina A (100 ng/ml) BMP-2 (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
14. Activina A (100 ng/ml) + IL-4 (10 ng/ml)
15. Activina A (100 ng/ml) + SDF1a (20 ng/ml)
- 20 16. Activina A (100 ng/ml) + Wnt-3a (10 ng/ml) + Wnt-5a (10 ng/ml) + Wnt-7a (10 ng/ml)
17. Activina A (100 ng/ml) + IL-4 (10 ng/ml) + SDF1a (20 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml)

#### Resultados:

- 25 Las células se recogieron el Día 3 del tratamiento con protocolo DE. Para su análisis, se usó una parte alícuota de células tratadas para la preparación de ARN para RT-PCR y el resto de las células se usó para análisis por FACS. La frecuencia (%) de CXCR4 se muestra en la **Figura 37**. La adición de los sistemas de crecimiento anteriores no mejoró la expresión del tratamiento anterior por CXCR4 con 100 ng/ml AA en suero bajo.
- 30 Para el análisis por RT-PCR, las células se analizaron para la expresión de un panel seleccionado de marcadores endodérmicos definitivos. Los resultados que se muestran se calibraron sobre células que crecieron en el medio base pero no se trataron con Activina A o cualquier otro de los factores de crecimiento. De acuerdo con los datos FACS, la **Tabla V** muestra que no ha habido un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos por adición de factores de crecimiento, como Wnt-3A a cultivos tratados con una alta dosis de activina A en suero bajo. Contrasta con los ejemplos previos, que muestran un aumento significativo de los marcadores DE para células ES cultivadas en condiciones sin distribuidor en presencia de activina A, WNT3A y suero bajo.

#### Referencia: Ejemplo 23

- 40 **Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ o fibronectina humana a endodermo definitivo (DE)**

Las células H9P55 se cultivaron y diferenciaron en fibronectina humana o factor de crecimiento normal MATRIGEL™ (BD Biosciences). Se añadió 1 ml de DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) con 1 ug/ml de fibronectina humana (R&D Systems, MN) a cada recipiente de cada 6 placas de cultivo de tejido tratado. De forma alternativa, el factor de crecimiento MATRIGEL™ normal se diluyó 1:10 en DMEM/F12 y se añadió 1 ml de MATRIGEL™ diluido a cada recipiente de 6 placas de cultivo de cultivo de tejido tratado. Las células se pasaron con colagenasa. Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se trataron de la siguiente manera: 2 días de 0,5 % de FBS con 10 ng/ml de Wnt3a (R&D) recombinante de ratón y 100 ng/ml de Activina A (R&D). A continuación, 3 días de 2 % de FBS más 100 ng/ml de Activina A. La **Figura 38, paneles a-b** muestran la expresión de CXCR4 por células madre embrionarias cultivadas en fibronectina y MATRIGEL, respectivamente. Los resultados de PCR en tiempo real (**Figura 39**) confirman que la formación del endodermo definitivo fue equivalente en fibronectina y placas recubiertas de MATRIGEL™.

#### Referencia: Ejemplo 24

#### Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido con concentraciones variables de MATRIGEL™ a endodermo definitivo

Los cultivos de H9 a una confluencia de aproximadamente 60 a 70 % se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 20 ng/ml de Wnt-3a y 100 ng/ml de activina A durante 2 días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS, 20 ng/ml de Wnt-3a y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Las células H9 se cultivaron en placas recubiertas de MATRIGEL normal en una dilución de 1:60 a 1:10. Las placas se recubrieron con MATRIGEL durante 1 hora a temperatura ambiente.

65

Los resultados de PCR a tiempo real se muestran en la **Figura 40**. El tratamiento de células madre embrionarias con suero bajo, Activina A y Wnt3a llevó a la expresión de genes CXCR4, GATA4, Goosecoide, HNF-3beta y SOX-17, sugiriendo que las células se diferenciaban al estadio endodérmico definitivo. De todas formas, no parece que el recubrimiento de MATRIGEL™ juegue un papel importante en la diferenciación.

5

**Referencia: Ejemplo 25**

**Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con matriz extracelular y en consecuencia cultivado en MEFS y diferenciado al papel de endodermo definitivo de Wnt-3a**

10

Las células de la línea H9 de células madre embrionarias humanas cultivadas en MATRIGEL™ por lo menos cinco pasadas se cultivaron en distribuidores MEF en un medio ES. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60 al 70 % se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los grupos de tratamiento adicionales incluyen Wnt-3a a 20 ng/ml los cinco días + 10-100 ng/ml de activina A.

15

Los días 3 y 5, los cultivos se analizaron en PCR a tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (Bry), goosecoide (GSC), HNF-3 beta, GATA4, hTERT y Oct4. AFP y SOX-7 se ven como marcadores endodérmicos viscerales mientras que GATA4, HNF-3beta y SOX-17 representan los marcadores endodérmicos definitivos y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de línea primitiva. hTERT y Oct-4 son marcadores para auto renovación y pluripotencia, respectivamente. Los resultados de PCR en tiempo real se muestran en la **Figura 41, paneles a-d**. El análisis por FACS también se llevó a cabo los días 3 y 5. Los niveles de expresión de CXCR-4 y CD9 se analizaron e informaron en la **Figura 41, panel e**.

20

25

En ausencia de Wnt3a, los niveles de expresión de AFP de las células cultivadas en 100 ng/ml de Activina A son similares a los vistos en los controles sin tratar. De todas formas, con la adición de Wnt3a a células cultivadas en 100 ng/ml de activina A, hay un aumento en la expresión de AFP que se incrementa con el tiempo. Cuando se usa una concentración más baja de Activina A, la expresión de AFP es muy alta, independientemente de la presencia de Wnt3a (**Figura 41, panel a**). Esto sugiere que es necesaria una alta concentración de Activina A para mantener la diferenciación de las células a tejidos extra-embrionarios.

30

Por análisis FACS, las células positivas CXCR4 tuvieron un rango de 32-42 % de la población de muestras tratadas con una alta concentración de Activina A pero no tratadas con Wnt3a en comparación con el 23-33 % de la población de muestras tratadas con una alta concentración de Activina A y Wnt3a el día 3 (**Figura 41, panel e**). Para el día 5 de tratamiento, el 28-32 % de las células tratadas con una alta concentración de activina A pero no tratadas con CXCR4 de expresión de Wnt-3a en comparación con el 43-51 % de las células tratadas con una alta concentración de Activina A y Wnt3a (**Figura 41, panel f**). En las células tratadas con una baja concentración de Activina A, ha habido más células positivas CXCR4 en el grupo de tratamiento sin Wnt3a (de 11 a 20 %) en comparación con el grupo tratado con Wnt-3a (de 3 a 4 %) (**Figura 41, panel g**). En general, Wnt-3a no parece tener un papel significativo en la diferenciación de células madre embrionarias, cultivadas en MEFS, al endodermo definitivo. Esto sugiere que la capa de distribuidor probablemente segrega una cantidad suficiente de Wnt-3a o de ligando análogo para mejorar la formación de endodermo definitivo inducido por activina A.

35

40

45

**Referencia: Ejemplo 26**

**Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con matriz extracelular a endodermo definitivo seguido de tratamiento con un inhibidor Wnt DKK-1**

50

Para determinar si la adición de Wnt-3a ha provocado el aumento de la diferenciación, se añadió un inhibidor de la señalización de Wnt-3 a los cultivos. Se expusieron cultivos de H9 a una confluencia de aproximadamente 60 a 70 % a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 20 ng/ml de Wnt3a, 100 ng/ml de Dkkopf-1 (Dkk-1) y 100 ng/ml de activina A durante dos días y a continuación tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Las células H9 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL de factor de crecimiento reducido a una dilución de 1:30. Las placas se recubrieron con MATRIGEL durante 1 hora a temperatura ambiente.

55

El día 5, los cultivos se analizaron con PCR a tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (Bry), goosecoide (GSC), HNF-3 beta, GATA4, hTERT y Oct4. AFP y SOX-7 se ven como marcadores endodérmicos viscerales mientras que GATA4, HNF-3beta y SOX-17 representan los marcadores endodérmicos definitivos y GSC, Bry y CXCR4 representa marcadores de línea primitiva. hTERT y Oct-4 son marcadores de auto renovación y pluripotencia, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 42.

60

En presencia de Wnt3a, las células expresan CXCR4, GATA4, HNF-3beta y SOX17, todos marcadores de endodermo definitivo. Los marcadores de formación de línea primitiva como goosecoide también se detectaron a

65

niveles más altos que los detectados en controles no tratados. Con la adición de DKK1, el nivel de expresión de los marcadores de diferenciación antes mencionados disminuye claramente a niveles similares a los de células no tratadas.

5 **Referencia: Ejemplo 27**

**Tintado de inmunofluorescencia de marcadores DE para células madre embrionarias H9 cultivadas en sustrato cultivado de tejido recubierto con MATRIGEL y diferenciado en suero bajo más activina-a y +/- Wnt-3a**

10 Los cultivos de las células H9 se tintaron de acuerdo con la Referencia del Ejemplo 10 para SOX-17, HNF-3B, GATA-4, N-cadherina y E-cadherina. Todos los núcleos se contra-tintaron con DAPI. 20 ng/mg Wnt-3a tuvo como resultado un número notablemente mayor de núcleos tintados positivos para SOX-17, HNF-3beta y GATA-4 en comparación con los cultivos diferenciados en ausencia de Wnt-3a. Además, la adición de Wnt-3a tuvo como resultado una pérdida significativa de expresión de e-cadherina y una expresión mejorada para N-cadherina (**Figura 43, panel a y Figura 43, panel B**).

**Referencia: Ejemplo 28**

20 **Análisis por micromatriz de cambios en la expresión genética en las células madre embrionarias seguido de formación de endodermo definitivo sobre MEFS vs MATRIGEL™**

El ARN total se aisló de los siguientes cultivos de células madre embrionarias usando un mini kit RNeasy (Qiagen):  
 25 A) células H9P33 cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución de 1:30) y expuestas a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días; B) células H9P44 cultivadas en MEFs y expuestas a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de Activina A durante dos días, seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de Activina A otros tres días, y C) células H9P48 cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y expuestas a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3A durante dos días, seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % e FBS y 100 ng/ml de Activina A (AA) otros tres días. Los controles para cada grupo incluyeron células prensadas en placas recubiertas con MATRIGEL y cultivadas en un medio condicionado por MEF o células prensadas en MEFs y cultivadas en un medio de ES. Todos los grupos contenían tres réplicas biológicas y cada réplica biológica se repitió en dos chips de genes separados.

La preparación e hibridación de las muestras y el análisis de las imágenes se llevó a cabo de acuerdo con la matriz del Genoma Humano Affymetrix U133 Plus 2.0. Tras la normalización y transformación logarítmica, se llevó a cabo el análisis de los datos usando software OmniViz® y GENESIFTER (VizX Labs, WA). Se evaluaron diferencias significativas en la expresión genética entre las muestras usando un análisis de la variación y un test F con valor P ajustado (corrección de Benjamini y Hochberg) de  $\leq 0,05$ . Solo se incluyeron en el análisis genes presentes en por lo menos un grupo. La **Tabla VI** relaciona la intensidad de la señal normalizada transformada logarítmicamente de los genes que muestran por lo menos una diferencia de 5 entre el grupo A, grupo B y grupo C junto con el valor P ajustado para cada gen.

45 **Referencia: Ejemplo 29**

**Diferenciación de línea ES cultivada en sustrato de cultivo de tejido SA002 recubierta con MATRIGEL™ a endodermo definitivo**

50 Las células SA002 (Cellartis, Suecia) cultivadas previamente por lo menos tres pasadas en placas recubiertas con MATRIGEL (dilución 1:30) en MEF-CM complementadas con 8 ng/ml de bFGF se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) +/- 20 ng/ml de Wnt-3a o 100 nm GSK-3B inhibidor IX durante dos días, seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los resultados de PCR en tiempo real se muestran en la **Figura 44, paneles a & b**. Similar a las líneas H1, H7 y H9, la línea SA002 también necesitó de la adición de Wnt-3A para la expresión sólida de marcadores DE. La expresión de CXCR4 se muestra en la **Figura 45: a) tratamiento de AA b) AA + Wnt-3a c) AA + inhibidor GSK-3B**.

60 **Referencia: Ejemplo 30**

**Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con suero humano a endodermo definitivo (DE)**

65 Los cultivos de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pasaje 55 se cultivaron y diferenciaron en placas recubiertas de suero humano (Sigma, #H1388, MO). Se añadió 0,5 ml de suero humano a cada recipiente de

las 6 placas tratadas con cultivo de tejido, se incubó a 1 hora a temperatura ambiente y se aspiró antes de añadir células madre embrionarias humanas. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 %, se trataron de la siguiente manera: 2 días 0,5 % de FBS con 10 nI/ml de Wnt3a (R&D) recombinante de ratón o 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B (Catálogo # 361550, Calbiochem, CA) y 100 ng/l de Activina A (R&D). A continuación, 3 días de 2 % de FBS más 100 ng/ml de Activina A. Los cultivos se analizaron por PCR en tiempo real (**Figura 46, paneles a & b**). La expresión sólida de los marcadores de endodermo definitivo se anotaron para células tratadas con Activina A + inhibidor GSK-3B o Wnt-3A en comparación con células tratadas solo con activina A. Estas conclusiones son paralelas a las nuestras para células madre embrionarias humanas cultivadas en MATRIGEL™ o placas recubiertas de fibronectina humana.

#### Referencia: Ejemplo 31

#### Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo (DE) – Evaluación de varios inhibidores de GSK-3B

La eficacia de varios inhibidores GSK-3B disponibles comercialmente se estudió en formación de DE a partir de células madre embrionarias humanas. Los siguientes inhibidores GSK-3B se evaluaron a 100 nM: inhibidor VIII de GSK-3B (Catálogo # 361549, Calbiochem, CA), GSK-3B inhibidor IX (Catálogo # 361550, Calbiochem, CA), inhibidor IX de GSK-3B (Catálogo# 361553, Calbiochem, CA), inhibidor XII GSK-3B (Catálogo# 361554, Calbiochem, CA). Las células H1P54 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) + /- varios inhibidores de GSK-3B durante dos días y a continuación tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los cultivos de control se trataron con suero bajo más una alta dosis de AA. La **Figura 47, paneles a y b** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos el día 5. Los inhibidores IX y XI de GSK-3B fueron eficaces en la inducción de formación DE en comparación con inhibidores VIII y XII GSK-3B.

#### Referencia: Ejemplo 32

#### Formación de endodermo pancreático por células madre embrionarias humanas cultivadas en condiciones libres de distribuidor: evaluación de análogos de ácido retinoico

Las células madre embrionarias se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y expuestas a un medio de DMEM/F12 complementadas con 0,5 FBS, 20 ng/ml Wnt-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. El día 5, se recogieron las células para su evaluación por FACS y PCR en tiempo real. Como se ha indicado en ejemplos anteriores, este protocolo tuvo como resultado un aumento sólido de los marcadores endodérmicos definitivos, como CXCR4 y SOX-17. Las células endodérmicas definitivas resultantes el día 5 se expusieron a las siguientes situaciones para inducir la formación de endodermo pancreático: cultivo en medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 1 µM de ácido holo-trans-retinoico (RA) (Catálogo# R2625, Sigma, MO) o 0,1-10 µM AM-580 (4-[(5,6,7,8-Tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilo-2-naftalenilo)carboxamido]ácido benzoico, Catálogo#A8843, Sigma, MO), o 0,1-1 µM TTNPB (4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilo-2-naftalenilo)-1-propenilo]ácido benzoico ácido Arotinoide, Catálogo#T3757, Sigmam, MO) durante 3 días. AM-580 y TTNPB son análogos de ácido retinoico con afinidad para receptores de ácido retinoico. Tras el tratamiento por RA, siguió tres días más de tratamiento en medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 20-50 ng/ml bFGF (Catálogo#F0291, Sigma, MO). Los cultivos se recogieron y se obtuvieron muestras de mRNA para su análisis.

El análisis de la expresión genética reveló que (Figura 48, paneles a-d) la adición de 1 µM RA seguida de exposición a bFGF aumenta de forma significativa los marcadores endodérmicos pancreáticos, como PDX-1. Además, este protocolo tuvo como resultado la expresión robusta de marcadores del intestino delgado anterior, como CDX-2 y AFP. A una concentración de 1 µM, la adición de análogos de RA tuvo como resultado marcadores equivalentes para endodermo pancreático e intestino anterior. De todas formas, la adición de análogos de 1 µM RA tuvo como resultado una expresión de AFP más sólida en comparación con el ácido holo-trans-retinoico. De todas formas, la adición de 10 µM AM-580 suprimió la expresión de AFP y CDX-2 al mismo tiempo que mantuvo una alta expresión de PDX-1.

#### Referencia: Ejemplo 34

#### El efecto del tratamiento de Wnt-3a sobre la expresión de la citoquina en las células madre embrionarias humanas

El efecto que tiene el tratamiento de Wnt-3a sobre la expresión de la citoquina se analizó usando una matriz proteica. Se cultivaron células de la línea H9 de células madre embrionarias humanas de acuerdo con los métodos descritos en la **Referencia: Ejemplo 15**. En el pasaje 54, las células se diferenciaron en presencia de 100 ng/ml de Activina A +/- 10 ng/ml Wnt3a durante 2 días en 0,5 % FBS DMEM/F12. Posteriormente, las células se cultivaron tres

días más en 100 ng/ml de Activina A y 2 % de FBS DMEM/F12. Al final del día 5, la expresión de CXCR4 se determinó por FACS para cada uno de los grupos de tratamiento. Las células tratadas con Activina A solo tuvieron un 1 % de células que expresasen CXCR4. Las células tratadas con Activina A y Wnt3 tuvieron un 73 % de células positivas para expresión de CXCR4.

5 Los lisados celulares se prepararon a partir de células de cada uno de los grupos de tratamiento con un kit de lisado celular de mamíferos (Sigma-Aldrich, MO). Los medios condicionados para cada grupo de tratamiento se recogieron y concentraron. El análisis de matriz de citoquina se completó usando paneles de Matriz de Citoquina proporcionados por RayBiotech, GA (<http://www.raybiotech.com/>). La **Tabla VII** relaciona citoquina, factor de crecimiento y la expresión de receptores que sigue a la normalización de los datos y la sustracción del fondo. Para cada uno de los paneles, también se incluyen controles positivo y negativo. Los datos son dos muestras independientes para cada grupo de tratamiento celular (1,2).

10 En los medios condicionados de células tratadas Wnt3 se percibe un claro aumento de Antiogenina, IGFBP-1 y EGF. Numerosas proteínas aumentan en los lisados de células tratadas Wnt3a incluidos IGFBP-1, TGFbeta-1 y TGFbeta-3. Estas proteínas aumentadas pueden volver a añadirse a los medios de diferenciación para sustituir o mejorar los efectos de Wnt3a sobre la formación de endodermo definitivo.

#### Referencia: Ejemplo 35

#### Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo: papel del Wnt1

25 Las células H1P55 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, y 100 ng/ml de activina A +/- 10-20 ng/ml de WNT-1 (PeproTech, NJ, Catálogo#120-17) durante dos días seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) y +/- de 10 o 20 ng/ml de WNT-1 otros tres días. Se experimentaron las siguientes combinaciones de WNT1 + AA:

30 a) 20 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 0,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2, seguido de 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA el día tres, b) 20 ng/ml de WNT + 100 ng/ml AA en 0,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA los días 3-5, c) 10 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 9,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA el día tres, d) 10 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 0,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de un 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA los días 3-5, e) 20 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 9,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de un 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT1 el día tres, f) 20 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 9,5 % FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de un 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT1 los días 3-5. La **Figura 40, paneles a y b** muestra los datos de PCR a tiempo real para marcadores endodérmicos definitivos siguiendo el tratamiento de las células H1 con suero bajo, AA y Wnt-1. La adición de 20 ng/ml de Wnt1 en presencia de 100 ng/ml de AA tuvo como resultado un aumento significativo de marcadores endodérmicos definitivos (Bry, CXCR4, GSC, SOX17, HNF-3B y GATA-4).

#### Referencia: Ejemplo 36

#### Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido a endodermo definitivo en medios definidos

50 Las células madre embrionarias H1 cultivadas en condiciones hipóxicas (aproximadamente un 3 % de O<sub>2</sub>) y prensadas en placas recubiertas de MATRIGEL™ (dilución 1:30) se cultivaron en un medio condicionado por MEF a aproximadamente una confluencia entre el 60 y el 70 % y a continuación se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % FBS, 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) y 100 ng/ml de Activina-A (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con un medio DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de Activina-A (AA) 3 o 4 días más. Paralelamente, las células H1 cultivadas en MATRIGEL se expusieron a DMEM-F12 o DMEM-LG complementado con 0,5-1 % B27 (Invitrogen, Ca) + 20 ng/ml WNT-3a + 100 ng/ml de Activina-A +/- inhibidor IX GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA) durante 4-5 días. En algunas culturas, se usó un suplemento 1%N2 (Invitrogen, Ca) en lugar de un 1 % de B27.

60 Además, las líneas celulares aisladas de la línea H9 ES parental denominadas células "EXPRES" (Células expansibles de línea pre-primitiva) también se expusieron a la misma formulación de medio descrita antes para inducir la formación de endodermo definitivo (DE). Las propiedades de las células EXPRES se han descrito previamente en la solicitud de los EE. UU. 60/913.475. Finalmente, las células de la línea BGO1V obtenida a partir de Invitrogen y cultivada en placas recubiertas de MATRIGEL en un medio condicionado por MEF + 8 ng/ml bFGF, se expusieron a los medios de diferenciación antes mencionados para inducir la formación de DE. La **Figura 50** muestra la expresión de CXCR4 y CD4 por medio de FACS el día 4-5 para líneas celulares EXPRES01, BGO1V y H1 P50 expuestas a medios de diferenciación definida o medios de diferenciación basados en suero bajo. Para todas las líneas testadas, la expresión de CXCR4 fue equivalente cuando se usó el medio definido basado en

suplemento 1 % B27 en oposición a medio basado en FBS. Además, el suplemento de 1 % N2 no pudo inducir la formación de DE, probablemente debido a una alta concentración de insulina (8,6  $\mu$ M) en el suplemento N2. La **Figura 51** muestra los datos de PCR a tiempo real para cultivos EXPRES01, BGO1V y H1 tratados con suero bajo o medio definido + AA + WNT3A los días 4-5. Este protocolo tuvo como resultado un aumento significativo de los marcadores DE. La **Figura 52** muestra imágenes de inmunofluorescencia de células EXPRES 01 P49 diferenciadas en DE usando un 1 % de b27 + DM-F12 + Activina-A + WNT3A + inhibidor de GSK03B durante cinco días. La mayoría de las células tintan positivo para GATA-4, SOX-17 y HNF-3B y una minoría de células tintan en positivo para OCT-4, SOX-2 y Nanog.

5

10 **Referencia: Ejemplo 37**

**Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en MEFs a endodermo definitivo en medio definido**

15 Las células H1 se prensaron en 6 placas previamente cultivadas con fibroblastos embrionarios de ratón tratado con mitomicina (MEF). Se hizo crecer las células hasta una confluencia del 70 al 80 % en medio de célula ES consistente en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) complementado con un 20 % de sustitución de suero desactivado, 100 nM MEM de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM beta-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina (todo de Invitrogen/GIBCO) y 8 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico humano (bFGF) (R&D Systems).

20 Para la formación de DE, las células se trataron en presencia o ausencia de Activina-A (100 ng/ml), además de otros factores de crecimiento que se detallan más adelante. Los factores de crecimiento se añadieron para aumentar la concentración de FBS paso a paso como se indica en el siguiente patrón de tratamiento:  
 Día 0: 0 % FBS o 1 % de B27 en DMEM-LG o RPMI  
 Día 1: 0,5 % FBS o 1 % de B27 en DMEM/F12 o RPMI  
 25 Día 2-5: 2 % de FBS o 1 % B27 en DMEM/F12 o RPMI

De forma alternativa, las células se trataron en un medio HESGro (Chemicon, Ca) + 100 nM LY-Compuesto (EMD, CA) + 100 ng/ml de AA los días 1-5.

30 Las células se recogieron para análisis de FACS y RT-PCR los días 1-5. Todos los factores de crecimiento se adquirieron a R&D Sistemas, MN. La **Figura 53** muestra los datos de PCR en tiempo real para células H1 expuestas a bajo suero + Activina-A o medio definido + Activina-A los días 1-5. El cambio en los niveles de expresión se normaliza a los niveles del día 1.

35

40

45

50

55

60

65

**TABLA IA: LISTA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA FACS Y ANÁLISIS DE INMUNO-TINTADO**

| Anticuerpo   | Proveedor                        | Isotipo       | Clon      |
|--------------|----------------------------------|---------------|-----------|
| SSEA-1       | Chemicon (CA)                    | Ratón IgM     | MC-480    |
| SSEA-3       | Chemicon (CA)                    | Ratón IgG3    | MC-631    |
| SSEA-4       | Chemicon (CA)                    | IgM de Rata   | MC-813-70 |
| TRA 1-60     | Chemicon (CA)                    | IgM de Ratón  | TRA 1-60  |
| TRA 1-81     | Chemicon (CA)                    | IgM de Ratón  | TRA 1-81  |
| TRA 1-85     | Chemicon (CA)                    | IgG1 de ratón | TRA 1-85  |
| AP           | R&D Systems                      | IgG1 de ratón | B4-78     |
| HNF3 $\beta$ | R&D Systems                      | IgG de cabra  |           |
| PDX1         | Santa Cruz<br>Biotechnology, INC | IgG de cabra  | A-17      |
| GATA4        | R&D Systems                      | IgG de cabra  |           |
| Sox 17       | R&D Systems                      | IgG de cabra  |           |
| CD9          | BD                               | IgG1 de ratón | M-L 13    |

**TABLA IB: LISTA DE ANTICUERPOS CONJUGADOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA FACS Y ANÁLISIS DE INMUNO-TINTADO**

| Anticuerpo conjugado secundario          | Proveedor                   | Dilución |
|--|-----------------------------|----------|
| Cabra anti-ratón IgG<br>Conjugado de APC | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1:200    |
| Cabra anti-ratón IgG<br>Conjugado de PE  | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1:200    |
| Mono anti-conejo conjugado de PE o -APC  | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1:200    |
| Mono anti-cabra conjugado de PE o -APC   | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1:200    |
| Cabra anti-ratón PE IgM                  | SouthernBiotech (AL)        | 1:200    |
| Cabra anti-rata IgM PE                   | SouthernBiotech (AL)        | 1:200    |
| Cabra anti-ratón IgG3 PE                 | SouthernBiotech (AL)        | 1:200    |

**TABLA IIA: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN EL TIEMPO, TRAS TRATAMIENTO DE ACTIVINA A**

|        | DÍA 0   | DÍA 2   | DÍA 5   | DÍA 8   |
|--------|---------|---------|---------|---------|
| SSEA-3 | 98,67 % | 92,14 % | 42,9 %  | 22,05 % |
| CD9    | 92,64 % | 29,42 % | 7,27 %  | 4,1 %   |
| ECAM   | 61,23 % | 20,87 % | 14,17 % | 1,02 %  |
| NCAM   | 7,33 %  | 5,04 %  | 21,1 %  | 8,86 %  |
| CXCR4  | 8,53 %  | 20,2 %  | 55,26 % | 56,92 % |

**TABLA IIB: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN EL TIEMPO, TRAS TRATAMIENTO POR ACTIVINA A**

|                  | Día 1      |              | Día 3      |              | Día 5      |              |
|------------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
|                  | No tratada | AA 100 ng/ml | No tratada | AA 100 ng/ml | No tratada | AA 100 ng/ml |
| CXCR4+           | 13 %       | 6 %          | 7,6 %      | 38 %         | 3 %        | 65,5 %       |
| CXCR4+<br>C-Kit+ | 5,32 %     | 2,97 %       | 2,9 %      | 31,56 %      | 3 %        | 55,21 %      |
| CXCR4+<br>EPCAM+ | 11,5 %     | 14,58 %      | 5,26 %     | 36,67 %      | 3 %        | 54,5 %       |
| CXCR4+<br>CD9+   | 12,27 %    | 8,13 %       | 2,72 %     | 24,11 %      | 3 %        | 2,1 %        |

**TABLA IIC: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN EL TIEMPO, TRAS TRATAMIENTO POR ACTIVINA A**

|              | Tratamiento de 5 días con AA |
|--------------|------------------------------|
| CXCR4+       | 92,78 %                      |
| CXCR4+C-kit+ | 92,90 %                      |
| CXCR4+/EPCAM | 87,99 %                      |
| CXCR4+/CD99  | 88,78 %                      |
| CXCR4+/CD9   | 7,03 %                       |

**TABLA III: PERFIL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA PARA CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS USADAS EN LA PRESENTE INVENCION**

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

| Marcador | H9          |        |         |
|----------|-------------|--------|---------|
|          | FACS        | RT-PCR | Tintado |
| OCT3/4   |             | +      | +       |
| SOX-2    |             | +      |         |
| UTF-1    |             | +      |         |
| REX-1    |             | +      |         |
| HTERT    |             | +      |         |
| Cx 43    |             | +      |         |
| Cx 45    |             | +      |         |
| ABCG-2   |             | +      |         |
| SSEA-1   | ± (36,35 %) |        |         |
| SSEA-3   | + (94,38 %) |        | +       |
| SSEA-4   | + (98,77 %) |        | +       |
| TRA-1-81 | + (85,85 %) |        | +       |
| TRA-1-60 | + (78,14 %) |        | +       |
| TRA-1-85 | + (95,96 %) |        |         |
| CD9      | + (92,02 %) |        |         |
| AP       | + (99 %)    |        | +       |

**TABLA IV: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES ENTRE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS INDIFERENCIADAS Y CÉLULAS DE ESTÁGIO ENDODERMICAS DEFINITIVAS CULTIVADAS EN MATRIGELTM O FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN DESPUES DE 5 DÍAS DE TRATAMIENTO**

|    | Identificador de gen | Título del Gen   | ID de Gen | H9P83 en Madrigel | SEM  | Fase H9P83 en Madrigel DE | SEM  | H9P44 en MEFs | SEM  | Fase H9P44 en Madrigel DE | SEM  |
|----|----------------------|--|-----------|-------------------|------|---------------------------|------|---------------|------|---------------------------|------|
| 5  |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 10 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 15 | D87811               | Homo sapiens mRNA for GATA-6, complete cds.<br>/PROD=GAT A-6<br>/FL=gb:U660 75.1<br>gb:NM_0052 57.1<br>gb:D87811.1   | GATA6     | -2.12             | 0.19 | 2.82                      | 2.20 | -2.56         | 0.46 | 5.34                      | 1.79 |
| 20 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 25 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 30 | AW157548             | insulin-like growth factor binding protein 5<br>/FL=gb:M650 62.1<br>gb:M62782.1<br>gb:NM_0005 99.1<br>gb:AF05503 3.1 | IGFBP5    | -3.28             | 0.17 | 3.31                      | 2.11 | -3.78         | 0.36 | 5.35                      | 2.00 |
| 35 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 40 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 45 | NM_001898            | Homo sapiens cystatin SN (CST1), mRNA.<br>/PROD=cystatin SN<br>/FL=gb:J038 70.1<br>gb:NM_0018 98.1                   | CST4      | -2.15             | 1.26 | 2.54                      | 1.95 | -2.71         | 0.98 | 4.64                      | 1.63 |
| 50 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 55 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |
| 60 | AK000680             | Homo sapiens cDNA  | PAG1      | -2.87             | 0.91 | 1.61                      | 0.22 | -4.08         | 0.50 | 1.68                      | 0.10 |
| 65 |                      |  |           |                   |      |                           |      |               |      |                           |      |

|    |           |             |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|-------------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | FLJ20673    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | fis, clone  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | KAlA4464.   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF24 |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 0634.1      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0184  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | NM_022642 | Homo        | -    | -2.24 | 0.12 | 2.97 | 0.42 | -3.78 | 0.07 | 2.51 | 0.44 |
|    |           | sapiens     |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | chorionic   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | somatomam   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | motropin    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hormone 1   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (placental  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | lactogen)   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (CSH1),     |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | transcript  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | variant 4,  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           | mRNA.       |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=chori |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | onic        |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | somatomam   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | motropin    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hormone 1,  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | isoform4    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 | NM_001317 | Homo        | CSH1 | -2.95 | 0.57 | 2.69 | 0.36 | -4.04 | 0.51 | 1.86 | 0.68 |
|    |           | sapiens     |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | chorionic   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | somatomam   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | motropin    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hormone 1   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (placental  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | lactogen)   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | (CSH1),     |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | transcript  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | variant 1,  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | mRNA.       |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=chori |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | onic        |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | somatomam   |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | motropin    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           | hormone 1,  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | isoform     |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 1precursor  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           | /FL=gb:NM_  |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 001317.2    |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:J00118.1 |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |             |      |       |      |      |      |       |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | BC005921  | Homo sapiens, chorionic somatomamotropin hormone 1 (placental lactogen), clone MGC:14518, mRNA, complete cds. | CSH1  | -2.26 | 0.09 | 3.26 | 0.23 | -2.96 | 0.37 | 2.58 | 0.45 |
| 10 |           | /PROD=chorionic somatomamotropin hormone 1 (placentallactogen)  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:BC005921.1   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 | AI796169  | GATA-binding protein 3  | GATA3 | -4.45 | 0.10 | 0.24 | 1.30 | -4.72 | 0.13 | 0.80 | 2.05 |
| 35 |           | /FL=gb:NM_002051.1 gb:M69106.1 gb:BC003070.1  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | NM_020991 | Homo sapiens chorionic somatomamotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 1, mRNA.                         | CSH1  | -1.27 | 0.48 | 3.19 | 0.23 | -2.91 | 0.35 | 2.62 | 0.54 |
| 45 |           | /PROD=chorionic somatomamotropin hormone 2, isoform 1precursor  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | /FL=gb:NM_020991.2  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
|    |           | gb:BC00271  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 7.1   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 5  | NM_021827 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ23514 (FLJ23514), mRNA.  | CCDC81  | -0.37 | 0.35 | 3.16  | 2.05 | -2.02 | 1.27 | 5.25 | 1.98 |
| 10 |           | /PROD=hypothetical protein FLJ23514   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:NM_021827.1  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 20 | AB028021  | Cluster Incl. AB028021:Homo sapiens HNF-3beta mRNA for hepatocyte nuclear factor-3 beta, complete cds | FOXA2   | -2.97 | 0.25 | 0.59  | 3.25 | -3.43 | 0.57 | 4.12 | 2.57 |
| 25 |           | /cds=(196,1569)   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 |           | /gb=AB028021  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 35 |           | /gi=4958949   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 40 |           | /ug=Hs.155651 /len=1944   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 45 | NM_002521 | Homo sapiens natriuretic peptide precursor B (NPPB), mRNA.  | NPPB    | 1.54  | 0.11 | 5.47  | 1.17 | -0.15 | 0.38 | 6.24 | 1.23 |
| 50 |           | /PROD=natriuretic peptide precursor B   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 55 |           | /FL=gb:NM_002521.1  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 60 | AA352113  | ESTs  | ST8SIA4 | -4.01 | 1.24 | -0.99 | 2.04 | -4.79 | 1.00 | 1.05 | 1.62 |
| 65 | BM128432  | Homo sapiens full length insert   | IGFBP5  | -2.73 | 1.11 | 2.31  | 2.30 | -3.48 | 0.56 | 4.45 | 2.02 |

|    |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
|----|-----------|--|-------|-------|-----------|------------|-----------|------|--|--|
| 5  |           | cDNA clone<br>YA81B05  |       |       |           |            |           |      |  |  |
|    | NM_002770 | Homo sapiens<br>protease,<br>serine, 2<br>(trypsin 2)<br>(PRSS2),<br>mRNA.<br>/PROD=prot<br>ease, serine,<br>2 (trypsin 2)<br>/FL=gb:M276<br>02.1<br>gb:NM_0027<br>70.1  | PRSS1 | -2.77 | 0.33 1.59 | 2.68 -3.13 | 0.48 3.88 | 2.95 |  |  |
| 10 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 15 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 20 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 25 | NM_022579 | Homo sapiens<br>chorionic<br>somatomam<br>motropin<br>hormone-like<br>1 (CSHL1),<br>transcript<br>variant 3,<br>mRNA.<br>/PROD=chori<br>onic<br>somatomam<br>motropin<br>hormone-like<br>1, isoform 3<br>precursor<br>/FL=gb:NM_<br>022579.1 | CSH1  | -1.58 | 0.91 2.48 | 0.38 -3.33 | 0.13 1.77 | 0.49 |  |  |
| 30 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 35 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 40 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 45 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 50 | NM_005454 | Homo sapiens<br>cerberus 1<br>(Xenopus<br>laevis)<br>homolog<br>(cysteine<br>knot<br>superfamily)<br>(CER1),<br>mRNA.<br>/PROD=cerb<br>erus 1<br>/FL=gb:NM_  | CER1  | 2.82  | 0.09 5.78 | 1.04 1.48  | 0.05 6.74 | 1.18 |  |  |
| 55 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 60 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |
| 65 |           |  |       |       |           |            |           |      |  |  |

|    |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| 5  | NM_022645 | 005454.1<br>Homo sapiens chorionic somatomamotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 3, mRNA.<br>/PROD=chorionic somatomamotropin hormone 2, isoform 3precursor<br>/FL=gb:NM_022645.1 | CSH1      | -2.30 | 0.33 | 2.95  | 0.31 | -2.78 | 0.24 | 2.45 | 0.34 |
| 10 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 20 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 25 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 | AI821586  | ESTs, Moderately similar to JE0284 Mm-1 cell derived transplantability-associated protein 1b (H.sapiens)  | LOC440981 | -3.22 | 0.97 | 0.66  | 3.19 | -2.97 | 0.13 | 4.22 | 2.76 |
| 35 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 40 | AL121722  | Human DNA sequence from clone RP4-788L20 on chromosome 20 Contains the HNF3B (hepatocyte nuclear factor 3, beta) gene. a novel gene based on ESTs, ESTs, STSs, GSSs and CpG Islands       | -         | -2.95 | 0.36 | -0.01 | 2.69 | -3.43 | 0.38 | 2.95 | 2.66 |
| 45 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 50 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 60 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 65 | NM_001311 | Homo  | CRIP1     | 1.66  | 0.17 | 1.90  | 0.07 | -2.96 | 0.66 | 1.80 | 0.24 |

|    |           |               |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---------------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | sapiens       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | cysteine-rich |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | protein 1     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | (intestinal)  |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | (CRIP1),      |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 10 |           | mRNA.         |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=cyst    |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | eine-rich     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | protein 1     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | (intestinal)  |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:U586   |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 30.1          |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:BC00273    |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 8.1           |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 20 |           | gb:NM_0013    |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 11.1          |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:U09770.1   |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | AY177407  | Homo          | GSC   | -4.59 | 0.18 | -1.08 | 2.89 | -4.64 | 0.06 | 1.89 | 2.79 |
| 25 |           | sapiens       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | homeobox      |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | protein       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | goosecoid     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 |           | mRNA,         |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | complete      |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | cds.          |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=hom     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 35 |           | eobox         |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | protein       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | goosecoid     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AY17   |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 40 |           | 7407.1        |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_1738    |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 49.1          |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | NM_005442 | Homo          | EOMES | -0.16 | 0.29 | 2.89  | 1.70 | 0.13  | 0.16 | 4.90 | 1.34 |
| 45 |           | sapiens       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | eomesoderm    |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | in (Xenopus   |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | laevis)       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | homolog       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 50 |           | (EOMES),      |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=eom     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | esodermin     |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 55 |           | (Xenopus      |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | laevis)       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | homolog       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AB03   |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 60 |           | 1038.1        |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0054    |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 65 |           |               |       |       |      |       |      |       |      |      |      |

|    |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | L01639    | 42.1<br>Human<br>(clone<br>HSY3RR)<br>neuropeptide<br>Y receptor<br>(NPYR)<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=neur<br>opeptide Y<br>receptor<br>/FL=gb:L067<br>97.1<br>gb:NM_0034<br>67.1<br>gb:AF02537<br>5.1<br>gb:AF14720<br>4.1<br>gb:M99293.1<br>gb:L01639.1 | CXCR4  | 0.64  | 0.26 | 3.71 | 1.78 | -0.16 | 0.50 | 5.48 | 1.77 |
| 10 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 | NM_022646 | Homo<br>sapiens<br>chorionic<br>somatomam<br>motropin<br>hormone 2<br>(CSH2),<br>transcript<br>variant 4,<br>mRNA.<br>/PROD=chori<br>onic<br>somatomam<br>motropin<br>hormone 2,<br>isoform4<br>/FL=gb:NM_<br>022646.1   | -      | -1.57 | 0.60 | 2.67 | 0.26 | -1.88 | 0.98 | 2.22 | 0.35 |
| 40 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | AW007532  | Human<br>insulin-like<br>growth factor<br>binding<br>protein 5<br>(IGFBP5)<br>mRNA   | IGFBP5 | 0.31  | 0.25 | 4.59 | 1.53 | 0.72  | 0.09 | 6.19 | 1.58 |
| 60 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 | NM_002160 | Homo<br>TNC  | TNC    | -0.24 | 0.29 | 2.23 | 0.80 | -0.81 | 0.81 | 2.85 | 0.82 |

|    |           |                |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|----------------|-----------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | sapiens        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hexabrachion   |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | n (tenascin    |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | C, cytotactin) |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (HXB),         |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | /PROD=hexa     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | brachion       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (tenascin C,   |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | cytotactin)    |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:M556    |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 18.1           |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0021     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | AA149250  | ESTs,          | LOC645638 | 1.27  | 0.61 | 4.23 | 1.26 | -0.64 | 0.40 | 2.47 | 1.23 |
|    |           | Weakly         |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | similar to     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           | WDNM RAT       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | WDNM1          |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | PROTEIN        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | PRECURSO       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | R              |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (R.norvegicu   |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | s)             |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AW977527  | ESTs           | -         | -0.91 | 0.99 | 1.18 | 0.68 | -2.52 | 1.01 | 1.59 | 0.64 |
| 35 | NM_022454 | Homo           | SOX17     | -1.01 | 0.33 | 2.29 | 2.08 | -0.14 | 0.15 | 4.60 | 1.73 |
|    |           | sapiens        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hypothetical   |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | protein        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | FLJ22252       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | similar to     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | SRY-box        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | containing     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gene 17        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (FLJ22252),    |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | /PROD=hypo     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | thetical       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | protein        |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | FLJ22252       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           | similar to     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | SRY-           |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | boxcontainin   |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | g gene 17      |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           | /FL=gb:NM_     |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 022454.1       |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AI640307  | protocadheri   | PCDH10    | -1.89 | 1.37 | 1.53 | 1.32 | -1.33 | 0.38 | 2.99 | 1.19 |
|    |           | n 10           |           |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 | AJ224869  | Homo           | -         | 0.98  | 0.18 | 4.22 | 1.88 | 1.34  | 0.17 | 6.36 | 1.49 |

|    |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | sapiens<br>CXCR4 gene<br>encoding<br>receptor<br>CXCR4   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | AI824037  | ESTs,<br>Weakly<br>similar to<br>FCE2<br>MOUSE<br>LOW<br>AFFINITY<br>IMMUNOGL<br>OBULIN<br>EPSILON<br>FC<br>RECEPTOR<br>(M.musculus<br>)   | FREM1 | -1.42 | 0.36 | 1.22 | 1.95 | -1.37 | 0.61 | 3.48 | 1.49 |
| 15 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | BE222344  | splicing<br>factor,<br>arginineserin<br>e-rich 5   | -     | 0.50  | 0.05 | 3.01 | 0.93 | -0.94 | 1.18 | 4.27 | 0.94 |
| 25 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 | NM_001643 | Homo<br>sapiens<br>apolipoprotei<br>n A-II<br>(APOA2),<br>mRNA.<br>/PROD=apoli<br>poprotein A-<br>II precursor<br>/FL=gb:M298<br>82.1<br>gb:NM_0016<br>43.1<br>gb:BC00528<br>2.1 | APOA2 | -2.25 | 1.05 | 1.72 | 2.60 | -1.20 | 0.44 | 4.47 | 2.42 |
| 35 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | AI821669  | ESTs   | -     | -0.94 | 0.79 | 1.71 | 2.19 | -0.89 | 0.21 | 3.91 | 1.94 |
| 45 | NM_002608 | Homo<br>sapiens<br>platelet-<br>derived<br>growth factor<br>beta<br>polypeptide<br>(simian<br>sarcoma<br>viral (v-sis)   | PDGFB | -0.23 | 0.82 | 1.87 | 0.15 | -2.27 | 0.65 | 1.92 | 0.13 |
| 50 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|--------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | oncogene<br>homolog)<br>(PDGFB),<br>mRNA.<br>/PROD=plate<br>let-derived   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | growth factor<br>beta<br>polypeptide(<br>simian   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | sarcoma<br>viral (v-sis)<br>oncogene<br>homolog)<br>/FL=gb:M127   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | 83.1<br>gb:NM_002   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | AW444761  | ESTs  | CDKN2B | -3.35 | 0.90 | 0.39 | 0.52 | -3.11 | 0.88 | 0.80 | 0.25 |
|    | BF223214  | ESTs  | -      | -0.48 | 0.08 | 1.69 | 2.04 | -1.51 | 0.25 | 4.09 | 1.98 |
|    | AF154054  | Homo  | GREM1  | 1.68  | 0.26 | 4.61 | 0.74 | 0.62  | 0.04 | 3.58 | 0.87 |
| 30 |           | sapiens<br>DRM (DRM)<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=DR<br>M<br>/FL=gb:NM_<br>013372.1<br>gb:AF11013<br>7.2<br>gb:AF04580<br>0.1<br>gb:AF15405<br>4.1 |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_021223 | Homo  | MYL7   | 1.81  | 0.05 | 4.28 | 0.81 | 0.17  | 0.08 | 4.87 | 0.96 |
| 50 |           | sapiens<br>myosin light<br>chain 2a<br>(LOC58498),<br>mRNA.<br>/PROD=myo<br>sin light<br>chain 2a<br>/FL=gb:NM_<br>021223.1                                 |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 | AI817041  | G protein-<br>coupled<br>receptor   | CMKOR1 | -0.19 | 0.27 | 2.67 | 1.97 | 0.06  | 0.18 | 5.05 | 1.64 |
| 65 |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | NM_003670 | Homo sapiens   | BHLHB2 | 1.09  | 0.08 | 3.85  | 0.10 | -0.11 | 0.17 | 3.46  | 0.03 |
| 10 |           | basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (BHLHB2), mRNA. |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | /PROD=differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1             |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | /FL=gb:AB004066.1  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           | gb:NM_003670.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 | NM_023915 | Homo sapiens G protein-coupled receptor 87 (GPR87), mRNA.            | GPR87  | -1.70 | 0.61 | 1.64  | 0.18 | -2.99 | 0.06 | 1.40  | 0.23 |
| 35 |           | /PROD=G protein-coupled receptor 87                                  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | /FL=gb:NM_023915.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           | gb:AF237763.1  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 | NM_003867 | Homo sapiens fibroblast growth factor 17 (FGF17), mRNA.              | FGF17  | -3.05 | 0.39 | 0.03  | 2.07 | -2.13 | 0.41 | 2.49  | 1.35 |
| 55 |           | /PROD=fibroblast growth factor 17                                    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           | /FL=gb:NM_003867.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           | gb:AB009249.1  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_024426 | Homo sapiens   | WT1    | -3.23 | 0.37 | -1.11 | 0.62 | -4.20 | 0.56 | -2.44 | 1.26 |

|    |           |               |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---------------|--------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | Wilms tumor   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 1 (WT1),      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | transcript    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | variant D,    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.         |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 10 |           | /PROD=Wil     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | ms tumor 1    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | isoform D     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 15 |           | 024424.1      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0244    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 26.1          |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | NM_033136 | Homo          | FGF1   | -3.10 | 1.42 | 0.09 | 0.83 | -3.16 | 0.63 | -0.78 | 1.21 |
|    |           | sapiens       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 20 |           | fibroblast    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | growth factor |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 1 (acidic)    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | (FGF1),       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 |           | transcript    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | variant 2,    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.         |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=fibro   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 |           | blast growth  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | factor 1      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | (acidic)      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | isoform       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 |           | 2precursor    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 033137.1      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0331    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 40 |           | 36.1          |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | X99268    | H.sapiens     | TWIST1 | 0.10  | 0.33 | 3.94 | 0.24 | 0.34  | 0.22 | 3.45  | 0.34 |
|    |           | mRNA for B-   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | HLH DNA       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 |           | binding       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | protein.      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=B-      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | HLH DNA       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 50 |           | binding       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | protein       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 000474.1      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 55 | AL524520  | G protein-    | LGR5   | -2.27 | 1.43 | 0.76 | 1.40 | -1.58 | 0.40 | 2.51  | 1.35 |
|    |           | coupled       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | receptor 49   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | NM_022557 | Homo          | CSH1   | -0.91 | 0.19 | 1.40 | 0.22 | -2.12 | 0.08 | 1.47  | 0.14 |
|    |           | sapiens       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 60 |           | growth        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | hormone 2     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 65 |           |               |        |       |      |      |      |       |      |       |      |

|    |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | (GH2),<br>transcript<br>variant 2,<br>mRNA.<br>/PROD=growth hormone<br>2, isoform 2<br>precursor<br>/FL=gb:J037<br>56.1   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | gb:NM_0225<br>57.1  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 | AL544576  | ESTs  | TMEM88    | -1.96 | 0.68 | 1.75  | 0.58 | -1.45 | 0.86 | 2.08  | 0.70 |
| 20 | NM_022580 | Homo sapiens chorionic somatomamotropin hormone-like 1 (CSHL1), transcript variant 4, mRNA.<br>/PROD=chorionic somatomamotropin hormone-like 1, isoform 4<br>/FL=gb:NM_022580.1 | CSH1      | -1.20 | 0.86 | 2.30  | 0.39 | -1.78 | 0.64 | 1.55  | 0.63 |
| 25 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 | J03580    | Human, parathyroid-like protein (associated with humoral hypercalcemia of malignancy) mRNA, complete cds.<br>/FL=gb:J03580.1  | PTH1H     | -2.72 | 0.33 | -0.80 | 0.40 | -4.05 | 0.41 | -1.42 | 0.73 |
| 45 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | BC029835  | Homo sapiens, clone IMAGE:5169759, mRNA.  | LOC646867 | -2.66 | 1.12 | 1.01  | 1.85 | -1.40 | 0.41 | 3.03  | 1.61 |
| 65 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
|    | AI452798  | ESTs   | MYOCD  | 0.98  | 0.13 | 3.31 | 0.66 | -0.07 | 0.28 | 2.80 | 0.98 |
| 5  | NM_022559 | Homo sapiens   | CSH1   | -1.56 | 0.38 | 2.00 | 0.32 | -2.07 | 0.42 | 1.47 | 0.28 |
| 10 |           | growth hormone 1 (GH1), transcript variant 2, mRNA.                            |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /PROD=growth hormone 1, isoform 2 precursor                                    |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | NM_001318 | Homo sapiens   | CSH1   | 0.15  | 0.41 | 2.83 | 0.40 | -1.30 | 0.34 | 2.37 | 0.50 |
| 25 |           | chorionic somatomamotropin hormone-like 1 (CSHL1), transcript variant 1, mRNA. |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | /PROD=chorionic somatomamotropin hormone-like 1, isoform 1                     |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | /FL=gb:NM_001318.2   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | M65062    | Human  | IGFBP5 | -2.80 | 1.17 | 2.19 | 2.00 | -0.99 | 0.23 | 4.11 | 1.81 |
| 45 |           | insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5) mRNA, complete cds.     |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | /PROD=insulin-like growth factor binding protein 5                             |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           | /FL=gb:M65062.1  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|----------------|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:M62782.1    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0005     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 99.1           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:AF05503     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 3.1            |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AF207990  | Homo           | FER1L3 | 0.49  | 0.40 | 3.00  | 0.81 | -0.16 | 0.09 | 4.02  | 0.92 |
| 10 |           | sapiens        | fer-1  |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | like protein 3 |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | (FER1L3)       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | mRNA,          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | complete       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | cds.           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=fer-1    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | like protein 3 |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:AF20    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 7990.1         |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AI079944  | ESTs           | -      | -0.78 | 0.22 | 0.08  | 0.59 | -3.56 | 0.24 | -0.13 | 0.73 |
| 25 | BC003070  | Homo           | GATA3  | 1.07  | 0.04 | 3.23  | 0.96 | 0.31  | 0.26 | 4.45  | 0.80 |
|    |           | sapiens,       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | GATA-          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | binding        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           | protein 3,     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | clone          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | MGC:2346,      |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA,          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           | complete       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | cds.           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=GAT      |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | A-binding      |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | protein 3      |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 002051.1       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           | gb:M69106.1    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:BC00307     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 0.1            |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BE877796  | collagen,      | COL8A1 | -3.76 | 1.17 | -1.28 | 0.73 | -4.89 | 0.54 | -1.33 | 1.64 |
| 50 |           | type VIII,     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | alpha 1        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 001850.1       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 | NM_022560 | Homo           | CSH1   | -2.23 | 0.74 | 1.95  | 0.08 | -2.01 | 0.51 | 1.47  | 0.31 |
|    |           | sapiens        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | growth         |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | hormone 1      |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           | (GH1),         |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | transcript     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | variant 3,     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA,          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           | /PROD=grow     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |               |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|----|-----------|---------------|-------|-------|-------|------|------|-------|-------|------|------|------|
| 5  |           |               |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | th hormone    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | 1, isoform 3  |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | precursor     |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | 022560.1      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    | BE328496  | hypothetical  | -     | -0.59 | 0.25  | 1.76 | 0.13 | -2.01 | 0.97  | 1.73 | 0.26 |      |
| 10 |           | protein       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | PRO2032       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF11   |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | 6683.1        |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 15 |           | gb:NM_0186    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | 15.1          |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    | NM_022469 | Homo          | GREM2 | -1.15 | 0.25  | 0.09 | 0.88 | -3.43 | 0.90  | 0.76 | 0.47 |      |
| 20 |           | sapiens       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | hypothetical  |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | protein       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | FLJ21195      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 25 |           | similar to    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | protein       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | related to    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | DAC and       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | cerberus      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 30 |           | (FLJ21195),   |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=hypo    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | thetical      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 35 |           | protein       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | FLJ21195      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | similar to    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 40 |           | proteinrelate |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | d to DAC      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | and cerberus  |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 45 |           | 022469.1      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    | NM_001362 | Homo          | DIO3  | -1.73 | 0.70  | 1.99 | 1.92 | -1.05 | 0.79  | 4.23 | 1.51 |      |
| 50 |           | sapiens       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | deiodinase,   |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | iodothyronin  |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | e, type III   |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | (DIO3),       |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 55 |           | /PROD=thyr    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | oxine         |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | deiodinase    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | type III      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 60 |           | /FL=gb:NM_    |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | 001362.1      |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
|    |           | gb:S79854.1   |       |       |       |      |      |       |       |      |      |      |
| 65 |           | NM_022581     | Homo  | CSH1  | -1.56 | 0.67 | 2.08 | 0.42  | -1.63 | 0.80 | 1.47 | 0.53 |

|    |           |               |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---------------|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | sapiens       |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | chorionic     |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | somatomam     |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | motropin      |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hormone-like  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | 1 (CSHL1),    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | transcript    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | variant 5,    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=chori   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | onic          |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | somatomam     |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | motropin      |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hormone-like  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | 1, isoform 5  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | precursor     |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 022581.1      |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | NM_013372 | Homo          | GREM1 | 1.61  | 0.07 | 4.15 | 0.64 | 0.91  | 0.15 | 3.20 | 0.81 |
|    |           | sapiens       |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | cysteine knot |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | superfamily   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | 1, BMP        |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | antagonist 1  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (CKTSF1B1)    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | , mRNA.       |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=cyst    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | eine knot     |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | superfamily   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | 1, BMP        |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | antagonist 1  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 013372.1      |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | gb:AF11013    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 7.2           |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:AF04580    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 0.1           |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | gb:AF15405    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 4.1           |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_022561 | Homo          | CSH1  | -1.32 | 0.60 | 1.91 | 0.25 | -1.66 | 0.46 | 1.57 | 0.22 |
| 55 |           | sapiens       |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | growth        |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | hormone 1     |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (GH1),        |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           | transcript    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | variant 4,    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=grow    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           | th hormone    |       |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |                                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--------------------------------|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |                                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_022659 | Homo sapiens                   | -      | -1.58 | 0.75 | -1.24 | 1.79 | -3.62 | 0.20 | -1.81 | 1.25 |
| 10 |           | 1, isoform 4 precursor         |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_022561.1             |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | hypothetical protein           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | FLJ11500 similar to EBF2       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | (FLJ11500), mRNA.              |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=hypothetical protein     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           | FLJ11500 similar to EBF2       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_022659.1             |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 | AF006060  | Homo sapiens                   | CSH1   | -1.21 | 0.06 | 1.13  | 0.05 | -3.08 | 0.63 | 0.50  | 0.17 |
| 35 |           | placental growth hormone       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 20kDa isoform (hGH-V)          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | mRNA, complete cds.            |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           | /PROD=placental growth hormone |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 20kDa isoform                  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           | /FL=gb:AF006060.1              |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:NM_022556.1                 |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 | AI688418  | plexin A2                      | PLXNA2 | -0.18 | 0.14 | 0.84  | 1.58 | -1.28 | 0.53 | 2.74  | 0.96 |
|    | M86849    | Homo sapiens                   | -      | -5.08 | 0.26 | 0.54  | 0.47 | -1.64 | 0.19 | -0.09 | 0.44 |
| 60 |           | connexin 26 (GJB2)             |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA, complete cds.            |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |                                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 20 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 30 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 35 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 40 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 45 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 50 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 55 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 60 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 65 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|    |           |   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|----------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | transcription factor 2  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_000325.1  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:U69961.1   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:AF04872  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 10 |           | 0.1   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | AI692659  | heat shock 90kD protein 1, alpha  | PRDM1    | 0.21  | 0.25 | 1.67 | 0.77 | -0.67 | 0.17 | 2.61  | 0.80 |
| 15 | NM_000602 | Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA. | SERPINE1 | 2.97  | 0.16 | 4.75 | 1.89 | 1.55  | 0.22 | 2.75  | 1.87 |
| 20 |           | /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 |           | /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 |           | /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 |           | /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 40 |           | /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 |           | /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA.        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 50 | NM_001480 | Homo sapiens galanin receptor 1 (GALR1), mRNA.  | GALR1    | -1.90 | 0.68 | 0.04 | 0.73 | -2.42 | 0.72 | -0.34 | 0.73 |
| 55 |           | /PROD=galanin receptor 1  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 60 |           | /FL=gb:NM_001480.2  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:U23854.1   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:L34339.1   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 65 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |

|    |           |  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | NM_000393 | gb:U53511.1<br>Homo sapiens collagen, type V, alpha 2 (COL5A2), mRNA.<br>/PROD=collagen, type V, alpha 2<br>/FL=gb:NM_000393.1   | COL5A2 | 4.29  | 0.14 | 5.25  | 0.21 | 2.62  | 0.02 | 5.48  | 0.13 |
| 10 | N63706    | ESTs   | -      | 0.06  | 0.18 | 1.73  | 1.89 | -0.74 | 0.13 | 3.75  | 1.75 |
| 15 | AF132818  | Homo sapiens colon Kruppel-like factor (CKLF) mRNA, complete cds.<br>/PROD=colon Kruppel-like factor<br>/FL=gb:AF132818.1<br>gb:AF28727.2.1<br>gb:AB03082.4.1<br>gb:NM_001730.1<br>gb:D14520.1 | KLF5   | 0.63  | 0.11 | 3.16  | 0.50 | 0.07  | 0.42 | 3.40  | 0.44 |
| 20 | X59065    | H.sapiens FGF gene, exon 3<br>/FL=gb:NM_000800.1<br>gb:M13361.1  | -      | -1.17 | 1.11 | -0.39 | 1.06 | -2.61 | 0.26 | -0.96 | 1.01 |
| 25 | R73554    | Human insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) mRNA   | IGFBP5 | -0.12 | 0.15 | 2.63  | 1.41 | -0.69 | 0.16 | 4.00  | 1.65 |
| 30 | NM_002149 | Homo sapiens   | HPCAL1 | -0.18 | 0.28 | 1.81  | 0.44 | -1.98 | 0.86 | 1.18  | 0.22 |

|    |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|---|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | hippocalcin-like 1<br>(HPCAL1),<br>mRNA.<br>/PROD=hippocalcin-like 1  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | /FL=gb:NM_002149.1<br>gb:D16227.1   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 | AI093327  | ESTs  | -     | 0.69 | 0.11 | 3.09 | 0.58 | 0.45 | 0.07 | 2.29 | 0.85 |
|    | NM_003240 | Homo sapiens<br>endometrial<br>bleeding<br>associated<br>factor (left-right<br>determination, factor A;<br>transforming growth factor<br>beta superfamily)<br>(EBAF),<br>mRNA.<br>/PROD=transforming<br>growth factor, beta 4 | PYCR2 | 6.22 | 0.16 | 6.97 | 0.60 | 4.16 | 0.07 | 7.51 | 0.68 |
| 20 |           | /FL=gb:U81523.1<br>gb:NM_003240.1<br>gb:AF081513.1  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 | AI263909  | ras homolog gene family, member B<br>/FL=gb:NM_004040.1   | RHOB  | 3.89 | 0.16 | 5.88 | 0.13 | 3.01 | 0.15 | 5.64 | 0.10 |
| 55 | NM_001792 | Homo sapiens<br>cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)<br>(CDH2),<br>mRNA.<br>/PROD=cadh   | CDH2  | 3.83 | 0.17 | 6.01 | 0.11 | 2.85 | 0.13 | 5.74 | 0.17 |
| 60 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           |   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
|----|-----------|--|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|-----|
| 5  |           | erin 2, type<br>1, N-<br>cadherin<br>(neuronal)<br>/FL=gb:NM_<br>001792.1  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 10 | NM_003897 | Homo sapiens<br>immediate<br>early<br>response 3<br>(IER3),<br>mRNA,<br>/PROD=imm<br>ediate early<br>response 3<br>/FL=gb:BC00<br>5080.1<br>gb:BC00084<br>4.1              | IER3  | 5.45  | 0.15 | 6.97 | 0.17 | 4.33  | 0.11 | 6.75 | 0.2 |
| 15 |           | gb:AF08342<br>1.1<br>gb:NM_0038<br>97.1  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 20 | AF278532  | Homo sapiens<br>beta-netrin<br>mRNA,<br>complete<br>cds,<br>/PROD=beta<br>-netrin<br>/FL=gb:AF11<br>9916.1<br>gb:AF29771<br>1.1<br>gb:NM_0212<br>29.1<br>gb:AF27853<br>2.1 | NTN4  | -0.16 | 0.30 | 1.70 | 0.91 | -0.67 | 0.48 | 2.66 | 0.7 |
| 25 |           | gb:AF27853<br>2.1  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 30 | AF348491  | Homo sapiens<br>chemokine<br>receptor<br>CXCR4<br>mRNA,<br>complete<br>cds.  | CXCR4 | 1.39  | 0.21 | 4.05 | 1.58 | 1.45  | 0.07 | 5.67 | 1.6 |
| 35 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 40 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 45 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 50 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 55 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 60 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |
| 65 |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |     |

|    |           |                |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|----------------|----------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           |                |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=che      |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | mokine         |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | receptor       |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | CXCR4          |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF34    |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 8491.1         |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | NM_030781 | Homo           | COLEC12  | 1.93  | 0.13 | 3.64 | 1.66 | 1.96  | 0.18 | 5.68 | 1.51 |
|    |           | sapiens        |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | scavenger      |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | receptor with  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | C-type lectin  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (SRCL),        |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=scav     |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | enger          |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | receptor with  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | C-type lectin  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           | 030781.1       |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_000599 | Homo           | IGFBP5   | -0.31 | 0.34 | 3.03 | 1.85 | 0.12  | 0.24 | 4.51 | 1.75 |
|    |           | sapiens        |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | insulin-like   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | growth factor  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | binding        |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | protein 5      |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (IGFBP5),      |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | mRNA.          |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=insul    |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | in-like growth |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | factor         |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | binding        |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | protein 5      |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:M650    |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | 62.1           |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:M62782.1    |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0005     |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 99.1           |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | gb:AF05503     |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | 3.1            |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AI348094  | KIAA0882       | TBC1D9   | 0.13  | 0.26 | 3.21 | 1.13 | 0.96  | 0.13 | 4.67 | 1.08 |
|    |           | protein        |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | BG287862  | AHNAK          | AHNAK    | 1.47  | 0.20 | 3.72 | 0.51 | 1.37  | 0.17 | 4.34 | 0.58 |
|    |           | nucleoprotei   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | n              |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | (desmoyokin    |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           | )              |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AI676059  | ESTs           | FOXQ1    | -0.32 | 0.55 | 3.08 | 1.63 | 0.50  | 0.17 | 4.81 | 1.47 |
|    | AI127440  | ESTs           | -        | -0.85 | 0.36 | 0.60 | 1.22 | -0.65 | 0.27 | 2.13 | 1.13 |
|    | AL574210  | serine (or     | SERPINE1 | 2.81  | 0.24 | 5.07 | 0.88 | 2.13  | 0.15 | 3.96 | 0.86 |
| 65 |           | )              |          |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |                |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|----------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | cysteine)      |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | proteinase     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | inhibitor,     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | clade E        |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (nexin,        |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | plasminogen    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | activator      |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | inhibitor type |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1), member     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1              |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:NM_     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 000602.1       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:M16006.1    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 | AB037810  | Homo           | SIPA1L2 | 3.88 | 0.04 | 5.66 | 0.08 | 3.18 | 0.11 | 5.85 | 0.11 |
|    |           | sapiens        |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA for       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | KIAA1389       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein,       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | partial cds.   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=KIA      |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | A1389          |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein        |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 | NM_001394 | Homo           | DUSP4   | 0.22 | 0.37 | 2.88 | 1.09 | 0.50 | 0.14 | 4.12 | 0.99 |
|    |           | sapiens dual   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | specificity    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | phosphatase    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | 4 (DUSP4),     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=dual     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | specificity    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | phosphatase    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 4              |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | 001394.2       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:BC00267     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1.1            |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:U48807.1    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | gb:U21108.1    |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | BC029442  | Homo           | -       | 2.04 | 0.20 | 3.80 | 0.74 | 1.18 | 0.05 | 4.50 | 0.65 |
|    |           | sapiens,       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | Similar to     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | immunity       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | associated     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein 1,     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | clone          |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           | MGC:32707      |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | IMAGE:4618     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 467, mRNA,     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | complete       |         |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|----------------------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_000700 | Homo sapiens         | ANXA1 | 5.00  | 0.18 | 6.27  | 1.28 | 3.67  | 0.05 | 4.96  | 1.25 |
| 15 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BC000740  | Homo sapiens,        | CCKBR | 1.08  | 0.36 | 3.93  | 1.84 | 1.93  | 0.03 | 5.86  | 1.82 |
| 30 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | N36408    | hypothetical protein | FOSL2 | -0.09 | 0.40 | 2.07  | 0.04 | -0.85 | 0.24 | 1.71  | 0.28 |
| 60 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |                      |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AF072242  | Homo sapiens         | MBD2  | -3.98 | 0.38 | -0.59 | 0.27 | -3.07 | 0.22 | -1.70 | 0.68 |

|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AF211891  | Homo sapiens Mix-like homeobox protein 1 (MILD1) mRNA, complete cds. /PROD=met hyl-CpG binding protein MBD2 /FL=gb:NM_003927.2 gb:AF07224 2.1                 | MIXL1 | -0.63 | 0.38 | 0.77 | 0.95 | -2.29 | 0.44 | 0.92 | 1.71 |
| 25 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BF063186  | ESTs  | CALD1 | 1.16  | 0.19 | 2.03 | 0.42 | -1.20 | 1.02 | 1.65 | 0.27 |
| 45 | NM_000362 | Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) (TIMP3), mRNA. /PROD=tissue inhibitor of metalloproteinase | TIMP3 | 0.08  | 0.32 | 1.98 | 0.09 | -0.34 | 0.33 | 1.80 | 0.26 |
| 50 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |       |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|----------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 3precursor<br>/FL=gb:NM_<br>000362.2<br>gb:U14394.1<br>gb:U67195.1<br>gb:U02571.1                                      |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 10 | AK022852  | Homo sapiens cDNA<br>FLJ12790  | SIPA1L2  | 2.87  | 0.12 | 4.50 | 0.09 | 1.87  | 0.01 | 4.55  | 0.09 |
| 15 |           | fis, clone<br>NT2RP2001<br>985, weakly<br>similar to   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 20 |           | Homo sapiens high-risk<br>human papilloma<br>viruses E6<br>oncoproteins<br>targeted<br>protein<br>E6TP1 alpha<br>mRNA. |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 | BE500942  | Homo sapiens mRNA;<br>cDNA<br>DKFZp761M<br>0111 (from<br>clone<br>DKFZp761M<br>0111)                                   | C6orf155 | 3.23  | 0.10 | 4.68 | 0.86 | 1.95  | 0.03 | 3.77  | 0.96 |
| 40 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 | AW665892  | paternally expressed 3   | MFAP5    | -1.82 | 0.54 | 0.37 | 0.60 | -1.54 | 0.39 | -0.01 | 0.28 |
| 50 | AK025063  | Homo sapiens cDNA:<br>FLJ21410   | FAM84A   | -1.34 | 0.84 | 0.75 | 0.45 | -2.35 | 0.85 | 1.01  | 0.53 |
| 55 |           | fis, clone<br>COL03938.  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 60 | NM_001828 | Homo sapiens Charot-Leyden<br>crystal<br>protein<br>(CLC),   | CLC      | 2.17  | 0.21 | 3.53 | 1.07 | 0.45  | 0.08 | 2.11  | 1.27 |
| 65 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |

|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|----------|------------|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | M15329   | Human      | IL1A  | 0.85  | 0.32 | 2.72 | 0.30 | -0.88 | 0.60 | 2.20 | 0.22 |
| 15 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BC002671 | Homo       | DUSP4 | 1.79  | 0.03 | 4.30 | 1.39 | 2.10  | 0.10 | 5.60 | 1.22 |
| 30 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AA524250 | deleted in | DLC1  | 1.02  | 0.05 | 2.35 | 0.98 | 0.10  | 0.38 | 3.26 | 0.96 |
| 55 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BC001211 | Homo       | KIFC3 | -1.53 | 0.72 | 0.81 | 0.38 | -2.08 | 0.42 | 0.75 | 0.16 |
| 60 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |          |            |       |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |                |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|----------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | complete       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cds.           |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=kine     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | sin family     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | member C3      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:BC00    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | 1211.1         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0055     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 50.1           |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AF00442     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | 6.1            |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | NM_004560 | Homo           | ROR2  | 0.76 | 0.08 | 2.20 | 0.81 | 0.08 | 0.14 | 3.06 | 0.95 |
|    |           | sapiens        |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | receptor       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           | tyrosine       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | kinase-like    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | orphan         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | receptor 2     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | (ROR2),        |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=rece     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ptor tyrosine  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | kinase-like    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | orphan         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | receptor 2     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:M976    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | 39.1           |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0045     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 60.1           |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | BC000125  | Homo           | TGFB1 | 1.16 | 0.18 | 3.43 | 0.08 | 0.72 | 0.14 | 3.30 | 0.16 |
| 40 |           | sapiens,       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | Similar to     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | transforming   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | growth         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | factor, beta   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1, clone       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | MGC:3119,      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA,          |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | complete       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cds.           |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=Simil    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ar to          |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | transforming   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | growth         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | factor, beta 1 |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:M384    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           | 49.1           |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:BC00118     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 0.1            |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           |                |       |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|--|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           |  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:BC00012   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 5.1  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0006   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 60.1   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | NM_016931 | Homo sapiens   | NOX4    | 1.83 | 0.06 | 3.31 | 1.29 | 1.20 | 0.14 | 2.28 | 1.27 |
| 10 |           | NADPH oxidase 4 (NOX4), mRNA.  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | /PROD=NADPH oxidase 4  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           | /FL=gb:AF261943.1  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | gb:NM_016931.1   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AF254621.1  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AB041035.1  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 | BC001830  | Homo sapiens,  | TGFB111 | 0.95 | 0.17 | 3.59 | 0.73 | 1.52 | 0.09 | 2.74 | 0.69 |
| 35 |           | Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1, clone MGC:4078, mRNA, complete cds. |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           | /PROD=Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1                                |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | /FL=gb:NM_015927.1   |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | gb:BC001830.1  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | gb:AF116343.1  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 | NM_024576 | Homo sapiens   | OGFRL1  | 3.15 | 0.13 | 4.49 | 0.82 | 1.63 | 0.06 | 3.30 | 0.98 |
| 65 |           |  |         |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |                      |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|----------------------|---|----------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |                      | hypothetical<br>protein<br>FLJ21079<br>(FLJ21079),<br>mRNA.<br>/PROD=hypo                             |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |                      | thetical<br>protein<br>FLJ21079<br>/FL=gb:NM_   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 | NM_001963            | Homo sapiens<br>epidermal<br>growth factor<br>(beta-<br>urogastrone)<br>(EGF),<br>mRNA.<br>/PROD=epid | EGF      | 0.12  | 0.22 | 1.82 | 1.15 | -0.62 | 0.36 | 2.68 | 1.23 |
| 20 |                      | ermal growth<br>factor (beta-<br>urogastrone)<br>/FL=gb:NM_   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |                      | 001963.2  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |                      | ESTs  | C6orf155 | 1.97  | 0.05 | 3.35 | 1.01 | 0.59  | 0.17 | 2.10 | 1.05 |
| 35 | BE620374<br>AL359062 | Homo sapiens<br>mRNA full<br>length insert<br>cDNA clone<br>EUROIMAG<br>E 1913076.                    | COL8A1   | -1.31 | 0.25 | 2.32 | 0.94 | 0.03  | 0.12 | 3.51 | 1.02 |
| 40 |                      |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 | AL117653             | Homo sapiens<br>mRNA;<br>cDNA<br>DKFZp586C<br>0224 (from<br>clone<br>DKFZp586C<br>0224).              | MITF     | -0.12 | 0.61 | 2.32 | 0.10 | 0.21  | 0.13 | 2.56 | 0.06 |
| 50 |                      |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |                      | Cluster Incl. -<br>AL021977:b<br>K447C4.1<br>(novel MAFF<br>(v-maf<br>musculoapo<br>neurotic          |          | 1.92  | 0.14 | 4.53 | 0.43 | 2.15  | 0.12 | 4.66 | 0.22 |
| 60 |                      |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |                      |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|------|--------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_003564 | Homo | TAGLN2 | 5.43  | 0.12 | 6.76 | 0.06 | 3.48  | 0.27 | 6.69 | 0.04 |
| 20 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BC005107  | Homo | -      | 7.08  | 0.07 | 6.42 | 0.26 | 2.60  | 0.07 | 6.93 | 0.22 |
| 35 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_001124 | Homo | ADM    | 4.70  | 0.22 | 7.61 | 0.19 | 5.21  | 0.06 | 7.58 | 0.21 |
| 50 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 | AF280545  | Homo | NRP2   | -0.29 | 0.33 | 1.40 | 0.30 | -1.67 | 0.61 | 1.22 | 0.33 |
| 65 |           |      |        |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|--------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | mRNA,<br>complete<br>cds,<br>alternatively<br>spliced.  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | /PROD=neur<br>opilin-2b(5)<br>/FL=gb:AF28<br>0544.1   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | gb:AF28054<br>5.1   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_014624 | Homo sapiens<br>S100<br>calcium-<br>binding<br>protein A6<br>(calcyclin)<br>(S100A6),<br>mRNA.<br>/PROD=S10<br>0 calcium-<br>binding<br>protein A6<br>/FL=gb:NM_<br>014624.2<br>gb:BC00143<br>1.1                                       | S100A6 | 3.08 | 0.38 | 3.10 | 0.18 | -0.57 | 0.37 | 3.24 | 0.19 |
| 20 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | AB030824  | Homo sapiens<br>mRNA for<br>transcription<br>factor<br>BTEB2,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=tran<br>scription<br>factor<br>BTEB2<br>/FL=gb:AF13<br>2818.1<br>gb:AF28727<br>2.1<br>gb:AB03082<br>4.1<br>gb:NM_0017<br>30.1<br>gb:D14520.1 | KLF5   | 0.57 | 0.24 | 2.16 | 0.49 | -0.41 | 0.05 | 2.53 | 0.17 |
| 45 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | NM_015675 | Homo sapiens  | GADD45B | 2.47  | 0.22 | 4.44 | 0.46 | 2.02  | 0.09 | 4.64 | 0.33 |
| 10 |           | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45B), mRNA.                         |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /PROD=DKF ZP566B133 protein   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | /FL=gb:NM_015675.1 gb:AF090950.1  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | BF347089  | tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) | TIMP3   | 0.57  | 0.13 | 2.01 | 0.29 | -0.19 | 0.20 | 2.09 | 0.44 |
| 30 |           | /FL=gb:NM_000362.2 gb:U14394.1 gb:U67195.1 gb:U02571.1                                |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 | BF056473  | ESTs  | -       | -0.64 | 0.87 | 1.79 | 0.10 | -0.73 | 0.34 | 1.57 | 0.23 |
| 40 | AA809487  | Homo sapiens cDNA: FLJ21715 fis, clone COL10287, highly similar to AF071569           | -       | 0.52  | 0.22 | 3.68 | 0.43 | 1.39  | 0.22 | 3.89 | 0.48 |
| 45 |           | Homo sapiens multifunctional calciumcalmodulin-dependent protein kinase II delta2     |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |  |       |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | AL575735  | isoform<br>mRNA<br>collagen, -<br>type V, alpha<br>2   |       | 5.54  | 0.11 | 6.65 | 0.14 | 4.57  | 0.08 | 6.68 | 0.07 |
| 10 | AF003934  | /FL=gb:NM_<br>000393.1<br>Homo sapiens<br>prostate<br>differentiation<br>factor<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=prostate<br>differentiation<br>factor<br>/FL=gb:U883<br>23.1<br>gb:BC00052<br>9.1<br>gb:AF00393<br>4.1<br>gb:NM_0048<br>64.1<br>gb:AF01977<br>0.1<br>gb:AB00058<br>4.1 | GDF15 | 2.74  | 0.20 | 4.01 | 0.41 | 0.72  | 0.17 | 4.34 | 0.50 |
| 45 | NM_000313 | Homo sapiens<br>protein S<br>(alpha)<br>(PROS1),<br>mRNA.<br>/PROD=protein S (alpha)<br>/FL=gb:M150<br>36.1<br>gb:NM_0003<br>13.1  | PROS1 | -1.54 | 0.10 | 0.98 | 0.83 | -0.62 | 0.09 | 1.79 | 0.86 |
| 60 | NM_016651 | Homo sapiens<br>heptacellular<br>carcinoma<br>novel gene-3<br>protein  | DACT1 | 2.37  | 0.26 | 4.79 | 0.67 | 2.46  | 0.14 | 3.92 | 0.78 |

|    |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | (LOC51339),<br>mRNA.<br>/PROD=hept<br>acellular<br>carcinoma  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | novel gene-3<br>protein<br>/FL=gb:NM_<br>016651.2   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | gb:AF25107<br>9.2   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_020129 | Homo sapiens placental protein 13-like protein (LOC56891), mRNA.<br>/PROD=placental protein 13-like protein<br>/FL=gb:NM_020129.1 | LGALS14 | 1.38  | 0.30 | 3.15  | 0.70 | 0.79  | 0.04 | 2.47  | 0.66 |
| 20 |           | gb:AF26785<br>2.1   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           | (C.elegans)-like 3 (myoferlin) (FER1L3), mRNA.<br>/PROD=fer-1 (C.elegans)-like 3 (myoferlin)<br>/FL=gb:NM_013451.1                | FER1L3  | 1.75  | 0.15 | 4.02  | 0.97 | 1.59  | 0.13 | 5.14  | 0.82 |
| 30 |           | gb:AF18231<br>6.1   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           | microfibrillar-associated protein 4   | MFAP4   | -1.15 | 0.60 | -1.76 | 0.61 | -2.37 | 0.22 | -0.60 | 0.72 |
| 40 |           | ESTs, Moderately similar to   | FUT1    | 2.42  | 0.14 | 2.32  | 0.72 | -0.46 | 0.53 | 1.70  | 0.59 |
| 45 |           | ALU1_HUMAN ALU  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    | SUBFAMILY   |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-------------|----------------|--------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | J           |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | SEQUENCE    |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | CONTAMIN    |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | ATION       |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | WARNING     |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | ENTRY       |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | (H.sapiens) |                |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_001553   | Homo sapiens   | IGFBP7 | 3.41 | 0.19 | 4.63 | 1.07 | 1.65  | 0.10 | 3.34 | 1.16 |
| 15 |             | sapiens        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | insulin-like   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | growth factor  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | binding        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |             | protein 7      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | (IGFBP7),      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | mRNA.          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | /PROD=insul    |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |             | in-like growth |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | factor         |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | binding        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | protein 7      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |             | /FL=gb:NM_     |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | 001553.1       |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | gb:L19182.1    |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BG285011    | Homo sapiens   | ARID5B | 0.05 | 0.22 | 1.79 | 0.21 | -0.95 | 0.42 | 1.16 | 0.55 |
| 35 |             | sapiens        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | mRNA;          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | cDNA           |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |             | DKFZp586N      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | 012 (from      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | clone          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | DKFZp586N      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |             | 012)           |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BE967311    | Homo sapiens   | -      | 1.99 | 0.06 | 4.08 | 0.92 | 2.28  | 0.17 | 5.01 | 0.87 |
| 50 |             | sapiens        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | mRNA;          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | cDNA           |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | DKFZp762O      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | 1615 (from     |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |             | clone          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | DKFZp762O      |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | 1615)          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | BC005047    | Homo sapiens,  | DUSP6  | 2.50 | 0.32 | 4.04 | 0.67 | 1.56  | 0.16 | 2.94 | 0.84 |
| 60 |             | sapiens,       |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | clone          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | MGC:12852,     |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | mRNA,          |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |             | complete       |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |             | ods.           |        |      |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | /PROD=Unk<br>nown<br>(protein for<br>MGC:12852)<br>/FL=gb:NM_<br>001946.1             |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | gb:AB01338<br>2.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | gb:BC00356<br>2.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | gb:BC00314<br>3.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 | AW005572  | putative 47<br>kDa protein  | ANKS1B | -0.59 | 0.12 | 0.19  | 0.70 | -1.59 | 0.07 | 0.86  | 0.92 |
| 25 | AW294092  | ESTs  | RERG   | 0.54  | 0.16 | -0.68 | 1.55 | -2.78 | 0.92 | -0.58 | 0.97 |
| 25 | NM_001899 | Homo<br>sapiens<br>cystatin S<br>(CST4),<br>mRNA.                                     | CST4   | 0.14  | 0.52 | 2.46  | 1.59 | 0.53  | 0.14 | 3.87  | 1.40 |
| 30 |           | /PROD=cyst<br>atin S<br>/FL=gb:NM_<br>001899.1  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 | AI917371  | ESTs  | -      | -1.47 | 0.95 | 0.18  | 1.43 | -1.24 | 0.33 | 2.21  | 1.17 |
| 35 | NM_000515 | Homo<br>sapiens<br>growth<br>hormone 1<br>(GH1),<br>transcript<br>variant 1,<br>mRNA. | CSH1   | -2.36 | 0.29 | 1.92  | 0.10 | -0.73 | 0.57 | 1.37  | 0.21 |
| 40 |           | /PROD=grow<br>th hormone<br>1, isoform 1<br>precursor<br>/FL=gb:NM_<br>000515.2       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 | NM_004414 | Homo<br>sapiens<br>Down<br>syndrome<br>critical region<br>gene 1<br>(DSCR1),<br>mRNA. | DSCR1  | 2.14  | 0.03 | 3.85  | 0.26 | 1.74  | 0.16 | 3.34  | 0.36 |
| 60 |           |   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |          |                |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|----------|----------------|----------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |          |                |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          |                |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          |                |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 10 |          |                |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | AI355441 | sprouty        | -        | 0.24  | 0.48 | 1.72 | 0.50 | -1.12 | 0.40 | 2.03  | 0.61 |
| 15 |          | (Drosophila)   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | homolog 4      |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | AB032953 | Homo           | ODZ2     | 0.00  | 0.14 | 0.65 | 0.35 | -1.74 | 0.74 | 0.88  | 0.03 |
| 20 |          | sapiens        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | mRNA for       |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | KIAA1127       |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | protein,       |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 |          | partial cds.   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=KIA      |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | A1127          |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | protein        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 | BE048571 | ESTs           | MGC16121 | -1.66 | 0.78 | 1.44 | 1.00 | -1.31 | 0.21 | 0.10  | 1.22 |
|    | AW471145 | ESTs           | PRSS23   | 0.87  | 0.10 | 3.46 | 0.35 | 1.13  | 0.11 | 3.37  | 0.53 |
|    | BF196943 | ESTs           | USP53    | 1.43  | 0.03 | 3.24 | 0.92 | 0.85  | 0.26 | 2.32  | 0.88 |
|    | AF498927 | Homo           | ARHGDIB  | -0.03 | 0.19 | 0.04 | 0.96 | -3.00 | 0.54 | -0.85 | 0.93 |
| 35 |          | sapiens Rho    |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | GDP            |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | dissociation   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | inhibitor beta |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 40 |          | (ARHGDIB)      |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | mRNA,          |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | complete       |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 |          | ods.           |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=Rho      |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | GDP            |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | dissociation   |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | inhibitor beta |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 50 |          | /FL=gb:AF49    |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | 8927.1         |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | AF329092 | Homo           | DOC1     | -2.38 | 0.45 | 1.00 | 0.19 | -1.62 | 0.74 | 0.75  | 0.11 |
| 55 |          | sapiens        |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | GPBP-          |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | interacting    |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | protein 90     |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 60 |          | mRNA,          |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | complete       |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | ods.           |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=GPB      |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 65 |          | P-interacting  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |          | protein 90     |          |       |      |      |      |       |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| 5  | BG250721  | Homo sapiens mRNA; cDNA   | -       | 2.48  | 0.04 | 4.54  | 0.95 | 2.63  | 0.14 | 5.31 | 0.83 |
| 10 |           | DKFZp564C2063 (from clone DKFZp564C2063)                          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 | N69091    | ESTs  | PCDH17  | 0.59  | 0.10 | 1.49  | 0.88 | -1.11 | 0.69 | 2.49 | 0.78 |
|    | BF589359  | ESTs  | PAG1    | -1.11 | 0.52 | -0.09 | 0.43 | -1.54 | 0.12 | 0.50 | 0.13 |
|    | BF968270  | ESTs  | SLC35F3 | 0.37  | 0.02 | 1.84  | 0.30 | 0.10  | 0.17 | 2.46 | 0.36 |
| 20 | NM_006183 | Homo sapiens neurotensin (NTS), mRNA.                             | NTS     | 4.77  | 0.15 | 4.73  | 1.45 | 3.01  | 0.19 | 3.21 | 1.47 |
| 25 |           | /PROD=neurotensin precursor                                       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 |           | /FL=gb:NM_006183.2  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 35 | D28124    | Cluster Incl. D28124:Human mRNA for unknown product, complete cds | NBL1    | 2.90  | 0.03 | 4.24  | 0.37 | 2.09  | 0.08 | 4.44 | 0.38 |
| 40 |           | /cds=(61,603)   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 45 |           | /gb=D28124 /gi=641821 /ug=Hs.76307 /len=1929                      |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 50 | AW129593  | tudor repeat associator with PCTAIRE 2                            | TDRD7   | 1.19  | 0.19 | 2.40  | 0.87 | 0.92  | 0.04 | 3.27 | 0.89 |
| 55 | BE675435  | core promoter element binding protein                             | KLF6    | 0.29  | 0.30 | 2.91  | 1.02 | 0.54  | 0.24 | 3.68 | 0.94 |
| 60 |           | /FL=gb:AF001461.1   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 65 |           | gb:BC00031  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |

|    |           |   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|---|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | 1.1<br>gb:NM_001300.2<br>gb:AB017493.1<br>gb:BC004301.1   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 | AI202327  | ESTs  | CPEB2  | 1.88 | 0.09 | 3.42 | 0.07 | 0.99 | 0.10 | 3.36 | 0.03 |
|    | NM_002228 | Homo  | JUN    | 2.12 | 0.16 | 4.09 | 0.56 | 1.62 | 0.13 | 4.53 | 0.41 |
| 15 |           | sapiens v-jun<br>avian<br>sarcoma<br>virus 17<br>oncogene   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           | homolog<br>(JUN),<br>mRNA.<br>/PROD=v-jun   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | avian<br>sarcoma<br>virus 17<br>oncogene  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | homolog<br>/FL=gb:NM_002228.2<br>gb:BC002646.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 | AF005775  | Homo  | CFLAR  | 2.88 | 0.18 | 3.70 | 1.56 | 0.35 | 0.17 | 5.22 | 1.69 |
| 40 |           | sapiens<br>caspase-like<br>apoptosis<br>regulatory<br>protein 2<br>(clarp)  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | mRNA,<br>alternatively<br>spliced,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=caspase-like<br>apoptosis<br>regulatory<br>protein 2<br>/FL=gb:AF005775.1 |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           |   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           |   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 | NM_007173 | Homo  | PRSS23 | 3.02 | 0.10 | 5.11 | 0.21 | 2.90 | 0.05 | 5.22 | 0.23 |
| 65 |           | sapiens<br>protease,  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | serine, 23<br>(SPUVE),<br>mRNA.<br>/PROD=prot<br>ease, serine,<br>23   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 10 |           | /FL=gb:BC00<br>1278.1<br>gb:AF19361<br>1.1   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 15 |           | gb:AF01528<br>7.1<br>gb:AL13691<br>4.1   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 20 |           | gb:NM_0071<br>73.1   |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 | NM_012413 | Homo sapiens<br>glutaminyl-<br>peptide<br>cyclotransfer<br>ase<br>(glutaminyl<br>cyclase)<br>(QPCT),<br>mRNA.<br>/PROD=gluta<br>minyl-<br>peptide<br>cyclotransfer<br>ase<br>precursor<br>/FL=gb:NM_<br>012413.2 | QPCT   | 1.44  | 0.09 | 0.97 | 0.85 | -2.46 | 0.65 | 0.19  | 1.10 |
| 30 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 40 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 | BU683415  | Homo sapiens,<br>clone<br>IMAGE:4096<br>273, mRNA  | KLF6   | 3.40  | 0.06 | 5.28 | 0.85 | 3.46  | 0.09 | 6.01  | 0.85 |
| 50 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 55 | AV729634  | DnaJ<br>(Hsp40)<br>homolog,<br>subfamily B,<br>member 6<br>/FL=gb:AB00<br>7942.1<br>gb:NM_0147<br>87.1   | DNAJC6 | 0.62  | 0.20 | 2.59 | 0.79 | 0.99  | 0.19 | 3.35  | 0.65 |
| 60 |           |  |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 65 | BC038556  | Homo   | -      | -0.79 | 0.40 | 0.12 | 0.99 | -2.17 | 0.62 | -0.08 | 0.38 |

|    |           |   |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | sapiens,<br>clone<br>IMAGE:3446<br>976, mRNA.                                 |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_014942 | Homo sapiens<br>ANKRD6  | 0.62  | 0.04 | 2.17 | 1.11 | 0.59  | 0.23 | 3.30 | 1.07 |
| 10 |           | sapiens<br>KIAA0957<br>protein<br>(KIAA0957),<br>mRNA.                        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /PROD=KIA<br>A0957<br>protein   |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | /FL=gb:AB02<br>3174.1<br>gb:NM_0149<br>42.1                                   |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | AF260333  | Homo sapiens<br>C4orf18   | -1.58 | 0.10 | 0.21 | 1.21 | -3.19 | 1.07 | 1.60 | 1.12 |
| 30 |           | AD036<br>mRNA,<br>complete<br>cds.  |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | /PROD=AD0<br>36<br>/FL=gb:AF26<br>0333.1                                      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | AA448956  | Homo sapiens<br>CAMK2D  | 1.47  | 0.18 | 2.75 | 0.42 | 0.21  | 0.21 | 2.97 | 0.39 |
| 45 |           | cDNA:<br>FLJ21715<br>fis, clone<br>COL10287,<br>highly similar<br>to AF071569 |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | Homo sapiens<br>multifunctional<br>calciumcalmodulin-<br>dependent<br>protein |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           | kinase II<br>delta2<br>isoform<br>mRNA  |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           | /FL=gb:AF07<br>1569.1   |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |       |      |      |      |       |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |               |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---------------|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|    | BE349115  | ESTs          | COL22A1   | -0.02 | 0.52 | 2.04  | 0.25 | 0.24  | 0.06 | 2.38  | 0.22 |
|    | BF209337  | Homo          | LOC541471 | 4.83  | 0.17 | 5.80  | 0.73 | 3.13  | 0.02 | 4.84  | 0.81 |
| 5  |           | sapiens       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | cDNA          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | FLJ10934      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | fis, clone    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | OVARC1000     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 640           |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AB019695  | Homo          | -         | 2.43  | 0.01 | 4.15  | 0.40 | 1.42  | 0.05 | 3.50  | 0.29 |
| 15 |           | sapiens       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA for      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | thioredoxin   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | reductase II  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | beta,         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | complete      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | cds.          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=thior   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           | edoxin        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | reductase II  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | beta          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:AB01   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           | 9695.1        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AK090497  | Homo          | LOC284576 | -3.78 | 0.56 | -2.87 | 1.42 | -4.94 | 0.07 | -4.74 | 0.53 |
| 35 |           | sapiens       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | cDNA          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | FLJ33178      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | fis, clone    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | ADRGL2002     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | 753.          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_006763 | Homo          | BTG2      | 2.30  | 0.10 | 3.28  | 0.62 | 0.85  | 0.25 | 3.84  | 0.74 |
| 45 |           | sapiens       | BTG       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | family,       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | member 2      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | (BTG2),       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=BTG     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           | family,       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | member 2      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:U726   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 49.1          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           | gb:NM_0067    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 63.1          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BC002616  | Homo          | TAGLN2    | 5.61  | 0.20 | 5.56  | 0.17 | 2.91  | 0.18 | 5.40  | 0.12 |
| 60 |           | sapiens,      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | transgelin 2, |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | clone         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | MGC:2989,     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           | mRNA,         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | complete      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|----------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | ods.<br>/PROD=tran<br>sgelin 2<br>/FL=gb:BC00<br>2616.1  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | AF078077  | Homo sapiens<br>growth arrest<br>and DNA-<br>damage-<br>inducible<br>protein<br>GADD45bet<br>a mRNA,<br>complete<br>ods.<br>/PROD=grow<br>th arrest and<br>DNA-<br>damage-<br>inducible<br>proteinGAD<br>D45beta<br>/FL=gb:AF08<br>7853.1<br>gb:AF07807<br>7.1 | GADD45B  | 1.30  | 0.17 | 3.41 | 0.31 | 0.61  | 0.12 | 3.05  | 0.29 |
| 10 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 15 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 20 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | NM_001854 | Homo sapiens<br>collagen,<br>type XI,<br>alpha 1<br>(COL11A1),<br>mRNA,<br>/PROD=colla<br>gen, type XI,<br>alpha 1<br>/FL=gb:J041<br>77.1<br>gb:NM_0018<br>54.1  | COL11A1  | 2.90  | 0.02 | 4.06 | 1.44 | 1.87  | 0.06 | 2.68  | 1.43 |
| 40 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 50 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 55 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | A1830201  | ESTs   | KIAA0773 | -0.75 | 0.82 | 1.24 | 0.22 | -1.87 | 0.51 | 0.40  | 0.22 |
|    | N95437    | ESTs   | LMCD1    | 0.74  | 0.12 | 2.72 | 0.57 | 0.39  | 0.14 | 3.05  | 0.42 |
| 60 | BC002511  | Homo sapiens,<br>carbonyl<br>reductase 1,<br>clone<br>MGC:1920,  | CBR1     | 3.72  | 0.02 | 1.03 | 2.43 | -4.10 | 0.16 | -1.64 | 2.36 |
| 65 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |       |      |

|    |           |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=carb<br>onyl<br>reductase 1                      |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | /FL=gb:BC00<br>2511.1<br>gb:NM_0017<br>57.1   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 | AV682252  | HIV-1 rev   | -       | -0.33 | 0.15 | 1.78 | 1.36 | -0.24 | 0.17 | 0.41 | 1.29 |
|    |           | binding<br>protein 2  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | AW263497  | ESTs  | SYTL5   | -1.05 | 0.25 | 1.44 | 0.38 | -0.55 | 0.41 | 2.11 | 0.47 |
|    | AF130095  | Homo  | -       | 5.80  | 0.14 | 6.80 | 0.49 | 4.54  | 0.10 | 7.35 | 0.36 |
|    |           | sapiens<br>clone<br>FLC0562<br>PRO2841  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           | mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=PRO<br>2841                                      |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | /FL=gb:AF13<br>0095.1   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 | H92988    | tyrosine 3-<br>monooxygen<br>asetryptopha<br>n 5-<br>monooxygen<br>ase              | C9orf19 | 2.00  | 0.06 | 3.54 | 0.91 | 1.93  | 0.14 | 4.61 | 0.81 |
| 40 |           | activation<br>protein, eta<br>polypeptide   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 | X02761    | Human   | FN1     | 5.67  | 0.17 | 6.65 | 0.54 | 4.52  | 0.21 | 7.21 | 0.42 |
| 50 |           | mRNA for<br>fibronectin<br>(FN<br>precursor).<br>/PROD=fibro<br>nectin<br>precursor |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | AI016316  | ESTs  | -       | 0.24  | 0.18 | 1.19 | 1.17 | -0.33 | 0.18 | 0.25 | 1.18 |
| 60 | NM_006622 | Homo  | PLK2    | 4.64  | 0.14 | 5.88 | 0.45 | 3.50  | 0.06 | 5.19 | 0.47 |
| 65 |           | sapiens<br>serum-<br>inducible  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |                |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|----------------|---------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | kinase         |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (SNK),         |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=seru     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | m-inducible    |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | kinase         |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF05    |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 9617.1         |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0066     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | 22.1           |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AF22357     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 4.1            |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    | NM_013238 | Homo           | DNAJC15 | -2.27 | 0.60 | 3.79 | 2.03 | 4.07 | 0.09 | 5.58 | 2.31 |
| 20 |           | sapiens        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | DNAJ           |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | domain-        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | containing     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | (MCJ),         |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=DNA      |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | J domain-      |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | containing     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 013238.1       |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AF12674     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | 3.1            |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    | AK026737  | Homo           | FN1     | 5.86  | 0.14 | 6.85 | 0.49 | 4.66 | 0.08 | 7.39 | 0.37 |
| 40 |           | sapiens        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cDNA:          |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | FLJ23084       |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | fis, clone     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | LNG06602,      |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | highly similar |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | to HSF1B1      |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | Human          |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA for       |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | fibronectin    |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (FN            |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | precursor).    |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    | NM_001458 | Homo           | FLNC    | 3.28  | 0.17 | 4.17 | 0.70 | 2.11 | 0.17 | 3.39 | 0.64 |
| 55 |           | sapiens        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | filamin C,     |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gamma          |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (actin-        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           | binding        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein-280)   |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (FLNC),        |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |         |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | /PROD=gam      |         |       |      |      |      |      |      |      |      |

|    |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|----------|---|---------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |          | ma filamin<br>/FL=gb:AF08<br>9841.1<br>gb:NM_0014<br>58.1   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | AK025843 | Homo sapiens<br>cDNA:<br>FLJ22190<br>fis, clone<br>HRC01053.<br>/FL=gb:AF15<br>1909.1<br>gb:AF07704<br>1.1<br>gb:NM_0160<br>81.1            | PALLD   | 1.58  | 0.31 | 3.38 | 0.15 | 1.03  | 0.20 | 3.29 | 0.19 |
| 15 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | BC005858 | Homo sapiens,<br>clone<br>MGC:3255,<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=Unk<br>nown<br>(protein for<br>MGC:3255)<br>/FL=gb:BC00<br>5858.1 | FN1     | 5.86  | 0.10 | 6.86 | 0.49 | 4.70  | 0.19 | 7.37 | 0.36 |
| 30 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | BG491844 | v-jun avian<br>sarcoma<br>virus 17<br>oncogene<br>homolog<br>/FL=gb:NM_<br>002228.2<br>gb:BC00264<br>6.1                                    | JUN     | 3.53  | 0.08 | 5.45 | 0.47 | 3.42  | 0.11 | 5.91 | 0.34 |
| 45 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | AA284532 | tyrosine 3-<br>monooxygen<br>asetryptopha<br>n 5-<br>monooxygen<br>ase<br>activation<br>protein, eta<br>polypeptide                         | C9orf19 | 2.19  | 0.11 | 4.12 | 0.84 | 2.43  | 0.08 | 4.93 | 0.90 |
| 60 |          |   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 | AA192306 | triadin   | TRDN    | -2.54 | 0.69 | 0.02 | 0.61 | -1.99 | 0.31 | 0.57 | 0.63 |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AF116676  | Homo sapiens  | -       | 1.50  | 0.18 | 3.31  | 1.11 | 1.37  | 0.15 | 4.23  | 1.05 |
| 10 |           | PRO1957 mRNA, complete cds.   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | /PROD=PRO1957   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 | NM_003033 | Homo sapiens  | ST3GAL1 | -0.08 | 0.18 | 1.68  | 1.04 | 0.20  | 0.16 | 2.74  | 0.74 |
| 25 |           | sialyltransferase 4A (beta-galactosidase alpha-2,3-sialyltransferase) (SIAT4A), mRNA. |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           | /PROD=sialyltransferase 4A (beta-galactosidase alpha-2,3-sialyltransferase)           |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           | /FL=gb:L139   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | 72.1 gb:L29555.1 gb:NM_003033.1   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 | AI222435  | ESTs  | -       | -4.14 | 1.52 | -0.73 | 0.32 | -2.33 | 0.62 | -0.33 | 0.12 |
| 50 | NM_001924 | Homo sapiens  | GADD45A | 3.59  | 0.09 | 5.04  | 0.44 | 3.06  | 0.17 | 5.38  | 0.48 |
| 55 |           | growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), mRNA.                        |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           | /PROD=growth arrest and   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |               |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           |               |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | DNA-          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | damage-       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | inducible,    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | alpha         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:M609   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | 74.1          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0019    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 24.2          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 | NM_001425 | Homo          | EMP3 | 2.76 | 0.18 | 3.90 | 0.64 | 1.51 | 0.06 | 3.13 | 0.57 |
|    |           | sapiens       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | epithelial    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | membrane      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein 3     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           | (EMP3),       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=epith   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | elial         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | membrane      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein 3     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:U521   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | 01.1          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0014    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 25.1          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:U87947.1   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 | AB017493  | Homo          | KLF6 | 1.69 | 0.20 | 4.02 | 1.01 | 1.80 | 0.08 | 4.87 | 0.87 |
|    |           | sapiens       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA for      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | DNA-binding   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           | zinc          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | finger(GBF),  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | complete      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cds.          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | /PROD=DNA     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | -binding zinc |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | finger(GBF)   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | /FL=gb:AF00   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1461.1        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:BC00031    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | gb:NM_0013    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 00.2          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AB01749    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 3.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           | gb:BC00430    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 1.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | X58851    | Human         | -    | 0.99 | 0.16 | 2.75 | 1.28 | 1.12 | 0.15 | 4.04 | 1.14 |
| 65 |           | MLC1emb       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gene for      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | embryonic     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|--|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | myosin<br>alkaline light<br>chain,<br>promoter<br>and exon 1   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 | BE327172  | v-jun avian<br>sarcoma<br>virus 17<br>oncogene   | -      | 0.86 | 0.15 | 2.94 | 0.51 | 1.14 | 0.08 | 3.57 | 0.45 |
| 15 | U37283    | Human<br>microfibril-<br>associated<br>glycoprotein-<br>2 MAGP-2<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=micr<br>ofibril-<br>associated<br>glycoprotein-<br>2 MAGP-2<br>/FL=gb:NM_<br>003480.1<br>gb:U37283.1                            | MFAP5  | 0.48 | 0.19 | 1.87 | 0.26 | 0.15 | 0.35 | 1.36 | 0.47 |
| 35 | AI819043  | ESTs   | CREB5  | 0.92 | 0.26 | 2.63 | 0.73 | 0.65 | 0.15 | 1.80 | 0.79 |
| 40 | NM_001511 | Homo<br>sapiens<br>GRO1<br>oncogene<br>(melanoma<br>growth<br>stimulating<br>activity,<br>alpha)<br>(GRO1),<br>mRNA.<br>/PROD=GR<br>O1<br>oncogene<br>(melanoma<br>growth<br>stimulatingac<br>tivity, alpha)<br>/FL=gb:NM_<br>001511.1 | CXCL1  | 1.01 | 0.13 | 2.95 | 0.35 | 0.31 | 0.08 | 2.39 | 0.27 |
| 65 | NM_006736 | Homo<br>sapiens heat   | DNAJB2 | 2.23 | 0.04 | 3.46 | 0.44 | 1.10 | 0.02 | 3.75 | 0.41 |

|    |           |              |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|--------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           |              |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | shock        |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein,     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | neuronal     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | DNAJ-like 1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (HSJ1),      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA,        |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | /PROD=heat   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | shock        |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein,     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | neuronal     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | DNAJ-like 1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 006736.1     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 | AA534817  | ESTs,        | EDG3   | 2.32 | 0.06 | 3.28 | 1.04 | 2.08 | 0.04 | 4.58 | 1.04 |
|    |           | Weakly       |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | similar to   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ALU8_HUM     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | AN ALU       |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | SUBFAMILY    |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | SX           |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | SEQUENCE     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | CONTAMIN     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ATION        |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | WARNING      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ENTRY        |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | (H.sapiens)  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | U82164    | Human        | CD99   | 4.73 | 0.15 | 5.69 | 0.73 | 3.19 | 0.07 | 6.36 | 0.93 |
|    |           | Transmembra  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ne protein   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           | CD99 type II |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA,        |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | complete     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | cds.         |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=CD9    |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 9 typeII     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:BC00  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | 2584.1       |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0024   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 14.1         |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:M16279.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | gb:BC00314   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 7.1          |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:U82164.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 | NM_000389 | Homo         | CDKN1A | 4.03 | 0.02 | 4.20 | 0.12 | 1.81 | 0.07 | 4.16 | 0.05 |
|    |           | sapiens      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cyclin-      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | dependent    |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | kinase       |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | inhibitor 1A |        |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | NM_001299 | Homo           | CNN1 | 3.75 | 0.15 | 5.75 | 0.50 | 3.47 | 0.11 | 5.14 | 0.43 |
| 30 |           | sapiens        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | calponin 1,    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | basic,         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | smooth         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           | muscle         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (CNN1),        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | mRNA.          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=calp     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | onin 1, basic, |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | smooth         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | muscle         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:U370    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           | 19.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0012     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | 99.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | M36172    | Human          | MYL4 | 1.55 | 0.21 | 3.30 | 1.05 | 1.21 | 0.13 | 4.11 | 1.06 |
|    |           | embryonic      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | myosin alkali  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | light chain    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (MLC1)         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA,          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | complete       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cds.           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:M361    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 72.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:M24121.1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0024     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 76.1           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | AB033831  | Homo sapiens   | PDGFC | 0.48 | 0.21 | 0.63 | 0.15 | -1.87 | 0.96 | 0.21 | 0.16 |
| 10 |           | hSCDGF mRNA for spinal cord-derived growth factor, complete cds. |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /PROD=spinal cord-derived growth factor                          |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | /FL=gb:NM_016205.1   |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           | gb:AB033831.1  |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:AF091434.1  |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:AF244813.1  |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 | NM_014333 | Homo sapiens   | IGSF4 | 3.11 | 0.09 | 4.12 | 0.27 | 1.85  | 0.06 | 3.79 | 0.24 |
| 35 |           | immunoglobulin superfamily, member 4 (IGSF4), mRNA.              |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | /PROD=immunoglobulin superfamily, member 4                       |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | /FL=gb:NM_014333.1   |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:AF132811.1  |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 | AF345910  | Homo sapiens   | TTC29 | 0.35 | 0.26 | 1.53 | 0.93 | -0.51 | 0.52 | 0.91 | 0.72 |
| 55 |           | NYD-SP14 mRNA, complete cds.                                     |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           | /PROD=NYD-SP14   |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF345910.1  |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 | NM_004297 | Homo   | GNA14 | 4.59 | 0.06 | 4.52 | 1.59 | 1.95  | 0.11 | 2.95 | 1.50 |

|    |           |               |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|---------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | sapiens       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | guanine       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | nucleotide    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | binding       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein (G    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein),     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | alpha 14      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (GNA14),      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /PROD=gua     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | nine          |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | nucleotide    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | binding       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein (G    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           | protein),alph |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | a 14          |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF10   |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 5201.1        |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | gb:NM_0042    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 97.1          |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | AK057525  | Homo          | -         | 3.60 | 0.08 | 4.45 | 0.44 | 2.00 | 0.16 | 4.80 | 0.46 |
| 30 |           | sapiens       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cDNA          |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | FLJ32963      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | fis, clone    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | TESTI20084    |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 05.           |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | BC000893  | Homo          | HIST1H2BK | 2.80 | 0.06 | 3.99 | 0.90 | 2.48 | 0.09 | 4.81 | 0.82 |
| 40 |           | sapiens,      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | H2B histone   |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | family,       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | member A,     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | clone         |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | MGC:5132,     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA,         |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | complete      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cds.          |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | /PROD=H2B     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | histone       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | family,       |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | member A      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | /FL=gb:BC00   |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 0893.1        |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    | NM_007038 | Homo          | ADAMTS5   | 0.23 | 0.17 | 1.80 | 0.48 | 0.45 | 0.28 | 1.11 | 0.73 |
| 60 |           | sapiens a     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | disintegrin-  |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | like and      |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | metalloprote  |           |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | ase           |           |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|---------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | (reprolysin<br>type) with<br>thrombospon<br>din type 1<br>motif, 5<br>(aggrecanas<br>e-2)<br>(ADAMTS5),<br>mRNA.<br>/PROD=a                  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | disintegrin<br>and<br>metalloprote<br>ase<br>withthrombo<br>spondin<br>motifs-5<br>preproprotei<br>n<br>/FL=gb:NM_<br>007038.1<br>gb:AF14209 |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 | AW241910  | ESTs,  | COL22A1 | -0.21 | 0.12 | 1.15 | 0.47 | -0.57 | 0.18 | 1.90 | 0.51 |
| 20 |           | Weakly<br>similar to<br>JX0369<br>collagen<br>alpha 1(XIX)<br>chain<br>precursor<br>(H.sapiens)  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | AI860150  | ESTs,  | FOSL2   | -0.43 | 0.55 | 1.59 | 0.37 | -0.34 | 0.10 | 1.08 | 0.20 |
| 30 |           | Weakly<br>similar to<br>A49134 Ig<br>kappa chain<br>V-I region<br>(H.sapiens)  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 | NM_005902 | Homo   | SMAD3   | 1.09  | 0.41 | 1.49 | 0.25 | -1.10 | 0.89 | 1.73 | 0.10 |
| 40 |           | sapiens<br>MAD<br>(mothers<br>against<br>decapentapl<br>egic,<br>Drosophila)<br>homolog 3<br>(MADH3),<br>mRNA.                               |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |                |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|----------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           | /PROD=MA       |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | D (mothers     |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | against        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | decapentapl    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           | egic,Drosoph   |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | ila) homolog   |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 3              |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:U680    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | 19.1           |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:U76622.1    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0059     |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | 02.1           |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 | AA777512  | Homo           | CAMK2D   | 2.27 | 0.15 | 3.67 | 0.47 | 1.67 | 0.08 | 3.99 | 0.51 |
|    |           | sapiens        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | cDNA:          |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | FLJ21715       |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           | fis, clone     |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | COL10287,      |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | highly similar |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | to AF071569    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | Homo           |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | sapiens        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | multifunction  |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | al             |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | calciumcalm    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | odulin-        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | dependent      |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           | kinase II      |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | delta2         |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | isoform        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA           |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 | AI130705  | ESTs,          | FAM89A   | 0.80 | 0.00 | 1.96 | 0.99 | 0.43 | 0.18 | 2.70 | 0.97 |
|    |           | Weakly         |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | similar to     |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           | A46302         |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | PTB-           |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | associated     |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | splicing       |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 |           | factor, long   |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | form           |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | (H.sapiens)    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 | NM_007061 | Homo           | CDC42EP1 | 1.86 | 0.11 | 2.51 | 0.29 | 0.16 | 0.27 | 2.00 | 0.17 |
|    |           | sapiens        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | serum          |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | constituent    |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | protein        |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | (MSE55),       |          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | mRNA.          |          |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|--|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5  |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 | NM_003407 | Homo sapiens zinc finger protein homologous to Zfp-36 in mouse (ZFP36), mRNA.          | ZFP36 | 2.55 | 0.14 | 3.53 | 0.55 | 1.49 | 0.28 | 3.98 | 0.47 |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 | BC033088  | Homo sapiens, Similar to lamin AC, clone MGC:45654 IMAGE:3623 265, mRNA, complete cds. | LMNA  | 2.03 | 0.22 | 2.89 | 0.45 | 0.69 | 0.24 | 1.79 | 0.50 |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 55 | U97075    | Homo sapiens FLICE-like inhibitory protein short form mRNA, complete cds.              | CFLAR | 2.50 | 0.09 | 3.39 | 1.45 | 0.73 | 0.08 | 4.93 | 1.54 |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           |  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|---------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | E-like<br>inhibitory<br>protein short<br>form<br>/FL=gb:U970<br>75.1   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | AF133207  | Homo<br>sapiens<br>protein<br>kinase (H11)<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=prot<br>ein kinase<br>/FL=gb:AF13<br>3207.1   | HSPB8   | 2.54  | 0.07 | 4.47 | 0.62 | 2.22  | 0.04 | 4.88 | 0.58 |
| 15 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 | NM_005979 | Homo<br>sapiens<br>S100<br>calcium-<br>binding<br>protein A13<br>(S100A13),<br>mRNA.<br>/PROD=S10<br>0 calcium-<br>binding<br>protein A13<br>/FL=gb:BC00<br>0632.1<br>gb:NM_0059<br>79.1 | S100A13 | 4.10  | 0.11 | 5.67 | 1.17 | 3.92  | 0.02 | 6.81 | 1.20 |
| 30 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 | AL040178  | ESTs   | PEAR1   | -0.87 | 0.08 | 0.51 | 0.36 | -1.16 | 0.30 | 0.48 | 0.26 |
|    | AL117523  | Homo<br>sapiens<br>mRNA;<br>cDNA<br>DKFZp434H<br>0350 (from<br>clone<br>DKFZp434H<br>0350); partial<br>cds.<br>/PROD=hypo<br>thetical<br>protein   | SAMD4A  | 0.47  | 0.06 | 1.59 | 0.61 | -0.24 | 0.30 | 1.28 | 0.53 |
| 50 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 | AB051826  | Homo<br>sapiens  | RHOU    | 0.55  | 0.23 | 2.18 | 0.61 | 0.17  | 0.29 | 2.73 | 0.65 |

|    |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|----------|----------------|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          |                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BC005961 | Homo           | PTHLH  | -3.33 | 0.69 | -0.88 | 0.81 | -2.86 | 0.77 | -1.97 | 1.36 |
| 25 |          | sapiens,       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | parathyroid    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | hormone-like   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |          | hormone,       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | clone          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | MGC:14611,     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | mRNA,          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |          | complete       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | cds.           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=para     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | thyroid        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |          | hormone-like   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | hormone        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:BC00    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 5961.1         |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 | A1670948 | ESTs           | NODAL  | 2.13  | 0.04 | 2.37  | 0.22 | 0.42  | 0.13 | 2.78  | 0.38 |
|    | A1685060 | caldesmon 1    | CALD1  | 4.34  | 0.33 | 6.42  | 0.73 | 4.45  | 0.09 | 5.63  | 0.82 |
|    |          | /FL=gb:M641    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 10.1           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |          | gb:NM_0043     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 42.2           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BF797381 | Homo           | CAMK2D | 3.16  | 0.13 | 4.91  | 0.65 | 3.10  | 0.10 | 5.49  | 0.61 |
| 55 |          | sapiens        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | cDNA:          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | FLJ21715       |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | fis, clone     |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |          | COL10287,      |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | highly similar |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | to AF071569    |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | Homo           |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |          | sapiens        |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | multifunction  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | al             |        |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | calciumcalm<br>odulin-<br>dependent<br>protein<br>kinase II<br>delta2   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | isoform<br>mRNA   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AF026219  | Homo sapiens HP<br>protein (HP)<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=HP<br>protein<br>/FL=gb:AF02<br>6219.1<br>gb:AF03511<br>9.1<br>gb:NM_0060<br>94.2 | DLC1      | 1.16  | 0.07 | 2.28  | 1.13 | 0.61  | 0.09 | 3.52  | 0.84 |
| 15 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 | AK024480  | Homo sapiens<br>mRNA for<br>FLJ00074<br>protein,<br>partial cds.<br>/PROD=FLJ<br>00074<br>protein   | LOC126917 | 1.64  | 0.11 | 2.86  | 0.24 | 1.19  | 0.06 | 2.58  | 0.25 |
| 35 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | N29837    | ESTs  | LIX1      | -1.43 | 0.15 | -0.11 | 0.33 | -1.50 | 0.45 | -0.22 | 0.22 |
| 45 | AK001022  | Homo sapiens<br>cDNA<br>FLJ10160<br>fis, clone<br>HEMBA1003<br>545, highly<br>similar to<br>INSULIN<br>GENE<br>ENHANCER<br>PROTEIN<br>ISL-2.            | ISL2      | 0.41  | 0.34 | 2.14  | 0.39 | 0.32  | 0.08 | 1.57  | 0.49 |
| 50 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | NM_000047 | Homo sapiens<br>arylsulfatase<br>E  | ARSE      | 1.37  | 0.11 | 2.45  | 1.03 | 0.59  | 0.05 | 3.18  | 1.23 |
| 65 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|--------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | (chondrodysplasia punctata 1) (ARSE), mRNA.   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | /PROD=arylsulfatase E precursor   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:X83573.1   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_000047.1  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_006379 | Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C (SEMA3C), mRNA. | SEMA3C | 0.24 | 0.25 | 1.08 | 0.00 | -0.34 | 0.05 | 0.86 | 0.18 |
| 20 |           | /PROD=sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C (SEMA3C), mRNA.        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |           | /FL=gb:NM_006379.1  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | gb:AB000220.1   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | /PROD=sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C                        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | /FL=gb:NM_006379.1  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | gb:AB000220.1   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | /PROD=sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C                        |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | NM_007127 | Homo sapiens villin 1 (VIL1), mRNA.   | VIL1   | 0.31 | 0.30 | 1.92 | 0.49 | 0.02  | 0.22 | 2.54 | 0.68 |
| 60 |           | /PROD=villin 1  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           | /FL=gb:NM_007127.1  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|    | U76549    | Human KRT8  | KRT8   | 5.41 | 0.16 | 5.87 | 0.56 | 3.79  | 0.05 | 6.34 | 0.57 |

|    |           |  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--|----------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | cytokeratin 8<br>mRNA,<br>complete<br>cds.   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | /PROD=cyto<br>keratin 8  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:BC00<br>0654.1<br>gb:U76549.1<br>gb:NM_0022<br>73.1<br>gb:M26324.1<br>gb:M34225.1           |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | NM_004904 | Homo sapiens<br>cAMP<br>response<br>element-<br>binding<br>protein CRE-<br>BPα                     | CREB5    | 0.92  | 0.23 | 1.84 | 0.37 | 0.00  | 0.06 | 1.21 | 0.80 |
| 25 |           | (H_GS165L1<br>5.1), mRNA.<br>/PROD=cAM<br>P response<br>element-<br>binding<br>protein CRE-<br>BPα |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | /FL=gb:NM_<br>004904.1<br>gb:L05911.1  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | ESTs,<br>Weakly<br>similar to<br>B34087<br>hypothetical<br>protein<br>(H.sapiens)                  | WNK4     | -1.17 | 0.26 | 0.98 | 0.38 | -0.97 | 0.20 | 0.05 | 0.86 |
| 40 |           | death<br>receptor 6<br>/FL=gb:NM_<br>014452.1<br>gb:AF06886<br>8.1                                 | TNFRSF21 | 4.76  | 0.06 | 5.90 | 0.54 | 3.94  | 0.08 | 6.28 | 0.58 |
| 45 | AW082836  |  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | BE568134  |  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |  |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 | NM_002845 | Homo sapiens<br>protein<br>tyrosine  | PTPRM    | 2.50  | 0.10 | 3.43 | 0.46 | 1.34  | 0.19 | 3.76 | 0.50 |

|    |           |                            |   |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|----------------------------|---|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |                            | phosphatase<br>, receptor<br>type, M<br>(PTPRM),<br>mRNA.   |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           |                            | /PROD=prot<br>ein tyrosine<br>phosphatase<br>, receptor<br>type,<br>mupolypepti<br>de                       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           |                            | /FL=gb:NM_<br>002845.1  |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AI949419  | ESTs                       | -   | -0.11 | 0.21 | 1.72  | 0.64 | -0.47 | 0.01 | 2.39  | 0.77 |
|    | AK024680  | Homo                       | NRP2  | 0.42  | 0.02 | 2.65  | 0.17 | 0.98  | 0.09 | 2.86  | 0.17 |
| 25 |           |                            | sapiens<br>cDNA:<br>FLJ21027<br>fis, clone<br>CAE07110.   |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           |                            | /FL=gb:NM_<br>018534.1  |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BE542563  | ESTs                       | LOC643277   | 2.20  | 0.10 | 0.54  | 1.49 | -3.73 | 0.40 | -1.74 | 1.96 |
| 35 | AW005572  | putative 47<br>kDa protein | ANKS1B  | -1.21 | 0.52 | -0.24 | 0.82 | -1.19 | 0.55 | 1.05  | 0.64 |
|    | AW665892  | paternally<br>expressed 3  | MFAP5   | -3.87 | 0.82 | -1.56 | 1.24 | -2.40 | 0.24 | -3.49 | 2.10 |
| 40 | NM_006206 | Homo                       | PDGFRA  | 0.92  | 0.18 | 2.34  | 0.74 | 0.72  | 0.09 | 3.18  | 0.62 |
| 45 |           |                            | sapiens<br>platelet-<br>derived<br>growth factor<br>receptor,<br>alpha<br>polypeptide<br>(PDGFRA),<br>mRNA. |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |                            | /PROD=plate<br>let-derived<br>growth factor<br>receptor,<br>alphapolype<br>ptide                            |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |                            | /FL=gb:NM_<br>006206.1<br>gb:M21574.1   |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | NM_002425 | Homo                       | MMP10   | -1.21 | 0.70 | 1.21  | 0.88 | -0.37 | 0.28 | 0.52  | 0.45 |
| 65 |           |                            | sapiens   |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |               |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---------------|---------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | matrix        |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | metalloprotei |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | nase 10       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | (stromelysin  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 2) (MMP10),   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 10 |           | /PROD=matr    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | ix            |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | metalloprotei |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | nase 10       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 |           | preproprotei  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | n             |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:BC00   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 2591.1        |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 20 |           | gb:NM_0024    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 25.1          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | NM_004338 | Homo          | C18orf1 | -0.79 | 0.22 | -0.09 | 0.39 | -1.57 | 0.43 | 0.50 | 0.02 |
|    |           | sapiens       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 25 |           | chromosome    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 18 open       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | reading       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | frame 1       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 |           | (C18ORF1),    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=chro    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mosome 18     |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 35 |           | open reading  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | frame 1       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 004338.1      |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 40 |           | gb:AF00942    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 6.1           |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | AF052094  | Homo          | EPAS1   | 0.75  | 0.12 | 2.28  | 0.19 | 0.42  | 0.21 | 1.74 | 0.33 |
| 45 |           | sapiens       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | clone 23698   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | sequence.     |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 50 |           | /FL=gb:U516   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 26.1          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:U81984.1   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0014    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 55 |           | 30.1          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | BF126155  | ESTs          | S100A10 | -0.32 | 0.25 | 1.24  | 0.28 | -0.65 | 0.33 | 1.02 | 0.44 |
|    | AI860212  | phosphoprot   | PAG1    | -0.17 | 0.22 | 1.37  | 0.28 | -0.40 | 0.23 | 1.25 | 0.13 |
| 60 |           | ein           |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | associated    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | with GEMs     |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF24   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 65 |           | 0634.1        |         |       |      |       |      |       |      |      |      |

|    |           |               |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---------------|---------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | matrix        |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | metalloprotei |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | nase 10       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | (stromelysin  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 2) (MMP10),   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 10 |           | mRNA.         |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=matr    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | ix            |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | metalloprotei |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 |           | nase 10       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | preproprotei  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | n             |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:BC00   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 20 |           | 2591.1        |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:NM_0024    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 25.1          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | NM_004338 | Homo          | C18orf1 | -0.79 | 0.22 | -0.09 | 0.39 | -1.57 | 0.43 | 0.50 | 0.02 |
| 25 |           | sapiens       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | chromosome    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 18 open       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | reading       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 |           | frame 1       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | (C18ORF1),    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA.         |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /PROD=chro    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 35 |           | mosome 18     |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | open reading  |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | frame 1       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 40 |           | 004338.1      |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:AF00942    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 6.1           |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 45 | AF052094  | Homo          | EPAS1   | 0.75  | 0.12 | 2.28  | 0.19 | 0.42  | 0.21 | 1.74 | 0.33 |
|    |           | sapiens       |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | clone 23698   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | mRNA          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | sequence.     |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 50 |           | /FL=gb:U516   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 26.1          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | gb:U81984.1   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 55 |           | gb:NM_0014    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | 30.1          |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | BF126155  | ESTs          | S100A10 | -0.32 | 0.25 | 1.24  | 0.28 | -0.65 | 0.33 | 1.02 | 0.44 |
|    | AI860212  | phosphoprot   | PAG1    | -0.17 | 0.22 | 1.37  | 0.28 | -0.40 | 0.23 | 1.25 | 0.13 |
| 60 |           | ein           |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | associated    |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | with GEMs     |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |           | /FL=gb:AF24   |         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 65 |           | 0634.1        |         |       |      |       |      |       |      |      |      |

|    |          |                   |       |      |       |      |       |      |      |      |
|----|----------|-------------------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| 5  |          |                   |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | /PROD=APR         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | -1 protein        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | /FL=gb:AF32       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 0912.1            |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | gb:AF14323        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 5.3               |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 10 |          | gb:NM_0140        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 61.1              |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | AL577531 | caldesmon 1 CALD1 | 5.79  | 0.06 | 6.06  | 0.75 | 4.07  | 0.06 | 5.13 | 0.77 |
|    |          | /FL=gb:M641       |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 15 |          | 10.1              |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | gb:NM_0043        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 42.2              |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | AI082237 | proprotein TAGLN  | 1.38  | 0.21 | 3.20  | 0.33 | 1.55  | 0.15 | 2.74 | 0.44 |
|    |          | convertase        |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 20 |          | subtilisin        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | type 7            |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | BF055171 | acyl- ACOX3       | 0.88  | 0.22 | 2.52  | 0.83 | 1.27  | 0.06 | 3.73 | 0.81 |
| 25 |          | Coenzyme A        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | oxidase 3,        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | pristanoyl        |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 30 |          | /FL=gb:NM_        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 003501.1          |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | AF231124 | Homo SPOCK1       | 2.84  | 0.09 | 4.17  | 0.95 | 2.71  | 0.07 | 5.38 | 1.00 |
|    |          | sapiens           |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 35 |          | testican-1        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | mRNA,             |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | complete          |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | cds.              |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 40 |          | /PROD=lesti       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | can-1             |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | /FL=gb:NM_        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 004598.1          |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 45 |          | gb:AF23112        |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 4.1               |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    | AA588092 | ESTs SLC40A1      | -1.53 | 0.23 | -0.94 | 0.51 | -2.42 | 0.33 | 0.27 | 0.27 |
|    | AK094809 | Homo RASGRF2      | 3.20  | 0.05 | 3.64  | 0.77 | 1.95  | 0.24 | 2.95 | 0.74 |
| 50 |          | sapiens           |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | cDNA              |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | FLJ37490          |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | fis, clone        |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 55 |          | BRAWH201          |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | 4934, highly      |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | similar to        |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 60 |          | GUANINE           |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | NUCLEOTID         |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | E                 |       |      |       |      |       |      |      |      |
|    |          | RELEASING         |       |      |       |      |       |      |      |      |
| 65 |          | PROTEIN.          |       |      |       |      |       |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|--------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
|    | NM_013959 | Homo sapiens  | NRG1   | 1.50  | 0.20 | 3.22 | 0.68 | 1.34  | 0.13 | 3.78 | 0.75 |
| 5  |           | neuregulin 1 (NRG1), transcript variant   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 |           | SMDF, mRNA, /PROD=neur  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           | egulin 1 isoform SMDF   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |           | /FL=gb:L418 27.1 gb:NM_013959.1   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_004887 | Homo sapiens  | CXCL14 | 0.70  | 0.07 | 1.70 | 0.37 | -0.15 | 0.11 | 2.36 | 0.63 |
| 25 |           | small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (BRAK) (SCYB14), mRNA, /PROD=smal |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           | l inducible cytokine subfamily B(Cys-X-Cys), member 14 (BRAK)                                 |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |           | /FL=gb:AF14 4103.1 gb:AF10691.1   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |           | gb:AF07395.7.1 gb:BC00351.3.1   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           | gb:NM_004887.1  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 |           | 87.1  |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 | T77995    | Homo sapiens  | -      | -0.20 | 0.16 | 0.82 | 0.50 | -1.70 | 0.24 | 1.17 | 0.06 |
| 60 |           | cDNA FLJ13392   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |        |       |      |      |      |       |      |      |      |



|    |          |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|----------|--|---------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |          | /FL=gb:NM_014333.1   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | N32834   | gb:AF132811.1  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          | HIV-1 rev  | -       | -0.28 | 0.36 | 1.58 | 0.97 | -0.23 | 0.18 | 0.33 | 1.17 |
| 10 |          | binding protein 2  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | AF132811 | Homo sapiens   | IGSF4   | 2.23  | 0.07 | 3.85 | 0.28 | 2.17  | 0.10 | 3.58 | 0.34 |
| 15 |          | nectin-like protein 2 (NECL2)  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 |          | mRNA, complete cds.  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 25 |          | /PROD=nectin-like protein 2  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          | /FL=gb:NM_014333.1   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 | J04177   | gb:AF132811.1  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          | Cluster Incl.  | COL11A1 | 3.28  | 0.22 | 4.44 | 1.22 | 2.32  | 0.03 | 3.03 | 1.31 |
| 35 |          | J04177:Human alpha-1 type XI collagen (COL11A1)  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 |          | mRNA, complete cds   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |          | /cds=(161,5581)  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          | /gb=J04177   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          | /gi=179729   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |          | /ug=Hs.82772   |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 | AI982754 | clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotei | CLU     | 0.17  | 0.14 | 1.86 | 0.94 | 0.39  | 0.13 | 0.97 | 0.83 |
| 55 |          |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |          |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |          |  |         |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-----------|---|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|    |           | n J)  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 5  | NM_003501 | Homo sapiens acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl (ACOX3), mRNA. | ACOX3  | 0.43 | 0.32 | 2.10 | 0.91 | 0.79 | 0.08 | 3.19 | 0.95 |
| 10 |           | /PROD=acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl                       |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15 |           | /FL=gb:NM_003501.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20 | AF144103  | Homo sapiens NJAC protein (NJAC) mRNA, complete cds.              | CXCL14 | 1.69 | 0.13 | 2.16 | 0.55 | 0.40 | 0.21 | 2.73 | 0.69 |
| 25 |           | /PROD=NJAC protein  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30 |           | /FL=gb:AF144103.1   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 35 |           | gb:AF10691.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 40 |           | gb:AF07395.7.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 45 |           | gb:BC00351.3.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:NM_004887.1  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 50 | NM_005451 | Homo sapiens enigma (LIM domain protein) (ENIGMA), mRNA.          | PDLIM7 | 2.58 | 0.12 | 3.12 | 0.50 | 1.30 | 0.16 | 2.65 | 0.37 |
| 55 |           | /PROD=enigma protein  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 60 |           | /FL=gb:BC001093.1   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 65 |           | gb:NM_005451.2  |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AF265209.1   |        |      |      |      |      |      |      |      |      |

|    |           |                    |  |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|--------------------|--|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  | NM_004472 | Homo sapiens       | FOXD1  | -0.85 | 0.80 | 2.04 | 0.55 | 0.71  | 0.23 | 1.70 | 0.74 |
| 10 |           |                    | forkhead box D1 (FOXD1), mRNA.                               |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           |                    | /PROD=fork head box D1 /FL=gb:U598 32.1 gb:NM_0044 72.1      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | AF332197  | Homo sapiens adult | SIX2   | 0.36  | 0.24 | 0.72 | 0.12 | -0.44 | 0.35 | 1.05 | 0.15 |
| 25 |           |                    | SIX2 (SIX2) mRNA, complete cds.                              |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |           |                    | /PROD=SIX2 /FL=gb:AF33 2197.1 gb:NM_0169 32.1 gb:AF13694 0.1 |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 | AB046817  | Homo sapiens       | SYTL2  | 2.88  | 0.17 | 4.09 | 1.09 | 2.50  | 0.05 | 3.12 | 1.03 |
| 40 |           |                    | mRNA for KIAA1597 protein, partial cds.                      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 |           |                    | /PROD=KIAA1597 protein                                       |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 | AK093435  | Homo sapiens       | FLJ36116   | 4.75  | 0.02 | 4.59 | 1.53 | 2.46  | 0.18 | 6.15 | 1.46 |
| 55 |           |                    | cDNA FLJ36116 fis, clone TESTI20223 38.                      |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 | NM_004815 | Homo sapiens       | ARHGAP29   | 2.18  | 0.02 | 3.18 | 0.82 | 1.69  | 0.03 | 4.15 | 0.69 |
| 65 |           |                    | PTPL1-associated RhoGAP 1 (PARG1), mRNA.                     |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    |           |                    | /PROD=PTP L1-  |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
|----|----------------------|---|------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| 5  |                      | associated<br>RhoGAP 1<br>/FL=gb:U909<br>20.1<br>gb:NM_0048<br>15.1   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 10 | BG028597<br>AB019562 | ESTs<br>Homo sapiens<br>mRNA<br>expressed only in placental villi, clone SMAP41.  | COL11A1<br>SPP1  | 0.19<br>0.58  | 0.02<br>0.14 | 1.61<br>2.79 | 1.02<br>1.07 | -0.11<br>1.10 | 0.38<br>0.02 | 0.48<br>1.21 | 1.09<br>1.06 |
| 15 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 20 | NM_002346            | Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E), mRNA.<br>/PROD=lymphocyte antigen 6 complex, locus E<br>/FL=gb:U423<br>76.1<br>gb:NM_0023<br>46.1<br>gb:U56145.1 | LY6E             | 3.54          | 0.06         | 3.92         | 1.16         | 1.81          | 0.23         | 4.93         | 1.39         |
| 25 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 30 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 35 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 40 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 45 | BF589515<br>AL037401 | ESTs<br>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2<br>/FL=gb:M644<br>97.1  | TMEM16D<br>NR2F2 | 0.63<br>-2.00 | 0.24<br>0.30 | 1.94<br>0.58 | 0.85<br>0.67 | 0.90<br>-2.19 | 0.20<br>0.13 | 1.47<br>0.82 | 0.75<br>0.66 |
| 50 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 55 | NM_000783            | Homo sapiens cytochrome P450, subfamily XXVIA, polypeptide 1  | CYP26A1          | 3.92          | 0.27         | 6.28         | 1.06         | 6.29          | 0.09         | 7.31         | 0.98         |
| 60 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |
| 65 |                      |   |                  |               |              |              |              |               |              |              |              |

|    |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
|----|----------------------|--|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| 5  |                      | (CYP26A1),<br>mRNA.<br>/PROD=cyto<br>chrome<br>P450,<br>subfamily<br>XXVIA,<br>polypeptide<br>1<br>/FL=gb:NM_<br>000783.1<br>gb:AF00541<br>8.1   |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 10 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 15 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 20 | U16307               | Human<br>glioma<br>pathogenesi<br>s-related<br>protein<br>(GliPR)<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=glio<br>ma<br>pathogenesi<br>s-related<br>protein<br>/FL=gb:NM_<br>006851.1<br>gb:U16307.1 | GLIPR1         | -0.11        | 0.03         | 1.16         | 0.95         | -0.46         | 0.77         | 0.35         | 0.77         |
| 25 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 30 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 35 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 40 | NM_001233            | Homo<br>sapiens<br>caveolin 2<br>(CAV2),<br>mRNA.<br>/PROD=cave<br>olin 2<br>/FL=gb:AF03<br>5752.1<br>gb:BC00525<br>6.1<br>gb:NM_0012<br>33.1  | CAV2           | 4.07         | 0.07         | 4.42         | 0.90         | 2.82          | 0.08         | 3.44         | 0.85         |
| 45 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 50 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 55 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |
| 60 | AA211909<br>AK057525 | ESTs<br>Homo<br>sapiens<br>cDNA<br>FLJ32963<br>fis, clone  | C20orf100<br>- | 0.62<br>2.17 | 0.17<br>0.13 | 1.93<br>2.97 | 1.00<br>0.77 | -0.21<br>0.97 | 0.11<br>0.08 | 0.72<br>3.68 | 0.99<br>0.60 |
| 65 |                      |  |                |              |              |              |              |               |              |              |              |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|---------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | BF344237  | TESTI20084<br>05.<br>Homo sapiens<br>mRNA;<br>cDNA  | -       | -2.82 | 0.20 | -0.92 | 0.64 | -0.73 | 0.67 | -1.25 | 1.03 |
| 10 |           | DKFZp564N<br>1116 (from<br>clone  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | DKFZp564N<br>1116)  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 | NM_014481 | Homo sapiens<br>apurinicapyri<br>midinic<br>endonucleas<br>e(APEX<br>nuclease)-<br>like 2 protein<br>(APEXL2),<br>mRNA.<br>/PROD=apur<br>inicapyrimidi<br>nic<br>endonucleas<br>e(APEXnucl<br>ease)-like 2<br>protein<br>/FL=gb:AB04<br>9211.1<br>gb:NM_0144<br>81.1<br>gb:BC00295<br>9.1<br>gb:AB02126<br>0.1<br>gb:AF11904<br>6.1 | APEX2   | 2.76  | 0.15 | 3.18  | 0.80 | 1.57  | 0.11 | 3.91  | 0.93 |
| 25 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 | AI912583  | HIV-1 rev<br>binding<br>protein 2   | KRR1    | 1.10  | 0.23 | 2.68  | 1.04 | 1.31  | 0.06 | 1.53  | 1.01 |
| 60 | BI254089  | Homo sapiens full<br>length insert<br>cDNA clone<br>ZD50E03   | ADAMTS5 | -1.40 | 0.26 | -0.01 | 0.31 | -1.71 | 0.64 | -0.79 | 0.52 |
| 65 | BF197655  | caveolin 2<br>/FL=gb:AF03<br>5752.1   | CAV2    | 3.51  | 0.10 | 3.54  | 0.94 | 2.32  | 0.09 | 2.70  | 0.85 |

|    |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|----|-----------|---|----------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 5  |           | gb:BC00525<br>6.1<br>gb:NM_0012<br>33.1   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
|    | NM_001955 | Homo sapiens<br>endothelin 1 (EDN1), mRNA.<br>/PROD=end<br>othelin 1<br>/FL=gb:NM_001955.1  | EDN1     | 2.84  | 0.15 | 2.97 | 0.95 | 1.01  | 0.14 | 1.75 | 1.03 |
| 10 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 15 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | NM_003319 | Homo sapiens titin (TTN), mRNA.<br>/PROD=titin<br>/FL=gb:NM_003319.1  | TTN      | 1.28  | 0.19 | 0.62 | 0.86 | -0.92 | 0.42 | 2.00 | 0.55 |
| 25 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 | BE965029  | Homo sapiens cDNA: FLJ22463<br>fis, clone HRC10126  | MICAL2   | 0.60  | 0.21 | 1.95 | 0.64 | 0.21  | 0.19 | 0.83 | 0.78 |
| 35 | AI452457  | ESTs  | C1orf168 | -1.48 | 0.53 | 0.02 | 0.93 | -1.87 | 0.07 | 1.05 | 0.94 |
|    | AI733465  | collagen, type IX, alpha 2<br>/FL=gb:NM_001852.1  | COL9A2   | 0.96  | 0.13 | 1.99 | 1.00 | 1.17  | 0.14 | 2.94 | 0.86 |
| 40 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 45 | NM_006103 | Homo sapiens epididymis-specific, whey-acidic protein type, four-disulfide core; putative ovarian carcinoma marker (HE4), mRNA.<br>/PROD=epidi<br>dymis-specific, | WFDC2    | 4.02  | 0.11 | 5.11 | 1.05 | 3.39  | 0.04 | 6.19 | 1.10 |
| 50 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 55 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |
| 65 |           |   |          |       |      |      |      |       |      |      |      |

|    |           |  |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
|----|-----------|--|--------------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|
| 5  |           | whey-acidic protein type, four-disulfide core; putative ovarian carcinoma marker |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 10 |           | /FL=gb:NM_00610  |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 15 | NM_017540 | Homo sapiens   | GALNT10      | 1.46  | 0.18 | 2.68 | 0.78 | 0.97  | 0.23 | 3.47  | 0.82 |      |
| 20 |           | hypothetical protein DKFZp586H0623   |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 25 |           | (DKFZp586H0623), mRNA.   |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 30 |           | /PROD=hypothetical protein DKFZp586H0623   |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 35 |           | /FL=gb:NM_017540.1   |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 40 | W72527    | phosphoserine aminotransferase   | SLC1A4       | -0.65 | 0.09 | 0.38 | 0.80 | -0.63 | 0.62 | -0.72 | 0.09 |      |
| 45 |           | NM_003468  | Homo sapiens | FZD5  | 1.35 | 0.26 | 3.43 | 1.21  | 1.45 | 0.10  | 4.43 | 1.16 |
| 50 |           | frizzled (Drosophila) homolog 5 (FZD5), mRNA.                                    |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 55 |           | /PROD=frizzled 5 /FL=gb:NM_003468.1  |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |
| 60 | H15920    | ESTs, Weakly similar to RTA RAT PROBABLE G PROTEIN-                              | MRGPRF       | 2.34  | 0.18 | 3.62 | 1.02 | 2.11  | 0.11 | 2.87  | 0.84 |      |
| 65 |           |  |              |       |      |      |      |       |      |       |      |      |

| 5  |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
|----|----------|---|--------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
|    |          | COUPLED<br>RECEPTOR<br>RTA<br>(R.norvegicus)  |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 10 | U83508   | Human<br>angiopoietin-1 mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=angiopoietin-1<br>/FL=gb:NM_001146.1<br>gb:D13628.1<br>gb:U83508.1                   | ANGPT1 | 1.06 | 0.11 | 1.49 | 0.44 | -0.32 | 0.27 | 0.32 | 0.79 |
| 15 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 20 | AF043179 | Homo sapiens T cell receptor beta chain (TCRBV13S1-TCRBJ2S1) mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=T cell receptor beta chain<br>/FL=gb:AF043179.1 | PRSS1  | 2.42 | 0.12 | 3.07 | 0.81 | 1.71  | 0.10 | 2.30 | 0.60 |
| 25 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 30 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 35 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 40 | AU157541 | hypothetical protein<br>FLJ22833<br>/FL=gb:NM_022837.1  | -      | 1.39 | 0.08 | 2.12 | 0.42 | 0.55  | 0.18 | 1.41 | 0.77 |
| 45 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 50 | AF114264 | Homo sapiens clone HH409 unknown mRNA.<br>/PROD=unknown   | NEXN   | 1.37 | 0.21 | 2.86 | 0.51 | 1.72  | 0.16 | 1.96 | 0.76 |
| 55 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |
| 60 | BE965029 | Homo sapiens cDNA:<br>FLJ22463<br>fis, clone<br>HRC10126  | MICAL2 | 1.58 | 0.19 | 2.58 | 0.51 | 1.32  | 0.13 | 1.40 | 0.74 |
| 65 |          |   |        |      |      |      |      |       |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |          |  |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
|----|----------|--|---------|------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | AB028976 | Homo sapiens mRNA for KIAA1053 protein, partial cds.   | SAMD4A  | 2.89 | 0.08 | 3.65  | 0.66 | 2.04  | 0.17 | 2.78  | 0.81 |
| 10 |          | /PROD=KIAA1053 protein   |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 | AI670862 | ESTs, Weakly similar to A49134 Ig kappa chain V-I region (H.sapiens)   | FOSL2   | 0.17 | 0.21 | 2.05  | 0.57 | 0.45  | 0.16 | 1.18  | 0.65 |
| 20 |          |  |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 | L03203   | Human peripheral myelin protein 22 (GAS3) mRNA, complete cds.  | PMP22   | 0.37 | 0.24 | 1.95  | 0.84 | 0.31  | 0.26 | 2.77  | 0.91 |
| 30 |          | /PROD=peripheral myelin protein 22   |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |          | /FL=gb:L03203.1  |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 | AI571798 | Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha   | ARHGDI1 | 0.89 | 0.06 | -0.54 | 0.26 | -3.00 | 0.89 | -2.58 | 0.87 |
| 45 | X57348   | Cluster Incl. X57348:H.sapiens mRNA (clone 9112) /cds=(165,911) /gb=X57348 /gi=23939 /ug=Hs.184510 /len=1407 | -       | 2.94 | 0.04 | 4.07  | 0.41 | 2.70  | 0.08 | 3.69  | 0.41 |
| 50 |          |  |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |          |  |         |      |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | AF051851 | Homo sapiens supervillin mRNA, complete  | SVIL    | 2.03 | 0.18 | 2.28  | 0.62 | 1.13  | 0.20 | 1.71  | 0.69 |
| 65 |          |  |         |      |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |                |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|----------------|--------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | cds.           |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=supe     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | rillin         |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:AF05    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 1851.1         |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 10 |           | gb:NM_0031     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 74.2           |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:AF05185     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 0.1            |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    | M95929    | Human          | -      | 0.07  | 0.43 | 1.27 | 0.58 | -0.02 | 0.19 | 0.64  | 0.61 |
| 15 |           | homeobox       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | protein        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | (PHOX1)        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA, 3        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 20 |           | end.           |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=hom      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | eobox          |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | protein        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 | BG251266  | FOS-like       | FOSL1  | 1.94  | 0.06 | 2.41 | 0.46 | 1.25  | 0.05 | 1.93  | 0.36 |
|    |           | antigen-1      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 005438.1       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 | AW298375  | ESTs           | -      | -0.40 | 0.30 | 0.46 | 0.63 | -0.09 | 0.20 | -0.58 | 1.07 |
|    | NM_004362 | Homo           | CLGN   | 0.90  | 0.30 | 1.95 | 0.96 | 0.69  | 0.11 | 3.11  | 1.01 |
|    |           | sapiens        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | calmegin       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 |           | (CLGN),        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.          |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=calm     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | egin           |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 40 |           | /FL=gb:NM_     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 004362.1       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:D86322.1    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 45 | AF001540  | calcineurin-   | -      | 0.10  | 0.15 | 2.84 | 0.70 | 0.42  | 0.44 | 1.64  | 0.39 |
|    |           | binding        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | protein        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | calsarcin-1    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 50 | NM_001191 | Homo           | BCL2L1 | 1.21  | 0.22 | 0.58 | 0.35 | -1.89 | 0.35 | -1.09 | 1.03 |
|    |           | sapiens        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | BCL2-like 1    |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | (BCL2L1),      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.          |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 55 |           | /PROD=BCL      |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 2-like 1       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_     |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | 001191.1       |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
| 60 | NM_003316 | Homo           | TTC3   | 3.90  | 0.15 | 5.15 | 0.98 | 3.68  | 0.12 | 6.19  | 0.97 |
|    |           | sapiens        |        |       |      |      |      |       |      |       |      |
|    |           | tetratricopept |        |       |      |      |      |       |      |       |      |

65

|    |           |   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
|----|-----------|---|---------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| 5  |           | ide repeat<br>domain 3<br>(TTC3),<br>mRNA.<br>/PROD=tetra   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 10 |           | tricopeptide<br>repeat<br>domain 3<br>/FL=gb:D842   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 15 |           | 95.1<br>gb:NM_0033  |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
|    | L16895    | Human lysyl -<br>oxidase<br>(LOX) gene,<br>exon 7   | -0.66   | 0.24 | 0.53 | 0.14 | -0.63 | 0.15 | 0.14 | 0.19 |      |
| 20 |           |   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
|    | AI912976  | ESTs  | RASGRF2 | 3.13 | 0.08 | 4.05 | 0.56  | 2.66 | 0.16 | 3.54 | 0.64 |
| 25 | NM_012242 | Homo sapiens<br>dickkopf<br>(Xenopus<br>laevis)<br>homolog 1<br>(DKK1),<br>mRNA.<br>/PROD=dickkopf<br>(Xenopus<br>laevis)<br>homolog 1<br>/FL=gb:AF17     | DKK1    | 0.47 | 0.29 | 0.73 | 0.04  | 0.49 | 0.51 | 1.09 | 0.23 |
| 30 |           | 7394.1<br>gb:NM_0122  |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 35 |           | 42.1<br>gb:AF12756  |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 40 |           | 3.1   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 45 | AL096776  | Human DNA -<br>sequence<br>from clone<br>RP4-646B12<br>on<br>chromosome<br>1q42.11-<br>42.3.<br>Contains an<br>FTH1<br>(ferritin,<br>heavy<br>polypeptide | 1.94    | 0.07 | 3.41 | 0.16 | 2.40  | 0.07 | 3.40 | 0.14 |      |
| 50 |           |   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 55 |           |   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 60 |           |   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |
| 65 |           |   |         |      |      |      |       |      |      |      |      |

|    |          |               |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|----------|---------------|---------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |          | 1) (FTHL6)    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | pseudogene,   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | the gene for  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | a novel Ras   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | family        |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |          | protein,      |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | ESTs, STSs,   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | GSSs and a    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | putative CpG  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |          | island        |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:AF28   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 2258.1        |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | gb:NM_0212    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 | BC005997 | Homo sapiens, | -       | 1.12  | 0.25 | 0.95  | 0.44 | 2.04  | 0.07 | 1.51  | 0.22 |
|    |          | clone         |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | MGC:14801,    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | mRNA,         |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |          | complete      |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | cds.          |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=Unk     |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | nown          |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |          | (protein for  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | MGC:14801)    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:BC00   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 | AF074979 | Homo sapiens  | RGS20   | -0.52 | 0.18 | -0.04 | 0.38 | -1.30 | 0.09 | -0.34 | 0.13 |
|    |          | regulator of  |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | G protein     |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |          | signaling-Z   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | (RGSZ1)       |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | mRNA,         |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |          | complete      |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | cds.          |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=regu    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | lator of G    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |          | protein       |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | signaling     |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:AF06   |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 0877.2        |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |          | gb:AF07497    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 9.1           |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | gb:NM_0037    |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 02.2          |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | BF060767 | ESTs          | ADAMTS5 | -0.36 | 0.15 | 0.80  | 0.33 | 0.22  | 0.14 | 0.40  | 0.56 |
|    | AU151151 | Homo sapiens  | LEPR    | 1.72  | 0.18 | 2.38  | 0.80 | 1.85  | 0.10 | 1.71  | 0.69 |
|    |          | cDNA          |         |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |          |               |         |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--------------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | L27624    | Homo sapiens | TFPI2 | 3.77  | 0.06 | 3.57  | 0.77 | 2.59  | 0.11 | 2.44  | 0.89 |
| 10 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 | NM_003174 | Homo sapiens | SVIL  | 3.15  | 0.09 | 3.68  | 0.44 | 2.91  | 0.01 | 3.27  | 0.46 |
| 35 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 | AF052127  | Homo sapiens | RELN  | -3.13 | 1.04 | -1.36 | 0.26 | -0.88 | 0.17 | -0.40 | 0.11 |
| 55 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | AL031290  | Human DNA    | -     | 0.38  | 0.06 | 1.39  | 0.46 | 0.40  | 0.05 | 0.95  | 0.44 |
| 65 |           |              |       |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |              |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--------------|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | 1q24.1-24.3  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | Contains     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | protein      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | similar to   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | pregnancy-   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | associated   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | plasma       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | protein A    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | precursor    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | neuronal     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | migration    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | protein      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | astrotactin, |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | ESTs, STS    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | and GSS      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | AI129628  | ESTs         | SAMD3     | -0.30 | 0.18 | -0.01 | 0.25 | 0.72  | 0.06 | 0.17  | 0.21 |
|    | NM_016206 | Homo         | VGLL3     | -0.39 | 0.36 | 0.05  | 1.03 | -0.31 | 0.29 | -1.05 | 1.01 |
| 25 |           | sapiens      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | colon        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | carcinoma    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | related      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | protein      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 |           | (LOC51159),  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /PROD=colo   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |           | n carcinoma  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | related      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | protein      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | 016206.1     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:AF09950   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 5.1          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | BE348291  | ESTs         | -         | 1.62  | 0.06 | -0.19 | 0.98 | -3.65 | 0.10 | -2.75 | 1.84 |
| 45 | AW242720  | Homo         | LOC143381 | -1.62 | 0.34 | -1.20 | 0.94 | -0.08 | 0.24 | -0.08 | 0.77 |
|    |           | sapiens      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | cDNA         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | FLJ10561     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           | fis, clone   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | NT2RP2002    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 672          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_001146 | Homo         | ANGPT1    | 1.86  | 0.06 | 2.09  | 0.81 | 1.10  | 0.16 | 0.87  | 1.05 |
| 55 |           | sapiens      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | angiopoietin |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 1 (ANGPT1),  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           | /PROD=angi   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | opoietin 1   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           | 001146.1     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|-------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | AU152579  | Homo sapiens cDNA FLJ13034 fis, clone NT2RP3001232   | PCSK5 | 2.41  | 0.14 | 2.47  | 0.86 | 2.04 | 0.15 | 1.11  | 1.20 |
| 10 |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 | NM_006200 | Homo sapiens proprotein convertase subtilisinexin type 5 (PCSK5), mRNA. /PROD=proprotein convertase subtilisinexin type 5          | PCSK5 | 3.01  | 0.21 | 2.88  | 0.92 | 2.28 | 0.11 | 1.52  | 1.25 |
| 20 |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | /FL=gb:U56387.2 gb:NM_006200.1   |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 | BF342661  | KIAA0036 gene product  | MAP2  | -0.77 | 0.30 | -0.19 | 0.44 | 0.12 | 0.17 | -2.21 | 1.64 |
| 40 | AF063824  | Homo sapiens trp-related protein 4 truncated variant delta mRNA, complete cds. /PROD=trp-related protein 4 truncated variant delta | TRPC4 | -3.03 | 0.39 | 0.05  | 0.49 | 1.28 | 0.17 | 0.21  | 0.92 |
| 45 |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           | /FL=gb:AF063824.1  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 | AA723810  | cDNA for differentially expressed CO16 gene /FL=gb:BC00  | LY6K  | 0.07  | 0.20 | -0.13 | 1.23 | 0.15 | 0.14 | -0.38 | 1.27 |
| 65 |           |  |       |       |      |       |      |      |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|----------|------|------|------|------|-------|------|-------|------|
|    |           | 1291.1   |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
|    | N29877    | interleukin -<br>14  |          | 1.94 | 0.13 | 0.51 | 0.48 | 0.78  | 0.64 | -1.57 | 0.65 |
| 5  | NM_007287 | Homo sapiens<br>membrane metallo-<br>endopeptidase (neutral<br>endopeptidase,<br>enkephalinas e, CALLA,<br>CD10) (MME),<br>transcript variant 1bis,<br>mRNA.<br>/PROD=membrane<br>metallo-<br>endopeptidase<br>/FL=gb:NM_007288.1<br>gb:NM_007287.1<br>gb:J03779.1 | MME      | 2.59 | 0.03 | 1.81 | 0.40 | 1.89  | 0.21 | 2.14  | 0.30 |
| 10 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 15 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 20 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 25 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 30 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 35 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 40 | AB050856  | Homo sapiens<br>beta3GalNAcT-1 mRNA<br>for globoside synthase,<br>complete cds,<br>clone: type 2.<br>/PROD=globoside<br>synthase<br>/FL=gb:AB050856.1  | B3GALNT1 | 1.39 | 0.05 | 0.20 | 0.22 | -0.13 | 0.21 | -0.10 | 0.17 |
| 45 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 50 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 55 | AI827455  | Homo sapiens<br>cDNA:<br>FLJ21042<br>fis, clone<br>CAE11204  | BCL6B    | 0.65 | 0.31 | 0.62 | 0.21 | 1.07  | 0.24 | 0.90  | 0.29 |
| 60 |           |  |          |      |      |      |      |       |      |       |      |
| 65 | AF017987  | Homo   | SFRP1    | 4.15 | 0.22 | 4.37 | 1.24 | 6.02  | 0.06 | 5.74  | 1.01 |

|    |          |               |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|----|----------|---------------|----------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 5  |          | sapiens       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | secreted      |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | apoptosis     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | related       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | protein 2     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | (SARP2)       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 10 |          | mRNA,         |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | complete      |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | cds.          |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | /PROD=secr    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | eted          |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 15 |          | apoptosis     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | related       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | protein 2     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:AF05   |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 20 |          | 6087.1        |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | gb:NM_0030    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | 12.2          |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | gb:AF01798    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 25 |          | 7.1           |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | gb:AF00190    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | 0.1           |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    | AL117451 | Homo          | C1orf108 | -0.73 | 0.20 | 0.68 | 0.24 | 1.06 | 0.05 | 0.82  | 0.21 |
| 30 |          | sapiens       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | mRNA;         |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | cDNA          |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | DKFZp586E     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 35 |          | 2317 (from    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | clone         |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | DKFZp586E     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | 2317).        |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    | AW268357 | ESTs, Highly  | USP32    | 0.73  | 0.20 | 0.36 | 0.19 | 0.70 | 0.03 | 0.09  | 0.18 |
| 40 |          | similar to    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | AF155116 1    |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | NY-REN-60     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | antigen       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 45 |          | (H.sapiens)   |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    | BE465243 | ESTs          | ARFGEF1  | 0.50  | 0.23 | 0.16 | 0.32 | 1.03 | 0.08 | 0.47  | 0.06 |
|    | AA993400 | ESTs          | ADAL     | 0.89  | 0.22 | 0.48 | 0.28 | 0.83 | 0.10 | 0.29  | 0.43 |
|    | AI970898 | Cluster Incl. | ACACB    | 0.69  | 0.15 | 0.51 | 0.53 | 1.46 | 0.11 | -0.87 | 0.83 |
| 50 |          | AI970898:wr   |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | 21c03.x1      |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | Homo          |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | sapiens       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 55 |          | cDNA, 3       |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | end           |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | /clone=IMAG   |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
|    |          | E-2488324     |          |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 60 |          | /clone_end=   |          |       |      |      |      |      |      |       |      |

|    |           |               |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---------------|----------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
|    |           | 3             |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | /gb=AI97089   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 5  |           | 8             |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | /gi=5767724   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | /ug=Hs.2348   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 98 /len=382   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 10 | BG026457  | ESTs,         | KIAA1909 | 0.60 | 0.07 | 0.23 | 0.59 | 0.98 | 0.03 | -2.11 | 1.28 |
|    |           | Weakly        |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | similar to    |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 15 |           | ALU5_HUM      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | AN ALU        |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | SUBFAMILY     |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | SC            |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 20 |           | SEQUENCE      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | CONTAMIN      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | ATION         |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | WARNING       |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 25 |           | ENTRY         |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | (H.sapiens)   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    | BC041933  | Homo          | UBE3C    | 0.83 | 0.23 | 0.11 | 0.51 | 0.55 | 0.05 | 0.41  | 0.92 |
|    |           | sapiens,      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 30 |           | clone         |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | IMAGE:5300    |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 703, mRNA.    |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 35 | AI638611  | KIAA1373      | STAMBPL1 | 2.20 | 0.17 | 1.37 | 0.58 | 2.32 | 0.08 | -0.39 | 1.24 |
|    |           | protein       |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    | AI341686  | ESTs, Highly  | MTRF1    | 1.36 | 0.14 | 0.45 | 0.48 | 1.43 | 0.09 | -1.09 | 0.99 |
|    |           | similar to    |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 40 |           | RF1M_HUM      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | AN            |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | MITOCHON      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | DRIAL         |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 45 |           | PEPTIDE       |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | CHAIN         |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | RELEASE       |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | FACTOR 1      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 50 |           | PRECURSO      |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | R             |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | (H.sapiens)   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    | NM_003182 | Homo          | TAC1     | 1.89 | 0.20 | 1.65 | 0.13 | 2.46 | 0.09 | 1.48  | 0.26 |
| 55 |           | sapiens       |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | tachykinin,   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | precursor 1   |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | (substance    |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 60 |           | K, substance  |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | P, neurokinin |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 1, neurokinin |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 2,            |          |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 65 |           | neuromedin    |          |      |      |      |      |      |      |       |      |

|    |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | L, neurokinin<br>alpha,<br>neuropeptide<br>K,neuropepti<br>de gamma)<br>(TAC1),<br>transcript<br>variant beta,<br>mRNA.<br>/PROD=tach<br>ykinin 2<br>precursor,<br>isoform beta<br>/FL=gb:U3 |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | M80634    | Human  | FGFR2  | 3.63  | 0.06 | 2.25  | 0.39 | 2.79 | 0.19 | 2.07  | 0.84 |
|    |           | keratinocyte<br>growth factor<br>receptor<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=kera<br>tinocyte<br>growth factor<br>receptor<br>/FL=gb:M806<br>34.1<br>gb:NM_0229<br>69.1<br>gb:M97193.1    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 | AK021452  | Homo   | ZNF521 | -0.20 | 0.16 | -1.15 | 1.12 | 1.31 | 0.05 | 0.36  | 0.18 |
|    |           | sapiens<br>cDNA<br>FLJ11390<br>fis, clone<br>HEMBA1000<br>561, weakly<br>similar to<br>ZINC<br>FINGER<br>PROTEIN<br>91.  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 | AA541622  | ESTs   | SYNPO2 | -0.49 | 0.30 | -0.90 | 0.06 | 0.35 | 0.09 | -2.58 | 0.93 |
|    | N50714    | ESTs   | -      | -1.13 | 0.13 | -1.34 | 0.52 | 0.10 | 0.12 | -0.21 | 0.28 |
| 60 | NM_002674 | Homo   | PMCH   | 0.62  | 0.24 | 1.10  | 0.48 | 1.64 | 0.03 | 0.09  | 0.80 |
|    |           | sapiens pro-<br>melanin-<br>concentratin<br>g hormone  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |  |                |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|----------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | (PMCH),<br>mRNA.<br>/PROD=pro-<br>melanin-<br>concentratin<br>g hormone  |                |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | /FL=gb:NM_<br>002674.1<br>gb:M57703.1  |                |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 | BM666010  | Homo sapiens<br>cDNA<br>FLJ23803<br>fis, clone<br>HEP22811.  | LOC200169 1.36 | 0.16 | 0.45  | 0.74 | 1.49  | 0.12 | -1.65 | 1.41 |
| 20 | AI343467  | Homo sapiens<br>cDNA<br>FLJ11041<br>fis, clone<br>PLACE1004<br>405   | - -0.44        | 0.08 | -1.50 | 0.82 | 1.11  | 0.19 | -0.64 | 0.20 |
| 25 | AA046424  | ESTs,<br>Weakly<br>similar to<br>YZ28_HUMA<br>N<br>HYPOTHETI<br>CAL<br>PROTEIN<br>ZAP128<br>(H.sapiens)                                | ACOT4 0.58     | 0.27 | -0.94 | 0.66 | -1.08 | 0.38 | -1.09 | 0.25 |
| 30 | R38389    | olfactomedin<br>related ER<br>localized<br>protein   | OLFM1 4.27     | 0.11 | 3.02  | 0.76 | 4.53  | 0.07 | 2.17  | 0.96 |
| 35 | BF724270  | ESTs   | - 2.03         | 0.22 | 0.72  | 0.42 | 2.36  | 0.06 | 0.01  | 0.97 |
| 40 | NM_001819 | Homo sapiens<br>chromogranin B<br>(secretogranin 1) (CHGB),<br>mRNA.<br>/PROD=chro<br>mogranin B<br>precursor<br>/FL=gb:BC00<br>0375.1 | CHGB 1.40      | 0.18 | 0.50  | 0.75 | 1.66  | 0.05 | -0.74 | 1.03 |
| 45 |           |  |                |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |  |                |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |  |                |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           |  |                |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |  |                |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | AK026387  | Homo sapiens   | -        | 0.03  | 0.28 | -0.05 | 0.52 | 1.23  | 0.26 | 0.52  | 0.67 |
| 10 |           | cDNA: FLJ22734   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 | BF062139  | polymerase (RNA) III (DNA directed) (32kD)                       | -        | 5.23  | 0.06 | 4.31  | 0.74 | 5.80  | 0.07 | 3.37  | 0.86 |
| 20 |           | /FL=gb:NM_006467.1   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 | BG540454  | ESTs   | SCGB3A2  | 4.64  | 0.02 | 2.91  | 0.84 | 4.13  | 0.07 | 1.72  | 0.83 |
| 30 | AI659533  | ArgAbl-interacting protein                                       | SORBS2   | 0.02  | 0.12 | 1.12  | 0.71 | 2.17  | 0.05 | -1.08 | 1.48 |
| 35 | AA531287  | ESTs   | -        | 2.94  | 0.27 | 1.32  | 0.72 | 2.57  | 0.04 | 0.22  | 0.90 |
| 40 | NM_013243 | Homo sapiens secretogranin III (SCG3), mRNA.                     | SCG3     | 3.30  | 0.20 | 2.13  | 0.95 | 3.67  | 0.19 | 0.87  | 1.06 |
| 45 |           | /PROD=secretogranin III  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           | /FL=gb:AF078851.1  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 | AI307586  | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566H0124 (from clone DKFZp566H0124) | C10orf95 | 0.34  | 0.22 | -1.15 | 0.24 | -0.49 | 0.16 | -3.61 | 0.99 |
| 60 | BC032004  | Homo sapiens, Similar to glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3, | GRIA3    | -0.02 | 0.23 | -0.15 | 0.33 | 0.47  | 0.04 | 0.17  | 0.07 |
| 65 |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | AW205739  | clone<br>IMAGE:4753<br>474, mRNA.<br>ESTs, TYW3  | 0.47  | 0.01 | 0.81  | 1.35 | 3.72 | 0.18 | 2.46  | 1.15 |
| 10 |           | Weakly similar to ORF YGL050w (S.cerevisiae)   |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 | NM_153262 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ34198 (FLJ34198), mRNA. /FL=gb:NM_153262.1  | -0.01 | 0.17 | -0.84 | 0.51 | 0.00 | 0.18 | -3.88 | 1.64 |
| 20 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 | AA156873  | albumin PELO   | 0.77  | 0.12 | -0.23 | 0.93 | 0.65 | 0.14 | -2.33 | 1.01 |
| 30 | BC012375  | Homo sapiens, Similar to KIAA1001 protein, clone MGC:8996 IMAGE:3882 163, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to KIAA1001 protein /FL=gb:AB023218.1 gb:NM_014960.1 gb:BC012375.1 | -0.46 | 0.48 | -0.78 | 0.42 | 0.57 | 0.22 | -0.41 | 0.55 |
| 35 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 | AA843242  | ESTs BNC2  | 2.12  | 0.37 | 1.03  | 0.47 | 2.89 | 0.06 | 0.43  | 0.80 |
|    | BF792954  | ESTs HDLBP   | -1.53 | 1.04 | -2.75 | 0.91 | 0.30 | 0.16 | -0.72 | 0.26 |
| 60 | AA780067  | heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1   | 0.41  | 0.19 | 0.30  | 0.61 | 2.61 | 0.18 | 0.78  | 0.60 |
| 65 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|------------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|    | AA909330  | ESTs   | RP1-32F7.2 | 0.98  | 0.17 | -1.67 | 0.51 | 0.79 | 0.02 | -0.38 | 0.12 |
| 5  | AF141339  | Homo sapiens   | ZNF521     | -0.41 | 0.12 | -0.97 | 0.93 | 1.67 | 0.11 | -0.31 | 0.80 |
| 10 |           | LYST-interacting protein LIP3 mRNA, partial cds.                   |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | /PROD=LYST T-interacting protein LIP3                              |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | BF435123  | bromodomai n and PHD finger containing, 3                          | -          | 2.28  | 0.17 | 1.31  | 0.51 | 2.70 | 0.12 | 1.30  | 1.00 |
| 25 | AK056212  | Homo sapiens cDNA FLJ31650 fis, clone NT2RI2004079.                | -          | 1.03  | 0.14 | 0.14  | 0.27 | 1.10 | 0.07 | -1.41 | 0.51 |
| 30 | NM_001446 | Homo sapiens fatty acid binding protein 7, brain (FABP7), mRNA.    | FABP7      | 2.07  | 0.15 | 0.74  | 0.29 | 2.20 | 0.04 | 1.08  | 0.16 |
| 35 |           | /PROD=fatty acid binding protein 7, brain                          |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           | /FL=gb:UB1235.1 gb:D88648.1 gb:U51338.1 gb:NM_001446.1 gb:D50373.1 |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           |  |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           |  |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 | AW051591  | ESTs, Moderately similar to unnamed protein product (H.sapiens)    | RNF175     | 1.41  | 0.32 | 0.22  | 0.10 | 2.60 | 0.06 | 0.96  | 0.20 |
| 60 |           |  |            |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 | BC041970  | Homo sapiens,  | C9orf122   | 0.74  | 0.03 | -0.35 | 0.49 | 0.76 | 0.06 | -2.31 | 1.25 |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | clone<br>IMAGE:5302<br>687, mRNA.   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | BC013077  | Homo sapiens,<br>clone<br>IMAGE:3459<br>334, mRNA.  | -      | 2.51  | 0.11 | 0.80  | 1.15 | 2.85 | 0.06 | 0.08  | 0.89 |
| 10 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | AW572379  | ESTs  | -      | 1.80  | 0.03 | 0.60  | 0.84 | 1.45 | 0.07 | 1.88  | 0.53 |
| 15 | BE644917  | nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3   | XIST   | -3.88 | 1.26 | -0.54 | 1.28 | 1.94 | 0.13 | -0.20 | 1.94 |
| 20 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | NM_171999 | Homo sapiens sal-like 3 (Drosophila) (SALL3), mRNA.<br>/PROD=sal-like 3<br>/FL=gb:NM_171999.1 | SALL3  | 2.97  | 0.18 | 2.04  | 0.71 | 3.79 | 0.08 | 1.02  | 0.74 |
| 25 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | AI654224  | ESTs  | -      | 0.46  | 0.36 | 0.14  | 0.44 | 1.03 | 0.07 | -0.81 | 0.85 |
| 35 | AA167449  | nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3   | XIST   | -3.08 | 0.10 | -0.47 | 2.59 | 4.59 | 0.07 | 2.80  | 1.86 |
| 40 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | BF977837  | KIAA0527 protein  | SUSD5  | 1.64  | 0.02 | 0.50  | 0.68 | 1.96 | 0.16 | -1.52 | 1.66 |
| 45 | BC029425  | Homo sapiens,<br>Similar to KIAA1275 protein,<br>clone<br>IMAGE:4616<br>553, mRNA.            | FILIP1 | -0.83 | 0.45 | -0.03 | 0.62 | 0.76 | 0.20 | -0.29 | 0.44 |
| 50 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 | AI978754  | ESTs  | -      | 2.76  | 0.14 | 1.54  | 0.57 | 3.57 | 0.06 | 2.31  | 0.69 |
|    | AA628440  | nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3   | XIST   | 0.18  | 0.13 | 1.42  | 1.52 | 4.80 | 0.02 | 3.01  | 1.50 |
| 60 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | L36861    | L36861<br>/FEATURE=expanded_c   | -      | 2.75  | 0.17 | 2.01  | 0.82 | 3.63 | 0.09 | 3.00  | 0.97 |
| 65 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |              |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--------------|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | ds           |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /DEFINITIO   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | N=HUMGCA     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | PB Homo      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | sapiens      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | guanylate    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | cyclase      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | activating   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | protein      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | (GCAP)       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gene exons   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 1-4,         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | complete cds |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | AW023227  | ESTs         | MKX    | -0.91 | 0.60 | -1.31 | 0.06 | 0.27 | 0.13 | -2.90 | 0.52 |
|    | NM_021614 | Homo         | KCNN2  | 3.45  | 0.13 | 2.52  | 0.83 | 4.40 | 0.14 | 1.54  | 0.80 |
|    |           | sapiens      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | potassium    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |           | intermediate |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | small        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | conductance  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | calcium-     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | activated    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | channel,     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | subfamily N, |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | member 2     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | (KCNN2),     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=pota   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           | ssium        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | intermediate |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | small        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | conductance  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           | calcium-     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | activated    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | channel,     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | subfamily N, |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           | member 2     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 021614.1     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:AF23961   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           | 3.1          |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | NM_000956 | Homo         | PTGER2 | -0.71 | 0.71 | -0.73 | 0.57 | 0.63 | 0.33 | -2.38 | 0.61 |
|    |           | sapiens      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | prostaglandi |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           | n E receptor |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 2 (subtype   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | EP2), 53kD   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           | (PTGER2),    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |                |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|----|-----------|----------------|---------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | /PROD=pros     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | taglandin E    |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | receptor 2     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | (subtype       |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | EP2), 53kD     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 10 |           | /FL=gb:U194    |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 87.1           |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0009     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 56.1           |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 15 | NM_013381 | Homo           | TRHDE   | 1.96 | 0.16 | 0.25 | 0.36 | 1.81 | 0.03 | 0.82  | 0.23 |
|    |           | sapiens        |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | thyrotropin-   |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | releasing      |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | hormone        |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 20 |           | degrading      |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | ectoenzyme     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | (TRHDE),       |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 25 |           | mRNA.          |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=thyr     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | otropin-       |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | releasing      |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 30 |           | hormone        |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | degradingect   |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | oenzyme        |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 35 |           | /FL=gb:AF12    |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 6372.1         |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0133     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 81.1           |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 40 | NM_016354 | Homo           | SLCO4A1 | 2.18 | 0.06 | 1.01 | 0.37 | 2.35 | 0.05 | -0.91 | 1.23 |
|    |           | sapiens        |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | solute carrier |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | family 21      |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 45 |           | (organic       |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | anion          |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | transporter),  |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | member 12      |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 50 |           | (SLC21A12),    |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.          |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=orga     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | nic anion      |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 55 |           | transporter    |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | OATP-E         |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:AB03    |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 60 |           | 1051.1         |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0163     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 54.1           |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:AF20507     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
|    |           | 2.1            |         |      |      |      |      |      |      |       |      |
| 65 |           | gb:AF18781     |         |      |      |      |      |      |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|----------|---|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | BC028359 | 7.1<br>Homo sapiens, clone<br>IMAGE:4828<br>836, mRNA.  | ZNF141 | -1.05 | 0.39 | -0.59 | 0.65 | 1.25 | 0.17 | -1.48 | 0.72 |
| 10 | AI193252 | ESTs, Weakly similar to<br>AF133270 1<br>SLIT2<br>(H.sapiens)   | LRRN6A | 4.38  | 0.11 | 2.47  | 0.43 | 4.23 | 0.11 | 1.90  | 0.37 |
| 15 | H09780   | Human (clone CTG-A4) mRNA<br>sequence   | -      | 2.04  | 0.19 | 0.56  | 0.07 | 2.50 | 0.11 | 0.12  | 0.40 |
| 20 | BC040605 | Homo sapiens, clone<br>IMAGE:5271<br>039, mRNA.   | -      | 2.64  | 0.16 | 1.61  | 1.08 | 3.59 | 0.09 | 0.45  | 1.14 |
| 25 | AW057589 | ESTs  | -      | -0.96 | 0.26 | -2.77 | 0.81 | 0.25 | 0.24 | -1.21 | 0.35 |
| 30 | M31213   | Human papillary thyroid carcinoma-<br>encoded protein<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/FL=gb:M312<br>13.1   | RET    | 0.42  | 0.10 | -1.86 | 0.83 | 1.77 | 0.12 | -0.64 | 0.15 |
| 35 | Z92546   | Human DNA sequence<br>from clone<br>CTA-65A6<br>on<br>chromosome<br>22q11-12<br>Contains the<br>3 part of the<br>gene for the<br>ortholog of<br>rat CAIN<br>(KIAA0330),<br>the gene for<br>a novel<br>Sushi | -      | 0.58  | 0.13 | -1.16 | 0.54 | 1.07 | 0.12 | -1.27 | 0.14 |
| 40 |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |          |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | domain<br>(SCR repeat)<br>containing<br>protein<br>similar to<br>Mucins,<br>ESTs, an<br>STS, GSSs<br>and two...  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 | AA974416  | protein  | PPP2R2B  | 4.02  | 0.16 | 3.52  | 0.23 | 5.22  | 0.07 | 3.12  | 0.15 |
| 15 |           | phosphatase<br>2 (formerly<br>2A),<br>regulatory<br>subunit B<br>(PR 52),<br>beta isoform  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 | AW138143  | ESTs   | SORBS2   | 3.44  | 0.16 | 2.89  | 0.88 | 4.47  | 0.10 | 1.88  | 1.15 |
| 25 | NM_014862 | Homo sapiens<br>KIAA0307<br>gene product<br>(KIAA0307),<br>mRNA.<br>/PROD=KIA<br>A0307 gene<br>product<br>/FL=gb:AB00<br>2305.1<br>gb:NM_0148<br>62.1  | ARNT2    | 1.29  | 0.08 | -0.68 | 0.97 | 2.00  | 0.08 | 0.02  | 0.24 |
| 30 |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 | AI765540  | ESTs   | -        | 1.28  | 0.22 | 0.07  | 0.39 | 1.50  | 0.07 | -0.11 | 0.26 |
| 40 | NM_018013 | Homo sapiens<br>hypothetical<br>protein<br>FLJ10159<br>(FLJ10159),<br>mRNA.<br>/PROD=hypo<br>thetical<br>protein<br>FLJ10159<br>/FL=gb:NM_<br>018013.1 | FLJ10159 | 1.30  | 0.21 | 0.38  | 0.39 | 2.89  | 0.02 | 0.62  | 0.21 |
| 45 |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 | BF382322  | ESTs,<br>Weakly<br>similar to<br>unnamed   | -        | -0.40 | 0.09 | -2.09 | 0.67 | -0.12 | 0.08 | -1.73 | 0.50 |
| 65 |           |  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|-------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 5  | AV699347  | protein product (H.sapiens)  | XIST  | -1.37 | 0.38 | 0.45 | 1.69 | 4.28 | 0.02 | 2.25  | 1.53 |
| 10 | BC011549  | nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3  | ATP5S | 0.69  | 0.19 | 0.96 | 0.68 | 2.57 | 0.29 | -0.02 | 0.52 |
| 15 |           | Homo sapiens, clone MGC:19945 IMAGE:4554 461, mRNA, complete cds.  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 20 |           | /PROD=Unk nown (protein for MGC:19945) /FL=gb:BC01 1549.1  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 25 | NM_001889 | Homo sapiens crystallin, zeta (quinone reductase) (CRYZ), mRNA.  | CRYZ  | -1.68 | 0.26 | 0.23 | 1.38 | 3.75 | 0.07 | 1.78  | 1.11 |
| 30 |           | /PROD=cryst allin, zeta (quinone reductase) /FL=gb:NM_001889.1 gb:L13278.1 gb:S58039.1                       |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 35 | BC002665  | Homo sapiens, proteolipid protein (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicated), clone | PLP1  | 4.57  | 0.15 | 2.95 | 0.64 | 4.70 | 0.06 | 2.32  | 0.52 |
| 40 |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 45 |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 50 |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 55 |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 60 |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |
| 65 |           |  |       |       |      |      |      |      |      |       |      |

|    |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|---------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | MGC:3940,<br>mRNA,<br>complete<br>cds.  |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=prot<br>eolipid<br>protein<br>(Pelizaeus-<br>Merzbacherd<br>isease,<br>spastic<br>paraplegia 2,<br>uncomplicate<br>d) |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | /FL=gb:BC00<br>2665.1   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_001243 | Homo sapiens<br>tumor<br>necrosis<br>factor<br>receptor<br>superfamily,<br>member 8<br>(TNFRSF8),<br>mRNA.                  | TNFRSF8 | 3.75 | 0.03 | 1.45  | 0.35 | 3.24 | 0.11 | 0.89  | 0.46 |
| 25 |           | /PROD=CD3<br>0 antigen<br>(Ki-1<br>antigen)   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | /FL=gb:NM_<br>001243.1<br>gb:D86042.1<br>gb:M83554.1  |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 | NM_001195 | Homo sapiens<br>beaded<br>filament<br>structural<br>protein 1,<br>filensin<br>(BFSP1),<br>mRNA.                             | BFSP1   | 0.57 | 0.33 | -1.65 | 1.30 | 0.60 | 0.14 | -0.86 | 0.73 |
| 50 |           | /PROD=filen<br>sin  |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           | /FL=gb:AF03<br>9655.1<br>gb:NM_0011<br>95.2   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|----------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | NM_024582 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ23056 (FLJ23056), mRNA.   | FAT4     | 2.16  | 0.27 | -0.49 | 0.30 | 1.54 | 0.28 | -1.35 | 1.01 |
| 10 |           | /PROD=hypothetical protein FLJ23056  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | /FL=gb:NM_024582.1   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_000767 | Homo sapiens cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible), polypeptide 6 (CYP2B6), mRNA. | CYP2B6   | 2.60  | 0.18 | 0.87  | 0.96 | 1.47 | 0.12 | -0.69 | 1.03 |
| 25 |           | /PROD=cytochrome P450, subfamily IIB(phenobarbital-inducible), polypeptide 6                         |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | /FL=gb:NM_000767.2   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | gb:AF18227.1   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           | gb:M29874.1  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 | AW665509  | ESTs   | MGC42174 | -0.10 | 0.33 | -0.87 | 0.72 | 1.20 | 0.08 | -2.60 | 1.40 |
| 50 | NM_001104 | Homo sapiens actinin, alpha 3 (ACTN3), mRNA.   | ACTN3    | 2.12  | 0.13 | 1.64  | 0.28 | 3.35 | 0.03 | 1.67  | 0.36 |
| 55 |           | /PROD=skeletal muscle specific actinin, alpha 3  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|    |           | /FL=gb:M864   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 07.1  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 5  |           | gb:NM_001104.1  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    | NM_021069 | Homo sapiens  | SORBS2   | -0.49 | 0.43 | 0.30  | 1.36 | 2.03  | 0.07 | -1.13 | 1.15 |
|    |           | ArgAbl-interacting protein ArgBP2 (ARGBP2), transcript variant 2, mRNA. |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | /PROD=ArgAbl-interacting protein 2, isoform 2                           |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | /FL=gb:AB018320.1   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | gb:NM_021069.1  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 | T65020    | ESTs  | -        | 0.51  | 0.16 | -0.84 | 0.26 | 1.10  | 0.15 | -1.50 | 0.38 |
| 30 | NM_152647 | Homo sapiens  | GALK2    | 0.08  | 0.56 | -1.42 | 0.52 | 0.03  | 0.17 | -2.34 | 0.91 |
| 35 |           | hypothetical protein FLJ32800 (FLJ32800), mRNA.                         |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | /FL=gb:NM_152647.1  |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 | BC036917  | Homo sapiens, clone   | C6orf141 | -0.82 | 0.30 | -1.18 | 0.40 | 0.88  | 0.11 | -2.18 | 0.62 |
| 50 |           | MGC:46457 IMAGE:5201433, mRNA, complete cds.                            |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           | /PROD=Unknown (protein for MGC:46457)                                   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           | /FL=gb:BC036917.1   |          |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 | AI969112  | Homo sapiens,   | PHIP     | -1.07 | 0.13 | -2.88 | 0.91 | -0.37 | 0.02 | -2.23 | 0.33 |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|----------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | clone<br>IMAGE:5260<br>603, mRNA,<br>partial cds  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | AW449813  | KIAA0918  | SLITRK5  | 0.32  | 0.26 | -1.89 | 0.50 | 0.46 | 0.10 | -0.57 | 0.13 |
|    |           | protein   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 | AW044658  | ESTs  | -        | 0.16  | 0.16 | -1.47 | 0.25 | 0.90 | 0.14 | -0.89 | 0.16 |
|    | AI694300  | ESTs  | -        | -0.52 | 0.02 | -1.34 | 0.52 | 0.27 | 0.08 | -1.00 | 0.08 |
|    | NM_017631 | Homo  | FLJ20035 | 1.35  | 0.13 | 0.05  | 0.19 | 1.51 | 0.17 | 0.32  | 0.15 |
| 15 |           | sapiens<br>hypothetical<br>protein<br>FLJ20035<br>(FLJ20035),<br>mRNA.<br>/PROD=hypo<br>thetical<br>protein<br>FLJ20035<br>/FL=gb:NM_<br>017631.1               |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 | AF298547  | Homo  | NALP2    | 1.54  | 0.08 | 1.22  | 1.61 | 5.04 | 0.05 | 3.23  | 1.36 |
| 35 |           | sapiens<br>nucleotide-<br>binding site<br>protein 1<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=nucl<br>eotide-<br>binding site<br>protein 1<br>/FL=gb:AF29<br>8547.1 |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 | NM_030631 | Homo  | SLC25A21 | 1.96  | 0.25 | 0.33  | 0.81 | 2.47 | 0.11 | -0.28 | 0.63 |
| 55 |           | sapiens<br>oxodicarboxy<br>late carrier<br>(ODC1),<br>mRNA.<br>/PROD=oxod<br>icarboxylate<br>carrier<br>/FL=gb:NM_<br>030631.1                                  |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 | BF196255  | ESTs  | -        | 2.94  | 0.05 | 1.18  | 0.43 | 3.15 | 0.08 | 0.54  | 0.57 |
| 65 | NM_003247 | Homo  | THBS2    | 2.62  | 0.20 | 1.04  | 0.28 | 2.70 | 0.04 | 0.27  | 0.45 |
|    |           | sapiens   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|-----------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | thrombospon<br>din 2<br>(THBS2),<br>mRNA.<br>/PROD=thro<br>mbospondin  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | 2<br>/FL=gb:NM_<br>003247.1<br>gb:L12350.1   |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 | NM_001446 | Homo sapiens fatty acid binding protein 7, brain (FABP7), mRNA.<br>/PROD=fatty acid binding protein 7, brain<br>/FL=gb:U81235.1<br>gb:D88648.1<br>gb:U51338.1<br>gb:NM_001446.1<br>gb:D50373.1 | FABP7     | 0.95 | 0.09 | -0.75 | 0.37 | 0.20 | 0.22 | -1.73 | 0.99 |
| 20 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 | AW004016  | ESTs   | ST6GAL2   | 1.57 | 0.14 | 0.89  | 0.32 | 3.30 | 0.07 | 1.48  | 0.43 |
|    | AW072790  | contactin 1  | CNTN1     | 0.50 | 0.20 | 0.18  | 0.98 | 1.84 | 0.10 | 1.01  | 1.39 |
|    | AL512686  | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp7611177 (from clone DKFZp7611177).  | GNAO1     | 2.16 | 0.50 | -0.28 | 1.03 | 1.67 | 0.18 | -1.12 | 0.37 |
| 45 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 | A1638063  | ESTs   | CBX5      | 0.49 | 0.16 | -0.34 | 0.34 | 0.98 | 0.11 | -2.71 | 1.22 |
|    | AU157049  | Homo sapiens cDNA FLJ14284 fis, clone PLACE1005898   | LOC153346 | 2.24 | 0.20 | 0.34  | 0.47 | 2.24 | 0.09 | -0.44 | 0.96 |
| 60 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 | NM_002738 | Homo sapiens   | PRKCB1    | 0.99 | 0.28 | -0.15 | 0.45 | 1.42 | 0.08 | -1.02 | 1.04 |

|    |           |               |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---------------|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|    |           | protein       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | kinase C,     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 5  |           | beta 1        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | (PRKCB1),     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=prot    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | ein kinase C, |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | beta 1        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 002738.1      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 | AI185136  | ESTs          | DYDC2  | 0.12  | 0.31 | -0.80 | 0.08 | 0.72 | 0.08 | -0.60 | 0.09 |
|    | AI928037  | ESTs          | RPIB9  | -0.55 | 0.55 | -2.71 | 0.74 | 0.49 | 0.12 | -0.89 | 0.27 |
|    | NM_016179 | Homo          | TRPC4  | -1.51 | 0.85 | -1.87 | 1.42 | 1.71 | 0.11 | -0.13 | 1.23 |
|    |           | sapiens       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 |           | transient     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | receptor      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | potential     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |           | channel 4     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | (TRPC4),      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=tran    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | sient         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | receptor      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | potential 4   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | /FL=gb:NM_    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 016179.1      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:AF17540    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 6.1           |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 | AW138143  | ESTs          | SORBS2 | 3.29  | 0.13 | 2.35  | 1.05 | 4.28 | 0.10 | 1.32  | 1.07 |
|    | NM_001876 | Homo          | CPT1A  | 1.63  | 0.18 | -0.15 | 0.21 | 1.32 | 0.07 | -0.20 | 0.33 |
|    |           | sapiens       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           | carnitine     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | palmitoyltran |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | sferase I,    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | liver         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           | (CPT1A),      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | nuclear gene  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | encoding      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mitochondria  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           | I protein,    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=liver   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | carnitine     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           | palmitoyltran |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | sferase I     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:L392   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 11.1          |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           | gb:NM_0018    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 76.1          |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|----------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|    | AA903862  | ESTs  | C20orf54 | 1.61  | 0.15 | -1.17 | 0.30 | 0.68 | 0.21 | -1.49 | 0.23 |
| 5  | AI670947  | phosphatidyli<br>nositol-4-<br>phosphate 5-<br>kinase, type<br>I, beta  | -        | 3.91  | 0.05 | 0.55  | 1.54 | 3.33 | 0.10 | 1.17  | 0.68 |
| 10 | AV648405  | polymerase<br>(RNA) III<br>(DNA<br>directed)<br>(32kD)  | -        | -0.01 | 0.11 | 0.23  | 0.52 | 1.73 | 0.14 | -1.23 | 1.15 |
| 15 | BF435123  | bromodomain<br>and PHD<br>finger<br>containing, 3   | -        | 1.80  | 0.13 | -1.35 | 1.01 | 1.14 | 0.03 | 0.37  | 0.24 |
| 20 | NM_016582 | Homo<br>sapiens<br>peptide<br>transporter 3<br>(LOC51296),<br>mRNA.<br>/PROD=peptide<br>transporter 3<br>/FL=gb:NM_<br>016582.1<br>gb:AB02059<br>8.1                      | SLC15A3  | 1.77  | 0.16 | -0.88 | 1.35 | 1.30 | 0.23 | -2.04 | 1.23 |
| 25 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 | AI830490  | glycerol<br>kinase  | GK       | 0.61  | 0.01 | -0.65 | 0.79 | 1.25 | 0.20 | -0.38 | 0.33 |
| 45 | AW134979  | HSPC156<br>protein  | STXBP6   | 2.28  | 0.03 | 0.55  | 0.28 | 2.05 | 0.03 | 0.30  | 0.44 |
|    | AI354636  | ESTs  | -        | 2.81  | 0.11 | 0.68  | 1.17 | 3.02 | 0.20 | 0.19  | 0.76 |
|    | BE672659  | ESTs  | -        | 0.20  | 0.64 | -0.43 | 0.61 | 1.98 | 0.12 | -0.69 | 0.45 |
| 50 | AF284095  | Homo<br>sapiens<br>alpha-2A<br>adrenergic<br>receptor<br>mRNA,<br>complete<br>cds.<br>/PROD=alpha-<br>2A<br>adrenergic<br>receptor<br>/FL=gb:AF28<br>4095.1<br>gb:NM_0006 | ADRA2A   | 0.63  | 0.21 | -0.74 | 0.98 | 1.85 | 0.03 | 0.55  | 0.31 |
| 55 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |   |          |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | NM_021136 | 81.1<br>Homo sapiens<br>reticulon 1<br>(RTN1),<br>mRNA.<br>/PROD=reticulon 1<br>/FL=gb:L10333.1                           | RTN1   | -0.30 | 0.03 | -1.39 | 0.35 | 0.80 | 0.07 | -1.23 | 0.39 |
| 10 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_014729 | 33.1<br>gb:L10334.1<br>gb:NM_021136.1   | TOX    | 0.34  | 0.03 | -0.46 | 0.12 | 0.90 | 0.18 | -1.86 | 0.40 |
| 25 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 | BE674118  | ESTs  | -      | 0.78  | 0.07 | -1.32 | 0.73 | 0.28 | 0.19 | -0.96 | 0.74 |
| 40 | BC026969  | Homo sapiens,<br>clone<br>IMAGE:5116073, mRNA,<br>partial cds.  | WDR67  | 2.95  | 0.11 | 0.75  | 0.92 | 3.08 | 0.08 | 0.45  | 0.61 |
| 45 | AF131783  | Homo sapiens<br>clone 25181<br>mRNA<br>sequence.  | PAP2D  | -0.42 | 0.26 | -2.00 | 1.05 | 0.31 | 0.22 | -1.56 | 0.70 |
| 50 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 | U11058    | Homo sapiens<br>large<br>conductance<br>calcium- and<br>voltage-<br>dependent<br>potassium<br>channel<br>alpha<br>subunit | KCNMA1 | 1.56  | 0.09 | -0.16 | 1.08 | 2.29 | 0.18 | -0.79 | 0.86 |
| 60 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |          |               |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|----------|---------------|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |          | (MaxiK)       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | mRNA,         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | complete      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | ods.          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /PROD=larg    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |          | e             |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | conductance   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | calcium- and  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | voltage-      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |          | dependentpo   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | assium        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | channel       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | alpha         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |          | subunit       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:U237   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 67.1          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | gb:NM_0022    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 |          | 47.1          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | gb:AF02599    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 9             |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 30 | BF510715 | fibroblast    | -         | 2.67  | 0.27 | 0.84  | 0.17 | 3.29  | 0.01 | 0.64  | 0.51 |
|    |          | growth factor |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 4 (heparin    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | secretory     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 |          | transforming  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | protein 1,    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | Kaposi        |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | sarcoma       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |          | oncogene)     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | /FL=gb:M174   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 46.1          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | gb:NM_0020    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 | BE897866 | ESTs          | ACADSB    | 1.41  | 0.23 | 0.08  | 0.34 | 3.10  | 0.10 | -0.27 | 0.88 |
|    | AI735586 | ESTs          | LOC152573 | 0.60  | 0.13 | 0.00  | 1.14 | 2.84  | 0.07 | 1.12  | 1.30 |
|    | AL573058 | complement    | C1R       | 0.92  | 0.14 | -1.67 | 0.38 | 0.73  | 0.02 | -0.96 | 0.77 |
| 50 |          | component     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | 1, r          |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | subcompone    |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | nt            |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 | AF429305 | Homo          | RMST      | -0.48 | 0.03 | -2.49 | 0.51 | -0.25 | 0.20 | -1.89 | 0.27 |
|    |          | sapiens       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | C23up         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | NCRMS         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |          | mRNA,         |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | partial       |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | sequence;     |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |          | alternatively |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |          | spliced.      |           |       |      |       |      |       |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|----------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | BF195118  | ESTs,<br>Weakly<br>similar to<br>ALU7_HUM<br>AN ALU<br>SUBFAMILY<br>SQ<br>SEQUENCE<br>CONTAMIN<br>ATION<br>WARNING<br>ENTRY<br>(H.sapiens)  | ATP5J    | 0.09 | 0.13 | -0.92 | 0.42 | 1.57 | 0.16 | -0.53 | 0.08 |
| 10 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_005460 | Homo<br>sapiens<br>synuclein,<br>alpha<br>interacting<br>protein<br>(synphilin)<br>(SNCAIP),<br>mRNA.<br>/PROD=synu<br>clein alpha<br>interacting<br>protein<br>/FL=gb:AF07<br>6929.1<br>gb:NM_0054<br>60.1 | SNCAIP   | 1.76 | 0.16 | -0.84 | 0.52 | 1.61 | 0.19 | -0.92 | 0.88 |
| 25 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 | NM_024893 | Homo<br>sapiens<br>hypothetical<br>protein<br>FLJ14220<br>(FLJ14220),<br>mRNA.<br>/PROD=hypo<br>thetical<br>protein<br>FLJ14220<br>/FL=gb:NM_<br>024893.1   | C20orf39 | 1.16 | 0.29 | -0.56 | 0.42 | 2.36 | 0.15 | -0.06 | 0.17 |
| 50 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 | NM_022034 | Homo<br>sapiens<br>estrogen<br>regulated<br>gene 1<br>(ERG-1),  | CUZD1    | 1.31 | 0.08 | 0.80  | 0.28 | 2.78 | 0.07 | 0.24  | 0.58 |
| 65 |           |   |          |      |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | mRNA,<br>/PROD=estr<br>ogen<br>regulated<br>gene 1<br>/FL=gb:AF30  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | 5835.1<br>gb:NM_0220<br>34.1   |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 | NM_014788 | Homo sapiens<br>TRIM14   | 3.12  | 0.09 | 1.22  | 0.59 | 3.54 | 0.08 | 1.02  | 0.45 |
| 20 |           | KIAA0129<br>gene product<br>(KIAA0129),<br>mRNA,<br>/PROD=KIA<br>A0129 gene<br>product<br>/FL=gb:D509                                      |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |           | 19.1<br>gb:NM_0147<br>88.1   |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 | AV646597  | ESTs,<br>Weakly<br>similar to<br>ALU7_HUM<br>AN ALU<br>SUBFAMILY<br>SQ<br>SEQUENCE<br>CONTAMIN<br>ATION<br>WARNING<br>ENTRY<br>(H.sapiens) | -0.77 | 0.18 | 0.06  | 1.55 | 3.78 | 0.25 | 2.28  | 0.98 |
| 35 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 | BF062629  | DKFZP586E<br>1621 protein<br>TMEM158   | 4.00  | 0.19 | 2.41  | 0.27 | 4.87 | 0.00 | 1.93  | 0.19 |
| 55 | AW440492  | ATPase,<br>Na+K+<br>transporting,<br>alpha 2 (+)<br>polypeptide<br>/FL=gb:NM_  | 1.33  | 0.07 | -2.12 | 1.07 | 1.27 | 0.06 | -0.53 | 0.11 |
| 60 | AF283777  | Homo sapiens<br>clone<br>TCBAP0702<br>mRNA   | -0.08 | 0.45 | -1.88 | 1.19 | 0.41 | 0.24 | -1.42 | 1.13 |
| 65 |           |  |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
|----|-----------|--|----------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
|    |           | sequence.  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 5  | NM_005375 | Homo sapiens v-myb avian myeloblastos  | MYB      | 2.11 | 0.17 | -0.52 | 0.18 | 2.24 | 0.03 | 0.10 | 0.08 |
| 10 |           | is viral oncogene homolog (MYB), mRNA.   |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 15 |           | /PROD=v-myb avian myeloblastos   |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 20 |           | is viral oncogeneho  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 25 |           | molog /FL=gb:NM_005375.1   |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:AF10486.3.1   |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
|    |           | gb:M15024.1  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 30 | NM_017671 | Homo sapiens hypothetical protein  | C20orf42 | 3.19 | 0.12 | 0.97  | 0.70 | 3.26 | 0.07 | 0.16 | 0.94 |
| 35 |           | FLJ20116 (FLJ20116), mRNA.   |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 40 |           | /PROD=hypothetical protein   |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 45 | BG283790  | ESTs   | MATR3    | 2.27 | 0.11 | 0.95  | 0.57 | 3.53 | 0.04 | 0.89 | 0.51 |
|    | NM_000702 | Homo sapiens ATPase, Na+K+ transporting, alpha 2 (+) polypeptide (ATP1A2), mRNA. | ATP1A2   | 2.12 | 0.17 | 0.76  | 0.38 | 2.93 | 0.16 | 0.51 | 0.12 |
| 50 |           | /PROD=ATPase, Na+K+ transporting, alpha 2 (+)polypeptid                          |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 55 |           |  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 60 |           |  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |
| 65 |           |  |          |      |      |       |      |      |      |      |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|---------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|    |           | e   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_000702.1  |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 5  | NM_025135 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ22297 (KIAA1695), mRNA.                                  | FHOD3   | 1.02 | 0.18 | 0.80  | 0.40 | 2.34 | 0.10 | -0.77 | 0.72 |
| 10 |           | /PROD=hypothetical protein KIAA1695   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | /FL=gb:NM_025135.1  |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_012281 | Homo sapiens potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2 (KCND2), mRNA. | KCND2   | 1.67 | 0.30 | 0.05  | 0.15 | 2.70 | 0.09 | -0.26 | 0.38 |
| 25 |           | /PROD=potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2                       |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | /FL=gb:NM_012281.1  |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | gb:AB028967.1   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           | gb:AF121104.1   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 | BF449063  | collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)   | COL14A1 | 1.61 | 0.15 | 0.30  | 0.38 | 2.68 | 0.17 | -0.33 | 0.68 |
| 50 | AA280904  | ESTs  | C9orf39 | 0.23 | 0.21 | -1.58 | 1.26 | 1.13 | 0.14 | -0.78 | 0.42 |
| 55 | NM_022467 | Homo sapiens N-   | CHST8   | 2.11 | 0.20 | -0.51 | 0.30 | 2.17 | 0.10 | 0.48  | 0.02 |
| 60 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |   |         |      |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|------|-------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
|    | BE468066  | ESTs | RMST  | 3.26 | 0.09 | 1.49  | 0.10 | 3.80 | 0.09 | 1.63  | 0.08 |
| 25 | AL120674  | ESTs | -     | 1.00 | 0.11 | -1.35 | 1.73 | 1.55 | 0.15 | -2.20 | 0.86 |
|    | NM_133329 | Homo | KCNG3 | 2.18 | 0.27 | 0.74  | 0.29 | 3.67 | 0.01 | 0.26  | 0.28 |
| 30 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |      |       |      |      |       |      |      |      |       |      |
|    | AI742043  | ESTs | -     | 0.94 | 0.34 | -0.76 | 0.37 | 1.77 | 0.10 | -1.45 | 0.52 |
| 65 | NM_005103 | Homo | FEZ1  | 2.80 | 0.11 | 2.08  | 0.25 | 4.98 | 0.06 | 2.20  | 0.26 |

|    |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|-----------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 | NM_000277 | Homo sapiens phenylalanine hydroxylase (PAH), mRNA. /PROD=zyginn 1, isoform 1 /FL=gb:U60060.1 gb:U69139.1 gb:NM_005103.2 | PAH       | 0.65 | 0.11 | -1.08 | 0.08 | 1.46 | 0.18 | -0.42 | 0.12 |
| 30 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 | BF698797  | ESTs   | -         | 0.93 | 0.10 | -0.74 | 0.11 | 2.07 | 0.10 | -0.40 | 0.44 |
|    | BF437747  | ESTs,  | C20orf118 | 4.26 | 0.07 | 1.99  | 0.45 | 4.57 | 0.09 | 1.75  | 0.39 |
| 50 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 | NM_003020 | Homo sapiens secretory granule,  | SCG5      | 4.03 | 0.14 | 2.53  | 0.32 | 5.01 | 0.12 | 3.11  | 0.24 |

|    |           |   |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|---|-----------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           | neuroendocrine protein 1 (7B2 protein) (SGNE1), mRNA.   |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | /PROD=secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2protein) /FL=gb:BC005349.1                              |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | gb:NM_003020.1  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_002800 | Homo sapiens  | PSMB9     | 1.38 | 0.10 | 0.27  | 0.34 | 2.05 | 0.07 | -1.43 | 1.14 |
| 25 |           | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2) (PSMB9), mRNA.       |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | /PROD=proteasome (prosome, macropain) subunit, betatype, 9 (large multifunctional protease 2) /FL=gb:U01025.1 |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | gb:NM_002800.1  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 | BE972639  | ESTs  | LOC646326 | 0.00 | 0.15 | -2.71 | 0.55 | 0.33 | 0.22 | -2.24 | 0.61 |
| 45 | BC044830  | Homo sapiens,   | C10orf96  | 1.38 | 0.12 | -0.32 | 0.82 | 2.28 | 0.06 | -1.39 | 0.90 |
| 50 |           | Similar to RIKEN cDNA 1700011F14 gene, clone MGC:35062  |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           |   |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |   |           |      |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |   |           |      |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |              |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--------------|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |           |              |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | IMAGE:5166   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 167, mRNA,   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | complete     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | cds.         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /PROD=Simil  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 10 |           | ar to RIKEN  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | cDNA         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 1700011F14   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gene         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | /FL=gb:BC04  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 4830.1       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | AI961231  | KIAA0808     | TOX    | 3.28  | 0.13 | 1.23  | 0.06 | 4.00 | 0.01 | 1.13  | 0.37 |
|    |           | gene product |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 |           | /FL=gb:AB01  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 8351.1       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0147   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 29.1         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 | U17496    | Human        | PSMB8  | 3.43  | 0.21 | 0.46  | 1.17 | 3.30 | 0.06 | 0.09  | 0.64 |
|    |           | proteasome   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | subunit      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | LMP7 (allele |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           | LMP7B)       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA,        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | complete     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | cds.         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | /PROD=prot   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | eamosome     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | subunit      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | LMP7         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           | /FL=gb:U174  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 97.1         |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:U17496.1  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | N23651    | ESTs         | SDK2   | -1.16 | 0.31 | -2.65 | 0.42 | 1.27 | 0.09 | -2.07 | 0.75 |
| 45 | NM_007015 | Homo         | LECT1  | 4.83  | 0.12 | 2.27  | 0.84 | 5.36 | 0.09 | 1.83  | 0.69 |
|    |           | sapiens      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | chondromod   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | ulin I       |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           | precursor    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | (CHM-I),     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | mRNA.        |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           | /PROD=chon   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | dromodulin I |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | precursor    |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:NM_   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           | 007015.1     |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | gb:AB00600   |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |           | 0.1          |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    | NM_015474 | Homo         | SAMHD1 | 2.63  | 0.17 | 0.57  | 0.33 | 2.89 | 0.09 | 0.29  | 0.22 |
| 65 |           | sapiens      |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  |           | DKFZP564A  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 032 protein  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | (DKFZP564  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | A032),   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | mRNA.  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 10 |           | /PROD=DKF  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | ZP564A032  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | protein  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | /FL=gb:AF22  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | 8421.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:AL05026   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 7.1  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:AB01384   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | 7.1  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0154   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 74.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 | AF147427  | Homo sapiens full length insert cDNA clone YP80A10.      | SAMHD1 | 1.33  | 0.03 | -0.99 | 0.88 | 1.35  | 0.08 | -2.30 | 0.97 |
| 30 | NM_004688 | Homo sapiens N-myc (and STAT) interactor (NMI), mRNA.    | NMI    | 3.54  | 0.04 | 0.96  | 0.07 | 3.80  | 0.07 | 1.13  | 0.34 |
| 35 |           | /PROD=N-myc and STAT interactor                          |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           | /FL=gb:BC00  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           | 1268.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | gb:NM_0046   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
|    |           | 88.1   |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 | AB040812  | gb:U32849.1  | PAK7   | -1.37 | 0.60 | -3.89 | 1.62 | -0.49 | 0.07 | -4.18 | 0.12 |
| 55 |           | Homo sapiens mRNA for protein kinase PAK5, complete cds. |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           | /PROD=protein kinase PAK5                                |        |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           | /FL=gb:AB04  |        |       |      |       |      |       |      |       |      |

|    |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|--------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | AI985987  | 0812.1<br>ESTs,<br>Moderately<br>similar to<br>ALU1_HUM<br>AN ALU<br>SUBFAMILY<br>J<br>SEQUENCE<br>CONTAMIN<br>ATION<br>WARNING<br>ENTRY<br>(H.sapiens)  | SCNN1G | -0.28 | 0.31 | -0.99 | 0.35 | 0.12 | 0.19 | -2.70 | 0.59 |
| 10 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | NM_001877 | Homo<br>sapiens<br>complement<br>component<br>(3dEpstein<br>Barr virus)<br>receptor 2<br>(CR2),<br>mRNA.<br>/PROD=com<br>plement<br>component<br>(3dEpstein<br>Barr<br>virus)recepto<br>r 2<br>/FL=gb:NM_<br>001877.1<br>gb:M26004.1 | CR2    | 1.50  | 0.13 | -0.43 | 1.05 | 2.35 | 0.14 | -1.44 | 1.51 |
| 25 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 | NM_001351 | Homo<br>sapiens<br>deleted in<br>azoospermia<br>-like (DAZL),<br>mRNA.<br>/PROD=delet<br>ed in<br>azoospermia<br>-like<br>/FL=gb:U667<br>26.2<br>gb:NM_0013<br>51.1<br>gb:U65918.1<br>gb:U66078.1                                    | DAZL   | 1.69  | 0.24 | -0.81 | 0.76 | 1.93 | 0.12 | -0.73 | 0.06 |
| 50 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |           |  |        |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | NM_022168 | Homo sapiens melanoma differentiation associated protein-5 (MDA5), mRNA. /PROD=melanoma differentiation associated protein-5  | IFIH1     | -2.03 | 1.08 | -2.76 | 0.83 | -0.10 | 0.15 | -2.15 | 0.40 |
| 10 |           | /FL=gb:AY017378.1   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 15 |           | gb:NM_022168.1  |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 20 |           | gb:AF095844.1   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 25 | AF052108  | Homo sapiens clone 23687 mRNA sequence.   | LOC157627 | 1.49  | 0.33 | 0.22  | 1.02 | 2.26  | 0.40 | -1.33 | 1.19 |
| 30 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 35 | AI056877  | Human DNA sequence from clone RP4-530H15 on chromosome 20. Contains the 3' end of the PTPN1 gene for protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (EC 3.1.3.48), the gene for a novel protein similar to placental protein DIFF40, an RPL36 (60S Ribos | LOC200230 | 0.11  | 0.30 | -2.37 | 0.94 | 1.15  | 0.18 | -1.35 | 0.75 |
| 40 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |

ES 2 537 578 T3

|    |           |  |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|-----------|--|---------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  | NM_002522 | Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA.                     | NPTX1   | 2.35  | 0.25 | -0.48 | 0.19 | 2.17 | 0.09 | -1.19 | 0.83 |
| 10 |           | /PROD=neuronal pentraxin I precursor                                 |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |           | /FL=gb:NM_002522.1 gb:U61849.1                                       |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 | N21096    | ESTs   | STXBP6  | 2.42  | 0.16 | 0.99  | 0.08 | 3.69 | 0.09 | 1.14  | 0.04 |
|    | AI693516  | ESTs   | COL14A1 | 0.39  | 0.23 | -1.63 | 0.96 | 0.96 | 0.17 | -1.81 | 0.67 |
| 25 | NM_018043 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ10261 (FLJ10261), mRNA.         | TMEM16A | -0.90 | 0.37 | -1.93 | 0.70 | 0.25 | 0.43 | -3.93 | 0.49 |
| 30 |           | /PROD=hypothetical protein FLJ10261                                  |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 35 |           | /FL=gb:NM_018043.1   |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 | AF110400  | Homo sapiens fibroblast growth factor 19 (FGF19) mRNA, complete cds. | FGF19   | 2.12  | 0.14 | -0.08 | 0.34 | 2.18 | 0.04 | -0.91 | 0.18 |
| 45 |           | /PROD=fibroblast growth factor 19                                    |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |           | /FL=gb:AF110400.1 gb:NM_005117.1 gb:AB018122.1                       |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 55 |           |  |         |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 | AK098525  | Homo sapiens cDNA FLJ25659   | HHIP    | 1.76  | 0.14 | -0.57 | 0.63 | 3.32 | 0.06 | -0.11 | 0.15 |
| 65 |           |  |         |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
|----|--|-----------|---------------------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| 5  |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
|    |  | AV715309  | ESTs, C20orf118     | 4.28  | 0.13 | 1.89  | 0.39 | 4.76 | 0.10 | 1.48  | 0.42 |
| 10 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 15 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 20 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 25 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 30 |  | U96136    | Homo sapiens CTNND2 | 0.78  | 0.11 | -1.33 | 0.87 | 1.18 | 0.12 | -1.17 | 0.67 |
| 35 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 40 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 45 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 50 |  | NM_002590 | Homo sapiens PCDH8  | -0.80 | 0.34 | -0.83 | 0.82 | 2.18 | 0.02 | 0.12  | 0.33 |
| 55 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 60 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |
| 65 |  |           |                     |       |      |       |      |      |      |       |      |

|    |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-----------|---|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 5  | AF107846  | 3.2<br>Homo sapiens<br>neuroendocrine-specific<br>Golgi protein p55<br>(XLalphas)<br>gene, exon XL2 and complete cds          | -         | 0.44  | 0.20 | -0.25 | 0.12 | 2.12  | 0.14 | -2.56 | 0.81 |
| 10 | BG169832  | adenylate kinase 5<br>/FL=gb:NM_012093.1<br>gb:AF062595.1   | AK5       | 0.62  | 0.36 | -2.79 | 0.50 | 1.03  | 0.36 | -1.94 | 0.32 |
| 15 | BE968806  | ESTs, Weakly similar to<br>ALU4_HUMAN<br>AN ALU SUBFAMILY<br>SB2<br>SEQUENCE CONTAMINATION<br>WARNING<br>ENTRY<br>(H.sapiens) | ATP5S     | -1.15 | 0.14 | -3.03 | 0.71 | -0.34 | 0.15 | -4.73 | 0.74 |
| 20 | BU729850  | hypothetical protein<br>LOC153469   | JAKMIP2   | 2.30  | 0.07 | 0.43  | 1.78 | 3.86  | 0.04 | -1.56 | 1.92 |
| 25 | AL832535  | Homo sapiens<br>mRNA;<br>cDNA<br>DKFZp547J1816 (from<br>clone<br>DKFZp547J1816).  | LOC157627 | 2.25  | 0.18 | -0.04 | 1.00 | 3.14  | 0.25 | -1.50 | 1.19 |
| 30 | NM_000439 | Homo sapiens<br>proprotein convertase<br>subtilisin/kexin type 1<br>(PCSK1),  | PCSK1     | -0.63 | 0.18 | -2.68 | 0.53 | 0.69  | 0.30 | -3.19 | 1.03 |
| 35 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 40 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 45 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 50 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 55 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 60 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |
| 65 |           |   |           |       |      |       |      |       |      |       |      |



**TABLA V: EXPRESIÓN RELATIVA DE MARCADORES ENDODÉRMICOS DEFINITIVOS PARA LAS CONDICIONES MARCADAS EN EJEMPLO 10. TODOS LOS VALORES FUERAN NORMALIZADOS PARA EL GRUPO 1 (CONTROL)**

5

10

15

20

25

|                   | Sox17 | CXCR4 | Goosecoid | HNF-3B | SOX-2 | Oct-4 |
|-------------------|-------|-------|-----------|--------|-------|-------|
| Grupo 1 – control | 1     | 1     | 1         | 1      | 1     | 1     |
| Grupo 2           | 45    | 19.5  | 2.8       | 0.64   | 0.91  | 1.1   |
| Grupo 3           | 45    | 30    | 2.9       | 0.74   | 0.70  | 0.76  |
| Grupo 4           | 8     | 14    | 2.7       | 1.11   | 0.18  | 0.36  |
| Grupo 5           | 23    | 16    | 3.1       | 1.76   | 0.16  | 0.41  |
| Grupo 6           | 41    | 5.8   | 3.0       | 1.87   | 0.61  | 0.57  |
| Grupo 7           | 25    | 19.5  | 2.7       | 0.62   | 0.34  | 0.48  |
| Grupo 8           | 6     | 15.9  | 2.9       | 2.0    | 0.13  | 0.43  |
| Grupo 9           | 1     | 1.4   | 0.9       | 0.89   | 1.2   | 0.85  |
| Grupo 10          | 22    | 1.5   | 1.4       | 1.20   | 1.36  | 0.68  |
| Grupo 11          | 54    | 23    | 2.5       | 0.71   | 0.66  | 0.65  |
| Grupo 12          | 68    | 0.7   | 0.9       | 1.51   | 0.02  | 0.30  |
| Grupo 13          | 13.9  | 12.7  | 3.0       | 2.1    | 0.11  | 0.30  |
| Grupo 14          | 52.6  | 20.6  | 2.9       | 0.82   | 0.69  | 0.70  |
| Grupo 15          | 68    | 27.7  | 2.9       | 0.68   | 0.68  | 0.85  |
| Grupo 16          | 13.9  | 21    | 2.4       | 0.79   | 0.46  | 0.72  |
| Grupo 17          | 52    | 14.9  | 3.5       | 2.12   | 0.22  | 0.44  |

**TABLA VI: VALORES MÉDIOS NORMALIZADOS DE INTENSIDAD (EN FOMATO LOG) DE GENES PARA CÉLULAS MADRES EMBRIONÁRIAS H9 DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE ENDODÉRMICAS DEFINITIVAS CULTIVADAS EN MADRIGEL™ O MEFS +/- WNT-3A.**

30

35

40

45

50

55

60

65

| Título de Gen  | Tratamiento DE en serum + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum + AA +Wnt-3 <sup>a</sup> en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|--|--|--|--------------------------------------|------------------------------|
| ESTs   | -4.82708                                 | 2.63968  | -4.26995                             | 8.62E-05                     |
| microfibrillar-associated protein 4  | 0.063791                                 | 5.16358  | -0.60091                             | 3.48E-03                     |
| Homo sapiens, alpha-1 (VI) collagen  | -3.66187                                 | 2.36459  | -2.26934                             | 1.45E-04                     |
| ESTs   | -3.43712                                 | 2.14508  | -2.6475                              | 0.00E+00                     |
| Homo sapiens cystatin SN (CST1), mRNA. /PROD=cystatin SN /FL=gb:J03870.1 gb:NM_001898.1  | 0.072931                                 | 7.53908  | 4.63955                              | 4.46E-03                     |
| solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 /FL=gb:U81800.1 gb:NM_004207.1   | -0.066405                                | 5.23572  | 0.279005                             | 4.27E-04                     |
| Homo sapiens fibroblast growth factor 17 (FGF17), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 17 /FL=gb:NM_003867.1 gb:AB009249.1   | -0.894644                                | 5.75417  | 2.4872                               | 4.93E-03                     |
| Human linkprotein mRNA, complete cds. /PROD=link protein /FL=gb:NM_001884.1 gb:U43328.1  | -1.93991                                 | 3.31348  | -1.26346                             | 1.14E-02                     |
| Homo sapiens solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (SLC16A3), mRNA. /PROD=solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 /FL=gb:U81800.1 gb:NM_004207.1 | 0.710321                                 | 6.12971  | 1.72403                              | 0.00E+00                     |
| Homo sapiens apolipoprotein A-I (APOA1), mRNA. /PROD=apolipoprotein A-I precursor /FL=gb:M27875.1 gb:M11791.1 gb:NM_000039.1 gb:BC005380.1   | -1.47073                                 | 5.37558  | 2.46891                              | 5.07E-03                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens cytidine deaminase (CDA), mRNA. /PROD=cytidine deaminase /FL=gb:L27943.1 gb:NM_001785.1   | -3.89129                                      | 2.05822   | -1.67035                                  | 2.23E-03                     |
| 15 | ESTs, Moderately similar to JE0284 Mm-1 cell derived transplantability-associated protein 1b (H.sapiens) ESTs  | -2.37712                                      | 5.75671   | 4.22227                                   | 2.56E-02                     |
|    | glycophorin B (includes Ss blood group)  | -0.04716                                      | 5.28231   | 0.966974                                  | 0.00E+00                     |
|    | Homo sapiens homeobox protein goosecoid mRNA, complete cds. /PROD=homeobox protein goosecoid /FL=gb:AY177407.1 gb:NM_173849.1  | -2.85201                                      | 3.32812   | -0.12969                                  | 1.45E-04                     |
| 20 | MCP-1=monocyte chemotactic protein (human, aortic endothelial cells, mRNA, 661 nt). /PROD=MCP-1  | -4.42042                                      | 3.55326   | 1.89424                                   | 2.50E-02                     |
| 25 | Homo sapiens Mix-like homeobox protein 1 (MILD1) mRNA, complete cds. /PROD=Mix-like homeobox protein 1 /FL=gb:AF211891.1   | -2.27571                                      | 5.13499   | 2.95543                                   | 2.92E-02                     |
|    | ESTs   | -1.54648                                      | 4.47601   | 0.921971                                  | 2.01E-02                     |
| 30 | Homo sapiens lumican (LUM), mRNA. /PROD=lumican /FL=gb:NM_002345.1 gb:U18728.1 gb:U21128.1   | -4.93603                                      | 2.17917   | -0.23735                                  | 1.12E-04                     |
|    | Homo sapiens HNF-3beta mRNA for hepatocyte nuclear factor-3 beta, complete cds. /PROD=hepatocyte nuclear factor-3 beta /FL=gb:AB028021.1 gb:NM_021784.1  | -4.05726                                      | 3.21064   | 0.948822                                  | 3.39E-02                     |
| 35 | Homo sapiens reserved (KCNK12), mRNA. /PROD=tandem pore domain potassium channel THIK-2 /FL=gb:NM_022055.1 gb:AF287302.1   | -2.71785                                      | 4.68666   | 2.82506                                   | 3.71E-02                     |
| 40 | Homo sapiens atrophin-1 interacting protein 1; activin receptor interacting protein 1 (KIAA0705), mRNA. /PROD=atrophin-1 interacting protein 1; activinreceptor interacting protein 1 /FL=gb:NM_012301.1 gb:AF038563.1 | -0.468745                                     | 6.28184   | 3.77969                                   | 1.97E-02                     |
| 45 | ESTs   | -4.30828                                      | 1.80825   | -1.32021                                  | 9.63E-03                     |
| 50 | Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD) (GAD1), transcript variant GAD25, mRNA. /PROD=glutamate decarboxylase 1, isoform GAD25/FL=gb:NM_013445.1 gb:AF178853.1 gb:BC002815.1                              | -2.33636                                      | 2.25176   | -2.32124                                  | 5.26E-04                     |
| 55 | Homo sapiens cardiac ventricular troponin C mRNA, complete cds. /PROD=cardiac ventricular troponin C /FL=gb:NM_003280.1 gb:AF020769.1  | -2.424  | 2.31908   | -1.87965                                  | 4.07E-04                     |
|    | ESTs   | -0.549728                                     | 4.89072   | 1.4377                                    | 2.99E-03                     |
| 60 | Homo sapiens fibroblast growth factor 8 (androgen-induced) (FGF8), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 8 (androgen-induced) /FL=gb:U36223.1 gb:U46212.1 gb:NM_006119.1  | -2.89554                                      | 3.42817   | 0.926036                                  | 2.62E-02                     |
|    | ESTs   | -4.32791                                      | 2.19561   | 0.015827                                  | 5.91 E-03                    |
| 65 |  | -3.09818                                      | 1.66254   | -2.20564                                  | 8.62E-05                     |

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens haptoglobin-related protein (HPR), mRNA. /PROD=haptoglobin-related protein /FL=gb:NM_020995.1   | -2.6068                                       | 2.38009   | -1.19632                                  | 6.95E-03                     |
|    | collagen, type VI, alpha 1   | -1.418  | 3.85952   | 0.604245                                  | 1.21E-02                     |
| 15 | Human (clone 8B1) Br-cadherin mRNA, complete cds. /PROD=Br-cadherin /FL=gb:L34057.1 gb:L33477.1 gb:NM_004061.1   | -2.17941                                      | 2.59894   | -1.02624                                  | 1.24E-02                     |
|    | ESTs   | -1.40092                                      | 2.57297   | -1.82509                                  | 1.45E-04                     |
| 20 | Homo sapiens cystatin SA (CST2), mRNA. /PROD=cystatin SA /FL=gb:NM_001322.1  | -0.102178                                     | 5.21645   | 2.1671                                    | 2.40E-02                     |
|    | Human mRNA for apolipoprotein AI (apo AI)=. /PROD=preproapolipoprotein AI  | 0.215086                                      | 5.51109   | 2.49684                                   | 9.57E-03                     |
| 25 | Homo sapiens MLL septin-like fusion (MSF), mRNA. /PROD=MLL septin-like fusion /FL=gb:AF123052.1 gb:NM_006640.1   | -3.29221                                      | 1.70902   | -1.49951                                  | 2.25E-03                     |
|    | Homo sapiens cystatin S (CST4), mRNA. /PROD=cystatin S /FL=gb:NM_001899.1  | 0.92448                                       | 6.48842   | 3.87036                                   | 7.20E-03                     |
| 30 | Homo sapiens phorbolin-like protein MDS019 (MDS019), mRNA. /PROD=phorbolin-like protein MDS019 /FL=gb:AF182420.1 gb:NM_021822.1  | -1.11883                                      | 4.73391   | 2.40782                                   | 7.86E-03                     |
|    | Homo sapiens apolipoprotein A-II (APOA2), mRNA. /PROD=apolipoprotein A-II precursor /FL=gb:M29882.1 gb:NM_001643.1 gb:BC005282.1   | -1.03333                                      | 5.80468   | 4.46856                                   | 3.23E-02                     |
| 35 | ESTs   | -1.55475                                      | 3.48278   | 0.420447                                  | 2.50E-02                     |
|    | Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD) (GAD1), transcript variant GAD67, mRNA. /PROD=glutamate decarboxylase 1, isoform GAD67 /FL=gb:NM_000817.1 gb:M81883.1 gb:L16888.1 | -3.86752                                      | 1.56384   | -1.08675                                  | 2.52E-02                     |
| 40 | ESTs   | -0.731491                                     | 5.43249   | 3.52168                                   | 1.60E-02                     |
|    | ESTs   | -2.03591                                      | 3.38924   | 0.760984                                  | 2.34E-03                     |
| 45 | Homo sapiens retinoid X receptor, gamma (RXRG), mRNA. /PROD=retinoid X receptor, gamma /FL=gb:NM_006917.1 gb:U38480.1  | -2.37496                                      | 2.62934   | -0.32035                                  | 8.83E-04                     |
|    | ESTs   | -0.648552                                     | 4.30576   | 1.43266                                   | 2.19E-03                     |
| 50 | Homo sapiens cDNA FLJ11550 fis, clone HEMBA1002970   | -1.22228                                      | 5.37746   | 4.21644                                   | 1.68E-02                     |
|    | ESTs   | -1.782  | 3.50391   | 1.0501                                    | 1.85E-02                     |
|    | Homo sapiens haptoglobin (HP), mRNA. /PROD=haptoglobin /FL=gb:K00422.1 gb:L29394.1 gb:NM_005143.1  | -1.10114                                      | 3.5449  | 0.477027                                  | 8.13E-03                     |
| 55 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ10970 (FLJ10970), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ10970 /FL=gb:NM_018286.1  | -0.431989                                     | 5.14497   | 3.02045                                   | 2.62E-02                     |
| 60 | Homo sapiens beta-site APP cleaving enzyme (BACE) mRNA, complete cds. /PROD=beta-site APP cleaving enzyme /FL=gb:AF200343.1 gb:AF204943.1  | -2.0354                                       | 3.70648   | 1.75385                                   | 8.00E-03                     |
| 65 | gb:AF190725.1 gb:AF201468.1 gb:NM_012104.1   |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

| 5  | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 10 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ22252 similar to SRY-box containing gene 17 (FLJ22252), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ22252 similar to SRY-box containing gene 17 /FL=gb:NM_022454.1  | 1.36784                                       | 6.82571   | 4.5979                                    | 2.10E-02                     |
| 15 | Cluster Incl. AB028021:Homo sapiens HNF-3beta mRNA for hepatocyte nuclear factor-3 beta, complete cds /cds=(196,1569) /gb=AB028021 /gi=4958949 /ug=Hs.155651 /len=1944   | -1.5339                                       | 5.12418   | 4.11704                                   | 4.47E-02                     |
| 20 | Homo sapiens gastrin-releasing peptide (GRP), mRNA. /PROD=gastrin-releasing peptide /FL=gb:NM_002091.1 gb:K02054.1 gb:BC004488.1   | -2.74071                                      | 2.70077   | 0.509757                                  | 2.49E-04                     |
| 25 | Homo sapiens sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A (SEMA5A), mRNA. /PROD=sema domain, seven thrombospondin repeats (type1 and type 1-like), transmem | -1.53335                                      | 3.78503   | 1.48732                                   | 4.71E-02                     |
| 30 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586J0624 (from clone DKFZp586J0624); complete cds. /PROD=hypothetical protein /FL=gb:AF215636.1 gb:NM_014585.1 gb:AF231121.1 gb:AF226614.1 gb:AL136944.1  | -0.835182                                     | 5.22406   | 3.69882                                   | 2.08E-02                     |
| 35 | Human mRNA for alpha-1 type II collagen.   | -2.8736                                       | 2.155   | -0.38021                                  | 5.70E-03                     |
|    | Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha   | -1.54385                                      | 1.7147  | -2.58241                                  | 1.71E-02                     |
|    | neuropilin 1 /FL=gb:AF016050.1 gb:NM_003873.1 gb:AF018956.1  | -1.62253                                      | 1.95432   | -1.9667                                   | 8.83E-04                     |
| 40 | Human DNA sequence from clone RP1-181C24 on chromosome 6p11.1-12.2. Contains the 3 end of the BMP5 gene for bone morphogenetic protein 5, ESTs, STSs and GSSs /FL=gb:M60314.1 gb:NM_021073.1   | -3.72313                                      | 1.68755   | -0.37308                                  | 1.38E-03                     |
| 45 | myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS, 80K-L) /FL=gb:M68956.1 gb:D10522.1 gb:NM_002356.4   | -0.71724                                      | 3.51728   | 0.335725                                  | 4.29E-03                     |
| 50 | hypothetical protein FLJ23403 /FL=gb:NM_022068.1 hepatocyte nuclear factor 4, alpha  | -1.45618                                      | 1.81423   | -2.31327                                  | 1.20E-02                     |
|    | Homo sapiens cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homologue of L1) (CHL1), mRNA. /PROD=cell adhesion molecule with homology to L1CAM(close homologue of L1)/FL=gb:AF002246.1   | -4.26574                                      | 1.7879  | 0.445241                                  | 3.25E-02                     |
| 55 | gb:NM_006614.1 matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) /FL=gb:U41078.1 gb:NM_004995.2  | -0.541188                                     | 2.1751  | -2.5002                                   | 1.16E-03                     |
|    | Homo sapiens glycophorin B (includes Ss blood group) (GYPB), mRNA. /PROD=glycophorin B precursor /FL=gb:J02982.1 gb:NM_002100.2  | -2.05734                                      | 2.36236   | -0.5185                                   | 1.66E-02                     |
| 60 | WAS protein family, member 2 /FL=gb:NM_006990.1 gb:AB026542.1  | -0.947308                                     | 3.26089   | 0.180293                                  | 4.83E-04                     |
| 65 |  | -2.18746                                      | 1.99129   | -1.05968                                  | 4.00E-03                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens frizzled-related protein (FRZB), mRNA. /PROD=frizzled-related protein /FL=gb:U24163.1 gb:U68057.1 gb:NM_001463.1 gb:U91903.1  | 0.56502                                       | 5.7261  | 3.67629                                   | 1.75E-02                     |
| 15 | Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD) (GAD1), transcript variant GAD25, mRNA. /PROD=glutamate decarboxylase 1, isoform GAD25/FL=gb:NM_013445.1 gb:AF178853.1 gb:BC002815.1  | -1.68495                                      | 2.27067   | -0.96944                                  | 8.02E-03                     |
| 20 | ESTs   | 0.812766                                      | 5.93144   | 3.91314                                   | 4.15E-02                     |
| 20 | Homo sapiens clone 23736 mRNA sequence   | -0.047182                                     | 5.79006   | 4.50744                                   | 1.74E-02                     |
| 25 | Homo sapiens glycophorin E (GYPE), mRNA. /PROD=glycophorin E /FL=gb:NM_002102.1 gb:M29610.1  | -2.01601                                      | 1.79002   | -1.50134                                  | 1.97E-02                     |
| 25 | ESTs   | 1.06767                                       | 5.63319   | 3.12487                                   | 2.00E-02                     |
| 25 | ESTs   | -1.41162                                      | 2.5396  | -0.57029                                  | 1.29E-02                     |
| 25 | Human Fritz mRNA, complete cds. /PROD=Fritz /FL=gb:U24163.1 gb:U68057.1 gb:NM_001463.1 gb:U91903.1   | 0.436589                                      | 5.69814   | 3.91514                                   | 1.99E-02                     |
| 30 | Homo sapiens, clone MGC:4655, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:4655) /FL=gb:BC004908.1   | 2.3772  | 5.9184  | 2.47596                                   | 1.20E-02                     |
| 35 | KIAA0878 protein /FL=gb:NM_014899.1 gb:AB020685.1  | 1.1189  | 6.41747   | 4.78882                                   | 2.01E-02                     |
| 40 | Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E (SEMA3E), mRNA. /PROD=sema domain, immunoglobulin domain (Ig), shortbasic domain, secreted, (semaphorin) 3E /FL=gb:NM_012431.1 gb:AB002329.1 | -0.785987                                     | 3.69668   | 1.27624                                   | 2.10E-02                     |
| 45 | ESTs   | 1.48084                                       | 6.59709   | 4.81395                                   | 1.36E-02                     |
| 45 | noggin /FL=gb:NM_005450.1  | -1.63627                                      | 3.28161   | 1.32958                                   | 2.53E-02                     |
| 50 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ11316 (FLJ11316), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ11316 /FL=gb:NM_018388.1  | -0.904749                                     | 3.35854   | 0.755319                                  | 1.12E-04                     |
| 50 | Homo sapiens angiopoietin 2 (ANGPT2), mRNA. /PROD=angiopoietin 2 /FL=gb:AB009865.1 gb:AF004327.1 gb:NM_001147.1  | -2.93044                                      | 2.23779   | 0.59685                                   | 3.43E-02                     |
| 55 | Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP14), mRNA. /PROD=matrix metalloproteinase 14 preproprotein /FL=gb:U41078.1  | -0.723489                                     | 2.97262   | -0.09689                                  | 5.44E-03                     |
| 60 | gb:NM_004995.2 G protein-coupled receptor  | 1.50709                                       | 6.65228   | 5.05327                                   | 2.00E-02                     |
| 60 | collagen, type IX, alpha 2 /FL=gb:NM_001852.1  | 1.27026                                       | 5.4659  | 2.93507                                   | 3.19E-03                     |
| 60 | ESTs   | 0.521638                                      | 3.93176   | 0.620223                                  | 0.00E+00                     |
| 65 | KIAA1462 protein   | -3.84563                                      | 1.65452   | 0.437064                                  | 3.27E-02                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|     | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|-----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5   |  |   |   |   |                              |
| 10  | Homo sapiens cartilage linking protein 1 (CRTL1), mRNA. /PROD=cartilage linking protein 1 /FL=gb:NM_001884.1 gb:U43328.1   | -1.31515                                      | 2.27271   | -0.80521                                  | 2.22E-02                     |
| 15  | Homo sapiens solute carrier family 21 (prostaglandin transporter), member 2 (SLC21A2), mRNA. /PROD=solute carrier family 21 (prostaglandin transporter), member 2 /FL=gb:U70867.1 gb:NM_005630.1 | 0.711428                                      | 4.89808   | 2.43304                                   | 6.84E-03                     |
| 20  | ESTs   | 0.307173                                      | 4.78515   | 2.65653                                   | 1.72E-02                     |
| 25  | 6-phosphofructo-2-kinasefructose-2,6-biphosphatase 4   | -0.242865                                     | 3.97929   | 1.59985                                   | 5.28E-03                     |
| 30  | Homo sapiens dual specificity phosphatase 4 (DUSP4), mRNA. /PROD=dual specificity phosphatase 4 /FL=gb:NM_001394.2 gb:BC002671.1 gb:U48807.1 gb:U21108.1   | 0.953857                                      | 5.82811   | 4.12159                                   | 4.00E-03                     |
| 35  | ESTs, Weakly similar to T00331 hypothetical protein KIAA0555 (H.sapiens)   | -1.57372                                      | 2.70797   | 0.443622                                  | 6.74E-03                     |
| 40  | ESTs   | -3.57414                                      | 3.15167   | 3.37198                                   | 8.82E-03                     |
| 45  | ESTs, Highly similar to IHH_HUMAN INDIAN HEDGEHOG PROTEIN PRECURSOR (H.sapiens)  | -0.653989                                     | 3.22059   | 0.590533                                  | 5.18E-03                     |
| 50  | ESTs, Weakly similar to FCE2 MOUSE LOW AFFINITY IMMUNOGLOBULIN EPSILON FC RECEPTOR (M.musculus)  | 0.494192                                      | 5.22522   | 3.48031                                   | 1.97E-02                     |
| 55  | homeo box HB9/FL=gb:NM_005515.1  | -1.65563                                      | 3.2238  | 1.63092                                   | 5.58E-03                     |
| 60  | Homo sapiens arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1) (ARSE), mRNA. /PROD=arylsulfatase E precursor /FL=gb:XB3573.1 gb:NM_000047.1  | 0.283004                                      | 4.95903   | 3.18424                                   | 9.22E-03                     |
| 65  | ESTs   | -0.05909                                      | 3.0455  | -0.29817                                  | 1.47E-02                     |
| 70  | Homo sapiens hypothetical protein FLJ23403 (FLJ23403), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ23403 /FL=gb:NM_022068.1  | -1.48452                                      | 1.97473   | -1.00431                                  | 5.72E-03                     |
| 75  | ESTs   | -0.182403                                     | 3.01548   | -0.18954                                  | 3.72E-03                     |
| 80  | hypothetical protein FLJ23091  | 0.323388                                      | 5.25192   | 3.77987                                   | 3.57E-02                     |
| 85  | Human dipeptidyl peptidase IV (CD26) mRNA, complete cds. /PROD=dipeptidyl peptidase IV /FL=gb:M74777.1   | -3.61145                                      | 0.760585  | -1.25595                                  | 3.07E-02                     |
| 90  | hypothetical protein FLJ21032  | 0.355672                                      | 4.67756   | 2.61753                                   | 4.59E-02                     |
| 95  | Homo sapiens Kell blood group (KEL), mRNA. /PROD=Kell blood group antigen /FL=gb:BC003135.1 gb:NM_000420.1   | -2.20519                                      | 1.89439   | -0.38393                                  | 1.91E-02                     |
| 100 | splicing factor, arginineserine-rich 5   | 0.7481  | 5.68934   | 4.27169                                   | 2.97E-03                     |
| 105 | Human prostatic secretory protein 57 mRNA, complete cds. /PROD=PSP57 /FL=gb:U22178.1   | -3.01313                                      | 1.46338   | -0.40767                                  | 1.97E-02                     |
| 110 | Homo sapiens KIAA0878 protein (KIAA0878), mRNA. /PROD=KIAA0878 protein /FL=gb:NM_014899.1 gb:AB020685.1  | 2.0265  | 7.00937   | 5.65368                                   | 2.85E-02                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens cryptic mRNA, complete cds. /PROD=cryptic /FL=gb:AF312769.1   | 0.104874                                      | 2.87319   | -0.67353                                  | 1.61E-03                     |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ13221 fis, clone NT2RP4002075   | 0.355743                                      | 3.98782   | 1.30963                                   | 1.38E-03                     |
|    | phorbolin-like protein MDS019  | -1.11756                                      | 2.83853   | 0.503523                                  | 1.59E-02                     |
| 15 | Homo sapiens mRNA for KIAA1409 protein, partial cds. /PROD=KIAA1409 protein  | 0.368334                                      | 2.8009  | -1.03191                                  | 1.78E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434D0818 (from clone DKFZp434D0818)   | -2.63427                                      | 1.64513   | -0.3056                                   | 2.52E-02                     |
| 20 | ESTs   | 0.35393                                       | 5.14775   | 3.74875                                   | 3.16E-02                     |
|    | Homo sapiens TBX3-iso protein (TBX3-iso), mRNA. /PROD=TBX3-iso protein /FL=gb:NM_016569.1 gb:AF216750.1  | -2.34566                                      | 2.45238   | 1.07038                                   | 1.31E-02                     |
| 25 | Homo sapiens chromosome 19, cosmid R31181  | -0.258871                                     | 3.0636  | 0.223926                                  | 1.58E-03                     |
|    | Homo sapiens mRNA for GATA-6, complete cds. /PROD=GATA-6 /FL=gb:U66075.1 gb:NM_005257.1 gb:D87811.1  | 2.21862                                       | 6.8609  | 5.34263                                   | 4.29E-02                     |
| 30 | Homo sapiens ankyrin-like with transmembrane domains 1 (ANKTM1), mRNA  | -1.10879                                      | 3.93484   | 2.81939                                   | 1.29E-02                     |
|    | G protein-coupled receptor 49  | 0.265509                                      | 4.46257   | 2.50537                                   | 2.19E-02                     |
| 35 | Homo sapiens growth differentiation factor 3 (GDF3), mRNA. /PROD=growth differentiation factor 3 precursor /FL=gb:NM_020634.1 gb:AF263538.1  | 1.67253                                       | 5.34944   | 2.87486                                   | 8.62E-05                     |
|    | Human (clone HSY3RR) neuropeptide Y receptor (NPYR) mRNA, complete cds. /PROD=neuropeptide Y receptor /FL=gb:L06797.1 gb:NM_003467.1 gb:AF025375.1 gb:AF147204.1 gb:M99293.1 gb:L01639.1 | 1.77461                                       | 6.70301   | 5.47995                                   | 3.00E-02                     |
| 40 |  |   |   |   |                              |
| 45 | Homo sapiens type VI collagen alpha2 chain precursor (COL6A2) mRNA, complete cds, alternatively spliced. /PROD=type VI collagen alpha 2 chain precursor /FL=gb:AY029208.1                | 1.7011  | 5.33126   | 2.84458                                   | 5.91 E-03                    |
|    | ESTs   | -0.349726                                     | 3.29119   | 0.824929                                  | 4.11E-03                     |
| 50 | ESTs   | -0.903317                                     | 1.89777   | -1.36429                                  | 6.84E-03                     |
|    | Homo sapiens hypothetical protein FLJ10718 (FLJ10718), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ10718 /FL=gb:NM_018192.1  | 2.60483                                       | 7.10633   | 5.55242                                   | 1.41E-02                     |
| 55 | Homo sapiens Rho GTPase activating protein 6 (ARHGAP6), transcript variant 2, mRNA. /PROD=Rho GTPase activating protein 6 isoform 2 /FL=gb:AF022212.2 gb:NM_001174.2                     | -1.10389                                      | 1.83053   | -1.28521                                  | 1.28E-02                     |
| 60 | stanniocalcin 1 /FL=gb:U25997.1 gb:NM_003155.1 gb:U46768.1   | 2.41135                                       | 7.29563   | 6.14284                                   | 2.51 E-02                    |
|    | Human glycoporphin HeP2 mRNA, partial cds. /PROD=glycoporphin HeP2   | -0.843493                                     | 2.71108   | 0.233547                                  | 2.98E-04                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens cDNA FLJ12993 fis, clone NT2RP3000197  | 0.147259                                      | 4.12241   | 2.06949                                   | 6.84E-03                     |
| 15 | Homo sapiens presenilin stabilization factor b (PSF) mRNA, complete cds; alternatively spliced. /PROD=presenilin stabilization factor b /FL=gb:AY113699.1   | -0.86173                                      | 2.85614   | 0.56745                                   | 6.09E-03                     |
| 20 | Homo sapiens glycoporphin Erik STA (GP Erik) gene complete cds. /PROD=glycoporphin Erik (STA) /FL=gb:U00178.1   | -1.19362                                      | 2.17108   | -0.45439                                  | 1.45E-04                     |
| 25 | bromodomain and PHD finger containing, 3 ESTs   | -2.8472                                       | 1.75573   | 0.369397                                  | 8.62E-05                     |
|    | ESTs  | 0.784344                                      | 4.74104   | 2.71543                                   | 7.55E-03                     |
|    | ESTs  | -1.26251                                      | 3.4693  | 2.27614                                   | 3.80E-03                     |
|    | ESTs  | -1.71713                                      | 1.23763   | -1.71122                                  | 2.99E-02                     |
| 30 | Homo sapiens microsomal glutathione S-transferase 2 (MGST2), mRNA. /PROD=microsomal glutathione S-transferase 2 /FL=gb:NM_002413.1 gb:U77604.1  | 2.06233                                       | 6.81536   | 5.6918                                    | 3.79E-02                     |
| 35 | Homo sapiens eomesodermin (Xenopus laevis) homolog (EOMES), mRNA. /PROD=eomesodermin (Xenopus laevis) homolog /FL=gb:AB031038.1 gb:NM_005442.1  | 2.65926                                       | 6.71627   | 4.89839                                   | 2.76E-02                     |
| 40 | Homo sapiens mRNA for MSX-2, complete cds. /PROD=MSX-2 /FL=gb:D89377.1  | 0.407211                                      | 4.11145   | 1.94529                                   | 1.35E-02                     |
| 45 | Homo sapiens apolipoprotein A-II (APOA2), mRNA. /PROD=apolipoprotein A-II precursor /FL=gb:M29882.1 gb:NM_001643.1 gb:BC005282.1  | -1.10237                                      | 5.10066   | 4.75899                                   | 1.34E-02                     |
| 50 | Homo sapiens adenylate cyclase 8 (brain) (ADCY8), mRNA. /PROD=adenylate cyclase 8 /FL=gb:NM_001115.1  | -1.3408                                       | 1.12773   | -2.26149                                  | 1.07E-02                     |
| 55 | Homo sapiens glucose-6-phosphate transporter (G6PT) gene, G6PT-Dt allele, complete cds  | -0.193516                                     | 3.03064   | 0.407738                                  | 1.38E-03                     |
| 60 | Homo sapiens glutathione S-transferase A2 (GSTA2), mRNA. /PROD=glutathione S-transferase A2 /FL=gb:BC002895.1 gb:M25627.1 gb:M16594.1 gb:M14777.1 gb:M15872.1 gb:M21758.1 gb:NM_000846.1              | -3.10645                                      | 1.11704   | -0.4221                                   | 5.37E-04                     |
| 65 | Homo sapiens sodium dependent phosphate transporter isoform NaPi-IIb mRNA, complete cds. /PROD=sodium dependent phosphate transporter isoform NaPi-IIb /FL=gb:AF111856.1 gb:NM_006424.1 gb:AF146796.1 | -0.397133                                     | 2.78341   | 0.231961                                  | 1.11E-02                     |
|    | ESTs  | 2.77413                                       | 7.19192   | 5.906                                     | 3.17E-02                     |
|    | Homo sapiens partial LHX9 gene for LIM-homeobox 9, 3'UTR.   | -2.2486                                       | 1.64952   | -0.13424                                  | 7.89E-03                     |
|    | Homo sapiens LYST-interacting protein LIP3 mRNA, partial cds. /PROD=LYST-interacting protein LIP3 putative 47 kDa protein   | -0.682149                                     | 2.34271   | -0.31253                                  | 9.87E-03                     |
|    |   | -0.123937                                     | 3.2914  | 1.05247                                   | 3.72E-03                     |

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens protein S (alpha) (PROS1), mRNA. /PROD=protein S (alpha)/FL=gb:M15036.1 gb:NM_000313.1  | 0.577604                                      | 4.00035   | 1.7883                                    | 7.89E-03                     |
|    | ESTs   | -1.63711                                      | 0.915477  | -2.15328                                  | 1.83E-02                     |
| 15 | protocadherin 10   | 1.76718                                       | 5.1503  | 2.98569                                   | 2.52E-02                     |
|    | KIAA1511 protein   | 0.620278                                      | 3.86886   | 1.57543                                   | 1.86E-03                     |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ13221 fis, clone NT2RP4002075   | 0.282785                                      | 3.44178   | 1.08178                                   | 1.31E-03                     |
| 20 | Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4, soluble-form splice variant (FGFR4) mRNA, complete cds. /PROD=fibroblast growth factor receptor 4,soluble-form splice variant /FL=gb:NM_022963.1 gb:AF202063.1 | -1.72385                                      | 2.26674   | 0.747239                                  | 6.86E-03                     |
| 25 | X75208 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSPTKR H.sapiens HEK2 mRNA for protein tyrosine kinase receptor  | -1.36729                                      | 2.60456   | 1.08204                                   | 1.58E-02                     |
|    | Homo sapiens chemokine receptor  | 2.30557                                       | 6.72969   | 5.66933                                   | 3.31E-02                     |
| 30 | CXCR4 mRNA, complete cds. /PROD=chemokine receptor CXCR4 /FL=gb:AF348491.1   |   |   |   |                              |
|    | KIAA1415 protein   | 0.185854                                      | 3.70346   | 1.74255                                   | 7.78E-04                     |
|    | ESTs   | -0.048335                                     | 3.11786   | 0.836448                                  | 1.29E-02                     |
| 35 | Homo sapiens stanniocalcin 1 (STC1), mRNA. /PROD=stanniocalcin 1 /FL=gb:U25997.1 gb:NM_003155.1 gb:U46768.1  | 2.39435                                       | 6.55737   | 5.28007                                   | 2.19E-02                     |
|    | Homo sapiens high mobility group protein-R mRNA, complete cds. /PROD=high mobility group protein-R /FL=gb:AF176039.1   | 1.04695                                       | 3.2786  | 0.095286                                  | 2.11E-02                     |
| 40 | ESTs, Moderately similar to ALU4_HUMAN ALU SUBFAMILY SB2 SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)  | -1.10358                                      | 1.66331   | -0.98371                                  | 3.37E-02                     |
| 45 | Homo sapiens arrestin, beta 1 (ARRB1), transcript variant 1, mRNA. /PROD=arrestin beta 1, isoform A /FL=gb:BC003636.1 gb:AF084040.1 gb:NM_004041.2   | -0.158844                                     | 2.41791   | -0.40915                                  | 1.12E-02                     |
| 50 | ESTs   | -1.34399                                      | 1.80279   | -0.44529                                  | 1.60E-03                     |
|    | Human mRNA for pro-alpha 1 (II) collagen 3end C-term. triple helical and C-terminal non-helical domain. /PROD=pro-alpha 1 (II) collagen (313 AA; AA 975-271c) /FL=gb:NM_001844.2                                 | 0.85982                                       | 4.1935  | 2.15657                                   | 1.09E-02                     |
| 55 | Homo sapiens hypothetical protein DKFZp564B052 (DKFZp564B052), mRNA. /PROD=hypothetical protein DKFZp564B052 /FL=gb:NM_030820.1  | 1.47773                                       | 4.42479   | 2.00326                                   | 1.16E-03                     |
|    | testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)  | -0.695228                                     | 2.99328   | 1.31679                                   | 1.17E-03                     |
| 60 | Homo sapiens fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) (FEZ1), transcript variant 1, mRNA. /PROD=zygin 1, isoform 1 /FL=gb:U60060.1 gb:U69139.1  | 1.86433                                       | 4.71354   | 2.20315                                   | 8.62E-05                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 <sup>a</sup> en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | gb:NM_005103.2<br>Homo sapiens matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted) (MMP15), mRNA. /PROD=matrix metalloproteinase 15 preproprotein /FL=gb:D86331.1 gb:NM_002428.1 | -0.298504                                     | 3.44582   | 1.8336                                    | 4.80E-03                     |
| 15 | heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan) /FL=gb:M85289.1 gb:NM_005529.2   | -2.53327                                      | 0.924726  | -0.97212                                  | 4.31E-02                     |
| 20 | Homo sapiens dickkopf (Xenopus laevis) homolog 1 (DKK1), mRNA. /PROD=dickkopf (Xenopus laevis) homolog 1/FL=gb:AF177394.1 gb:NM_012242.1 gb:AF127563.1                       | 0.981469                                      | 3.70716   | 1.09014                                   | 1.76E-03                     |
|    | ESTs   | -0.801487                                     | 3.37342   | 2.21393                                   | 1.22E-02                     |
|    | ESTs   | -2.57626                                      | 1.40231   | 0.050493                                  | 6.60E-03                     |
| 25 | ESTs   | 0.499579                                      | 4.10541   | 2.39934                                   | 4.29E-03                     |
|    | Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA. /PROD=bone morphogenetic protein 2 precursor /FL=gb:NM_001200.1  | 2.04506                                       | 6.19114   | 5.02927                                   | 4.98E-02                     |
| 30 | Human extracellular matrix protein 1 (ECM1) mRNA, complete cds. /PROD=extracellular matrix protein 1 /FL=gb:NM_004425.2 gb:U65932.1 gb:U68186.1                              | 0.634778                                      | 3.65829   | 1.37564                                   | 6.11E-04                     |
| 35 | Homo sapiens nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (NROB1), mRNA. /PROD=adrenal hypoplasia protein /FL=gb:NM_000475.2  | -1.92783                                      | 2.32456   | 1.27907                                   | 2.99E-02                     |
|    | Homo sapiens cDNA: FLJ23067 fis, clone LNG04993.   | -2.25626                                      | 1.95987   | 0.882498                                  | 6.62E-03                     |
|    | Homo sapiens ADP-ribosylation factor 4-like (ARF4L), mRNA. /PROD=ADP-ribosylation factor 4-like /FL=gb:U25771.1 gb:L38490.1 gb:NM_001661.1 gb:BC000043.1                     | 1.63466                                       | 5.70351   | 4.48037                                   | 1.90E-02                     |
| 40 | Homo sapiens HT016 mRNA, complete cds. /PROD=HT016 /FL=gb:AF225426.1   | 0.218762                                      | 3.97514   | 2.45222                                   | 3.37E-02                     |
| 45 | Homo sapiens, tropomodulin, clone MGC:3643, mRNA, complete cds. /PROD=tropomodulin /FL=gb:NM_003275.1 gb:M77016.1 gb:BC002660.1  | 0.348796                                      | 3.54199   | 1.46427                                   | 1.29E-03                     |
| 50 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ22471 (FLJ22471), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ22471 /FL=gb:NM_025140.1  | 0.903825                                      | 4.65366   | 3.1349                                    | 2.48E-02                     |
|    | ESTs   | -0.120583                                     | 2.94229   | 0.738304                                  | 7.20E-03                     |
|    | ESTs, Moderately similar to JC4969 pig-c protein (H.sapiens)   | -2.39713                                      | 0.906454  | -1.04495                                  | 1.69E-02                     |
| 55 | Homo sapiens LIM homeobox protein 1 (LHX1), mRNA. /PROD=LIM homeobox protein 1 /FL=gb:NM_005568.1 gb:U14755.1  | -0.77166                                      | 2.27746   | 0.085559                                  | 4.26E-02                     |
| 60 | Homo sapiens, hypothetical protein MGC2865, clone MGC:20246 IMAGE:4635389, mRNA, complete cds. /FL=gb:BC016043.1   | -2.43105                                      | 0.646883  | -1.50617                                  | 8.27E-03                     |
|    | ESTs   | -2.01523                                      | 2.16773   | 1.12403                                   | 1.99E-02                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (OGDH), mRNA. /PROD=oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) /FL=gb:D10523.1 gb:BC004964.1 gb:NM_002541.1  | -0.032595                                     | 2.3997  | -0.38533                                  | 1.45E-02                     |
| 15 | ESTs, Weakly similar to T32252 hypothetical protein T15B7.2 - Caenorhabditis elegans (C.elegans)   | 2.20966                                       | 5.35974   | 3.33255                                   | 1.12E-04                     |
|    | Homo sapiens, cleft lip and palate associated transmembrane protein 1, clone MGC:10593, mRNA, complete cds. /PROD=cleft lip and palate associated transmembraneprotein 1 /FL=gb:BC004865.1                       | 1.31578                                       | 3.52357   | 0.556735                                  | 2.92E-03                     |
| 20 | Homo sapiens clone TUA8 Cri-du-chat region mRNA  | 0.09218                                       | 3.37126   | 1.49746                                   | 6.46E-03                     |
|    | Homo sapiens transcriptional activator of the c-fos promoter (CROC4), mRNA. /PROD=transcriptional activator of the c-fos promoter/FL=gb:NM_006365.1 gb:U49857.1  | 0.666391                                      | 4.50481   | 3.22532                                   | 5.80E-03                     |
| 25 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ21195 similar to protein related to DAC and cerberus (FLJ21195), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ21195 similar to proteinrelated to DAC and cerberus /FL=gb:NM_022469.1 | -1.38519                                      | 2.23626   | 0.763963                                  | 7.36E-03                     |
| 30 | ras homolog gene family, member B /FL=gb:AF498971.1 gb:NM_004040.1   | -0.123101                                     | 2.52093   | 0.071885                                  | 1.86E-02                     |
| 35 | cartilage linking protein 1  | 0.879449                                      | 3.47789   | 0.987243                                  | 1.03E-03                     |
|    | Homo sapiens BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNIP3) mRNA, complete cds. /PROD=BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3/FL=gb:AF002697.1 gb:NM_004052.2 gb:U15174.1                           | 3.30506                                       | 6.91803   | 5.44746                                   | 1.79E-03                     |
| 40 | Homo sapiens polycythemia rubra vera 1; cell surface receptor (PRV1), mRNA. /PROD=polycythemia rubra vera 1; cell surfacereceptor /FL=gb:NM_020406.1 gb:AF146747.1   | -1.19629                                      | 2.40987   | 0.93741                                   | 9.40E-03                     |
| 45 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ11560 (FLJ11560), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ11560 /FL=gb:NM_025182.1  | -0.044112                                     | 3.42017   | 1.80688                                   | 3.77E-03                     |
| 50 | plexin A2  | 0.930527                                      | 4.36203   | 2.74167                                   | 1.52E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547H236 (from clone DKFZp547H236). /PROD=hypothetical protein   | 1.37193                                       | 4.24502   | 2.08129                                   | 5.37E-04                     |
| 55 | Homo sapiens cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) (CST3), mRNA. /PROD=cystatin C (amyloid angiopathy and cerebralhemorrhage) /FL=gb:NM_000099.1   | 2.08601                                       | 5.30525   | 3.51965                                   | 2.20E-03                     |
| 60 | ESTs, Moderately similar to NFY-C (H.sapiens)  | -0.749407                                     | 2.00148   | -0.24268                                  | 2.34E-03                     |
|    | ESTs   | 2.54243                                       | 5.75201   | 3.97307                                   | 2.60E-02                     |
|    | Homo sapiens sialyltransferase (STHM), mRNA. /PROD=sialyltransferase /FL=gb:U14550.1 gb:NM_006456.1  | -0.68709                                      | 2.89586   | 1.50348                                   | 3.70E-02                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens SG2NA beta isoform mRNA, partial cds. /PROD=SG2NA beta isoform  | -1.15566                                      | 1.13989   | -1.53439                                  | 1.55E-02                     |
|    | Homo sapiens hypothetical protein FLJ12838 (FLJ12838), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ12838 /FL=gb:NM_024641.1  | 1.49091                                       | 4.80138   | 3.15205                                   | 2.63E-02                     |
| 15 | Homo sapiens solute carrier (SLC25A18) mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product. /PROD=solute carrier /FL=gb:AY008285.1  | 0.403706                                      | 2.12385   | -1.10043                                  | 1.78E-02                     |
| 20 | KIAA0346 protein   | -1.34736                                      | 2.49605   | 1.41497                                   | 3.90E-03                     |
|    | Human clone 23826 mRNA sequence  | 1.80782                                       | 4.07112   | 1.44315                                   | 2.28E-04                     |
|    | Homo sapiens receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2), mRNA. /PROD=receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 /FL=gb:M97639.1   | 1.53333                                       | 4.73839   | 3.05612                                   | 1.63E-02                     |
| 25 | gb:NM_004560.1   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor) (MAZ), mRNA. /PROD=MYC-associated zinc finger protein(purine-binding transcription factor) /FL=gb:D85131.1 | -0.055569                                     | 2.67075   | 0.511292                                  | 2.63E-02                     |
| 30 | gb:NM_002383.1   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ30081 fis, clone BGGI12000693, weakly similar to POLYHOMEOTIC-PROXIMAL CHROMATIN PROTEIN.   | 0.677905                                      | 3.33728   | 1.12499                                   | 1.12E-04                     |
| 35 | Homo sapiens elongation of very long chain fatty acids (FEN1Elo2, SUR4Elo3, yeast)-like 2 (ELOVL2), mRNA.  | 0.099979                                      | 3.23372   | 1.50802                                   | 2.59E-03                     |
| 40 | /PROD=elongation of very long chain fatty acids(FEN1Elo2, SUR4Elo3, yeast)-like 2 /FL=gb:NM_017770.1   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens thyrotropin-releasing hormone (TRH), mRNA. /PROD=thyrotropin-releasing hormone  | -1.65672                                      | 1.46994   | -0.25839                                  | 3.02E-02                     |
| 45 | /FL=gb:NM_007117.1   |   |   |   |                              |
|    | ESTs, Weakly similar to A46302 PTB-associated splicing factor, long form (H.sapiens)   | 0.894051                                      | 4.21835   | 2.69535                                   | 1.57E-02                     |
| 50 | Human MLC1emb gene for embryonic myosin alkaline light chain, promoter and exon 1  | 1.3489  | 5.11354   | 4.03961                                   | 1.61E-02                     |
|    | Homo sapiens microseminoprotein, beta- (MSMB), mRNA. /PROD=microseminoprotein, beta-/FL=gb:NM_002443.1   | -2.37904                                      | 1.3101  | 0.169915                                  | 2.46E-02                     |
| 55 | Homo sapiens cDNA FLJ11390 fis, clone HEMBA1000561, weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 91.  | -1.12944                                      | 2.02889   | 0.364373                                  | 0.00E+00                     |
|    | ESTs, Weakly similar to ALU8_HUMAN ALU SUBFAMILY SX SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)   | 2.76608                                       | 6.07949   | 4.57766                                   | 1.93E-02                     |
| 60 | Homo sapiens cDNA FLJ13810 fis, clone THYRO1000279   | -2.92389                                      | 0.51764   | -0.85322                                  | 8.08E-03                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens, aminolevulinate, delta-, dehydratase, clone MGC:5057, mRNA, complete cds. /PROD=aminolevulinate, delta-, dehydratase /FL=gb:BC000977.1 gb:M13928.1 gb:NM_000031.1 | 1.3099  | 4.44525   | 2.76918                                   | 7.69E-03                     |
| 15 | Homo sapiens kidney-specific membrane protein NX-17 mRNA, complete cds. /PROD=kidney-specific membrane protein NX-17 /FL=gb:AF229179.1  | 1.91929                                       | 5.08917   | 3.44968                                   | 6.91 E-03                    |
| 20 | Homo sapiens alpha 2,8-sialyltransferase mRNA, complete cds. /PROD=alpha 2,8-sialyltransferase /FL=gb:L43494.1 gb:D26360.1 gb:L32867.1 gb:NM_003034.1                           | -1.10548                                      | 2.36359   | 1.05469                                   | 4.63E-03                     |
| 25 | tyrosine 3-monooxygenasetryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide  | 2.98486                                       | 6.17918   | 4.60758                                   | 8.01E-03                     |
| 30 | Homo sapiens cardiac ankyrin repeat protein (CARP), mRNA. /PROD=cardiac ankyrin repeat protein /FL=gb:NM_014391.1   | -0.002291                                     | 3.35645   | 1.98688                                   | 3.44E-02                     |
| 35 | Homo sapiens porcupine (MG61), mRNA. /PROD=porcupine /FL=gb:AF317059.1 gb:AF317058.1 gb:NM_022825.1   | 1.51754                                       | 4.96311   | 3.68103                                   | 9.86E-03                     |
| 40 | collagen, type V, alpha 1 /FL=gb:D90279.1 gb:NM_000093.1 gb:M76729.1  | 1.5875  | 3.98844   | 1.66569                                   | 1.17E-03                     |
| 45 | Homo sapiens forkhead box F2 (FOXF2), mRNA. /PROD=forkhead box F2 /FL=gb:U13220.1 gb:NM_001452.1  | -1.54469                                      | 1.02305   | -1.11517                                  | 6.95E-03                     |
| 50 | PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2)  | -1.92021                                      | 3.74378   | 2.77277                                   | 2.10E-02                     |
| 55 | Homo sapiens PRO1957 mRNA, complete cds. /PROD=PRO1957 /FL=gb:AF116676.1  | 1.68941                                       | 5.30311   | 4.22705                                   | 1.43E-02                     |
| 60 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ23514 (FLJ23514), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ23514 /FL=gb:NM_021827.1   | 0.564613                                      | 5.98527   | 5.24692                                   | 2.85E-02                     |
| 65 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586G2120 (from clone DKFZp586G2120); complete cds. /PROD=hypothetical protein /FL=gb:AL136924.1  | -1.80897                                      | 1.69722   | 0.523009                                  | 2.47E-02                     |
| 70 | Cluster Incl. L37033:Human FK-506 binding protein homologue (FKBP38) mRNA, complete cds /cds=(140,1207) /gb=L37033 /gi=965469 /ug=Hs. 173464 /len=1613                          | 0.615619                                      | 3.478   | 1.66132                                   | 1.54E-02                     |
| 75 | ESTs  | -0.004009                                     | 3.63657   | 2.61352                                   | 4.29E-02                     |
| 80 | Homo sapiens apolipoprotein C-I (APOC1), mRNA. /PROD=apolipoprotein C-I precursor /FL=gb:NM_001645.2  | 3.24954                                       | 6.71073   | 5.50997                                   | 2.16E-02                     |
| 85 | ESTs  | 1.38635                                       | 4.93112   | 3.83641                                   | 1.39E-02                     |
| 90 | Homo sapiens cDNA FLJ34035 fis, clone FCBBF2004788.   | -3.58002                                      | -0.48718  | -2.00751                                  | 1.46E-02                     |
| 95 | Homo sapiens, clone IMAGE:3509274, mRNA, partial cds  | 0.493686                                      | 2.94923   | 0.794513                                  | 1.82E-02                     |

(continua)

|     | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y |
|-----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5   |   |   |   |   |                              |
| 10  | Homo sapiens putative sterol reductase SR-1 (TM7SF2) mRNA, complete cds. /PROD=putative sterol reductase SR-1 /FL=gb:AF096304.1   | 1.66857                                       | 4.3767  | 2.47833                                   | 5.37E-04                     |
| 15  | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha /FL=gb:NM_020529.1 gb:BC002601.1 gb:BC004983.1 gb:M69043.1                                  | 2.91463                                       | 6.48938   | 5.47812                                   | 1.97E-02                     |
| 20  | hypothetical protein FLJ12666   | 0.215767                                      | 3.10249   | 1.40459                                   | 1.91E-02                     |
| 25  | Homo sapiens ectodermal dysplasia 1, anhidrotic (ED1), mRNA. /PROD=ectodermal dysplasia 1, anhidrotic /FL=gb:AF060999.1 gb:NM_001399.1 gb:AF040628.1 gb:AF061189.1              | 0.796627                                      | 4.22895   | 3.07833                                   | 1.01 E-02                    |
| 30  | glycoprotein M6A /FL=gb:D49958.1  | 0.274378                                      | 3.59045   | 2.3278                                    | 2.64E-02                     |
| 35  | ESTs  | 1.04714                                       | 3.87608   | 2.12752                                   | 3.75E-02                     |
| 40  | ESTs  | -1.48489                                      | 1.371   | -0.35043                                  | 1.88E-03                     |
| 45  | ESTs, Weakly similar to KIAA1330 protein (H.sapiens)  | -0.925232                                     | 2.41149   | 1.18187                                   | 2.65E-03                     |
| 50  | putative 47 kDa protein   | 0.156484                                      | 2.78771   | 0.861726                                  | 2.60E-02                     |
| 55  | Homo sapiens hypothetical protein FLJ32835 (FLJ32835), mRNA. /FL=gb:NM_152506.1   | -0.595622                                     | 4.84785   | 3.94683                                   | 3.34E-02                     |
| 60  | Homo sapiens GS1999full mRNA, complete cds. /FL=gb:AB048286.1   | 0.137029                                      | 2.75189   | 0.849942                                  | 0.00E+00                     |
| 65  | Homo sapiens hexabrachion (tenascin C, cytotactin) (HXB), mRNA. /PROD=hexabrachion (tenascin C, cytotactin) /FL=gb:M55618.1 gb:NM_002160.1                                      | 3.96862                                       | 5.66572   | 2.85391                                   | 1.39E-02                     |
| 70  | +Homo sapiens Pig10 (PIG10) mRNA, complete cds. /PROD=Pig10 /FL=gb:AF059611.1 gb:AF010314.1 gb:NM_003633.1 gb:BC000418.1 gb:AF005381.1  | 0.129454                                      | 2.86013   | 1.09765                                   | 1.16E-03                     |
| 75  | Homo sapiens annexin A6 (ANXA6), transcript variant 1, mRNA. /PROD=annexin VI isoform 1 /FL=gb:D00510.1 gb:J03578.1 gb:NM_001155.2  | 3.89026                                       | 6.43752   | 4.49981                                   | 8.81 E-04                    |
| 80  | Homo sapiens c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (MERTK), mRNA. /PROD=c-mer proto-oncogene tyrosine kinase /FL=gb:NM_006343.1 gb:U08023.1                                      | 1.78994                                       | 4.92901   | 3.61665                                   | 1.84E-02                     |
| 85  | Homo sapiens caspase-like apoptosis regulatory protein 2 (clarp) mRNA, alternatively spliced, complete cds. /PROD=caspase-like apoptosis regulatory protein 2 /FL=gb:AF005775.1 | 0.434199                                      | 5.04863   | 5.2167                                    | 2.46E-02                     |
| 90  | Human embryonic myosin alkali light chain (MLC1) mRNA, complete cds. /FL=gb:M36172.1 gb:M24121.1 gb:NM_002476.1   | 1.94171                                       | 5.24959   | 4.11475                                   | 2.11E-02                     |
| 95  | Homo sapiens phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta (PIP5K1B), mRNA. /PROD=phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta /FL=gb:NM_003558.1          | 1.34876                                       | 4.12788   | 2.46657                                   | 3.66E-03                     |
| 100 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434E082 (from clone DKFZp434E082)  | 1.36443                                       | 4.34866   | 2.94283                                   | 2.92E-03                     |

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types), includes DXS142, DXS164, DXS206, DXS230, DXS239, DXS268, DXS269, DXS270, DXS272 (DMD), transcript variant Dp427p2, mRNA. | 1.40427                                       | 4.41881   | 3.04441                                   | 1.83E-02                     |
| 15 | /PROD=dystrophin Dp427p2 isoform<br>/FL=gb:NM_004010.1<br>Homo sapiens, clone MGC:14801, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:14801)  | 2.03928                                       | 3.96694   | 1.51059                                   | 5.65E-04                     |
| 20 | /FL=gb:BC005997.1<br>Homo sapiens hypothetical protein BC017868 (LOC159091), mRNA. /FL=gb:BC017868.1<br>gb:NM_138819.1  | -0.290244                                     | 2.2418  | 0.40157                                   | 6.04E-03                     |
| 25 | ESTs, Highly similar to AF229172 1 class III myosin (H.sapiens)   | -0.475471                                     | 1.94826   | 0.002417                                  | 5.28E-03                     |
|    | Homo sapiens solute carrier family 9 (sodiumhydrogen exchanger), isoform 5 (SLC9A5), mRNA.<br>/PROD=solute carrier family 9 (sodiumhydrogenexchanger), isoform 5                                  | 0.047487                                      | 2.80601   | 1.19645                                   | 2.80E-03                     |
| 30 | /FL=gb:AF111173.1 gb:NM_004594.1<br>Homo sapiens F37Esophageal cancer-related gene-coding leucine-zipper motif (FEZ1), mRNA.  | -0.128814                                     | 3.17069   | 2.10422                                   | 1.54E-02                     |
| 35 | /PROD=F37Esophageal cancer-related gene-codingleucine-zipper motif /FL=gb:AF123659.1<br>gb:NM_021020.1  |   |   |   |                              |
| 40 | Homo sapiens deiodinase, iodothyronine, type III (DIO3), mRNA. /PROD=thyroxine deiodinase type III<br>/FL=gb:NM_001362.1 gb:S79854.1  | -0.136937                                     | 5.08366   | 4.22897                                   | 1.41E-02                     |
| 45 | Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6), mRNA. /PROD=insulin-like growth factor binding protein 6 /FL=gb:BC005007.1 gb:M62402.1<br>gb:BC003507.1 gb:NM_002178.1        | 2.6126  | 5.13945   | 3.30402                                   | 9.72E-04                     |
| 50 | Homo sapiens U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (65kD) (U2AF65), mRNA. /PROD=U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (65kD)<br>/FL=gb:NM_007279.1                    | -0.821533                                     | 1.81533   | 0.096512                                  | 4.72E-02                     |
| 55 | Homo sapiens hypothetical protein DKFZp434F0318 (DKFZP434F0318), mRNA.<br>/PROD=hypothetical protein DKFZp434F0318<br>/FL=gb:NM_030817.1  | -1.11464                                      | 1.81375   | 0.394686                                  | 9.09E-03                     |
|    | Homo sapiens BACE mRNA for beta-site APP cleaving enzyme I-476, complete cds. /PROD=beta-site APP cleaving enzyme I-476 /FL=gb:AB050436.1   | 0.48553                                       | 3.13284   | 1.44588                                   | 4.99E-04                     |
| 60 | ESTs, Weakly similar to ALUC_HUMAN !!!! ALU CLASS C WARNING ENTRY !!! (H.sapiens)   | 1.07951                                       | 4.06134   | 2.7193                                    | 2.11 E-02                    |
|    | Homo sapiens mRNA for KIAA0876 protein, partial cds. /PROD=KIAA0876 protein   | -0.432037                                     | 1.97736   | 0.073246                                  | 3.37E-02                     |
| 65 |   |   |   |   |                              |

(continua)

|     | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|-----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5   |  |   |   |   |                              |
| 10  | Homo sapiens mRNA for protein-tyrosine kinase, complete cds. /PROD=protein-tyrosine kinase /FL=gb:U05682.1 gb:D17517.1 gb:D50479.1 KIAA0418 gene product | 0.160986                                      | 2.75713   | 1.04172                                   | 2.11E-02                     |
| 15  | Homo sapiens phosphofructokinase, liver (PFKL), mRNA. /PROD=phosphofructokinase, liver /FL=gb:NM_002626.1 gb:BC004920.1 gb:X15573.1                      | -0.677643                                     | 1.83134   | 0.034385                                  | 1.45E-04                     |
| 20  | Homo sapiens enolase 2, (gamma, neuronal) (ENO2), mRNA. /PROD=enolase 2, (gamma, neuronal) /FL=gb:NM_001975.1 gb:BC002745.1 gb:M22349.1                  | 2.039   | 4.51747   | 2.70388                                   | 1.28E-03                     |
| 25  | Homo sapiens AD036 mRNA, complete cds. /PROD=AD036 /FL=gb:AF260333.1   | 2.60624                                       | 5.37458   | 3.92621                                   | 3.17E-03                     |
| 30  | ESTs   | -0.503334                                     | 2.65787   | 1.60278                                   | 3.61 E-02                    |
| 35  | Homo sapiens keratin 19 (KRT19), mRNA. /PROD=keratin 19 /FL=gb:NM_002276.1 gb:BC002539.1   | -2.07933                                      | 1.00157   | -0.1307                                   | 2.39E-02                     |
| 40  | pleiomorphic adenoma gene-like 1 /FL=gb:U72621.3   | 3.80582                                       | 6.96535   | 5.91937                                   | 2.11E-02                     |
| 45  | Homo sapiens, Similar to lipase protein, clone MGC:2843, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to lipase protein /FL=gb:NM_020676.1 gb:BC001698.1            | -0.646793                                     | 1.88692   | 0.221481                                  | 4.21E-03                     |
| 50  | Cluster Incl. AB002344:Human mRNA for KIAA0346 gene, partial cds /cds=(0,4852) /gb=AB002344 /gi=2280479 /ug=Hs.103915 /len=6121                          | -1.16073                                      | 1.9994  | 0.961706                                  | 1.89E-02                     |
| 55  | Cluster Incl. N80935:zb07g06.s1 Homo sapiens cDNA, 3 end /clone=IMAGE-301402/clone_end=3 /gb=N80935 /gi=1243636 /ug=Hs.22483 /len=527                    | 2.15679                                       | 4.91332   | 3.47797                                   | 7.39E-03                     |
| 60  | tryptase, alpha  | 2.12419                                       | 4.48236   | 2.66555                                   | 1.50E-02                     |
| 65  | ESTs, Weakly similar to Z132_HUMAN ZINC FINGER PROTEIN 13 (H.sapiens)  | 2.99108                                       | 5.46095   | 3.76442                                   | 1.31E-03                     |
| 70  | Homo sapiens core histone macroH2A2.2 (MACROH2A2), mRNA. /PROD=core histone macroH2A2.2 /FL=gb:AF151534.1 gb:NM_018649.1                                 | 1.04865                                       | 3.65906   | 2.12166                                   | 2.43E-02                     |
| 75  | ESTs   | 1.67293                                       | 4.73906   | 3.66212                                   | 3.62E-02                     |
| 80  | Human rho GDI mRNA, complete cds. /PROD=human rho GDI /FL=gb:M97579.1 gb:D13989.1  | -0.146413                                     | 2.69334   | 1.39451                                   | 1.02E-02                     |
| 85  | heat shock 90kD protein 1, alpha   | 0.019358                                      | 1.75075   | -0.65155                                  | 1.85E-02                     |
| 90  | Homo sapiens BTB (POZ) domain containing 2 (BTBD2), mRNA. /PROD=BTB (POZ) domain containing 2 /FL=gb:NM_017797.1   | 1.69225                                       | 4.20576   | 2.60887                                   | 2.10E-02                     |
| 95  | Homo sapiens mandaselin long form mRNA, complete cds. /PROD=mandaselin long form /FL=gb:AY048775.1   | 1.10085                                       | 3.7628  | 2.32464                                   | 1.85E-02                     |
| 100 | signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)   | -0.148053                                     | 2.58361   | 1.2296                                    | 1.57E-02                     |
| 105 |  | -0.837261                                     | 1.90254   | 0.560225                                  | 8.83E-04                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E), mRNA. /PROD=lymphocyte antigen 6 complex, locus E /FL=gb:U42376.1   | 0.866364                                      | 4.91832   | 4.92642                                   | 2.78E-02                     |
|    | gb:NM_002346.1 gb:U56145.1 ESTs  | -1.24632                                      | 1.09042   | -0.61316                                  | 4.05E-02                     |
| 15 | Homo sapiens, clone IMAGE:4047715, mRNA.   | -2.50816                                      | 1.81  | 1.52693                                   | 2.63E-02                     |
|    | Cluster Incl. AB002344:Human mRNA for KIAA0346 gene, partial cds /cds=(0,4852) /gb=AB002344 /gi=2280479 /ug=Hs.103915 /len=6121  | 1.89578                                       | 4.61333   | 3.31717                                   | 1.12E-02                     |
| 20 | Homo sapiens singed (Drosophila)-like (sea urchin fascin homolog like) (SNL), mRNA. /PROD=singed (Drosophila)-like (sea urchin fascin homolog like) /FL=gb:BC000521.1 gb:NM_003088.1 gb:U03057.1 gb:U09873.1 | 4.23317                                       | 6.74774   | 5.25403                                   | 5.12E-03                     |
| 25 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586L0120 (from clone DKFZp586L0120).  | -2.72593                                      | 1.58998   | 1.27994                                   | 4.54E-02                     |
|    | Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10), mRNA. /PROD=mitogen-activated protein kinase 10 /FL=gb:U07620.1 gb:U34819.1 gb:U34820.1 gb:NM_002753.1  | 0.647994                                      | 3.46459   | 2.28644                                   | 6.65E-03                     |
| 30 | Homo sapiens transmembranetyrosine kinase mRNA, complete cds. /PROD=tyrosine kinase /FL=gb:L08961.1  | -0.006089                                     | 2.96035   | 1.93237                                   | 7.69E-03                     |
| 35 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp762H185 (from clone DKFZp762H185)   | 2.83663                                       | 5.30784   | 3.79206                                   | 6.22E-03                     |
|    | tyrosine 3-monooxygenasetryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide   | 3.48271                                       | 6.19368   | 4.92556                                   | 2.11E-02                     |
| 40 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434K0621 (from clone DKFZp434K0621); partial cds  | 0.581419                                      | 3.38088   | 2.21428                                   | 3.89E-02                     |
|    | ESTs, Weakly similar to ALUF_HUMAN !!!! ALU CLASS F WARNING ENTRY !!! (H.sapiens)  | -1.03247                                      | 1.75349   | 0.587598                                  | 2.11E-02                     |
| 45 | tudor repeat associator with PCTAIRE 2   | 2.15771                                       | 4.69127   | 3.27451                                   | 2.63E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564K1672 (from clone DKFZp564K1672); partial cds. /PROD=hypothetical protein  | 4.49405                                       | 7.38448   | 6.33474                                   | 1.39E-02                     |
| 50 | ESTs   | -0.184212                                     | 2.15367   | 0.554696                                  | 1.15E-02                     |
|    | Homo sapiens bHLH factor Hes4 (LOC57801), mRNA. /PROD=bHLH factor Hes4 /FL=gb:NM_021170.1 gb:AB048791.1  | 0.47816                                       | 3.40725   | 2.40001                                   | 3.16E-02                     |
| 55 | Homo sapiens guanylate cyclase activator 1B (retina) (GUCA1B), mRNA. /PROD=guanylate cyclase activator 1 B (retina) /FL=gb:M95174.1 gb:NM_002098.1 gb:M97496.1   | -0.714216                                     | 1.95339   | 0.684983                                  | 3.38E-03                     |
|    | KIAA0918 protein   | -1.39708                                      | 0.961939  | -0.57499                                  | 1.40E-02                     |
| 60 | Homo sapiens mRNA for KIAA1161 protein, partial cds. /PROD=KIAA1161 protein  | 0.781796                                      | 3.32846   | 1.98143                                   | 6.60E-03                     |

65

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 <sup>a</sup> en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens, Similar to B9 protein, clone MGC:11339, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to B9 protein /FL=gb:BC002944.1  | 1.43881                                       | 3.80457   | 2.29205                                   | 8.62E-05                     |
|    | hypothetical protein FLJ 12666   | 2.34087                                       | 5.11201   | 4.02837                                   | 1.97E-02                     |
| 15 | Homo sapiens FLICE-like inhibitory protein short form mRNA, complete cds. /PROD=FLICE-like inhibitory protein short form /FL=gb:U97075.1   | 0.135783                                      | 4.45631   | 4.92758                                   | 1.96E-02                     |
| 20 | Homo sapiens olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 (OR52A1), mRNA. /PROD=olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 /FL=gb:NM_012375.1                    | -0.309574                                     | 2.08723   | 0.636487                                  | 4.36E-03                     |
| 25 | Human DNA sequence from clone RP4-781 L3 on chromosome 1p34.3-36.11 Contains a pseudogene similar to IFITM3 (interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)), STSs and GSSs     | 2.82768                                       | 5.54517   | 4.43909                                   | 2.04E-03                     |
|    | Homo sapiens KIAA0127 gene product (KIAA0127), mRNA. /PROD=KIAA0127 gene product /FL=gb:D50917.1 gb:NM_014755.1  | 2.05236                                       | 4.43794   | 3.00216                                   | 3.12E-02                     |
| 30 | Homo sapiens clone HB-2 mRNA sequence hypothetical protein FLJ23091  | -0.503949                                     | 2.27896   | 1.25171                                   | 3.01E-02                     |
|    | ESTs   | -0.76092                                      | 3.70916   | 3.04154                                   | 2.45E-02                     |
|    | ESTs   | -0.403665                                     | 2.01868   | 0.643615                                  | 5.11E-04                     |
| 35 | ESTs   | 2.14401                                       | 4.70353   | 3.47114                                   | 3.15E-03                     |
|    | Homo sapiens regulator of G protein signalling 5 (RGS5) mRNA, complete cds. /PROD=regulator of G protein signalling 5 /FL=gb:AF493929.1  | 3.0091  | 5.37511   | 3.95132                                   | 1.29E-03                     |
| 40 | endothelin receptor type A /FL=gb:NM_001957.1 gb:L06622.1  | -1.83423                                      | 2.54948   | 1.95432                                   | 1.51E-02                     |
|    | H.sapiens skeletal embryonic myosin light chain 1 (MLC1) mRNA. /PROD=myosin light chain 1  | 0.690058                                      | 3.3896  | 2.36018                                   | 3.27E-02                     |
| 45 | Homo sapiens Kruppel-like factor 8 (KLF8), mRNA. /PROD=Kruppel-like factor 8 /FL=gb:U28282.1 gb:NM_007250.1  | 0.326119                                      | 2.825   | 1.63929                                   | 3.92E-02                     |
|    | hypothetical protein DKFZp434F2322   | 0.070576                                      | 2.58185   | 1.42121                                   | 5.81E-03                     |
| 50 | Homo sapiens transcription factor 2, hepatic; LF-B3; variant hepatic nuclear factor (TCF2), transcript variant a, mRNA. /PROD=transcription factor 2, isoform a /FL=gb:NM_000458.1 | -1.12537                                      | 3.45355   | 2.54347                                   | 1.15E-02                     |
|    | H2A histone family, member X   | 1.37085                                       | 2.48515   | -0.04057                                  | 1.34E-02                     |
| 55 | Homo sapiens H1 histone family, member X (H1FX), mRNA. /PROD=H1 histone family, member X /FL=gb:D64142.1 gb:BC000426.1 gb:NM_006026.1  | 3.21701                                       | 5.68105   | 4.50969                                   | 4.29E-03                     |
|    | ESTs, Weakly similar to KIAA1399 protein (H.sapiens)   | -0.831241                                     | 2.82364   | 2.79997                                   | 4.18E-02                     |
| 60 | Homo sapiens PNAS-145 mRNA, complete cds. /PROD=PNAS-145 /FL=gb:U03105.1 gb:NM_006813.1 gb:AF279899.1  | 2.84962                                       | 5.38084   | 4.2868                                    | 8.61E-03                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 <sup>a</sup> en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin) (EPB49), mRNA. /PROD=erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin) /FL=gb:NM_001978.1 gb:U28389.1  | -0.306603                                     | 2.11391   | 0.923806                                  | 4.81E-03                     |
| 15 | ESTs  | 0.783545                                      | 3.23146   | 2.07738                                   | 2.13E-02                     |
| 15 | ESTs  | 1.17515                                       | 3.61815   | 2.46265                                   | 1.56E-03                     |
| 15 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4   | 2.09472                                       | 5.82355   | 5.68859                                   | 3.63E-02                     |
| 20 | Novel human mRNA from chromosome 22. /PROD=hypothetical protein   | -0.533665                                     | 3.44679   | 3.05803                                   | 3.99E-02                     |
| 20 | Homo sapiens partial mRNA for putative nuclear factor. /PROD=putative nuclear factor /FL=gb:NM_017688.1   | 1.55224                                       | 3.89366   | 2.67866                                   | 1.53E-03                     |
| 25 | Homo sapiens BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNIP3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA. /PROD=BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 /FL=gb:AF002697.1 gb:NM_004052.2 gb:U15174.1 | 4.51142                                       | 6.99506   | 5.92755                                   | 2.25E-03                     |
| 30 | Homo sapiens bone morphogenetic protein 5 (BMP5), mRNA. /PROD=bone morphogenetic protein 5 /FL=gb:M60314.1 gb:NM_021073.1   | -0.6099                                       | 1.76351   | 0.614791                                  | 6.46E-03                     |
| 35 | Homo sapiens nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (NR0B1), mRNA. /PROD=adrenal hypoplasia protein /FL=gb:NM_000475.2   | -0.213822                                     | 4.14059   | 3.29782                                   | 3.42E-02                     |
| 40 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434P228 (from clone DKFZp434P228)  | 1.76846                                       | 4.196   | 3.11284                                   | 1.23E-02                     |
| 40 | Homo sapiens pilin-like transcription factor (PILB), mRNA. /PROD=pilin-like transcription factor /FL=gb:AF122004.1 gb:NM_012228.1   | 3.14467                                       | 5.51066   | 4.38212                                   | 3.80E-03                     |
| 45 | Homo sapiens complement component 5 (C5), mRNA. /PROD=complement component 5 /FL=gb:M57729.1 gb:NM_001735.1   | -1.89639                                      | 1.65637   | 1.59643                                   | 1.74E-02                     |
| 50 | Homo sapiens adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit (AP3B2), mRNA. /PROD=adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit /FL=gb:AF022152.1 gb:NM_004644.1 gb:U37673.1                                      | -0.208283                                     | 2.17404   | 1.07398                                   | 1.39E-02                     |
| 55 | Homo sapiens dynein, axonemal, light polypeptide 4 (DNAL4), mRNA. /PROD=dynein, axonemal, light polypeptide 4 /FL=gb:BC002968.1 gb:NM_005740.1  | 0.458271                                      | 2.88755   | 1.8494                                    | 3.66E-03                     |
| 55 | Homo sapiens, Similar to RIKEN cDNA C330013D18 gene, clone MGC:11226, mRNA, complete cds  | 0.087468                                      | 2.45867   | 1.42701                                   | 3.35E-03                     |
| 60 | Homo sapiens cDNA: FLJ22731 fis, clone HSI15841. ESTs   | -2.30948                                      | 1.62817   | 2.24143                                   | 4.15E-02                     |
| 60 | Homo sapiens CXCR4 gene encoding receptor CXCR4   | 0.532996                                      | 4.6172  | 3.79228                                   | 2.76E-02                     |
| 60 | Homo sapiens CXCR4 gene encoding receptor CXCR4   | 3.11086                                       | 7.24917   | 6.36084                                   | 3.13E-02                     |
| 65 | stanniocalcin 1   | 2.48686                                       | 6.20245   | 5.70081                                   | 4.94E-02                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | KIAA0761 protein ESTs  | -2.09591                                      | 1.57935   | 1.05907                                   | 1.86E-02                     |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ36116 fis, clone TESTI2022338.  | -1.16374                                      | 2.24964   | 2.52108                                   | 3.83E-02                     |
|    |  | 3.02587                                       | 6.7146  | 6.15456                                   | 3.88E-02                     |
| 15 | Homo sapiens, clone MGC:24252 IMAGE:3932604, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:24252) /FL=gb:BC014364.1   | -1.53346                                      | 2.53854   | 1.59251                                   | 3.91 E-03                    |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ13392 fis, clone PLACE1001280   | -1.90184                                      | 1.76129   | 1.16856                                   | 1.47E-02                     |
| 20 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ12538 similar to ras-related protein RAB17 (FLJ12538), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ12538 similar toras-related protein RAB17 /FL=gb:AL136645.1    | 1.70617                                       | 5.11419   | 4.73391                                   | 2.71E-02                     |
| 25 | gb:NM_022449.1   |   |   |   |                              |
|    | Human DNA sequence from clone RP11-446H13 on chromosome 10.  | -0.889422                                     | 2.90076   | 2.11955                                   | 3.52E-02                     |
| 30 | Contains the 3 end of the gene for a novel protein similar to KIAA1059 (ortholog of mouse VPS10 domain receptor protein SORCS), an RPL23A (60S ribosomal protein 23A) pseudogene, ESTs, STS an |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens calmegin (CLGN), mRNA. /PROD=calmegin /FL=gb:NM_004362.1  | -0.104278                                     | 2.97817   | 3.11092                                   | 1.89E-02                     |
| 35 | gb:D86322.1  |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens testican 3 (HSAJ1454), mRNA. /PROD=testican 3 /FL=gb:NM_016950.1  | -2.81226                                      | 0.7939  | 1.55068                                   | 3.99E-02                     |
| 40 | gb:BC000460.1 gb:BC003017.1  |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens gelsolin (amyloidosis, Finnish type) (GSN), mRNA. /PROD=gelsolin (amyloidosis, Finnish type) /FL=gb:NM_000177.1   | 1.6198  | 4.54047   | 4.45008                                   | 1.07E-02                     |
| 45 | Homo sapiens endothelin receptor type A (EDNRA), mRNA. /PROD=endothelin receptor type A /FL=gb:NM_001957.1 gb:L06622.1   | 0.763007                                      | 4.05983   | 3.55203                                   | 3.99E-02                     |
|    | Homo sapiens cDNA: FLJ22808 fis, clone KAIA2925.   | -0.367449                                     | 2.7584  | 2.41394                                   | 4.31E-02                     |
| 50 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ10312 (FLJ10312), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ10312 /FL=gb:NM_030672.1  | 1.59498                                       | 4.6335  | 4.89157                                   | 4.85E-02                     |
|    | Homo sapiens lipase mRNA, complete cds. /PROD=lipase /FL=gb:AF225418.1   | -2.2131                                       | 1.0208  | 0.55849                                   | 3.57E-02                     |
| 55 | Homo sapiens clone FLC1492 PRO3121 mRNA, complete cds. /PROD=PRO3121 /FL=gb:AF130082.1   | -0.300037                                     | -0.46894  | -3.39203                                  | 1.80E-02                     |
|    | protease, serine, 4 (trypsin 4, brain)   | -0.345569                                     | 2.86256   | 3.35886                                   | 4.65E-02                     |
| 60 | Homo sapiens ret finger protein-like 2 (RFPL2), mRNA. /PROD=ret finger protein-like 2 /FL=gb:NM_006605.1   | -2.15511                                      | 1.1797  | 0.503917                                  | 1.94E-02                     |
|    | Homo sapiens beta3GalNAcT-1 mRNA for globoside synthase, complete cds, clone type 2. /PROD=globoside   | -2.73257                                      | 0.21269   | -0.0984                                   | 2.48E-02                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y     |
|----|--|---|---|---|----------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                                  |
| 10 | synthase /FL=gb:AB050856.1<br>Homo sapiens hypothetical protein FLJ11155 (FLJ11155), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ11155 /FL=gb:NM_018342.1  | -3.34565                                      | -0.42738  | -0.71255                                  | 3.07E-02                         |
| 15 | Homo sapiens, dual specificity phosphatase 4, clone MGC:3713, mRNA, complete cds. /PROD=dual specificity phosphatase 4 /FL=gb:NM_001394.2 gb:BC002671.1 gb:U48807.1 gb:U21108.1  | 2.11487                                       | 5.16681   | 5.60057                                   | 3.11E-02                         |
| 20 | Homo sapiens MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 6 (MADH6), mRNA. /PROD=MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 6 /FL=gb:U59914.1 gb:NM_005585.1   | 0.917516                                      | 4.29847   | 3.5309                                    | 2.44E-02                         |
| 25 | secreted frizzled-related protein 1 /FL=gb:AF056087.1 gb:NM_003012.2 gb:AF017987.1 gb:AF001900.1   | 1.64933                                       | 4.41286   | 4.21799                                   | 4.12E-02                         |
| 30 | Homo sapiens secreted apoptosis related protein 2 (SARP2) mRNA, complete cds. /PROD=secreted apoptosis related protein 2 /FL=gb:AF056087.1 gb:NM_003012.2 gb:AF017987.1 gb:AF001900.1  | 3.18446                                       | 5.9316  | 5.74251                                   | 3.31E-02                         |
| 35 | KIAA0882 protein<br>Homo sapiens nudix (nucleoside diphosphate linked moietyX)-type motif 4 (NUDT4), mRNA. /PROD=nudix (nucleoside diphosphate linked moietyX)-type motif 4 /FL=gb:NM_019094.1 gb:AF191653.1 gb:AF191649.1 gb:AF191650.1 | 2.05587<br>3.91519                            | 4.63577<br>6.54632                                    | 4.67451<br>6.42767                        | 4.89E-02<br>4.63E-02             |
| 40 | Homo sapiens cDNA FLJ31061 fis, clone HSYRA2000927.  | -1.30452                                      | 2.06218   | 1.20749                                   | 1.72E-02                         |
| 45 | Homo sapiens diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase type 2 beta (NUDT4) mRNA, complete cds.<br>/PROD=diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase type 2 beta /FL=gb:NM_019094.1 gb:AF191653.1 gb:AF191649.1 gb:AF191650.1 | 2.62612                                       | 5.53515   | 5.12935                                   | 3.96E-02                         |
| 50 | Homo sapiens titin (TTN), mRNA. /PROD=titin /FL=gb:NM_003319.1   | -0.466154                                     | 2.46856   | 2.00309                                   | 4.18E-03                         |
| 55 | carboxypeptidase E /FL=gb:NM_001873.1<br>ESTs<br>Homo sapiens hypothetical protein FLJ39502 (FLJ39502), mRNA. /FL=gb:NM_173648.1   | 2.72316<br>-1.80443<br>-1.60435               | 5.80072<br>0.692933<br>1.6149                         | 5.15668<br>0.613229<br>2.4204             | 2.99E-02<br>1.46E-03<br>2.10E-02 |
| 60 | Homo sapiens renal tumor antigen (RAGE), mRNA. /PROD=renal tumor antigen /FL=gb:NM_014226.1 gb:AB022694.1  | -0.305406                                     | 2.4556  | 2.09136                                   | 3.30E-02                         |
| 65 | T-box 3 (ulnar mammary syndrome)   | -1.70952                                      | 1.31576   | 0.679584                                  | 1.29E-02                         |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAP3K8), mRNA. /PROD=mitogen-activated protein kinase kinase kinase8 /FL=gb:NM_005204.1 gb:D14497.1  | -1.14241                                      | 1.82177   | 1.23928                                   | 2.48E-02                     |
| 15 | Homo sapiens enoyl-Coenzyme A, hydratase3-hydroxyacyl Coenzym eA dehydrogenase (EHHADH), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA. /PROD=enoyl-Coenzyme A, hydratase3-hydroxyacylCoenzyme A dehydrogenase /FL=gb:NM_001966.1 gb:L07077.1 | 0.226733                                      | 3.18231   | 2.59938                                   | 6.22E-03                     |
| 20 | ESTs  | 1.65525                                       | 3.9984  | 3.98375                                   | 1.97E-02                     |
|    | Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), mRNA. /PROD=secreted frizzled-related protein 1 /FL=gb:AF056087.1 gb:NM_003012.2 gb:AF017987.1 gb:AF001900.1  | 3.91678                                       | 7.18429   | 6.24313                                   | 2.35E-02                     |
| 25 | ESTs  | 2.28659                                       | 5.21675   | 4.59884                                   | 3.11E-02                     |
|    | Homo sapiens selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1), mRNA. /PROD=selenoprotein P precursor /FL=gb:NM_005410.1   | 2.73332                                       | 5.13625   | 5.04138                                   | 1.75E-02                     |
| 30 | hypothetical protein FLJ 12838 /FL=gb:NM_024641.1   | 2.21522                                       | 5.4785  | 4.50835                                   | 4.55E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761M1216 (from clone DKFZp761M1216)  | -2.59761                                      | 0.092924  | -0.31569                                  | 4.19E-02                     |
| 35 | Homo sapiens KPL1 (KPL1) mRNA, complete cds. /PROD=KPL1 /FL=gb:AF081583.1 gb:U89715.1 gb:NM_021200.1  | -0.08886                                      | 2.51294   | 2.15967                                   | 1.97E-02                     |
| 40 | Homo sapiens, synovial sarcoma, X breakpoint 1, clone MGC:5162, mRNA, complete cds. /PROD=synovial sarcoma, X breakpoint 1 /FL=gb:BC001003.2 gb:NM_005635.1   | -1.57209                                      | 1.39869   | 2.12662                                   | 6.84E-03                     |
| 45 | Homo sapiens, Similar to testican 3, clone MGC:8506, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to testican 3 /FL=gb:NM_016950.1 gb:BC000460.1 gb:BC003017.1   | -2.778  | 0.563149  | 1.66935                                   | 1.87E-02                     |
|    | ESTs  | 0.502949                                      | 3.0682  | 2.72874                                   | 2.02E-02                     |
| 50 | Homo sapiens cDNA FLJ32963 fis, clone TESTI2008405.   | 1.49644                                       | 3.87336   | 3.68478                                   | 6.89E-03                     |
|    | triadin /FL=gb:U18985.1 gb:NM_006073.1  | -1.61408                                      | 0.713083  | 0.566175                                  | 1.87E-02                     |
|    | Homo sapiens adlican mRNA, complete cds. /PROD=adlican /FL=gb:AF245505.1  | 0.872786                                      | 3.20404   | 3.02406                                   | 4.21 E-02                    |
| 55 | Human midkine mRNA, complete cds. /PROD=midkine /FL=gb:NM_002391.1 gb:M69148.1  | 3.55275                                       | 5.93819   | 5.68363                                   | 1.89E-02                     |
|    | Homo sapiens, synovial sarcoma, X breakpoint 4, clone MGC:12411, mRNA, complete cds. /PROD=synovial sarcoma, X breakpoint 4 /FL=gb:BC005325.1   | -0.806785                                     | 1.90972   | 2.5215                                    | 4.17E-02                     |
| 60 | ESTs  | -3.61193                                      | -0.9408   | -1.53439                                  | 2.43E-03                     |
|    | ESTs  | -0.619714                                     | 1.93617   | 1.44843                                   | 4.14E-02                     |
| 65 |   |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 <sup>a</sup> en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|--|---|---|------------------------------|
| 5  |  |  |   |   |                              |
| 10 | ESTs<br>Homo sapiens flavin containing monooxygenase 5 (FMO5), mRNA. /PROD=flavin containing monooxygenase 5 /FL=gb:L37080.1<br>gb:NM_001461.1   | 0.446983<br>-0.476203                    | 3.14315<br>1.99948  | 2.48676<br>1.55491                        | 1.98E-02<br>3.73E-02         |
| 15 | Homo sapiens aminopeptidase A mRNA, complete cds. /PROD=aminopeptidase A /FL=gb:L12468.1<br>gb:NM_001977.1 gb:L14721.1   | -0.758987                                | 2.07596   | 1.20831                                   | 3.00E-02                     |
| 20 | Homo sapiens hypothetical protein DKFZp761H1710 (DKFZP761H1710), mRNA. /PROD=hypothetical protein DKFZp761H1710 /FL=gb:NM_031297.1<br>ESTs   | -0.713164<br>-1.94194                    | 2.03145<br>0.608912   | 1.24823<br>0.013238                       | 2.17E-03<br>1.72E-02         |
| 25 | Homo sapiens sialyltransferase 8 (alpha-2, 8-polysialyltransferase) D (SIAT8D), mRNA. /PROD=sialyltransferase 8 (alpha-2,8-polysialyltransferase) D /FL=gb:NM_005668.1<br>gb:L41680.1  | -1.07243                                 | 1.83889   | 0.855205                                  | 2.16E-02                     |
| 30 | Homo sapiens, clone IMAGE:5194204, mRNA.<br>hypothetical protein MGC4342 /FL=gb:NM_024329.1<br>gb:BC003033.1   | -2.13256<br>-0.403018                    | 0.383746<br>2.01722   | 1.02639<br>1.41263                        | 4.55E-02<br>1.97E-02         |
| 35 | Homo sapiens PHD finger protein 1 (PHF1), transcript variant 2, mRNA. /PROD=PHD finger protein 1, isoform b /FL=gb:NM_024165.1 gb:AF052205.1<br>adinin, alpha 4  | 0.620171<br>0.436893                     | 2.95191<br>3.11051  | 2.42296<br>2.23625                        | 2.32E-02<br>5.44E-03         |
| 40 | Homo sapiens PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1), mRNA. /PROD=PCTAIRE protein kinase 1 /FL=gb:NM_006201.1<br>Human DNA sequence from clone RP11-165F24 on chromosome 9. Contains the 3 end of the gene for a novel protein (similar to Drosophila CG6630 and CG11376, KIAA1058, rat | 2.38171<br>0.167347                      | 4.87071<br>2.56439  | 4.16957<br>1.93736                        | 2.90E-03<br>3.93E-02         |
| 45 | TRG), an RPL12 (60S ribosomal protein L12) pseudogene, ESTs, STSs, GSSs and a C...<br>insulin-like growth factor binding protein 3<br>/FL=gb:NM_000598.1   | 0.921068                                 | 3.60279   | 2.67905                                   | 4.80E-02                     |
| 50 | Homo sapiens, clone IMAGE:3840937, mRNA, partial cds. /PROD=Unknown (protein for IMAGE:3840937)  | 3.59778                                  | 6.12936   | 6.92649                                   | 8.62E-05                     |
| 55 | Homo sapiens phosphoglucomutase 1 (PGM1), mRNA. /PROD=phosphoglucomutase 1 /FL=gb:NM_002633.1 gb:BC001756.1 gb:M83088.1<br>apolipoprotein C-I  | 4.74364<br>2.77701                       | 7.09524<br>5.23054  | 6.43056<br>4.44049                        | 2.21E-02<br>3.39E-02         |
| 60 | Homo sapiens insulin induced gene 1 (INSIG1), mRNA. /PROD=insulin induced gene 1 /FL=gb:NM_005542.1<br>Human alpha6(IV) collagen (COL4A6) mRNA, complete cds. /PROD=A type IV collagen /FL=gb:U04845.1   | 2.11462<br>0.798849                      | 4.44128<br>3.23623  | 3.77765<br>2.41372                        | 3.21E-02<br>1.38E-03         |
| 65 |  |  |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens mRNA for alpha 1,6-fucosyltransferase, complete cds. /PROD=alpha 1,6-fucosyltransferase /FL=gb:AB049740.2   | 1.31479                                       | 3.6699  | 2.90742                                   | 3.48E-02                     |
|    | ESTs, Moderately similar to Six5 (M.musculus)  | 0.434259                                      | 2.81512   | 1.9556                                    | 1.23E-02                     |
| 15 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 /FL=gb:NM_006931.1 gb:M20681.1   | 5.23156                                       | 7.63734   | 6.74444                                   | 1.99E-02                     |
|    | Human acid sphingomyelinase (ASM) mRNA, complete cds. /PROD=acid sphingomyelinase /FL=gb:NM_000543.1 gb:M59916.1   | 1.03965                                       | 3.45689   | 2.52125                                   | 2.62E-02                     |
| 20 | ESTs, Weakly similar to unnamed protein product (H.sapiens)  | 3.0131  | 5.41021   | 4.46614                                   | 4.79E-03                     |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ33178 fis, clone ADRGL2002753.  | 0.137476                                      | -1.9718   | -4.73502                                  | 2.23E-03                     |
| 25 | Homo sapiens, parathyroid hormone-like hormone, clone MGC:14611, mRNA, complete cds. /PROD=parathyroid hormone-like hormone /FL=gb:BC005961.1  | 2.46289                                       | -0.34647  | -1.96791                                  | 3.05E-02                     |
| 30 | Homo sapiens colon carcinoma related protein (LOC51159), mRNA. /PROD=colon carcinoma related protein /FL=gb:NM_016206.1 gb:AF099505.1  | 2.50614                                       | -0.01889  | -1.04926                                  | 2.52E-02                     |
|    | KIAA0036 gene product  | 3.05174                                       | -0.66523  | -2.2068                                   | 2.62E-02                     |
| 35 | Homo sapiens cDNA FLJ13536 fis, clone PLACE1006521   | 4.27968                                       | 1.86625   | 1.70965                                   | 1.11E-02                     |
|    | Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126  | 3.68063                                       | 1.24806   | 1.39728                                   | 1.42E-02                     |
| 40 | Homo sapiens UDP-N-acetylglucosamine:a-1,3-D-mannoside beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV-homolog (HGNT-IV-H), mRNA. /PROD=UDP-N-acetylglucosamine:a-1,3-D-mannosidebeta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV-homolog /FL=gb:AB024729.1 gb:NM_0 | 2.71164                                       | 0.270906  | 0.433883                                  | 1.98E-02                     |
| 45 | tissue factor pathway inhibitor 2 /FL=gb:D29992.1 gb:L27624.1 gb:NM_006528.1 gb:BC005330.1   | 4.19529                                       | 1.63281   | 1.58393                                   | 7.53E-03                     |
|    | ESTs   | 2.8924  | 0.521234  | 0.762594                                  | 2.82E-02                     |
|    | putative gene product  | -0.518738                                     | -0.66615  | 1.82038                                   | 4.91 E-02                    |
| 50 | Homo sapiens mRNA for KIAA1758 protein, partial cds. /PROD=KIAA1758 protein  | 2.42082                                       | -0.03923  | 0.213473                                  | 1.25E-02                     |
|    | prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) /FL=gb:L25124.1 gb:D28472.1 gb:NM_000958.1 gb:L28175.1  | 2.58497                                       | 0.196846  | 0.527172                                  | 1.42E-02                     |
| 55 | Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126  | 2.85068                                       | 0.473875  | 0.830447                                  | 1.97E-02                     |
|    | Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 (HS3ST2), mRNA. /PROD=heparan sulfate D-glucosaminyl3-O-sulfotransferase 2 /FL=gb:AF105375.1 gb:AF105374.1 gb:NM_006043.1  | 3.18462                                       | 0.571052  | 0.709206                                  | 4.54E-02                     |
| 60 |  |   |   |   |                              |
| 65 |  |   |   |   |                              |

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 <sup>a</sup> en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens schwannomin interacting protein 1 (SCHIP-1), mRNA. /PROD=schwannomin interacting protein 1 /FL=gb:AF145713.1 gb:NM_014575.1                            | 5.5957  | 3.21054   | 3.57915                                   | 2.11E-02                     |
|    | Human lysyl oxidase (LOX) gene, exon 7  | 2.11886                                       | -0.24936  | 0.138069                                  | 2.55E-03                     |
| 15 | Human nephropontin mRNA, complete cds. /PROD=nephropontin /FL=gb:M83248.1   | 7.82555                                       | 5.27856   | 5.06542                                   | 4.61E-02                     |
|    | Human mRNA for KIAA0386 gene, complete cds. /FL=gb:AB002384.1   | 3.9213  | 1.56305   | 1.13663                                   | 1.93E-02                     |
| 20 | ESTs  | 3.22146                                       | 0.851355  | 0.404487                                  | 3.41 E-03                    |
|    | Human glioma pathogenesis-related protein (GliPR) mRNA, complete cds. /PROD=glioma pathogenesis-related protein /FL=gb:NM_006851.1 gb:U16307.1                      | 3.20187                                       | 0.502872  | 0.348681                                  | 1.34E-02                     |
|    | ESTs  | 2.96697                                       | 0.440894  | 0.773495                                  | 1.97E-02                     |
| 25 | Homo sapiens cDNA FLJ13384 fis, clone PLACE1001062, highly similar to Homo sapiens mRNA for lysine-ketoglutarate reductasesaccharopine dehydrogenase.               | 5.9221  | 3.48419   | 3.9531                                    | 3.38E-02                     |
| 30 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp76111912 (from clone DKFZp76111912)  | 6.06894                                       | 3.31919   | 3.4798                                    | 4.97E-02                     |
|    | ESTs  | 4.12419                                       | 1.53997   | 1.88239                                   | 5.68E-03                     |
| 35 | Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 2 (basic) /FL=gb:NM_002006.1 gb:M27968.1                               | 5.49297                                       | 2.64534   | 2.76054                                   | 4.71E-02                     |
|    | ribosomal protein L34 pseudogene 1  | 3.45116                                       | 2.78236   | 5.10812                                   | 2.42E-02                     |
| 40 | HIV-1 rev binding protein 2   | 4.4245  | 1.47599   | 1.52824                                   | 2.10E-02                     |
|    | H.sapiens FGF gene, exon 3 /FL=gb:NM_000800.1 gb:M13361.1   | 2.04849                                       | -0.34703  | -0.95745                                  | 3.33E-02                     |
|    | ESTs  | 2.03304                                       | -0.9164   | -0.83676                                  | 4.19E-02                     |
|    | ESTs  | 2.87393                                       | 0.428858  | 1.02011                                   | 9.72E-04                     |
| 45 | Homo sapiens clone 23700 mRNA sequence  | 4.60148                                       | 1.64243   | 1.72052                                   | 4.74E-02                     |
|    | ESTs, Highly similar to S21424 nestin (H.sapiens)   | 3.08579                                       | 0.725853  | 1.40345                                   | 1.99E-02                     |
| 50 | Homo sapiens actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACTG2), mRNA. /PROD=actin, gamma 2 propeptide /FL=gb:NM_001615.2   | 7.17155                                       | 4.15208   | 4.18551                                   | 4.72E-02                     |
|    | hypothetical protein FLJ22833   | 2.80785                                       | 0.480636  | 1.25154                                   | 2.43E-02                     |
|    | Homo sapiens LIM homeobox protein 6 (LHX6), mRNA. /PROD=LIM homeobox protein 6 /FL=gb:AB031041.1 gb:NM_014368.1 gb:AL136570.1                                       | 2.52571                                       | -0.06036  | 0.459727                                  | 4.37E-02                     |
| 55 | Homo sapiens, clone IMAGE:5271039, mRNA.  | 3.05576                                       | 0.189935  | 0.452681                                  | 4.05E-02                     |
| 60 | Homo sapiens cAMP response element-binding protein CRE-BPa (H_GS165L15.1), mRNA. /PROD=cAMP response element-binding protein CRE-BPa /FL=gb:NM_004904.1 gb:L05911.1 | 2.90971                                       | 0.487264  | 1.21334                                   | 4.24E-02                     |
| 65 | G protein-coupled receptor 1 /FL=gb:NM_005279.1   | 1.15804                                       | -1.24345  | -0.49352                                  | 2.28E-03                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1 (NETO1), transcript variant 3, mRNA.<br>/PROD=neuropilin-and tolloid-like protein 1 isoform 3precursor /FL=gb:AF448838.1 gb:NM_138966.2 | 3.25525                                       | 0.20233   | 0.301354                                  | 2.83E-02                     |
| 15 | Homo sapiens mRNA for KIAA0559 protein, partial cds. /PROD=KIAA0559 protein  | 2.37088                                       | -0.29358  | 0.199028                                  | 2.81 E-02                    |
|    | Human 65-kilodalton phosphoprotein (p65) mRNA, complete cds. /PROD=phosphoprotein p65<br>/FL=gb:M22300.1 gb:NM_002298.2 gb:J02923.1  | 3.25522                                       | 0.620942  | 1.15317                                   | 2.88E-02                     |
| 20 | Human DNA sequence from clone RP11-31K16 on chromosome 9. Contains a snoRNA binding domain pseudogene, the ELAVL2 gene for   | 4.77522                                       | 2.18971   | 2.77459                                   | 4.04E-02                     |
| 25 | ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2, ESTs, STSs, GSSs and a CpG island   |   |   |   |                              |
|    | hypothetical protein FLJ11006  | 1.75389                                       | -0.66646  | 0.100591                                  | 7.78E-04                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566A1046 (from clone DKFZp566A1046)   | 3.97344                                       | 1.32598   | 1.8683                                    | 3.19E-02                     |
| 30 | ESTs   | 4.13356                                       | 1.60769   | 2.27415                                   | 1.85E-02                     |
|    | H.sapiens gene from PAC 106H8.   | 3.05906                                       | -0.08711  | -0.13845                                  | 4.34E-02                     |
|    | Human T-cell receptor rearranged beta-chain V-region (V-D-J) mRNA, complete cds. /FL=gb:M15564.1   | 3.43862                                       | 0.94127   | 1.64514                                   | 5.31E-03                     |
| 35 | peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)   | 1.76352                                       | 0.908832  | 3.26124                                   | 2.19E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA for KIAA1597 protein, partial cds. /PROD=KIAA1597 protein  | 6.20675                                       | 3.06104   | 3.12403                                   | 1.78E-02                     |
| 40 | HIV-1 rev binding protein 2  | 3.54001                                       | 0.617783  | 0.325316                                  | 3.52E-02                     |
|    | Homo sapiens nidogen 2 (NID2), mRNA.<br>/PROD=nidogen 2 /FL=gb:NM_007361.1<br>gb:D86425.1  | 3.39549                                       | 0.915898  | 1.65422                                   | 4.70E-03                     |
| 45 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566A1046 (from clone DKFZp566A1046)   | 3.49826                                       | 0.859233  | 1.46022                                   | 3.01E-02                     |
|    | Homo sapiens muscleblind (Drosophila)-like (MBNL), mRNA. /PROD=muscleblind (Drosophila)-like<br>/FL=gb:NM_021038.1 gb:AB007888.1   | 3.53962                                       | 0.508166  | 0.298438                                  | 3.90E-02                     |
| 50 | hypothetical protein FLJ20163  | 5.26708                                       | 2.17148   | 2.01643                                   | 3.33E-02                     |
|    | KIAA0455 gene product  | 3.25374                                       | 0.057742  | -0.01612                                  | 2.66E-02                     |
|    | hypothetical protein FLJ22833 /FL=gb:NM_022837.1   | 2.93229                                       | 0.533105  | 1.40606                                   | 3.19E-02                     |
|    | ESTs   | 2.19313                                       | -0.32822  | 0.427128                                  | 1.87E-02                     |
| 55 | Homo sapiens NADPH oxidase 4 (NOX4), mRNA.<br>/PROD=NADPH oxidase 4 /FL=gb:AF261943.1<br>gb:NM_016931.1 gb:AF254621.1 gb:AB041035.1  | 5.57794                                       | 2.61602   | 2.28462                                   | 4.04E-02                     |
|    | ESTs   | 3.3266  | 0.840887  | 1.69605                                   | 0.00E+00                     |
| 60 | ESTs   | 1.99635                                       | -0.56359  | 0.236236                                  | 1.39E-02                     |

65

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens serumglucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA. /PROD=serumglucocorticoid regulated kinase /FL=gb:BC001263.1 gb:NM_005627.1 gb:AF153609.1  | 4.81433                                       | 2.46478   | 3.47797                                   | 2.02E-02                     |
| 15 | A kinase (PRKA) anchor protein 2 ESTs   | 6.03149<br>3.8522                             | 3.65135<br>1.17894                                    | 4.63469<br>0.483367                       | 1.17E-02<br>3.08E-02         |
|    | Homo sapiens similar to rat tricarboxylate carrier-like protein (BA108L7.2), mRNA. /PROD=similar to rat tricarboxylate carrier-likeprotein /FL=gb:NM_030971.1   | 1.74077                                       | -1.45032  | -1.24979                                  | 5.69E-04                     |
| 20 | Homo sapiens, lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3), clone MGC:2058, mRNA, complete cds. /PROD=lectin, galactoside-binding, soluble, 3(galectin 3) IFL=gb:NM_002306.1 gb:M35368.1 gb:BC001120.1 gb:M36682.1 gb:M57710.1 gb:AB006780.1      | 4.53668                                       | 1.85893   | 2.59596                                   | 3.84E-03                     |
| 25 | ESTs  | 1.06738                                       | -1.51321  | -0.67814                                  | 7.68E-03                     |
| 30 | Homo sapiens heptacellular carcinoma novel gene-3 protein (LOC51339), mRNA. /PROD=heptacellular carcinoma novel gene-3 protein /FL=gb:NM_016651.2 gb:AF251079.2   | 5.55437                                       | 3.02649   | 3.91576                                   | 2.22E-02                     |
| 35 | Homo sapiens, Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1, clone MGC:4078, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 /FL=gb:NM_015927.1 gb:BC001830.1 gb:AF116343.1               | 4.82642                                       | 2.07249   | 2.74019                                   | 1.03E-02                     |
| 40 | ESTs, Highly similar to FXD3_HUMAN FORKHEAD BOX PROTEIN D3 (H.sapiens)  | 3.81523                                       | 1.18624   | 1.98102                                   | 4.17E-02                     |
| 45 | ESTs  | 4.52094                                       | 1.70664   | 2.3196                                    | 2.78E-02                     |
| 50 | Homo sapiens potassium intermediatesmall conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2 (KCNN2), mRNA. /PROD=potassium intermediatesmall conductancecalcium-activated channel, subfamily N, member 2 /FL=gb:NM_021614.1 gb:AF239613.1       | 3.68048                                       | 0.897369  | 1.5433                                    | 1.32E-02                     |
|    | Homo sapiens transporter similar to yeast MRS2 (MRS2L), mRNA. /PROD=transporter similar to yeast MRS2 /FL=gb:AF288288.1 gb:NM_020662.1  | 5.68324                                       | 3.35483   | 4.46553                                   | 3.00E-03                     |
| 55 | Homo sapiens a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2) (ADAMTS5), mRNA. /PROD=a disintegrin and metalloprotease withthrombospondin motifs-5 preproprotein /FL=gb:NM_007038.1 gb:AF14209 | 4.54713                                       | 2.07152   | 1.10726                                   | 5.91 E-03                    |
| 60 | HIV-1 rev binding protein 2   | 3.85003                                       | 0.823769  | 0.407316                                  | 3.76E-02                     |
| 65 |   |   |   |   |                              |

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Human, parathyroid-like protein (associated with humoral hypercalcemia of malignancy) mRNA, complete cds. /FL=gb:J03580.1 | 1.73564                                       | -1.5631   | -1.41799                                  | 4.04E-02                     |
|    | ESTs  | 5.27633                                       | 2.76577   | 3.71542                                   | 1.39E-02                     |
|    | ESTs  | 1.7022  | -1.29085  | -0.81236                                  | 1.72E-02                     |
| 15 | pyruvate dehydrogenase phosphatase /FL=gb:NM_018444.1 gb:AF155661.1   | 6.62966                                       | 4.26189   | 5.37384                                   | 1.04E-03                     |
|    | ESTs  | 3.90566                                       | 1.11378   | 1.80307                                   | 1.57E-02                     |
| 20 | Homo sapiens DRM (DRM) mRNA, complete cds. /PROD=DRM /FL=gb:NM_013372.1 gb:AF110137.2 gb:AF045800.1 gb:AF154054.1         | 6.16645                                       | 3.12369   | 3.57831                                   | 1.59E-02                     |
|    | Homo sapiens cDNA: FLJ22769 fis, clone KAlA1316   | 2.36483                                       | -0.5543   | 0.025213                                  | 1.45E-04                     |
|    | ESTs  | 4.31647                                       | 1.44801   | 2.11226                                   | 2.19E-02                     |
| 25 | ESTs  | 1.24891                                       | -1.42983  | -0.57145                                  | 1.29E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586N012 (from clone DKFZp586N012)  | 2.85031                                       | 0.231102  | 1.16439                                   | 1.08E-02                     |
| 30 | jagged 1 (Alagille syndrome)  | 2.54951                                       | 0.151382  | 1.31733                                   | 4.46E-03                     |
|    | ESTs, Weakly similar to I38588 reverse transcriptase homolog (H. sapiens)   | 1.16209                                       | -1.26828  | -0.1187                                   | 3.40E-02                     |
|    | KIAA1339 protein  | 4.41803                                       | 2.09451   | 3.35786                                   | 3.90E-02                     |
| 35 | ESTs  | 3.83407                                       | 0.892884  | 1.56759                                   | 8.98E-03                     |
|    | DKFZP434D156 protein  | 4.42983                                       | 2.05154   | 3.28988                                   | 1.60E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA expressed only in placental villi, clone SMAP41.  | 3.84408                                       | 0.705031  | 1.20856                                   | 2.25E-02                     |
| 40 | RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)  | 2.7724  | 0.235409  | 1.34452                                   | 1.96E-02                     |
|    | KIAA0164 gene product /FL=gb:NM_014739.1 gb:D79986.1  | 4.99867                                       | 2.5327  | 3.72535                                   | 2.85E-02                     |
| 45 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761 M0111 (from clone DKFZp761M0111)   | 5.14752                                       | 2.61217   | 3.76652                                   | 3.78E-02                     |
|    | Homo sapiens NPD009 mRNA, complete cds. /PROD=NPD009 /FL=gb:NM_020686.1 gb:AF237813.1                                     | 2.15383                                       | -0.27664  | 0.990295                                  | 2.09E-03                     |
| 50 | muscleblind (Drosophila)-like /FL=gb:NM_021038.1 gb:AB007888.1  | 3.23823                                       | 0.467215  | 1.39628                                   | 7.60E-03                     |
|    | ESTs  | 4.49318                                       | 1.35004   | 1.91395                                   | 3.79E-02                     |
| 55 | muscleblind (Drosophila)-like /FL=gb:NM_021038.1 gb:AB007888.1  | 1.84877                                       | -0.57315  | 0.732468                                  | 8.06E-03                     |
|    | ESTs  | 6.068   | 3.42334   | 4.51189                                   | 1.89E-02                     |
|    | ESTs, Weakly similar to unnamed protein product (H.sapiens)   | 3.24528                                       | 0.740266  | 1.98306                                   | 3.89E-04                     |
| 60 | Human complement cytolysis inhibitor (CLI) mRNA, complete cds. /FL=gb:J02908.1 gb:NM_001831.1 gb:M64722.1 gb:M25915.1     | 6.50766                                       | 4.03647   | 5.33533                                   | 1.77E-02                     |
| 65 | ESTs  | 5.36759                                       | 2.42249   | 3.24765                                   | 3.23E-03                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | ESTs  | 0.957239                                      | -1.43055  | -0.04796                                  | 5.55E-04                     |
|    | transporter similar to yeast MRS2   | 3.77395                                       | 1.18311   | 2.36844                                   | 1.83E-02                     |
|    | Homo sapiens, Similar to regulator for ribosome resistance homolog (S. cerevisiae), clone MGC:2755, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to regulator for ribosome | 5.09957                                       | 2.72179   | 4.14116                                   | 2.72E-02                     |
| 15 | resistance homolog (S. cerevisiae) /FL=gb:BC001811.1  |   |   |   |                              |
| 20 | SWISNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 /FL=gb:NM_003070.1 gb:D26155.1                                 | 2.54229                                       | -0.29226  | 0.695255                                  | 1.89E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586L2424 (from clone DKFZp586L2424)  | 3.34446                                       | 0.795373  | 2.07147                                   | 1.03E-02                     |
| 25 | ESTs  | 4.63117                                       | 2.08252   | 3.36946                                   | 2.25E-03                     |
|    | Homo sapiens bicarbonate transporter-related protein BTR1 mRNA, complete cds. /PROD=bicarbonate transporter-related protein BTR1 /FL=gb:AF336127.1              | 3.17407                                       | 0.745852  | 2.17046                                   | 1.71E-03                     |
| 30 | ESTs  | 1.08377                                       | -1.27197  | 0.228305                                  | 4.76E-02                     |
|    | ESTs  | 2.94657                                       | 0.127188  | 1.20032                                   | 1.43E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434B2016 (from clone DKFZp434B2016).   | 2.47798                                       | -0.26439  | 0.894731                                  | 4.51E-03                     |
| 35 | ESTs  | 2.39983                                       | -1.04089  | -0.57976                                  | 3.37E-02                     |
|    | Homo sapiens synaptotagmin interacting protein STIP1 mRNA, partial cds. /PROD=synaptotagmin interacting protein STIP1   | 2.11009                                       | -0.57109  | 0.653181                                  | 1.78E-02                     |
| 40 | Homo sapiens connexin 26 (GJB2) mRNA, complete cds. /PROD=connexin 26 /FL=gb:NM_004004.1 gb:M86849.2  | 2.86049                                       | -0.57377  | -0.09328                                  | 4.27E-04                     |
|    | Homo sapiens brain-derived neurotrophic factor (BDNF), mRNA. /PROD=brain-derived neurotrophic factor /FL=gb:NM_001709.1   | 1.71599                                       | -0.79412  | 0.616733                                  | 3.09E-02                     |
| 45 | ESTs, Weakly similar to unknown (H.sapiens)   | 2.33677                                       | -0.04066  | 1.5217                                    | 1.87E-03                     |
|    | ESTs  | 2.57265                                       | 0.177794  | 1.74876                                   | 2.74E-04                     |
|    | ESTs  | 2.6809  | 0.209095  | 1.70624                                   | 1.21E-02                     |
| 50 | Homo sapiens DKC1 gene, exons 1 to 11   | 4.18307                                       | 1.70283   | 3.20863                                   | 2.00E-02                     |
|    | Homo sapiens T cell receptor beta chain (TCRBV13S1-TCRBJ2S1) mRNA, complete cds. /PROD=T cell receptor beta chain   | 4.45228                                       | 1.38318   | 2.30031                                   | 3.27E-03                     |
| 55 | /FL=gb:AF043179.1   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens PRO0066 mRNA, complete cds. /PROD=PRO0066 /FL=gb:AF113007.1  | 0.466715                                      | -1.87679  | -0.22665                                  | 4.25E-03                     |
|    | axonal transport of synaptic vesicles   | 5.20385                                       | 2.74124   | 4.27648                                   | 3.33E-03                     |
| 60 | Homo sapiens, Similar to cyclin M2, clone MGC:12933 IMAGE:4308662, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to cyclin M2 /FL=gb:BC021222.1                             | 0.139313                                      | -2.31405  | -0.76333                                  | 1.46E-02                     |
|    | Homo sapiens clone CDABP0095 mRNA sequence  | 3.87201                                       | 2.7936  | 5.73958                                   | 9.63E-03                     |
| 65 |   |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | H.sapiens mRNA for ribosomal protein L18a homologue. /PROD=ribosomal protein L18a homologue  | 2.00401                                       | 0.354674  | 2.73013                                   | 4.70E-04                     |
| 15 | ESTs, Weakly similar to ALU7_HUMAN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)   | 3.43639                                       | 0.843826  | 2.28468                                   | 3.37E-02                     |
|    | Homo sapiens, clone IMAGE:5242616, mRNA.   | -0.525567                                     | -2.07832  | 0.406964                                  | 2.23E-02                     |
| 20 | Homo sapiens C1orf24 mRNA, complete cds. /PROD=C1orf24/FL=gb:AF288391.1 gb:AB050477.1 gb:NM_022083.1   | 5.17968                                       | 2.58724   | 4.04213                                   | 1.98E-04                     |
|    | Homo sapiens clone IMAGE:451939, mRNA sequence   | 5.15776                                       | 2.22786   | 3.40438                                   | 2.60E-02                     |
| 25 | Homo sapiens cDNA FLJ14942 fis, clone PLACE1011185, highly similar to INSERTION ELEMENT IS1 PROTEIN INSB.  | 0.682724                                      | -2.08716  | -0.74074                                  | 1.45E-02                     |
|    | hypothetical protein FLJ20425 /FL=gb:NM_017816.1 gb:AL136750.1   | 4.23689                                       | 1.90847   | 3.69988                                   | 1.15E-02                     |
| 30 | Homo sapiens matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA. /PROD=matrix metalloproteinase 10 preproprotein /FL=gb:BC002591.1 gb:NM_002425.1   | 2.28308                                       | -0.65903  | 0.521586                                  | 8.87E-03                     |
| 35 | ESTs   | 3.67167                                       | 2.20619   | 4.86553                                   | 3.16E-03                     |
|    | Homo sapiens prominin (mouse)-like 1 (PROML1), mRNA. /PROD=prominin (mouse)-like 1 /FL=gb:NM_006017.1 gb:AF027208.1  | 5.46002                                       | 2.79737   | 4.29571                                   | 1.38E-03                     |
| 40 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434M2415 (from clone DKFZp434M2415).  | 2.40278                                       | -0.68409  | 0.399469                                  | 1.48E-02                     |
|    | Homo sapiens hypothetical protein FLJ20701 (FLJ20701), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ20701 /FL=gb:NM_017933.1  | 2.1471  | 0.312211  | 2.65409                                   | 2.28E-04                     |
| 45 | Homo sapiens cDNA FLJ35259 fis, clone PROST2004251.  | 6.79033                                       | 3.86627   | 5.12737                                   | 1.23E-03                     |
|    | Homo sapiens hypothetical protein FLJ39553 (FLJ39553), mRNA. /FL=gb:NM_173549.1  | 4.0369  | 1.34318   | 2.84336                                   | 7.69E-03                     |
| 50 | Human microfibril-associated glycoprotein-2 MAGP-2 mRNA, complete cds. /PROD=microfibril-associated glycoprotein-2 MAGP-2 /FL=gb:NM_003480.1 gb:U37283.1   | 3.89326                                       | 0.527618  | 1.35764                                   | 1.81E-03                     |
| 55 | Homo sapiens proprotein convertase subtilisinkexin type 5 (PCSK5), mRNA. /PROD=proprotein convertase subtilisinkexin type 5 /FL=gb:U56387.2 gb:NM_006200.1 | 3.76897                                       | 0.368734  | 1.17396                                   | 1.38E-02                     |
| 60 | Cluster Incl. A1735391:at10e09.x1 Homo sapiens cDNA, 3 end /clone=IMAGE-2354728 /clone_end=3 /gb=A1735391 /gi=5056915 /ug=Hs.20137 /len=567                | 2.59941                                       | 0.203564  | 2.03637                                   | 1.12E-04                     |
|    | ESTs   | 2.30031                                       | -1.01596  | -0.08964                                  | 1.46E-02                     |
| 65 | Kruppel-like factor 4 (gut)  | 3.50041                                       | 1.09954   | 2.95915                                   | 1.22E-02                     |

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens full length insert cDNA YI25A03 ESTs  | -1.40946                                      | -3.04877  | -0.39378                                  | 3.32E-02                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G02121 (from clone DKFZp761G02121); partial cds  | 0.806666                                      | -2.01081  | -0.53076                                  | 1.91E-02                     |
|    |  | 3.1892  | 0.012768  | 1.13562                                   | 1.35E-03                     |
| 15 | Homo sapiens TMEFF2 mRNA, complete cds. /FL=gb:AB017269.1 gb:NM_016192.2 gb:AF179274.2 gb:AF242222.1   | 2.28638                                       | -0.89508  | 0.225546                                  | 1.21E-03                     |
|    | Homo sapiens, clone MGC:3328, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:3328) /FL=gb:BC001745.1 gb:NM_014392.1  | 3.54625                                       | 0.772486  | 2.30168                                   | 4.16E-02                     |
| 20 | ESTs   | 2.18149                                       | -0.58303  | 0.984522                                  | 2.68E-02                     |
|    | synaptojanin 2   | 4.166   | 1.83143   | 3.84199                                   | 0.00E+00                     |
|    | KIAA0367 protein   | 1.5999  | -1.50555  | -0.26286                                  | 1.58E-02                     |
| 25 | ESTs, Moderately similar to ALU8_HUMAN ALU SUBFAMILY SX SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)   | 0.868185                                      | -1.46804  | 0.573078                                  | 1.69E-02                     |
|    | bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B   | 1.60872                                       | -1.12544  | 0.518361                                  | 2.11E-02                     |
| 30 | Human complement cytolytic inhibitor (CLI) mRNA, complete cds. /FL=gb:J02908.1 gb:NM_001831.1 gb:M64722.1 gb:M25915.1  | 6.61592                                       | 3.91665   | 5.596                                     | 1.66E-02                     |
|    | forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma) /FL=gb:NM_002015.2 gb:AF032885.1 gb:U02310.1   | 5.04975                                       | 2.59802   | 4.53545                                   | 1.60E-03                     |
| 35 | Homo sapiens cDNA: FLJ22727 fis, clone HS115054  | 4.88391                                       | 2.09093   | 3.68875                                   | 1.91E-02                     |
|    | cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) /FL=gb:D31784.1 gb:NM_004932.1   | 3.27371                                       | 0.243335  | 1.61199                                   | 2.74E-04                     |
| 40 | ESTs   | 3.97749                                       | 0.786845  | 1.99803                                   | 1.73E-02                     |
|    | endonuclease G-like 1 /FL=gb:AB020523.1 gb:NM_005107.1   | 1.11519                                       | -2.09018  | -0.88324                                  | 1.69E-02                     |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ13034 fis, clone NT2RP3001232   | 4.59641                                       | 0.64328   | 1.1121                                    | 1.66E-02                     |
| 45 | Human DNA sequence from clone RP4-61404 on chromosome 20q11.1-12 Contains the 3 part of the MMP24 (matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)) gene, the  | 2.91607                                       | 0.209555  | 1.92644                                   | 1.93E-02                     |
| 50 | ITGB4BP (integrin beta 4 binding protein) gene, the 3 end of a novel gene, the 3 end o...  |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens, collapsin response mediator protein-5; CRMP3-associated molecule, clone MGC:11247, mRNA, complete cds. /PROD=collapsin response mediator protein-5;CRMP3-associated molecule /FL=gb:BC002874.1 | 0.672753                                      | -1.75265 0  | 0.250803                                  | 8.65E-03                     |
| 55 | ESTs, Moderately similar to ALU7_HUMAN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)   | 2.91576                                       | 0.289656  | 2.10334                                   | 2.57E-03                     |
| 60 | ESTs, Moderately similar to CA1C RAT COLLAGEN ALPHA 1(XII) CHAIN (R.norvegicus)  | 6.2681  | 1.94518   | 1.82747                                   | 4.12E-02                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens alpha-aminoadipate semialdehyde synthase mRNA, complete cds. /PROD=alpha-aminoadipate semialdehyde synthase /FL=gb:AF229180.1  | 5.2604  | 2.72549   | 4.6685                                    | 4.33E-03                     |
| 15 | Homo sapiens Wnt inhibitory factor-1 (WIF-1), mRNA. /PROD=Wnt inhibitory factor-1 /FL=gb:AF122922.1 gb:NM_007191.1  | 1.03265                                       | -1.51207 0  | 0.433159                                  | 8.62E-05                     |
|    | ribosomal protein S11   | 4.95358                                       | 2.25158   | 4.04683                                   | 2.98E-04                     |
| 20 | Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), mRNA. /PROD=tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 /FL=gb:NM_007115.1  | 2.42729                                       | -0.73843  | 0.613222                                  | 1.93E-02                     |
|    | Homo sapiens hairyenhancer-of-split related with YRPW motif 2 (HEY2), mRNA. /PROD=hairyenhancer-of-split related with YRPW motif2 /FL=gb:NM_012259.1 gb:AF311884.1 gb:AB044755.1 gb:AF232238.1 gb:AF237949.1 gb:AF173901.1                                  | 2.3848  | -0.44154  | 1.27956                                   | 3.16E-03                     |
| 25 |   |   |   |   |                              |
| 30 | Homo sapiens semenogelin I (SEMGI), mRNA. /PROD=semenogelin I /FL=gb:J04440.1 gb:NM_003007.1  | 0.58581 6                                     | -2.46893  | -0.95223                                  | 3.05E-02                     |
|    | Homo sapiens, Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney), clone MGC:1470, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetalkidney) /FL=gb:BC000019.1   | 2.38648                                       | -0.02212  | 2.14359                                   | 2.59E-03                     |
| 35 |   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434H0350 (from clone DKFZp434H0350); partial cds. /PROD=hypothetical protein   | 2.16899                                       | -0.56794  | 1.27546                                   | 3.16E-03                     |
| 40 |   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 14 (GRB14), mRNA. /PROD=growth factor receptor-bound protein 14 /FL=gb:L76687.1 gb:NM_004490.1  | 4.2346  | 1.17569   | 2.73613                                   | 4.80E-03                     |
| 45 |   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens, Similar to TAF5-like RNA polymerase II, p300CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa, clone MGC:46101 IMAGE:5551246, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to TAF5-like RNA polymerase II, p300CBP-associated factor (PCAF)-associat | 2.10954                                       | -0.1313   | 2.24853                                   | 8.24E-04                     |
| 50 |   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761J1324 (from clone DKFZp761J1324)  | 1.42404                                       | -1.99222  | -0.77126                                  | 3.21E-02                     |
| 55 |   |   |   |   |                              |
|    | solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 antizyme inhibitor  | 2.82535                                       | 0.288493  | 2.38889                                   | 0.00E+00                     |
|    |   | 3.65887                                       | 0.37346   | 1.74912                                   | 1.86E-02                     |
|    | Homo sapiens GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha) (GRO1), mRNA. /PROD=GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha) /FL=gb:NM_001511.1   | 2.51473                                       | 0.107263  | 2.38874                                   | 7.16E-04                     |
| 60 |   |   |   |   |                              |
|    | Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (PCSK5), mRNA.   | 4.90999                                       | 0.871309  | 1.52441                                   | 1.71E-02                     |
| 65 |   |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | /PROD=proprotein convertase subtilisin/kexin type 5<br>/FL=gb:U56387.2 gb:NM_006200.1<br>ESTs  | 0.254736                                      | -1.96122  | 0.51777                                   | 4.00E-02                     |
|    | G-protein gamma-12 subunit /FL=gb:NM_018841.1<br>gb:AF119663.1   | 3.93653                                       | 1.06178   | 2.88889                                   | 5.11E-04                     |
| 15 | platelet-derived growth factor alpha polypeptide<br>clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40,<br>sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed<br>prostate message 2, apolipoprotein J)   | 3.50343                                       | 0.651246  | 2.50207                                   | 3.99E-03                     |
|    | ESTs   | 2.88196                                       | -0.42677  | 0.9712                                    | 8.48E-03                     |
| 20 | Homo sapiens insulinoma-associated 1 (INSM1),<br>mRNA. /PROD=insulinoma-associated 1<br>/FL=gb:NM_002196.1 gb:M93119.1   | 2.82081                                       | -1.69816  | -1.89985                                  | 4.10E-02                     |
|    | ESTs   | 2.94347                                       | 0.120494  | 2.02248                                   | 1.43E-03                     |
| 25 | LBP protein 32 /FL=gb:NM_014552.1 gb:AF198489.1<br>ESTs, Highly similar to T42654 hypothetical protein<br>DKFZp434G1115.1 (H.sapiens)  | 2.68546                                       | -0.16678  | 1.70626                                   | 1.87E-03                     |
|    | ESTs   | 2.84504                                       | 0.515703  | 2.95379                                   | 7.92E-04                     |
| 30 | Homo sapiens Friend leukemia virus integration 1<br>(FLI1), mRNA. /PROD=Friend leukemia virus<br>integration 1 /FL=gb:BC001670.1 gb:NM_002017.2<br>gb:M98833.3   | 1.7744  | -2.28064  | -1.56765                                  | 3.14E-02                     |
|    | ESTs   | 0.846429                                      | -2.42046  | -0.91891                                  | 1.57E-02                     |
| 35 | Homo sapiens oxidative 3 alpha hydroxysteroid<br>dehydrogenase; retinol dehydrogenase; 3-<br>hydroxysteroid epimerase (RODH), mRNA.<br>/PROD=oxidative 3 alpha hydroxysteroid<br>dehydrogenase; retinol dehydrogenase; 3-<br>hydroxysteroid epimerase /FL=gb:AF016509.1 gb:A | 1.30153                                       | -1.64227  | 0.196394                                  | 3.20E-03                     |
| 40 | minor histocompatibility antigen HA-1<br>UDP-glucose pyrophosphorylase 2   | 1.89498                                       | -0.37136  | 2.15157                                   | 4.61E-02                     |
|    | ESTs   | 4.26327                                       | 0.968939  | 2.4776                                    | 6.20E-03                     |
| 45 | Homo sapiens regulator of G-protein<br>signalling 2, 24kD (RGS2), mRNA. /PROD=regulator<br>of G-protein signalling 2, 24kD /FL=gb:L13463.1<br>gb:NM_002923.1   | 5.42952                                       | 3.05504   | 5.49711                                   | 1.21E-03                     |
|    | ESTs   | 4.49987                                       | 1.01623   | 2.35659                                   | 1.86E-03                     |
| 50 | ESTs   | 0.623422                                      | -1.94907  | 0.317138                                  | 8.95E-04                     |
|    | ESTs   | 0.326084                                      | -1.69499  | 1.13586                                   | 1.10E-02                     |
|    | ESTs   | 3.82952                                       | 0.673296  | 2.37112                                   | 3.92E-02                     |
|    | ESTs   | 2.80876                                       | -0.24405  | 1.56853                                   | 1.39E-02                     |
| 55 | Homo sapiens cDNA FLJ10160 fis, clone<br>HEMBA1003545, highly similar to INSULIN GENE<br>ENHANCER PROTEIN ISL-2.<br>thyroid hormone receptor-associated protein, 150kDa<br>subunit /FL=gb:NM_005119.1 gb:AF117756.1  | 4.66717                                       | 2.01883   | 4.2391                                    | 4.63E-03                     |
|    | ESTs   | 2.4548  | -0.3811   | 1.65212                                   | 4.08E-03                     |
| 60 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667D095 (from<br>clone DKFZp667D095)  | 3.13835                                       | 0.605922  | 2.95511                                   | 1.53E-03                     |

65

(continua)

|    | Título de Gen  | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|--|---|---|---|------------------------------|
| 5  |  |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens synaptojanin 2 mRNA, complete cds. /PROD=synaptojanin 2 /FL=gb:AF318616.1   | 2.94452                                       | 0.23595   | 2.4148                                    | 3.63E-04                     |
| 15 | Homo sapiens procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE), mRNA. /PROD=procollagen C-endopeptidase enhancer /FL=gb:BC000574.1 gb:NM_002593.2 gb:AB008549.1 gb:L33799.1  | 3.37999                                       | 0.343624  | 2.21149                                   | 1.46E-02                     |
|    | ESTs   | 3.24495                                       | 0.925809  | 3.52818                                   | 1.70E-04                     |
|    | Homo sapiens mRNA for KIAA0930 protein, partial cds. /PROD=KIAA0930 protein  | 3.65772                                       | 0.911608  | 3.09513                                   | 8.62E-05                     |
| 20 | Homo sapiens forkhead transcription factor FOXL2 (BPES), mRNA. /PROD=forkhead transcription factor FOXL2 /FL=gb:AF301906.1 gb:NM_023067.1  | 1.51993                                       | -2.14186  | -0.86243                                  | 3.75E-02                     |
|    | ESTs   | 1.9867  | -1.5948   | -0.2171                                   | 2.81 E-03                    |
| 25 | ESTs, Highly similar to AF174600 1 F-box protein Fbx20 (H.sapiens)   | 3.06175                                       | 0.202953  | 2.35691                                   | 2.45E-02                     |
|    | Homo sapiens ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) (ANK3), transcript variant 2, mRNA. /PROD=ankyrin 3, isoform 2 /FL=gb:NM_001149.1 gb:U43965.1  | 3.11644                                       | 0.101116  | 2.09865                                   | 2.90E-03                     |
| 30 | Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (TNFRSF6), mRNA. /PROD=apoptosis (APO-1) antigen 1 /FL=gb:NM_000043.1 gb:M67454.1  | 2.39086                                       | -1.04254  | 0.558779                                  | 1.62E-02                     |
| 35 | Homo sapiens thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme (TRHDE), mRNA. /PROD=thyrotropin-releasing hormone degradingectoenzyme /FL=gb:AF126372.1 gb:NM_013381.1  | 1.30849                                       | -1.50688  | 0.822517                                  | 4.91 E-02                    |
| 40 | ESTs   | 4.65711                                       | 0.915563  | 2.32327                                   | 6.29E-03                     |
|    | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564N1116 (from clone DKFZp564N1116)   | 2.36072                                       | -2.02594  | -1.25286                                  | 1.50E-02                     |
| 45 | Homo sapiens placental protein 13-like protein (LOC56891), mRNA. /PROD=placental protein 13-like protein /FL=gb:NM_020129.1 gb:AF267852.1  | 3.55894                                       | 0.434263  | 2.47085                                   | 3.48E-03                     |
| 50 | Homo sapiens, Similar to receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, clone MGC: 12687, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to receptor tyrosine kinase-like orphanreceptor 1 /FL=gb:BC006374.1                                  | 2.05578                                       | 0.178992  | 3.5007                                    | 4.46E-04                     |
|    | ESTs   | 0.159066                                      | -2.96514  | -0.84976                                  | 3.25E-02                     |
| 55 | Homo sapiens, Similar to v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, clone MGC:29755 IMAGE:3946751, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to v-ets avian erythroblastosis virusE26 oncogene homolog 1 /FL=gb:BC017314.1 | 2.22285                                       | -1.58562  | -0.1074                                   | 2.63E-02                     |
| 60 | ESTs, Highly similar to dedicator of cytokinesis 1 (H.sapiens)   | 0.83871                                       | -2.29829  | -0.12951                                  | 1.85E-02                     |
|    | ESTs   | 1.1465  | -1.7403   | 0.682768                                  | 3.99E-02                     |
|    | ESTs   | 1.7466  | -1.67509  | 0.283174                                  | 2.97E-03                     |
| 65 |  |   |   |   |                              |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | ESTs, Weakly similar to PMXB_HUMAN PAIRED MESODERM HOMEODOMAIN PROTEIN 2B (H.sapiens)   | 1.03192                                       | -2.44485  | -0.51457                                  | 1.87E-03                     |
|    | ESTs  | 3.22222                                       | -0.29339  | 1.59904                                   | 7.36E-03                     |
|    | Homo sapiens cDNA FLJ10561 fis, clone NT2RP2002672  | 2.295   | -1.60823  | -0.08369                                  | 3.93E-03                     |
| 15 | Homo sapiens, Similar to KIAA0441 gene product, clone MGC:45124 IMAGE:5578893, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to KIAA0441 gene product /FL=gb:BC036731.1   | 1.38545                                       | -1.60426  | 0.86909                                   | 2.33E-03                     |
| 20 | Homo sapiens, clone IMAGE:4067166, mRNA   | 0.195869                                      | -2.50507  | 0.276993                                  | 1.16E-03                     |
|    | ESTs  | 1.5857  | -2.61787  | -1.30022                                  | 1.12E-02                     |
|    | Homo sapiens methyl-CpG binding protein MBD2 (MBD2) mRNA, complete cds. /PROD=methyl-CpG binding protein MBD2 /FL=gb:NM_003927.2 gb:AF072242.1  | 0.490598                                      | -3.45465  | -1.70163                                  | 3.90E-03                     |
| 25 | KIAA1151 protein  | 0.642527                                      | -2.04288  | 1.00885                                   | 4.09E-03                     |
|    | H.sapiens mRNA for B-HLH DNA binding protein. /PROD=B-HLH DNA binding protein /FL=gb:NM_000474.1  | 5.43034                                       | 1.56039   | 3.45122                                   | 1.12E-04                     |
| 30 | Homo sapiens, Similar to hypothetical protein FLJ32001, clone MGC:39559 IMAGE:4828136, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to hypothetical protein FLJ32001 /FL=gb:BC036200.1   | 0.520711                                      | -1.99011  | 1.26899                                   | 2.63E-02                     |
| 35 | Homo sapiens Wilms tum or 1 (WT1), transcript variant D, mRNA. /PROD=Wilms tumor 1 isoform D /FL=gb:NM_024424.1 gb:NM_024426.1  | 2.40462                                       | -2.96375  | -2.43546                                  | 1.41E-02                     |
| 40 | ESTs  | 1.53104                                       | -1.54553  | 1.37309                                   | 8.14E-03                     |
|    | Homo sapiens, Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney), clone MGC:1470, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetalkidney) /FL=gb:BC000019.1   | 2.54746                                       | -0.69811  | 2.13419                                   | 1.45E-04                     |
| 45 | ESTs  | 0.133612                                      | -3.77953  | -1.56636                                  | 1.40E-02                     |
|    | paternally expressed 3  | 2.87581                                       | -1.67669  | -0.0118                                   | 2.17E-02                     |
| 50 | Homo sapiens Charot-Leyden crystal protein (CLC), mRNA. /PROD=Charot-Leyden crystal protein /FL=gb:NM_001828.3 gb:L01664.1  | 3.30086                                       | -0.41644  | 2.1096                                    | 2.08E-02                     |
|    | ESTs  | 3.26198                                       | -0.72777  | 1.5682                                    | 3.16E-03                     |
| 55 | Homo sapiens tachykinin, precursor 1 (substance K, substance P, neurokinin 1, neurokinin 2, neuromedin L, neurokinin alpha, neuropeptide K, neuropeptide gamma) (TAC1), transcript variant beta, mRNA. /PROD=tachykinin 2 precursor, isoform beta /FL=gb:U3 | 2.77265                                       | -1.02081  | 1.48319                                   | 4.07E-04                     |
| 60 | Homo sapiens PNAS-123 mRNA, complete cds  | 1.59659                                       | -1.46656  | 1.84663                                   | 3.90E-03                     |
| 65 |   |   |   |   |                              |

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini y Hochberg |
|----|---|---|---|---|------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                              |
| 10 | Homo sapiens hypothetical protein FLJ20075 (FLJ20075), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ20075 /FL=gb:NM_017655.1   | -0.359245                                     | -3.46654  | -0.06528                                  | 2.55E-03                     |
| 15 | Human platelet-derived growth factor alpha-receptor (PDGFRA) mRNA, exons 13-16  | 2.44464                                       | -0.5846   | 2.90484                                   | 3.63E-04                     |
| 15 | Homo sapiens cDNA: FLJ22547 fis, clone HSI00356   | 4.29365                                       | -0.10882  | 2.09548                                   | 1.54E-02                     |
| 15 | Homo sapiens HSPC156 protein (HSPC156), mRNA. /PROD=HSPC156 protein /FL=gb:NM_014178.1 gb:AF161505.1  | 0.786188                                      | -2.32161  | 1.29619                                   | 8.62E-05                     |
| 20 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586P1 124 (from clone DKFZp586P1 124)  | 0.485642                                      | -4.8524   | -3.09356                                  | 2.02E-02                     |
| 20 | caldesmon 1 /FL=gb:M64110.1 gb:NM_004342.2  | 7.09236                                       | 2.67863   | 5.63436                                   | 7.47E-03                     |
| 25 | Homo sapiens, Similar to hypothetical protein FLJ10058, clone MGC:34305 IMAGE:5167647, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to hypothetical protein FLJ10058 /FL=gb:BC034293.1                                 | 1.69808                                       | -2.74939  | 0.215566                                  | 1.92E-02                     |
| 30 | Homo sapiens, Similar to LIM homeobox protein 8, clone IMAGE:4839343, mRNA.   | -0.062884                                     | -4.30121  | -1.10961                                  | 1.16E-02                     |
| 30 | Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 4, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone 2, isoform4 /FL=gb:NM_022646.1   | 0.812166                                      | -2.21846  | 2.21843                                   | 3.60E-03                     |
| 35 | Homo sapiens HES-related repressor protein 1 HERP1 mRNA, complete cds. /PROD=HES-related repressor protein 1 HERP1 /FL=gb:NM_012259.1 gb:AF311884.1 gb:AB044755.1 gb:AF232238.1 gb:AF237949.1 gb:AF173901.1 | 2.80599                                       | -1.19396  | 2.40562                                   | 2.44E-03                     |
| 40 | Homo sapiens cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) (CDH6), mRNA. /PROD=cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) /FL=gb:D31784.1 gb:NM_004932.1   | 0.824752                                      | -3.83509  | -0.87634                                  | 2.49E-02                     |
| 45 | paternally expressed 3  | 2.87398                                       | -4.12925  | -3.49232                                  | 2.19E-02                     |
| 45 | Homo sapiens CDNA FLJ11398 fis, clone HEMBA1000637.   | 2.5268  | -1.71619  | 1.84868                                   | 4.46E-04                     |
| 50 | Homo sapiens BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing) (BIK), mRNA. /PROD=BCL2-interacting killer /FL=gb:NM_001197.2 gb:BC001599.1 gb:U34584.1 gb:U49730.1   | 4.30042                                       | 0.023414  | 3.56237                                   | 1.94E-03                     |
| 55 | Homo sapiens testis expressed sequence 14 (TEX14), mRNA. /PROD=testis expressed sequence 14 /FL=gb:NM_031272.1  | 3.51154                                       | -2.84891  | -1.3824                                   | 2.18E-02                     |
| 60 | Homo sapiens growth hormone 2 (GH2), transcript variant 2, mRNA. /PROD=growth hormone 2, isoform 2 precursor /FL=gb:J03756.1 gb:NM_022557.1   | 0.922569                                      | -2.77587  | 1.4679                                    | 1.60E-03                     |
| 65 | Homo sapiens, clone IMAGE:4828836, mRNA.  | 0.972907                                      | -4.24111  | -1.48398                                  | 1.63E-02                     |

ES 2 537 578 T3

(continua)

|    | Título de Gen   | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL | Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS | P-Valor Benjamini Hochberg y     |
|----|---|---|---|---|----------------------------------|
| 5  |   |   |   |   |                                  |
| 10 | Homo sapiens galanin receptor 1 (GALR1), mRNA. /PROD=galanin receptor 1 /FL=gb:NM_001480.2 gb:U23854.1 gb:L34339.1 gb:U53511.1  | 2.50745                                       | -3.13141  | -0.33802                                  | 3.38E-03                         |
| 15 | Homo sapiens, serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3, clone MGC:12244, mRNA, complete cds. /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, cladeB (ovalbumin), member 3 /FL=gb:NM_006919.1 gb:U19556.1 gb:BC005224.1 | 1.96851                                       | -4.13943  | -1.56568                                  | 3.06E-02                         |
| 20 | DKFZP566K1924 protein<br>ESTs, Moderately similar to ALU2_HUMAN ALU SUBFAMILY SB SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)   | 2.88225<br>4.24074                            | -2.59632<br>-0.69782                                  | 1.39062<br>3.87444                        | 0.00E+00<br>1.12E-04             |
| 25 | Human mRNA upregulated during camptothecin-induced apoptosis of U937 cells.<br>nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 ESTs   | 0.494505<br>1.77902<br>-1.3795                | -4.62912<br>-4.02806<br>-6.08172                      | -0.18915<br>-0.19682<br>-0.94606          | 4.38E-02<br>4.34E-02<br>6.91E-04 |
| 30 | Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 1, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone 2, isoform 1 precursor /FL=gb:NM_020991.2 gb:BC002717.1  | 1.12437                                       | -3.12138  | 2.61605                                   | 1.12E-04                         |
| 35 | Homo sapiens mRNA for SCCA2b, complete cds. /PROD=SCCA2b /FL=gb:AB046400.1<br>Homo sapiens KIAA0469 gene product (KIAA0469), mRNA. /PROD=KIAA0469 gene product /FL=gb:AB007938.1 gb:NM_014851.1   | 3.32911<br>4.03097                            | -3.16288<br>-1.94826                                  | 0.568045<br>2.56518                       | 1.93E-02<br>2.49E-04             |
| 40 | ESTs  | 4.45389                                       | -2.40636  | 5.33359                                   | 5.65E-04                         |

TABLA VII: EL EFECTO DEL TRATAMIENTO WNT-3A EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINA EN POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE DEL SISTEMA EMBRIONARIO LINEA H9.

|    | Lisado celular |           |           |           | Medios acondicionados de células |           |            |            |            |
|----|----------------|-----------|-----------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|------------|------------|
|    | w/o wnt 1      | w/o wnt 2 | w/ wnt 1  | w/ wnt 2  | w/o wnt 1                        | w/o wnt 2 | w/ wnt 1   | w/ wnt 2   |            |
| 5  | POS            | 62,842.33 | 67,606.06 | 49,758.34 | 50,702.57                        | 96,585.15 | 109,721.82 | 199,709.04 | 195,889.94 |
|    | NEG            | 23.38     | 34.49     | 370.82    | 400.66                           | 58.06     | 34.45      | 216.90     | 105.20     |
|    | Angiogenin     | 38.50     | 132.91    | 619.40    | 750.85                           | 13,726.35 | 11,749.55  | 57,442.48  | 54,969.04  |
|    | BDNF           | 167.50    | 167.82    | 763.51    | 951.45                           | 689.22    | 563.39     | 770.08     | 715.86     |
|    | BLC            | 2.00      | 48.99     | 742.24    | 476.36                           | 107.69    | 512.77     | 337.12     | 249.80     |
| 10 | BMP-4          | 247.00    | 273.70    | 348.44    | 304.48                           | 583.40    | 541.83     | 1,158.54   | 771.19     |
|    | BMP-6          | 8.50      | 141.92    | 571.23    | 641.05                           | 354.91    | 355.28     | 985.70     | 670.60     |
|    | CK beta 8-1    | 1.00      | 1.13      | 22.48     | 21.54                            | 17.79     | 25.31      | 42.78      | 75.44      |
|    | CNTF           | 1.00      | 55.19     | 1,382.51  | 1,060.82                         | 282.81    | 211.86     | 787.19     | 541.51     |
|    | EGF            | 32.50     | 82.22     | 742.24    | 984.39                           | 1,681.85  | 1,406.12   | 23,331.57  | 22,768.53  |
|    | Eotaxin        | 1.00      | 7.32      | 301.87    | 253.80                           | 207.89    | 199.67     | 622.91     | 291.71     |
| 15 | Eotaxin-2      | 262.00    | 336.77    | 1,155.31  | 960.31                           | 890.56    | 744.31     | 2,156.21   | 1,445.14   |
|    | Eotaxin-3      | 184.50    | 284.96    | 934.12    | 847.56                           | 975.77    | 665.56     | 2,140.81   | 1,480.35   |
|    | FGF-6          | 629.00    | 379.57    | 1,327.92  | 964.54                           | 1,239.85  | 947.73     | 3,283.94   | 2,519.78   |
|    | FGF-7          | 31.00     | 222.45    | 1,075.02  | 941.73                           | 449.49    | 352.47     | 1,086.66   | 861.72     |
|    | Flt-3 Ligand   | 44.00     | 180.21    | 857.45    | 795.19                           | 315.58    | 277.47     | 511.67     | 792.98     |
| 20 | Fractalkine    | 23.50     | 62.51     | 792.02    | 456.51                           | 120.80    | 145.30     | 359.37     | 367.15     |
|    | GCP-2          | 1.00      | 45.05     | 593.71    | 538.86                           | 203.21    | 166.86     | 451.78     | 362.12     |
|    | GDNF           | 84.00     | 292.84    | 436.75    | 444.68                           | 176.99    | 194.98     | 443.22     | 509.66     |
|    | GM-CSF         | 433.00    | 636.37    | 1,343.17  | 1,161.75                         | 777.25    | 722.75     | 1,808.82   | 1,446.82   |
|    | I-309          | 152.50    | 246.10    | 708.52    | 743.25                           | 1,828.87  | 179.05     | 181.30     | 288.36     |
|    | IFN-gamma      | 349.00    | 441.52    | 1,202.67  | 1,037.60                         | 283.74    | 559.64     | 1,238.97   | 1,435.08   |
| 25 | IGFBP-1        | 1.50      | 3.38      | 59.41     | 85.73                            | 33.71     | 24.37      | 227.60     | 155.91     |
|    | IGFBP-2        | 3,785.50  | 5,554.45  | 2,671.90  | 2,414.72                         | 27,656.85 | 28,473.95  | 42,215.53  | 43,934.33  |
|    | IGFBP-4        | 5,553.00  | 6,043.27  | 4,459.85  | 4,173.19                         | 10,091.09 | 6,029.45   | 18,988.34  | 13,380.14  |
|    | IGF-I          | 1.00      | 2.25      | 558.38    | 208.19                           | 88.96     | 148.11     | 254.98     | 187.77     |
|    | IL-10          | 158.00    | 422.93    | 1,222.75  | 1,096.30                         | 722.93    | 564.32     | 1,625.71   | 1,129.96   |
|    | IL-13          | 428.50    | 555.84    | 1,486.89  | 1,407.96                         | 1,114.36  | 786.49     | 2,522.42   | 1,807.27   |
| 30 | IL-15          | 599.50    | 808.13    | 1,677.16  | 1,601.79                         | 1,140.59  | 858.67     | 2,495.04   | 1,981.62   |
|    | IL-16          | 2.00      | 137.97    | 651.11    | 668.50                           | 259.39    | 214.67     | 436.38     | 405.71     |
|    | IL-1alpha      | 1,236.00  | 1,216.99  | 1,612.93  | 1,421.89                         | 10,155.70 | 5,842.90   | 3,999.26   | 3,545.79   |
|    | IL-1beta       | 1.00      | 1.13      | 352.05    | 312.08                           | 117.99    | 75.93      | 316.59     | 278.30     |
|    | IL-1ra         | 33.00     | 25.91     | 302.68    | 198.48                           | 142.34    | 93.74      | 354.23     | 581.75     |
| 35 | IL-2           | 210.50    | 681.99    | 966.23    | 1,133.88                         | 188.22    | 363.72     | 758.10     | 881.84     |
|    | IL-3           | 3,146.50  | 1,976.13  | 2,119.94  | 1,497.48                         | 4,598.86  | 5,260.77   | 11,345.78  | 12,174.73  |
|    | IL-4           | 17.50     | 74.34     | 625.42    | 638.94                           | 357.72    | 239.04     | 804.30     | 673.95     |
|    | IL-5           | 400.50    | 555.84    | 1,245.23  | 1,167.24                         | 1,056.31  | 791.18     | 2,120.27   | 1,713.38   |
|    | IL-6           | 828.50    | 516.98    | 1,121.19  | 842.07                           | 7,377.28  | 9,527.88   | 9,774.82   | 9,991.93   |
|    | IL-7           | 190.00    | 313.12    | 1,212.31  | 531.68                           | 456.98    | 430.27     | 681.09     | 1,017.63   |
| 40 | Leptin         | 900.50    | 617.79    | 1,234.39  | 1,091.65                         | 2,999.42  | 2,016.38   | 7,238.71   | 4,886.99   |
|    | LIGHT          | 10.50     | 232.02    | 1,081.04  | 888.10                           | 619.92    | 453.71     | 1,346.78   | 1,108.17   |
|    | MCP-1          | 242.50    | 282.71    | 1,022.03  | 1,076.03                         | 572.17    | 500.58     | 2,015.89   | 1,567.53   |
|    | MCP-2          | 24.00     | 109.25    | 909.63    | 1,152.46                         | 129.23    | 351.53     | 694.78     | 694.07     |
|    | MCP-3          | 1.00      | 168.38    | 1,184.61  | 1,255.50                         | 401.73    | 169.67     | 701.62     | 583.42     |
| 45 | MCP-4          | 7.50      | 46.74     | 1,380.51  | 1,606.86                         | 123.61    | 61.87      | 231.02     | 276.62     |
|    | M-CSF          | 1.00      | 63.64     | 852.63    | 867.83                           | 529.09    | 269.04     | 740.98     | 684.01     |
|    | MDC            | 1.00      | 2.25      | 269.36    | 280.41                           | 157.32    | 52.50      | 280.65     | 132.44     |
|    | MIG            | 291.00    | 226.39    | 1,113.16  | 1,137.26                         | 272.50    | 486.52     | 617.77     | 1,222.17   |
|    | MIP-1-delta    | 1.50      | 1.13      | 491.75    | 322.22                           | 144.21    | 66.56      | 474.02     | 291.71     |
|    | MIP-3-alpha    | 1.00      | 5.63      | 1,602.09  | 1,399.93                         | 55.25     | 0.00       | 208.78     | 184.41     |
| 50 | NAP-2          | 1.00      | 6.19      | 465.66    | 177.37                           | 97.39     | 110.61     | 371.35     | 343.68     |
|    | NT-3           | 1.00      | 1.13      | 316.73    | 275.76                           | 97.39     | 171.55     | 571.57     | 427.51     |
|    | PARC           | 1.00      | 2.25      | 352.85    | 353.04                           | 170.43    | 81.56      | 474.02     | 363.80     |
|    | PDGF-BB        | 437.00    | 1,644.99  | 517.84    | 597.56                           | 4,729.96  | 8,521.09   | 2,635.37   | 2,005.09   |
|    | RANTES         | 1.00      | 89.54     | 724.98    | 637.25                           | 393.31    | 347.78     | 682.80     | 855.01     |
|    | SCF            | 74.50     | 148.67    | 1,152.50  | 1,021.13                         | 691.09    | 487.46     | 1,394.69   | 2,155.98   |
| 55 | SDF-1          | 23.50     | 51.25     | 940.14    | 1,294.78                         | 382.07    | 123.74     | 326.85     | 616.95     |
|    | TARC           | 1.50      | 5.07      | 372.93    | 343.33                           | 206.95    | 71.24      | 277.23     | 1,642.97   |
|    | TGF-beta 1     | 362.00    | 230.33    | 1,426.67  | 1,240.30                         | 752.90    | 740.56     | 1,827.65   | 1,849.18   |
|    | TGF-beta 3     | 3.00      | 25.91     | 377.74    | 1,130.93                         | 111.44    | 115.30     | 294.34     | 343.68     |
|    | TNF-alpha      | 431.00    | 579.49    | 2,851.74  | 1,285.91                         | 1,205.20  | 929.91     | 2,609.70   | 2,167.71   |
|    | TNF-beta       | 241.00    | 342.40    | 1,049.33  | 1,026.62                         | 675.17    | 671.19     | 1,701.01   | 1,637.94   |
| 60 | ternaI Control | 18,642.67 | 18,642.67 | 18,642.67 | 18,642.67                        | 18,642.67 | 18,642.67  | 18,642.67  | 18,642.67  |
|    | POS            | 60,794.83 | 48,106.85 | 35,652.42 | 47,391.58                        | 94,013.71 | 90,889.16  | 141,321.30 | 149,125.43 |
|    | NEG            | 11.13     | 5.53      | 11.22     | 30.45                            | 24.93     | 17.75      | 36.22      | 33.27      |
|    | Acrrp30        | 1,036.00  | 744.50    | 601.61    | 690.66                           | 1,797.52  | 1,319.88   | 2,795.71   | 2,302.99   |
| 65 | AgRP           | 11.00     | 153.99    | 77.82     | 89.00                            | 378.17    | 195.90     | 651.26     | 482.21     |
|    | ngliopoietin-2 | 28.50     | 10.43     | 357.97    | 771.04                           | 655.82    | 632.60     | 65,959.24  | 71,664.21  |
|    | mpfhiregulin   | 17.50     | 15.44     | 73.63     | 154.62                           | 250.52    | 151.01     | 619.07     | 782.60     |
|    | Axl            | 637.50    | 795.83    | 88.59     | 139.03                           | 401.31    | 324.05     | 610.40     | 748.34     |
|    | bFGF           | 59,820.50 | 54,057.29 | 11,722.95 | 21,398.52                        | 7,948.03  | 4,993.83   | 1,226.99   | 1,241.09   |

## REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, que incluye los siguientes pasos:
- 5 a. cultivo de las células madre pluripotentes,  
 b. diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, cultivando las células madre pluripotentes en un medio definido químicamente que comprende un medio complementado con B27 y que trata las células pluripotentes con activina A,  
 10 c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con por lo menos un factor del crecimiento fibroblástico, o con ácido retinoico y por lo menos un factor de crecimiento fibroblástico y  
 15 d. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático a células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un inhibidor de la secretasa gamma.
2. El método de la reivindicación 1, cuando las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido químicamente que comprende DMEM-F12 complementado con B27 y activina A.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, cuando el paso (b) también incluye el prensado de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde B27 se usa a una concentración de aproximadamente 1 %.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde B27 se usa a una concentración de aproximadamente 1 %.
6. El método de la reivindicación 1, donde el paso de la diferenciación de las células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue por un método que comprende los pasos:
- 30 a. prensado de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular,  
 b. cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando de Wnt en un primer medio de cultivo complementado con B27 y  
 35 c. cultivo de las células madre pluripotentes con activina A en un segundo medio de cultivo complementado con B27.
7. El método de la reivindicación 1, donde el paso de diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se consigue por un método que también incluye el prensado de las células madre pluripotentes en una capa de distribuidor fibroblástico.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, donde las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido químicamente que comprende DMEM-F12 complementada con B27, un ligando de Wnt y activina A.
- 45 9. El método de la reivindicación 7, donde las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido químicamente que comprende DMEM-LG complementado con B27, un ligando Wnt y activina A.
10. Un método para diferenciar células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, que comprende los siguientes pasos:
- 50 a. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio definido químicamente que comprende un medio complementado con B27,  
 b. diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, tratando las células pluripotentes con activina A y  
 55 c. diferenciación de las células que expresan los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con por lo menos un factor de crecimiento fibroblástico, o con ácido retinoico y por lo menos un factor de crecimiento fibroblástico.
- 60 11. Un método para diferenciar células madre pluripotentes a células que expresan marcadores que son característicos del linaje endodérmico definitivo, que comprende los siguientes pasos:  
 a. prensado de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y  
 b. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio definido químicamente que incluya un medio complementado con B27 y tratamiento de las células pluripotentes con activina A.
- 65

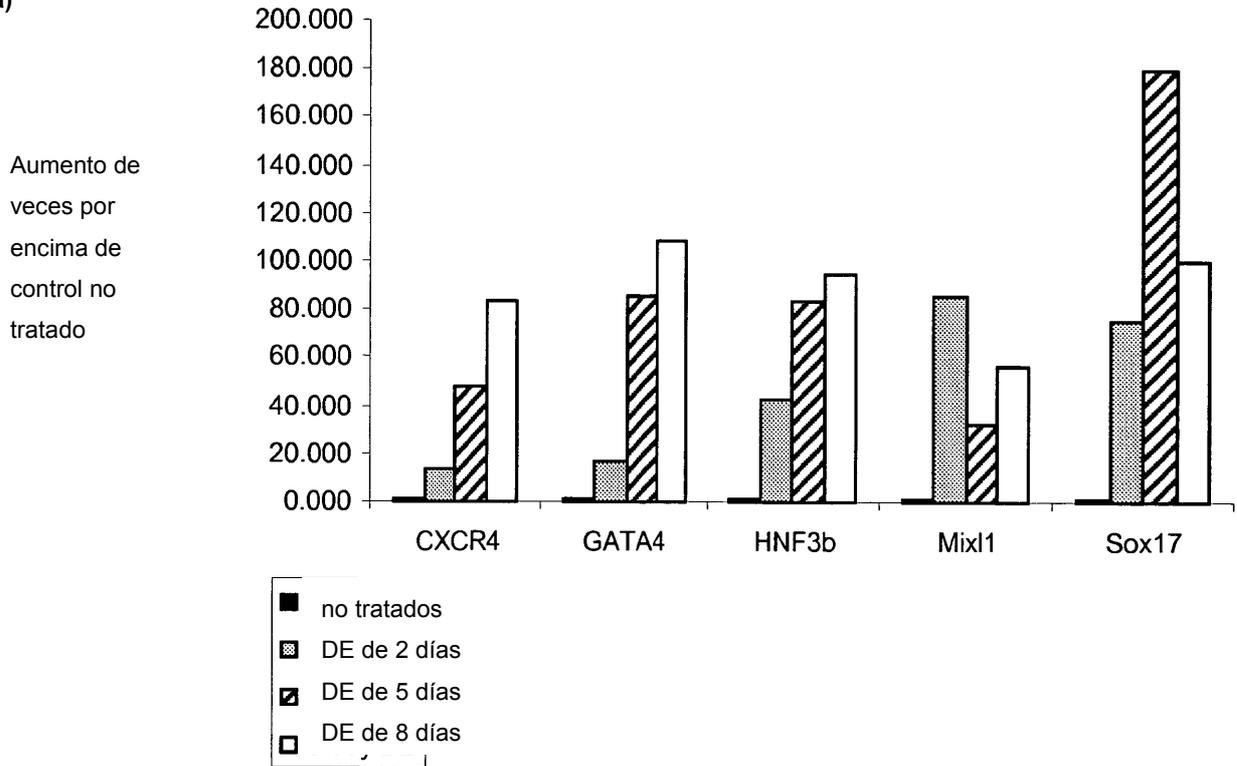
12. El método de la reivindicación 11, donde las células madre pluripotentes se cultiven en un medio definido químicamente que comprenda DMEM-F12 complementado con B27, un ligando Wnt y activina A.
- 5 13. El método de la reivindicación 11, donde las células madre pluripotentes se cultiven en un medio definido químicamente que comprenda DMEM-LG complementado con B27, un ligando Wnt y activina A.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el B27 se use a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 %.
- 10 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el B27 se use a una concentración de aproximadamente 1 %.
- 15 16. El método de la reivindicación 10 o reivindicación 11, donde el paso de la diferenciación de las células madre pluripotentes a células que expresen marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue por un método que también incluye el prensado de células madre pluripotentes en una capa de administración de fibroblasto.

Figura 1.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

ORIGINAL

a)



b)

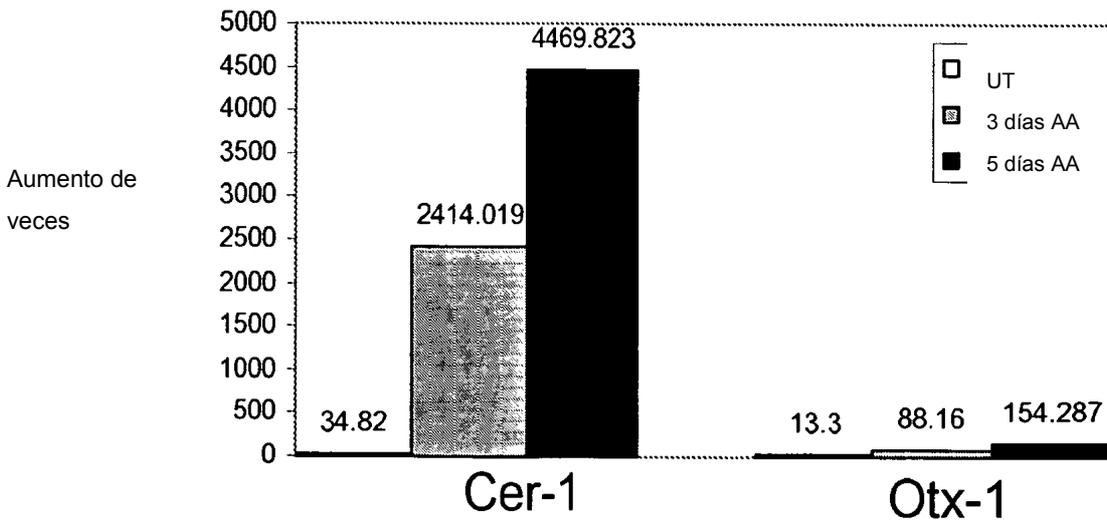


Figura 2.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

ORIGINAL

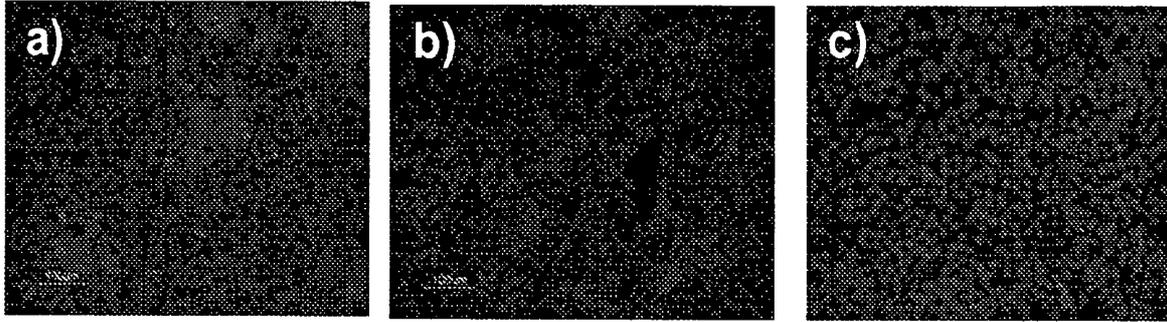
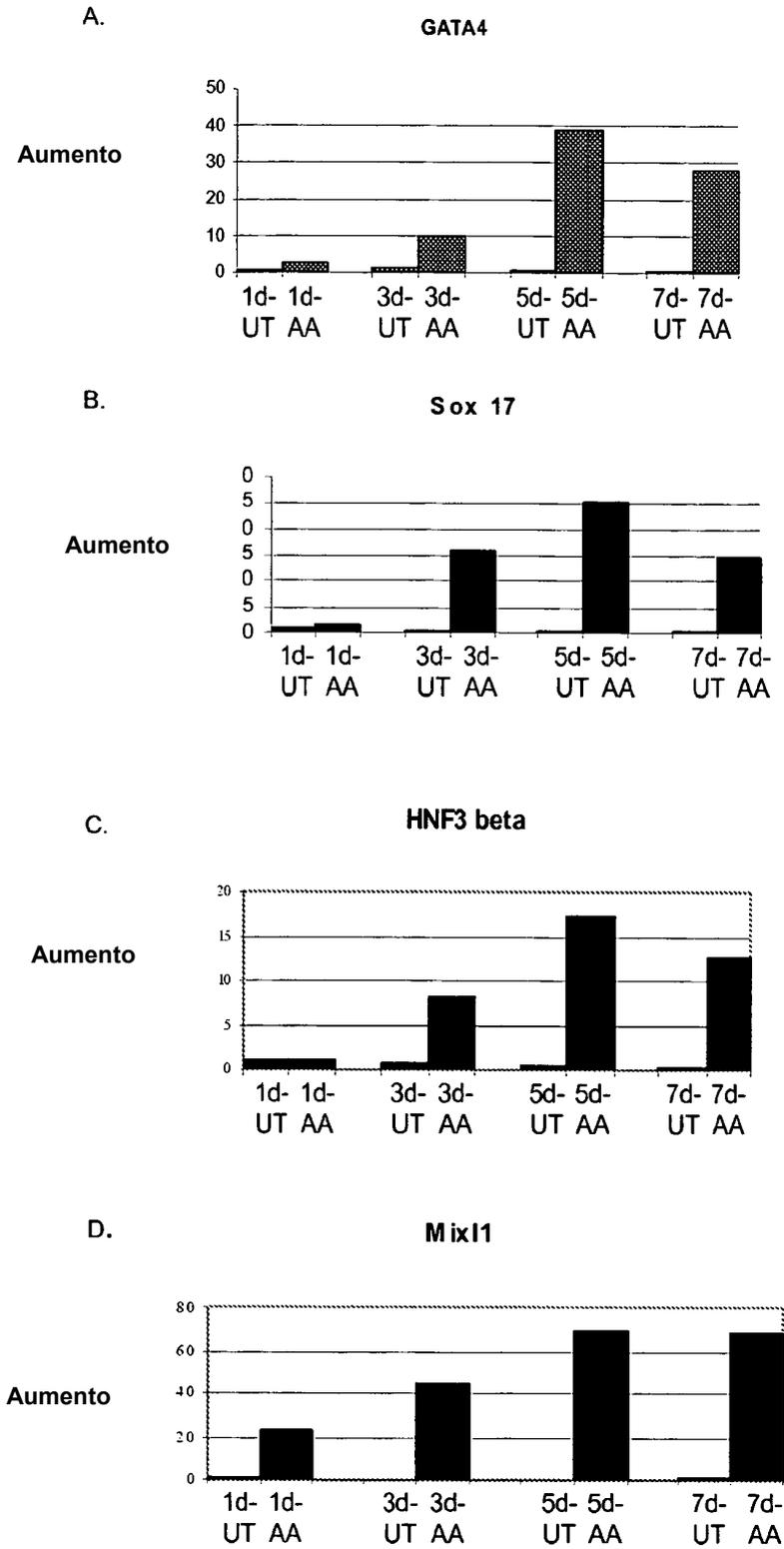


Figura 3.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



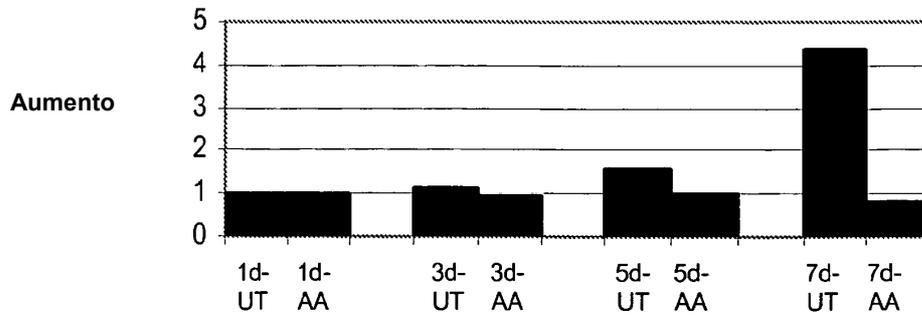
ORIGINAL

Figura 4.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

A.

Sox 7



B.

AFP

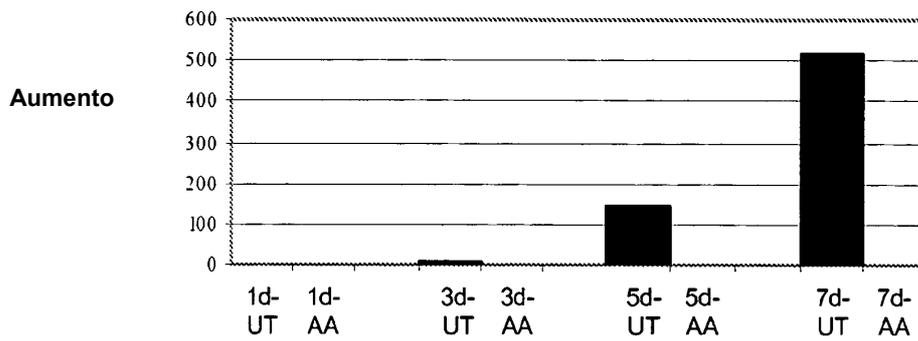
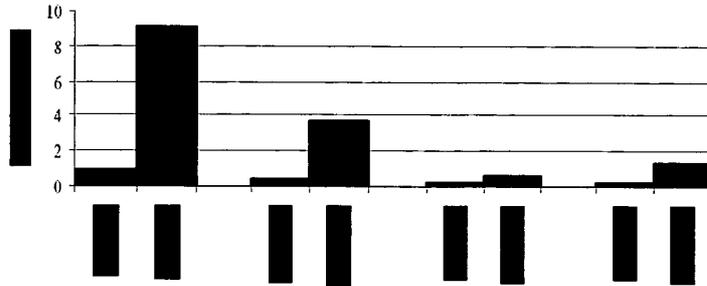


Figura 5.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

A.

Braquiuro



B.

Zic 1

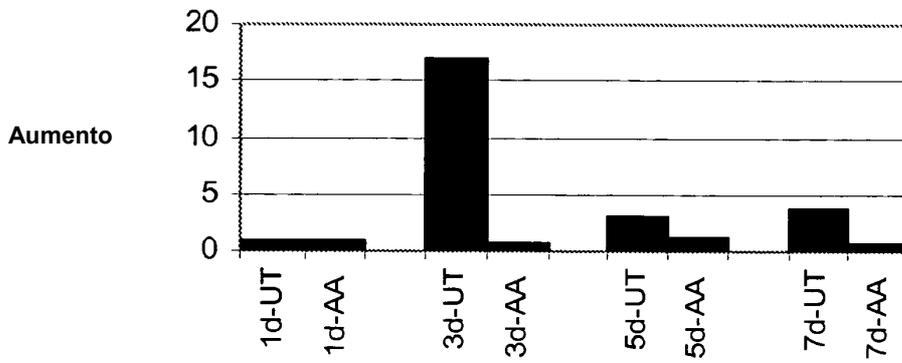
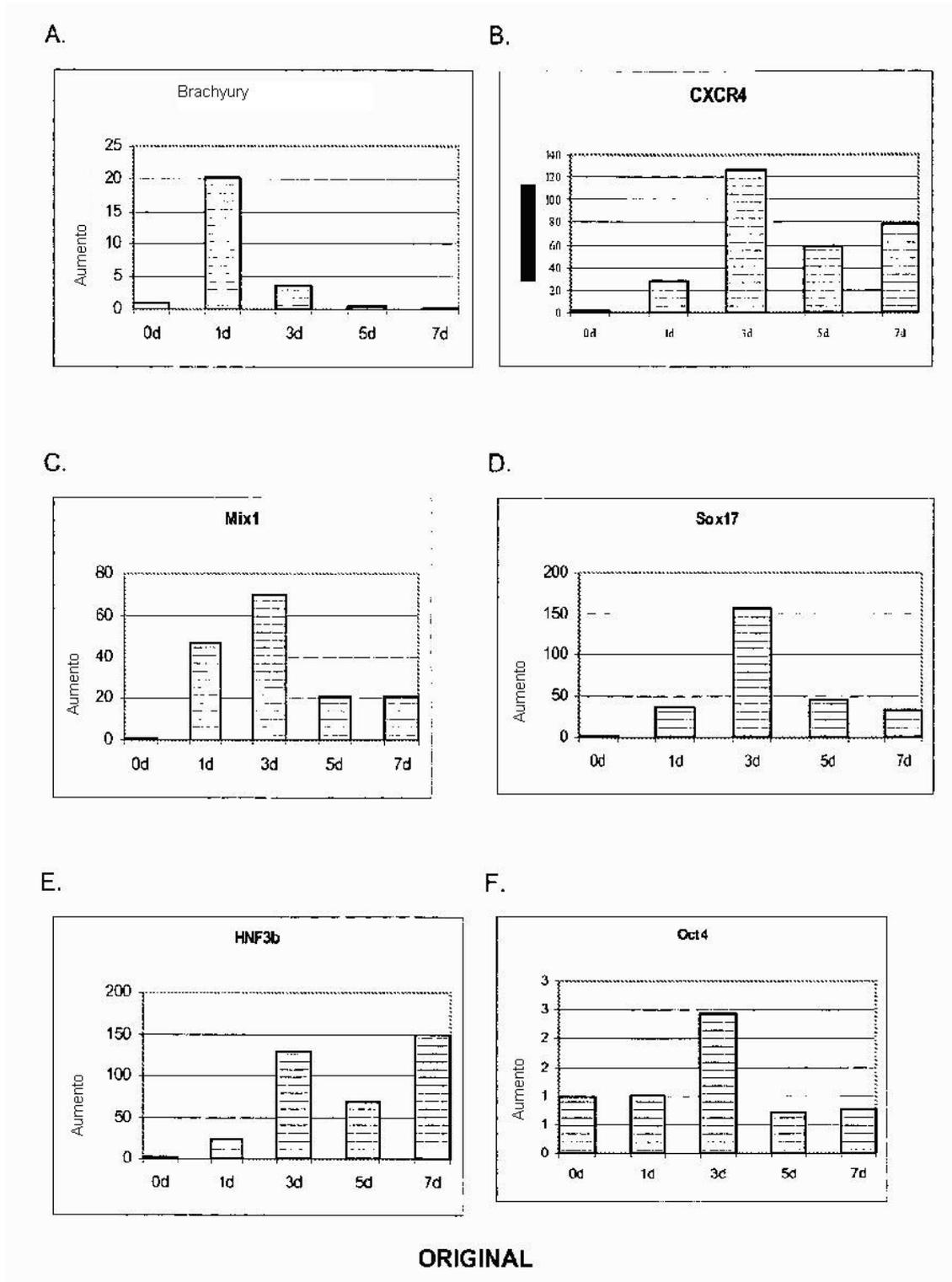


Figura 6.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
 Diferenciación de células madre embrionarias



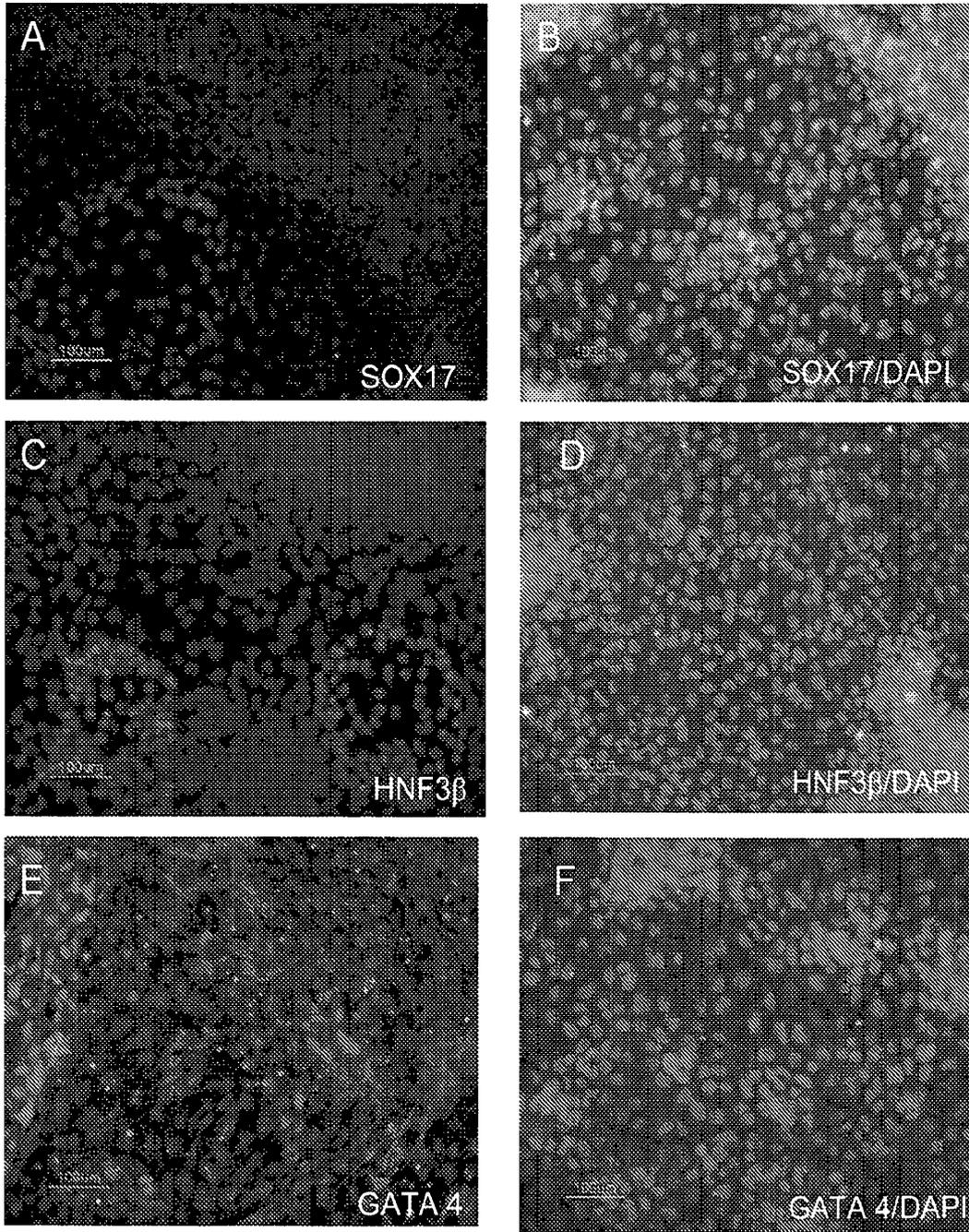
ORIGINAL

Figura 7.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

NO TRATADAS

TRATADAS



ORIGINAL

Figura 8.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

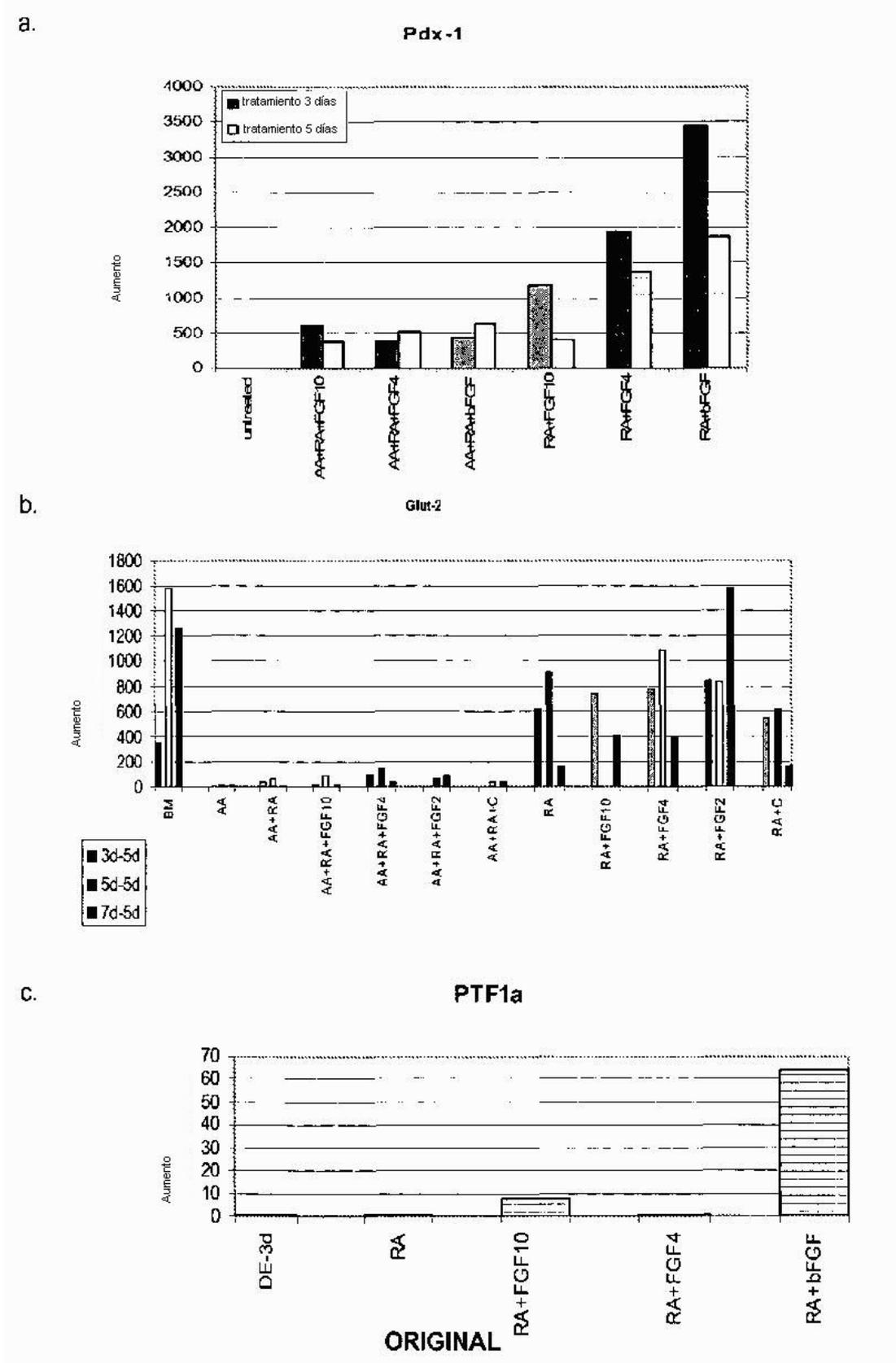
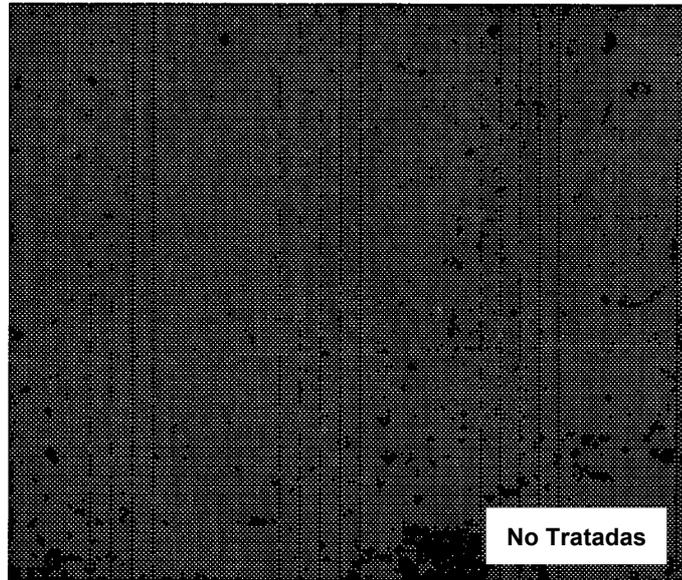


Figura 9.

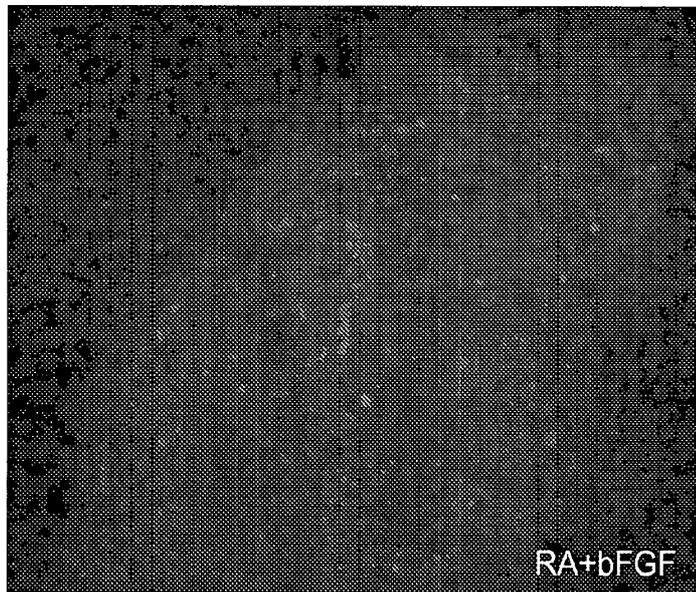
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

a.

PDX1



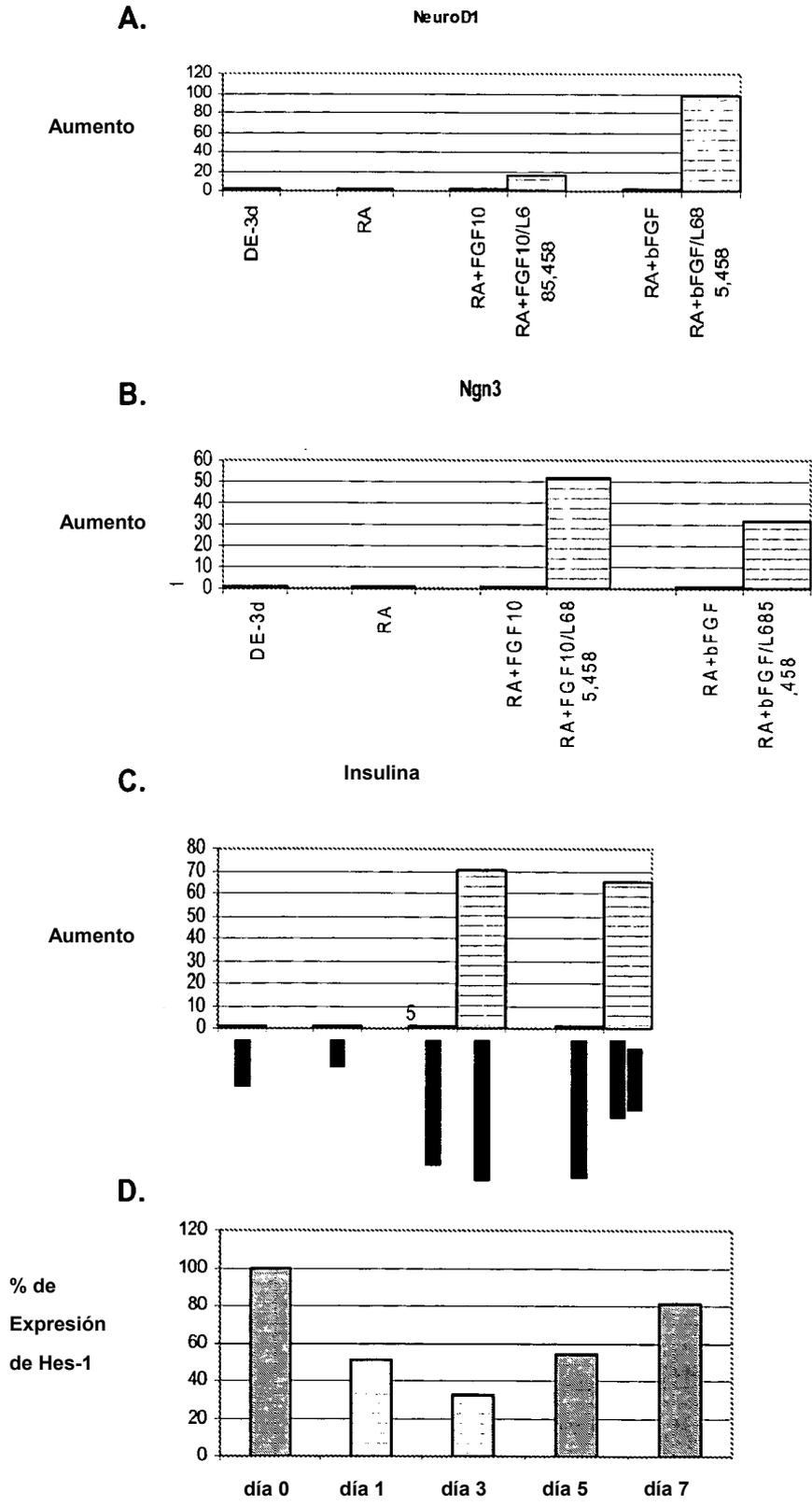
b.



ORIGINAL

Figura 10.

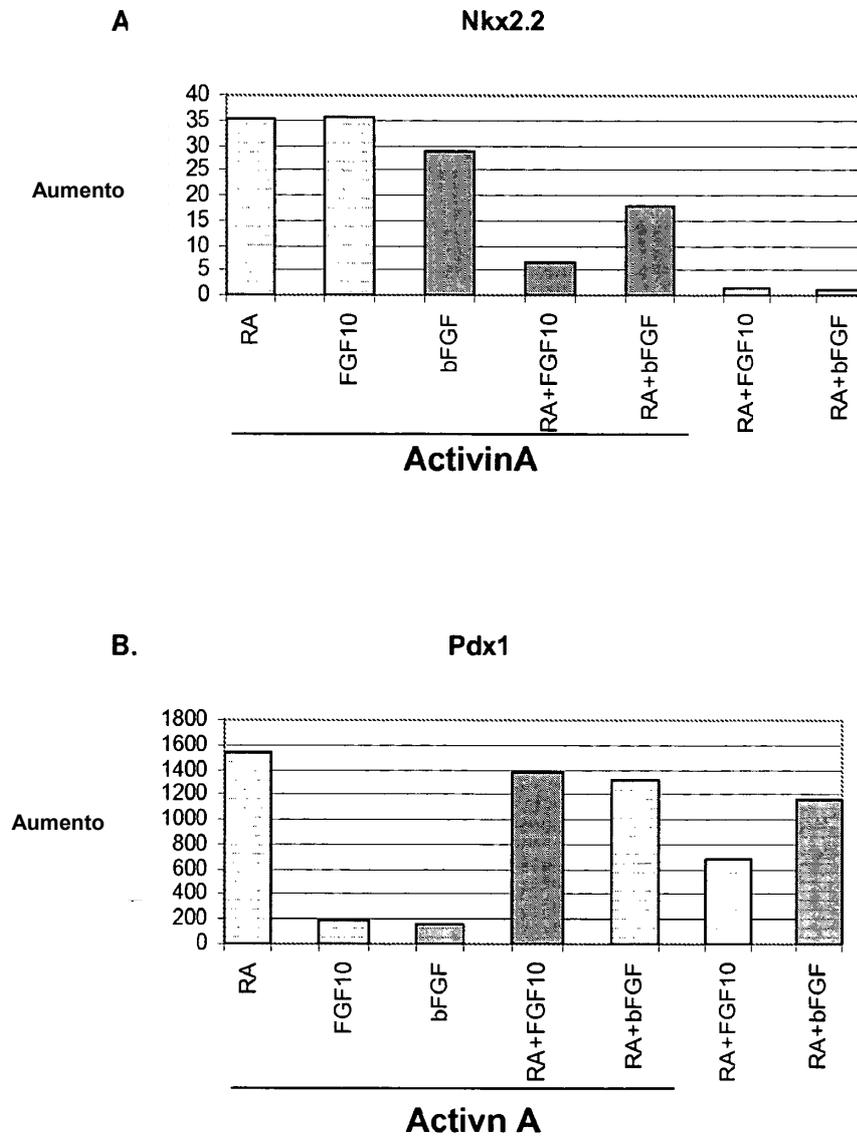
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 11.

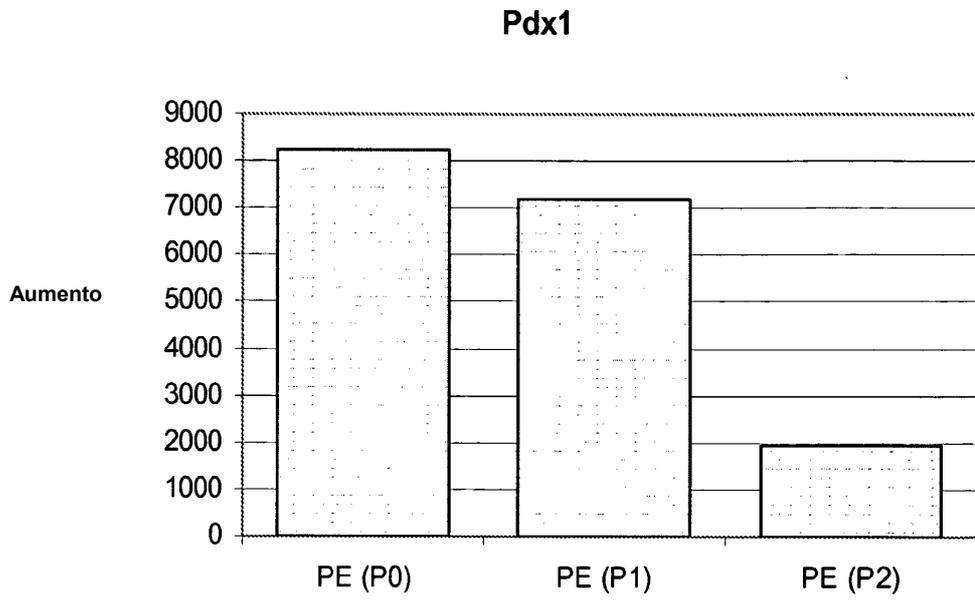
LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
 Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 12.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

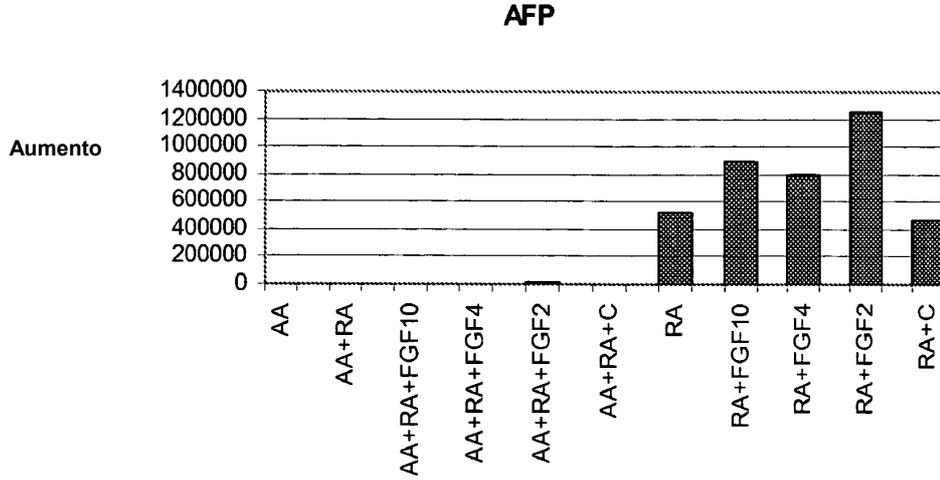


**ORIGINAL**

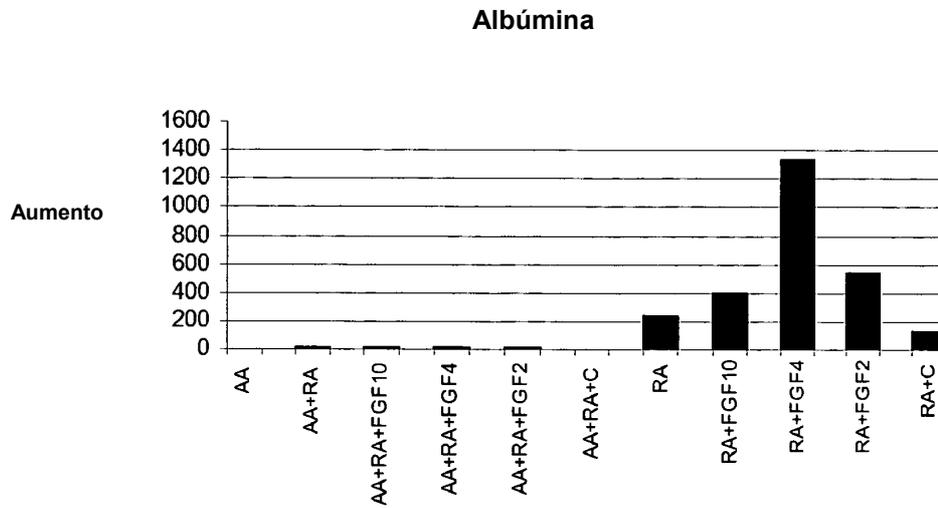
Figura 13.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei  
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



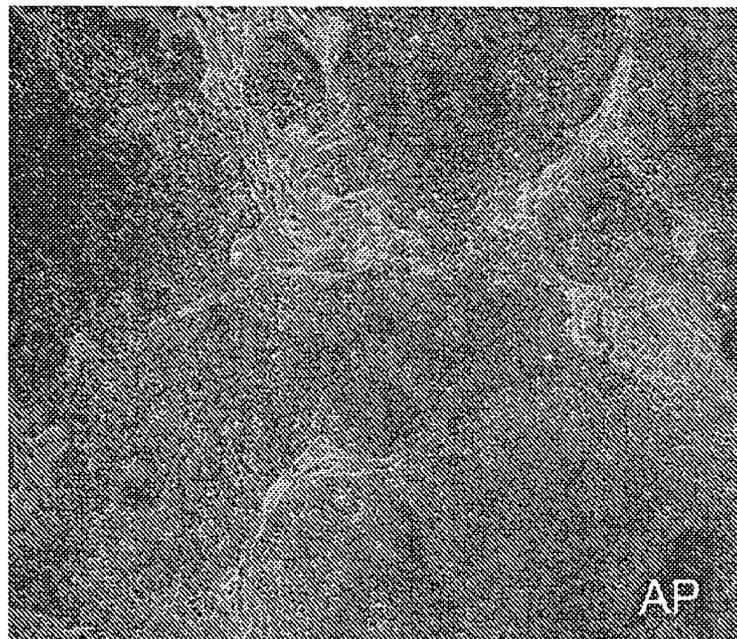
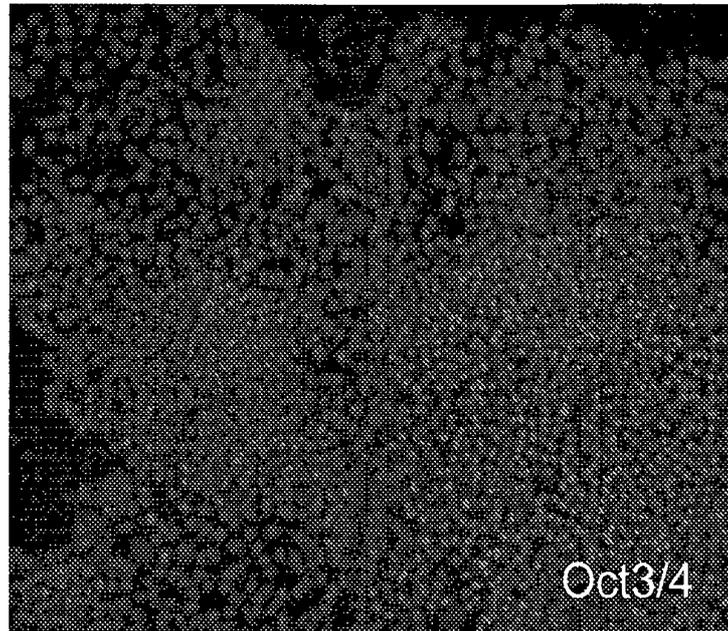
B.



**ORIGINAL**

Figura 14.

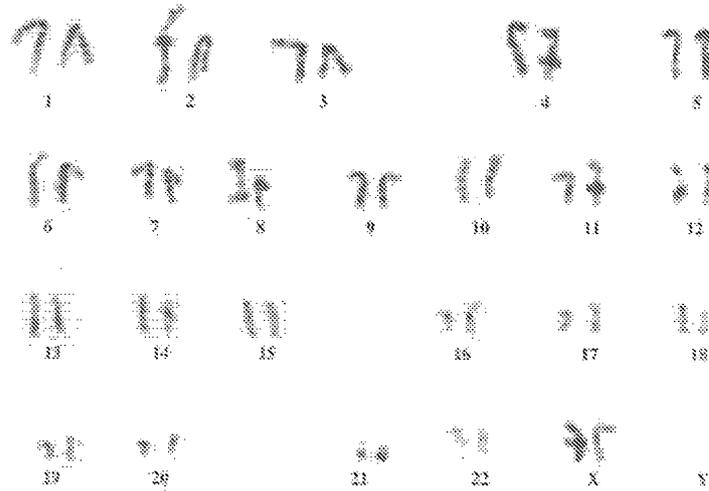
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 15.

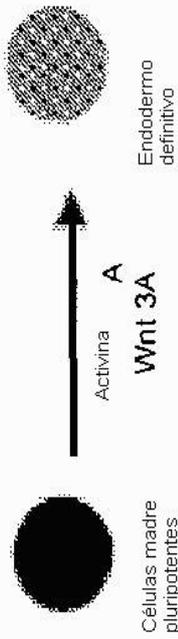
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



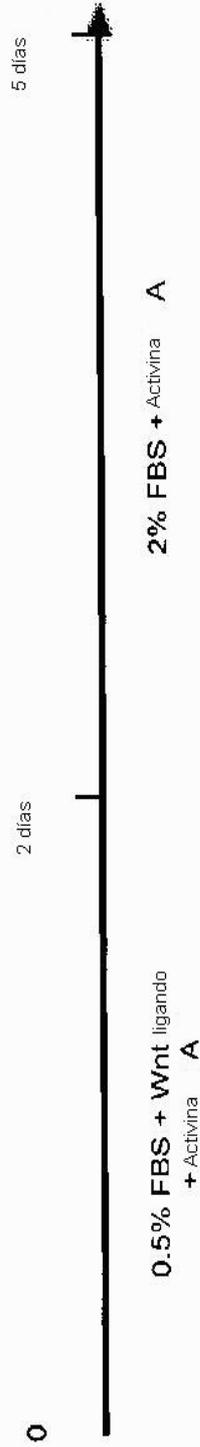
ORIGINAL

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

Figura 16



METODO:



MÉTODO ALTERNATIVO:

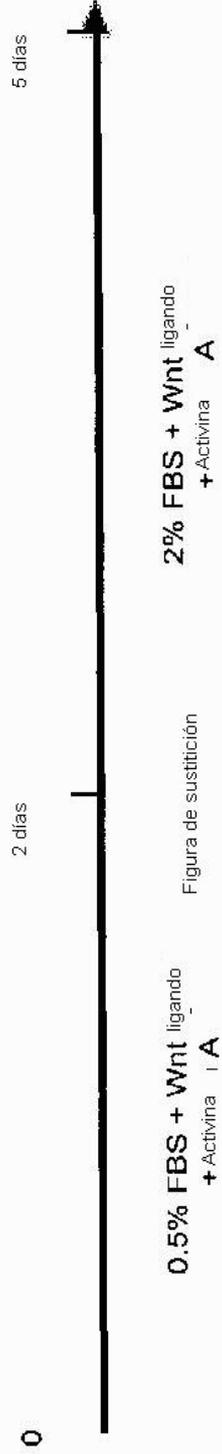
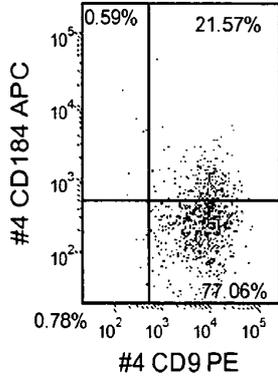


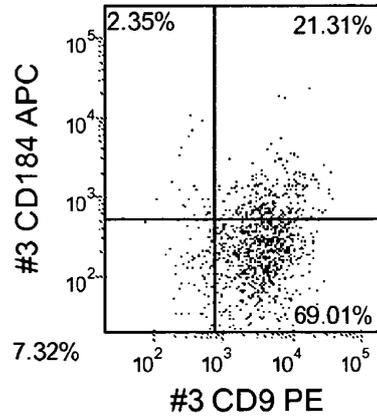
Figura 17.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

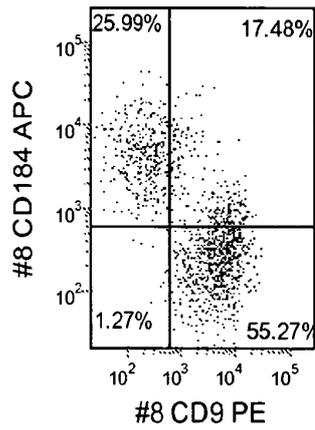
A. Dilución de Matrigel 1:60



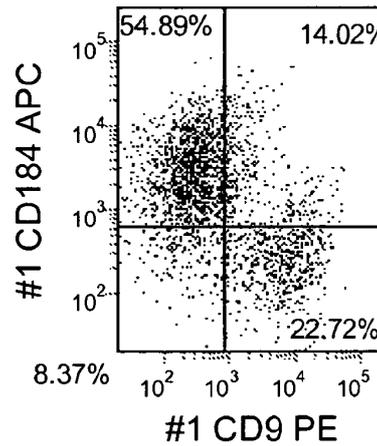
B. Dilución de Matrigel 1:30



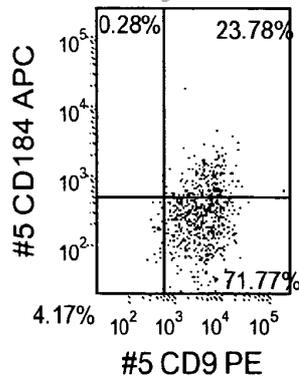
C. Dilución de Matrigel 1:15



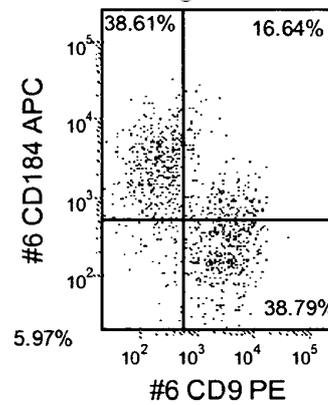
D. Dilución de Matrigel 1:10



E. Reducción de factor de crecimiento  
Dilución de Matrigel 1:30



F. Reducción de factor de crecimiento  
Dilución de Matrigel 1:10



ORIGINAL

Figura 18.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

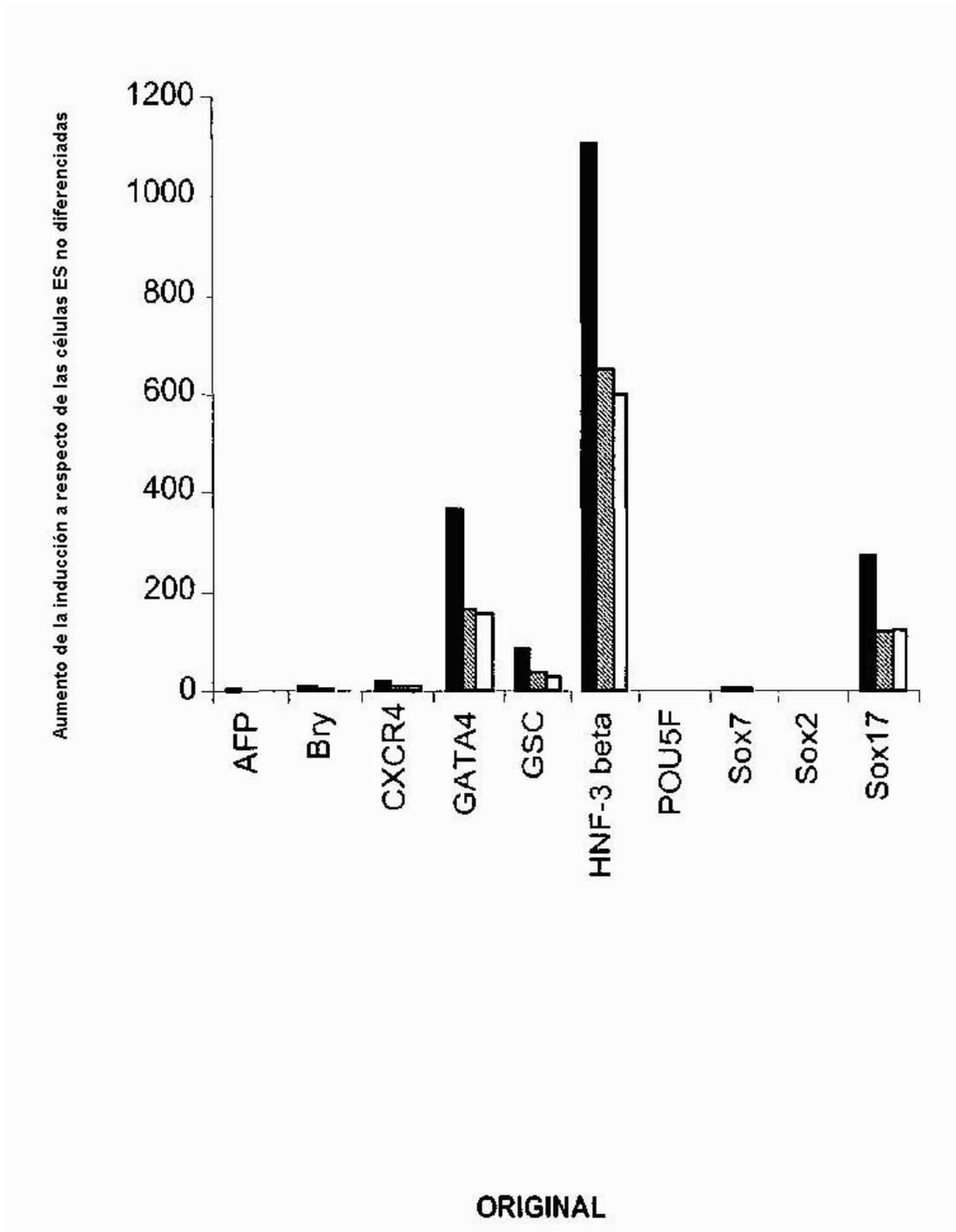
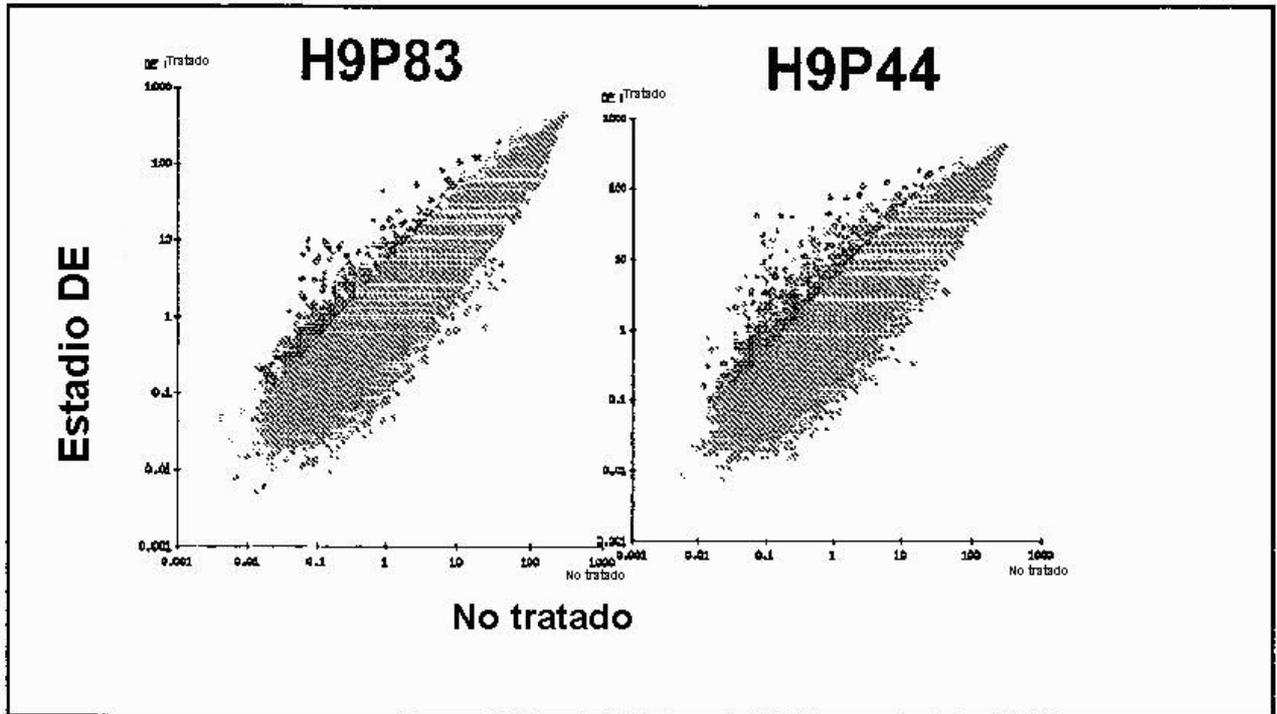


Figura 19.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 20.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

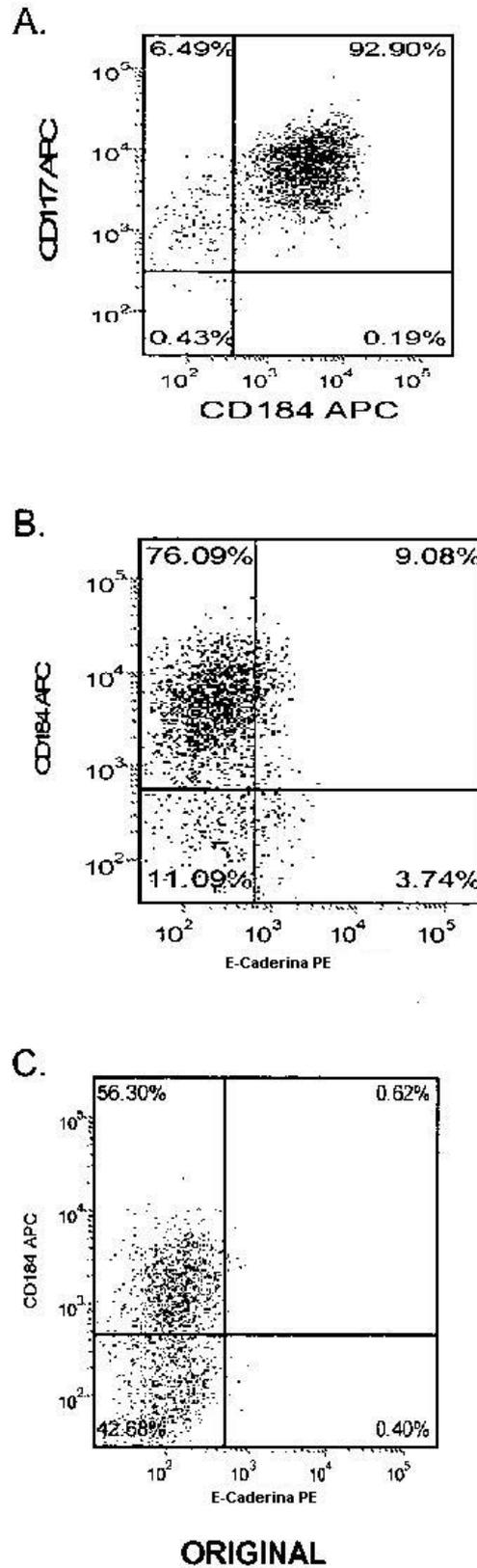
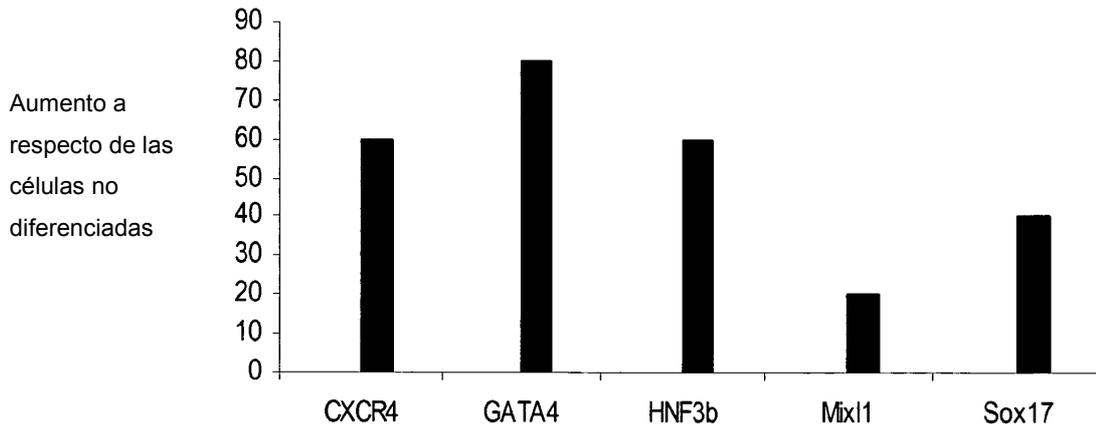


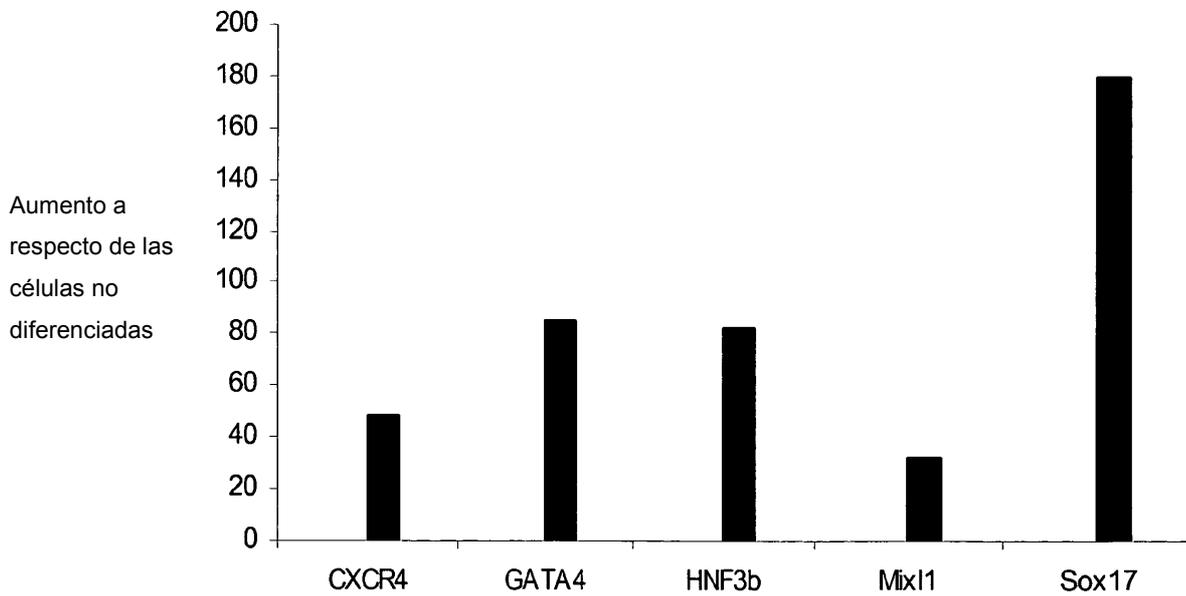
Figura 21.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

A.



B.

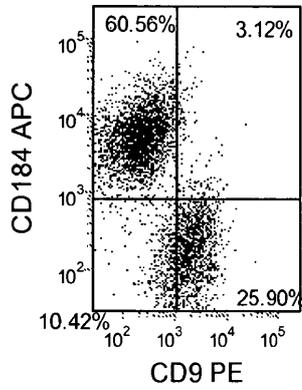


ORIGINAL

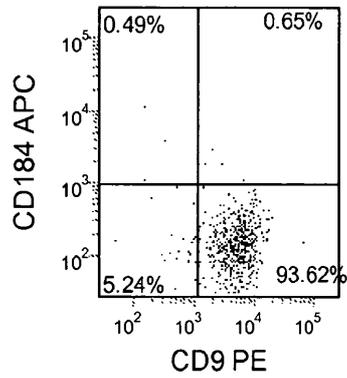
Figura 22.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
 Diferenciación de células madre embrionarias

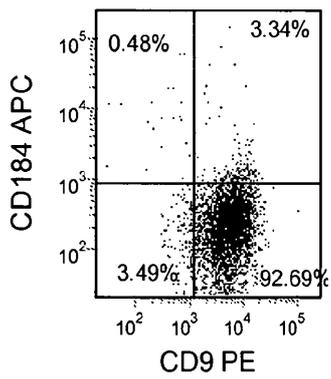
A.



B.



C.



ORIGINAL

Figura 23.

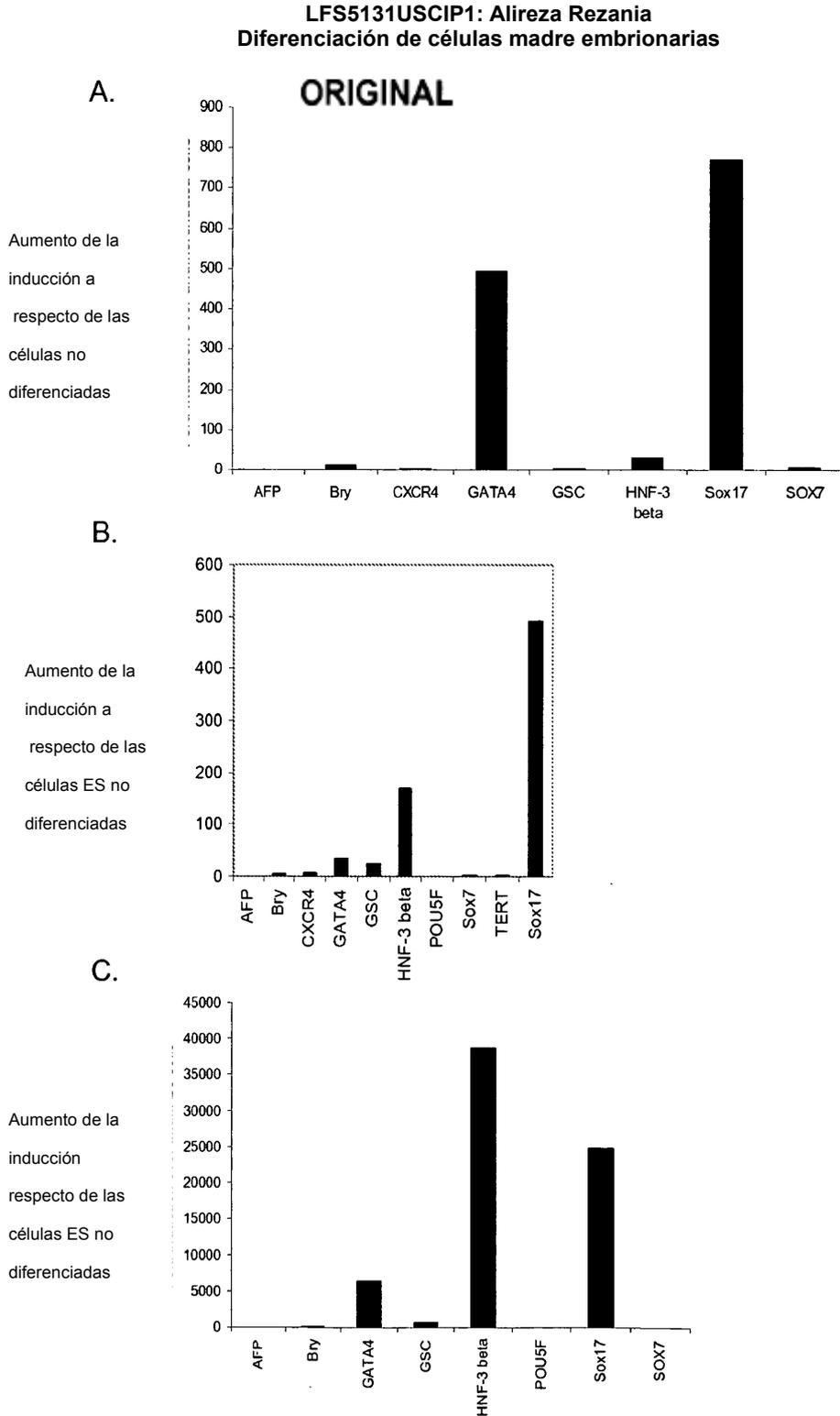
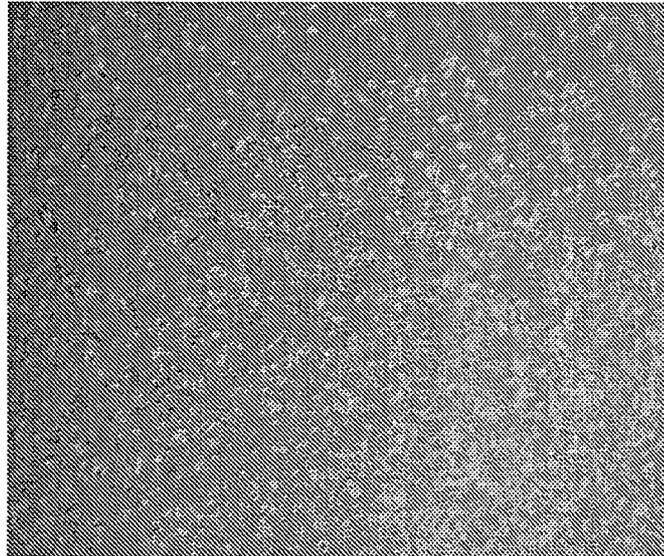


Figura 24.

**LFS5131USCIP1: Alireza Rezania**  
**Diferenciación de células madre embrionarias**

A.



B.

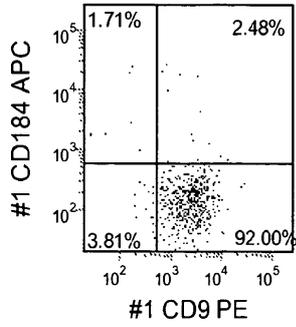


**ORIGINAL**

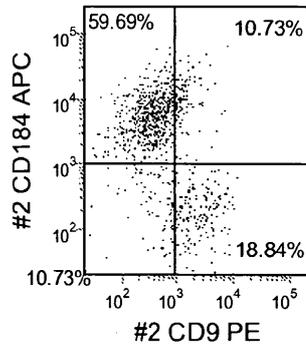
Figura 25.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

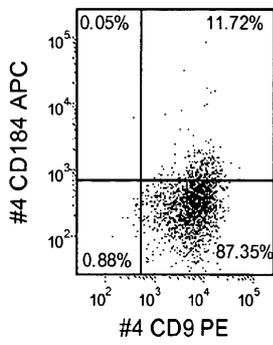
A.



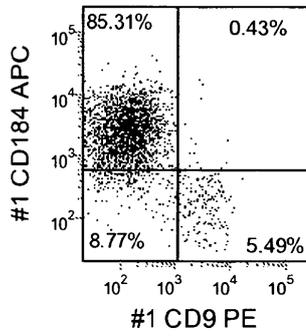
B.



C.



D.

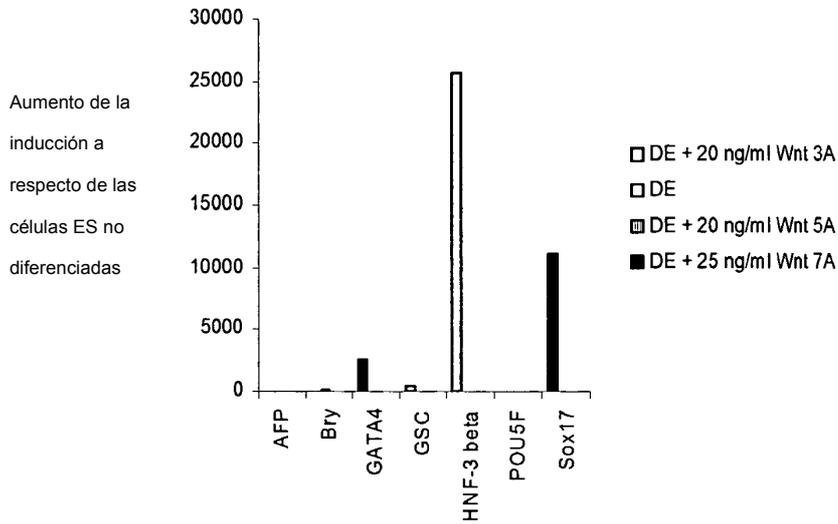


ORIGINAL

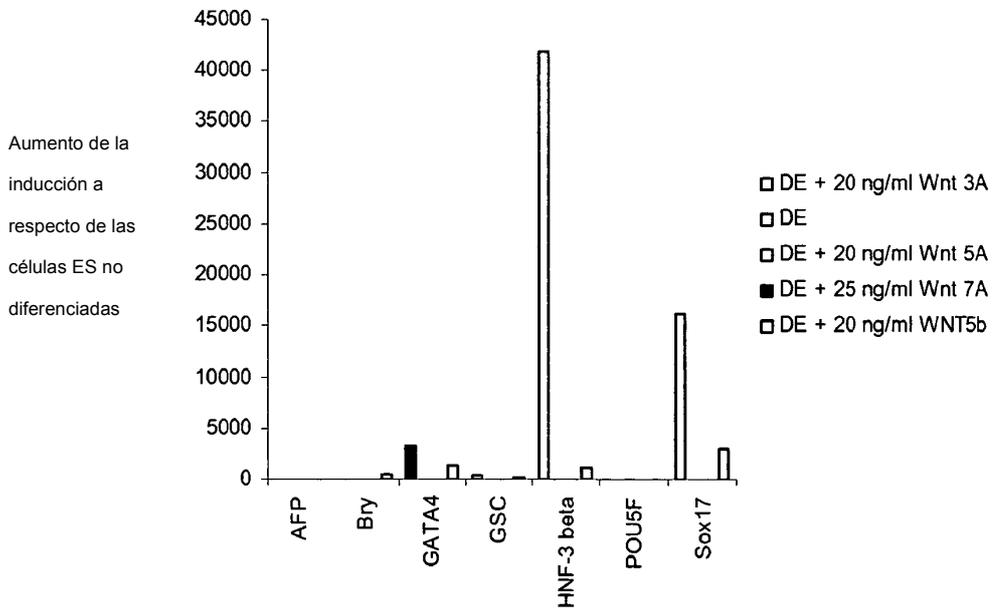
Figura 26.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



B.

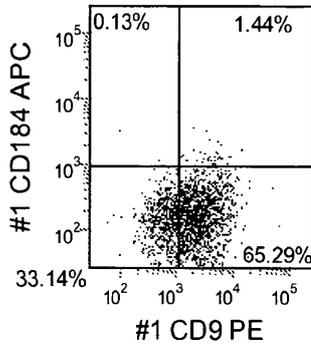


ORIGINAL

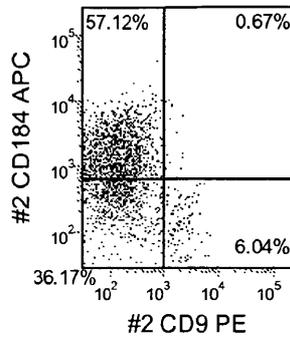
Figura 27.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

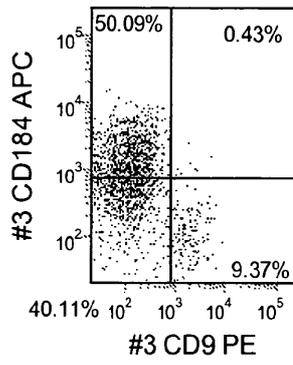
A.



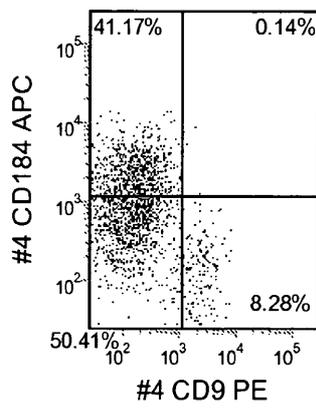
B.



C.

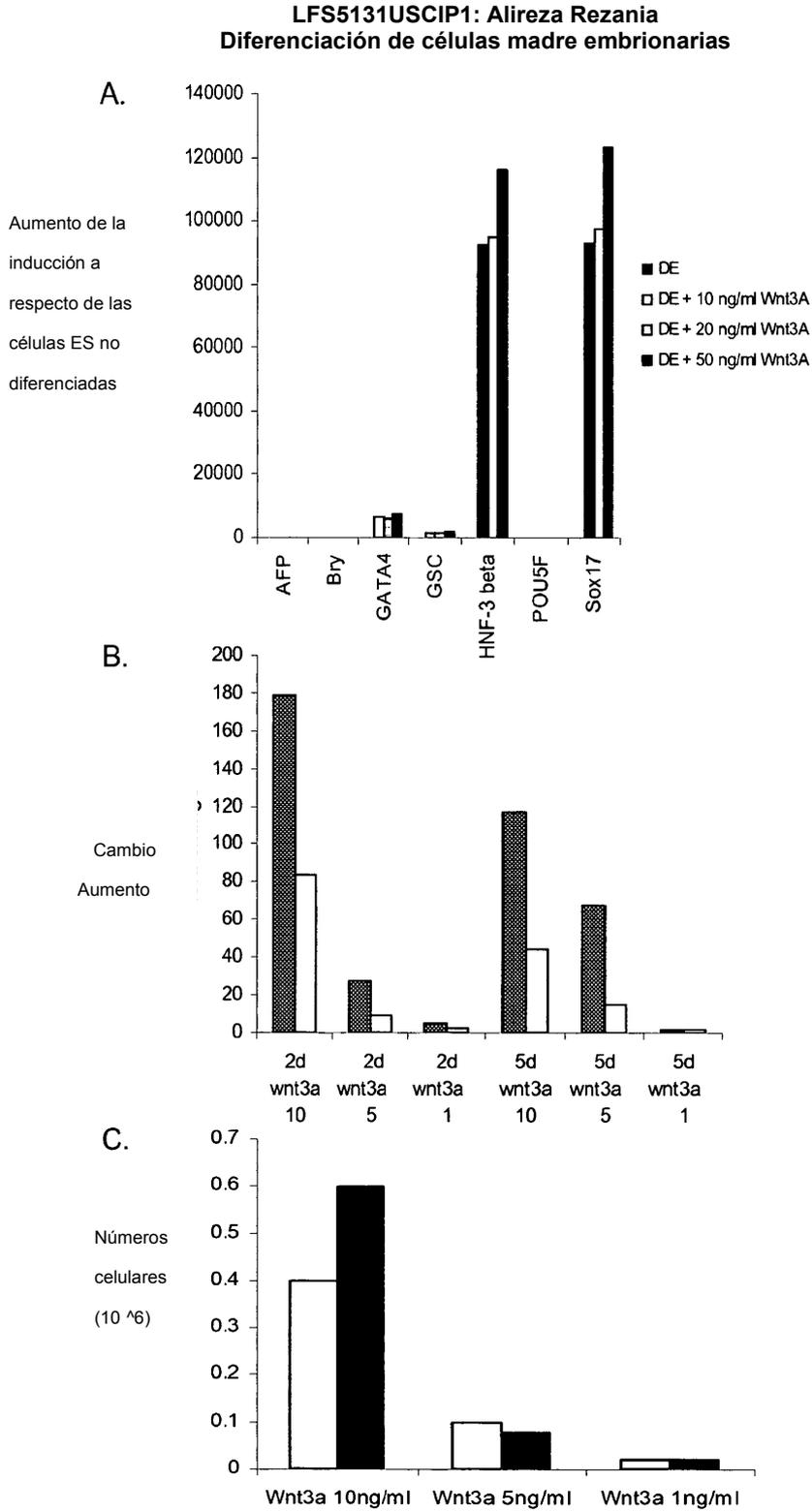


D.



ORIGINAL

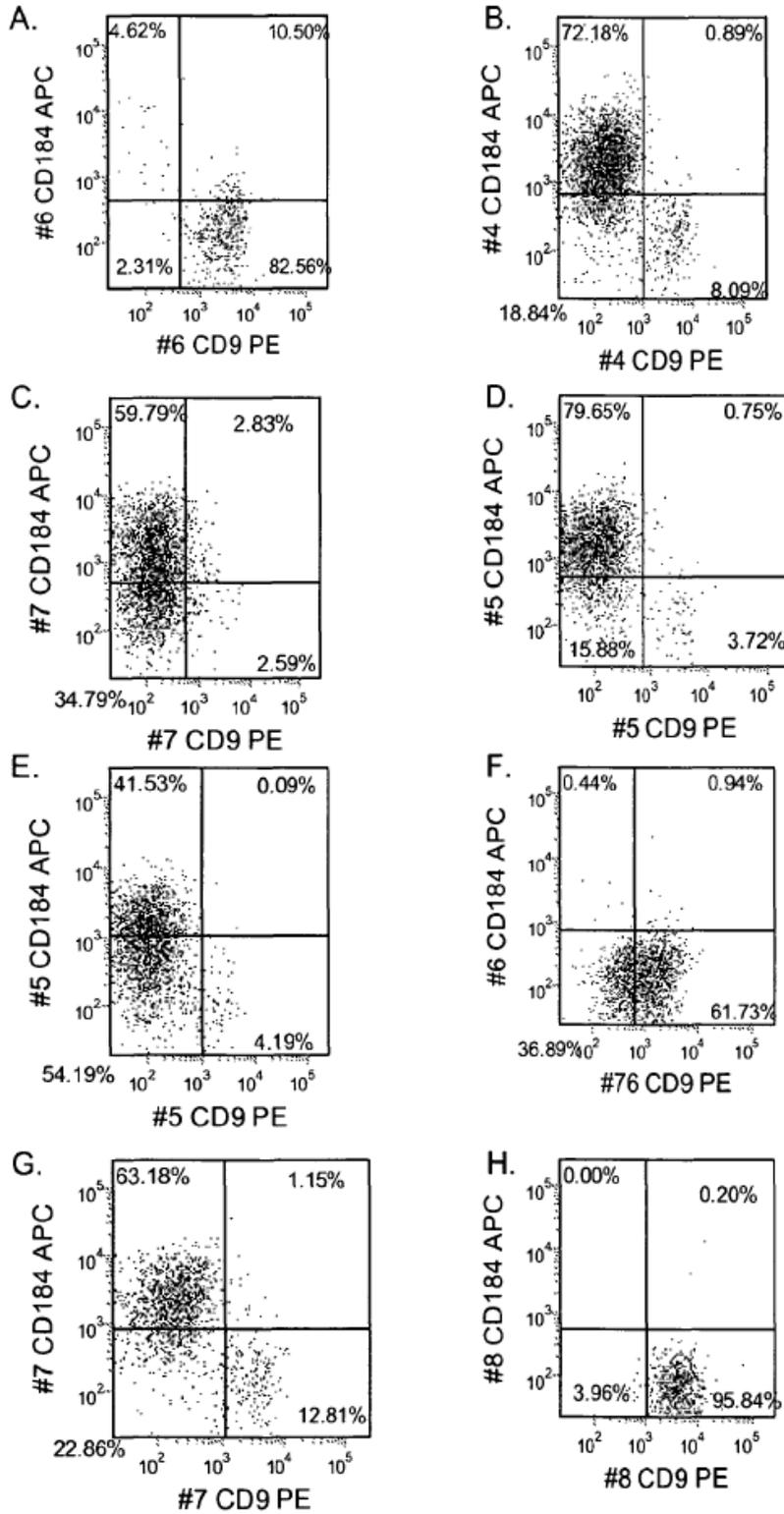
Figura 28.



ORIGINAL

Figura 29.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

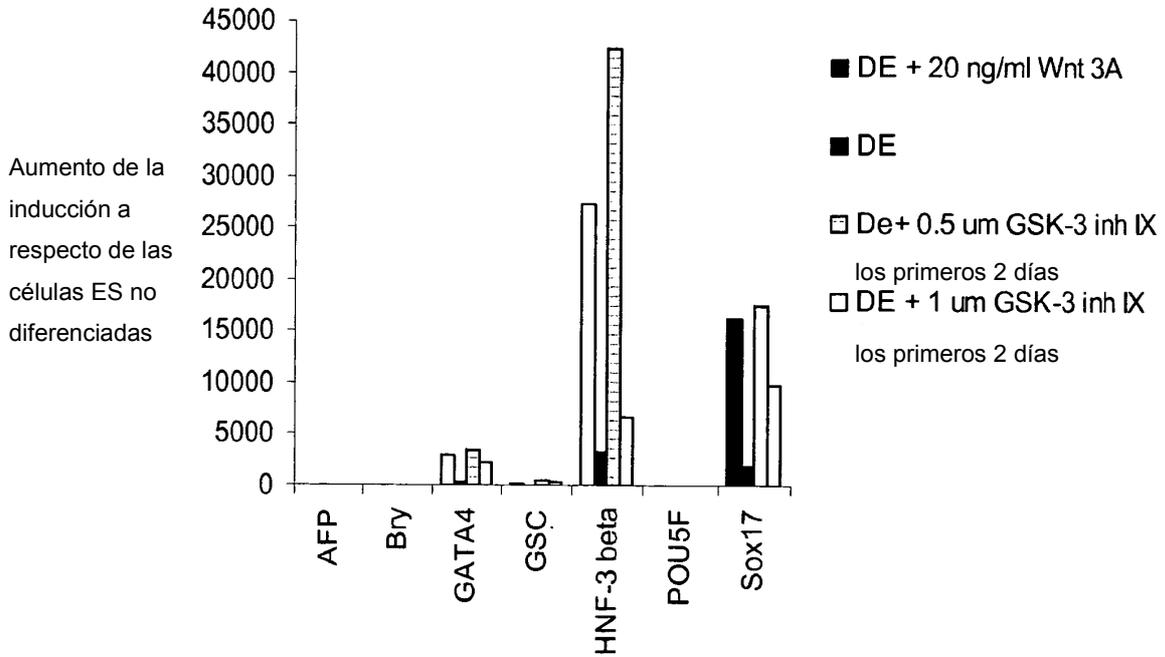


ORIGINAL

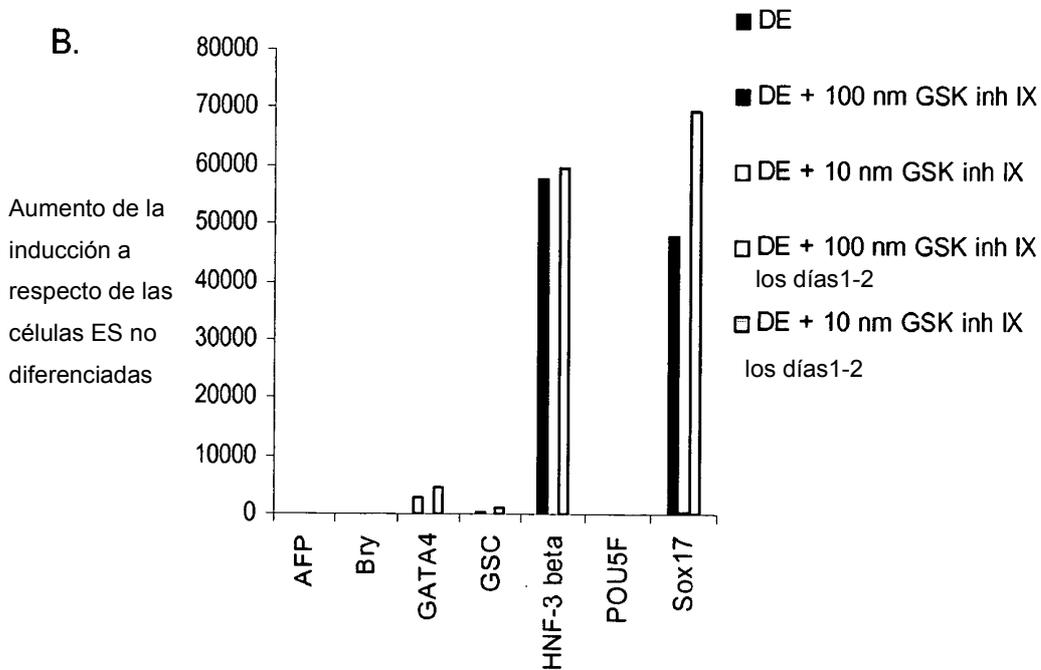
Figura 30.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



B.



ORIGINAL

Figura 31.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

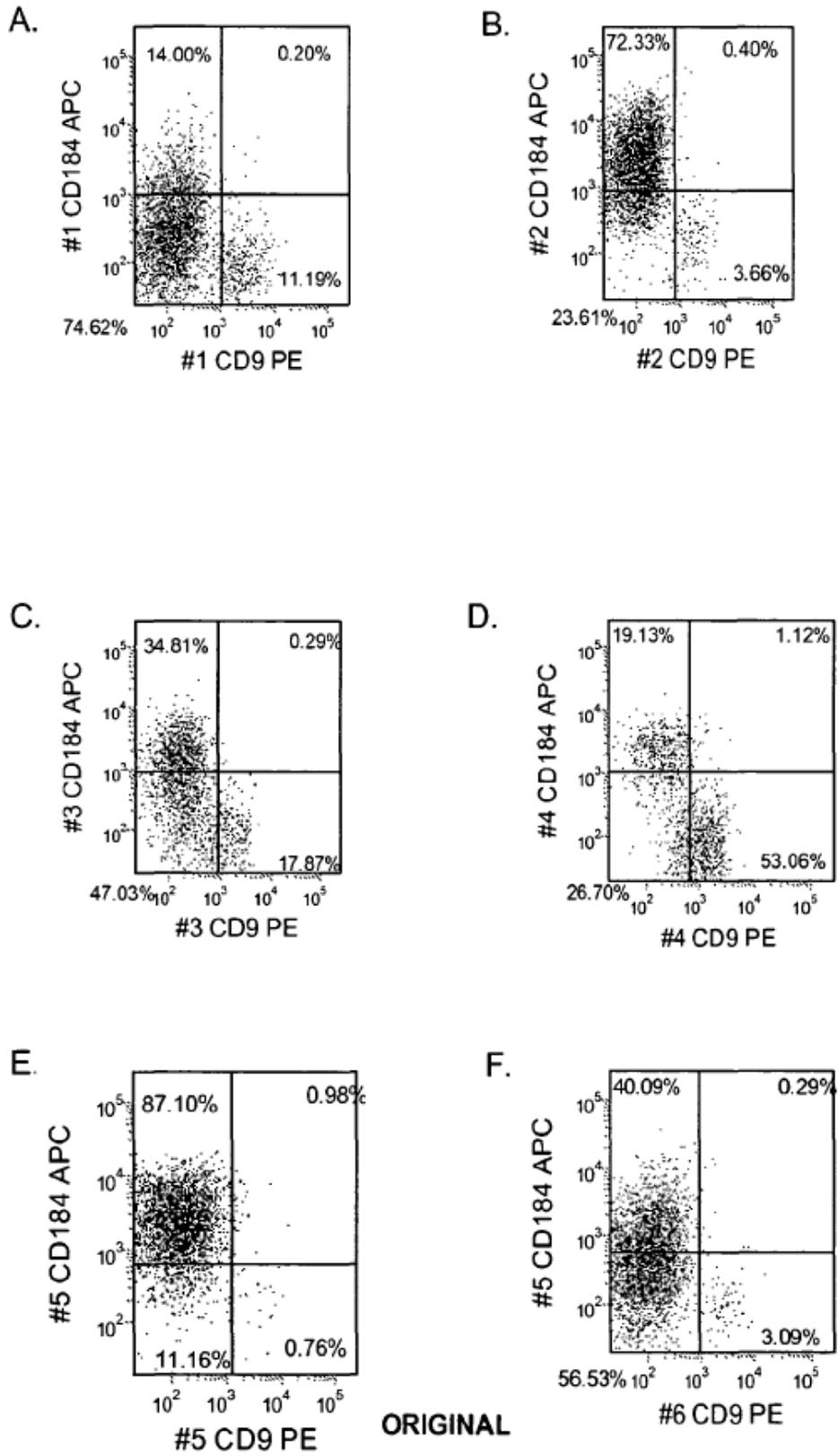
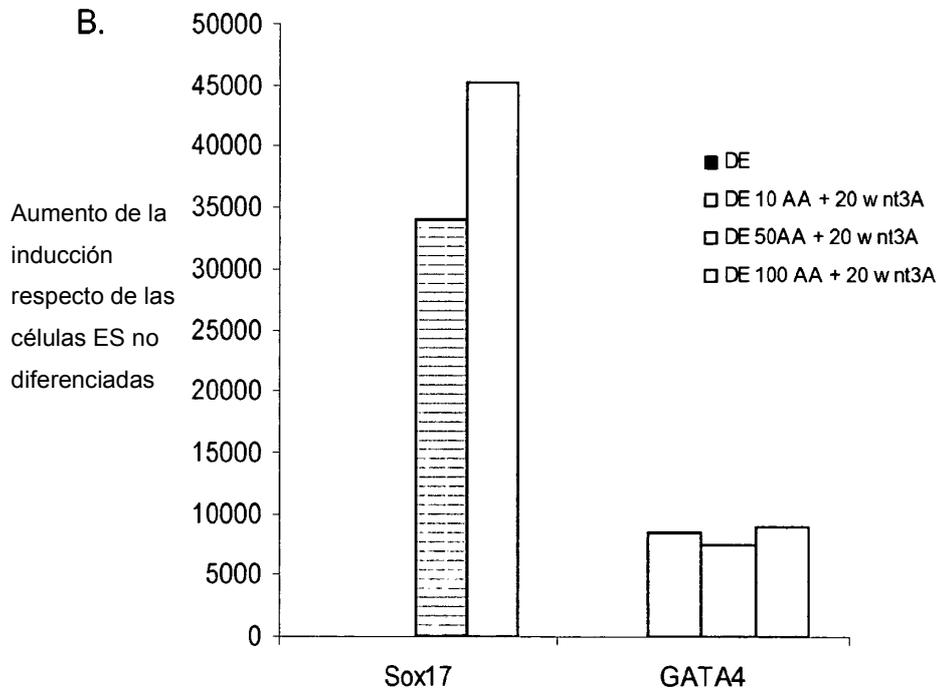
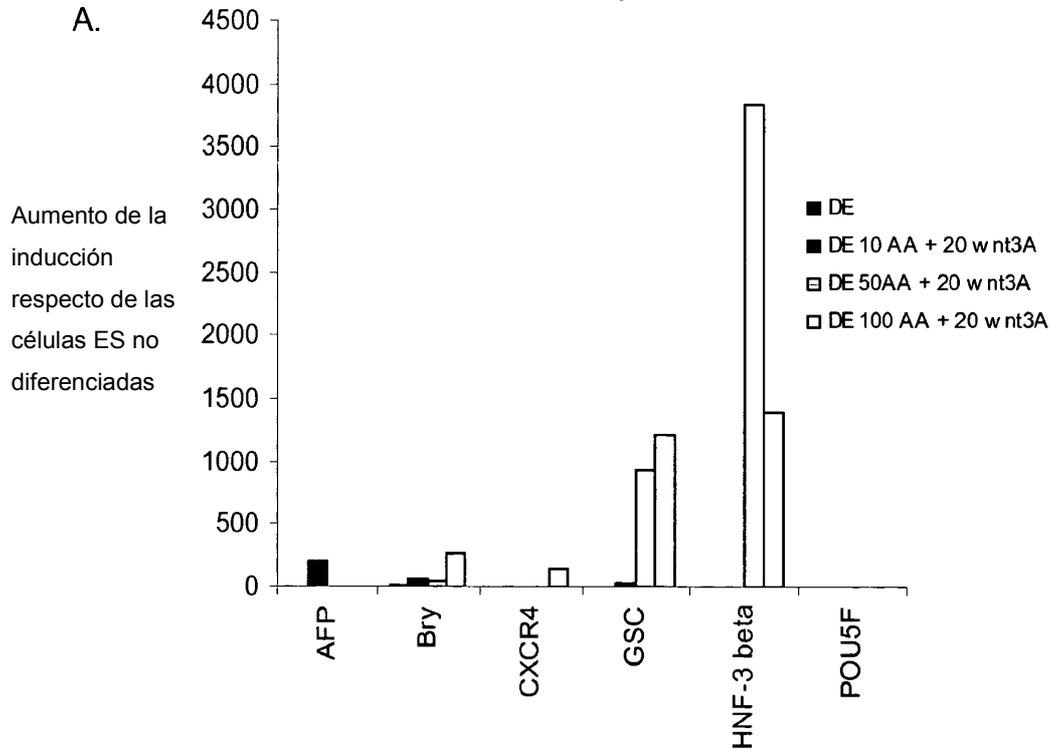


Figura 32.

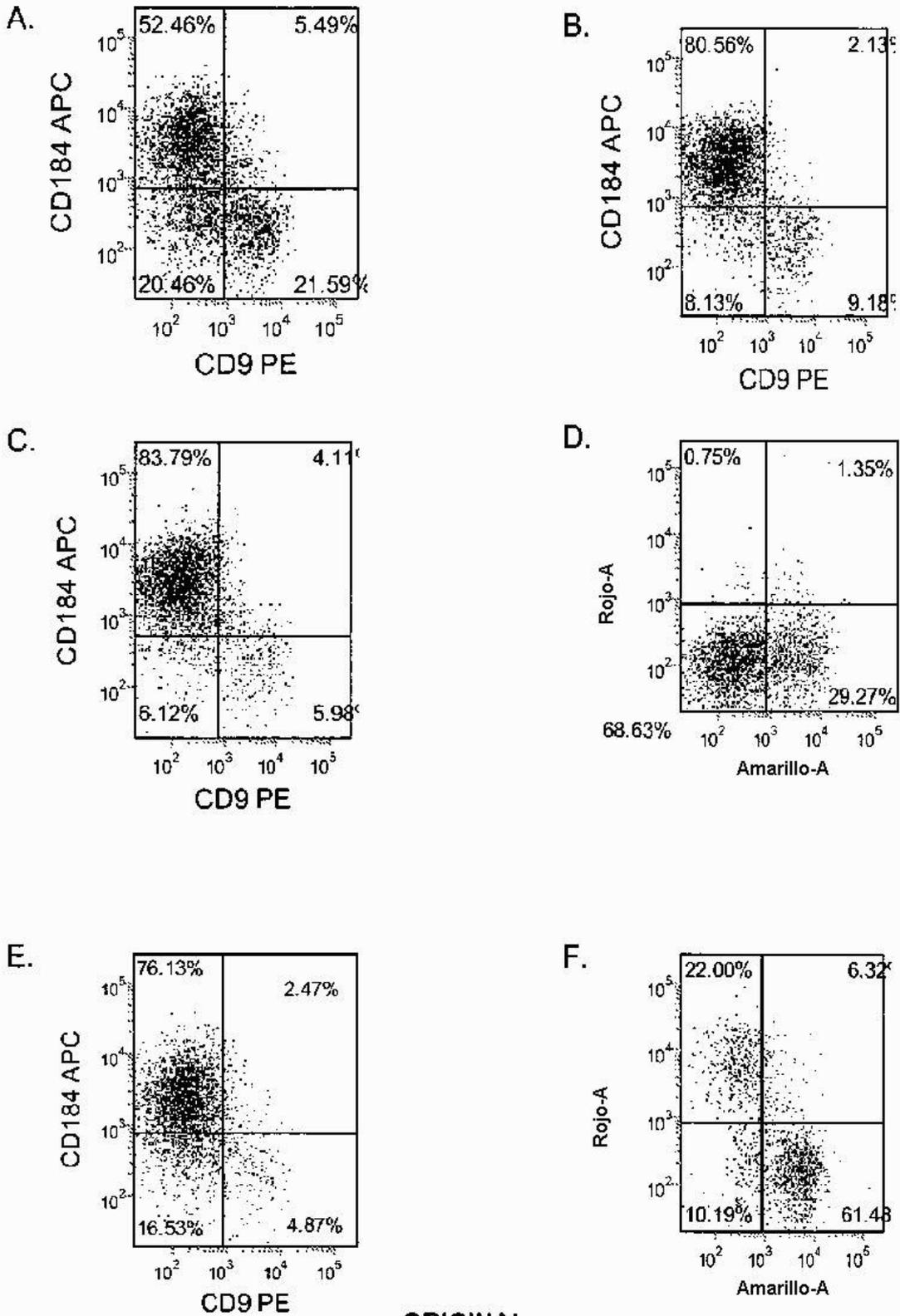
LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 33.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

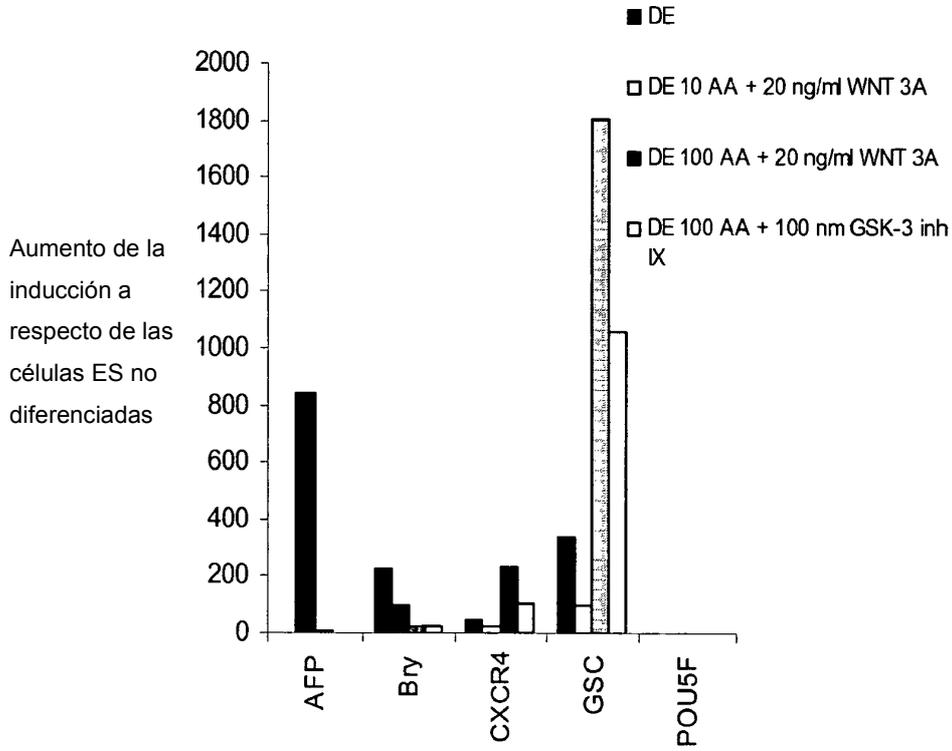


ORIGINAL

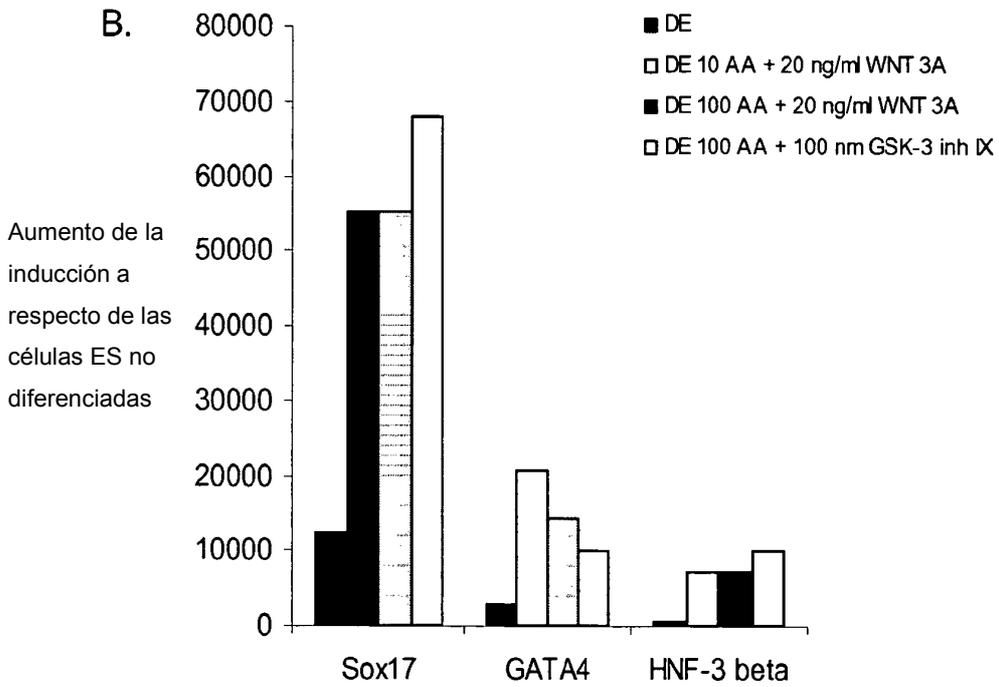
Figura 34.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



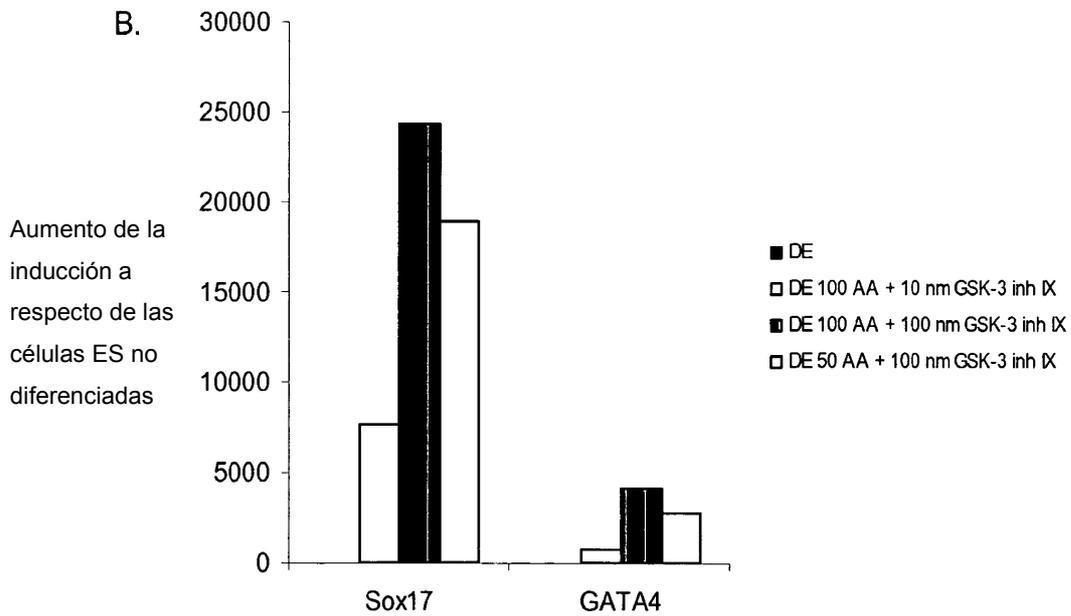
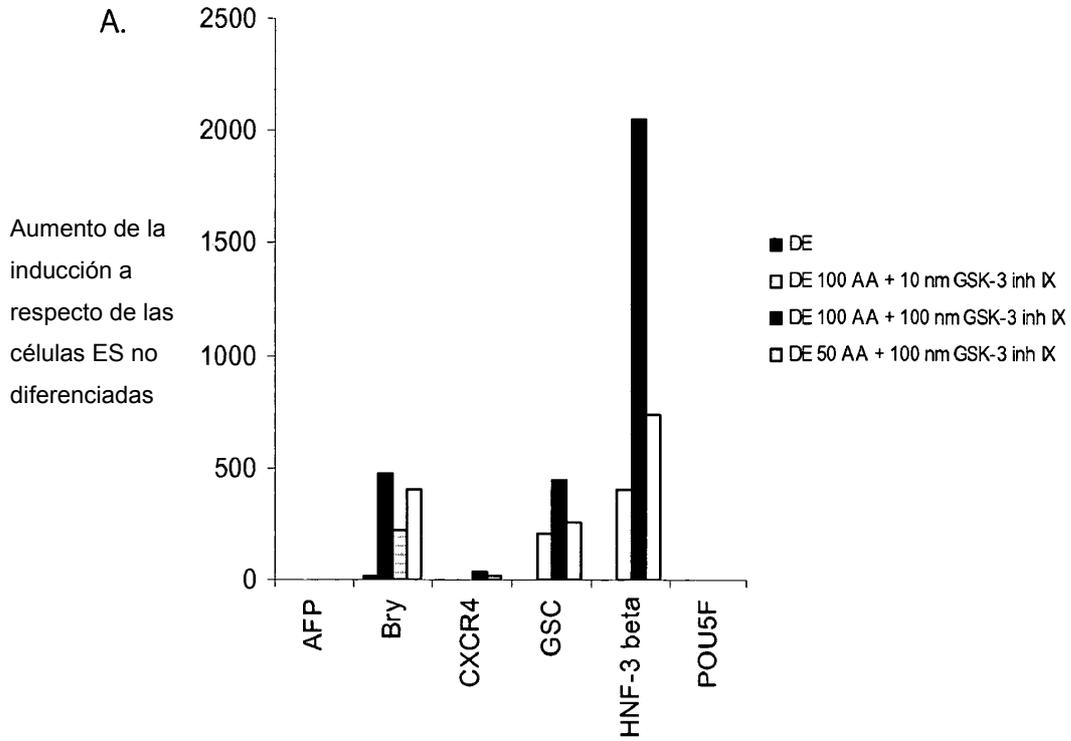
B.



ORIGINAL

Figura 35.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 36.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

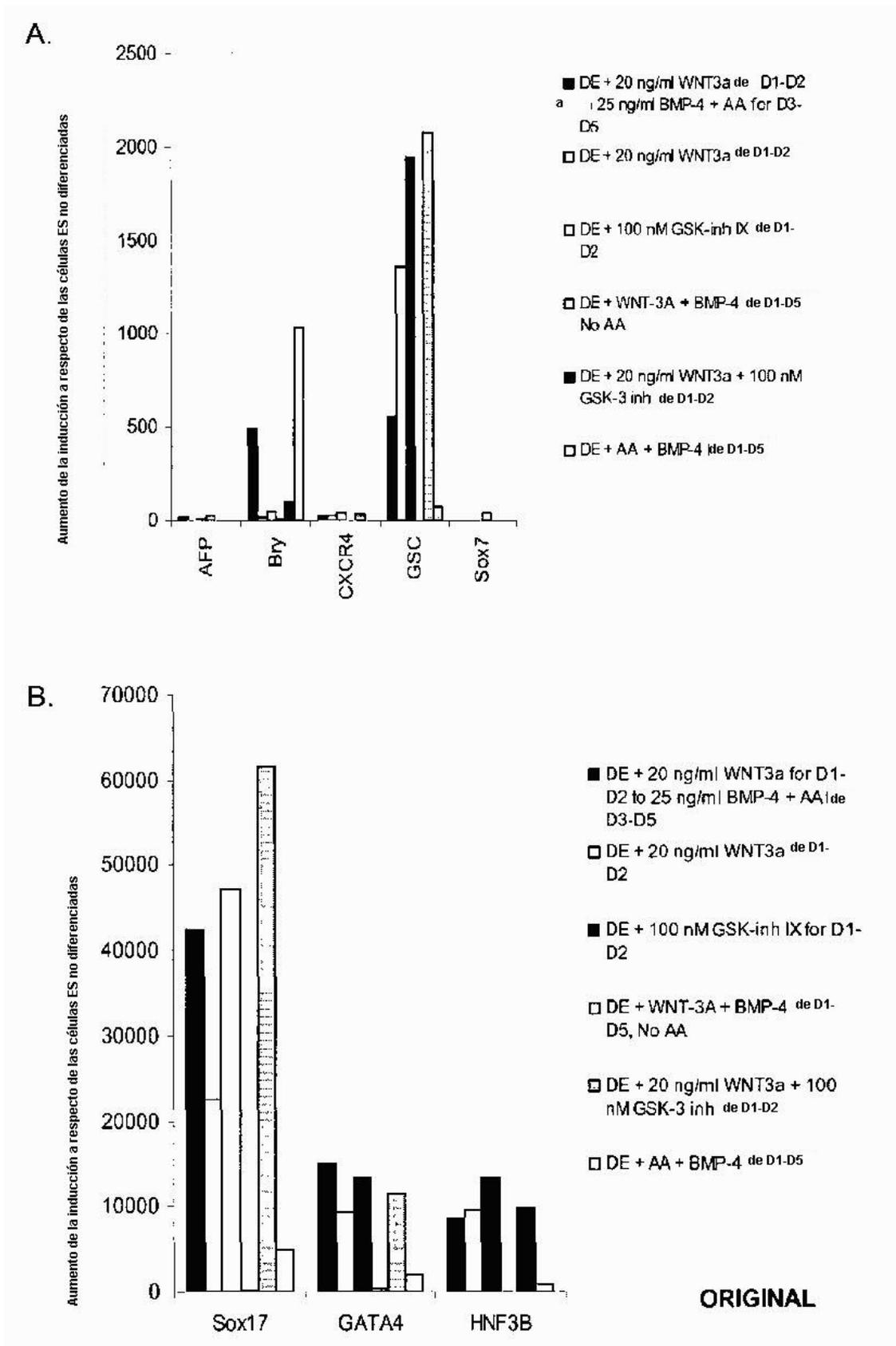
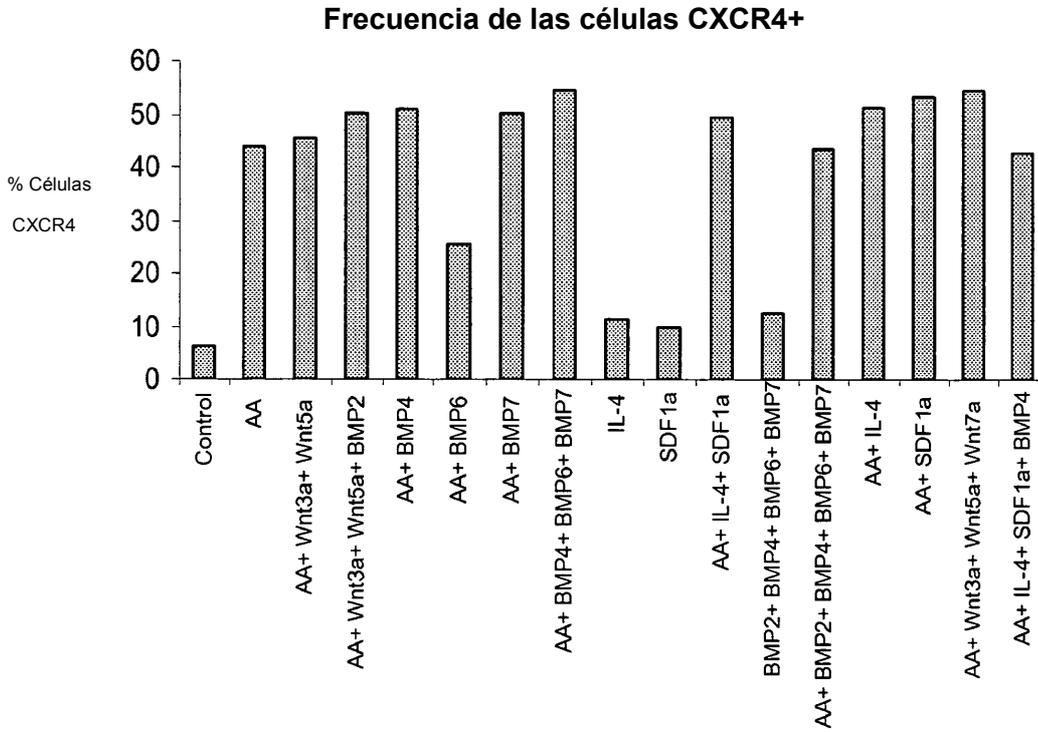


Figura 37.

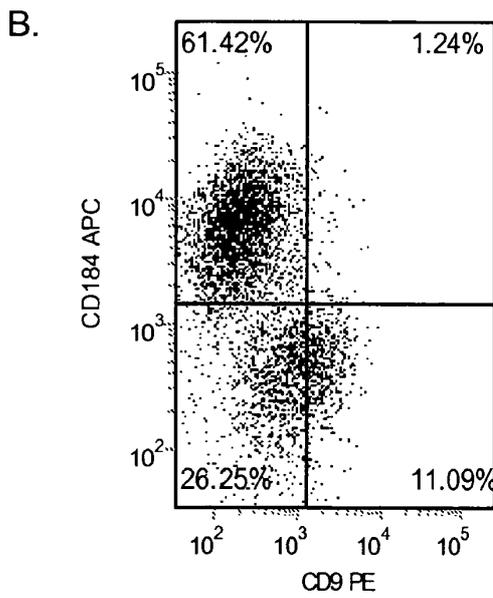
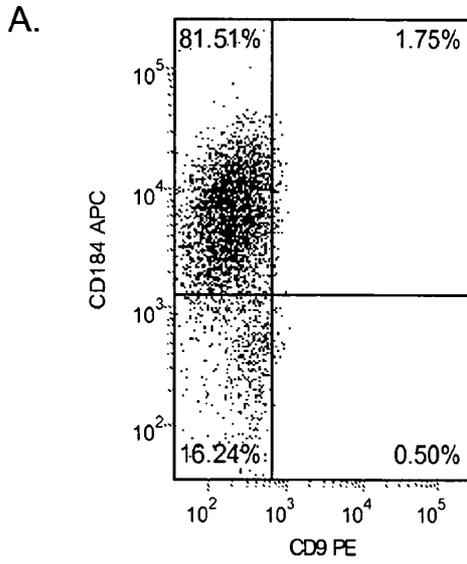
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 38.

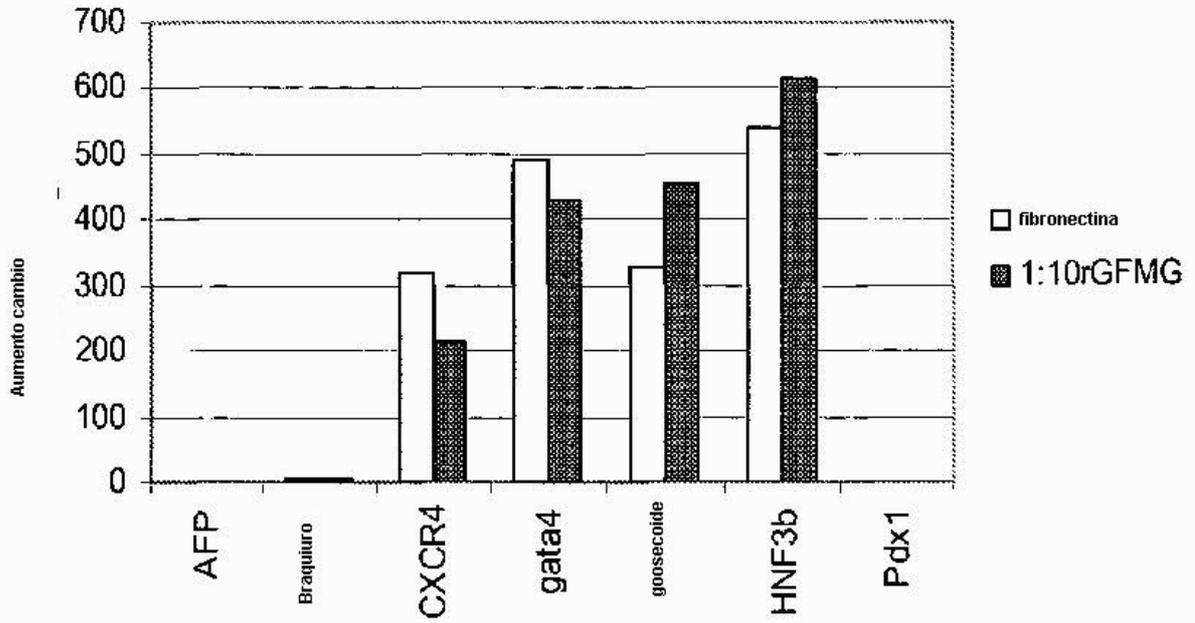
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 39.

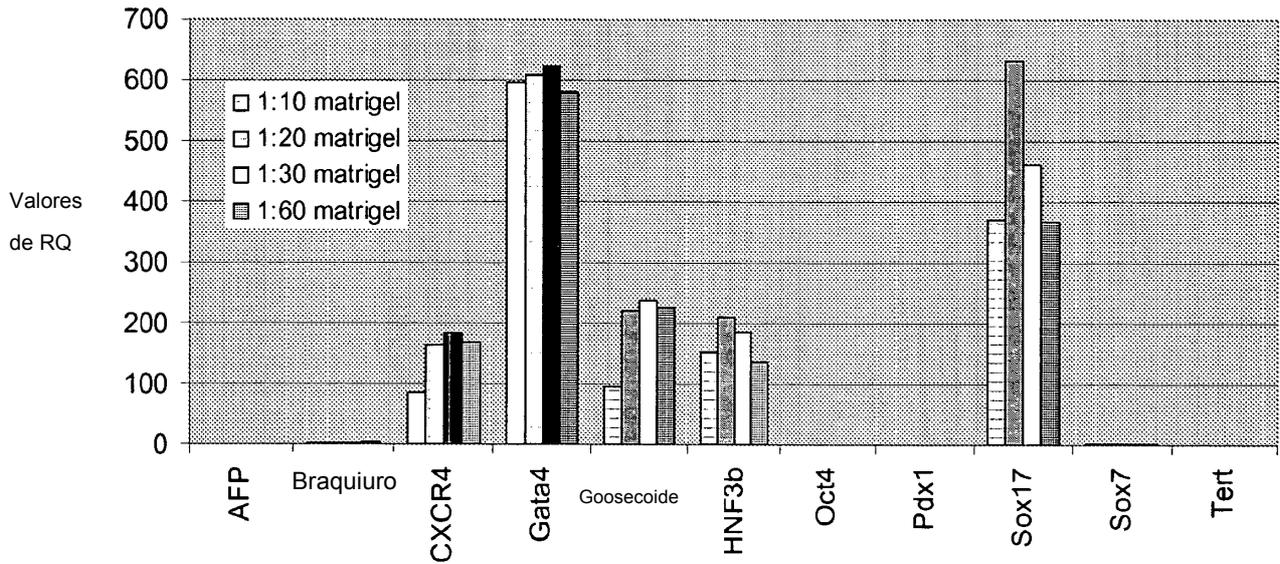
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 40.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 41-1.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

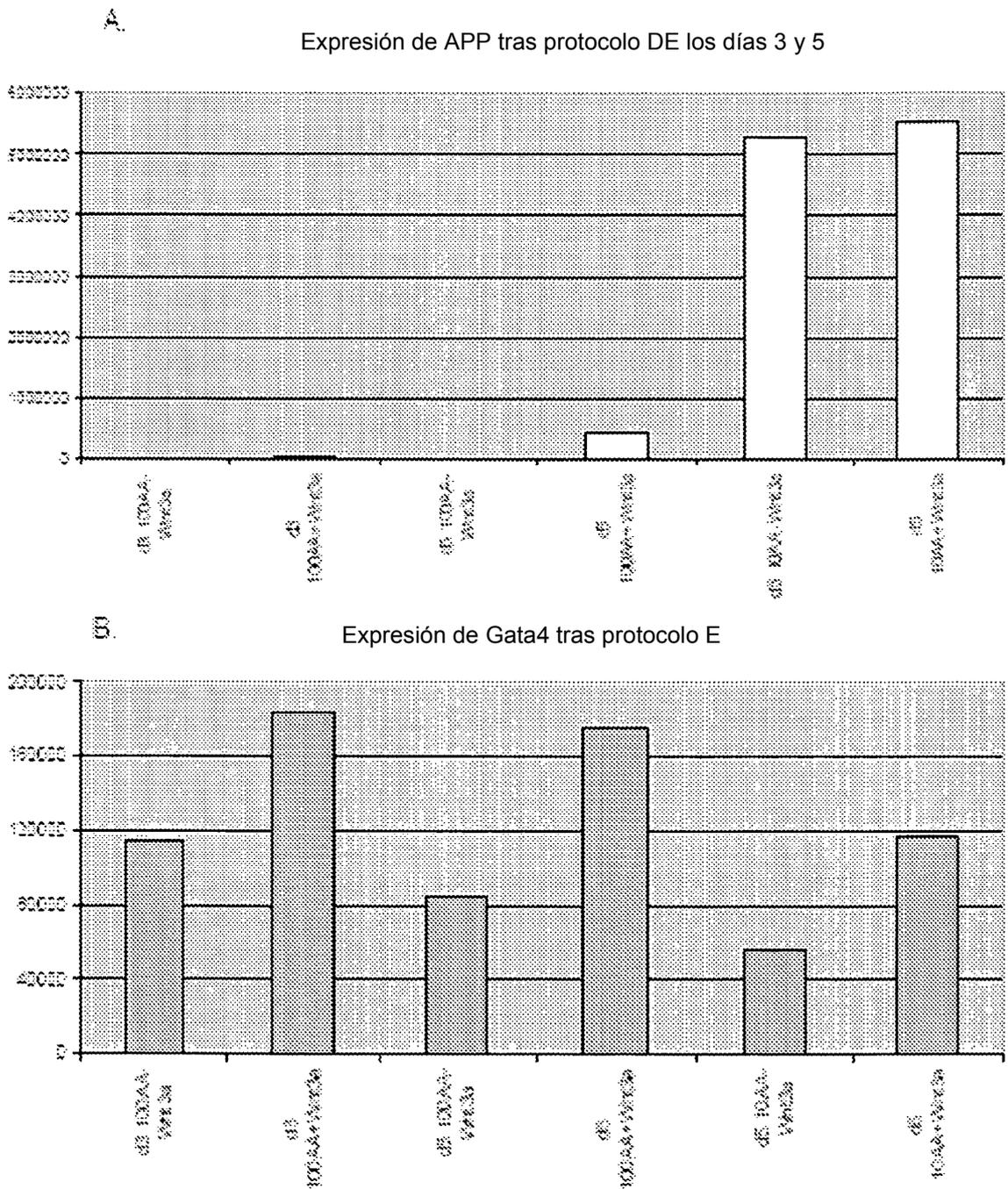


Figura 41-2.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

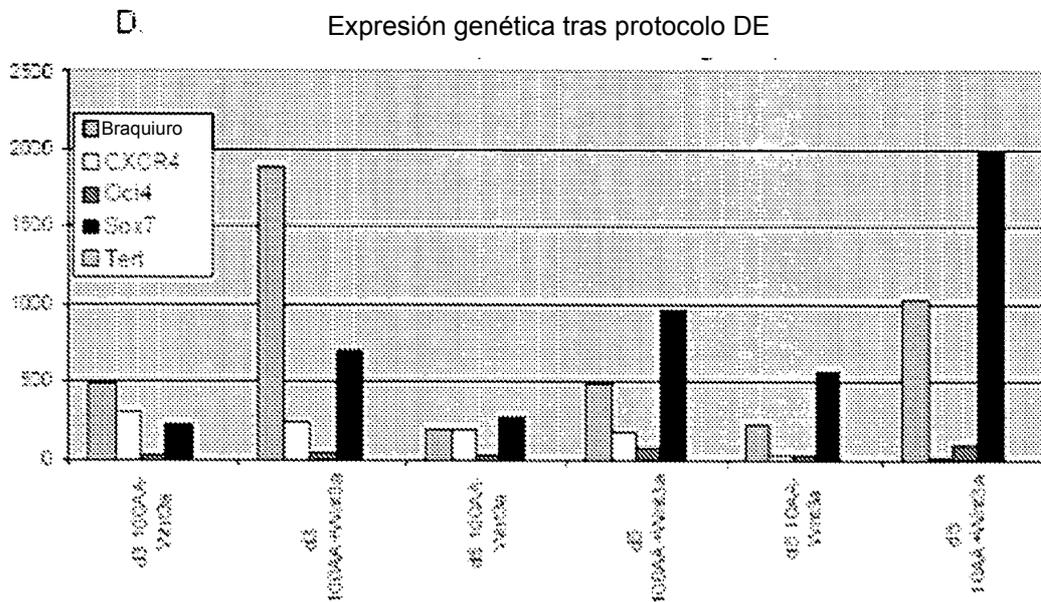
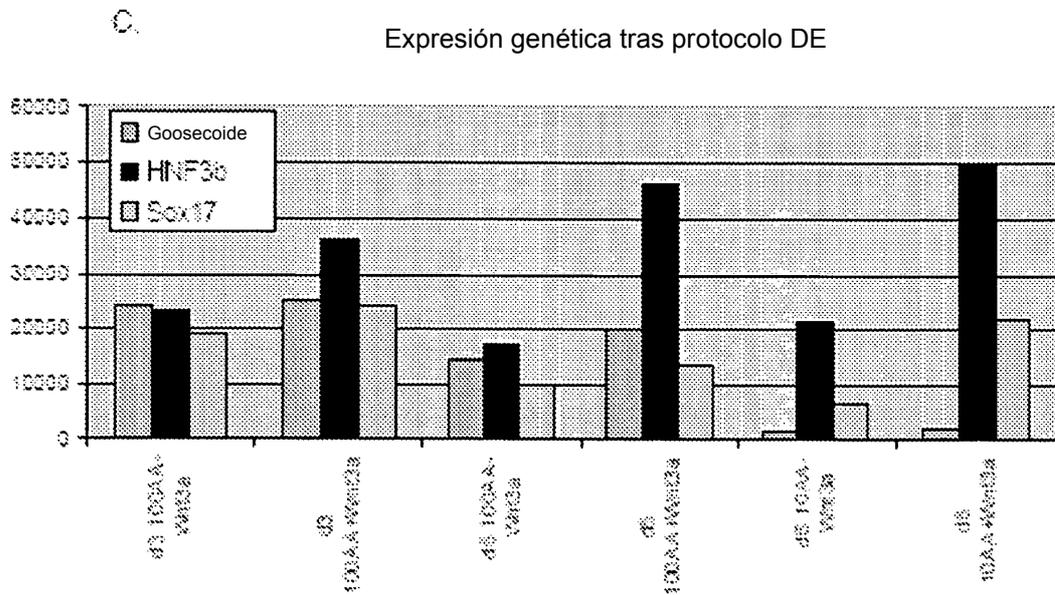


Figura 41-3.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

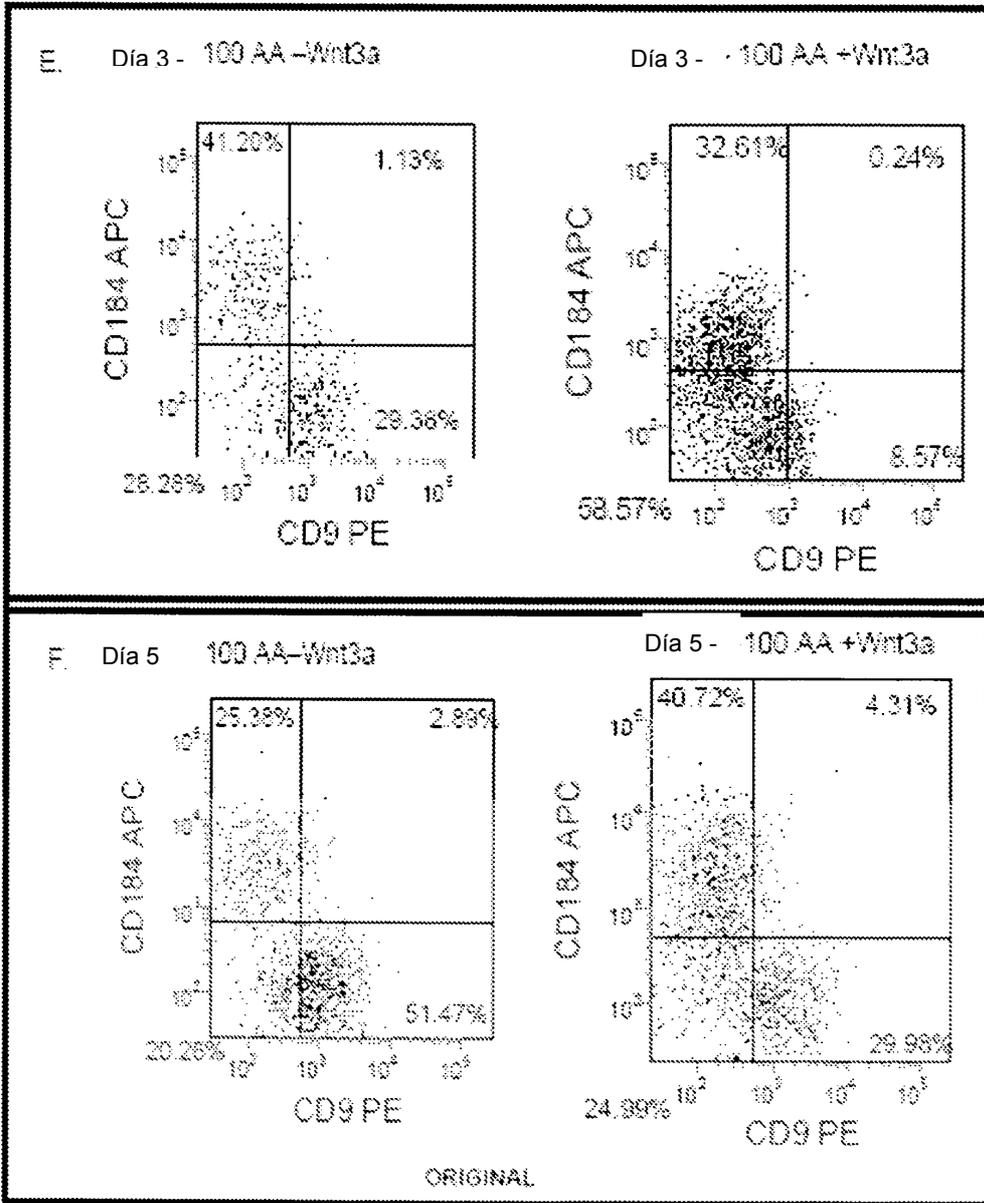


Figura 41-4.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

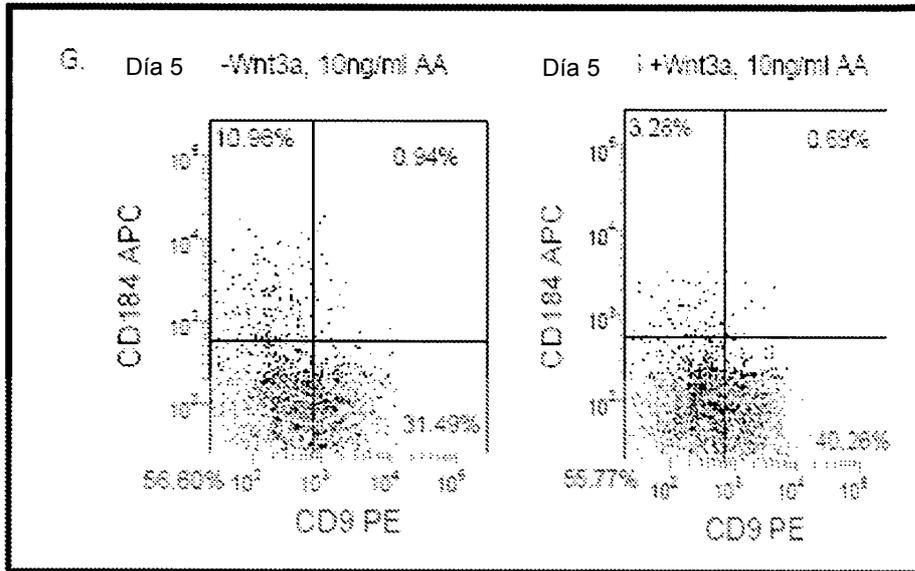
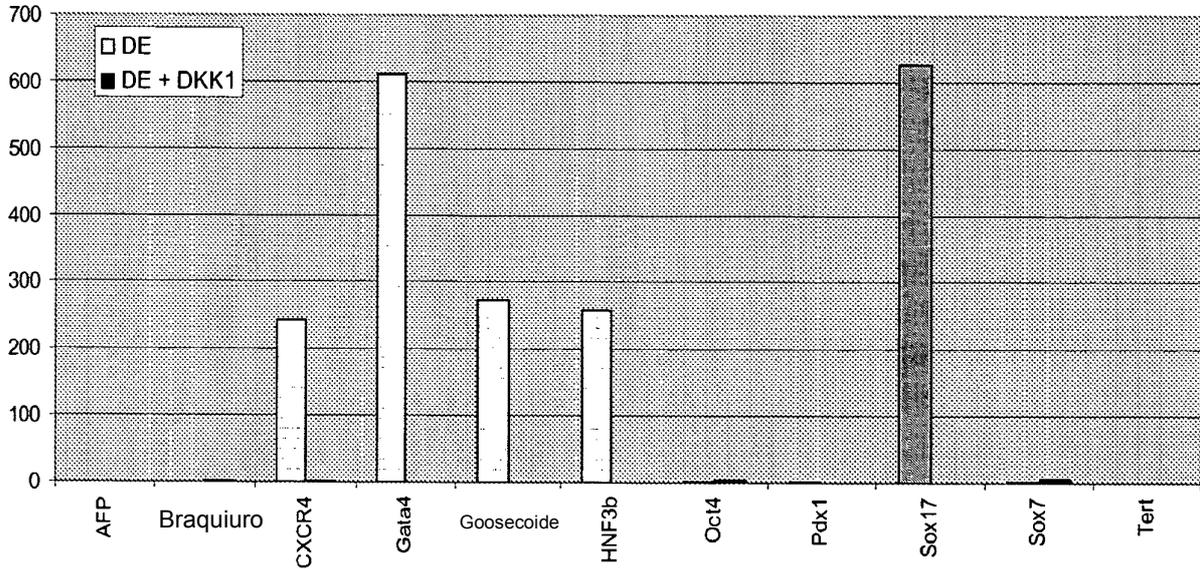


Figura 42.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

Expresión genética de células tratadas con protocolo DE



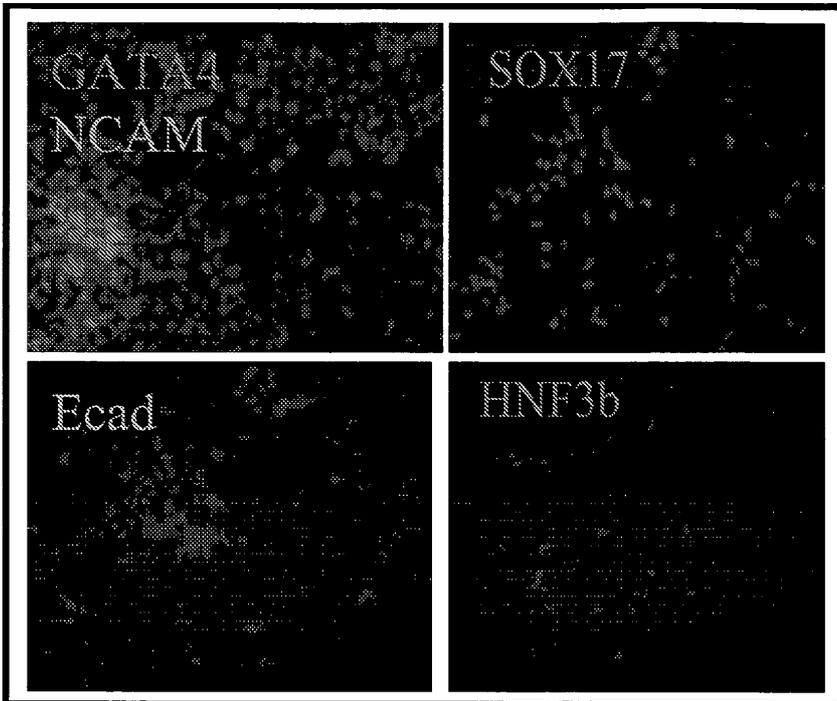
ORIGINAL

Figura 43.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei  
Diferenciación de células madre embrionarias

ORIGINAL

A.



B.

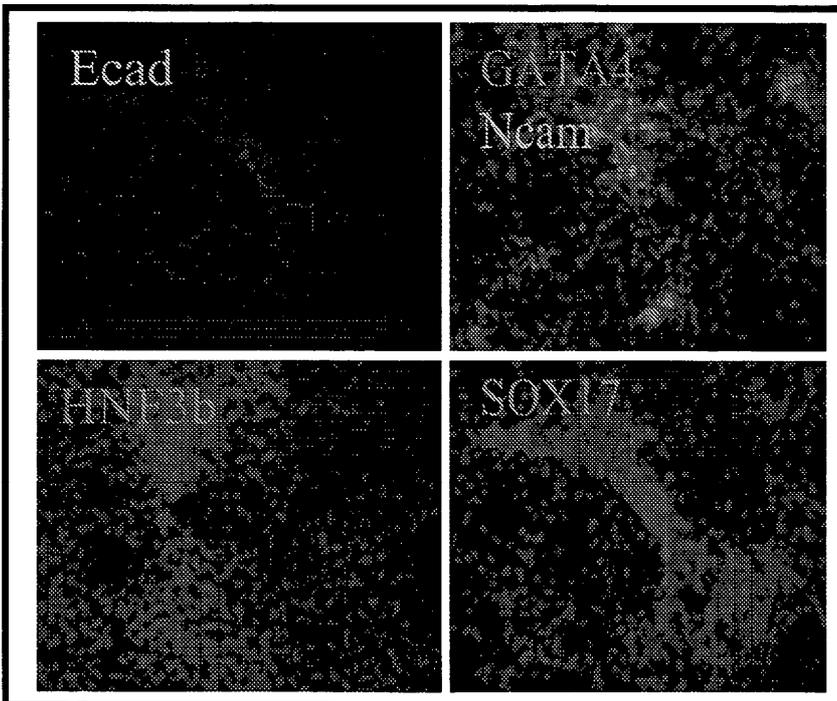
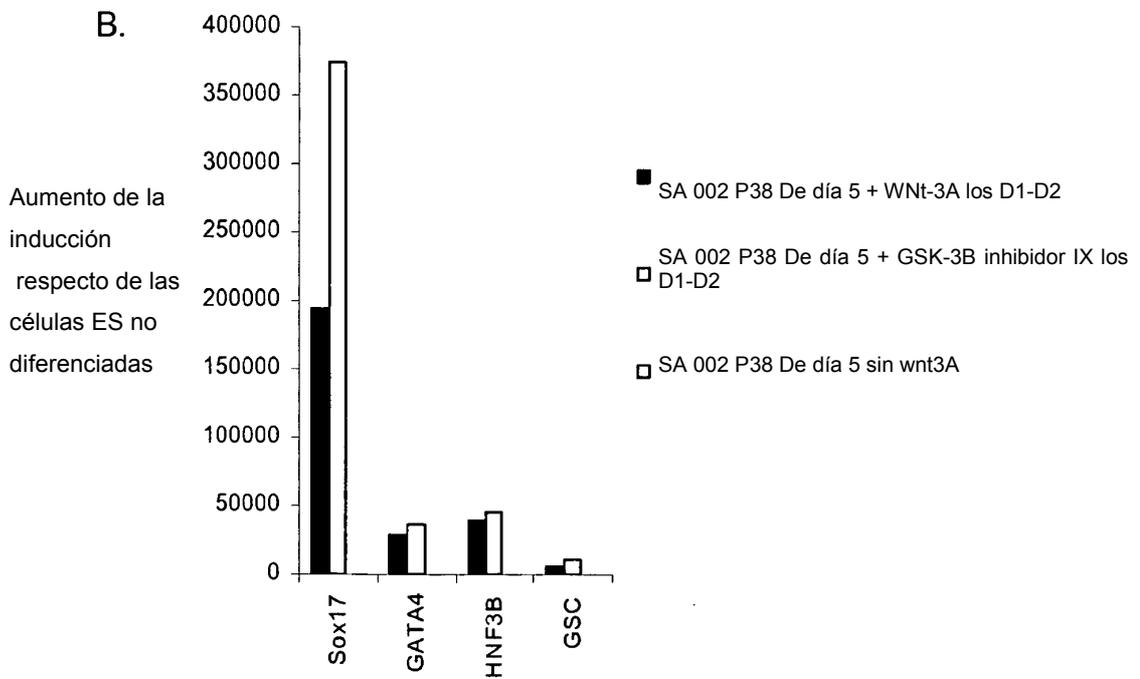
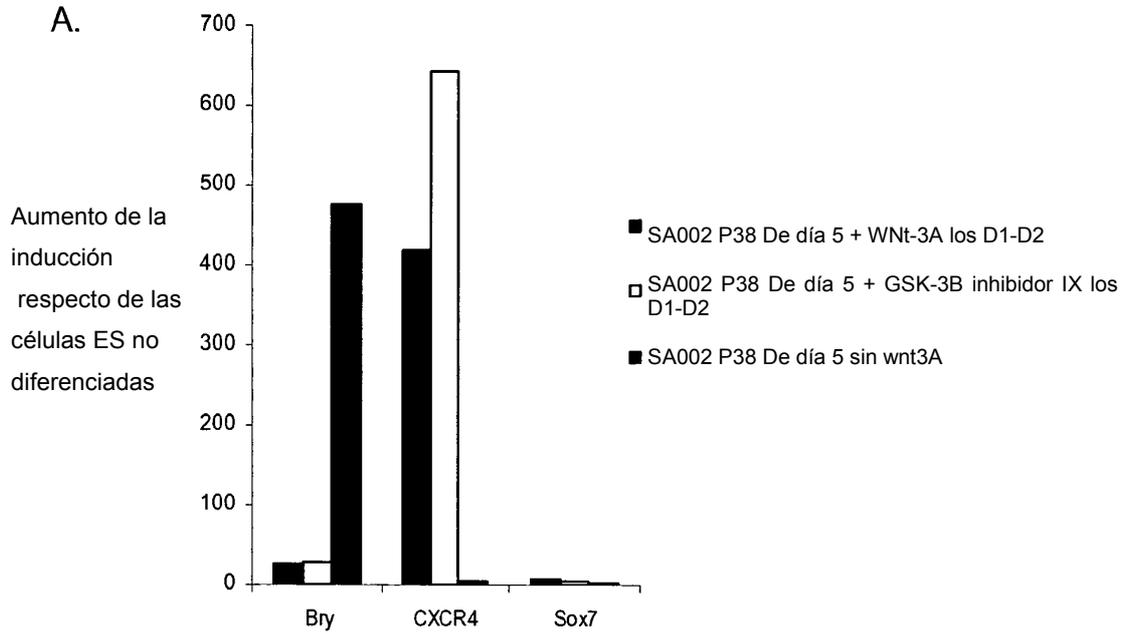


Figura 44.

**LFS5131USCIP1: Alireza Rezania**  
**Diferenciación de células madre embrionarias**

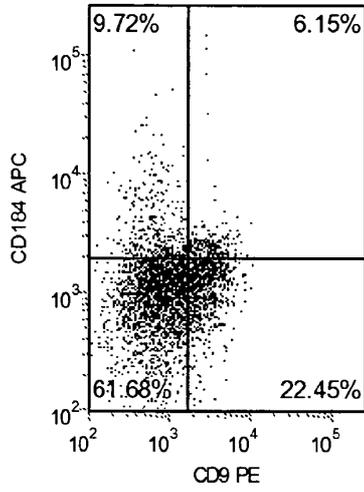


ORIGINAL

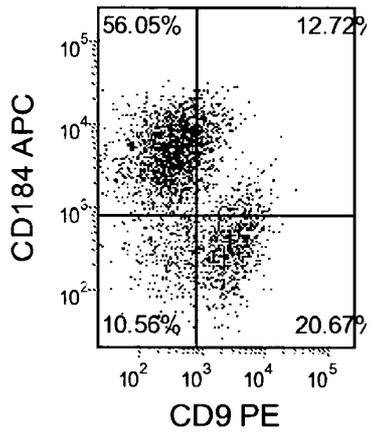
Figura 45.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

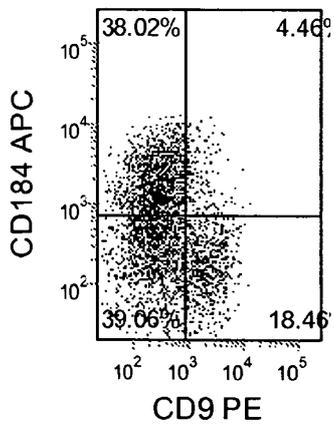
A.



B.



C.

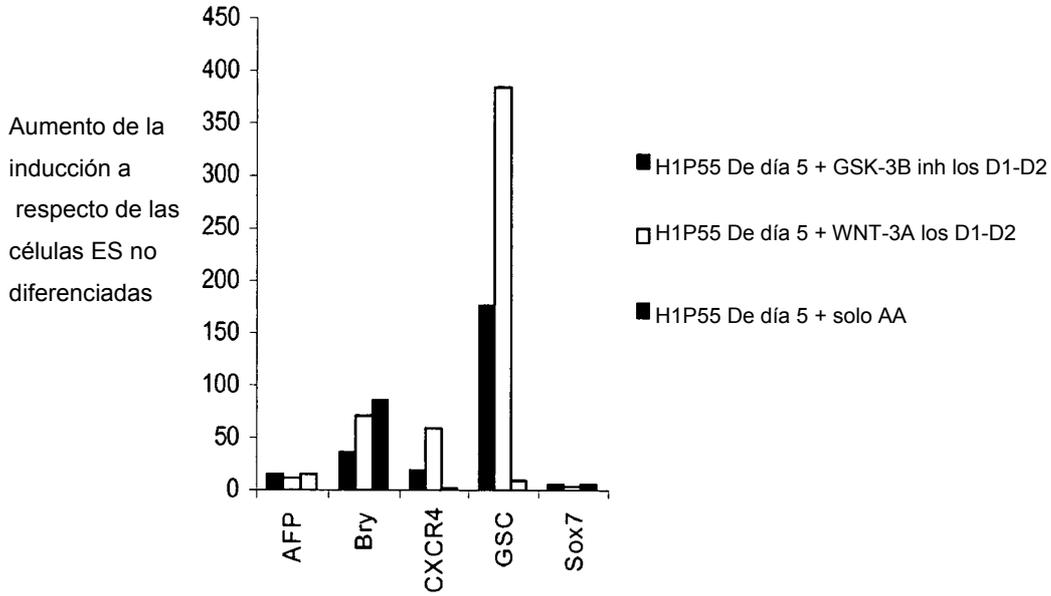


ORIGINAL

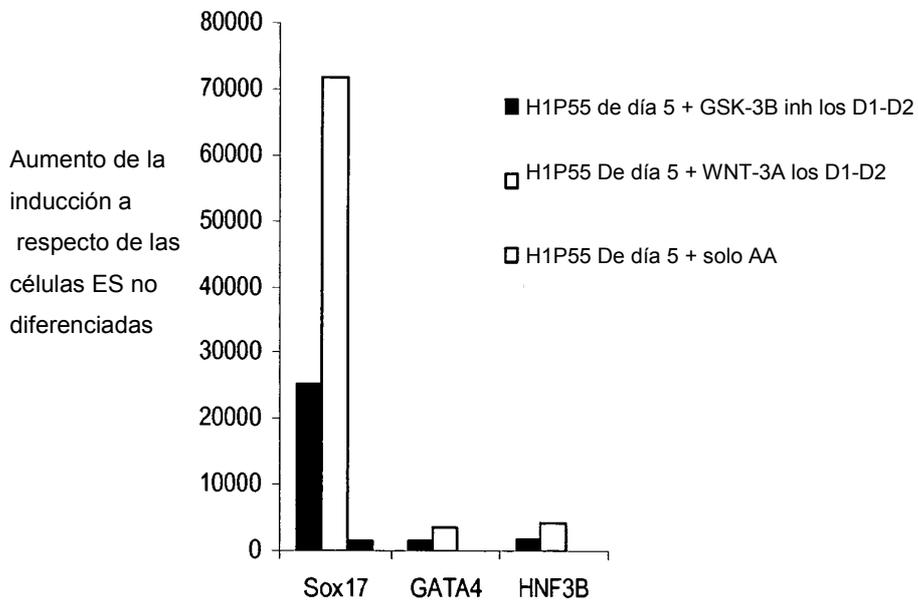
Figura 46.

**LFS5131USCIP1: Alireza Rezania**  
**Diferenciación de células madre embrionarias**

**A. Formación de DE en placas recubiertas de suero hu**



**B. Formación de DE en placas recubiertas de suero hu**

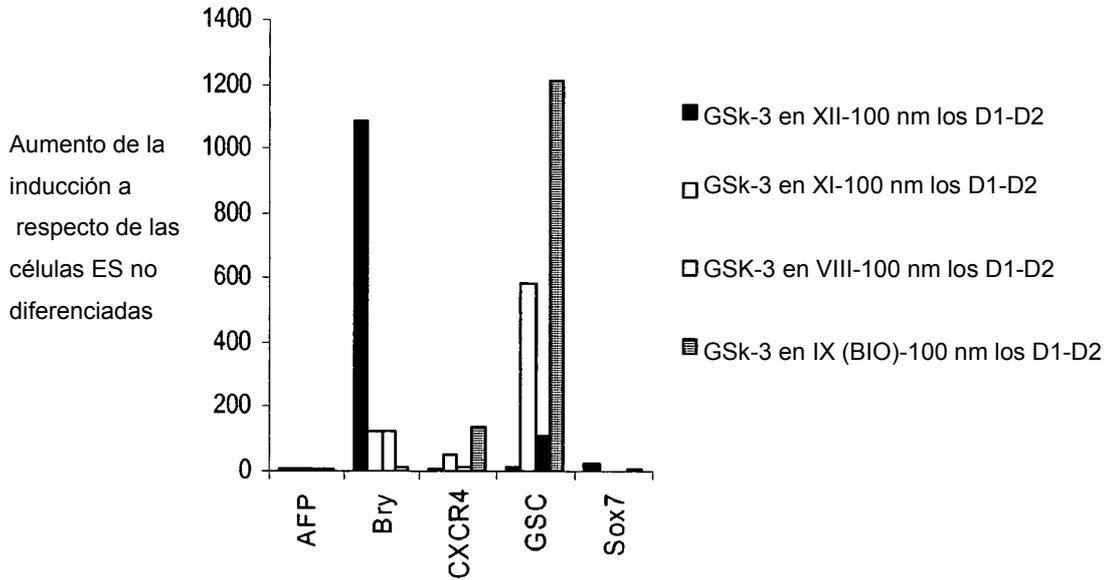


**ORIGINAL**

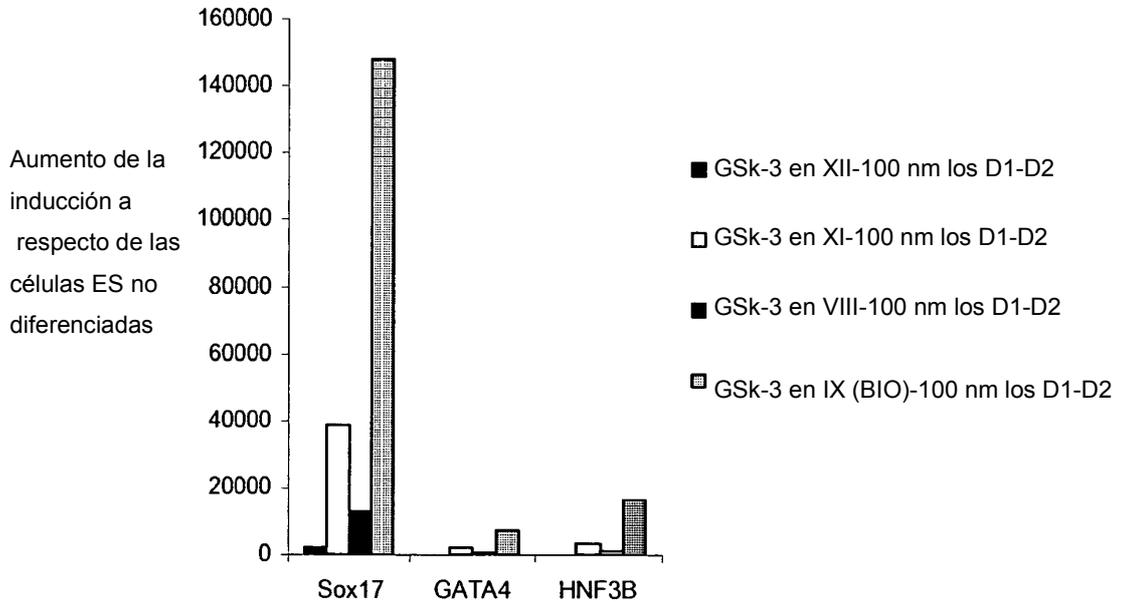
Figura 47.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia  
Diferenciación de células madre embrionarias

A. Evaluación del día 5 de H1P54 De de varios GSK-3 Inh



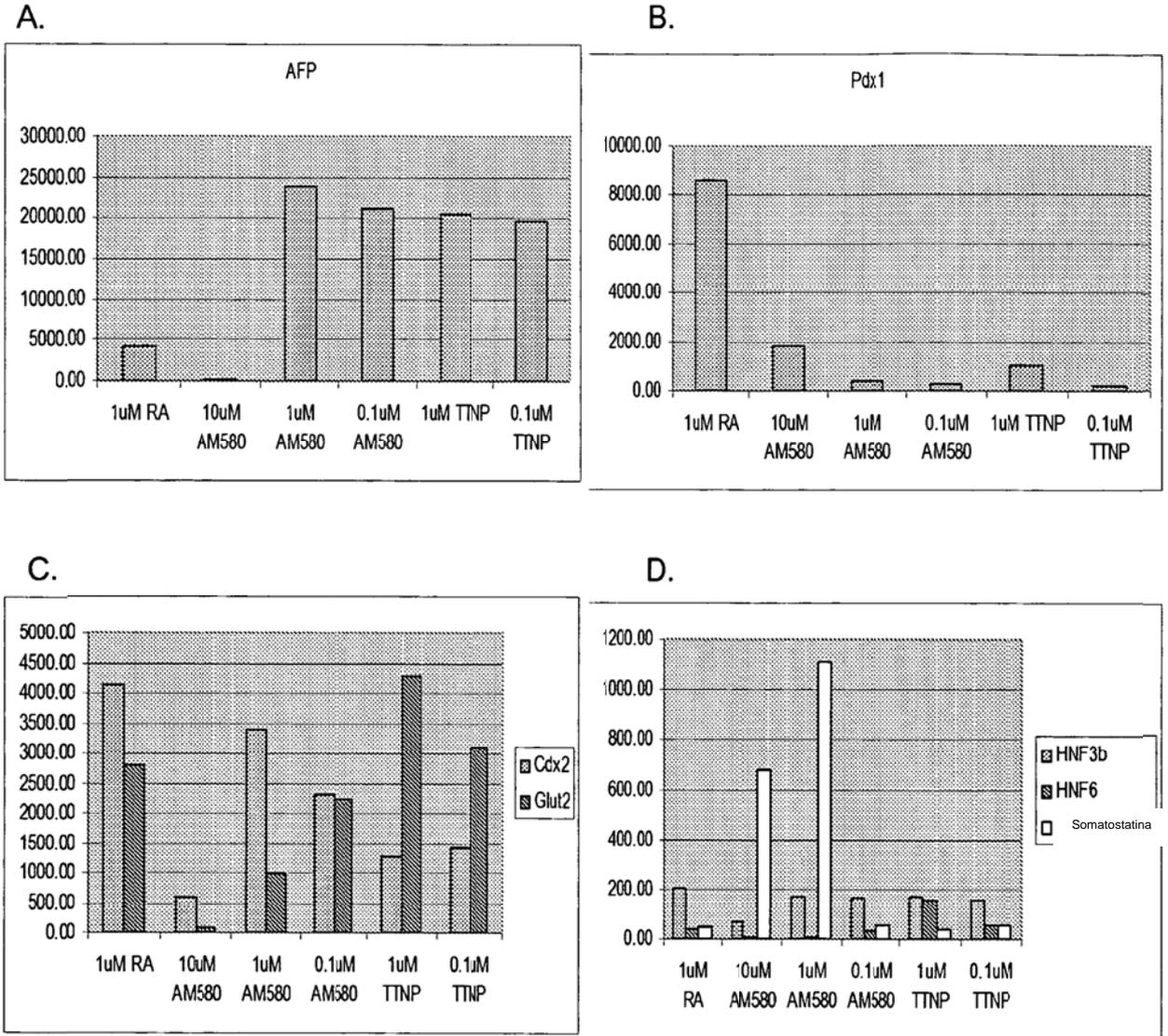
B. Evaluación del día 5 de H1P54 De de varios GSK-3B inh



ORIGINAL

Figura 48.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanja  
Diferenciación de células madre embrionarias

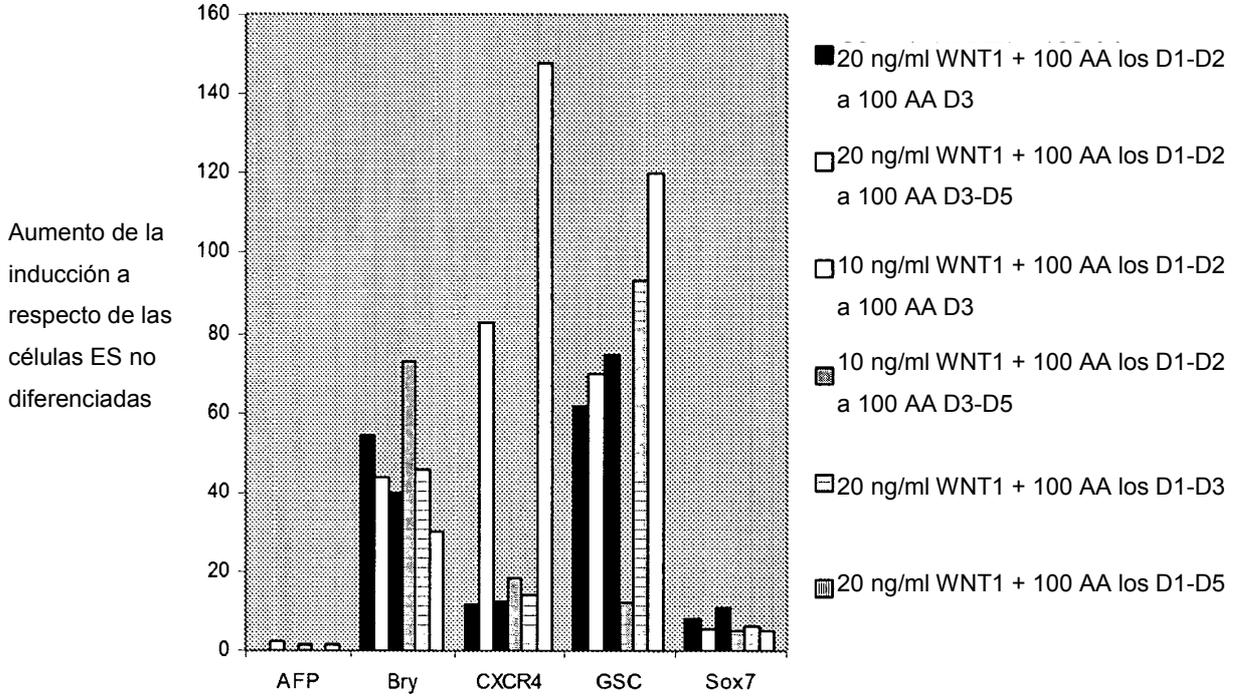


ORIGINAL

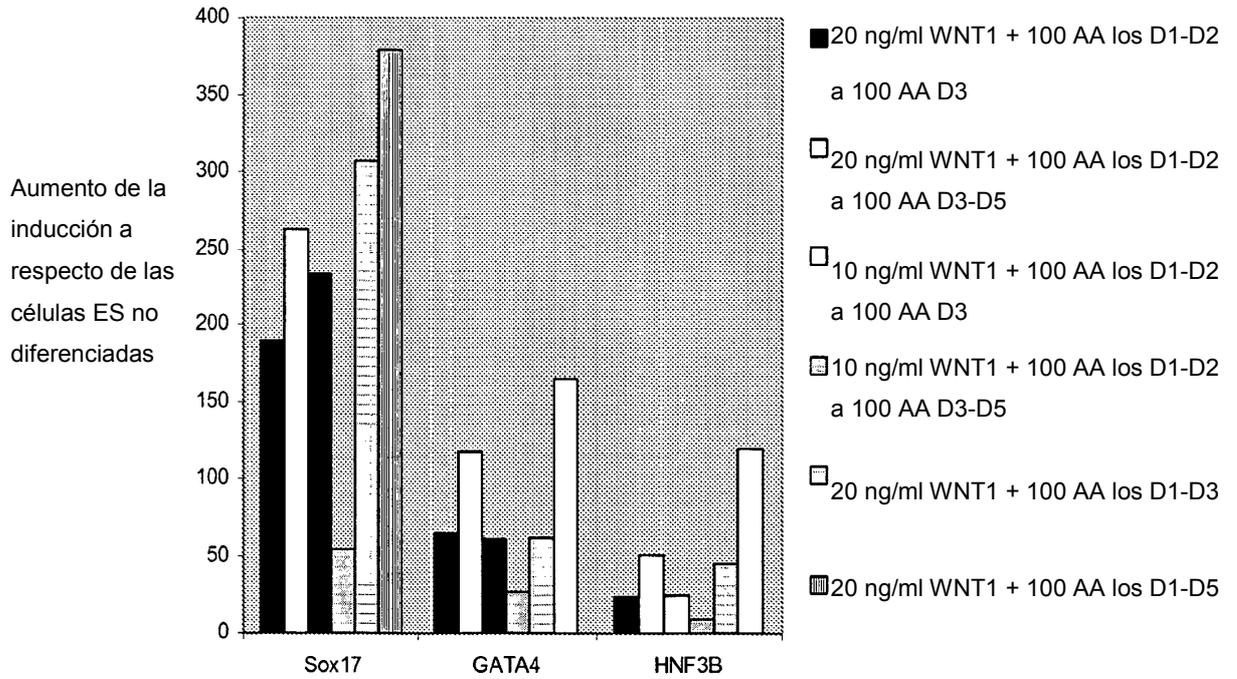
Figura 49.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



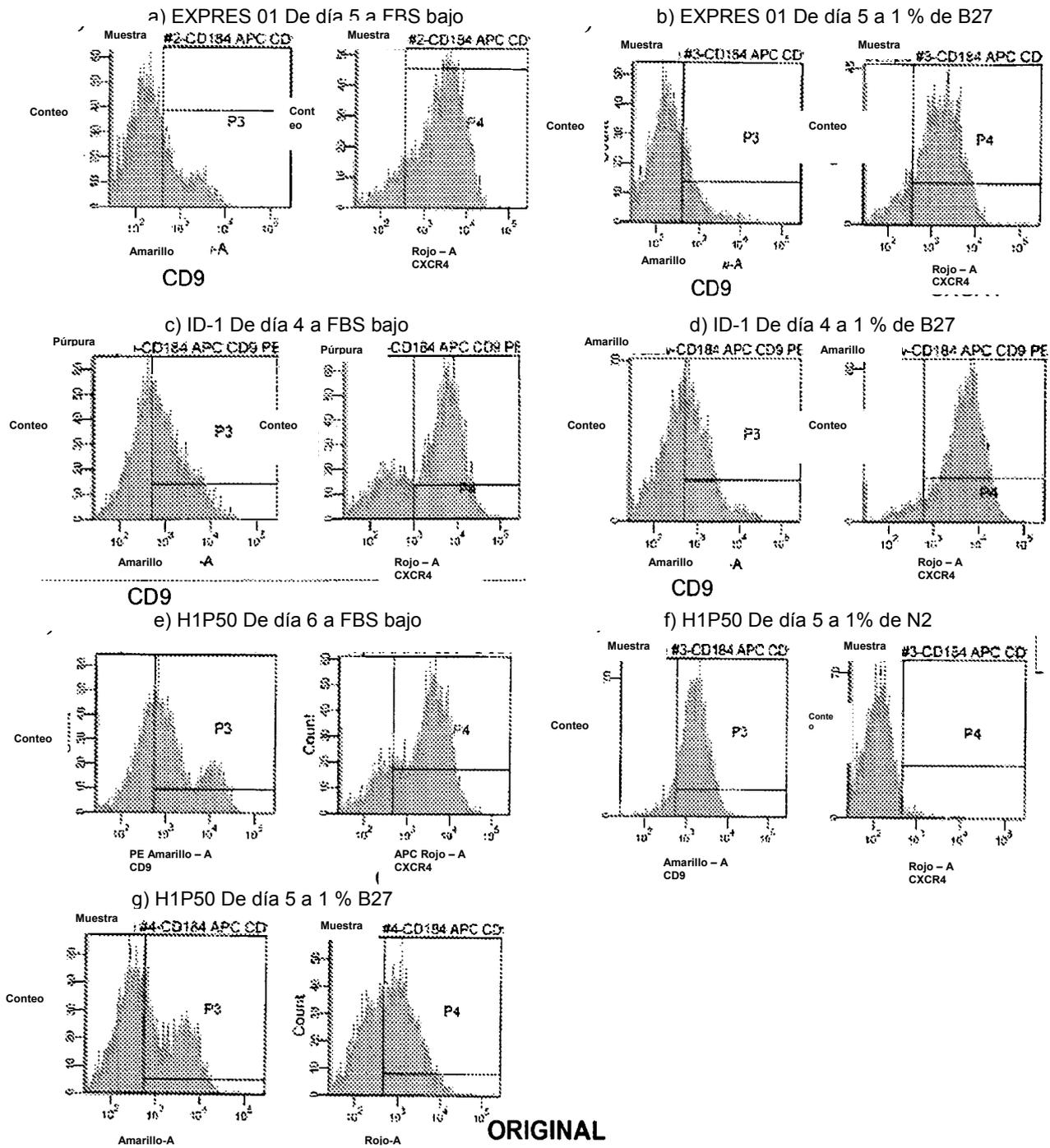
B.



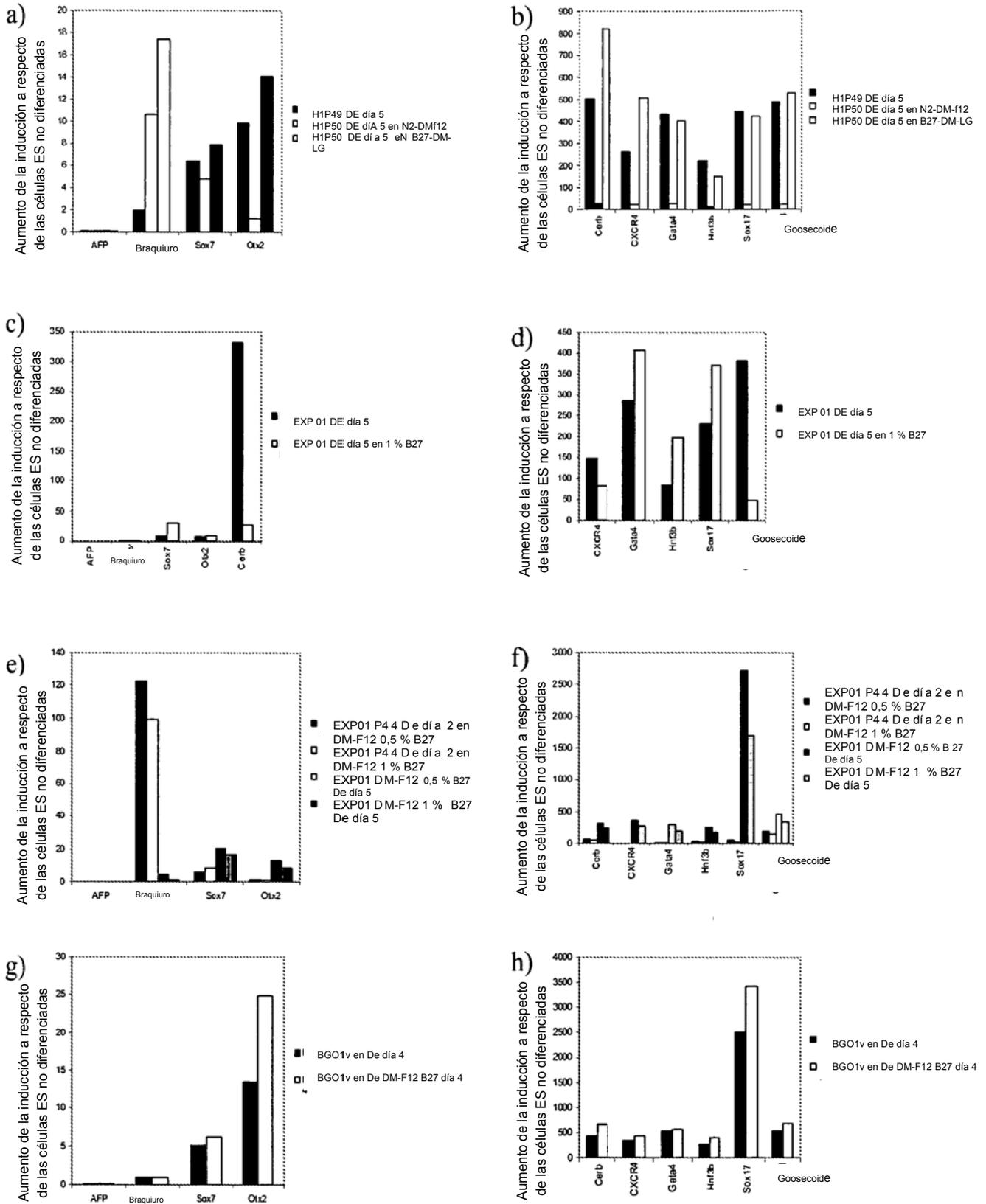
ORIGINAL

Figura 50.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



**Figura 51.**  
**LFS5131USCIP1: Alireza Rezania**  
**Diferenciación de células madre embrionarias**



ORIGINAL

Figura 52.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

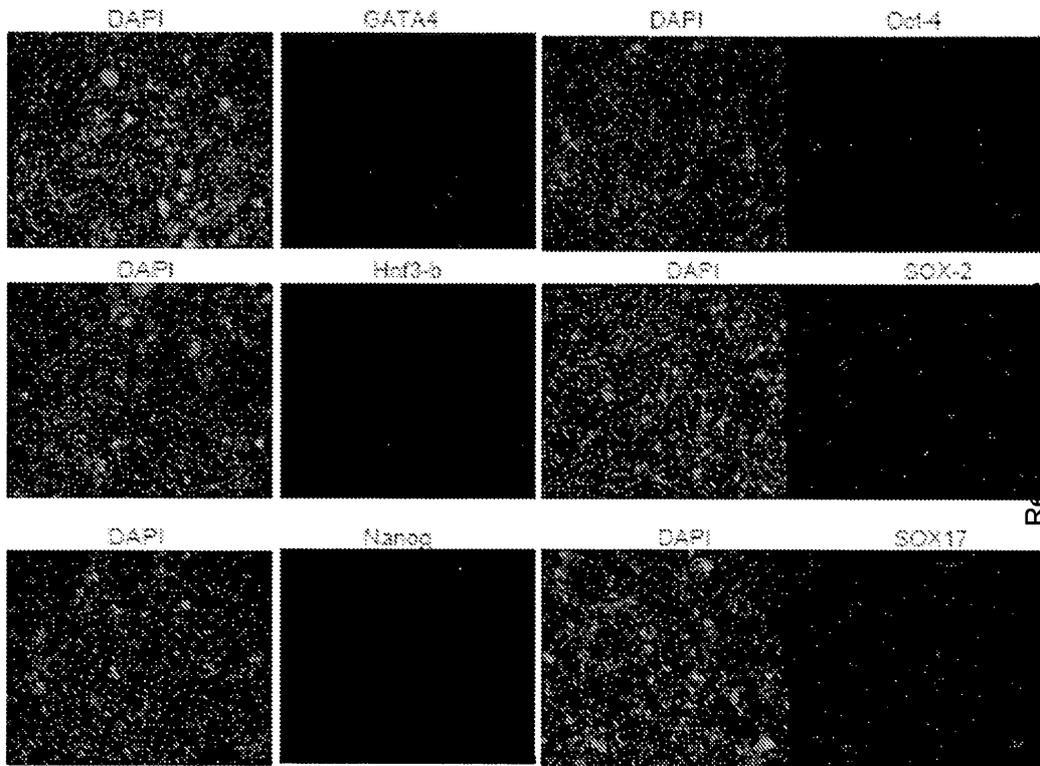
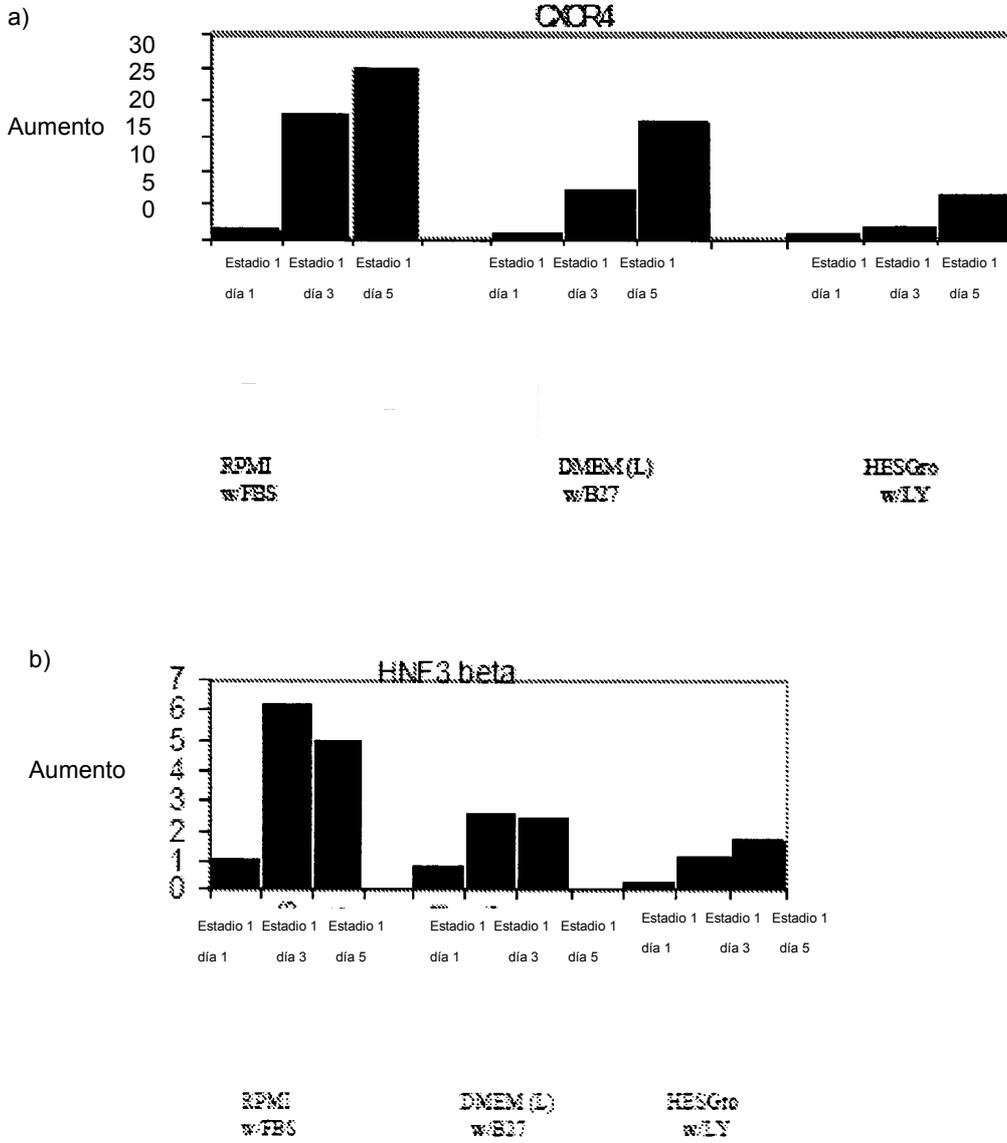


Figura 53-1.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias



**ORIGINAL**

Figura 53-2.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
Diferenciación de células madre embrionarias

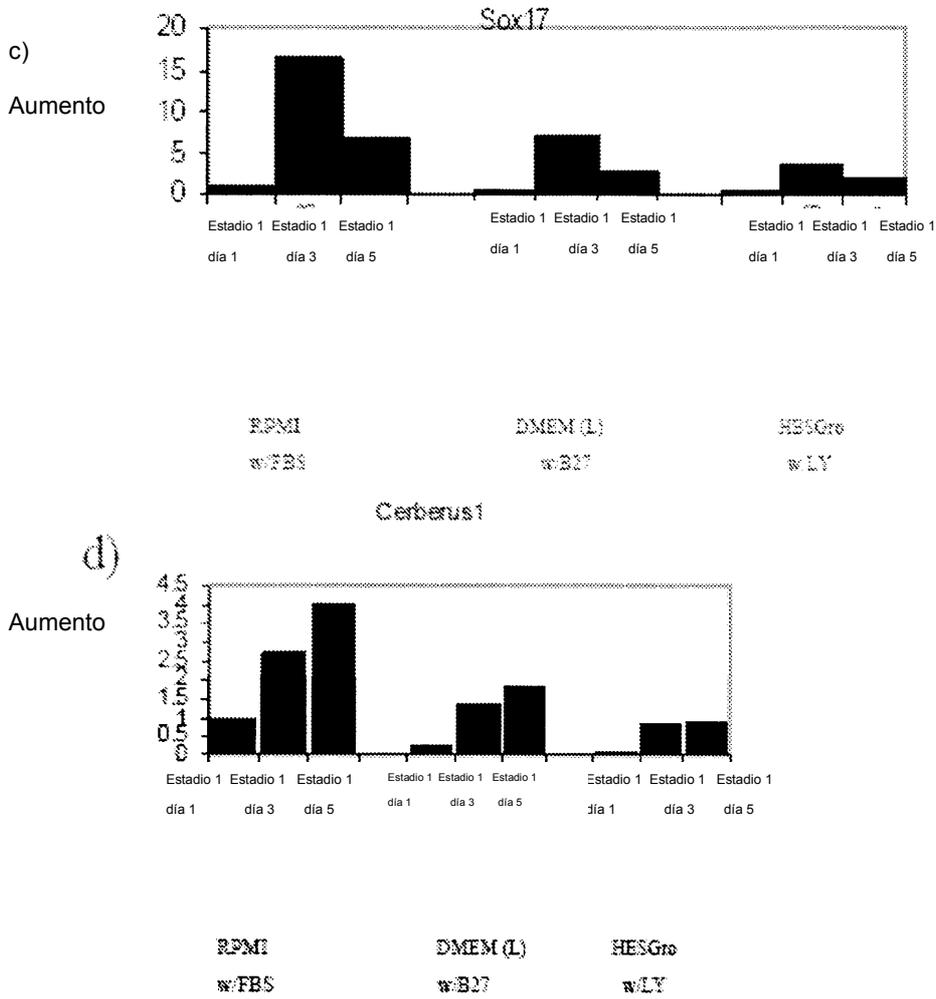


Figura 53-3.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania  
 Diferenciación de células madre embrionarias

