

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 832**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013 E 13167812 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2666871**

54 Título: **Procedimiento de determinación del genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) y ácidos nucleicos utilizables en dicho procedimiento**

30 Prioridad:

25.05.2012 FI 20125554

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

08.10.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF BERN (100.0%)
Hochschulstrasse 4
3012 Bern, CH**

72 Inventor/es:

LEEB, TOSSO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 832 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de determinación del genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) y ácidos nucleicos utilizables en dicho procedimiento

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro y a materiales utilizables en dicho procedimiento. Particularmente la presente mención se refiere a la variación genética relacionada con la PQNH en Labradores Retriever.

Antecedentes

- 10 La paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) es una genodermatosis de los Labradores Retriever con una herencia monogénica autosómica recesiva (Pagé y col. 2003, Peters et al. 2003). Los perros afectados de PQNH desarrollan, a una edad temprana, costras y fisuras en el plano nasal, aunque son perros sanos. Los cambios histopatológicos consisten en una hiperqueratosis paraqueratósica y en una acumulación de líquido proteico ("lagos de suero") en el interior del estrato córneo y en el estrato espinoso superficial. Actualmente la PQNH no puede curarse, pero los
15 síntomas pueden aliviarse con terapia sintomática.

Debido a la herencia monogénica autosómica recesiva, es muy importante disponer de un procedimiento que determine el genotipo de un perro. Los perros heterocigotos no están afectados y no pueden diferenciarse fenotípicamente de los perros homocigotos libres. Sin embargo, los perros heterocigotos portan el alelo mutante ("portadores") y pueden transmitir esta enfermedad a su descendencia.

- 20 Actualmente los criadores pueden identificar a los perros portadores únicamente basándose en la información del fenotipo obtenida de generaciones anteriores y eliminar a los portadores identificados de los programas de cría, reduciendo de este modo la frecuencia de la enfermedad genética en una raza. Por tanto, hay una gran necesidad en la cría de Labradores Retriever de un ensayo genético que permita la identificación de portadores también sanos de PQNH. Por lo tanto, es muy valioso un procedimiento de ensayo genético que pueda diferenciar los tres
25 genotipos "libre" (=tipo silvestre homocigoto), "portador" (=heterocigoto), y "afectado" (=mutante homocigoto) para la cría de perros, así como para medicina veterinaria para confirmar el diagnóstico de casos sospechosos.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar medios para identificar perros de cría, particularmente Labradores Retriever, que tengan un riesgo de transmitir a su descendencia el genotipo de PQNH.

- 30 Éstos y otros objetos se consiguen a través de la presente invención como se describe y reivindica más adelante.

- El primer aspecto de la invención es un procedimiento *in vitro* para determinar en un perro el genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH). De acuerdo con la invención el procedimiento comprende determinar la presencia o ausencia de una variación genética en la secuencia génica SUV39H2 en una muestra biológica de dicho perro, en el que la presencia de dicha variación genética indica que dicho perro padece o
35 padecerá dicho trastorno o que está en riesgo de transmitir dicho trastorno a su progenie, en el que dicha variación genética comprende un reemplazo de A por C en la posición 501 en la SEC ID N°:2 o en una secuencia al menos 80 % idéntica a dicha secuencia o dicha variación genética es una variación de un gen que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 1 que comprende un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324.

- 40 El segundo aspecto de la invención es un polinucleótido. De acuerdo con la invención la secuencia de dicho polinucleótido se selecciona en el grupo que consiste en:

- a) una secuencia que tiene la SEC ID N°: 2, en la que dicho polinucleótido comprende el reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501 (c.972T>G; CanFam 3 ensamblaje g.CFA2:21,731,842A>C); y
b) una secuencia que es al menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID N°: 2, en la que dicho polinucleótido comprende el reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501;
45 c) una secuencia que codifica el polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1 que comprende un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324; y
d) una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias de los apartados (a) a (c).

- El tercer aspecto de la invención es un uso de la variación genética en el gen SUV39H2 en un perro como un
50 marcador para identificar a un perro que porta la mutación heterocigota u homocigota relacionada con la paraqueratosis nasal, en el que dicha variación genética comprende un reemplazo de A por C en la posición 501 en la SEC ID N°: 2 con en una secuencia que es al menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID N°: 2.

El cuarto aspecto de la invención es un uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia SEC ID N°: 2 o una secuencia al menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID N° 2 en la que el nucleótido A en la posición 501 del oligonucleótido se ha reemplazado por C o dicho oligonucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 1 comprende un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324 en el diagnóstico del genotipo relacionado con la PQNH.

El quinto aspecto de la invención es un procedimiento *in vitro* para determinar la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro. De acuerdo con la invención dicho procedimiento comprende determinar la presencia o la ausencia de la mutación N324K en un polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1 en una muestra biológica de dicho perro, en la el que la presencia de dicha mutación indica que dicho perro padece o padecerá dicho trastorno o que está en riesgo de transmitir dicho trastorno a su progenie.

El sexto aspecto de la invención es un anticuerpo. De acuerdo con la invención dicho anticuerpo se caracteriza por reconocer específicamente a un epítipo que comprende la mutación N324K de SEC ID N°: 1 de un perro.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Análisis de asociación de todo el genoma (las coordenadas de la Figura se refieren al conjunto CanFam 2.1 anterior y no son idénticas a las coordenadas de CanFam 3.1 en el texto). (A) Se identificó una sola señal muy significativa en el cromosoma 2. (B) La señal de asociación se localizó en el primer tercio del cromosoma 2. (C) Las barras negras indican segmentos homocigotos en los 14 perros afectados. El mapeo de homocigosidad define un intervalo exacto para la localización de la mutación causante. (D) Contenido génico del intervalo crítico deducido de la anotación de genes humanos correspondiente.

Figura 2. Secuencia contexto de la mutación causante de la PQNH. (A) En la mitad superior, se muestra la secuencia en la misma orientación que la del gen SUV39H2. (B) Este gen está en orientación negativa en el cromosoma 2. Por lo tanto, en la mitad inferior de la figura la secuencia flanqueante también se muestra en la orientación directa, que corresponde a las coordenadas del conjunto del genoma CanFam 3.

Figura 3. Presentación esquemática de la estrategia de resecuenciación de un Labrador Retriever afectado. Se preparó una biblioteca de un fragmento de 200 pb y se recogieron 3 carriles de secuencias de 2x100 pb en un instrumento ilumina HiSec2000.; En total se recopiló 1 billón de lecturas o datos originales de 100 Gb correspondientes a una cobertura de genoma de 38,5. El diagrama de flujo muestra la estrategia de análisis de datos e ilustra cómo se usaron las lecturas de secuencias experimentales para determinar las variantes entre el genoma de Labrador Retriever afectado y el genoma de referencia del Bóxer.

Figura 4. Gráfico del gen SUV39H2 que muestra la secuenciación de "Control" (sano), "portador" y "afectado con PQNH"

Figura 5. Conservación de secuencia de la proteína SUV39H2. La figura muestra un alineamiento de aminoácidos en la región de la variante N324K crítica, que forma parte del dominio SET catalíticamente activo. La secuencia de las proteínas SUV39H2 ortólogas de todos los vertebrados es idéntica en la región del resto de N-324 (parte superior del alineamiento). Incluso metiltransferasas H3K9 parálogas distantemente relacionadas comparten un resto de asparagina en esta posición (parte inferior del alineamiento). La alta conservación de la secuencia confirma la hipótesis de que una mutación de asparagina en la posición 324 afectará a la función de la proteína SUV39H2.

Figura 6. Muestra 27 genes humanos anotados localizados en la región correspondiente a 15 genes anotados en el Labrador Retriever que se analiza en este estudio.

Descripción detallada

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la variación genética en el gen SUV39H2 está relacionada con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro. La presencia de dicha variación genética indica que dicho perro padece o padecerá dicho trastorno o que está en riesgo de transmitir dicho trastorno a su progenie. La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de determinar el genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro. El perro es preferentemente un Labrador Retriever.

El gen SUV39H2 codifica una histona metilasa, que metila específicamente el resto de lisina 9 de histona 3 (H3K9 metilasa). La trimetilación de H3K9 es una marca distintiva de heterocromatina transcripcionalmente silenciada. Las células pueden usar esta modificación epigenética para desactivar genes específicos, cuyos productos ya no se necesitan, por ejemplo, durante la diferenciación celular. Una ausencia de SUV39H2 funcionalmente activa puede por tanto conducir a una diferenciación celular retardada. El fenotipo de PQNH implica queratinocitos hiperproliferativos que evaden su diferenciación normal ya que se desplazan hacia arriba desde la membrana basal al estrato córneo de la epidermis. El gen SUV39H2 está muy conservado en los vertebrados.

Específicamente, dicha variación genética comprende un reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501 de un gen que tiene una secuencia SEC ID N°: 2 o una secuencia al menos 80%; preferentemente al menos 85%, más

preferentemente a menos 90%, aún más preferentemente al menos 95 % y más preferentemente al menos 98% idéntica a dicha secuencia. Dicho gen que codifica el polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1 es el gen SUV39H2 o un gen respectivo y se muestra como SEC ID N°: 2.

5 Como se usa en el presente contexto el término "identidad" se refiere a la identidad global entre dos secuencias comparadas entre sí desde el primer aminoácido codificado por el gen correspondiente hasta el último aminoácido. La identidad de las secuencias de longitud completa se mide usando un programa de alineamiento global de Needleman-Wunsch. El experto en la técnica es consciente del hecho de que los resultados usando el algoritmo de Needleman-Wunsch son únicamente comparativos cuando se alinean dominios de la secuencia correspondientes.

10 La presencia de dicha variación genética en ambos alelos de dicho gen SUV39H2 indica que dicho perro padece o padecerá PQNH, véase la **Tabla 1**.

La presencia de dicha variación genética en uno de los dos alelos de dicho gen SUV39H2 indica que dicho perro es un portador sano de PQNH.

La ausencia de dicha variación genética indica que dicho perro es un no portador sano de PQNH.

15 Antes de esta invención no había sido posible identificar portadores sanos (heterocigotos) antes de la reproducción; únicamente se habían reconocido perros que tenían la variación en ambos genes (ambos alelos del gen SUV39H2 o genes respectivos) basándose en el fenotipo. Es importante evitar apareamientos accidentales de portadores sanos ya que la descendencia de dichos apareamientos conlleva un riesgo del 25% de estar afectado con PQNH. De acuerdo con la legislación del bienestar animal en muchos países se prohíbe la cría de animales si se espera que la descendencia padezca enfermedades hereditarias. La PQNH es una enfermedad hereditaria dentro de esta parte de
20 la legislación del bienestar animal. Por lo tanto, los criadores están obligado por ley a impedir el apareamiento de portadores de PQNH sanos.

25 Existen numerosas formas de determinar con precisión el genotipo SUV39H2:c.972T>G de un perro. La variación puede detectarse usando, por ejemplo, PCR, PCR en tiempo real, análisis del punto de fusión de ADN bicatenario, espectroscopia de masas, secuenciación directa de ADN, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de conformación de moléculas monocatenarias (SSCP), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), extensión de cebador de una sola base u otros procedimientos relacionados. La información crítica es que esta variante realmente es la variante causante del fenotipo de PQNH y que hay una perfecta correlación del 100% del genotipo en esta variante con el fenotipo de PQNH (sin tener en cuenta ninguna otra mutación de PQNH teórica independiente).

30 El polinucleótido modificado se selecciona en el grupo que consiste en:

a) una secuencia que tiene la SEC ID N°: 2, en la que dicho polinucleótido comprende el reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501; y

35 b) una secuencia que es al menos un 80%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, aún más preferentemente al menos 95% y más preferentemente al menos 98% idéntica a la secuencia la SEC ID N°: 2, en la que dicho polinucleótido comprende el reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501; y

c) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1 que comprende un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324; y

d) una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias de los apartados (a) a (c).

40 En la presente invención puede usarse un par de cebadores, que comprende un primer y un segundo cebador y que es adecuado para detectar un genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro. Cada cebador comprende un tramo contiguo de al menos 14 nucleótidos de una secuencia de SEC ID N°: 2 o una secuencia complementaria a la misma, en la que:

a) dicho primer cebador se hibrida con una primera cadena de ADN del gen SUV39H2;

45 b) dicho segundo cebador se hibrida con la cadena complementaria con respecto a dicha primera cadena de ADN del gen SUV39H2; y

c) los extremos 3' dicho primer y segundo cebador se localizan en regiones que flanquean la posición 501 de la SEC ID N°: 2, o las posiciones de nucleótidos complementarias a la misma.

50 El experto en la técnica puede adaptar un par adecuado a posibles variaciones ligeras dentro de las secuencias de otras razas diferentes a las del Labrador Retriever usadas como un ejemplo en este estudio. En realizaciones preferidas los cebadores comprenden al menos 16, preferentemente 18 y más preferentemente al menos 20 nucleótidos.

Un par de cebadores adecuado tiene una secuencia 5'-CTCCTCAACTATGGACAAATCG-3' (SEC ID N°: 3) y una

secuencia 5'-TGCCACATCTTTCCATTCAG-3' (SEC ID N°: 4).

En la presente invención se incluye un uso de variación genética en el gen SUV39H2 en un perro, preferentemente en un Labrador Retriever, como un marcador para identificar a un perro que porta la mutación heterocigota u homocigota relacionada con la paraqueratosis nasal.

- 5 También se incluye dentro del ámbito de la presente invención un uso de un oligonucleótido que tiene la SEC ID N°: 2 o una secuencia al menos 80%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, aún más preferentemente al menos 95% y más preferentemente al menos 98% idéntica a dicha secuencia en la que el nucleótido A en la posición 501 del oligonucleótido se ha reemplazado por C en el diagnóstico del genotipo relacionado con la PQNH. Típicamente el gen codificante es el gen SUV39H2 mostrado como SEC ID N°: 2.
- 10 La paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro, preferentemente en un Labrador Retriever, también puede determinarse *in vitro* basándose en la presencia o en la ausencia de la mutación en un polipéptido EC 2.1.1.43 típicamente codificado por el gen SUV39H2 (o respectivo) en una muestra biológica de dicho perro. La mutación específica a nivel del polipéptido es N324K. La presencia de dicho epítipo indica que dicho perro padece o padecerá dicho trastorno o que está en riesgo de transmitir dicho trastorno a su progenie. Preferentemente el polipéptido se define por tener la secuencia de SEC ID N°: 1.
- 15

Un experto en la técnica es consciente de que la detección de la mutación no está limitada a ningún procedimiento particular. Éste puede basarse, por ejemplo, en espectroscopia de masas, definiendo la secuencia polipeptídica o la detección usando anticuerpos. El anticuerpo debe reconocer específicamente el epítipo. Son ejemplos de dichos anticuerpos los anticuerpos monoclonales suscitados contra un fragmento que comprende dicho epítipo o cualquiera de los anticuerpos purificados.

20

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Sin embargo, debe entenderse que las realizaciones proporcionadas en la descripción anterior y en los ejemplos son únicamente con fines ilustrativos, y que son posibles diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1. Identificación de la mutación causante**

Se realizó un estudio de asociación de todo el genoma usando 13 Labradores Retriever afectados de PQNH y 23 Labradores Retriever no afectados. Se realizó el genotipado de estos perros en 174.376 polimorfismos mononucleotídicos (SNP) homogéneamente distribuidos a lo largo del genoma. El análisis de los datos del genotipado del estudio de asociación de todo el genoma por plink (<http://pn-gu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) indicó diferencias significativas entre los casos y los controles en el cromosoma 2 (Figura 2). Después se analizaron adicionalmente los perros afectados y se descubrió que los 13 perros afectados compartían un segmento homocigoto idéntico en cromosoma 2 que se extendía de 20.818.259 a 22.414.949 (conjunto CanFam 3.1). Esto indica que todos los afectados con PQNH son probablemente consanguíneos con respecto a un solo animal fundador, que transmitió el alelo mutante y lo propagó en la población. Estos resultados indican adicionalmente que la mutación causante de la PQNH debe localizarse en el intervalo de ~1,6 Mb indicado anteriormente. Esta región por el momento contiene únicamente 15 genes anotados (NCBI MapViewer, construcción 3.1 del genoma de perro) mostrado en la **Fig. 2** mientras que la región humana sinténica correspondiente contiene 27 genes anotados mostrados en la **Fig. 6**.

30

35

Se secuenció todo el genoma de un Labrador Retriever afectado de PQNH en un instrumento ilumina HiSEC2000 a una cobertura de 38x. Se comparó la secuencia obtenida con el genoma de referencia del Boxer y se identificaron ~2.000 variantes de secuencia en el intervalo crítico de ~1,6 Mb en el cromosoma 2 entre el Labrador Retriever afectado de PQNH y la secuencia de referencia del Boxer. El procedimiento y los algoritmos usados se ilustran esquemáticamente en la **Fig 3**. La comparación dio como resultado la identificación de 1.357 SNP y 621 indeles (inserción o delección de bases). Entre estos hubo un total de cuatro variantes no sinónimas previstas (**Tabla 1**). Una de éstas fue un artefacto debido a un error en la secuencia de referencia del Boxer. Las otras tres variantes no sinónimas se ensayaron con respecto a la asociación con el fenotipo de PQNH en otros perros (**Tabla 1**).

40

45

Tabla 1: Asociación de tres variantes no sinónimas con el fenotipo de PQNH

| Genotipo | Casos LA | Portador obligado LA | Controles no relacionados con LA | Diversas razas |
|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------|
| ITGA8 c.363A>G | | | | |
| A/A | 0 | 0 | 1 | 2 |
| A/G | 0 | 1 | 2 | 2 |
| G/G | 15 | 3 | 5 | 10 |
| RPP38 c.381A>G | | | | |
| A/A | 0 | 0 | 218 | 40 |
| A/G | 0 | 4 | 57 | 21 |
| G/G | 16 | 0 | 0 | 16 |
| SUV39H2 c.972T>G | | | | |
| T/T | 0 | 0 | 297 | 139 |
| T/G | 0 | 4 | 43 | 0 |
| G/G | 20 | 0 | 0 | 0 |
| NMT2 c 254delC | Error en la secuencia de referencia | | | |

Para una de estas variantes (ITGA8:c.363A>G), los tres genotipos se observaron en Labradores Retriever no relacionados sin problemas nasales. Por tanto esta variante puede excluirse como causante de PQNH. La segunda variante no sinónima (RPP38:c.381A>G) mostró una perfecta asociación con la PQNH en una gran cohorte de Labradores Retriever. Sin embargo, también se encontró el alelo mutante en muchos perros de otras razas y también se encontraron perros de otras razas que eran homocigotos para el alelo mutante. Dado que se supone que la PQNH es una enfermedad específica de la raza del Labrador Retriever, se considera muy improbable que esta variante sea la causante de la PQNH. Finalmente, la tercera de estas tres variantes no sinónimas, la SUV39H2:c.972T>G, está perfectamente asociada con la PQNH en una gran cohorte de más 300 Labradores Retriever. También se ensayaron 139 perros sanos sin PQNH de otras razas y se encontró solo el alelo de tipo silvestre en esta variante. Por tanto, la variante SUV39H2:c.972T>G parece que se produce exclusivamente en la raza de Labrador Retriever, lo que indica que esta variante debe haberse generado después de la separación de las nuevas razas de perros. Esta distribución alélica corresponde al escenario de un evento de mutación relativamente precoz en un animal Labrador fundador, que conduce a la propagación de la PQNH en esta raza. Por lo tanto, los datos genéticos sugieren firmemente que la variante SUV39H2:c.972T>G es realmente es la mutación causante.

A nivel de proteína se espera que la variante SUV39H2:c.972T>G conduzca a un intercambio de asparagina por lisina en la posición 324 (p.N324K). Este intercambio de aminoácidos afecta a una posición evolutiva altamente conservada del dominio denominado SET catalíticamente activo de la proteína SUV39H2. Herramientas *in silico* tales como Sift y Polyphen predicen contundentemente un efecto funcionalmente perjudicial de esta variante.

En resumen, la variante SUV39H2:c.972T>G conduce a una pérdida de función de SUV39H2. Se espera que una pérdida de función de SUV39H2 conduzca a cambios en el silenciamiento epigenético de la cromatina y por tanto a defectos de diferenciación celular. Por tanto, desde un punto de vista funcional es factible que la variante SUV39H2:c.972T>G ocasiona realmente la PQNH.

25 Listado de secuencias:

SEC ID N°: 1 proteína de tipo silvestre codificada por SUV39H2

SEC ID N°: 2 ADN de SUV39H2 genómico de tipo silvestre

SEC ID N°: 3 y 4; cebadores

SEC ID N°: 5 proteína mutada codificada por SUV39H2

30 SEC ID N°: 6 ADN de SUV39H2 genómico mutado

Aplicación de estos descubrimientos

El conocimiento adquirido puede ahora usarse para determinar el genotipo de PQNH de un perro. Esto se ilustra en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Interpretación de genotipos SUV39H2:c.972T>G

| Genotipo SUV39H2 c.972T>G | Genotipo de PQNH |
|---------------------------|--------------------------------------|
| T/T | libre = homocigoto de tipo silvestre |
| T/G | portador = heterocigoto |
| G/G | afectado = mutante homocigoto |

Proceso técnico de determinación del genotipo SUV39H2:c.972T>G

5 En el laboratorio de los autores de la invención, un fragmento que contenía el exón 4 y alguna de las secuencias flanqueantes del gen SUV39H2 se amplificó por PCR usando un cebador directo 5'-CTCCTCAACTATGGACAAATCG-3' y un cebador inverso 5'-TGCCACATCTTTCCAT-TCAG-3'. Posteriormente se secuenció el producto resultante de 615 pb usando tecnología de secuenciación de Sanger para determinar el genotipo en la variante SUV39H2:c.972T>G. En la **Figura 2** se representan los detalles de la secuencia flanqueante.

Referencias:

10 Pág N, Paradis M, Lapointe JM, Dunstan RW: Paraqueratosis nasal hereditaria in Labrador Retrievers.; Vet Dermatol. Abr 2003; 14(2):103-110.

Peters J, Scott DW, Erb HN, Miller WH. : Hereditary nasal parakeratosis in Labrador retrievers: 11 new cases and a retrospective study on the presence of accumulations of serum ('serum lakes') in the epidermis of parakeratotic dermatoses and inflamed nasal plane of dogs., Vet Dermatol. Agosto 2003; 14(4):197-203.

15 PLINK (1.07), <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. American Journal of Human Genetics, 81.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> UNIVERSITY OF BERN
- <120> Procedimiento para determinar el genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) y ácidos nucleicos utilizables en dicho procedimiento.
- 25 <130> BP206005
- <160> 6
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 410
- <212> PRT
- 35 <213> *Canis lupus familiaris*
- 400> 1

ES 2 547 832 T3

Met Ala Ala Ala Gly Ala Glu Ala Arg Arg Ala Trp Cys Val Pro Cys
 1 5 10 15

Leu Val Ser Leu Asp Thr Leu Gln Glu Leu Cys Arg Lys Glu Lys Leu
 20 25 30

Thr Cys Lys Ser Ile Gly Ile Thr Lys Arg Asn Leu Asn Asn Tyr Glu
 35 40 45

Val Glu Tyr Leu Cys Asp Tyr Lys Val Val Lys Asp Met Glu Tyr Tyr
 50 55 60

Leu Val Lys Trp Lys Gly Trp Pro Asp Ser Thr Asn Thr Trp Glu Pro
 65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Lys Cys Pro Leu Leu Leu Gln Gln Phe Ser Asn Asp
 85 90 95

Lys His Asn Tyr Leu Ser Gln Val Lys Lys Gly Lys Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Lys Asp Asn Asn Lys Ala Leu Lys Pro Ala Ile Ala Glu Tyr Ile Val
 115 120 125

Lys Lys Ala Lys Gln Arg Ile Ala Leu Gln Arg Trp Gln Asp Glu Leu
 130 135 140

Asn Arg Arg Lys Asn His Lys Gly Met Ile Phe Val Glu Asn Thr Val
 145 150 155 160

Asp Leu Glu Gly Pro Pro Ser Asp Phe Tyr Tyr Ile Asn Glu Tyr Lys
 165 170 175

Pro Ala Pro Gly Ile Ser Leu Val Asn Glu Ala Thr Phe Gly Cys Ser
 180 185 190

Cys Thr Asp Cys Phe Phe Glu Lys Cys Cys Pro Ala Glu Ala Gly Val
 195 200 205

Leu Leu Ala Tyr Asn Lys Asn Gln Gln Ile Lys Ile Pro Pro Gly Thr
 210 215 220

Pro Ile Tyr Glu Cys Asn Ser Arg Cys Gln Cys Gly Pro Asp Cys Pro
 225 230 235 240

Asn Arg Ile Val Gln Lys Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Cys Ile Phe Arg
 245 250 255

Thr Ser Asn Gly Cys Gly Trp Gly Val Lys Thr Leu Val Lys Ile Lys
 260 265 270

Arg Met Ser Phe Val Met Glu Tyr Val Gly Glu Val Ile Thr Ser Glu
 275 280 285

Glu Ala Glu Arg Arg Gly Gln Leu Tyr Asp Asn Lys Gly Ile Thr Tyr
 290 295 300

Leu Phe Asp Leu Asp Tyr Glu Ser Asp Glu Phe Thr Val Asp Ala Ala
 305 310 315 320

Arg Tyr Gly Asn Val Ser His Phe Val Asn His Ser Cys Asp Pro Asn
 325 330 335

Leu Gln Val Phe Asn Val Phe Ile Asp Asn Leu Asp Thr Arg Leu Pro
 340 345 350

Arg Ile Ala Leu Phe Ser Thr Arg Thr Ile Asn Ala Gly Glu Glu Leu
 355 360 365

Thr Phe Asp Tyr Gln Met Lys Gly Ser Gly Asp Ile Ser Ser Asp Ser
 370 375 380

Val Asp His Ser Pro Ala Lys Lys Arg Val Arg Thr Val Cys Lys Cys
 385 390 395 400

Gly Ala Val Thr Cys Arg Gly Tyr Leu Asn
 405 410

<210> 2
 <211> 1001
 <212> ADN
 <213> *Canis lupus familiaris*

400> 2

```

tcctctatat gaagagaaaa ccttacaag ttttgaaaag attagatgaa atacataaaa      60
totcttgcaa aatgcctggt atttggtagt cacctcaatg aattttctaa atacagcaat    120
aataccacaa cctaactgaa gagttccttg tattaaaatg ctttgaaaa aaaaaaaaaa    180
tgctttggaa ggacgctgg gtgctcagcg gttgagcadc ttgccttcg ctcaggcat      240
gatcccagag ttccaggatc gaatcccaca tcgggctccc tgcattggagc ctgcttttcc    300
ctctgtctgt gtcactgcac ccccccccc catctctcat gaataaacia aatcttaaaa    360
aaaatgcttt ggaaatatta aaagggtaa taacttaaat actcctcaac tatggacaaa    420
tcgtaaaaa cagtactaag ttgattagtc ctgtctatcc ttaagtatc acttacactg    480
tgattaacia aatgagagac atttccatat cgggctgcat ccaactgtgaa ttcattcagat   540
tcataatcca gatcaagag atatgtgatt cccttggtgt catataattg tccccgtctt    600
tcagcttctt cgcttgatg tacctaaaaa gaagaaacta tagtatatta tatagctatt    660
gttgaattga acaactcccc ataatctat tattaattta ttaatgcctt aacaaciaag    720
gtttagaag taagaaattg aggtgtcttt aaaaciaata ttcagggatg cctgggtggt    780
tcagatggtt gggcatccc ctttggtca agtcatgadc tctagatcct gggatagagc    840
cccatgttg ggtcccagct cagttgggag tctgctcttc cctctgtctc tcttctgct    900
tgtgcgct ctctctcttg ctttcaaatg aataaaaaaa atgttaaaaa aaataaacia   960
tatttacaca agagctacia gagctctcta caagagctga a                          1001

```

5

<210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cebador

15

400> 3
 ctctcaact atggacaaat cg 22

20

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador

400> 4
 tgccacatct ttccattcag 20

30

<210> 5
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> *Canis lupus familiaris*

400> 5

ES 2 547 832 T3

Met Ala Ala Ala Gly Ala Glu Ala Arg Arg Ala Trp Cys Val Pro Cys
1 5 10 15

Leu Val Ser Leu Asp Thr Leu Gln Glu Leu Cys Arg Lys Glu Lys Leu
20 25 30

Thr Cys Lys Ser Ile Gly Ile Thr Lys Arg Asn Leu Asn Asn Tyr Glu
35 40 45

Val Glu Tyr Leu Cys Asp Tyr Lys Val Val Lys Asp Met Glu Tyr Tyr
50 55 60

Leu Val Lys Trp Lys Gly Trp Pro Asp Ser Thr Asn Thr Trp Glu Pro
65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Lys Cys Pro Leu Leu Leu Gln Gln Phe Ser Asn Asp
85 90 95

Lys His Asn Tyr Leu Ser Gln Val Lys Lys Gly Lys Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Lys Asp Asn Asn Lys Ala Leu Lys Pro Ala Ile Ala Glu Tyr Ile Val
115 120 125

Lys Lys Ala Lys Gln Arg Ile Ala Leu Gln Arg Trp Gln Asp Glu Leu
130 135 140

Asn Arg Arg Lys Asn His Lys Gly Met Ile Phe Val Glu Asn Thr Val
145 150 155 160

Asp Leu Glu Gly Pro Pro Ser Asp Phe Tyr Tyr Ile Asn Glu Tyr Lys
165 170 175

Pro Ala Pro Gly Ile Ser Leu Val Asn Glu Ala Thr Phe Gly Cys Ser
180 185 190

Cys Thr Asp Cys Phe Phe Glu Lys Cys Cys Pro Ala Glu Ala Gly Val
195 200 205

Leu Leu Ala Tyr Asn Lys Asn Gln Gln Ile Lys Ile Pro Pro Gly Thr
210 215 220

Pro Ile Tyr Glu Cys Asn Ser Arg Cys Gln Cys Gly Pro Asp Cys Pro
 225 230 235 240
 Asn Arg Ile Val Gln Lys Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Cys Ile Phe Arg
 245 250 255
 Thr Ser Asn Gly Cys Gly Trp Gly Val Lys Thr Leu Val Lys Ile Lys
 260 265 270
 Arg Met Ser Phe Val Met Glu Tyr Val Gly Glu Val Ile Thr Ser Glu
 275 280 285
 Glu Ala Glu Arg Arg Gly Gln Leu Tyr Asp Asn Lys Gly Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Leu Phe Asp Leu Asp Tyr Glu Ser Asp Glu Phe Thr Val Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Tyr Gly Lys Val Ser His Phe Val Asn His Ser Cys Asp Pro Asn
 325 330 335
 Leu Gln Val Phe Asn Val Phe Ile Asp Asn Leu Asp Thr Arg Leu Pro
 340 345 350
 Arg Ile Ala Leu Phe Ser Thr Arg Thr Ile Asn Ala Gly Glu Glu Leu
 355 360 365
 Thr Phe Asp Tyr Gln Met Lys Gly Ser Gly Asp Ile Ser Ser Asp Ser
 370 375 380
 Val Asp His Ser Pro Ala Lys Lys Arg Val Arg Thr Val Cys Lys Cys
 385 390 395 400
 Gly Ala Val Thr Cys Arg Gly Tyr Leu Asn
 405 410

<210> 6
 <211> 1001
 <212> ADN
 <213> *Canis lupus familiaris*

400> 6

ES 2 547 832 T3

| | |
|---|------|
| tcctctatat gaagagaaaa cttacaaaag ttttgaaaag attagatgaa atacataaaa | 60 |
| tctcttgcaa aatgcctggt atttggtagt cacctcaatg aattttctaa atacagcaat | 120 |
| aataccacaa cctaactgaa gagttctttg tattaaaatg ctttggaaaa aaaaaaaaaa | 180 |
| tgctttggaa ggacgcctgg gtgctcagcg gttgagcacc ttgccttcog ctcagggcat | 240 |
| gatcccagag ttccaggacc gaatcccaca tcgggctccc tgcattggagc ctgcttttcc | 300 |
| ctctgtctgt gtcaactgac ccccccccc catctctcat gaataaaca aatcttaaaa | 360 |
| aaaatgcttt ggaaatatta aaagggtgag taacttaaat actcctcaac tatggacaaa | 420 |
| tcgttaaaaa cagtactaag ttgattagtc ctgtctatcc ttaagtacc acttacactg | 480 |
| tgattaacaa aatgagagac ctttccatat cgggctgcat ccaactgtgaa ttcattcagat | 540 |
| tcataatcca gatcaaagag atatgtgatt cccttggtgt catataattg tccccgtctt | 600 |
| tcagcttctt cgcttgtgat tacctaaaa gaagaaacta tagtatatta tatagctatt | 660 |
| gttgaattga acactcacc ataaatctat tattaattta ttaatgcctt aacaacaaag | 720 |
| gtttagaaag taagaaattg aggtgtcttt aaaacaaata ttcagggatg cctgggtggt | 780 |
| tcagatgggt gggcatccac ctttggctca agtcatgacc tctagatcct gggatagagc | 840 |
| cccatggttg ggtcccagct cagttgggag tctgcttctc cctctgtctc tcttctgct | 900 |
| tgtgogcgt ctctctcttg ctttcaaatg aataaaaaaa atgttaaaaa aaataaaaca | 960 |
| tatttacaca agagctacaa gagctctcta caagagctga a | 1001 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* para determinar el genotipo relacionado con la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una variación genética en la secuencia génica SUV39H2 en una muestra biológica de dicho perro, en el que la presencia de dicha variación genética indica que dicho perro padece o padecerá dicho trastorno o está en riesgo de transmitir dicho trastorno a su progenie, en el que dicha variación genética comprende un reemplazo de A por C en la posición 501 en la SEC ID N°:2 o en una secuencia al menos 80 % idéntica a dicha secuencia o dicha variación genética es una variación de un gen que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 1 que comprende un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho perro es un Labrador Retriever.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que
- 15 - la presencia de dicha variación genética en ambos alelos de dicho gen SUV39H2 indica que dicho perro padece o padecerá PQNH; y
- la presencia de dicha variación genética en uno de dos alelos de dicho gen SUV39H2 indica que dicho perro es un portador sano de PQNH;
- 20 - la ausencia de dicha variación genética indica que dicho perro es un no portador sano de PQNH.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la variación se detecta, por ejemplo, por PCR, PCR en tiempo real, análisis del punto de fusión de ADN bicatenario, espectroscopia de masas, secuenciación directa de ADN, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de conformación de moléculas monocatenarias (SSCP), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), extensión de cebador de una sola base, u otros procedimientos relacionados.
- 25 5. Un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 a) una secuencia que tiene la SEC ID N°: 2, comprendiendo dicho polinucleótido un reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501; y
- b) una secuencia que es al menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID N°: 2, comprendiendo dicho polinucleótido un reemplazo del nucleótido A por C en la posición 501; y
- 35 c) una secuencia que codifica el polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1, comprendiendo un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324; y
- d) una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias de los puntos (a) a (c).
6. El uso de variación genética en el gen SUV39H2 en un perro como un marcador para la identificación de un perro que porta una mutación heterocigota u homocigota relacionada con la paraqueratosis nasal, en el que dicha variación genética comprende un reemplazo de A por C en la posición 501 en la SEC ID N°: 2 o en una secuencia que es al menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID N°: 2.
- 40 7. El uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia SEC ID N°: 2 o una secuencia que es al menos 80% idéntica a dicha secuencia, en el que el nucleótido A en la posición 501 del oligonucleótido ha sido reemplazado por C, o dicho oligonucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 1 comprende un reemplazo de asparagina por lisina en la posición 324 para el diagnóstico del genotipo relacionado con la PQNH.
- 45 8. Un procedimiento *in vitro* de determinación de la paraqueratosis nasal hereditaria (PQNH) en un perro, que comprende la determinación de la presencia o ausencia de una mutación N324K en un polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1 en una muestra biológica de dicho perro, en el que la presencia de la mutación indica que dicho perro padece o padecerá dicho trastorno o que está en riesgo de transmitir dicho trastorno a su progenie.
- 50 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la mutación es reconocida por un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo portador de la mutación N324K.
- 55 10. Un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo que comprende la mutación N324K en la SEC ID N°: 1 de un perro.

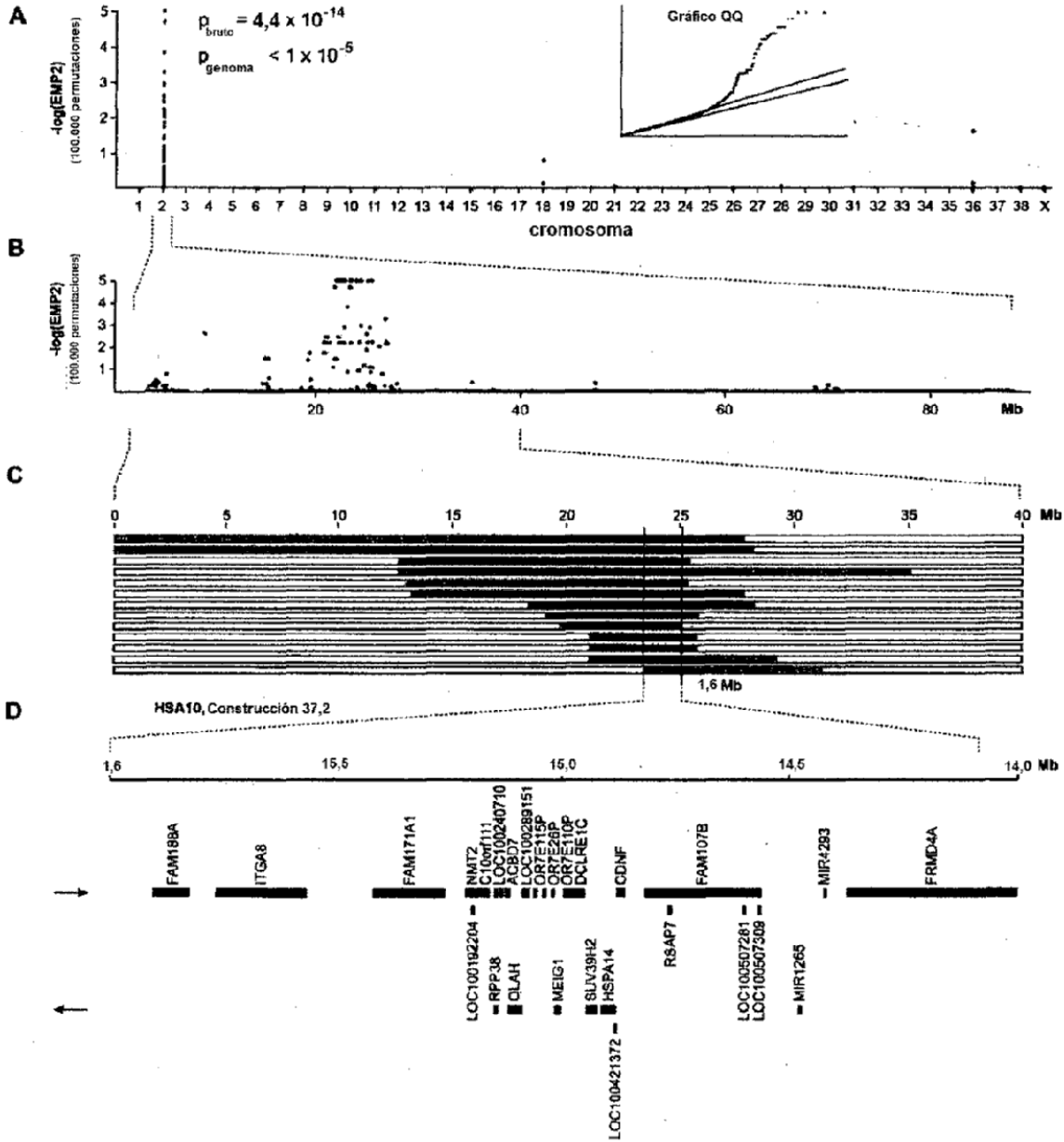


Fig 1

A Cadena Superior

CTGGATTATGAATCTGATGAATTCACAGTGGATGCGAGCCCGATATGGAAA [T/G] GTCTCTCATTTTGTTAATCACAGTGTAAAGTATACCTAAAGAATAGACAG

SUV39H2 c.972T>G, p.N324K

T: tipo silvestre

G: PQNH

B Cadena directa

Coordenada genómica

en CFA 2

(Conjunto CanFam 3)

```

21,731,342      1  tctctatat  gaagagaaaa  cottacaaaag  ttttgaaaag  attagatgaa  atacataaaa
21,731,402      61 tctcttgcaa  aatgcctggg  atttggtagt  cacctcaatg  aattttctaa  atacagcaat
21,731,462     121 aataccacaa  cctaactgaa  gagttctttg  tattaaaatg  ctttgaaaa  aaaaaaaaaa
21,731,522     181 tgetttggaa  ggaecgctgg  gtgetcagcg  gttgagcctc  ttgccttcog  ctcagggcoat
21,731,582     241 gatcccagag  ttccaggatc  gaatcccaca  tggggctccc  tgcattggagc  ctgcttttcc
21,731,642     301 ctctgtctgt  gtcactgcac  ccccccccc  catctctcat  gaataacaaa  aatcttaaaa
21,731,702     361 aaaatgcttt  ggaaatatta  aaagggtaa  taacttaaat  actcctcaac  tatggacaaa
21,731,762     421 tcgttaaaaa  cagtactaag  ttgattagtc  ctgcttatte  ttttaagtac  acttacactg
    
```

A>C Mutación causante de la paraqueratosis nasal (PQNH)

```

21,731,822      481 tgattaacaa  aatgagagac  atttccatat  egggctgcat  ccaactgtgaa  ttcactcagat
    
```

T>C Polimorfismo neutro

```

21,731,882     541 tcataatcca  gatcaaagag  atatgtgatt  ccoctgttgt  catataattg  tcccctcttt
    
```

```

21,731,942     601 tcagcttctt  egcttgtgat  taactaaaaa  gaagaaacta  tagtatatta  tatagctatt
21,732,002     661 gttgaattga  acactcacc  ataaatctat  tattaattta  ttaatgcctt  aacaacaaag
21,732,062     721 gtttagaaa  taagaaattg  aggtgtcttt  aaaacaaata  ttcagggatg  cctgggtggg
21,732,122     781 tcagatggtt  gggcatccac  ctttggtcca  agtcatgac  tctagatcct  gggatagagc
21,732,182     841 cccatgttgg  ggtccagct  cagtggggag  tctgcttctc  cctctgtctc  tcttctctgt
    
```

Microsatélite polimórfico, muchos alelos diferentes

```

                ↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓
21,732,242     901 tgtgcgcgct  ctctctcttg  ctttcaaatg  aataaaaaaa  atgttaaaaa  aaataaaaca
21,732,302     961 tatttacaca  agagctacaa  gagctctcta  caagagctga  a
    
```

CFA 2 genómico: g.21,731,842A>C (Conjunto CanFam 3.1, NCBI)

A: tipo silvestre

C: PQNH

Fig. 2

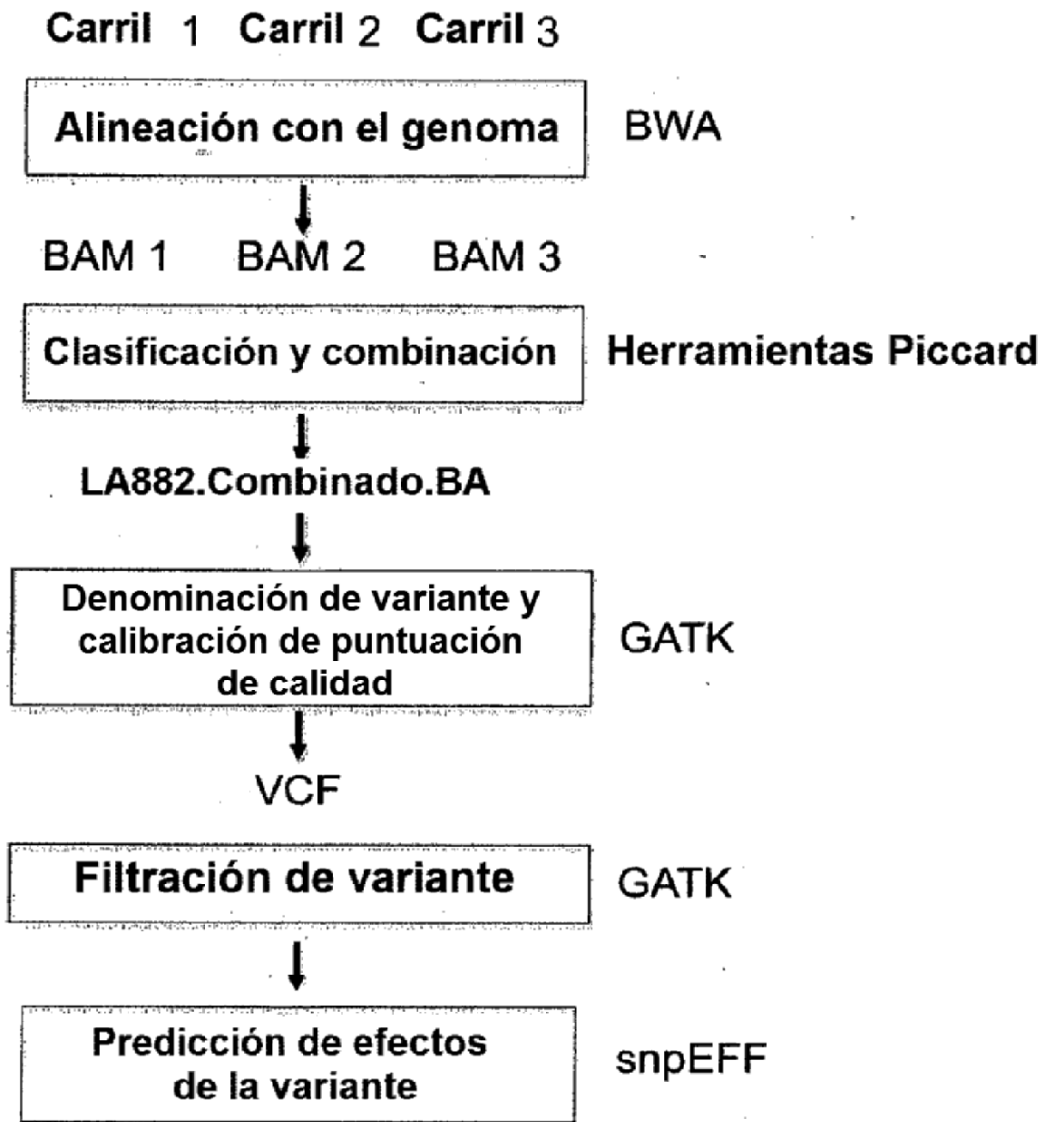


Fig. 3

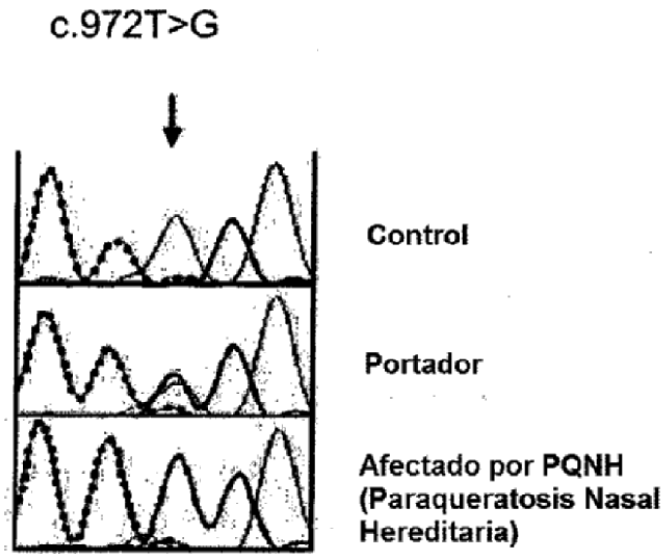


Fig. 4

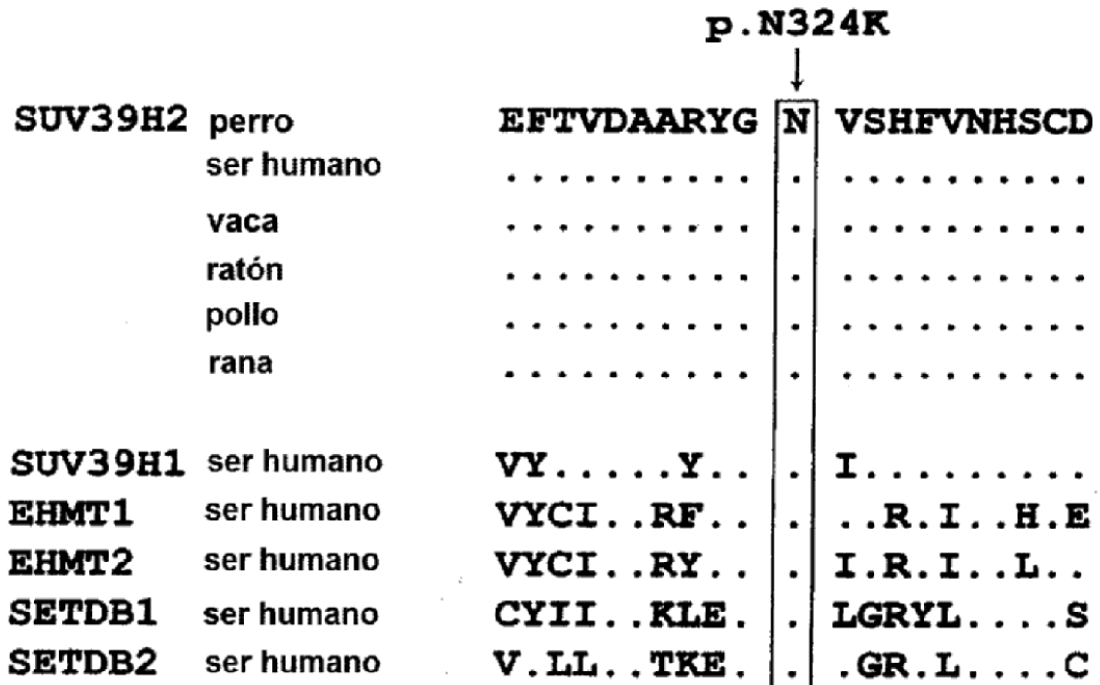


Fig. 5

27 Genes candidatos posicionales (Anotación HSA10, construcción 37.2)

| Inicio | Terminación | Símbolo | O | Descripción |
|------------|-------------|--------------|---|---|
| 13,685,706 | 14,372,866 | FRMD4A | - | dominio FERM que contiene 4A |
| 14,425,199 | 14,425,276 | MIR4293 | - | microARN4293 |
| 14,478,575 | 14,478,660 | MIR1265 | + | microARN1265 |
| 14,560,559 | 14,816,896 | FAM107B | - | familia con similitud de secuencia 107, miembro B |
| 14,566,478 | 14,568,847 | LOC100507309 | - | LOC100507309 teórica |
| 14,607,109 | 14,608,832 | LOC100507281 | - | proteína LOC100507281 teórica |
| 14,765,098 | 14,766,130 | RPSAP7 | - | proteína ribosomal SA pseudogen 7. |
| 14,861,251 | 14,879,383 | CDNF | - | factor neurotrófico de dopamina cerebral |
| 14,880,261 | 14,913,740 | HSPA14 | + | Proteína 14 de choque térmico de 70kDa |
| 14,884,305 | 14,884,827 | LOC100421372 | + | dedo de cinc y dominio SCAN que contiene 29 pseudogenes |
| 14,920,782 | 14,946,314 | SUV39H2 | + | Supresor de variegación 3-9 homólogo 2 (<i>Drosophila</i>) |
| 14,948,870 | 14,996,094 | DCLRE1C | - | reparación 1C reticulación de ADN |
| 15,001,438 | 15,014,850 | MEIG31 | + | Homólogo del gen 1 expresado en meiosis (ratón) |
| 15,028,875 | 15,029,470 | OR7E110P | - | receptor olfativo, familia 7, subfamilia E, miembro 110 pseudogen |
| 15,041,198 | 15,041,851 | OR7E2GP | - | receptor olfativo, familia 7, subfamilia E, miembro 26 pseudogen |
| 15,049,787 | 15,050,725 | OR7E11SP | - | receptor olfativo, familia 7, subfamilia E, miembro 115 pseudogen |
| 15,057,357 | 15,077,424 | LOC100289151 | - | proteína LOC100289151 teórica |
| 15,085,895 | 15,115,851 | OLAH | + | oleoil-ACP, hidrolasa |
| 15,117,474 | 15,130,775 | ACBD7 | - | acil-CoA de unión al dominio que contiene 7 |
| 15,135,060 | 15,135,612 | LOC100240710 | - | gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa pseudogen 45 |
| 15,137,384 | 15,139,318 | C10orf111 | - | cromosoma 10 fase de lectura abierta 111 |
| 15,139,182 | 15,146,256 | RPP38 | + | subunidad 38kDa P/MRP ribonucleasa |
| 15,147,771 | 15,210,695 | NMT2 | - | N-miristoiltransferasa 2 |
| 15,196,721 | 15,197,346 | LOC100192204 | - | peptidilpropil isomerasa A pseudogen |
| 15,253,642 | 15,413,058 | FAM171A1 | - | familia con similitud de secuencia 171. Miembro A1 |
| 15,559,088 | 15,761,770 | ITGA8 | - | integrina, alfa 8 |
| 15,830,175 | 15,902,519 | FAM188A | - | familia con similitud de secuencia 188, miembro A |

Fig. 6