

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 205**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 33/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010** **E 10722917 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2432892**

54 Título: **Microorganismo para expresar una proteína de membrana humana**

30 Prioridad:

21.05.2009 DE 102009022772

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

13.10.2016

73 Titular/es:

ORGANOBALANCE GMBH (100.0%)
Gustav-Meyer-Allee 25
13355 Berlin, DE

72 Inventor/es:

SCHILLING, MICHAEL;
LANG, CHRISTINE y
RAAB, ANDREAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 586 205 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

Microorganismo para expresar una proteína de membrana humana

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un organismo no mamífero vivo, modificado por ingeniería genética, aislado, con una actividad HMG-CoA-reductasa elevada con respecto al tipo natural, y con una actividad C24-metiltransferasa- y/o delta22-desaturasa reducida con respecto al tipo natural, a sus usos, a un constructo de ácido nucleico para su producción, a un kit que contiene el organismo, así como a un extracto de membrana que puede obtenerse a partir del organismo.

Estado de la técnica y fundamento de la invención

15 Un organismo de la estructura mencionada al principio se conoce por la cita bibliográfica WO 03/064650. Este organismo es adecuado para la biosíntesis de 7-deshidrocolesterol. La motivación para la creación de este organismo se basa en la necesidad de producir productos previos para la vitamina D3, en particular 7-deshidrocolesterol, en grandes cantidades y en condiciones económicas. Organismos similares se conocen por las citas bibliográficas Database WPI Week 200436 AN2004 - 382697, documento JP 2004141125 A y documento EP 20 0486290 A2.

En un contexto totalmente distinto, existe una necesidad de producir o poner a disposición del sistema proteínas de membrana, en particular proteínas de membrana humanas, funcionalmente en conformación nativa en cantidades al menos analíticamente útiles adecuadamente, que contienen estas proteínas en una cantidad suficiente por ejemplo para fines de selección de manera funcionalmente activa. Para ello se tienen en cuenta en principio, por ejemplo, procedimientos de la biosíntesis por medio de microorganismos. Sin embargo, la expresión heteróloga de proteínas de membrana de células de mamífero en cepas de tipo natural está relacionada con frecuencia con dificultades debido a la falta de colesterol, o la presencia de ergosterol, dado que las proteínas de membrana expresadas están con frecuencia funcionalmente limitadas o son inactivas. Esto puede justificarse mediante el hecho conocido de que los esteroides en las membranas desempeñan un papel importante en el plegamiento correcto y la inducción de una conformación activa de proteínas de membrana y por lo tanto en su funcionalidad, es decir para una expresión funcional de proteínas de membrana heterólogas en una levadura, el patrón de esterol de las membranas debe encajar con la proteína de membrana.

35 Los esteroides son un constituyente esencial de las membranas de células eucariotas. Son responsables de la fluidez y la permeabilidad de las membranas. Ha de destacarse especialmente su participación en la regulación de numerosas proteínas de membrana. En este sentido son importantes como un tipo de cofactores para el plegamiento correcto, la estabilidad y la actividad de las proteínas de membrana. Los esteroides libres en células eucariotas pueden encontrarse en la membrana plasmática, así como en las membranas de todos los compartimentos celulares. En las partículas lipídicas, los esteroides se encuentran en forma esterificada como lípidos de almacenamiento. En las levaduras, la mayor parte de los esteroides libres están localizados en la membrana plasmática, seguido de las vesículas secretoras, siendo reducida la cantidad en microsomas, vacuolas y membranas mitocondriales. El ergosterol representa el producto final de la ruta de síntesis de esterol, por ejemplo en la levadura *S. cerevisiae* y es el esterol principal en la membrana plasmática y las vesículas secretoras. Las membranas de los compartimentos subcelulares contienen menores cantidades de esteroides, pero también otros productos intermedios de esterol.

En células de mamífero, el producto final de la biosíntesis de esterol es el colesterol, que constituye la mayor parte de los esteroides en la membrana plasmática. La membrana plasmática contiene aproximadamente el 60-80 % del colesterol celular total, el RE, el sitio de la síntesis de esterol, solo aproximadamente el 0,5-1 %.

Por ejemplo, en la cita bibliográfica Wildt, S., Gerngross, T. U. Nature Reviews (2005) 3: 119-128 se habla de una humanización de levaduras. A este respecto, el término de la humanización se refiere, sin embargo, al patrón de glicosilación de proteínas producidas de manera heteróloga, que se adaptó al del ser humano y no al patrón de esterol relevante en el contexto de la presente invención. Se trata en primer lugar la síntesis de enzimas o anticuerpos y no de proteínas de membrana.

La ruta de biosíntesis de ergosterol de levaduras puede dividirse en la ruta preescualeno, es decir la síntesis de escualeno a partir de moléculas de acetil-CoA, y la ruta postescualeno, en la que se cataliza la conversión de escualeno en ergosterol. Como enzima marcapaso principal de la ruta preescualeno se identificó la hidroximetilglutaril-coenzima A-reductasa (HMG-CoA-reductasa). La ruta de biosíntesis de ergosterol de alto consumo de energía se regula, principalmente, mediante esta enzima, que experimenta, por consiguiente, numerosos mecanismos de regulación, tales como, por ejemplo, la inhibición de retroceso por ergosterol. La ruta preescualeno y la ruta postescualeno, hasta la síntesis de zimosterol, transcurren de igual forma en levaduras y células de mamífero. Las diferencias en el sentido 3' de zimosterol a ergosterol o colesterol se explican a continuación. En las células de levadura se convierte zimosterol mediante C24-metiltransferasa en fecosterol, a

continuación mediante delta7-delta8-isomerasa en episterol, mediante delta5-desaturasa en ergosta-5,7,24(28)-trienol, mediante delta 22-desaturasa en ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol y por último mediante delta 24-reductasa en ergosterol. En las células de mamífero se convierte zimosterol mediante delta7-delta8-isomerasa en colest-7,24-dienol, mediante delta5-desaturasa en colest-5,7,24-trienol y mediante delta7-reductasa en desmosterol, y por último mediante esterol-delta5-desaturasa en colesterol. A este respecto, la enzima mencionada en último lugar puede reaccionar también colest-7,24-dienol para dar latosterol y colest-5,7,24-trienol para dar 7-deshidrocolesterol. Latosterol puede hacerse reaccionar a su vez mediante delta5-desaturasa para dar 7-deshidrocolesterol. Este último reacciona a su vez mediante delta7-reductasa así mismo para dar colesterol.

Un ejemplo de una proteína de membrana humana es el transportador de serotonina (SERT). Este pertenece a la familia de los transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+/Cl^- , que son responsables de la recaptación de aminas biogénicas desde la hendidura sináptica de vuelta a la terminación nerviosa presináptica. Otros miembros de esta familia son los transportadores de noradrenalina, dopamina, colina, glicina y ácido γ -aminobutírico. El transportador de serotonina es una molécula objetivo farmacológico de muchos antidepresivos de elevada importancia clínica. Los antidepresivos, que tienen el SERT como objetivo, pueden dividirse en dos grupos principales: por un lado, las moléculas de principio activo tricíclicas, tales como por ejemplo imipramina, desimipramina, clomipramina y, por otro lado, los SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors (inhibidores de la recaptación de serotonina selectivos)). En el último grupo figuran principios activos tales como por ejemplo paroxetina, fluoxetina, sertralina y citalopram.

El SERT se clonó hasta el momento a partir del tejido del ser humano, la rata, el ratón, la ternera y la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. El SERT se expresó en todos los sistemas comunes, es decir, en *E. coli* y la levadura *Pichia Pastoris*, en células de insecto y distintas líneas celulares, tales como por ejemplo células COS-1, células BHK, células Hela y células HEK. Es desconocida una expresión del SERT en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una expresión funcional se ha logrado hasta el momento solo en líneas celulares de mamífero, así como en células de insecto, pero no *E. coli* o *Pichia pastoris*. El SERT es una proteína extremadamente difícil con respecto a la expresión heteróloga o sobreexpresión. Aparecen dificultades, sobre todo, por la dependencia del transportador de serotonina del colesterol en la membrana que rodea la proteína y la importancia de la glicosilación para el plegamiento correcto de la proteína. Una actividad del transportador de serotonina puede detectarse solo cuando el colesterol está presente en la membrana. Presumiblemente, este esterol induce un estado conformacional del SERT, que es óptimo para su actividad. Hasta el momento se cree que la falta de colesterol en la membrana no puede compensarse por la sustitución con otros esteroides. Debido a la importancia del colesterol para el SERT, parece claro porqué una expresión funcional en *E. coli* ha fracasado hasta el momento. A través de experimentos de inmunotransferencia de tipo Western, Tate et al. (Tate, C. G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y., y Williams, D. C. *Biochimica et Biophysica Acta* (2003) 1610, 141-153) pudieron mostrar que el rSERT en *Pichia Pastoris*, si bien se glicosila, en cambio, no se expresa funcionalmente. Esto hace suponer que la falta de colesterol en la levadura es responsable de ello.

Las citas bibliográficas Xu SH, Nes WD, *Biochem Biophys Res Commun.* (1988) 155 (1): 509-17 y el documento WO-2005/121315 A describen levaduras productoras de colesterol. Por la cita bibliográfica US-2005/0054108 A1 se conoce en otros contextos, un sistema a base de levadura para su uso en procedimientos de selección.

Un organismo modificado, por ejemplo una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene la capacidad de sintetizar colesterol o un precursor, que puede compensar la falta de colesterol con respecto al transportador de serotonina, podría parecer posible por primera vez una expresión funcional de esta proteína en no mamíferos. En el caso de una expresión funcional, podría usarse un organismo de este tipo como base para el desarrollo de un "bioensayo". Con este "bioensayo" podrían, mediante la "selección" de distintos grupos de sustancias, nuevos principios activos farmacológicamente relevantes para el transportador de serotonina. Además, pudo utilizarse una cepa de levadura de este tipo también para la expresión funcional de otras proteínas de membrana dependientes de colesterol. La lista de las proteínas de membrana humanas, para las que se detectó o se supone una dependencia del colesterol o, es larga y aumenta constantemente. La lista de las enfermedades e infecciones, en las que están implicadas la generación o la evolución de proteínas dependientes de colesterol, es así mismo larga. Un sistema adecuado como plataforma para la expresión de estas proteínas podría ser, por lo tanto, de gran valor.

Problema técnico de la invención

La invención se basa por lo tanto en el problema técnico de crear un organismo no mamífero, en particular un microorganismo, en el que puedan expresarse proteínas de membrana de mamífero, en particular proteínas de membrana humanas, de manera eficiente y funcionalmente sencilla. La invención se basa en el problema técnico adicional de crear un agente que permite, de manera sencilla y eficiente, la selección de sustancias o bibliotecas de sustancias de agonistas o antagonistas de las proteínas de membrana de mamífero, en particular, de las proteínas de membrana humanas.

Elementos básicos de la invención y formas de realización preferidas

Para resolver este problema técnico, la invención enseña el objeto de la reivindicación 1.

La invención se basa en el conocimiento sorprendente de que para una expresión funcional de proteínas de membrana de mamífero, es decir, la expresión en un plegamiento, que promueve o solo permite la actividad enzimática de la proteína de membrana, no solo es útil o necesaria la presencia de colesterol, sino que más bien puede conseguirse el mismo éxito también ya en presencia de desmosterol. Además, se muestra que el desmosterol está localizado realmente también en la membrana (plasmática) del organismo. Es decir, se ha creado un organismo no mamífero, que en una membrana, en particular la membrana plasmática, presenta un contenido elevado con respecto al tipo natural en desmosterol y dado el caso, tal como se explica a continuación, en colesterol. Con la invención se consigue en última instancia que puedan expresarse de manera funcionalmente heteróloga proteínas de membrana de mamífero, en particular proteínas de membrana humanas, en organismos no mamíferos, por ejemplo, en levaduras, transformándose estos organismos adicionalmente con un gen para la expresión de la proteína de membrana. Las proteínas de membrana pueden producirse funcionalmente por lo tanto en alta cantidad y de manera más sencilla así como económica. Esto puede aprovecharse adicionalmente de las más diversas formas. Además de la síntesis para fines de producción o para estudios estructurales y/o funcionales, puede usarse para ello un organismo de acuerdo con la invención por ejemplo también, para identificar sustancias de unión a la proteína de membrana (funcional), por ejemplo mediante selección. Un organismo de acuerdo con la invención es por lo tanto un instrumento universal para la síntesis funcional de prácticamente cualquier proteína de membrana, por ejemplo proteínas de membrana plasmática, a partir de mamíferos, tales como seres humanos, así como para hallar agonistas y/o antagonistas de proteínas de membrana de este tipo. La invención tiene por lo tanto también especial importancia como instrumento para el hallazgo de sustancias farmacéuticamente útiles.

Con el cambio genético del organismo con respecto a la elevada actividad HMG-CoA-reductasa se consigue una elevada producción de zimosterol. Con el cambio genético con respecto a la actividad C24-metiltransferasa y/o delta22-desaturasa reducida, preferentemente reducida para ambas, se consigue que la biosíntesis de ergosterol se bloquee o se reduzca, y que, en su lugar, con las actividades presentes de todos modos en el organismo en delta7-delta8-isomerasa y delta5-desaturasa, junto con la delta7-reductasa introducida, se cataliza la reacción de zimosterol a través de colest-7-24-dienol y colest-5,7,24-trienol para dar desmosterol.

En un perfeccionamiento de la invención puede estar previsto que el organismo presenta adicionalmente una actividad deshidrocolesterol-delta24-reductasa elevada con respecto al tipo natural. De esta manera tiene lugar una conversión adicional tanto del desmosterol en colesterol como de los precursores de desmosterol colest-7,24-dienol y colest-5,7,24-trienol en los precursores de colesterol latosterol y 7-deshidro-colesterol.

Se prefiere además cuando el organismo presenta una actividad escualeno-epoxidasa y/o lanosterol-desmetilasa elevada con respecto al tipo natural. De esta manera se promueve la biosíntesis de zimosterol a partir de escualeno y por lo tanto, en consecuencia, también la producción de desmosterol o colesterol.

Como organismo no mamífero se tiene en cuenta, en principio, cualquier organismo. El organismo puede ser un organismo procarionta, en particular seleccionado del grupo que consiste en bacterias de los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acetobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* o un organismo eucariota, en particular seleccionado del grupo que consiste en algas de los géneros *Cryptista*, *Chloromonadophyceae*, *Xanthophyceae*, *Cryptocodinium*, *Chrysophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*, *Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Haptophyta*, *Cryptista*, *Euglenozoa*, *Dinzoa*, *Chlorarachniophyta*, levaduras, células de insecto de *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Mamestra brassicae*, *Drosophila*, así como hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Fusidium*, *Gibberella*, *Mucor*, *Mortierella*, *Trichoderma* o plantas tales como cacahuete, colza, canola, girasol, cártamo (alazor), amapola, mostaza, cáñamo, ricino, oliva, sésamo, caléndula, púnica, onagra, candelaria, cardo, rosas silvestres, avellana, almendra, macadamia, aguacate, laurel, calabaza, lino, soja, pistachos, borraja, árboles (palma aceitera, coco o nuez) o frutos del campo, tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, mandioca, pimienta, tagetes, plantas solanáceas, tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa o plantas de arbustos (café, cacao, té), especies de *Salix* así como hierbas perennes y cultivos forrajeros. En el caso de una levadura esta puede seleccionarse del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces delbrückii*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoideus*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces ludwigii*, así como levaduras del género *Kluyveromyces* tales como *K. lactis* K. *marxianus* var. *marxianus*, *K. thermotolerans*, así como levaduras del género *Candida* tales como *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida lipolytica* y *Candida versatilis*, así como levaduras del género *Pichia* tales como *Pichia stipidis*, *Pichia pastoris* y *Pichia sorbitophila*, así como levaduras de los géneros *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Saccharomycesopsis*, *Saccharomycescodes*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamia*, *Debayomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Ogataea*, *Kuraishia*, *Komagataella*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Nakazawaea*, *Cryptococcus*, *Torulaspora*, *Bullera*, *Rhodotorula*, *Williopsis* y *Sporobolomyces* y musgos tales como *Physcomitrella* o *Ceratodon*.

El organismo descrito anteriormente forma la base o una herramienta para la creación de un organismo

adicionalmente modificado por ingeniería genética, que expresa de manera funcionalmente heteróloga una proteína de membrana de mamífero. Por lo tanto se prefiere además cuando el organismo está adicionalmente transformado con un gen que codifica una proteína de membrana de un mamífero, en particular una proteína de membrana humana, preferentemente una proteína de membrana plasmática, bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente. El gen que codifica para la proteína de membrana, a este respecto, es en principio cualquiera, y se selecciona preferentemente del grupo o de la familia que consiste en gen de transportador de serotonina, gen de transportador de noradrenalina, gen de transportador de dopamina, gen de transportador de colina, gen de transportador de glicina, gen de transportador de gamma-aminoácido, subunidad C de receptor 3 de 5-hidroxitriptamina, precursor de receptor de factor de crecimiento de mastocitos/células madre, precursor de receptor 8 tipo Toll, similar a receptor olfatorio MOR233-18, opsina sensible a verde, receptor de glicina, precursor frizzled 5, dimetilaniлина monooxigenasa [formadora de N-óxido], precursor de receptor de péptido relacionado con gen de calcitonina de tipo 1, receptor de acetilcolina muscarínico, receptor de quimiocina C-C de tipo 4, receptor acoplado a proteína G, receptor tirosina quinasa, receptor de dopamina, receptor de sustancia K, receptor de neurotransmisor putativo, componente de complejo de proteína asociado a receptor de hormona tiroidea TRAP230, receptor de fMet-Leu-Phe, precursor de subunidad alfa-6 de receptor de ácido gamma-aminobutírico (receptor de GABA (A)), precursor de receptor de péptido de tipo glucagón 2, receptor acoplado a proteína G 56, receptor hormonal EMR1, receptor de CCK-B/gastrina, receptor adrenérgico alfa-2C, receptor de dopamina D1beta, precursor GPR72 de receptor acoplado a posible proteína G, receptor de relaxina 2, similar a receptor de fosfolipasa A2 1, 180 kD, precursor de receptor de factor de coagulación II, receptor de somatostatina de tipo 1, proteína de receptor de acetilcolina, precursor de cadena alfa, precursor de cadena alfa de receptor de interleucina 7, similar a receptor de interleucina 9, similar a receptor Unc5H1 de transmembrana, receptor 2 de retención de proteína de lumen RE, proteína activadora de receptor de FGF 1, precursor de tipo IB del receptor de proteína morfogenética ósea, precursor de receptor de prolactina, receptor de factor de necrosis tumoral, similar a ARNm de receptor TRC8 transmembrana múltiple de Homo sapiens, receptor FLVCR de subgrupo C de virus de la leucemia felina, precursor de cadena beta de receptor de interferón-alfa/beta, precursor de receptor de inmunoglobulina polimérica, receptor de glucoproteína de superficie celular CD200, similar a proteína 3 relacionada con receptor de proteína de baja densidad, precursor de receptor B de péptido natriurético auricular, receptor alfa de secuencia señal, proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 21, proteína candidata de receptor I-1, precursor de receptor GPR37 acoplado a probable proteína G, precursor de cadena alfa de receptor de interleucina 10, receptor 1 acoplado a proteína G muy grande, precursor de receptor acoplado a proteína G HE6, similar a subunidad delta 1 del receptor de glutamato, receptor gamma 1 de ácido retinoico, similar a receptor olfatorio MOR42-1, similar a proteína 3 relacionada con receptor detector de calcio, precursor de receptor de factor de motilidad autocrino, receptor de citocina de clase I, similar a receptor de Nogo, receptor de 5-hidroxitriptamina 6, precursor de supermiembro 1B de receptor de factor de necrosis tumoral, enfermedad renal poliquística y receptor para proteína relacionada con albúmina de huevo, receptor acoplado a proteína G putativa, precursor de receptor relacionado con sortilina, precursor de cadena beta 1 de receptor de interleucina 12, receptor 2 de tipo lectina de tipo c, similar a receptor olfatorio, precursor de supermiembro TNFRSF19L de receptor del factor de necrosis tumoral, similar a receptor 2 de tipo G de siete pases de EGF LAG de caderina, receptor acoplado a proteína G, proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, W, precursor alfa de receptor de folato, receptor acoplado a proteína G, similar a receptor olfatorio MOR217-1, proteína de tipo 1 de unión a nucleótido guanina, precursor de supermiembro 21 de receptor de factor de necrosis tumoral, proteína de receptor de acetilcolina neuronal, precursor de cadena alfa 7, precursor de cadena beta de receptor de interleucina-2, precursor de receptor de manosa-6-fosfato dependiente de catión, precursor de receptor de interleucina-17, similar a receptor de tipo B de ácido gamma-aminobutírico, precursor de subunidad 2, precursor de cadena alfa de receptor de interleucina-2, precursor de supermiembro 18 de receptor de factor de necrosis tumoral, similar a receptor acoplado a proteína G, C, grupo 5, similar a receptor acoplado a proteína G de MrgG, precursor de cadena beta de receptor de interleucina-6, receptor LYVE-1 de hialuronano específico de endotelio linfático, receptor acoplado a proteína G putativa, precursor de tipo III de receptor de TGF-beta, similar a miembro 1 de complejo de receptor de Golgi SNAP, precursor de subunidad alfa de receptor épsilon de inmunoglobulina de alta afinidad, precursor de cadena alfa de receptor de interleucina-4, precursor de cadena beta 2 de receptor de interleucina-12, similar a receptor 1 de tipo inmunoglobulina de leucocitos, similar a purinoceptor P2Y 3 (P2Y3) (receptor de nucleósido difosfato), precursor de supermiembro 11A de factor de necrosis tumoral, receptor LYVE-1 de hialuronano específico de endotelio linfático, receptor activador PILRbeta, precursor de receptor 7 de efrina de tipo A, similar a probable receptor de tromboxano A2 isoforma beta humano, proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, C, precursor de isoforma 2, precursor de receptor de proteína C endotelial, casete de unión a ATP, sub-B, transportador de casete de unión a ATP C13 putativo, transportador de casete de unión a ATP, casete de unión a ATP, sub-A (ABC1), casete de unión a ATP, sub B, similar a proteína de multiresistencia a fármacos 2, casete de unión a ATP, sub-D, casete de unión a ATP, sub-A, casete de unión a ATP, sub-G, similar a vehículo de soluto 21 (transportador de anión orgánico), transportador de anión orgánico 3, vehículo de soluto 2, (transportador de glucosa facilitado), vehículo de soluto 7, (transportador de aminoácido catiónico, sistema y+), HCAT-2A, vehículo de soluto 6 (transportador de neurotransmisor, glicina), transportador de dicarboxilato de alta afinidad dependiente de sodio, similar a vehículo de soluto 26, vehículo de soluto 21, transportador de UDP N-acetilglucosamina, transportador de aminoácido neutro B (0), vehículo de soluto 2, transportador de glucosa facilitado, vehículo de soluto 29 (transportadores de nucleósidos), miembro 1, vehículo de soluto 26, vehículo de soluto 10 (cotransportador de sodio/ácido biliar), transportador de H+/péptido, similar a vehículo de soluto 9, vehículo de soluto 30, vehículo de soluto 25, vehículo de soluto 19 (transportador de folato), transportador de UDP-ácido glucurónico/UDP-N-acetilgalactosamina, vehículo de soluto 16 (transportadores de ácido monocarboxílico), miembro 4, transportador de

nucleósido, cotransportador de sodio/nucleósido 1, similar a ARNm de cotransportador del estroma tímico TSCOT putativo de *Mus musculus*, transportador de amina de gránulo cromafín, transportador de acetil-coenzima A, transportador de colina de alta afinidad, transportador de catión orgánico, proteína transportadora asociada a membrana, similar a subunidad BO de transportador de aminoácido, +AT, similar a precursor de translocador de triosa fosfato de plastidio no verde, similar a transportador de péptido/histidina, glucoproteína de tipo B de Rh, intercambiador de sodio/hidrógeno 6, vehículo de soluto 39 (transportador de cinc), miembro 4, vehículo de soluto dependiente de Ca peroxisómico, cotransportador de K-CL, vehículo de soluto 4, intercambiador de aniones, cotransportador de sodio/yoduro, intercambiador de aniones cloruro, similar a precursor de intercambiador de sodio/potasio/calcio 3 (Na⁺)/K⁺/Ca²⁺) de proteína de intercambio 3), transportador de fosfato dependiente de sodio, similar a vehículo de soluto 20 (transportador de fosfato, vehículo de soluto 8 (intercambiador de sodio-calcio), vehículo de soluto 11 (simportadores de sodio/fosfato), débilmente similar a factor de homeostasis de metal ATX2, transportador regulado por hierro IREG1, probable proteína de captación de cobre de baja afinidad 2, similar a vehículo de soluto 9 (intercambiador de sodio/hidrógeno), isoforma 7, subunidad alfa de canal de sodio regulado por tensión, canal de potasio TASK-4, proteína 2 de canal de potasio activado por calcio de conductancia pequeña, canal 2 de potencial de receptor transitorio largo, canal de potasio de tipo éter-a-go-go 1, proteína de canal de potasio controlado por tensión, canal de sodio, no controlado por tensión 1, delta, canal de calcio de tipo N dependiente de tensión, acuaporina, canal de calcio, dependiente de tensión, alfa, similar a canal de calcio de potencial de receptor transitorio, receptor de rianodina 3, canal de catión de potencial de receptor transitorio, canal de potasio sub K, canal alfa controlado por nucleótido ciclico, similar a ARNm de regulador 1 de canal de potación de *Rattus norvegicus*, similar a proteína 3 de canal de cloruro 3 (CLC-3), canal de cloruro 2 activado por calcio, proteína intrínseca de membrana de fibra lenticular, canal iónico de esperma, similar a proteína RAW1 de canal de potasio relacionada con Shaw, sensible a dihidropiridina de tipo L, precursor de subunidades alfa-2/delta de canal de calcio, similar a canal de anión dependiente de voltaje 2, canal de cloruro relacionado con mid-1, similar a subunidad de canal de potasio (Slack), ATPasa, transportador de Ca⁺⁺, fast twitch 1, transportador de calcio de membrana plasmática, subunidad A de 116 kDa de ATPasa de translocación de protón vacuolar, cadena alfa 3 de ATPasa de transporte de sodio/potasio, ATPasa 1 de transporte de cobre (bomba de cobre 1) (proteína asociada a enfermedad de Menkes), probable ATPasa 3 de transporte de catión (Fragmento), precursor de subunidad S1 de ATP sintasa vacuolar, similar a ATPasa ID de transporte de fosfolípidos potencial, cadena beta 3 de ATPasa de transporte de sodio/potasio, tirosina quinasa, proteína tirosina fosfatasa, no receptor de tipo 5, GTPasa transmembrana putativa (fragmento), factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona), proteína quinasa C de tipo 1, débilmente similar a proteína 1 de supresor RAS, represor de receptor de dioxina, 3',5'-fosfodiesterasa cíclica 4A específica de AMPc, proteína que contiene dominio de muerte de activación de MAP-quinasa, isoforma G, factor 2 de intercambio de nucleótido guanina ras (fragmento), óxido reductasa que contiene FMN y FAD dependiente de NADPH, precursor de subunidad de 63 kDa de doliquil-difosfoligosacárido - proteína glicosiltransferasa, glicano de fosfatidilinositol, clase B, proteína 13 de anclaje de A quinasa (PRKA), fosfolipasa A2 independiente de calcio de 85 kDa, protooncogén A-Raf de serina/treonina proteína quinasa, similar a peptidilproil isomerasa A (ciclofilina A), proteína de unión a GTP relacionada con Ras, similar a esfingosina-1-fosfato fosfatasa 1, precursor de proteína WNT-10A, similar a factor de ribosilación de ADP de tipo 1, precursor de factor de crecimiento transformante alfa, factor de intercambio de nucleótido guanina, proteína tirosina fosfatasa, no receptor, similar a serina/treonina proteína quinasa putativa, cadena catalítica de proteína quinasa de tipo IV dependiente de calcio/calmodulina, similar a fosfatidilinositol-4-fosfatasa 5-quinasa, tipo II, gamma, similar al represor de 52 kDa del inhibidor de la proteína quinasa (proteína de interacción con p58IPK) (proteína de interacción con proteína quinasa inducida por interferón de 58 kDa) (P52rIPK) (proteína asociada a muerte 4), regulador de la apoptosis, proteína 1 de anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2, similar a proteína C1 hematopoyética RHO-GAP, similar a subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-quinasa delta, similar a precursor de transductor de señal de calcio asociado a tumor 1 (proteína asociada a tumor gastrointestinal principal GA733-2) (antígeno de superficie de célula epitelial) (glucoproteína epitelial) (EGP) (antígeno asociado a adenocarcinoma) (KSA) (antígeno KS 1/4), precursor de tirosina-proteína quinasa ROS de protooncogén, proteasa de factor de transcripción unido a membrana de sitio 2, inositol polifosfato 5-fosfatasa, subunidad de 25 kDa de peptidasa de señal microsomal, similar a subunidad gamma de proteína quinasa activada por AMP, supermiembro 8 de ligando de factor de necrosis tumoral, proteína de activación de escisión de proteína de unión a elemento regulador de esterol, proteasa transmembrana, serina 3, isoforma 3, similar a Ser-Thr proteína quinasa relacionada con la proteína quinasa de distrofia miotónica, precursor de proteasa de factor de transcripción unido a membrana de sitio 1, similar a represor de 52 kDa del inhibidor de proteína quinasa (proteína de interacción con p58IPK) (proteína de interacción con proteína quinasa inducida por interferón de 58 kDa) (P52rIPK) (proteína asociada a muerte 4), PAS-quinasa, subunidad catalítica 2B de serina/treonina proteína fosfatasa, isoforma alfa, proteína de transducción de señales CBL, componente A 2 de proteínas rab de geraniltransferasa, similar a proteína de interacción con Rho 2 (factor de intercambio de nucleótido guanina Rho) (RhoGEF) (RIP2), ARN helicasa PRP16 dependiente de ATP de factor de corte y empalme de pre-ARNm, factor de corte y empalme 3b, subunidad 1, 155 kD, proteína de cuerpo nuclear SP110, isoforma a, similar a mantenimiento estructural SMC2 de cromosomas 2 de tipo 1 (levadura), similar a polimerasa (dirigida a ADN), theta, factor nuclear I/B, nurim (proteína de membrana de envuelta nuclear), similar a coactivador de receptor nuclear 4, débilmente similar a factor de corte y empalme, rico en arginina/serina 4, similar a factor 1-alfa 1 de elongación (EF-1-alfa-1) (factor de elongación 1 A-1) (eEF1A-1) (factor de elongación Tu) (EF-Tu), similar a proteína ribosómica 60S L7, desoxirribonucleasa II alfa supuesta, factor nuclear de potenciador de gen de polipéptido ligero kappa e inhibidor de linfocitos B, épsilon, vehículo de soluto 25 (vehículo mitocondrial), similar a citocromo b-561, subunidad I de citocromo oxidasa, cadena beta de succinil-CoA ligasa [formadora de GDP], precursor mitocondrial (fragmento), similar a proteína OXA1 de biogénesis de citocromo

oxidasa, precursor mitocondrial (proteína de tipo OXA1) (OXA1Hs), cadena 5 de NADH-ubiquinona oxidorreductasa, subunidad beta de enzima trifuncional, precursor mitocondrial, meticrotonil-CoA carboxilasa cadena beta, precursor mitocondrial, similar a subunidad III de citocromo c oxidasa, subunidad proteolítica putativa de proteasa de Clp dependiente de ATP, precursor mitocondrial, subunidad de 39 kDa de NADH-ubiquinona oxidorreductasa, precursor mitocondrial, segundo activador de caspasa derivado de mitocondria, isoforma Smac-delta, precursor, similar a NADH deshidrogenasa subunidad 5, subunidad TIM23 de traslocasa de membrana interna de importación mitocondrial, similar a citocromo b, receptor de importación de proteínas de precursor mitocondrial, polipéptido II de citocromo c oxidasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, precursor mitocondrial, similar a proteína de choque térmico de 60 kDa, precursor mitocondrial (Hsp60), citocromo c1, proteína heme, precursor mitocondrial, farnesiltransferasa protoheme IX, precursor mitocondrial, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, precursor mitocondrial, proteína de homeobox Hox-A7, regulador transcripcional ATRX, similar a factor de transcripción general II, i, isoforma 1, similar a factor de transcripción general IIIC, polipéptido 1 (subunidad alfa, 220 kD), activador transcripcional SRCAP, esterol/retinol deshidrogenasa, fitoceramidasa alcalina, carnitina o-palmitoiltransferasa I, isoforma hepática mitocondrial, similar a bA84N7.1 (nueva proteína similar a diacilglicerol quinasa eta (DGKH)), 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa épsilon, proteína de defecto de utilización de manosa-P-dolicol 1, esterol O-aciltransferasa 2, precursor de apolipoproteína L1, precursor de fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa, hidroxilasa de ácido graso, moderadamente similar a ARNm putativo de ácido lisofosfatídico aciltransferasa de Mus musculus, débilmente similar a precursores de subunidad B de inhibidor de fosfolipasa A2, biosíntesis de fosfatidilinositol-glucano, proteína de clase F, serina palmitoiltransferasa 1, fosfatidilserina sintasa I, similar a 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa gamma (1-AGP aciltransferasa 3) (1-AGPAT 3) (ácido lisofosfatídico aciltransferasa-gamma) (LPAAT-gamma) (1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 3), similar a triacilglicerol lipasa, precursor gástrico (lipasa gástrica) (GL), 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, ceramida glucosiltransferasa, doliquil-P-Man:Man (5) GlcNAc (2)-PP-doliquil manosiltransferasa, N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol des-N-acetilasa, precursor de subunidad de 67 kDa de doliquil-difosfoligosacárido proteína glicosiltransferasa, diacilglicerol quinasa, zeta, apolipoproteína F, similar a hidrolasa de amida de ácido graso, similar a ácido graso de cadena larga-CoA ligasa 6 (LACS 6), farnesil pirofosfato sintetasa (FPP sintetasa), esfingomielina fosfodiesterasa 2, membrana neutra (esfingomielinasa neutra), estradiol 17 beta-deshidrogenasa 7, fosfatidil inositol glucano clase S, precursor de 24-deshidrocolesterol reductasa, proteína de unión a oxisterol 1, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa beta, mioinositol-1 (o 4)-monofosfatasa, estradiol 17-beta deshidrogenasa 7, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa beta, ácido graso desaturasa MLD putativo, CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferasa, proteína 1 de tipo apirasa lisosomal, enzima condensadora de acil-malonilo, enzima de conjugación de ubiquitina E2, precursor de peroxidasa tiroidea (2 miembros), UDP-N-acetilglucosamina--doliquil-fosfato N-acetilglucosaminafosfotransferasa, N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster alfa-N-acetilglucosaminidasa, 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta 5-->4-isomerasa de tipo II, similar a adenilato ciclaza 6, isoforma a, similar a citocromo P450 IID6, GalNAc 4-sulfotransferasa, GPI transamidasa, proproteína convertasa de tipo subtilisina/kexina 7, ubiquitina ligasa 1 de tipo NEDD4, hialuronano sintasa 2, ketohexoquinas, precursor de ecto-ADP-ribosiltransferasa testicular, fosfatasa alcalina, precursor intestinal, precursor de ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico oxidasa, proteína biotina ligasa, proteína doliquil-difosfoligosacárido glicosiltransferasa, escualeno monooxigenasa, proteasa específica de ubiquitina, similar a glicerol quinasa, probable doliquil pirofosfato GlcMan9GlcNAc2 alfa-1,3-glicosiltransferasa, precursor de gamma-glutamiltanspeptidasa 1, proteína de tipo serina hidrolasa, fosfatidato citidiltransferasa 2, ADN topoisomerasa II, isozima beta, precursor de ácido lisosomal fosfatasa, precursor de tipo I de ADNasa específico de músculo, similar a quinurenina 3-monooxigenasa, similar a monooxigenasa de amidación de Peptidilglicina alfa, componente GPII de N-acetilglucosamil transferasa, similar a 3,5-fosfodiesterasa cíclica A inhibida por GMPC (fosfodiesterasa A inhibida por GMP cíclica) (CGI-PDE A), manosiltransferasa beta 1,4, colinafosfotransferasa 1, moderadamente similar a esterasa diana de neuropatía de Homo sapiens, homólogo de proteasa 1 de CAAX prenilo, pantotenato quinasa 1 alfa, similar a N-acetilglucosaminiltransferasa VI, citocromo P450 39A1, similar a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hígado, similar a beta-1,4 N-acetilgalactosaminiltransferasa, CAAX prenil proteasa 2, beta-1,3-galactosiltransferasa-6, hexosaminidasa A, precursor de proteína relacionada con anhidrasa carbónica 2, gamma-carboxilasa dependiente de vitamina K, malato deshidrogenasa, citoplasmática, manosiltransferasa, forma larga de N-acetilglucosamina-6-O-sulfotransferasa, acetilesterasa II específica de ácido siálico, similar a ADN glicosilasa de uracilo, precursor de cadena beta de beta-hexosaminidasa, similar a L-lactato de deshidrogenasa cadena B (LDH-B), probable precursor de serina proteasa HTRA3, débilmente similar a subunidad de 110 kDa de UDP-N-acetilglucosamina--péptido N-acetilglucosaminiltransferasa, esfingomielinasa II neutra, similar a N-acetiltransferasa Camello 2 putativa, débilmente similar a NADPH-citocromo P450 reductasa, similar a ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 5, similar a 3-OXO-5- alfa-esteroide 4-deshidrogenasa 2, precursor de glutamato carboxipeptidasa de plasma sanguíneo, xilosiltransferasa II, caseína quinasa I, isoforma épsilon, seleniuro, disquinasa de agua 2, paraoxonasa 2, similar a subunidad MLRQ de óxido reductasa de NADH-ubiquinona, similar a precursor de ADAMTS-5 (desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 5) (ADAM-TS 5) (ADAM-TS5) (Agreganasa-2) (ADMP-2) (ADAM-TS 11), galactosa-3-O-sulfotransferasa, valil-ARNt sintetasa 2, ribonucleasa H1, acetil-CoA carboxilasa 2, similar a precursor de alfa-L-iduronidasa, similar a precursor de ADAMTS-5 (desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 5) (ADAM-TS 5) (ADAM-TS5) (Agreganasa-2) (ADMP-2) (ADAM-TS 11), precursor del inhibidor 1 de proteasa de tipo kunitz, supuesta sialoglicoproteasa de tipo 2, homólogo de enzima E1 de activación de ubiquitina, precursor de prenilcisteína liasa, dihidrodiol deshidrogenasa dimérica, glicosiltransferasa, precursor de integrina alfa V, cadena pesada de dineína axonemal (Fragmento), precursor de proteína p24 de membrana de vesícula cubierta con cop, protocaderina ARCADLIN, queratina, de tipo I de citoesqueleto, proteína de membrana de poro de envuelta nuclear, componente 6

de complejo de gamma-tubulina, proteína transmembrana 1 asociada a labio leporino y paladar hendido, homólogo Sec61, proteína de tipo romboide asociada a presinilinas, supresor de tumor de cáncer de próstata putativo, receptor de partículas de reconocimiento de señales ("proteína de acoplamiento"), antígeno de histocompatibilidad HLA de clase I, precursor de cadena alfa B-8 B*0801, débilmente similar a peregrina, antígeno de histocompatibilidad de HLA clase II, precursor de cadena beta, precursor de ligando kit, proteína de dedo Ret 2, proteína ASPP1, gluproteína de membrana neuronal M6-a, proteína de cofactor de membrana (CD46, antígeno con reactividad cruzada de trofoblasto-linfocito) proteína de transporte de vesículas, proteína de membrana epitelial 1, precursor beta de neurexina 3, precursor de molécula de adhesión intercelular 3, presenilina 2, proteína 2 de interacción con proteína de 19 kDa de BCL2/adenovirus E1B, precursor de globulina de unión a corticoesteroides, precursor de cadena alfa de glucoproteína CD8 de superficie de linfocitos T, precursor de proteína 2 de morfogénesis capilar, proteína 2 de red golgi trans, inhibidor de bax 1 de tipo vang 1 (van gogh, Drosophila), isoforma 2 de esclerosis tuberosa 2, proteína P, precursor de molécula de adhesión a células de síndrome de Down, precursor de proteína 1 de adhesión a células vascular, proteína de leucemia linfoide mieloide de ensamblaje de clatrina, proteína de tipo kelch 2, leucemia de linaje mieloide/linfoide o mixto (homólogo a trithorax, Drosophila), transmembrana 4 súper, proteína 1A asociada a microtúbulos, tetraspanina, sinaptotagmina XI, proteína de tipo spinstar, precursor de isoforma 1A de integrina beta 1, débilmente similar a homólogo 1 de proteína de parches, precursor de pro-neuregulina-2, supresor de metástasis tumoral, precursor de homólogo de sel-1, precursor de proteína regulada por oxígeno de 150 kDa, variante de corte y empalme de proteína relacionada con procaderina mu, débilmente similar a precursor de proteína PTM1, débilmente similar a precursor de coclina, similar a proteína TRAM (proteína de membrana asociada a cadena de translocación), subunidad 7A de complejo COP9, autoantígeno 1 relacionado con atopia de unión a calcio, similar a metaxina 1, precursor de proteína de envuelta, proteína asociada a Myc, proteína de tipo 1 de albinismo ocular, proteína PL6, función desconocida pero deletionada en cáncer pulmonar microcítico (Fragmento), precursor del marcador 5 endotelial tumoral, precursor DCC de proteína de supresor tumoral, mucina, precursor relacionado con marcador 7 endotelial tumoral, proteína de dedo de cinc 179, proteína de unión a integrina alfa 63, similar a precursor de molécula 1 de interacción Stromal, similar a antígeno de carcinoma de células escamosas de Homo sapiens reconocido por linfocitos T, proteína relacionada con P400 SWI2/SNF2, molécula de adhesión a células relacionadas con NgCAM (Fragmento), similar a proteína transmembrana inducida por factor de necrosis tumoral alfa, similar a factor de complementación Apobec-1, proteína de estimulación Apobec-1, gen que potencia la expresión de células malignas/gen que potencia la progresión tumoral, supuesta ferritina (Fragmento), débilmente similar a ARNm de proteína rica en cisteína que contiene dominio DHHC humano, similar a neoplasia endocrina múltiple I, similar a proteína HIRA (potenciador de tipo TUP1 de proteína de corte y empalme 1), proteína de envuelta, precursor de miembro 3 de súper proteína transmembrana 7, proteína sobreexpresada de cáncer de vejiga, proteína transmembrana vezatina, precursor de proteína 1 de aparato de Golgi, precursor de molécula 2 no inflamatoria vascular, precursor de E-selectina, precursor de antígeno CD33 de superficie de células mieloides, similar a proteína que contiene dominios FH1/FH2 (homólogo de forma sobreexpresada en bazo) (FHOS), homólogo 1 de proteína de parches, panexina 3, autoantígeno asociado a esclerodermia, sitio 2B de integración viral ecotrópico, precursor de alfa-sarcoglucono, precursor CD34 de antígeno de células progenitoras hematopoyéticas, antígeno 112 asociado a carcinoma hepatocelular, neuropilina 1, precursor de basigina, preproteína-A2 plasmática asociada a embarazo, precursor de proteína de núcleo de proteoglucono heparan sulfato específico de membrana basal, proteína E6TP1 beta dirigida a coproteínas de virus E6 de papiloma humano de alto riesgo, altamente similar a ARNm db83 de *Rattus norvegicus*, proteína potenciadora de tipo transducina 2, protocaderina grasa 2, proteína relacionada con Unc-93, factor 600 asociado con retinoblastoma, antígeno CD44 (función de regreso y sistema de grupos indios, precursor de subunidad alfa de meprina A, similar a precursor de proteína 1 de tipo Podocalixina, similar a proteína 1 asociada a diferenciación inducida por gangliósido de Mus musculus, precursor de proteína LRRC3 de repetición rica en leucina, proteína de tipo neuropilina derivada de células endoteliales de músculo liso, fuente de péptidos asociados a MHC inmunodominante, precursor de fibulina 2, antígeno CD3Z, polipéptido zeta, precursor de cadena gamma CD3 de glucoproteína de superficie de linfocitos T, precursor de glucoproteína GP2 principal de membrana de gránulos secretores pancreáticos, precursor de molécula de activación linfocítica de señalización, precursor de proteína A4 amiloide de enfermedad de Alzheimer, precursor de proteína pM5, similar a la cadena ligera A de dineína, precursor de proteína 3 de activación de linfocitos, homólogo de proteína de anquilosis progresiva, proteína de membrana integral de banda de eritrocitos 7, proteína SYG1, similar a SINAPSINAS IA y IB, similar a la región de cromosoma de esclerosis lateral amiotrófica 2 (juvenil), candidato 2, proteína de enfermedad renal poliquística 1, precursor de proteína de niemann-Pick C1, homólogo de proteína de DNAJ 1, precursor de trombomodulina, débilmente similar oclusora, ocludina, similar a renina, yunctofilina de tipo 3, similar a proteína homeótica CHox3-pollo, similar a proteína de transferencia de glucolípidos (GLTP), subunidad de proteasoma de tipo alfa, proteína de matriz extracelular, delta-sarcoglucono, precursor de proteína 1 de tipo prominina, proteína asociada a translocación, precursor de subunidad delta, factor de biogénesis de peroxisoma 1, neuroglucano C, proteína de adaptador SH3 SPIN90, homólogo de Mcd4p, precursor de antígeno CD80 de activación de linfocitos T, similar a proteína de unión a calcio CaBP7, proteína de unión estrecha ZO-1, disferlina, dachshund 2, bartina, precursor CD5 de glucoproteína de superficie de linfocitos T, precursor de proteína anclada a membrana específica de cerebro, similar a proteína de unión a ácidos grasos, corazón (H-FABP) (proteína de unión a ácidos grasos de músculo) (M-FABP) (inhibidor de crecimiento derivado de mama) (MDGI), factor de ensamblaje de peroxisoma 1, precursor de proteína PTX3 relacionada con pentaxina, neuropilina y de tipo toloide 1, proteína 6 de región crítica de síndrome de ojo de gato, precursor de proteína-l-alfa de reconocimiento de péptidoglicano, subunidad beta de receptor de partícula de reconocimiento de señal, similar a proteína de unión a raIA 1, precursor táctil de proteína de superficie de linfocitos T, precursor de proteína 4 de ácido gamma-

carboxiglutámico transmembrana, isoforma larga de proteína relacionada con JAW1 MRVI1A, proteína PEX13 de membrana peroxisómica, precursor de proteína 2 de unión a zona pelúcida de esperma, similar a proteasoma (prosoma, macropaina) subunidad, tipo beta, 3, precursor de glucoproteína MUC18 de superficie celular, similar a otro autoantígeno de Golgi, precursor, golgin sub a, 2, homólogo de ISS a INHIBIDOR DE PRECURSOR DE ANHIDRASA CARBÓNICA-putativo, similar a catenina alfa 2, (proteína relacionada con afa-catenina) (Alfa N-catenina), proteína 1 de unión a elemento regulador de esterol, similar a factor S-II de elongación de transcripción (Factor de elongación de transcripción A), precursor de protocadherina 15, homólogo de DROSOPHILA HEADCASE, calmina, proteína 8 relacionada con proteína de unión a oxisterol, Nesprina-1 alfa, proteína SOX-13, la mayor subunidad de ARN polimerasa I dirigida a ADN, ARX de resistencia asociado a ANTRACICLINA, similar a Matrina 3, sustancia epicárdica de vaso sanguíneo, wolframina, precursor de factor de crecimiento de fibroblastos 4, precursor de noguina, precursor de transcobalamina I, precursor de factor von Willebrand, precursor de cadena beta 3 de laminina, similar a proteína 2 de interacción con complejo de proteína de unión a CAP, calsintenina-2, hermano de CDO, antígeno 137 asociado a carcinoma hepatocelular, proteína TEX28 específica de testículo, proteína de transcripción 1 de gen potenciado por megacariocito, similar a distrofia macular viteliforme (enfermedad de Best, bestrofina), similar a precursor humano de cadena alfa 2b de integrina, precursor de mucina 2, homólogo 1 de letal 3 específico de hombre, protocadherina Flamingo 2, isoforma 1 de STRA6, cistinosina, proteína ELK4, isoforma b, similar a isoforma bcl-x humana de regulador de apoptosis, precursor de endogлина, similar a cadena pesada de dineína beta 1, similar a precursor de proteína WNT-5A, similar a MH321 de histona de tipo H3.3 de ratón, factor regulador del MHC de clase II RFX1, sarcospan, forma larga de mandasolina, precursor de matrilina 2, similar a proteína DESC1, proteoglicano 200 de matriz de interfotorreceptor, precursor de cadena alfa de inhibina, porteoglucano 200 de matriz de interfotorreceptor, homólogo 1 de letal 3 específico de hombre, precursor de nefrina, precursor de matrilina 2, precursor de variante 2 citoplasmático de antígeno M130, factor de especificidad de escisión y poliadenilación, subunidad de 160 kDa, sustancia epicárdica de vaso sanguíneo, súper miembro 2 de transmembrana 6 (Fragmento) similar a proteína de dedo de cinc HRX (ALL-1) (proteína de tipo Trithorax), molécula de adhesión a células relacionada con NgCAM (Fragmento), policistina-1L1, similar a dinamina-1, similar a OTK27, precursor de cadena beta de glucoproteína Ib de plaquetas, proteína NMD, intersectina 2, precursor de matrilina 2, precursor de proteína ERGIC-53, proteína asociada a translocón, subunidad gamma, débilmente similar a proteína de resistencia a cinc/cadmio, quiescina, similar a prot GOR, proteína de transcripto 1 de gen potenciado por megacariocitos.

Secuencias génicas que codifican HMG-CoA-reductasas adecuadas, inclusive HMG-CoA-reductasas truncadas, pero aún funcionales, tales como tHMG1, son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NC_001145, NM_106299, NC_003421.2, NC_009784.1, NC_003028.3, NC_007308.3, así como la Figura 3 (tHMG1).

Secuencias génicas que codifican C24-metiltransferasas de inhibición son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NC_001145, NC_000911.1, NC_003423.3.

Secuencias génicas que codifican delta22-desaturasas de inhibición son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NC_003424.3, NC_009046.1, NC_001145.2.

Secuencias génicas que codifican delta7-reductasas adecuadas son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NM_103926, NM_001360, NM_007856, NM_203904, NM_001014927, NM_201330, NM_022389, NM_001131727, NM_001087087, XM_001497598, XM_001174160, XM_001099101, BM490402, CA753545.

Secuencias génicas que codifican delta24-reductasas adecuadas son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NM_014762, NM_001016800, NM_001094456, NM_001008645, NM_001103276, NM_001080148, NM_053272, NM_00103128, XM_001488247, AB125202, XM_001153751.

Secuencias génicas que codifican delta7-delta8-isomerasa adecuadas son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): M74037.

Secuencias génicas que codifican delta5-desaturasas adecuadas son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): S46162, NG_009446, NM_053642, NM_001035356.

Secuencias génicas que codifican escualeno-epoxidadas adecuadas son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): M64994.

Secuencias génicas que codifican lanosterol-desmetilasas adecuadas son conocidas por ejemplo por los siguientes n.º de registro del banco de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): EF059165.

- 5 Secuencias génicas que codifican proteínas de membrana de mamífero que pueden expresarse a modo de ejemplo de manera heteróloga son conocidas, por ejemplo, por los siguientes n.º de registro del bando de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NP_570126, NP_006019, NP_000860, NP_619542, NP_000786, NP_000787, NP_150645, NP_150646, NP_057658, NP_387512, NP_000669, NP_150647, NP_000671, NP_387507, NP_387508, NP_387509, NP_000670, NP_001690, NP_068713. Otras secuencias génicas para proteínas de membrana de mamífero, en particular de las proteínas de membrana enumeradas anteriormente, pueden identificarse sin dificultad mediante búsquedas en el banco de datos de genes mencionado.
- 10 Secuencias génicas que codifican promotores adecuados (promotores de las enzimas y/o proteínas respectivas expresadas de manera heteróloga, pueden ser en cada caso iguales o distintos en un organismo de acuerdo con la invención) son conocidas por ejemplo a partir de los siguientes n. de registro del bando de datos de genes The National Center for Biotechnology Information (NCBI): NC_001142, NC_001139, NC_001147, NC_001139, NC_001148, NC_001135, NC_001136.
- 15 Una actividad enzimática está elevada en un organismo de acuerdo con la invención con respecto al tipo natural, cuando la actividad es al menos un 10 %, preferentemente al menos un 50 %, de manera sumamente preferente al menos un 1000 % mayor que la misma actividad en el tipo natural correspondiente. El término del aumento abarca, a este respecto, también la presencia de la actividad enzimática en cuestión en un organismo de acuerdo con la invención, cuando el tipo natural correspondiente no presenta ninguna actividad igual.
- 20 Una enzima presenta actividad HMG-CoA-reductasa, cuando puede catalizar la reacción de beta-hidroxi-beta-metilglutaril-coenzima-A para dar mevalonato.
- 25 Una enzima presenta actividad C24-metiltransferasa, cuando puede catalizar la reacción de zimosterol para dar fecosterol.
- Una enzima presenta actividad delta22-desaturasa, cuando puede catalizar la reacción de ergosta-5,7,24(28)-trienol para dar ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol.
- 30 Una enzima presenta actividad deshidrocolesterol-delta7-reductasa (abreviado: delta7-reductasa), cuando puede catalizar la reacción de colest-5,7,24-trien-3-ol para dar desmosterol.
- 35 Una enzima presenta actividad deshidrocolesterol-delta24-reductasa (abreviado: delta24-reductasa), cuando puede catalizar la reacción de colest-7-24-dien-3beta-ol para dar latosterol, de colest-5,7,24-trien-3-ol para dar 7-deshidrocolesterol, y/o de desmosterol para dar colesterol.
- Una enzima presenta actividad escualeno-epoxidasa, cuando puede catalizar la reacción de escualeno para dar epóxido de escualeno.
- 40 Una enzima presenta actividad lanosterol-desmetilasa, cuando puede catalizar la reacción de lanosterol para dar 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol.
- 45 Una enzima presenta actividad delta7-delta8-isomerasa, cuando puede catalizar la reacción de fecosterol para dar episterol, y/o de zimosterol para dar colest-7-24-dien-3beta-ol. Una enzima de este tipo se expresa preferentemente ya en el tipo natural del organismo de acuerdo con la invención. En caso de que el tipo natural de esta enzima no se exprese o no se exprese en medida suficiente, el organismo de acuerdo con la invención puede transformarse con un gen que codifica esta enzima, bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente.
- 50 Una enzima presenta actividad delta5-desaturasa, cuando puede catalizar la reacción de episterol para dar ergosta-5-7-24(28), de colest-7-24-dien-3beta-ol para dar colest-5,7,24-trien-3-ol, y/o de latosterol para dar 7-deshidrocolesterol. Una enzima de este tipo se expresa preferentemente ya en el tipo natural del organismo de acuerdo con la invención. En caso de que el tipo natural de esta enzima no se exprese o no se exprese en medida suficiente, el organismo de acuerdo con la invención puede transformarse con un gen que codifica esta enzima, bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente.
- 55 En general, una de las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente se mide porque se hace reaccionar una cantidad predeterminada del educto en cuestión con la adición de una cantidad predeterminada de la enzima en cuestión así como, dado el caso, cantidades predeterminadas de los componentes de reacción necesarios adicionales para dar el producto y se determina la cantidad del producto formada en un intervalo de tiempo predeterminado.
- 60 La determinación de la actividad HMG-CoA-reductasa, la actividad lanosterol-desmetilasa, la actividad escualeno-epoxidasa, la actividad C24-metiltransferasa, la actividad delta7-delta8-isomerasa, la actividad delta5-desaturasa, la actividad delta 22-desaturasa y la actividad delta24-reductasa tiene lugar por ejemplo tal como se describe en la cita bibliográfica WO 03/064650 A1. La determinación de la actividad delta7-reductasa tuvo lugar de manera análoga.
- 65

El contenido en desmosterol y/o colesterol está elevado en una membrana, en particular una membrana plasmática, un organismo de acuerdo con la invención con respecto al tipo natural, cuando la cantidad de la sustancia en cuestión es al menos un 10 %, preferentemente al menos un 50 %, de manera sumamente preferente al menos un 1000 % mayor que la misma actividad en el tipo natural correspondiente. El término del aumento abarca a este respecto también la presencia de la sustancia en cuestión en la membrana de un organismo de acuerdo con la invención, cuando en la membrana de un tipo natural correspondiente la sustancia no es detectable. La medición de la cantidad tiene lugar a este respecto, tal como se indica en los Ejemplos con las entradas "Tratamiento de los esteroides de membrana" y "Condiciones para la cromatografía de gases (GC)".

Un uso adicional de un organismo de acuerdo enseña la producción de una proteína de membrana de un mamífero, en particular de una proteína de membrana humana, preferentemente de una proteína de membrana plasmática, y se caracteriza porque el organismo transformado con un gen, que codifica una proteína de membrana de un mamífero, se cultiva, preferentemente sin adición de colesterol y/o desmosterol, y porque tras transcurrir una duración de cultivo predeterminada, se aísla la proteína de membrana a partir del sobrenadante de cultivo y/o a partir del organismo.

Un uso adicional de un organismo de acuerdo con la invención se refiere a la selección de sustancias que se unen a una proteína de membrana de un mamífero, en particular a una proteína de membrana humana, preferentemente a una proteína de membrana plasmática, en el que el organismo transformado con el gen para la proteína de membrana o un extracto de membrana del organismo transformado, dado el caso tras el cultivo previo del organismo, se pone en contacto con una sustancia predeterminada o una mezcla de sustancias predeterminadas, porque se miden cambios o la ausencia de cambios de propiedades del organismo, del extracto de membrana, y/o la unión o no unión de una sustancia a la proteína de membrana, y porque en la medición de cambios y/o la unión, la sustancia o la mezcla de sustancias se clasifica como de unión a la proteína de membrana. A las propiedades que pueden determinarse del organismo pertenecen la determinación de la viabilidad, la determinación cuantitativa del crecimiento celular y la determinación cuantitativa de productos metabólicos predeterminados de las células tras el transcurso de un tiempo predeterminado del contacto con una sustancia prospectiva o una mezcla prospectiva de sustancias y la comparación del tamaño determinado con el mismo tamaño antes del contacto. La formación de una sustancia prospectiva en una proteína de membrana puede tener lugar con todos los ensayos de unión habituales en la técnica. Para ello puede estar previsto que la proteína de membrana y/o la sustancia esté covalentemente unida con una molécula indicadora detectable por medio de métodos físicos, fisicoquímicos o químicos.

La invención se refiere además, de acuerdo con la reivindicación 10, a un kit para llevar a cabo un procedimiento de selección de acuerdo con la invención. Este contiene un organismo de acuerdo con la invención, opcionalmente un constructo de ácido nucleico adecuado para transformación del organismo que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de membrana de un mamífero, en particular una proteína de membrana humana, preferentemente una proteína de membrana plasmática, que se encuentra bajo el control de un promotor de manera preferente constitutivamente activo, y con unas instrucciones de uso para la transformación del organismo con el constructo de ácido nucleico, para el cultivo del organismo antes y después de la transformación, para poner en contacto el organismo con una sustancia predeterminada o una mezcla predeterminada de sustancias, y para la medición de un cambio de una propiedad del organismo y/o de una unión de la sustancia o mezcla de sustancias a la proteína de membrana.

En el contexto de la invención puede emplearse también un constructo de ácido nucleico, en particular plásmido o vector lanzadera, que contiene un ácido nucleico o varios ácidos nucleicos, iguales o distintos, que codifican una proteína con actividad deshidrocolesterol-delta7-reductasa y/o actividad deshidrocolesterol-delta24-reductasa, encontrándose el/los ácido(s) nucleico(s) (en cada caso) bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente. El constructo de ácido nucleico puede contener adicionalmente: un ácido nucleico o varios ácidos nucleicos, iguales o distintos, que codifican una proteína con actividad HMG-CoA-reductasa y/o escualeno-epoxidasa y/o lanosterol-desmetilasa, encontrándose el/los ácido(s) nucleico(s) (en cada caso) bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente.

Un constructo de ácido nucleico de este tipo puede usarse para la producción de un organismo de acuerdo con la invención, transformándose un organismo precursor con el constructo de ácido nucleico, siendo el organismo precursor preferentemente un organismo modificado por ingeniería genética con una actividad C24-metiltransferasa y/o delta22-desaturasa reducida con respecto al tipo natural.

Por último la invención se refiere, de acuerdo con la reivindicación 13, a un extracto de membrana, en particular extracto de membrana plasmática, que puede obtenerse a partir de un organismo de acuerdo con la invención mediante disgregación del organismo y separación de la membrana, en particular de la membrana plasmática. Son bien conocidos por el experto procedimientos adecuados para la disgregación o la separación y el aislamiento de la membrana.

Todas las explicaciones anteriores y siguientes y variantes preferidas con respecto a un aspecto de la invención se aplican de manera correspondiente en los otros aspectos de la invención, sin que sea necesario repetir de manera

explícita las características respectivas con respecto a cada aspecto de la invención. Todas las características divulgadas pueden combinarse aleatoriamente con distintos aspectos de la invención, independientemente de en qué contexto se divulgan en concreto las características.

5 A continuación se explica en más detalle la invención mediante ejemplos.

Ejemplo 1: Materiales y métodos usados

1.1: Cebador

10 Todos los cebadores se sintetizaron por la empresa Metabion (Martinsried).

Tabla 1: Cebador de PCR para la amplificación. Las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción NotI y XhoI están subrayadas.

Cebador	Secuencia
mSERTNotI	5' -ATGCGGCCGCACCATGGAGACCACACCTTTG-3'
mSERTXhoI	5' -ATCTCGAGTTACACAGCATTTCATGCGG-3'

1.2: Plásmidos

20 Sistema de vector pFlat (Veen, M., Dissertation, TU-Berlín (2002)) En los siguientes ensayos se transformaron distintas cepas de la levadura *S. cerevisiae* con el vector pFlat1 o pFlat3 del sistema de vector pFlat (Jacobs BL, Azmitia EC. *Physiol Rev* (1992) 72, 165-229). Estos "vectores lanzadera" de *E. coli* ↔ *S. cerevisiae* contienen un sitio de restricción NotI y un sitio de restricción XhoI en el "Multiple cloning site" (sitio de clonación múltiple), que se usó en el presente trabajo para la clonación. Además, estos plásmidos portan el gen LEU2-(pFlat3) o el gen URA3(pFlat1), que se usaron como genes marcadores de auxotrofia para la selección de cepas que portan el plásmido de selección en medios mínimos correspondientes.

pCis-rSERT

30 El vector de expresión eucariota pCis incluye el ADNc del transportador de serotonina de rata, que se integró entre los sitios de restricción XhoI y HpaI.

1.3: Cepas

Escherichia coli K12 JM109

35 [recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 λrelA1 Δ(lac-proAB) /F'traD36 proA⁺B⁺lacI^qlacZΔMI5] (Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. *Gene* (1985) 33 (1), 103-119)

Saccharomyces cerevisiae GRFura3

[MATa leu2-3, leu2-112, his4-519, can1, ura3Δ]

(Veen, 2002, véase anteriormente)

Saccharomyces cerevisiae GRFcol

40 [MATa tHMG1-leu2, ERG1-erg5, ERG11-erg6, his3, ura3, can1]

(Veen, 2002, véase anteriormente)

1.4: Medios

Medio LB:

45 Trypton al 1%; extracto de levadura al 0,5%; NaCl al 0,5%; pH 7,4

Medio YE:

Extracto de levadura al 0,5%; glucosa al 2%; pH 6,3

Medio YNB:

50 YNB al 0,67 % („yeast nitrogen base" (base nitrogenada de levadura), Difco, Augsburg); glucosa al 2%

WMVIII:

(Lang y Looman, véase anteriormente) Para 1 litro de medio: 50 g de sacarosa; 250 mg de NH₄H₂PO₄; 2,8 de NH₄Cl; 250 mg de MgCl₂ x 6H₂O; 100 mg de CaCl₂ x 2H₂O; 2 g de KH₂PO₄; 550 mg de MgSO₄ x 7H₂O; 75 mg de meso-inositol; 10 g de glutamato de Na; 1 ml de 1000 x solución de elemento traza; 4 ml de 250 x solución de vitamina

55 Elementos traza:
Concentrado 1000x: 1,75 g de ZnSO₄ x 7H₂O; 0,5 g de FeSO₄ x 7 H₂O; 0,1 g de CuSO₄ x 5 H₂O; 0,1 g de MnCl₂ x 4 H₂O; 0,1 g de NaMoO₄ x 2 H₂O para un litro

Solución de vitamina:

60 Concentrado 250x: 2,5 g de ácido nicotínico; 6,25 g de piridoxina; 2,5 g de tiamina; 0,625 g de biotina; 12,5 g de pantotenato de Ca para 1 litro

Para placas de agar se agregó agar al 1,5 % (Serva, Heidelberg) al medio.

Antibióticos:

Ampicilina (Boehringer, Mannheim) 50 µg/ml

Suplementos del medio:

Leucina (0,4 g/l); histidina-HCl (20 mg/l)

1.5: Tampones y productos químicos

5 Tampón Laemmli(4x):

Tris-HCl 0,2 M pH 6,8; SDS al 8%; azul de bromofenol al 0,4%; glicerol al 40%; DTT 400 mM; Triton-X al 4%

PBS („Phosphat buffered saline" (solución salina tamponada con fosfato)):

NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ 8,4 mM; KH₂PO₄ 1,6 mM, pH 7,4

PBS-T:

10 1 x PBS pH 7,4; Tween 20 al 0,05 %

Solución de parada(4x):

Sacarosa al 60% (p/v) ; EDTA 20 mM; azul de bromofenol al 0,025% (p/v) tampón TAE: Acetato de sodio 20 mM;

Tris 40 mM; EDTA 2 mM; pH 8,3

Tampón TB-1:

15 NaCl 100 mM; KCl 2 mM; CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM; pH 7,5

Tampón TE (10x):

Tris-HCl 0,1 M; EDTA 0,01 M, pH 8,0

Tampón TED:

20 Tris-HCL 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; DTT 1 mM

1.6: Métodos

1.6.1: Cultivo

Cultivo aeróbico

25 El cultivo de *E. coli* tuvo lugar en un matraz Erlenmeyer de 100 ml a 37^oC y 160 rpm sobre un agitador giratorio en medio LB. Para la selección de cepas que portan plásmido se empleó el antibiótico ampicilina (50 µg/ml). Cultivos previos de la levadura *S. cerevisiae* se cultivaron a 30^oC y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer de 100 ml y cultivos principales en un matraz con trabas de 250 ml sobre un agitador giratorio. Cuando no se describe expresamente lo contrario, todos los cultivos de la levadura *S. cerevisiae* tuvieron lugar en medio WMVIII(C. Lang, A.C. Looman. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1995) 44: 147-156), suplementado con histidina 1 mg/ml.

Cultivo anaeróbico

35 Cuando no se señala expresamente, el cultivo de la cepa *S. cerevisiae* GRFura3 pFlat3-rSERT o pFlat3-leer tuvo lugar en condiciones estrictamente anaeróbicas, tal como sigue: Un precultivo de 20 ml se cultivó durante 48 h tal como se describe en „cultivo aeróbico". El cultivo principal se inoculó al 1% con este precultivo y se cultivó en un matraz con trabas de 250 ml en 50 ml de medio WMVIII, suplementado con histidina 1 mg/l y colesterol 40 mg/l, en condiciones estrictamente anaeróbicas a 30^oC y 160 rpm sobre un agitador giratorio. Para ello se incubó el matraz con trabas en una marmita anaeróbica de 2,5 l (Merck, Darmstadt) junto con dos envases con gas (Anaerocult A, Merck, Darmstadt). La suplementación de colesterol tuvo lugar con 0,5 ml (por 50 ml de medio) de una solución de colesterol (2,5 g de etanol; 2,5 g de Tween 80; 20 mg de colesterol), de modo que estaba presente una concentración final de 40 mg de colesterol por 1 litro de medio.

1.6.2: Métodos del análisis de ADN

45 Restricción

La restricción del ADN (de 1 a 10 µg) tuvo lugar en preparaciones de 30 µl, compuestas por ADN, 3 µl del tampón correspondiente, 1 µl de RSA (3 mg/ml) y 1 U de enzimas (NotI y XhoI, BioLabs, Schwalbach) por 1 µg de ADN empleado. La preparación se incubó a 37^oC durante dos horas. Para la restricción de amplicones de PCR se incubó durante cuatro horas.

50 Electroforesis en gel de agarosa
La electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo en aparatos Minigelgel (BioRad, Múnich). Los geles se componían de agarosa al 1% en tampón TAE. Como tampón de ejecución se usó así mismo tampón TAE. Se mezclaron 10 µl de la muestra con 3 µl con una solución de parada. Como patrón sirvió para fragmentos entre 2 kb y 13 kb λ-ADN (BioLabs, Schwalbach) restringido con HindIII (tamaño de banda: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb y 0,6 kb). Para fragmentos más pequeños entre 500 pb y 3 kb se usó el marcador GeneRuler (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) y para fragmentos entre 3 kb y 10 kb el marcador 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs). Para la separación de fragmentos de ADN se aplicó una tensión de 100 V durante 30-45 min. Después se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio (tampón TAE 0,4 mg/l) y se tomaron imágenes bajo luz UV(254 nm).

60 Precipitación de ADN

65 Se concentró ADN de soluciones acuosas por medio de una precipitación. Para ello se mezcló la solución de ADN con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4,8) y un volumen de 2,5 veces de etanol (al 96%). La preparación se incubó durante 30 min a -20^oC y se centrifugó a continuación a 14000 x g. El gránulo de ADN se lavó después una vez más con etanol al 70% y se centrifugó a 14000 g durante 5 min. El gránulo secado al aire se resuspendió en un volumen deseado de tampón TE y se almacenó a -20^oC.

Ligación

La ADN-ligasa de T4 cataliza la unión de enlaces fosfodiéster covalentes entre el grupo 3'-hidroxilo de un nucleótido y el grupo 5'-fosfato de un segundo nucleótido en ADN bicatenario. Los fragmentos que van a ligarse se purificaron por medio de un kit de purificación de ADN (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante y se juntaron en una relación de ADN de vector con respecto a inserto de 3:1 y se recogieron en un volumen de 17 μ l. A continuación se agregaron 2 μ l de tampón ligasa (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) y 1 μ l de ligasa de T4 (1 U/ μ l) y se incubó la preparación durante 2 horas en el caso de una „sticky-end-Ligation" a 16°C.

10 Células competentes y transformación de E. coli

La transformación de células de E. coli con ADN de plásmido tuvo lugar de acuerdo con el método de electroporación. Para la preparación de células electrocompetentes se sobreinoculó un cultivo durante la noche al 1% en 500 ml de medio LB reciente y se cultivó de manera aeróbica a 37°C hasta una densidad óptica de 0,5-0,7. A continuación se separaron por centrifugación las células a 5000 x g durante 10 min y se resuspendieron en 200 ml de glicerol al 10% helado. Después de una etapa de centrifugación adicional a 5000 x g durante 10 min se resuspendieron las células en 100 ml de glicerol al 10% helado. Después de una nueva centrifugación a 5000 x g durante 10 min y una resuspensión en 50 ml de glicerol al 10% helado, se separaron por centrifugación las células durante 10 min a 5000 x g, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el gránulo en el glicerol refluyente, se dividió en alícuotas de 65 μ l y se congeló a -80°C. Para la transformación se mezclaron 100-200 ng de ADN de plásmido con 30 μ l de las células competentes en un Eppi de 1,5 ml y se incubó durante algunos minutos sobre hielo. A continuación se transfirió la preparación a cubetas de electroporación, estériles, enfriadas previamente sobre hielo y se llevó a cabo la electroporación (1,67 kV, 25 μ F, 200 Ω , 5 ms) con un Multiporator (Eppendorf, Hamburgo). Tras la emisión de pulsos tuvo lugar la adición inmediata de 1 ml de medio YE y la transferencia a un Eppi de 1,5 ml. La preparación se incubó ahora para la regeneración durante 1 h a 37°C y, a continuación, se sembró en placa en placas de LB-agar con ampicilina para la selección.

Aislamiento de ADN de plásmido de E. coli (Miniprep)

Las cepas de E. coli en cuestión se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina 50 mg/l y se cultivaron durante la noche a 37°C. Las células se centrifugaron a continuación a 5000 x g. El sobrenadante se desechó y el ADN de plásmido se trató por medio de un kit Miniprep (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa es posible, por medio de cebadores específicos, amplificar fragmentos de ADN a partir de ADN aislado o directamente a partir de células de E. coli completas. Según el estándar, para una reacción de PCR se emplearon 100 ng de ADN de molde, disueltos en 1 μ l de H₂O una colonia de E. coli, transferida con un palillo de dientes a un tubo de PCR (PCR de colonias). Además de la plantilla, estaba presente una preparación de reacción de 4 μ l de dNTP-Mix (2,5 mM), 5 μ l de 10x tampón de reacción, respectivamente 2 μ l de cebador (forward y revers (directo e inverso)), 0,2 μ l (1 U) de Taq-polimerasa (Promega, Mannheim) o Takara-polimerasa (Takara, Tokio, Japón) y H₂O en un volumen total de 50 μ l. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Biorad, Múnich) según la preparación. Para el análisis se separaron 10 μ l de la preparación de PCR sobre un gel de agarosa o se purificaron para el uso adicional por medio de un kit de purificación de PCR (Qiagen, Hilden) y se concentraron hasta un volumen de 30 μ l.

Transformación de levadura

Para la transformación de levadura se cultivó un precultivo en 20 ml de medio YE durante la noche. Un cultivo principal de 50 ml se inoculó hasta una densidad óptica DO₆₀₀ de 0,3 y se cultivó durante aproximadamente 4 horas. A una DO₆₀₀ alcanzada de 0,8- 1,0 se centrifugaron las células a 4000 g durante 10 min y se lavó el sedimento celular con 10 ml de H₂O estéril. A continuación se recogieron las células en 1,5 ml de H₂O y se transfirieron a un Eppi. Las células se centrifugaron (4000 g, 2 min) y se resuspendieron en 1 ml de solución de acetato de litio (LiAc 100 mM en tampón TE), se centrifugaron (4000 x g, 2 min) y se lavaron de nuevo con 1 ml de solución de acetato de litio. A continuación se recogieron las células en 200 μ l de solución de acetato de litio (células competentes). Para una preparación de transformación se emplearon 40 μ l de células competentes, 10 μ l de ADN de esperma de arenque (10 mg/ml), 230 μ l de solución de PEG (PEG 4000 al 40% en acetato de litio 0,1 M en 1 x TE pH 8,0) y 1-20 μ g de ADN que va a transformarse. Esta preparación se incubó durante 30 min a 30°C y se expuso a continuación a un choque térmico a 42°C durante 8 min. Después de enfriar hasta temperatura ambiente se añadieron 800 μ l de H₂O y se centrifugó la preparación a 7000 x g durante 20 s. A continuación se sembraron en placa las células directamente sobre medios de selección correspondientes con agar y se incubaron durante 3 a 5 días a 30°C. En el caso de la transformación doble mencionada en el capítulo 4.2.2, es decir, la transformación simultánea con 2 vectores, la preparación de transformación contenía aproximadamente 30 μ g de cada vector. Para ello se precipitó el ADN de vector y se recogió en 10 μ l de H₂O. Se añadieron 40 μ l de células competentes y se incubó esta preparación durante 30 min a 37°C, antes de añadirse la solución de PEG y el ADN de esperma de arenque. Después se procedió tal como se describió anteriormente.

1.6.3: Analítica de esteroles

Condiciones de cultivo para el análisis de esteroles

Para el análisis de esteroles se realizaron cultivos de levadura según el siguiente esquema: Un precultivo de 20 ml se

inoculó con 50 µl de un cultivo congelado y se cultivó durante 2 días. El cultivo principal se realizó en un matraz con trabas de 250 ml con 50 ml de medio (medio WMVIII, suplementado con histidina 1 mg/ml) sobre un agitador giratorio a 160 rpm y 30°C durante 1 o 3 días. Se inoculó el cultivo principal con un 1% del precultivo.

5 Determinación de la sustancia seca

Para la determinación de la sustancia seca se transfirieron 3 veces 6 ml de volumen de cultivo a tubos Greiner de 15 ml pesados previamente. Las células se separaron por centrifugación a 3500 g durante 5 min y se lavaron con 10 ml de H₂O. A continuación se secó el sedimento celular en una estufa de secado durante 12 horas a 80°C. Las muestras se enfriaron en el desecador, antes de que tuviera lugar la pesada.

10

Tratamiento de los esteroides totales

Las células que van a examinarse se recogieron y se lavaron con 40 ml de H₂O. A continuación se determinó la densidad óptica DO₆₀₀ y se recogió un sedimento de levadura, que corresponde a 125 de DO₆₀₀, en 5 ml de una solución de HCl 0,5 N. La suspensión se coció entonces en un tubo Falcon de 50 ml durante 20 min a 100°C. Las células labilizadas de esta manera se enfriaron a continuación sobre hielo y se añadieron a la solución 3 g de KOH. Tras disolverse el KOH se añadieron 12,5 ml de una solución de pirogalol metanólico 0,25 g/l. Como patrón de extracción se añadieron adicionalmente 10 µl de solución de colesterol (10 mg/ml). La mezcla de saponificación se incubó durante 1 h 45 min a 70°C. Tras enfriarse esta preparación hasta temperatura ambiente se extrajeron los esteroides con 2 x 20 ml de n-hexano. Las fases de n-hexano combinadas se concentraron en el evaporador rotatorio y el residuo se disolvió con 2 x 1 ml de cloroformo con nonadecano 0,2 g/l como patrón interno y se transfirieron a frascos de vidrio topacio. Los extractos de esteroles se almacenaron hasta el análisis a -20°C.

Tratamiento de los esteroides de membrana

Para la preparación de las muestras para la analítica de esteroides de membrana debieron aislarse en primer lugar las membranas plasmáticas de las cepas de levadura *S. cerevisiae* que iban a examinarse. Esto tuvo lugar según el método de Serrano (Serrano et al., *Methods Enzymol.*, 157:533-544 (1988) con algunas modificaciones, que se describen brevemente a continuación: Las células se recogieron tras la cosecha y una etapa de lavado con H₂O en 1 ml de Tris 1 M (pH 8), 200 µl de EDTA 0,5 M y 100 µl de PMSF 200 mM. A continuación tuvo lugar la disgregación con perlas de vidrio. Después de una etapa de centrifugación se retiró el sobrenadante, se lavaron las perlas de vidrio con tampón TED y se reunieron los sobrenadantes en un tubo SS34. Las vesículas de membrana más grandes y la membrana plasmática se sedimentaron ahora a 20000 g durante 30 min y el sedimento se recogió en 4 ml de glicerol al 20% en tampón TED con 200 µl de PMSF 0,2 M y se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce. Se añadieron 3 ml de este homogeneizado a un gradiente discontinuo, de 6 ml al 53% (p/p) y 3 ml al 43% (p/p) de sacarosa en un tubo de ultracentrífuga Beckman. La centrifugación tuvo lugar durante 6 h a 100.000 g en un rotor Beckman SW41-Ti. La membrana plasmática purificada pudo retirarse de la interfase con una pipeta y se transfirió a un nuevo tubo Beckman, que se llenó con H₂O. La membrana plasmática se sedimentó a continuación a 80000 g durante 30 min y se resuspendió el sedimento en 2 ml de tampón TED y se almacenó a -20°C. Para la extracción de los esteroides se mezcló 1 ml de la suspensión de membrana plasmática con 500 µl de cloroformo y se agitó con vórtex durante 1 min. Le siguió la separación de fases a 13000 rpm durante 15 min. Se transfirieron 450 µl de la fase orgánica inferior ahora a un tubo de CG y se añadieron 50 µl de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, Sigma, Múnich). La derivatización de los esteroides tuvo lugar durante 1 h a 80°C. Las muestras acabadas pudieron ahora analizarse por cromatografía de gases.

Condiciones para la cromatografía de gases (CG)

La analítica de CG se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent, Waldbronn), equipado con un automuestreador Agilent 7683B. Como detector se usó un espectrómetro de masas Agilent 5975 VL. Se seleccionaron las siguientes condiciones: Como columna sirvió una columna HP-5MS de 30 m de longitud (J&W Scientific, EE.UU.) con un diámetro interno de 0,25 mm y un grosor de película de 0,25 µm. Helio sirvió como fase móvil. El sistema CG/EM se ejecutó con un programa de temperatura (100°C 0,5 min, 5°C/min a 270°C, 270°C durante 10 min, 5°C/min a 290°C, 290°C durante 4 min, 5°C/min a 325°C, 325°C durante 20 min, 5°C/min a 340°C, 340°C durante 2 min) en el modo sin fraccionamiento. La temperatura del inyector ascendía a 280°C, la del detector a 150°C. Para la mejor separación y el aumento de la volatilidad de los productos intermedios de esteroles, se derivatizaron los productos de esteroles con MSTFA durante una hora a 80°C en la estufa de secado. La determinación de las masas molares de los productos intermedios de esteroles examinados, así como su identificación por medio del patrón de ionización, tuvo lugar con el espectrómetro de masas Agilent 5975 VL. El volumen de inyección de las muestras ascendió a 2 µl.

Ejemplo 2: Resultados

60 En el año 2002 se logra establecer la biosíntesis de colest-5,7,24-trien-3-ol en la levadura *S. cerevisiae* (Veen, 2002, véase anteriormente). Para ello se modificó con métodos de ingeniería genética una cepa de laboratorio de libre acceso GRF18 tal como se representa a continuación.

Cepa	Descripción
GRFI8 ↓	leu2, his3
GRFura3 ↓	leu2, his3, ura3
GRFtH3 ↓	tHMG1-leu2, his3, ura3
GRFtH3E1e5 ↓	tHMG1-leu2, ERG1-erg5, his3, ura3
GRFtH1E1E11e5e6	tHMG1-leu2, ERG1-erg5, ERG11-erg6, his3, ura3

5 Tal como puede verse, se delecionó en primer lugar el gen URA3 y el gen tHMG1 se integró en el locus de gen LEU2. El gen tHMG1 (t = truncated (truncado), abreviado) codifica para una HMG-CoA-reductasa acortada, que se compone tan solo de la subunidad catalítica de la proteína y, por lo tanto, no experimenta ya la inhibición feedback mediante productos intermedios de esteroles. La transcripción del gen tHMG1 se controla por el promotor de ADH1 constitutivo. Mediante el análisis de una sobreexpresión sistemática y una desregulación transcripcional de todos los genes de la ruta de biosíntesis de postescualeno individualmente y en combinaciones en la cepa desregulada por HMG1, pudieron identificarse dos puntos de regulación principales adicionales o pasos estrechos en la ruta de postescualeno. Estos pasos estrechos pudieron superarse mediante la sobreexpresión de la escualeno-epoxidasa (ERG1) y la lanosterol-desmetilasa (ERG11). Para ello se integraron en el genoma de levadura los genes ERG1 y ERG11 en una forma transcripcionalmente desregulada bajo el control de un promotor de ADH1 constitutivo, en concreto, por medio de la recombinación homóloga en los loci de los genes ERG5 y ERG6, que se delecionaron de esta manera (Veen, 2002, véase anteriormente). De este modo, en solo 3 etapas de transformación, se introdujeron 5 cambios genéticos en la cepa de levadura, mediante los cuales se ha logrado una eliminación de los pasos estrechos en la ruta de síntesis de ergosterol, así como el establecimiento de la síntesis de colest-5,7,24-trien-3-ol. Adicionalmente se mostró que la cepa de levadura resultante GRFtH1E1E11e5e6 (GRFcol) produce productos intermedios de post-escualeno-esteroles en cantidades mucho mayores que la cepa de tipo natural GRFura3.

20 En una etapa adicional, en esta cepa, por medio del vector lanzadera, de acuerdo con la invención, se llevó a la sobreexpresión una deshidrocolesterol-delta7-reductasa (conocida por la cita bibliográfica US-5,759,801). Para ello se integró el ADNc para la deshidrocolesterol-delta7-reductasa (DHCR7) de Arabidopsis thaliana entre el promotor de ADH1 constitutivo y el terminador de triptófano (TRP1) del vector y se transformó en la levadura. La cepa de levadura resultante se designó como GRFcol pFlat1-DHCR7.

25 El análisis de cromatografía de gases de la composición de esteroles total está representada a continuación. La Tabla 2 muestra la composición de los esteroles principales en la levadura GRFcol después de la transformación con el vector pFLAT1-DHCR7, que incluye la deshidrocolesterol- Δ 7-reductasa de Arabidopsis thaliana y/o pFlat3-DHCR24, que incluye la deshidrocolesterol- Δ 24-reductasa de Xenopus laevis. Los valores proceden de un análisis de CG/EM y se entienden como partes porcentuales. Se reconoce que la sobreexpresión de DHCR7 llevó a una conversión parcial del colest-5,7,24-trienol en colest-5,24-dienol (desmosterol), un precursor directo de colesterol. El porcentaje de este esteroles en el contenido en esteroles total de la levadura se encuentra en aproximadamente el 40-50%. Por lo tanto, desmosterol junto a zimosterol, era el esteroles principal en la levadura. El examen de la membrana plasmática dio como resultado que desmosterol era, con un porcentaje de aproximadamente el 60%, el esteroles de membrana principal (datos no mostrados).

Tabla 2: Parte porcentual del esteroles respectivo en las cepas indicadas (esteroles totales)

Cepa	Colesterol	Desmosterol	Zimosterol	colest-7,24-dienol	Ergosterol	colest-5,7,24-trienol	Escualeno	7-des-hidro-colesterol
GRFcol pFlat1 pFlat3	0,0	0,0	14,5	14,0	5,3	25,4	40,7	0,0
GRFcol pFlat1- DHCR7 pFlat3	0,0	47,3	8,7	5,5	4,2	13,1	21,3	0,0
GRFcol pFlat1- DHCR7 pFlat3- DHCR24 X.laevis	3,2	41,7	6,6	4,8	5,7	8,9	22,1	7,0

Después del establecimiento de la biosíntesis de desmosterol, se expresó por medio del vector lanzadera pFlat3, una deshidrocolesterol- Δ 24-reductasa en la levadura además de DHCR7. Para ello se integró el ADNc para la deshidrocolesterol- Δ 24-reductasa (DHCR24) de *Xenopus laevis* entre el promotor de ADH1 constitutivo y el terminador de triptófano (TRP1) del vector pFlat3 y se introdujo en la levadura. La cepa resultante se designó como GRFcol pFlat1-DHCR7 pFlat3-DHCR24. El análisis de cromatografía de gases de la composición de esterol total de esta cepa mostró que la sobreexpresión de DHCR24 llevaba a la síntesis de colesterol y 7- deshidrocolesterol. El porcentaje de colesterol y 7-deshidrocolesterol se encontraba en aproximadamente el 3,2 o el 7,0 %. (Tabla 1)

Para examinar una influencia de desmosterol sobre la expresión heteróloga de una proteína de membrana, se sobreexpresó el transportador de serotonina de la rata en la cepa GRFcol pFlat1-DHCR7. Par ello se integró el ADNc de rSERT entre el promotor de ADH1 constitutivo (C. Lang, A.C. Looman, Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 147-156 (1995) y el terminador de triptófano (TRP1) del vector pFlat3. La integración tuvo lugar a través de un sitio de restricción NotI y un sitio de restricción XhoI en el "multiple-cloning-site" (sitio de clonación múltiple) de este "vector lanzadera" de *E. coli* / *S. cerevisiae*. El sistema de vector pFlat está representado esquemáticamente en la Figura 1. Esta muestra una representación esquemática de los plásmidos de expresión de levadura episomales pFlat1 y pFlat3. El plásmido pFlat1 porta un gen URA3 y pFlat3 un gen LEU2 para la selección de cepas que portan plásmido. Ambos plásmidos contienen el promotor de ADH1 constitutivo y el terminador de TRP1, así como la mayor parte del ADN 2 μ m para la replicación. La clonación del ADNc de rSERT entre los sitios de restricción NotI y XhoI del multiple-cloning-site está representada esquemáticamente.

Después de la creación del vector pFlat3 rSERT se transformó la cepa GRFcol pFlat1-DHCR7 así como la cepa de tipo natural GRF18 con el plásmido y se llevó a la expresión el receptor de serotonina. La expresión funcional del rSERT en las cepas de levadura que van a examinarse se examinó mediante unión de [3 H] citalopram a esferoblastos.

Los antagonistas de serotonina, tales como citalopram, se unen exclusivamente a moléculas de SERT correctamente plegadas y activas, es decir, funcionalmente expresadas. Citalopram se une con alta afinidad al mismo sitio del transportador de serotonina que el verdadero sustrato, serotonina. Un índice de ello es que citalopram reduce el número máximo de sitios de unión, pero no reduce la afinidad de la serotonina hacia SERT. Se conoce que [3 H] citalopram solo se une al rSERT, cuando está presente colesterol en la membrana que lo rodea. Ergosterol no pudo sustituir a colesterol en este estudio. En un experimento deberá examinarse si esto se logra con los esteroides colest-5,7,24-trienol y desmosterol, que son similares a la estructura de colesterol.

Para examinar la expresión funcional del rSERT en la membrana plasmática de las cepas de levadura que van a examinarse, se llevó a cabo un estudio de unión de [3 H] citalopram con esferoblastos de estas cepas. La Figura 2 muestra los resultados de este estudio. Está representado un recuento de centelleo del [3 H] citalopram unido fmoI por 10^9 células. Se cultivaron de manera anaeróbica esferoblastos de las cepas GRFura3 pFlat1-leer, pFlat3-rSERT; GRFcol pFlat-leer, pFlat3-rSERT; GRFcol pFlat1-DHCR7, pFlat3-rSERT; GRFura3 pFlat1-leer, pFlat3-rSERT con suplementación de colesterol y se incubaron las cepas control correspondientes (para determinar la unión no específica, portan el vector pFlat3-leer) con [3 H] citalopram 2 nM. Los datos de porcentaje representan la unión específica a la unión total. La altura de las barras representa el valor medio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el valor de medición mayor y el menor.

La Figura 2 muestra que la unión no específica es la máxima en GRFcol-DHCR7 y es la mínima en GRFura3 de manera anaeróbica + colesterol.

Una diferencia significativa entre unión específica y no específica a esferoblastos de GRFura3 y GRFcol y, por lo tanto, una expresión funcional del rSERT en estas cepas, no es evidente a partir de los resultados en la Figura 2. En cambio, es sorprendente que, además de GRFura3 de manera anaeróbica con colesterol, también en GRFcol-DHCR7 puede detectarse una unión específica del [3 H] citalopram de aproximadamente el 20%. Esto corresponde a una unión específica de, en promedio, 6 moléculas de [3 H] citalopram o a la expresión funcional de 6 moléculas de rSERT por célula de la cepa GRFura3 de manera anaeróbica con colesterol. En GRFcol-DHCR7 corresponde a 11 moléculas. La diferencia de 5 moléculas puede explicarse mediante el diferente nivel de expresión del SERT en las dos cepas. Un análisis del nivel de expresión por inmunotransferencia de tipo Western (datos no mostrados) mostró que la expresión en GRFcol-DHCR7 es mayor que en GRFura3 de manera anaeróbica con colesterol.

La unión específica asciende, tanto en GRFura3 de manera anaeróbica con colesterol, como en GRFcol-DHCR7 a aproximadamente el 20%. Es decir, desmosterol parece compensar por completo la falta de colesterol, con respecto a la funcionalidad del SERT. Los resultados del estudio de unión con esferoblastos indican una expresión funcional del rSERT en GRFcol-DHCR7.

En el caso de esferoblastos de la cepa GRFura3 pFlat3-rSERT de manera anaeróbica con colesterol, pudo detectarse una unión específica de [3 H] citalopram. Es decir, se parte de que el rSERT en esta cepa se expresa funcionalmente en estas condiciones de cultivo. Dado que se trabajó con esferoblastos, se ha logrado también la detección para la expresión del rSERT en la membrana plasmática. Los resultados en la Figura 2 aclaran que ergosterol y colest-5,7,24-trienol no pueden compensar la falta de colesterol, y para una expresión funcional del

SERT es necesario colesterol o desmosterol en la membrana.

REIVINDICACIONES

1. Organismo no mamífero vivo, modificado por ingeniería genética, aislado, con una actividad HMG-CoA-reductasa elevada con respecto al tipo natural, y con una actividad C24-metiltransferasa y/o delta22-desaturasa reducida con respecto al tipo natural,
- 5 caracterizado por que
- el organismo presenta una actividad deshidrocolesterol-delta7-reductasa elevada con respecto al tipo natural y
- 10 por que el organismo está transformado adicionalmente con un gen que codifica una proteína de membrana de un mamífero, bajo el control de un promotor.
2. Organismo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el organismo presenta adicionalmente una actividad deshidrocolesterol-delta24-reductasa elevada con respecto al tipo natural.
- 15 3. Organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el organismo presenta una actividad escualeno-epoxidasa y/o lanosterol-desmetilasa elevada con respecto al tipo natural.
- 20 4. Organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el organismo es un organismo procarionta, en particular seleccionado del grupo que consiste en bacterias de los géneros Bacillus, Escherichia, Lactobacillus, Corynebacterium, Acetobacter, Acinetobacter y Pseudomonas o un organismo eucariota, en particular seleccionado del grupo que consiste en algas, levaduras, hongos, células de insecto, musgos y plantas.
- 25 5. Microorganismo, de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que la levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces delbrückii*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomycodes ludwigii*, así como levaduras del género *Kluyveromyces* tales como *K. lactis*, *K. marxianus* var. *marxianus*, *K. thermotolerans*, así como levaduras del género *Candida* tales como *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida lipolytica* y *Candida versatilis*, así como levaduras del género *Pichia* tales como *Pichia stipidis*, *Pichia pastoris* y *Pichia sorbitophila*, así como levaduras de los géneros *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Saccharomycesopsis*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Ogataea*, *Kuraishia*, *Komagataella*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Nakazawaea*, *Cryptococcus*, *Torulasporea*, *Bullera*, *Rhodotorula*, *Willipsis* y *Sporobolomyces*.
- 30 6. Organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el organismo, en particular la membrana, en particular la membrana plasmática del organismo presentan un contenido en desmosterol y/o colesterol y/o 7-deshidro-colesterol y/o latosterol elevado con respecto al tipo natural.
- 35 7. Organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el gen que codifica una proteína de membrana de un mamífero es un gen que codifica una proteína de membrana humana, preferentemente una proteína de membrana plasmática, y por que este gen se encuentra bajo el control de un promotor constitutivamente activo.
- 40 8. Uso de un organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción de una proteína de membrana de un mamífero, en particular de una proteína de membrana humana, preferentemente de una proteína de membrana plasmática, caracterizado por que el organismo transformado se cultiva, preferentemente sin adición de colesterol y/o desmosterol, y por que tras transcurrir una duración de cultivo predeterminada se aísla la proteína de membrana a partir del sobrenadante de cultivo y/o a partir del organismo.
- 45 9. Uso de un organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para la selección de sustancias que se unen a una proteína de membrana de un mamífero, en particular a una proteína de membrana humana, preferentemente a una proteína de membrana plasmática, caracterizado por que el organismo o un extracto de membrana del organismo, tras el cultivo previo del organismo, se pone en contacto con una sustancia predeterminada o una mezcla de sustancias predeterminadas, por que se miden cambios o la ausencia de cambios de propiedades del organismo, del extracto de membrana, y/o la unión o no unión de una sustancia a la proteína de membrana y por que en la medición de cambios y/o la unión, la sustancia o la mezcla de sustancias se clasifica como de unión a la proteína de membrana.
- 50 10. Kit para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, con un organismo no mamífero vivo, modificado por ingeniería genética, con una actividad HMG-CoA-reductasa elevada con respecto al tipo natural, con una actividad C24-metiltransferasa y/o actividad delta22-desaturasa reducida con respecto al tipo natural, y con una actividad deshidrocolesterol-delta7-reductasa elevada con respecto al tipo natural, con un constructo de ácido
- 55 60 65

- nucleico, adecuado para la transformación del organismo, que contiene un ácido nucleico que codifica para una proteína de membrana de un mamífero, en particular una proteína de membrana humana, preferentemente una proteína de membrana plasmática, que se encuentra bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente, y con unas instrucciones de uso para la transformación del organismo con el constructo de ácido nucleico, para el cultivo del organismo antes y después de la transformación, para poner en contacto el organismo con una sustancia predeterminada o una mezcla predeterminada de sustancias, y para la medición de un cambio de una propiedad del organismo y/o de una unión de la sustancia o mezcla de sustancias a la proteína de membrana.
- 5
11. Uso de un constructo de ácido nucleico, en particular plásmido o vector lanzadera, que contiene un ácido nucleico o varios ácidos nucleicos, iguales o distintos, que codifican una proteína con actividad deshidrocolesterol-delta7-reductasa y/o actividad deshidrocolesterol-delta24-reductasa, en el que el/los ácido(s) nucleico(s) se encuentra o encuentran (en cada caso) bajo el control de un promotor de manera preferente constitutivamente activo para la producción de un organismo para un kit de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se transforma un organismo precursor con el constructo de ácido nucleico, el constructo de ácido nucleico que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de membrana de un mamífero, en particular una proteína de membrana humana, preferentemente una proteína de membrana plasmática, que se encuentra bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente, en el que el organismo precursor es preferentemente un organismo modificado por ingeniería genética con una actividad C24-metiltransferasa y/o delta22-desaturasa reducida con respecto al tipo natural.
- 10
- 15
- 20
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, el constructo de ácido nucleico que contiene adicionalmente un ácido nucleico o varios ácidos nucleicos, iguales o distintos que codifican una proteína con actividad HMG-CoA-reductasa y/o escualeno-epoxidasa y/o lanosterol-desmetilasa, en el que el/los ácido(s) nucleico(s) se encuentra o encuentran (en cada caso) bajo el control de un promotor preferentemente activo constitutivamente.
- 25
13. Extracto de membrana, en particular extracto de membrana plasmática, que puede obtenerse a partir de un organismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 mediante disgregación del organismo y separación de la membrana, en particular de la membrana plasmática, que contiene desmosterol y/o colesterol y/o 7-deshidrocolesterol y/o latosterol, así como una proteína de membrana de un mamífero, obtenido a partir del gen que codifica una proteína de membrana de un mamífero.
- 30

Figura 1

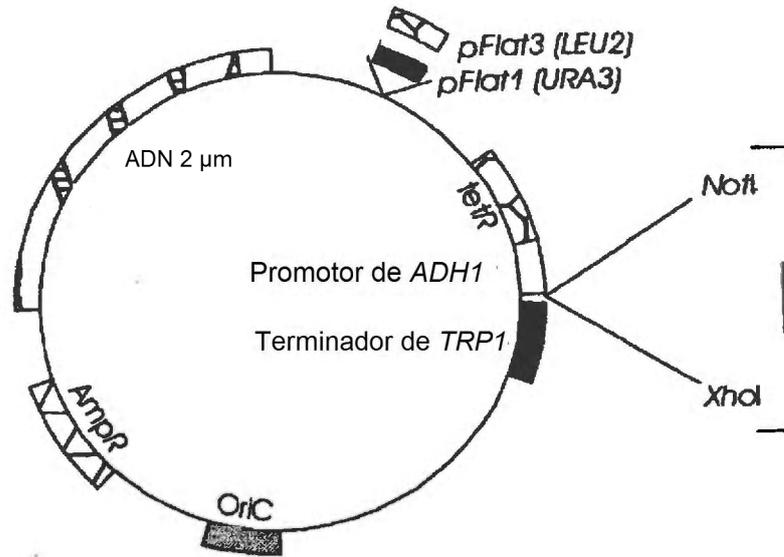


Figura 2

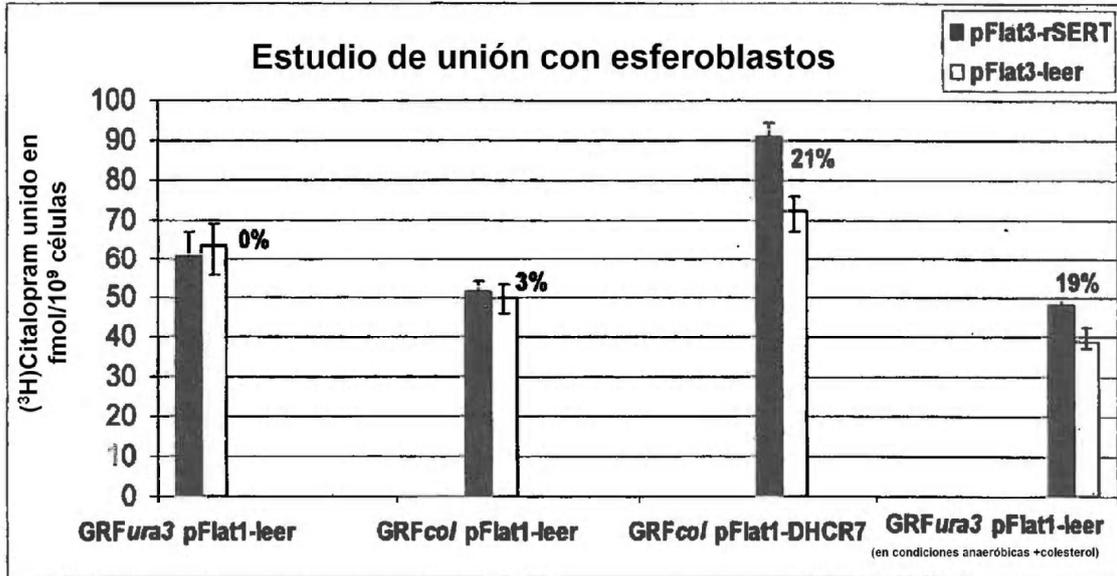


Figura 3

ATGGACCAATTGGTGAAAACCTGAAGTCACCAAG
 AAGTCTTTTACTGCTCCTGTACAAAAGGCTTCTACACCAGTTTTAACCAATAAAACAGTC
 ATTTCTGGATCGAAAGTCAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCA
 TCATCTAGTGAGGAAGATGATTCCC GCGATATTGAAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCT
 TTAGAAGAATTAGAAGCATTATTAAGTAGTGGAAATACAAAACAATTGAAGAACAAAGAG
 GTCGCTGCCTTGGTTATTCACGGTAAGTTACCTTTGTACGCTTTGGAGAAAAAATTAGGT
 GATACTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTCAATTTTGGCAGAAGCTCCT
 GTATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAATTATGACTACGACCGCGTATTTGGCGCT
 TGTTGTGAAAATGTTATAGGTTACATGCCTTTGCCCGTTGGTGTATAGGCCCTTGGTT
 ATCGATGGTACATCTTATCATATACCAATGGCAACTACAGAGGGTTGTTTGGTAGCTTCT
 GCCATGCGTGGCTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGGTGGTGCAACAACCTGTTTTAACTAAG
 GATGGTATGACAAGAGGCCAGTAGTCCGTTTCCCAACTTTGAAAAGATCTGGTGCCTGT
 AAGATATGGTTAGACTCAGAAGAGGGACAAAACGCAATTAAAAAAGCTTTTAACTCTACA
 TCAAGATTTGCACGTCTGCAACATATTCAAACCTGTCTAGCAGGAGATTTACTCTTCATG
 AGATTTAGAACAACACTACTGGTGACGCAATGGGTATGAATATGATTTCTAAAGGTGTCGAA
 TACTCATTAAAGCAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGTTGTCTCCGTT
 TCTGGTAACTACTGTACCGACAAAAACCAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTCGTGGT
 AAGAGTGTGTCGCAGAAGCTACTATTCCTGGTGATGTTGTCAGAAAAGTGTTAAAAAGT
 GATGTTCCGCATTGGTTGAGTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGATCTGCAATGGCT
 GGGTCTGTTGGTGGATTTAACGCACATGCAGCTAATTTAGTGACAGCTGTTTTCTTGGCA
 TTAGGACAAGATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTCCAACCTGTATAACATTGATGAAAGAA
 GTGGACGGTGATTTGAGAATTTCCGTATCCATGCCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGT
 GGTGGTACTGTTCTAGAACCACAAGGTGCCATGTTGGACTTATTAGGTGTAAGAGGCCCG
 CATGCTACCGCTCCTGGTACCAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCTGTGCCGTC
 TTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCCTAGCAGCCGCCATTTGGTTCAAAGTCAT
 ATGACCCACAACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAATTTGGACGCCACTGAT
 ATAAATCGTTTGAAGATGGGTCCGTCACCTGCATTAAATCCTAA