

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 369**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2012** **PCT/IB2012/000177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012** **WO12127289**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2012** **E 12703152 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 2670769**

54 Título: **R2R^{1/2} en diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

03.02.2011 EP 11250127

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2019

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN A/U LEIDEN
UNI MEDICAL CTR (50.0%)
Albinusdreef 2
9600 Leiden 2300 RC, NL y
JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AERSSSENS, JEROEN MARCEL MARIA ROGER;
VAN BREMPT, RONALD KAREL LOUISA;
PEETERS, PIETER JOHAN;
DE HOOGT, RONALD ANTHONIUS y
DE RUITER, MARCUS CORNELIS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 733 369 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

R2R^{1/2} en diagnóstico y terapia

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona nuevos genes que apoyan el desarrollo/mantenimiento de la arquitectura tridimensional refinada del pulmón, así como medicamentos y composiciones para el tratamiento de enfermedades y/o afecciones pulmonares.

10 Antecedentes de la invención

La expresión de genes del filamento intermedio (*Krt6*), EDC (complejo de diferenciación epidérmica) y SCC (complejo de genes de proteínas secretadas por el epitelio estratificado) permite la supervivencia celular en ambientes hostiles. Este perfil de expresión conduce a diferenciación escamosa y es un sello distintivo de las células epiteliales cutáneas. Los inventores descubrieron que este programa transcripcional es también vital para el refinamiento de la arquitectura pulmonar (morfogénesis de ramificación tardía): las células en las vías respiratorias distales y los vasos sanguíneos deben asumir una forma plana y adquirir flexibilidad mecánica en un ambiente rico en oxígeno. Las proteínas codificadas por el grupo de filamento intermedio y los genes asociados de EDC y SCC permiten este tipo de forma y flexibilidad celular. Al mismo tiempo, el pulmón necesita mantener células progenitoras que sean capaces de diferenciarse en células capaces de construir dichas proteínas. Estas células progenitoras o basales expresan normalmente el gen de filamento intermedio *Krt14*.

El pulmón está expuesto a grandes cantidades de tensión mecánica y oxidativa y se asemeja a la piel en este aspecto. El programa de diferenciación escamosa como se ha mencionado anteriormente es la línea principal de defensa. Las células que revisten las vías respiratorias distales y los vasos sanguíneos del pulmón deben soportar esta tensión y deben reemplazarse en caso de muerte celular por un grupo de células progenitoras. Dos patologías humanas destacan por la insuficiencia de este sistema.

1. Displasia broncopulmonar (DBP): Los pulmones de bebés, que nacen prematuramente, son más susceptibles a lesión pulmonar tal como tensión mecánica. Además, los pulmones de bebés prematuros que sobreviven a lesión pulmonar con frecuencia se curan con cicatrices significativas o displasia broncopulmonar (DBP). Estos pulmones tienen un potencial regenerativo limitado o subdesarrollado.

2. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC): Los pulmones de pacientes adultos con EPOC parecen responder inadecuadamente a estímulos nocivos tales como el tabaco. Aunque desarrollan una barrera contra estos estímulos, su falta de capacidades regenerativas en caso de muerte celular conduce a la deformación de vías respiratorias de los pulmones y vasos sanguíneos. Tanto la DBP como la EPOC conducen a morbilidad y mortalidad significativas.

El documento WO2008/067195 (SEQ ID NO: 761: n.º de referencia: GSP:ATK90136. describe un posible papel para la SEQ ID NO: 6 en la enfermedad de Crohn. El documento WO2008/112177 (SEQ ID NO: 929: n.º de referencia: GSP:AUZ53610) describe un posible papel para la SEQ ID NO: 6 en la esquizofrenia humana.

Un depósito de la base de datos Geneseq, n.º de referencia de EBI: GSN:ARC00629, con fecha del 10 de julio de 2018 (titulado "DNA fragments of a human Tox gebne, 44680") y un depósito UniProt del 3 de marzo de 2009, n.º de referencia: UNIPROT:B8A4K4 (titulado "SubName: Full=Novel protein") proporciona las SEQ ID NO: 10 y 12 respectivamente, pero sin indicación de su función o papel.

Sumario de la invención

La presente invención deriva del hallazgo de que dos genes desempeñan papeles importantes en el desarrollo de tejidos y la biología del cáncer. En particular, los inventores han descubierto que estos dos genes se expresan en células pulmonares y son necesarios para la morfogénesis de ramificación tardía del epitelio y endotelio pulmonar y apoyan el desarrollo/mantenimiento de la arquitectura tridimensional refinada del pulmón. Estos genes son esenciales en el programa de diferenciación escamosa y el desarrollo/mantenimiento del conjunto de células progenitoras (expresión de *Krt14*). Por otra parte, los inventores han identificado papeles cruciales para estos genes en la biología del cáncer, particularmente procesos asociados con la adquisición de un fenotipo inmortal y metastásico (incluyendo progresión del cáncer y metástasis) y desarrollo cardíaco.

Los inventores han determinado las secuencias de las formas murinas y humanas de estos genes. En vista de su expresión y función coordinadas como genes regenerativos para células respiratorias, los inventores han designado estos genes R2R¹ y R2R². Por simplicidad, la mayor parte de esta memoria descriptiva utilizará el término "R2R^{1/2}" que se pretende que represente la expresión más larga "R2R¹ y/o R2R²"

La invención proporciona el método *in vitro* de identificación u obtención de agentes que modulan la expresión de los genes de R2R¹ y/o R2R², como se define en las reivindicaciones 1-7,

En consecuencia, debe entenderse que las referencias al R2R^{1/2} abarcan todas las formas de mamíferos de estos genes, incluyendo, por ejemplo, formas humanas y de roedor (ratón, conejo, cobaya, rata, etc). Asimismo, además de abarcar las secuencias génicas de R2R¹ y/o R2R² completas, debe entenderse que estas designaciones también abarcan fragmentos, partes, mutantes, derivados y/u homólogos/ortólogos de cualquiera de los genes descritos en el presente documento. En este sentido, debe entenderse que el término "R2R¹" abarca la secuencia murina codificada por las secuencias de ADNc designadas 2200001115Rik o ADNc de RIKEN 2200001115, así como los siete homólogos humanos designados FAM25A, FAM25B, FAM25C, FAM25D, FAM25E, FAM25G y FAM25HP.

Además, cuando sea adecuado, el término "R2R^{1/2}" comprende los productos proteicos de los genes de R2R¹ y/o R2R² o fragmentos o porciones de los mismos.

En particular, el término "R2R^{1/2}" o de hecho cualquiera de los términos "R2R¹" o "R2R²", abarca las secuencias proporcionadas como las SEQ ID NO: 1-12 posteriores o fragmentos, partes, análogos, variantes o derivados de los mismos.

La secuencia de un transcrito ilustrativo del gen de R2R¹ murino se proporciona a continuación como SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 1

acactgacacggaccgaaggagtggaagaaagctttacctgtcactgtctgtctgcat
acgATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGCTGGCGGCCGAGGGCCTGGCCCACCGCACAGAGAAA
GCCACTGGGGGAGCAGTTCACGCAGTGGAGAGGTGGTGAGCGAGGTGGTGGGCCACGCC
AAGGAGGTGGAGAGAAGACCATTAATGACGCCCTAAAGAAAGCCCAAGAATCAGGAGAC
AGGGTGGTGAAGGAGGTCACTGAGAAGGTCAACCCACACCATCACTGATGCTGTTACCCAT
GCGGCAGAAGGCCTGGGAAGACTGGGACAGtgagcctgcctaccagcatggctggccctt
cctgaagggtcaataaagagtggtgaaacgtgaaaaaaaaaaaaaaaaataacaaaaaaaaaaa
aaaaaaaa

La parte codificada o traducida de esta secuencia está subrayada y comprende unos 267 nucleótidos. Esta parte particular de la SEQ ID NO: 1 se ha designado SEQ ID NO: 2.

Un experto en este campo apreciará que los 267 nucleótidos traducidos producen una proteína que comprende 89 aminoácidos y que tiene la siguiente secuencia (designada SEQ ID NO: 3)
SEQ ID NO: 3

MLGGLGKLAAEGLAHRTEKATGGAVHAVEEVVSEVVGHAKVGEKTINDALKKAQESGDR
VVKEVTEKVTHTITDAVTHAAEGLGRLGQ

Además, los inventores han determinado la secuencia completa de un transcrito humano ilustrativo del gen de R2R¹ y este se proporciona como SEQ ID NO: 4 a continuación:
SEQ ID NO: 4

actgtctgtctgccacacgATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGCTGGCTGCCGAAGGCCTGGCC
CACCGCACCGAGAAGGCCACCGAGGGAGCCATTCATGCCGTGGAAGAAGTGGTGAAGGAG
GTGGTGGGACACGCCAAGGAGACTGGAGAGAAAGCCATTGCTGAAGCCATAAAGAAAGCC
CAAGAGTCAGGGGACAAAAAGATGAAGGAAATCACTGAGACAGTGACCAACACAGTCACA
AATGCCATCACCCATGCAGCAGAGAGTCTGGACAAACTTGGACAGtgagtgacacctgcta
ccacggcccttccccagttctcaataaaaagccatgacatgtg

La parte codificada o traducida de esta secuencia está subrayada y comprende unos 267 nucleótidos. Esta parte particular de la SEQ ID NO: 4 se ha designado SEQ ID NO: 5.

Un experto en este campo apreciará que los 267 nucleótidos traducidos producen una proteína que comprende 89 aminoácidos y que tiene la siguiente secuencia (designada SEQ ID NO: 6)

SEQ ID NO: 6

MLGGLGKLAAEGLAHRTEKATEGAIHAVEEVVKEVVGHAKETGEKAIAEAIKKAQESGDK
KMKEITETVTNTVTNAITHAAESLDKLGQ

5

La secuencia de un transcrito ilustrativo del gen de R2R² murino se proporciona a continuación como SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO: 7

Gtgactggctgctgtctcttagttggtgaggcctcttgggatctyggcgctmacmccwtgc
tytagwgactccgatagctcccrmggctccagtgsasmcctcggkcgnggnagggaaaa
ggcacttgctggtagctctgctcaccgcactgggacctggagctggaggactaagaaga
cagacggctgctgcttgccacagcctggaccATGGACCCCCATGAGATGGTTGTGAAGAA
TCCATATGCCACATCAGCATTCCTCGGGCTCACCTGCGCTCTGACCTGGGGCAGCAGTT
AGAGGAGGTTCTTCTTCATCTTCCTCCTCTGAGACTCAGCCTCTGCCTGCAGGAACATG
TATCCCAGAGCCAGTGGGCCTCTTACAACTACTGAAGCCCCTGGGCCCCAAAGGTATCAA
GGGCATCAAGGGTACTGCTCCTGAGCACGGCCAGCAGACCTGGCAGTCACCCTGCAATCC
CTATAGCAGTGGGCAACGTCCATCGGGACTGACTTATGCTGGCCTGCCACCTGTAGGGCG
TGGTGATGACATTGCCACCACTGCTGCTGCTGCCCTTGCTGCTCCTGCTGCCACTGTCC
TCGCTTCTGCCGTTGTACAGCTGTTGTGTTATCTCCTagctgactattgaacctccagg
gctgtgcagcccagggttcctgctcaatgccaaagtgttgctggacatcaggagcagccgt
tgtcatgagcatcagccatttcctgccctgagcaggggagcctgtccaccagcgttcagc
tgtagccttctggaatagggttcagccactagccatggttggaacaacagggacaccct
tcacgtcctgcaagactttggcaataaagcaggatgagcgttgctgnncctgntgaaan
aaamwaaawacwgccgttgctcacarcygttrtggtatctmmkagstgacwattgtaamnt
ycagrgetgtrmagcccraggkksckgctcaatgccaaagtgttgmtgsmcmterggrgsr
gccaaagctttacgcggtacccgggattttttttgtacaaaaaggggccccctattagg

10

La parte codificada o traducida de esta secuencia está subrayada y comprende unos 426 nucleótidos. Esta parte particular de la SEQ ID NO: 7 se ha designado SEQ ID NO: 8.

15 Un experto en este campo apreciará que los 426 nucleótidos traducidos producen una proteína que comprende 142 aminoácidos y que tiene la siguiente secuencia (designada SEQ ID NO: 9)

SEQ ID NO: 9

MDPHEMVVKNPYAHISIPRAHLRSDLGQQLLEVPSSSSSSETQPLPAGTCIPEPVGLLQT
TEAPGPKGIGIKGTAPHEHQQTWQSPCNFYSSGQRPSGLTYAGLPPVGRGDDIAHCCC
CPCCSCCHCPRFCRCHSCCVIS

20

Además, los inventores han determinado la secuencia completa de un transcrito humano ilustrativo del gen de R2R² y este se proporciona como SEQ ID NO: 10 a continuación:

SEQ ID NO: 10

cttgaacccgggagggcagaggttgagtgagccgagatcgcgagctgcaactccagcctg
ggcaacagagcaagactccatctcagaaaagaagcagaaagcctccaagagccaatggct
ctcaagcatcttgggtctctgctaagaagaggctcagaggcttagaagccctgctcgccg
gggctttgaggtgtgtgagcaatggctggggactgcaggcccggaatctgagggcctca
ccccacttcctttccagagccgtgacctcagggtcacctcctgcccctcctctcaggcaag
ctgcagatgccctttagggcccaggccatgccccggatgtgaggggctgagtcactggtt
tggcagtgccccctcagagcccaggcctgggctgccacccacctgaggacgaggggctgggc
cagctgtcgtgctccagttgctggggcctcttgggatcttgggaaccccatctctgagcc
ccgccccATGGCCCCGCCCTCCCAAGGAGGGAAAAGGCGGCTGCCAGTCGCTCAACTCA
GGCACTGGGACCTAGAGCTCAGAAGACCGAGAGGACAGACTGCCGTGTTGCCACCACAGG
CTGGACCATGGACCCCCAAGAGATGGTCGTCAAGAACCCATATGCCACATCAGCATCCC
CCGGGCTCACCTGCGGCCTGACCTGGGGCAGCAGTTAGAGGTGGCTTCCACCTGTTCTC
ATCCTCGGAGATGCAGCCCCTGCCAGTGGGGGCCCTGTGCCCCAGAGCCAACCCACCTCTT
GCAGCCGACCGAGGTCCCAGGGCCCCAAGGGCGCCAAGGGTAACCAGGGGGCTGCCCCCAT
CCAGAACCAGCAGGCCTGGCAGCAGCCTGGCAACCCCTACAGCAGCAGTCAGCGCCAGGC
CGGACTGACCTACGCTGGCCCTCCGCCCCGCGGGGCGCGGGGATGACATCGCCCACCACTG
CTGCTGCTGCCCCCTGCTGCCACTGCTGCCACTGCCCCCCTTCTGCCGCTGCCACAGCTG
CTGCTGCTGTGTCATCTCCTagcccagcccaccctgccagggccaggaccagacttcag
caaatgtggctcacacagtgccgggacatgccgggacatgccgggtggctgttgatgg
gcgtctgccccttcacaccaggcactggggctcagacccaccaggaagggtggccggttcag

cccgagctcctgaaacggaatcccagggtcctggctggagagggacacccctgattacctt
aaggcccaggcaataaagcaggggtgatcttc

La parte codificada o traducida de esta secuencia está subrayada y comprende unos 552 nucleótidos. Esta parte particular de la SEQ ID NO: 10 se ha designado SEQ ID NO: 11.

5

Un experto en este campo apreciará que los 552 nucleótidos traducidos producen una proteína que comprende 184 aminoácidos y que tiene la siguiente secuencia (designada SEQ ID NO: 12)

SEQ ID NO: 12

MAPPLPREKAAASRSTQALGPRAQKTERTD CRVATTGWTMDPQEMVVKNPYAHISIPRA
HLRPDLGQQLVASTCSSSSEMQLPLVGPCAPEPTHLLQPTVEVPGPKGAKGNQGAAPIQN
QQAWQQPGNPYSSSRQAGLTYAGPPPAGRGDDIAHCCCCPCCHCCHCPPFCRCHSCCC
CVIS

10

Como tal, la presente divulgación se refiere a los genes codificados por las secuencias designadas como SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11, así como cualquier fragmento, parte, mutante, variante, derivado y/u homólogo/ortólogo de los mismos. Normalmente, los fragmentos, partes, mutantes, variantes, derivados y/u homólogos/ortólogos son funcionales o activos, es decir, conservan la función de los genes de R2R^{1/2} de tipo silvestre.

15

El término "mutantes" puede abarcar mutantes de origen natural o los creados artificialmente por la introducción de una o más adiciones, supresiones, sustituciones o inversiones de ácido nucleico.

Un experto en este campo entenderá fácilmente que se pueden encontrar genes homólogos de los genes de R2R^{1/2} humanos y murinos detallados anteriormente en varias especies diferentes, incluyendo, por ejemplo, otras especies de mamíferos. Los genes homólogos pueden mostrar tan poco como aproximadamente 20 o 30 % de homología o identidad de secuencia, sin embargo, en otros casos, los genes homólogos pueden mostrar al menos 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de homología con las diversas secuencias de nucleótidos proporcionadas anteriormente. Como tales, deben incluirse genes homólogos de otras especies dentro del alcance de la presente invención.

Usando las diversas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos descritas en el presente documento, un experto en la materia podría identificar fácilmente secuencias relacionadas en otras especies, tales como otros mamíferos, etc. Por ejemplo, el ácido nucleico obtenido de una especie particular se puede explorar usando las sondas descritas en el presente documento, para secuencias homólogas o estrechamente relacionadas.

Además, debería entenderse que la presente divulgación también se refiere a los productos de los genes abarcados por la presente invención y, en particular, a los péptidos codificados por las SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12. Asimismo, los fragmentos, partes, análogos, variantes, derivados de cualquiera de estas proteínas o proteínas homólogas y/o idénticas también están dentro del alcance de la presente divulgación. Normalmente, los fragmentos, partes, derivados, variantes y/u homólogos son funcionales o activos, es decir, conservan la función de la proteína R2R^{1/2} de tipo silvestre.

Además, las proteínas, polipéptidos/péptidos homólogos/idénticos a cualquiera de las proteínas codificadas por las SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12 también están dentro del alcance de la presente divulgación. Las secuencias proteicas o polipeptídicas/peptídicas que se consideran homólogas o idénticas a cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento pueden mostrar tan poco como 20 % o 30 % de identidad/homología de secuencia. Sin embargo, las secuencias homólogas/idénticas pueden ser al menos 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % homólogas o idénticas. Un fragmento puede comprender cualquier cantidad entre aproximadamente 10 y n-1 aminoácidos (donde "n" es el número de aminoácidos en la secuencia completa). Por ejemplo, un fragmento puede comprender aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 o aproximadamente 125 aminoácidos (estando el número máximo de aminoácidos determinado por el número de aminoácidos en la secuencia completa) - dichos fragmentos/partes pueden denominarse fragmentos peptídicos. Los fragmentos peptídicos pueden ser antigénicos y/o inmunogénicos, es decir, conservan la capacidad de unirse a anticuerpos que muestran especificidad, afinidad y/o selectividad para el antígeno nativo (completo), tales como los codificados por las SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12.

Un experto en este campo entenderá fácilmente que para las diversas secuencias de ácido nucleico y polipéptidos descritos en el presente documento, puede existir variaciones naturales debidas a, por ejemplo, polimorfismos, entre genes y proteínas de R2R^{1/2} aisladas de cualquier especie dada. Además, es bien conocido en la técnica que la degeneración del código genético permite la sustitución de una o más bases en un codón sin alteración de la secuencia de aminoácidos primaria. Como tal, la degeneración genética se puede aprovechar para producir secuencias de ácidos nucleicos variantes que codifican secuencias peptídicas o proteicas sustancialmente idénticas a las secuencias de antígenos descritas en el presente documento. De hecho, las secuencias variantes proporcionadas por la presente invención pueden manifestarse como proteínas y/o genes que muestran una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inversiones de aminoácidos/ácidos nucleicos en relación con una secuencia de referencia (por ejemplo, cualquiera de las secuencias descritas anteriormente).

Como tales, debe entenderse que todas estas variantes, especialmente las que son funcionales o presentan la actividad deseada, deben incluirse dentro del alcance de esta divulgación.

La divulgación se refiere a derivados de cualquiera de las secuencias de R2R^{1/2} descritas en el presente documento. El término "derivados" puede abarcar secuencias génicas o peptídicas de R2R^{1/2} que, en relación con los descritos en el presente documento, comprenden una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inversiones de aminoácidos.

Además, o como alternativa, pueden producirse análogos de los diversos péptidos descritos en el presente documento introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en la secuencia primaria. Un experto en este campo entenderá que se pretende que la expresión "sustitución conservativa" abarque el acto de reemplazar uno o más aminoácidos de una proteína o un péptido con un aminoácido alternativo con propiedades similares y que no altera de manera sustancial las propiedades fisicoquímicas y/o la estructura o función de la proteína nativa (o de tipo silvestre). El alcance de la presente divulgación también abarca análogos de este tipo.

Como es bien sabido en la técnica, la degeneración del código genético permite la sustitución de una o más bases en un codón sin cambiar la secuencia de aminoácidos primaria. En consecuencia, aunque se sabe que las secuencias descritas en la presente solicitud codifican las proteínas R2R^{1/2} descritas en el presente documento, la degeneración del código puede aprovecharse para producir secuencias de ácidos nucleicos variantes que codifican las mismas

secuencias de aminoácidos primarias.

Como se ha indicado, los presentes inventores han descubierto que los genes de $R2R^{1/2}$ (y sus productos proteicos) están implicados en acontecimientos de morfogénesis pulmonar y cardíaca (tales como señalización/transición celular, etc.) y apoyan el desarrollo de la arquitectura tridimensional del pulmón y el corazón. Como tal, la divulgación proporciona los genes de $R2R^{1/2}$ y/o proteínas $R2R^{1/2}$, para su uso como medicamentos o para su uso en el tratamiento de enfermedades que afectan al desarrollo/estructura, diferenciación, proliferación y/o morfogénesis de células/tejidos. Por ejemplo, los genes de $R2R^{1/2}$ y/o proteínas $R2R^{1/2}$ pueden ser para su uso en el tratamiento, por ejemplo, de enfermedades y/o afecciones pulmonares y/o cardíacas, así como cáncer, en particular cánceres que afectan a tejidos del sistema pulmonar o cardíaco.

La divulgación puede proporcionar los genes de $R2R^{1/2}$ y/o proteínas $R2R^{1/2}$ para su uso en la modulación de acontecimientos de transición celular, tales como, por ejemplo, acontecimientos de transición mesenquimatosas a epitelial (MET) y acontecimientos implicados en el proceso inverso, transición de mesenquimatosas a epitelial (EMT).

La divulgación proporciona los genes de $R2R^{1/2}$ y/o proteínas $R2R^{1/2}$ para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o afecciones pulmonares o su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y/o afecciones pulmonares.

La divulgación proporciona el gen y/o la proteína de $R2R^1$ para su uso en el tratamiento de enfermedades cardíacas. El gen y/o la proteína de $R2R^1$ se pueden usar para tratar enfermedades que afectan al desarrollo/estructura, diferenciación, proliferación y/o morfogénesis de células/tejidos cardíacos. La divulgación puede proporcionar el gen y/o proteína de $R2R^1$ para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o afecciones que afectan al desarrollo y/o la formación del tabique ventricular.

La divulgación proporciona el gen y/o proteína de $R2R^1$ para su uso en el tratamiento del cáncer. El gen y/o proteína de $R2R^1$ se pueden usar para tratar cánceres que afectan a diversos tejidos, incluyendo, por ejemplo, tejido pulmonar y/o cardíaco. Más en general, la divulgación puede extenderse al tratamiento de cualquier cáncer que implique procesos MET/EMT aberrantes/defectuosos. Se detallan posteriormente ejemplos de al menos algunos de los cánceres que pueden tratarse utilizando los genes y/o proteínas de la divulgación.

Se reitera que los términos " $R2R^1$ ", " $R2R^{2/2}$ " y " $R2R^{1/2}$ " abarcan no solo las secuencias génicas/peptídicas completas como se ha descrito anteriormente, sino también fragmentos, análogos, homólogos, ortólogos, variantes y derivados de los mismos.

Las expresiones "enfermedad pulmonar" o "afección pulmonar" pueden incluir patologías pulmonares tales como las que afectan al desarrollo pulmonar o la arquitectura tridimensional de los tejidos pulmonares. Por ejemplo, las "enfermedades pulmonares" pueden incluir enfermedades y/o afecciones que afectan a las células epiteliales que revisten las vías respiratorias del pulmón, las células endoteliales de la red de vasos pulmonares y/o la diferenciación y/o crecimiento de estas células. Como tales, las enfermedades pulmonares pueden incluir enfermedades que afectan a las rutas y acontecimientos de la morfogénesis pulmonar. Las enfermedades y/o afecciones pulmonares que afectan a la diferenciación de determinados tipos celulares pulmonares (por ejemplo, las células epiteliales escamosas) o la generación y/o mantenimiento de poblaciones de células progenitoras (basales) también pueden tratarse con los compuestos, medicamentos y métodos descritos en el presente documento. A modo de ejemplo específico, enfermedades tales como la displasia broncopulmonar (DBP) y/o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) pueden tratarse utilizando los compuestos descritos en el presente documento. En otras realizaciones, las expresiones "enfermedad pulmonar" o "afección pulmonar" pueden incluir la proliferación celular o trastornos neoplásicos tales como el cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y/o cáncer de pulmón microcítico (CPM).

Las expresiones "cardiopatía" o "afección cardíaca" pueden incluir patologías del corazón tales como las que afectan al desarrollo cardíaco o la arquitectura tridimensional de los tejidos cardíacos. Las cardiopatías pueden incluir enfermedades que afectan a las rutas y acontecimientos de la morfogénesis cardíaca, en particular transición de mesenquimatosas a epiteliales y de epiteliales a mesenquimatosas. A modo de ejemplo específico, enfermedades tales como defectos de tabiques auriculares y ventriculares, defectos del canal auriculoventricular, malformación de las válvulas cardíacas (auriculoventriculares) y las arterias coronarias se pueden tratar usando los compuestos descritos en el presente documento.

También debe entenderse que ya que se ha mostrado que los genes/proteínas de $R2R^{1/2}$ descritos en el presente documento desempeñan un papel en acontecimientos de morfogénesis (tales como señalización celular, etc.) y apoyan el desarrollo de la arquitectura tridimensional de tejidos complejos tales como el pulmón y/o el corazón, pueden encontrar aplicación en la medicina regenerativa. A modo de ejemplo, cuando se usan células madre (por ejemplo, células somáticas adultas, embrionarias o reprogramadas (tales como células iPS) para reparar o reconstruir, por ejemplo, tejido dañado o enfermo, las proteínas y/o genes proporcionados por la presente divulgación pueden usarse para facilitar el desarrollo del tejido.

La proteína y los genes de $R2R^{1/2}$ desempeñan un papel importante en los acontecimientos de morfogénesis del

pulmón y el corazón como filtros de la transición epitelial a mesenquimatosa y mesenquimatosa a epitelial. Por lo tanto, pueden encontrar aplicación en la biología del cáncer y el tratamiento del cáncer. A modo de ejemplo, enfermedades tales como la transformación del cáncer localizado a metástasis del cáncer pueden tratarse utilizando compuestos descritos en el presente documento.

Además de divulgar diversos usos y medicamentos que implican a los genes y/o proteínas de R2R^{1/2} descritos en el presente documento, la presente divulgación también proporciona métodos para tratar a sujetos que padecen cualquiera de las enfermedades y/o afecciones descritas en el presente documento, incluyendo cualquiera de las enfermedades y/o afecciones cardíacas/pulmonares perfiladas anteriormente. Un método para tratar una enfermedad y/o afección cardíaca/pulmonar puede comprender las etapas de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de los genes de R2R¹ y/o R2R² y/o proteínas R2R¹ y/o R2R² descritas en el presente documento.

Cuando una enfermedad o afección cardíaca o pulmonar resulta de, o está asociada con, una falta de, o defecto en, la expresión/función de genes y/o proteínas de R2R^{1/2}, el uso de un gen o proteína de R2R^{1/2} funcional como se describe en el presente documento, puede proporcionar un medio para restaurar la función del gen/proteína de R2R^{1/2} normal (o de tipo silvestre) para tratar y/o aliviar los síntomas de la enfermedad o afección.

Se apreciará que los usos, medicamentos y métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden requerir la generación de genes/proteínas de R2R^{1/2} recombinantes y, como tales, la presente divulgación contempla además métodos para generar y/o expresar genes y/o proteínas de R2R^{1/2} recombinantes. Un experto en este campo apreciará que pueden aprovecharse técnicas de PCR para obtener selectivamente secuencias génicas de R2R^{1/2} de diversas fuentes incluyendo, por ejemplo, tejido pulmonar. Estas secuencias pueden ligarse a diversas secuencias de control de la expresión o reguladoras tales como, por ejemplo, elementos promotores, operadores, inductores, potenciadores y/o silenciadores, sitios de unión a ribosomas y/o secuencias terminadoras. Los expertos en este campo pueden seleccionar secuencias reguladoras o de control de la expresión adecuadas para cualquier hospedador dado. Las secuencias génicas de R2R^{1/2} procedentes de PCR pueden introducirse en un vector (tal como un plásmido o casete de expresión). El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos de una etiqueta o marcador para ayudar en los procedimientos de purificación de proteínas.

Una célula hospedadora puede transformarse con el vector y mantenerse en condiciones adecuadas para inducir la expresión de la secuencia génica de R2R^{1/2} y producción de R2R^{1/2} recombinante. Los vectores en los que se han clonado secuencias génicas de R2R^{1/2} (o fragmentos de los mismos), pueden introducirse o transfectarse en células utilizando diversas técnicas - dichas técnicas pueden denominarse de otro modo protocolos de transfección. Los protocolos de transfección utilizan condiciones que hacen que las membranas celulares sean permeables a compuestos tales como ácidos nucleicos. A modo de ejemplo, puede ser posible facilitar la transfección de vectores, incluyendo vectores de expresión, en células usando electroporación, choque térmico, compuestos químicos tales como, por ejemplo, fosfato de calcio, fosfato de estroncio, técnicas de microinyección y/o pistolas genéticas.

Se conocen técnicas utilizadas para purificar proteínas recombinantes generadas de esta manera y, cuando la proteína recombinante está etiquetada o marcada, estas pueden incluir el uso de, por ejemplo, técnicas de cromatografía de afinidad.

En vista de lo anterior, la divulgación proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia génica de R2R^{1/2} y una célula hospedadora transformada con ella, respectivamente.

La divulgación también proporciona compuestos capaces de modular la expresión de los genes de R2R^{1/2} y que pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones que resultan de, o están asociadas con, la sobreexpresión de genes/proteínas de R2R^{1/2}. Dichos compuestos pueden ser oligonucleótidos, preferentemente oligonucleótidos antisentido que pueden tomar la forma de, por ejemplo, ADN y/o ARN. En una realización, los oligonucleótidos son moléculas de ARN conocidas por los expertos en este campo como ARN de interferencia y/o silenciador pequeño/corto y que se denominarán en lo sucesivo en el presente documento ARNip. Dichos oligonucleótidos de ARNip pueden tomar la forma de dobles cadenas de ARN nativo o dobles cadenas que se han modificado de alguna manera (por ejemplo, mediante modificación química) para que sean resistentes a la nucleasa. Además, o como alternativa, los oligonucleótidos de ARNip pueden tomar la forma de construcciones de expresión o plasmídicas de ARN en horquilla corto (ARNhp) que corresponden a, o comprenden, los ARNip descritos en el presente documento.

Los oligonucleótidos pueden diseñarse para modular la expresión de los genes de R2R^{1/2}. Analizando secuencias de R2R^{1/2} nativos o de tipo silvestre y con la ayuda de algoritmos como BIOPREDSi, un experto en la técnica podría determinar fácilmente o predecir computacionalmente secuencias de ácido nucleico que tienen un efecto de atenuación óptimo para estos genes (véase, por ejemplo: <http://www.biopredsi.org/start.html>). En consecuencia, el experto en la materia puede generar y ensayar una matriz o biblioteca de oligonucleótidos diferentes para determinar si son capaces o no de modular la expresión de los genes de R2R^{1/2}.

En vista de lo anterior, los oligonucleótidos antisentido y/o las moléculas de ARNip descritas en el presente documento pueden usarse (i) para tratar cualquiera de las enfermedades y/o afecciones descritas en el presente documento, en

particular (ii) para tratar enfermedades y/o trastornos pulmonares, (iii) para tratar enfermedades y/o afecciones cardíacas y (iv) para tratar el cáncer. Asimismo, los oligonucleótidos antisentido y/o las moléculas de ARNip descritas en el presente documento pueden usarse en la fabricación de medicamentos para tratar las enfermedades descritas como (i)-(iv) anteriores o en métodos de tratamiento de sujetos que padecen dichas enfermedades y/o trastornos.

5 Además, los anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) capaces de unirse a las proteínas R2R^{1/2} pueden ser útiles en el tratamiento de las enfermedades y/o afecciones descritas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, enfermedades y/o afecciones cardíacas y/o pulmonares. Los anticuerpos que bloquean o neutralizan la función de las proteínas R2R^{1/2} pueden ser particularmente útiles cuando una enfermedad y/o afección
10 resulta de la sobreexpresión de una proteína R2R^{1/2}. Las técnicas utilizadas para generar anticuerpos monoclonales (mAb) son bien conocidas y pueden aprovecharse fácilmente para generar mAb específicos para cualquiera de las proteínas R2R¹ y/o R2R² o fragmentos de las mismas. De forma similar, los procesos utilizados para generar anticuerpos policlonales también están bien establecidos y pueden usarse para generar anticuerpos específicos para cualquiera de las proteínas R2R¹ y/o R2R² o fragmentos de las mismas.

15 Otros compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades y/o afecciones descritas en el presente documento (por ejemplo, afecciones y/o trastornos cardíacos y/o pulmonares o cáncer) pueden incluir, por ejemplo, proteínas, péptidos, aminoácidos, carbohidratos y otras moléculas pequeñas orgánicas.

20 Además de lo anterior, se pueden usar secuencias de nucleótidos y/o proteínas de R2R^{1/2} aisladas como base para el diseño de sondas y/o cebadores para su uso en Estudios de detección y expresión *ex vivo* y/o *in situ*. Los estudios de detección típicos incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estudios de hibridación, protocolos de secuenciación y técnicas de detección inmunológica y/o de transferencia Southern/Northern.

25 En principio, cualquier polinucleótido (u oligonucleótidos) o fragmento polipeptídico diseñado a partir de las secuencias descritas anteriormente puede usarse en dichos estudios de detección y/o expresión.

Normalmente, fragmentos de polinucleótidos para su uso como sondas y/o cebadores, comprenderán 10-30 nucleótidos (aunque otras longitudes pueden ser útiles para determinadas aplicaciones) y mostrarán un grado de especificidad para una secuencia particular y no se unirán a secuencias no relacionadas. De forma similar, los fragmentos de polipéptidos para usar como sondas también pueden ser relativamente cortos y normalmente pueden comprender 5-20 aminoácidos (aunque otras longitudes ligeramente más cortas o más largas pueden ser útiles para algunas aplicaciones).

35 Se entenderá fácilmente que la selección cuidadosa de la secuencia de cebador/sonda y el uso de condiciones de hibridación rigurosas (preferentemente altamente rigurosas) minimizará cualquier unión no selectiva.

En consecuencia, las secuencias de cebadores y/o sondas oligonucleotídicas que tienen al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 90 % o al menos 95 % de complementariedad, así como los que tienen complementariedad exacta (es decir, 100 %) con todas o parte de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento deben considerarse como incluidos dentro de esta divulgación.

45 La hibridación entre una sonda/cebador y una secuencia de ácido nucleico (tal como cualquiera descrita en el presente documento) puede efectuarse a una temperatura de aproximadamente 40 °C-75 °C en 2-6 x SSC (es decir, 2-6 x NaCl 17,5 g/l y citrato de sodio (CS) a 8,8 g/l) de solución salina tamponada que contiene 0,1 % de dodecilsulfato de sodio (SDS). Por supuesto, dependiendo del grado de similitud entre la sonda/cebador y la secuencia, tampones con una concentración de SSC reducida (es decir, 1xSSC que contiene SDS al 0,1 %, 0,5xSSC que contiene SDS al 0,1 % y 0,1xSSC que contiene SDS al 0,1 %).

50 Las sondas polipeptídicas que tengan al menos 30 %, 50 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad, así como las que tengan identidad exacta (es decir, 100 % de identidad) con todas o parte de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, deben considerarse dentro del alcance de esta divulgación.

Como tal, un aspecto adicional de esta divulgación proporciona sondas oligonucleotídicas y/o cebadores diseñados para hibridar con todas o parte de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1; 2; 4; 5; 7; 8; 10 y 11. Además, un aspecto adicional proporciona sondas polipeptídicas diseñadas para unirse con todas o parte de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3; 6; 9 y 12

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o afección pulmonar y/o susceptibilidad a la misma, en donde el método comprende determinar si los genes de R2R¹ y/o R2R² en un sujeto se expresan de forma aberrante.

Los sujetos que se ha diagnosticado que padecen, por ejemplo, cáncer y/o una enfermedad y/o afección cardíaca y/o pulmonar pueden mostrar expresión de genes/proteínas de R2R¹ y/o R2R² aberrante (es decir, aumentada o disminuida). Debe entenderse que la expresión "expresión aberrante" abarca niveles de expresión génica que están aumentados y/o disminuidos con respecto a la expresión observada en una muestra procedente de un sujeto sano o

un sujeto que no padece las enfermedades y/o afecciones (a saber, una enfermedad y/o afección cardíaca o pulmonar o cáncer).

Debe entenderse que el término "muestra" incluye muestras de líquidos corporales tales como sangre completa, plasma, suero, saliva, sudor y/o semen. En otros casos, se pueden usar "muestras" tales como biopsias y/o raspados de tejido. En particular, se pueden usar biopsias y/o raspados de tejido pulmonar. Además, una muestra puede comprender una secreción de tejido o glándula y se pueden usar protocolos de lavado para obtener una muestra de líquido secretado en, por ejemplo, el pulmón. Los protocolos de lavado adecuados pueden incluir procedimientos de lavado broncoalveolar. Un experto en este campo apreciará que las muestras descritas anteriormente pueden producir cantidades de ácido nucleico de $R2R^{1/2}$ (es decir, ADN o ARN) y/o proteínas $R2R^{1/2}$, péptidos (o fragmentos de los mismos). Asimismo, estos métodos pueden comprender la primera etapa de proporcionar una muestra de un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad y/o afección pulmonar o que puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o afección pulmonar.

Un aumento en el nivel de expresión de genes/proteínas de $R2R^1$ y/o $R2R^2$ puede estar asociado con cualquiera de las enfermedades y/o afecciones descritas anteriormente o a susceptibilidad las mismas. Por ejemplo, un aumento en la expresión de genes/proteínas de $R2R^{1/2}$ puede ser indicativo de proliferación y/o diferenciación celular excesiva, y puede estar asociado con, por ejemplo, una afección neoplásica tal como el cáncer (es decir, cáncer de pulmón). Las disminuciones en la expresión de genes/proteínas de $R2R^1$ y/o $R2R^2$ pueden ser indicativas de afecciones patológicas caracterizadas por desarrollo cardíaco/pulmonar escaso o alterado. Dichas afecciones pueden dar como resultado lesión tisular (debido a tensiones mecánicas que actúan dentro del corazón/pulmón), formación de cicatrices, pérdida de la integridad estructural del corazón/pulmón y vías respiratorias pulmonares o estructura cardíaca deformadas o dañadas.

Un experto en la materia estará familiarizado con las técnicas que pueden usarse para identificar niveles de proteínas y/o genes, tales como los genes y/o proteínas de $R2R^{1/2}$, en muestras tales como las enumeradas anteriormente.

Dichas técnicas pueden incluir, por ejemplo, técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR en tiempo real (también conocida como PCR cuantitativa). En el presente caso, la PCR en tiempo real puede usarse para determinar el nivel de expresión de los genes que codifican las proteínas $R2R^1$ y/o $R2R^2$. Normalmente, y para cuantificar el nivel de expresión de una secuencia particular de ácido nucleico, se puede usar PCR con transcriptasa inversa para transcribir de forma inversa el ARNm relevante a ADN complementario (ADNc). Preferentemente, el protocolo de transcriptasa inversa puede usar cebadores diseñados para amplificar específicamente una secuencia de interés de ARNm. En lo sucesivo, la PCR se puede usar para amplificar el ADNc generado por transcripción inversa.

Normalmente, el ADNc se amplifica utilizando cebadores diseñados para hibridar específicamente con una determinada secuencia y los nucleótidos utilizados para PCR pueden marcarse con compuestos fluorescentes o radiomarcados.

Un experto en la materia estará familiarizado con la técnica de usar nucleótidos marcados para permitir la cuantificación de la cantidad de ADN producido durante una PCR. Brevemente, y a modo de ejemplo, la cantidad de ácido nucleico amplificado marcado puede determinarse supervisando la cantidad de nucleótido marcado incorporado durante el ciclo de la PCR.

Puede encontrarse información adicional acerca de las técnicas basadas en PCR descritas en el presente documento en, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual, Segunda edición editada por Carl W. Dieffenbach y Gabriela S. Dveksler: Cold Spring Harbor Laboratory Press y Molecular Cloning: A Laboratory Manual de Joseph Sambrook y David Russell: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Otras técnicas que pueden usarse para determinar el nivel de expresión génica de $R2R^1$ y/o $R2R^2$ en una muestra incluyen, por ejemplo, técnicas de transferencia Northern y/o Southern. Se puede usar una transferencia Northern para determinar la cantidad de un ARNm particular presente en una muestra y, como tal, podría usarse para determinar la cantidad de expresión génica de $R2R^1$ y/o $R2R^2$. En resumen, puede extraerse ARNm de, por ejemplo, un sistema basado en células o sin células modificado para incluir genes de $R2R^1$ y/o $R2R^2$ expresables utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia y someterse a electroforesis. Una sonda de ácido nucleico, diseñada para hibridar con (es decir, complementaria de) una secuencia de ARNm de interés, en este caso el ARNm que codifica las proteínas $R2R^1$ y/o $R2R^2$, puede usarse después para detectar y cuantificar la cantidad de un ARNm particular presente en una muestra.

Además, o como alternativa, un nivel de expresión génica de $R2R^1$ y/o $R2R^2$ se puede identificar por medio de análisis de micromatrices. Dicho método implicaría el uso de una micromatriz de ADN que comprende ácido nucleico procedente de genes de $R2R^1$ y/o $R2R^2$. Para identificar el nivel de expresión génica de $R2R^1$ y/o $R2R^2$, un experto en la técnica puede extraer el ácido nucleico, preferentemente el ARNm de un sistema (basado en células o sin células) y someterlo a un protocolo de amplificación tal como, PCR de transcriptasa inversa para generar ADNc. Preferentemente, se pueden utilizar cebadores específicos para una determinada secuencia de ARNm, en este caso

las secuencias que codifican los genes de R2R¹ y/o R2R².

El ADNc de R2R¹ y/o R2R² amplificado puede someterse a una etapa de amplificación adicional, opcionalmente en presencia de nucleótidos marcados (como se ha descrito anteriormente). En lo sucesivo, el ADNc amplificado

opcionalmente marcado puede ponerse en contacto con la micromatriz en condiciones que permitan la unión con el ADN de la micromatriz. De esta manera, puede ser posible identificar un nivel de expresión génica de R2R¹ y/o R2R².

Puede encontrarse más información acerca de las técnicas descritas anteriormente en, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual, Segunda edición editada por Carl W. Dieffenbach y Gabriela S. Dveksler: Cold Spring Harbor Laboratory Press y Molecular Cloning: A Laboratory Manual de Joseph Sambrook y David Russell: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Para determinar el nivel de proteínas R2R^{1/2} en una muestra, se pueden usar técnicas inmunológicas que aprovechan agentes capaces de unirse con proteínas R2R^{1/2}.

En una realización, los métodos de diagnóstico descritos anteriormente pueden comprender la etapa de poner en contacto un sustrato (o parte del mismo) con una muestra para ensayar, en condiciones que permiten la asociación, interacción, unión y/o inmovilización de cualquier proteína R2R^{1/2} presente en la muestra, con dicho sustrato.

Los sustratos adecuados pueden incluir, por ejemplo, vidrio, nitrocelulosa, papel, agarosa y/o plásticos. Un sustrato tal como, por ejemplo, un material plástico, puede tomar la forma de una placa de microtitulación.

Como alternativa, el sustrato que va a entrar en contacto con la muestra para ensayar puede comprender un agente capaz de unirse con proteína(s) R2R^{1/2}. Preferentemente, el agente capaz de unirse con las proteínas R2R^{1/2} está unido al sustrato (o al menos una parte del mismo). Los agentes de unión adecuados pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales o policlonales y/u otros tipos de péptidos o moléculas pequeñas capaces de unirse a las proteínas R2R^{1/2}. Debe entenderse que esta definición se aplica a todos los tipos de agentes de unión mencionados en el presente documento. Como tal, el sustrato (o una parte del mismo) puede ponerse en contacto con la muestra para ensayar en condiciones que permitan la unión o interacción entre los agentes capaces de unirse con la proteína R2R^{1/2} y cualquier proteína R2R^{1/2} presente en la muestra.

Cualquier proteína R2R^{1/2} unida al sustrato o agentes capaces de unirse a la(s) proteína(s) R2R^{1/2}, puede detectarse con el uso de un agente adicional capaz de unirse a la(s) proteína(s) R2R^{1/2} (denominadas en lo sucesivo en el presente documento "agente de unión primario"). Además, o como alternativa, los agentes de unión primarios pueden tener afinidad por, o unirse a, proteína R2R¹/R2R²: complejos de sustrato o complejos que comprenden las proteínas R2R^{1/2} y los agentes anteriormente mencionados capaces de unirse a las proteínas R2R^{1/2}.

Los agentes de unión primarios pueden conjugarse con restos que permiten que se detecten (denominados en lo sucesivo "restos detectables"). Por ejemplo, los agentes primarios pueden conjugarse con una enzima capaz de indicar un nivel mediante una reacción quimioluminiscente colorimétrica. Dichas enzimas conjugadas pueden incluir, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AlkP). Además, o como alternativa, los agentes de unión primarios pueden conjugarse con una molécula fluorescente tal como, por ejemplo un fluoróforo, tal como FITC, rodamina o Texas Red. Otros tipos de moléculas que pueden conjugarse con agentes de unión incluyen restos radiomarcados.

Como alternativa, cualquier proteína R2R^{1/2} unida al sustrato o agentes capaces de unirse a las proteínas R2R^{1/2}, puede detectarse por medio de un agente de unión adicional más (denominado en lo sucesivo en el presente documento "agentes de unión secundarios") que tiene afinidad por los agentes de unión primarios. Preferentemente, los agentes de unión secundarios se conjugan con restos detectables.

La cantidad de agente de unión primario (o agente de unión secundario unido al mismo) unido a proteína(s) R2R^{1/2}, puede representar el nivel de proteína(s) R2R^{1/2} presentes en la muestra ensayada.

En una realización, los métodos para identificar un nivel de proteína R2R^{1/2}, puede tomar la forma de ensayo de "tira reactiva", en el que un sustrato (o parte del mismo) se pone en contacto con una muestra para ensayar en condiciones que permitan la unión de cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente en la muestra al sustrato o un agente de unión unido o inmovilizado con el mismo.

En una realización adicional, los métodos pueden tomar la forma de un ensayo inmunológico tal como, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Un ELISA puede tomar la forma de un ELISA de "captura" en donde una muestra para ensayar se pone en contacto con un sustrato y cualquier proteína(s) R2R^{1/2} proteínas presente en la muestra es/son "capturada(s)" o está(n) unida(s) con un agente de unión (capaz de unirse a las proteínas R2R^{1/2}) unido o inmovilizado con el sustrato. Como alternativa, la muestra se puede poner en contacto con el sustrato en condiciones que permitan la unión "directa" entre cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra y el sustrato.

Cada uno de los métodos de ELISA descritos anteriormente puede comprender una etapa de detección de proteínas R2R^{1/2} "directa" o una etapa de identificación "indirecta". Los ELISA que implican dichas etapas pueden conocerse como ELISA "directos" o ELISA "indirectos".

5 Un ELISA "directo" puede implicar poner en contacto la muestra para ensayar con un sustrato en condiciones que permitan la unión de cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra al sustrato y/o un agente de unión unido al mismo. Después de una etapa de bloqueo opcional, se pueden detectar proteína(s) R2R^{1/2} unidas por medio de un agente capaz de unirse a las proteínas R2R^{1/2} (es decir, un agente de unión primario). Preferentemente, los agentes de unión primarios se conjugan con un resto detectable.

10 Un ELISA "indirecto" puede comprender la etapa adicional de, después de poner en contacto la(s) proteína(s) R2R^{1/2} con un agente de unión primario, utilizar un agente de unión adicional (agente de unión secundario) con afinidad o especificidad por el agente de unión primario. Preferentemente, el agente de unión secundario puede conjugarse con un resto detectable.

15 Otras técnicas inmunológicas que pueden usarse para identificar un nivel de proteína R2R^{1/2} en una muestra incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica en donde los agentes de unión, tales como anticuerpos capaces de unirse a la(s) proteína(s) R2R^{1/2}, se ponen en contacto con una muestra, preferentemente una muestra tisular, en condiciones que permitan la unión entre cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra y el agente de unión a proteínas R2R^{1/2}.
20 Normalmente, antes de poner en contacto la muestra con el agente de unión, la muestra se trata con, por ejemplo, un detergente tal como Triton X100. Dicha técnica puede denominarse tinción inmunohistoquímica "directa".

Como alternativa, la muestra para ensayar puede someterse a un protocolo de tinción inmunohistoquímica indirecta en donde, después de haberse puesto en contacto la muestra con un agente de unión a proteínas R2R^{1/2}, un agente de unión adicional (un agente de unión secundario) que es específico para, tiene afinidad por o es capaz de unirse al agente de unión a proteínas R2R^{1/2}, se utiliza para detectar complejos de proteínas R2R^{1/2}/agentes de unión.

25 El experto entenderá que en las técnicas de inmunohistoquímica tanto directa como indirecta, el agente de unión o agente de unión secundario puede conjugarse con un resto detectable. Preferentemente, el agente de unión o agente de unión secundario se conjuga con un resto capaz de indicar un nivel de agente de unión o agente de unión secundario unido, mediante una reacción quimioluminiscente colorimétrica.

30 Para identificar los niveles de proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra, se pueden comparar los resultados de una tinción inmunohistoquímica con los resultados de una tinción inmunohistoquímica realizada en una muestra de referencia. A modo de ejemplo, una muestra que revela más o menos agente de unión (o agente de unión secundario) a proteínas R2R^{1/2} unido que en una muestra de referencia, puede haber sido proporcionada por un sujeto con una enfermedad y/o afección particular.

35 Otras técnicas que aprovechan el uso de agentes capaces de unirse a las proteínas R2R^{1/2} incluyen, por ejemplo, técnicas tales como transferencia Western o transferencia puntual. Una transferencia Western puede implicar someter una muestra a electroforesis para separar o resolver los componentes, por ejemplo los componentes proteicos, de la muestra. Los componentes resueltos pueden después transferirse a un sustrato, tal como nitrocelulosa. Para identificar cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra, el sustrato puede ponerse en contacto con un agente de unión capaz de unirse a proteína(s) R2R^{1/2} en condiciones que permiten la unión entre cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra y los agentes capaces de unirse a proteína(s) R2R^{1/2}.
45

Provechosamente, los agentes capaces de unirse a proteína(s) R2R^{1/2} pueden conjugarse con un resto detectable.

50 Como alternativa, el sustrato puede ponerse en contacto con un agente de unión adicional que tenga afinidad por el/los agente(s) de unión capaz(es) de unirse a proteína(s) R2R^{1/2}. Provechosamente, el agente de unión adicional puede conjugarse con un resto detectable.

55 En el caso de una transferencia puntual, la muestra o una parte de la misma, puede ponerse en contacto con un sustrato de modo que cualquier proteína(s) R2R^{1/2} presente(s) en la muestra esté(n) unida(s) o inmovilizada(s) sobre el sustrato. Puede realizarse identificación de cualquier proteína(s) R2R^{1/2} unida(s) o inmovilizada(s) como se ha descrito anteriormente.

60 En cualquiera de las técnicas anteriormente mencionadas, la cantidad de agente de unión primario o secundario detectado es representativa de, o proporcional a, la cantidad de proteína R2R^{1/2} presente en la muestra. Asimismo, los resultados obtenidos de cualquiera o todos los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden compararse con los resultados obtenidos de muestras de referencia o control procedentes de sujetos sanos que se sabe que no padecen, o son susceptibles a, una enfermedad o trastorno particular (tal como, por ejemplo, una enfermedad o trastorno cardíaco y/o pulmonar y/o cáncer).

65 La invención proporciona un método de identificación u obtención de agentes que modulan la expresión de los genes de R2R¹ y/o R2R², comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto los genes de R2R¹ y/o R2R² con un

agente de ensayo y detectar cualquier modulación de la expresión génica de R2R^{1/2}.

Un experto en este campo apreciará que un método para identificar u obtener agentes que modulan la expresión de los genes de R2R¹ y/o R2R² puede realizarse en sistemas tales como, por ejemplo, sistemas basados en células o

libres de células, modificados para incluir los genes de R2R¹ y/o R2R². A modo de ejemplo, las células pueden transfectarse con ácido nucleico que comprende el gen de R2R¹ o R2R². En una realización, el ácido nucleico puede tomar la forma de un vector (por ejemplo, un plásmido o casete de expresión como se ha descrito anteriormente).

En una realización, los resultados obtenidos a partir de los métodos descritos anteriormente pueden compararse con los obtenidos a partir de un método de control en el que los genes de R2R¹ y/o R2R² no han entrado en contacto con un agente de ensayo. De esta manera, puede ser posible determinar si dicho agente es capaz o no de modular la expresión de los genes de R2R¹ y/o R2R². Cuando el nivel de expresión génica de R2R¹ y/o R2R² es menor o mayor que el nivel de expresión detectado en el método de control, el agente de ensayo puede ser útil como un modulador de la expresión génica de R2R¹ y/o R2R². Cuando el nivel de expresión es el mismo que el observado en los métodos de control, es muy probable que el agente de ensayo no sea capaz de modular la expresión de los genes de R2R¹ y/o R2R².

Los agentes de ensayo adecuados pueden tomar la forma de ácidos nucleicos, por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido descritos anteriormente, proteínas, péptidos, aminoácidos, anticuerpos (y fragmentos de los mismos), carbohidratos y otras moléculas pequeñas orgánicas.

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los genes/proteínas de R2R^{1/2} descritos anteriormente, oligonucleótidos antisentido (ADN o ARN) como se describe en el presente documento y/o cualquiera de los agentes identificados por los métodos de la presente invención y que son capaces de modular la expresión o función de los genes/proteínas de R2R¹ y/o R2R², en asociación con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden encontrar aplicación en, por ejemplo, el tratamiento de las diversas enfermedades y/o afecciones descritas en el presente documento incluyendo las enfermedades cardíacas y/o pulmonares y/o cánceres descritos anteriormente.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente divulgación se formulan como composiciones farmacéuticas estériles. Los excipientes, vehículos o diluyentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, sales de agua o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polipropileno, polietilenglicol y lanolina y similares, o combinaciones de los mismos.

Dicha formulación farmacéutica puede formularse, por ejemplo, en una forma adecuada para administración oral, parenteral o tópica. En una realización, la composición farmacéutica puede formularse de manera que pueda inhalarse. Las composiciones que deben administrarse por inhalación pueden tomar la forma de polvos finos o soluciones que se pueden aerosolizar e inhalar como gotas. Un experto en este campo estará familiarizado con dispositivos que pueden usarse para administrar composiciones directamente al pulmón mediante, por ejemplo, inhalación. El tamaño de gota o partícula de la composición se pueden alterar de manera que el fármaco pueda acceder a diferentes regiones del pulmón. Por ejemplo, una vez inhaladas, las partículas pequeñas o gotas pueden penetrar profundamente en el tejido pulmonar y, en algunos casos, pueden alcanzar los alvéolos.

Las composiciones farmacéuticas formuladas para administración tópica pueden presentarse como una pomada, solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua.

Los compuestos capaces de modular los genes de R2R¹ y/o R2R², tales como, por ejemplo, los identificados por los métodos descritos en el presente documento o los fragmentos de genes/proteínas de R2R^{1/2}, oligonucleótidos antisentido y anticuerpos descritos en el presente documento, pueden encontrar aplicación adicional como moduladores de la diferenciación celular. Como se ha indicado, los inventores han determinado que los genes de R2R¹ y R2R² y sus productos están implicados en las rutas que modulan la diferenciación de células epiteliales pulmonares, en particular las células epiteliales escamosas generadas a partir del progenitor epitelial pulmonar o la población de células basales (es decir, células *Krt14*⁺^{vo}).

Los compuestos que modulan la diferenciación celular (por ejemplo, células epiteliales pulmonares) pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de trastornos tales como DBP que producen pulmones dañados y cicatrizados con un potencial regenerativo reducido o subdesarrollado. Como tal, administrando o usando un compuesto que modula la diferenciación celular, puede ser posible mejorar o restaurar el potencial regenerativo del pulmón. Un experto en este campo entenderá fácilmente que los compuestos capaces de mejorar o promover la expresión génica de R2R¹ y/o R2R² o que restauran la función de estos genes pueden ser particularmente útiles.

La divulgación proporciona un modelo animal para estudiar el desarrollo tisular y/o los acontecimientos de transición celular, así como determinadas enfermedades y/o afecciones (incluyendo enfermedades y/o afecciones cardíacas y/o pulmonares y el cáncer). En una realización, el modelo animal puede generarse manipulando o modulando (es decir, regulando positiva o negativamente) la expresión de los genes/proteínas de $R2R^{1/2}$. Además, o como alternativa, se puede generar un modelo animal alterando la expresión génica de $R2R^{1/2}$. Como se ha descrito anteriormente, la divulgación de varias secuencias génicas/proteicas de $R2R^{1/2}$ humanas y murinas en el presente documento asegura que el experto en la materia podría manipular/modular fácilmente estas secuencias *in situ* para generar modelos animales. Por ejemplo, se pueden crear animales "nuligénicos", es decir, la expresión de secuencias génicas de $R2R^{1/2}$ se reduce o elimina sustancialmente. Dichos modelos son útiles para ensayar los efectos de fármacos potencialmente útiles en el tratamiento de las enfermedades y/o trastornos descritos en el presente documento y/o para determinar la función o el papel de un gen en particular. Como alternativa, También se pueden crear modelos animales en los que la expresión de los genes/proteínas de $R2R^{1/2}$ está regulada positivamente. De esta manera, puede ensayarse la eficacia y función de fármacos dirigidos a suprimir la expresión de genes/proteínas de $R2R^{1/2}$ regulada positivamente. También es posible investigar el efecto de la expresión de proteínas génicas de $R2R^{1/2}$ regulada positivamente en estos animales.

En otras realizaciones, se pueden introducir sustituciones, adiciones, supresiones y/o inversiones en las secuencias génicas de $R2R^{1/2}$ para efectuar cambios en la actividad de las proteínas y ayudar a dilucidar la función de determinados dominios, aminoácidos y similares. Además, o como alternativa, los animales nuligénicos, tales como los descritos anteriormente, pueden

transformarse con cualquiera de las secuencias génicas descritas en el presente documento. Esto es particularmente útil cuando va a investigarse el efecto de un gen de $R2R^{1/2}$ variante o mutado o eficacia de un fármaco o compuesto capaz de suprimir la expresión o función de dicha variante o secuencia mutada.

Descripción detallada

La presente divulgación se describirá a continuación en detalle con referencia a las siguientes Figuras que muestran:

Figura 1. Comparación de células endoteliales y epiteliales de *Vegf*^{+/+} en E16.5. Diagrama en volcán que muestra en el eje y la significancia de cada gen cuando se ensaya para determinar el efecto del origen celular (basado en LIMMA). El eje x muestra el factor de cambio al comparar los 2 tejidos. Las células Ker⁺ expresan genes epiteliales arquetípicos, mientras que las células *il*⁺ transcriben genes endoteliales representativos. Se destacan *Cldn5* endotelial y *Foxa1* epitelial porque ambos también estaban presentes como genes principales en el eje Y (PC₂) del análisis del mapa espectral no supervisado (véase Fig. 3).

Figura 2. Representación esquemática del proceso de microdissección de captura de láser. Se cortaron tórax embrionarios (A) en secciones de 8 mm y se colocaron en portaobjetos (B). La doble tinción inmunohistoquímica en estas secciones tisulares (C) con anti-'pan' queratina e isolectina GS-IB4 separó células de las vías respiratorias pulmonares separadas con epitelio (D) distintivo de las células circundantes con características endoteliales (E). Se muestran grupos celulares específicos aislados por microdissección de captura de láser en F y G. (P = pulmón, C = corazón).

Figura 3. Análisis del mapa espectral con el primer componente principal (PC1 en el eje X) y el segundo componente principal (PC2 en el eje Y). El efecto temporal o la edad embrionaria se descubrieron en PC1 (responsable del 35 % de la variación en el conjunto de datos). Se ubicaron sondas génicas de genes expresados posteriormente en la vida embrionaria como *Sftpc* más adelante en el eje X. Se encontró diferencia en el origen celular (células *il*⁺ frente a *ker*⁺) en PC2. Se ubicaron sondas génicas de genes epiteliales ('EPI') más adelante en el eje Y en contraste con las sondas génicas de las familias de genes endoteliales ('ENDO'). Los diferentes grupos de muestras se separaron en el mapa espectral a lo largo de PC1 (edad embrionaria) y PC2 (origen celular). Las muestras Ker⁺ se acumularon en el lado epitelial del eje Y, y las muestras *il*⁺ se agruparon en el lado endotelial. Las muestras también se distribuyeron a lo largo del eje X según su edad embrionaria. Las muestras de días embrionarios posteriores se ubicaron más adelante en el eje X. El panel de abajo muestra 3 perfiles de expresión: (1) que muestra la diferencia entre células epiteliales y endoteliales para expresión de *Foxa1*, (2) que muestra el efecto de la edad embrionaria para expresión de *Afp* y (3) que muestra el perfil dependiente de genotipo sobre la edad embrionaria para expresión de *Hmr*.

Figura 4. Comparación de células epiteliales de genotipos *Vegf*^{+/+} y *Vegf*^{120/120}. A. Diagrama en volcán que muestra en el eje y la significancia de cada gen para ensayar si el perfil de expresión sobre la edad embrionaria difiere entre Genotipos *Vegf*^{+/+} y *Vegf*^{120/120} (basados en LIMMA). El eje x muestra el factor de cambio en la inducción al comparar los 2 genotipos, *Vegf*^{+/+} frente a *Vegf*^{120/120} en E16.5. La regulación positiva de genes *Krt6a*, EDC y SCC en *ker*⁺ de tipo silvestre está destacada. B. Células epiteliales de las vías respiratorias en Pulmones E16.5 *Vegf*^{+/+} definidos por tinción anticitoqueratina 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18. Las células de las vías respiratorias distales desarrollan una morfología de células planas o escamosas (flecha amarilla) en contraste con sus vecinas proximales (flecha blanca) C. Asignación de la expresión diferencial a lo largo del cromosoma 3. Esto destaca la regulación negativa de los genes en la EDC de *Vegf*^{120/120} en comparación con el tipo silvestre.

Figura 5A. IF = grupo de queratinas de filamentos intermedios (rojo) que se anclan al desmosoma (naranja) que contiene Dsc1. Pkp1 (morado) une filamentos de queratina intermedios a proteínas de cadherina de la unión de tipo adherente (amarillo). Pkp1 también regula el contenido de proteínas del desmosoma. Los genes agrupados

de EDC y SCC interactúan con las queratinas de filamentos intermedios. El asterisco destaca los genes regulados positivamente y grupos de genes en la red de filamentos intermedios. La regulación positiva de *Eps8/1* (que codifica una proteína de adición terminal de actina) coordina el filamento intermedio con remodelación de actina.

B. Diagrama en volcán que muestra en el eje y la significancia de cada gen para ensayar si el perfil de expresión sobre la edad embrionaria difiere entre células endoteliales de genotipos *Vegf*^{+/+} y *Vegf*^{120/120} (basados en LIMMA). El eje x muestra el factor de cambio en la inducción al comparar los 2 genotipos, *Vegf*^{+/+} frente a *Vegf*^{120/120} en E16.5. Se destacan los genes agrupados de *Krt*, *Dsc1*, *Pkp1*, EDC y SCC. Los genes *Krt* regulados positivamente en células *Vegf*^{+/+} *il*⁺ y de tipo silvestre difieren de los genes *Krt* expresados en las células *ker*⁺ de tipo silvestre equivalentes. *Krt14* y *Krt1* son genes de células basales de marca registrada.

C. Imagen inmunofluorescente (aumento 40 x) de células de tinción con isolectina GS-IB4 (células *il*⁺) en pulmones embrionarios de tipo silvestre E16.5. Las células *il*⁺ siguen el mismo patrón arquitectónico de las células *ker*⁺ de las vías respiratorias distales.

Figura 6. Diagrama en volcán basado en el análisis LIMMA del grupo de células que se tiñen con anti-citoqueratina 4-5-6-8-10-13-18. (Modelos lineales para datos de micromatrices: las diferencias entre los compañeros de camada con desactivación de *Vegf*^{120/120} y de tipo silvestre en los perfiles de expresión sobre la edad embrionaria se ensayaron a través de una interacción bidireccional del genotipo de *Vegf* y el tiempo). Se destacan el gen de ADNc RIKEN 2200001115 y el gen de ADNc de RIKEN 2310002J15.

Figura 7. Diagrama en volcán basado en el análisis LIMMA del grupo de células de unión a GS-IB4. (Modelos lineales para datos de micromatrices: las diferencias entre los compañeros de camada con desactivación de *Vegf*^{120/120} y de tipo silvestre en los perfiles de expresión sobre la edad embrionaria se ensayaron a través de una interacción bidireccional del genotipo de *Vegf* y el tiempo). Se destacan el gen de ADNc RIKEN 2200001115 y el gen de ADNc de RIKEN 2310002J15.

Figura 8: Alineamientos de secuencias de ADNc del transcrito de hR4RA humano (= R2R¹ humano) frente a transcrito de R4Ra de ratón (= R2R¹ de ratón). Cabe señalar que el mayor contig construido a partir de clones de genes de ADNc de RIKEN 2200001115 se denomina 'transcrito de R4Ra de ratón (= R2R¹ de ratón)'.

Figura 9: Alineamientos de secuencias proteicas del transcrito de hR4RA humano traducido (= R2R¹ humano) frente a transcrito de R4Ra de ratón traducido (= R2R¹ de ratón).

Figura 10: Alineamientos de secuencias de ADNc del transcrito de hR4RD humano (= R2R² humano) frente a transcrito de R4Rd de ratón (= R2R² de ratón). Cabe señalar que el mayor contig construido a partir de clones de genes de ADNc de RIKEN 2310002J15 se denomina 'transcrito de R4Rd de ratón (= R2R² de ratón)'.

Figura 11: Alineamientos de secuencias proteicas del transcrito de hR4RD humano traducido (= R2R² humano) frente a transcrito de R4Rd de ratón traducido (= R2R² de ratón).

Figura 12: VEGF-A (regulación positiva dependiente de VEGF¹⁶⁴ de R2R¹ en el septo ventricular en desarrollo del embrión de ratón. Rojo = tipo silvestre, azul = ratón con desactivación de VEGF^{120/120}, que carece de la isoforma VEGF¹⁶⁴.

Figura 13: Expresión de homólogo de R2R² humano (=C9orf196) a lo largo del tiempo (24 - 72 h) en células epiteliales pulmonares primarias de adultos humanos.

Figura 14: La atenuación de ARNip de VEGF¹⁶⁵ conduce a la atenuación de los genes responsables del programa de células basales y del programa de diferenciación escamosa. La atenuación de ARNip en células epiteliales bronquiales primarias humanas (PBEC) modela de manera fiable el efecto de la atenuación génica de genes de interés. (a) RTqPCR: La atenuación mediada por ARNip de la expresión de VEGFA y VEGF¹⁶⁵ conduce a la atenuación de la expresión de KRT14 (marcador de células basales). Expresión relativa de KRT14 (normalizada con respecto a PGK1), VEGFA y VEGF¹⁶⁵ se representan gráficamente frente a ARNip. Se incluyen dos controles negativos (denominados nr 10 y 11). El ARNip dirigido contra la expresión de KRT14 se incluye como un control positivo. Se dirige ARNip VEGFA contra todas las isoformas de VEGFA.

Figura 15A-J: Cambios en la expresión génica global provocados por la atenuación de VEGFA mediada por ARNip en PBEC. Los cambios en la expresión génica global coinciden exactamente con los cambios observados en el ratón con desactivación de *Vegf*^{120/120}. Los gráficos (a) - (j) representan la significancia de cambios en la expresión génica después de la administración durante 24 h de un ARNip dirigido contra VEGF. Los gráficos (a) - (j) se crean mediante análisis de rutas automático. **Todas las rutas están implicadas en la diferenciación de queratinocitos: regeneración de células basales y diferenciación escamosa.**

Figura 16A-C: ARNip contra los homólogos de R2R¹ y R2R² humanos. Los homólogos de R2R¹ humanos comprenden la familia FAM25 que abarca los siete parálogos humanos designados FAM25A, FAM25B, FAM25C, FAM25D, FAM25E, FAM25G y FAM25HP. Estos son los homólogos humanos del ratón, la secuencia murina codificada por las secuencias de ADNc designadas como 2200001115Rik o ADNc de RIKEN 2200001115. La similitud de los parálogos de FAM25 excluye RTqPCR específico de los diferentes parálogos. Los parálogos de FAM25 también están ausentes en las matrices de expresión génica humana de Affymetrix como HT HG-U133 o HT HG-U219. Los inventores han seleccionado el conjunto de cebador-sonda de RTqPCR Hs04194072_m1 (Applied Biosystems) para la medición de la expresión génica diferencial de la familia FAM25. Applied Biosystems afirma que este conjunto de cebador-sonda no diferencia entre los diferentes parálogos. Se seleccionaron tres ARNip diseñados contra la familia FAM25 por su capacidad para regular negativamente la expresión de Hs04194072_m1 en PBEC. Los inventores han numerado los ARNip nr 18, 20 y 22, respectivamente. El gráfico (a) ilustra la regulación negativa de la expresión de FAM25 (Hs04194072_m1) (normalizada con respecto a PGK1) después de la administración de 24 h de los ARNip respectivos en PBEC. El homólogo de R2R² humano: Se seleccionaron dos ARNip (numerados 15 y 17) diseñados contra C9orf169 (a concentraciones de 5 y 20 nM respectivamente) basándose en su capacidad para regular negativamente la expresión de C9orf169 en PBEC. La

expresión de C9orf169 se evaluó mediante análisis de micromatrices y RTqPCR. Están presentes sondas para C9orf169 en la matriz de expresión génica humana de Affymetrix HT HG-U219. El gráfico (b) ilustra la regulación negativa (evaluada por análisis de micromatrices) de la expresión de C9orf169 después de la administración de 24 h de los ARNip respectivos en PBEC. La administración de ARNip dirigidos contra la familia FAM25 o VEGFA no tiene ningún efecto en la expresión de C9orf169. ARNip dirigidos contra R2R¹ (familia FAM25 humana) y R2R² (C9orf169 humano) regulan negativamente la expresión de KRT14 y es la respuesta similar a la observada después de la administración de ARNip dirigidos contra VEGFA y la atenuación mediada por ARNip de VEGF¹⁶⁵ de la familia FAM25 y C9orf169 conduce a la regulación negativa de la expresión génica de KRT14 (marcador de células basales). Esta respuesta es más evidente después de la administración de ARNip dirigidos contra C9orf169. El gráfico (c) ilustra la regulación negativa de la expresión de KRT14 (normalizada con respecto a PGK1) después de la administración de 24 h de los respectivos ARNip en PBEC. También se incluyen los ARNip dirigidos contra VEGFA y KRT14 por razones de comparación.

Figura 17: Es una representación esquemática de los efectos de los homólogos de R2R. Los homólogos de R2R de expresión conducen a la modulación simultánea de la señalización de HIF1A (que confiere tolerancia al oxígeno) (Recuadro 5), y modulación de una ruta antiapoptótica específica (PERP) (Recuadro 4). Esto permitirá la (re)generación de células epiteliales fuertes (con una barrera de defensa importante contra la tensión), sin la implantación de potencial de crecimiento ilimitado. En otras palabras, la modulación de una ruta antiapoptótica específica no es un "permiso" para la tolerancia general a la apoptosis. La tolerancia general a la apoptosis conduciría a la situación peligrosa de inmortalización de la célula: la célula se convierte en una célula cancerosa. La ruta se construyó sobre la base de un análisis por micromatrices de la atenuación mediada por ARNip del homólogo de R2R¹ humano (familia FAM25) y homólogo de R2R² humano (C9orf169).

Figura 18: Los homólogos de R2R son esenciales para la "regeneración y diferenciación de queratinocitos" (Recuadro 1) y "Modulación de la apoptosis" (Recuadro 2) en la ruta de VEGFA - VEGF¹⁶⁵. Los efectos sobre la expresión génica de los homólogos de R2R en la "regeneración y diferenciación de queratinocitos" (Recuadro 1) son evidentes en la Figura 18A y 18B. Los efectos en la expresión génica de los homólogos de R2R en la "modulación de la apoptosis" (Recuadro 2) son evidentes en la Figura 18C. Son los efectos finales del recuadro 3, 4 y 5.

Figura 19A-B: El efecto sobre la respiración celular (véase Recuadro 3 en la Figura 17) es altamente específico: La atenuación mediada por ARNip de los homólogos de R2R regulará negativamente la fosforilación oxidativa. La expresión de los homólogos de R2R regulará positivamente la fosforilación oxidativa. Se puede observar este efecto en su mayor medida en la expresión de ATP5A1 mitocondrial - ATP sintasa (transportadora de H⁺) (Figura 19A). Los ARNip dirigidos a los homólogos de R2R regularán negativamente la expresión de ATP5A1. La **Figura 19 B** ilustra la expresión de ATP5A1 entre cambios globales en la expresión génica de la ruta de fosforilación oxidativa.

Figura 20: Los efectos de los homólogos de R2R en señalización de P53 - P63 (véase Recuadro 4 en la Figura 17). El PERP (efector de la apoptosis de TP53) se regula negativamente mediante la atenuación mediada por ARNip de los homólogos de R2R humanos. 'PERP es un gen regulado por p63 esencial para la integridad epitelial. p63 es un regulador maestro del desarrollo epitelial estratificado que es necesario y suficiente para especificar este programa multifacético. Perp, una proteína de cuatro dominios transmembrana identificada originalmente como una diana asociada a la apoptosis del supresor de tumores p53, es la primera diana directa de p63 claramente implicada en la mediación de este programa de desarrollo *in vivo*': esto fue demostrado por Rebecca A. Ihrie *et al.* en 2005 (Cell, Vol. 120, 843-856, 25 de marzo de 2005) (cursiva citando al autor en el resumen del artículo). El gráfico muestra la regulación a negativa de la expresión de PERP después de la atenuación mediada por ARNip de los homólogos de R2R humanos.

Figura 21: Una visión general de la expresión de PERP entre cambios globales en la expresión génica de la ruta de P53 después de la administración de FAM25 nr 20 (dirigida al homólogo humano R2R¹)

Figura 22: Una visión general de la expresión de PERP entre cambios globales en la expresión génica de la ruta de P53 después de la administración de FAM25 nr 18 (dirigida al homólogo humano R2R¹)

Figura 23: Una visión general de la expresión de PERP entre cambios globales en la expresión génica de la ruta de P53 después de la administración de C9orf169 nr 15 (dirigida al homólogo humano R2R²)

Figura 24: Una visión general de la expresión de PERP entre cambios globales en la expresión génica de la ruta de P53 después de la administración de C9orf169 nr 17 (dirigida al homólogo humano R2R²)

Figura 25A-C: La expresión de HIF1A (véase recuadro 5 en la Figura 17) está estrechamente regulada por la expresión de los homólogos de R2R humanos. La atenuación mediada por ARNip de los homólogos de R2R humanos regulará negativamente la expresión de HIF1A (Figura 25A). Los efectos de HIF1A corriente abajo en la respiración celular (fosforilación oxidativa) se describieron en 3 (véase Figura 17, Respiración celular). Los homólogos de R2R controlan el 'PERP tipo p53-p63' y la expresión de HIF1A. Como tales, las células epiteliales "duras", equipadas con el arsenal HIF1A, podrían desarrollar un potencial de crecimiento ilimitado bajo la influencia de VEGFA/VEGF¹⁶⁵. Sin embargo, se observa al mismo tiempo que las células epiteliales no pueden entrar en un estado inmortal. La expresión de los homólogos de R2R actuará como un freno para la expresión de genes que podrían inmortalizar la célula. Esto es muy evidente en el caso de BCL2A1 (Figura 25B), un gen antiapoptótico cuya expresión confiere resistencia a la terapia en células cancerosas. La atenuación mediada por ARNip de los homólogos de R2R conduce a la regulación positiva de la expresión de BCL2A1. Los homólogos de R2R actúan como un freno para la expresión de BCL2A1.

Los homólogos de R2R también promoverán la expresión de genes que permiten a las células entrar en la apoptosis si es necesario. Esto se demuestra mediante la atenuación mediada por ARNip de los homólogos de

R2R: la atenuación provocará una regulación negativa de MAP2K4 (Figura 25C), un supresor de tumores en el adenocarcinoma de pulmón.

Tabla 1. El gen de ADNc de RIKEN 2200001115 y el gen de ADNc de RIKEN 2310002J15 entre los primeros en la lista de genes en el análisis SAM de la expresión génica diferencial en E16.5 en células de tipo silvestre y con desactivación de *Vegf120/120* con tinción anti-citoqueratina 4-5-6-8-10-13-18.

Tabla 2. El gen de ADNc de RIKEN 2200001115 y el gen de ADNc de RIKEN 2310002J15 entre los primeros en la lista de genes en el análisis SAM de la expresión génica diferencial en E16.5 en células de tipo silvestre y con desactivación de *Vegf120/120* con tinción GS-IB4.

Tabla 3. Distribución de embriones según edad y estado del genotipo *Vegf*. ts/ts = tipo silvestre homocigoto (*Vegf*+/+), 120/ts = *Vegf120*/+ heterocigoto y 120/120 = desactivación de *Vegf120/120* homocigoto. (NG = no genotipado debido a mala morfología embriológica).

Tabla 1

ID de conjunto de sondas	Varianza	UniGene ID	Alineamientos	Título del gen	Símbolo génico
1448745_s_at	44,327	Mm.1121	cr3:92166199-9216906	loricrina	Lor
1451613_at	25,9311	Mm.208047	cr3:93405151-9341897	hornerina	Hrnr
1449986_at	21,731	Mm.160339	cr16:88647705-886486	gen de ADNc de RIKEN 2310034C09	2310034C09Rik
1440186_s_at	19,595	Mm.44242	cr5:36523188-3652342	gen de ADNc de RIKEN 2310020A21	2310020A21Rik
1421575_at	18,532;	Mm.358728	cr16:88666693-886676	gen de ADNc de RIKEN 2310057N15	2310057N15Rik
1453218_at	16,908	Mm.292458	cr3:92764649-9276632	gen de ADNc de RIKEN 1110014K05	1110014K05Rik
1459897_a_at	16,677	Mm.250717	cr7:30460230-3046489	suprabasina	Sbsn
1420676_at	16,402	Mm.41969	cr3:92731934-9273371	tipo rico en prolina pequeño 3	Sprrl3
1420358_at	13,819;	Mm.353193	cr16:88647705-887093	proteína asociada a queratina 13	Krtap13
1437019_at	13,44	Mm.27156	cr14:33180971-331844	gen de ADNc de RIKEN 2200001 15	2200001 15Rik ←
1456248_at	12,776	Mm.46390	cr3:93078529-9307882	gen de ADNc de RIKEN 2310002A05	2310002A05Rik/// LOC630971
1434227_at	12,373	Mm.268157	cr7:30496664-3049985	asociado a diferenciación de queratinocitos	Krtdap
1420677_x_at	12,312	Mm.41969	cr3:92731934-9273371	tipo rico en prolina pequeño 3	Sprrl3
1439630_x_at	12,212	Mm.250717	cr7:30463567-3046489	suprabasina	Sbsn
1420350_at	11,873	Mm.279773	cr3:92754015-9275571	tipo rico en prolina pequeño 2	Sprrl2
1428781_at	11,64	Mm.30138	cr7:30485165-3048982	gen de ADNc de RIKEN 1110014F24	1110014F24Rik
1452732_at	11,02	Mm.183043	cr6:86593812-8659533	gen de ADNc de RIKEN 2300003P22	2300003P22Rik
1419394_s_at	10,266	Mm.21567	cr3:90754997-9075596	proteína de unión a calcio S100 A8 (c	S100a8
1453092_at	10,127	Mm.35806	cr3:93099607-9310107	gen de ADNc de RIKEN 2300002G24	2300002G24Rik
1435111_at	9,396	Mm.32861	cr7:24063581-2406386	gen de ADNc de RIKEN 2310011E23	2310011E23Rik
1419709_at	9,22	Mm.136573	cr16:36369769-363746	estefina A3	Stfa3
1435761_at	9,202	Mm.383370	cr16:36196367-362046	estefina A3	Stfa3
1422784_at	7,244	Mm.302399	cr15:101517949-10152	complejo de queratina 2, básico, gen 6a	Kit2-6a
1435760_at	7,165	Mm.300592	cr18:42299151-422997	cistatina A	Csta

1448756_at	6,71	Mm.2128	cr3:90778558-9078122	proteína de unión a calcio S100 A9 (c	S100a9
1447669_s_at	6,627	Mm.215394	cr13:13619774-136200	proteína de unión al nucleótido guanina (	Gng4
1425336_x_at	5,61	Mm.422886	cr17:33606481-336107	histocompatibilidad 2, K1, región k	H2-K1
1437145_s_at	5,455	Mm.46431	cr2:25060827-2506109	gen de ADNc de RIKEN 23010002J15	2310002J15Rik ←
1420741_x_at		Mm.291782	cr3:92862612-9286430	gen de ADNc de RIKEN 2310069N01	2310069N01Rik
1442339_at	4,062	Mm.187847	cr16:36076009-360811	tipo estefina A2 1	Stfa2l1
1427492_at	3,963	Mm.34964	crX: 108755370-108762	insuficiencia ovárica prematura 1B	Pof1b
1418722_at	3,693	Mm.236225	cr9:110265012-110268	proteína granular neutrófila	Ngp
1419409_at	3,69	Mm.291769	cr3:92741051-9274165	tipo rico en prolina pequeño 5	Sprrl5
1436936_s_at	3,42	Mm.274770	crX99684922-9968596	transcritos específicos de X inactivos	Xist
1427262_at	3,408	Mm.274770	crX99663093-9968593	transcritos específicos de X inactivos	Xist
1430567_at	3,377	Mm.35369	cr18:44114683-441478	inhibidor de serina peptidasa, tipo Kazal	Spink5
1422667_at	3,336	Mm.38498	cr11:99947848-999520	complejo de queratina 1, ácido, gen 15	Krt1-15
1448881_at	3,243	Mm.26730	cr8:112464257-112468	haptoglobina	Hp
1423547_at	2,71	Mm.45436	cr10:116681442-11668	lisozima	Lyzs
1449586_at	1,939	Mm.4494	cr1:137687809-137735	placofilina 1	Pkp1
1449133_at	1,932	Mm.331191	cr3:92569339-9257128	proteína rica en prolina pequeña 1A	Sprr1a
1449106_at	1,901	Mm.200916	cr11:54746194-547537	glutación peroxidasa 3	Gpx3
1452543_a_at	1,862	Mm.2258	cr19:9150684-9154982	secretoglobina, familia 1A, miembro 1	Scgb1a1
1450633_at	1,859	Mm.21075	cr13:3837003-3837919	calmodulina 4	Calm4
1459898_at	1,826	Mm.250717	cr7:30460230-3046489	suprabasina	Sbsn
1429565_s_at	1,815	Mm.292457	cr3:93103210-9310446	envoltura queratinizada tardía 5A	Lce5a
1429540_at	1,727;	Mm.34382	cr7:25076381-2507848	cornifelina	Cnfn
1453801_at	1,597	Mm.180200	cr3:94427502-9443259	miembro de la superfamilia de tioesterasa 5	Them5
1422672_at	1,568	Mm.140151	cr3:92522208-9252419	proteína rica en prolina pequeña 1B	Sprr1b

Tabla 2.

ID de conjunto de sondas	Varianza	UniGene	ID Gen	Título	Símbolo génico
1449586_at	32,877	Mm.4494		placofilina 1	Pkp1
1423935_x_at	30,173	Mm.6974		complejo de queratina 1, ácido, gen 14	Krt1-14
1460347_at	28,662	Mm.6974		complejo de queratina 1, ácido, gen 14	Krt1-14
1438856_X_at	23,207	Mm.26861	8	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 5	Serpnb5
1422667_at	21,017	Mm.38498		complejo de queratina 1, ácido, gen 15	Krt1-15
1422481_at	20,96	Mm.18313		complejo de queratina 2, básico, gen 1	Krt2-1

ES 2 733 369 T3

1424096_at	20,14	2 7	Mm.38399	complejo de queratina 2, básico, gen 5	Krt2-5
1451613_at	20,13	3 7	Mm.20804	hornerina	Hnr
1453218_at	18,79	5 7	Mm.29245	gen de ADNc de RIKEN 1110014K05	1110014K05Rik
1441941_x_at	18,5	2 8	Mm.26861	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro	Serpinb5
1456203_at	17,75	7 ---	---	gen de ADNc de RIKEN 1110020A10	1110020A10Rik
1434227_at	16,95	---	---	proteína asociada a diferenciación de queratinocitos	Krt2ap
1429067_at	16,39	6 ---	---	calpaína, subunidad pequeña 2	Capns2
1440186_s_at	16,18	6 5	Mm.37886	Locus transcrito	---
1419709_at	15,64	8 136573	Mm.	estefina A3	Stfa3
1422939_at	14,80	7 2	Mm.33736	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 3B	Serpinb3b
1422308_a_at	14,21	9 ---	Mm.20973	lectina, que se une a galactosa, soluble 7	Lgals7
1437019_at	13,87	6 ---	Mm.27156	gen de ADNc de RIKEN 2200001 15	2200001 15Rik ←
1450633_at	13,84	2 ---	Mm.21075	calmodulina 4	Calm4
1421117_at	12,77	3 5	Mm.33662	distonina	Dst
1421752_a_at	12,71	8 8	Mm.26861	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro	Serpinb5
1418799_a_at	12,31	6 ---	Mm.1225	procolágeno, tipo XVII, alfa 1	Col17a1
1453801_at	11,67	1 180200	Mm.	miembro de la superfamilia de tioesterasa 5	Them5
1422940_x_at	11,33	3 2	Mm.33736	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 3B	Serpinb3b
1436392_s_at	11,11	2 ---	Mm.3629	factor de transcripción AP-2, gamma	Tcfap2c
1452166_a_at	10,90	1 ---	Mm.22662	complejo de queratina 1, ácido, gen 10	Krt1-10
1449938_at	10,49	1 ---	Mm.1001	relacionada con proteína placentaria 11	Pp11r
1421040_a_at	10,27	2 ---	Mm.37156	glutación S-transferasa, alfa 2 (Yc2)	Gsta2
1437232_at	10,19	8 4	Mm.10721	tipo proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad 2	Bpil2
1424623_at	9,782	8 5	Mm.26861	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro	Serpinb5
1418748_at	9,085	---	Mm.20940	caspasa 14	Casp14
1418158_at	9,029	---	Mm.20894	proteína relacionada con la transformación 63	Trp63
1430551_s_at	8,917	7 ---	Mm.19593	tipo lipasa, que contiene dominio de ab-hidrolasa 3	Lip13
1430550_at	8,679	7 ---	Mm.19593	tipo lipasa, que contiene dominio de ab-hidrolasa 3	Lip13
1435761_at	8,652	136573 ---	Mm.	estefina A3	Stfa3
1448397_at	8,545	6 ---	Mm.25652	proteína de canal de membrana de unión comunicante beta	Gjb6
1459898_at	8,407	7 ---	Mm.25071	suprabasina	MGI:2446326
1422672_at	8,373	1 ---	Mm.14015	proteína rica en prolina pequeña 1B	Spr1b
1459897_a_at	8,371	7 ---	Mm.25071	suprabasina	MGI:2446326
1428781_at	8,218	---	Mm.30138	gen de ADNc de RIKEN 1110014F24	1110014F24Rik
1419492_s_at	8,128	---	Mm.5341	defensina beta 1	Defb1

ES 2 733 369 T3

at				
1439183_at	8,102	Mm.21878	N-acilesfingosina amidohidrolasa (ceramidasa alcalina) 3	Asah3
		4		
1419491_at	8,028	Mm.5341	defensina beta 1	Defbl
1427263_at	7,99	---	transcritos específicos de X inactivos	Xist
1416930_at	7,471	Mm.878	complejo de antígeno linfocítico 6, locus D	Ly6d
				MGI:3524930 ///
1435760_at	7,251	Mm.30059	cistatina A /// similar a homólogo de estefina	LOC547252
		2		
1439630_x_	7,031	Mm.25071	suprabasina	MGI:2446326
at		7		
1435639_at	6,509	---	gen de ADNc de RIKEN 2610528A11	2610528A11 Rik
1424976_at	6,23	Mm.	familia del gen homólogo de ras, miembro V	Rhov
		120274		
1455519_at	6,163	Mm.38327	desmogleína 1 beta	Dsg1b
		4	PREDICHA: gen de ADNc de RIKEN 2700099C18 de <i>Mus musculus</i>	
1455715_at	5,932	Mm.37365	(2700099C18Rik), ARNm	---
		6		
1434534_at	5,693	---	---	---
1426048_s_	5,603	Mm.85544	factor de transcripción AP-2, alfa	Tcfap2a
at				
1449500_at	5,535	Mm.66015	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro	Serpib7
		7		
1430582_at	5,508	Mm.13310	conector de histona SNF2 PHD RING helicasa	Shprh
		1		
1435670_at	5,464	Mm.	factor de transcripción AP-2 beta	Tcfap2b
		137021		
1422588_at	5,427	Mm.35861	complejo de queratina 2, básico, gen 6b	Krt2-6b
		7		9430070013Rik
				///
1445187_at	5,408	Mm.32950	Gen de ADNc de RIKEN 9430070013 /// modelo de gen	Gm979
		4	979, (NCBI)	
1421996_at	5,28	Mm.85544	factor de transcripción AP-2, alfa	Tcfap2a
1423323_at	5,278	Mm.	transductor de señal de calcio asociado a tumor 2	Tacstd2
		154045		
1452228_at	5,242	Mm.25781	gen de ADNc de RIKEN 4930451A13	4930451A13Rik
		9		
1449959_x_	5,214	Mm.23784	tipo rico en prolina pequeño 9	Sprrl9
at				
1419731_at	5,211	Mm. 14098	citocromo P450, familia 2, subfamilia b, polipéptido 19	Cyp2b19
			Potenciador del homólogo 1 de polycomb (<i>Drosophila</i>)	
			(Epc1), variante de transcripción 1,	
1442279_at	5,14	Mm.31213	ARNm	Epc1
		3		
1455408_at	5,008	Mm.24880	gen de ADNc de RIKEN 4732472I07	4732472I07Rik
1416271_at	4,925	Mm.28209	PERP, efector de apoptosis TP53	Perp
1418722_at	4,888	Mm.23622	proteína granular neutrófila	Ngp
		5		
1437351_at	4,809	Mm.22481	dedo de CXXC 4	Cxxc4
		4		
1440162_x_	4,662	Mm.208144	proteína hipotética A630043P06	A630043P06
at				
1426641_at	4,647	Mm.266679	homólogo de tribbles 2 (<i>Drosophila</i>)	Trib2
1442349_at	4,643	Mm.259334	gen de ADNc de RIKEN C630028N24	C630028N24Rik
1425624_at	4,593	Mm.209005	proteína que interactúa con EPM2A (laforina) 1	Epm2aip1
1460038_at	4,577	Mm.297371	dominio POU, clase 3, factor de transcripción 1	Pou3f1
1440523_at	4,562	Mm.98096	deshidrogenasa reductasa de cadena corta retiniana 2	MGI:2668443
1431211_s_	4,438	Mm.	miembro de la superfamilia de tioesterasa 5	Them5
at		180200		
1447329_at	4,351	---	---	---
1443687_x_	4,344	---	---	---
at				
1420988_at	4,306	Mm.311585	polimerasa (dirigida a ADN), eta (relacionado con RAD 30)	Polh
1456248_at	4,189	Mm.46390	gen de ADNc de RIKEN 2310002A05	2310002A05Rik

ES 2 733 369 T3

1430000_at 4,157---	gen de ADNc de RIKEN B230117O15	B230117O15Rik
	Proteína de unión a tramo de polipirimidina 2, ARNm (clon de ADNc MGC:11671	
1446490_at 4,154 Mm.29966	IMAGE:3709255)	Ptbp2
1441909_s_ 4,1 Mm.225253	gen de ADNc de RIKEN 9530066K23	9530066K23Rik
at		
1427747_a_ 4,035 Mm.9537	lipocalina 2	Lcn2
at		
1437145_s_ 3,994 Mm.46431	gen de ADNc de RIKEN 2310002J15	2310002J15Rik ←
at		
1419463_at 3,985 Mm.20897	canal de cloruro activado por calcio 2	Clca2
1441440_at 3,976 Mm.277366	relacionado con autofagia 4C (levadura)	Atg4c
1437705_at 3,854 ---	---	---
1418028_at 3,846 Mm.19987	dopacromo tautomerasa	Dct
1442786_s_ 3,804 Mm.270469	Segmento de ADN, cr 5, Brigham & Women's Genetics	D5Bwg0860e
at	0860 expresado	

Tabla 3.

E7733 E12,5	A	ts/ts	E7734 E12,5	A	120/120			
	B	ts/120		B	ts/120			
	C	120/120		C	ts/120			
	D	ts/120		D	ts/120			
	E	ts/120		E	ts/120			
	F	ts/ts		F	ts/120			
	G	ts/ts		G	ts/120			
	H	120/120		H	120/120			
					I		ts/ts	
			K	120/120				
E7232 E14.5	A	120/ts	E7494 E14.5	A	120/120			
	B	120/ts		B	ts/ts			
	C	120/120		C	120/ts			
	D	ts/ts		D	120/ts			
	E	120/ts		E	120/120			
	F	120/ts		F	120/ts			
	G	ts/ts		G	120/ts			
	H	120/120		H	120/ts			
	I	120/ts		I	ts/ts			
K	ts/ts							
L	ts/ts							
E7119 E16.5	A	120/ts	E7477 E16.5	A	120/120	E7478 E16.5	A	120/120
	B	120/ts		B	ts/ts		B	ts/ts
	C	120/120		C	?		C	120/ts
	D	120/ts		D	120/+		D	120/ts
	E	120/ts		E	ts/ts		E	120/ts
	F	120/ts		F	ts/ts		F	120/120
	G	120/120		G	?		G	ts/ts
	H	120/ts		H	120/ts		H	120/ts
	I	ts/ts		I	120/ts		I	120/ts
J	120/ts	K	120/ts	K	ts/ts			
K	120/ts	L	120/120	L	120/120			
L	120/ts			M	ts/ts			

INTRODUCCIÓN

Los genes de R2R, transcritos y proteínas respectivas se descubrieron en un modelo de desactivación de ratón de VEGF. El ratón con desactivación de *Vegf120/120* no puede producir las isoformas *Vegf*¹⁶⁴ y *Vegf*¹⁸⁸ (*Vegf*¹⁶⁴ es el homólogo de VEGF¹⁶⁵ humano). Los pulmones de ratones con desactivación de *Vegf120/120* son hipoplásicos al nacer y las vías respiratorias periféricas y la diferenciación vascular se deteriora gravemente en Pulmones embrionarios con desactivación de *Vegf120/120*. Un enfoque genómico condujo al descubrimiento de que *Vege*¹⁶⁴ en el ratón y VEGF¹⁶⁵ en el hombre conducen un programa de expresión génica muy específico. Este programa consta de dos componentes. El primer componente es la (re)generación de células basales del epitelio de las vías respiratorias: las células basales son la fuente de al menos la población celular de las vías respiratorias proximales. Las células basales también generan fuertes conexiones **intercelulares** mediante la construcción de conexiones de hemidesmosoma y adhesión focal. Las células basales fortalecen su arquitectura **intracelular** por las proteínas de filamento intermedio KRT14 y KRT5. Estas dos proteínas están pegadas al (hemi)desmosoma.

El segundo componente es un programa de diferenciación: es un 'programa de fortificación' ('diferenciación escamosa') de las células que revisten las vías respiratorias. Es necesario que estas células sean duras al nacer, ya que estarán expuestas a tensión mecánica y altos niveles de oxígeno. La fortificación se hace posible mediante una familia de proteínas que fortalecen la arquitectura celular. Esta familia de proteínas consiste en el grupo de filamentos intermedios y las proteínas que fortalecen los filamentos intermedios (proteínas SPRR, LOR, HRNR, etc). Estos dos programas se pueden resumir en los encabezamientos 'diferenciación de queratinocitos', 'diferenciación de células epidérmicas', 'reorganización de filamentos intermedios', 'envoltura queratinizada', 'diferenciación de queratinocitos'. 'filamentos de queratina de remodelación del citoesqueleto'.

Si bien es tentador utilizar la proteína VEGF¹⁶⁵ para la regeneración de pulmones dañados en seres humanos, VEGFA y VEGF¹⁶⁵ son reguladores importantes de una gran diversidad de procesos en el organismo. Por lo tanto, la administración de VEGFA o VEGF¹⁶⁵ daría como resultado demasiados efectos secundarios.

Se descubrieron dos nuevos genes (*R2R*¹ y *R2R*²) en el programa de expresión génica impulsado por *Vege*¹⁶⁴ en el ratón y VEGF¹⁶⁵ en el hombre. Estos nuevos genes, sus transcritos y proteínas traducidas no están relacionados con los genes y sus productos corriente abajo del programa de expresión de genes basal y escamoso.

Se realizaron experimentos para demostrar que estos genes son moduladores importantes del programa de diferenciación basal y escamoso. Uno de los hallazgos más importantes de estos experimentos es que estos genes son moduladores importantes de la expresión de HIF1 α y PERP en la célula. En los experimentos de los inventores, los genes de R2R son reguladores positivos y la interferencia con este mecanismo abre posibilidades terapéuticas en la terapia del cáncer.

MATERIAL Y MÉTODOS

Embriones de ratón y procesamiento de tejidos. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Centro Médico de la Universidad de Leiden y se realizaron según la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio* publicado por el NIH. Se cruzaron ratones *Vegf*^{+/120} heterocigotos para obtener embriones *Vegf120/120* y compañeros de camada de tipo silvestre *Vegf*^{+/+}. La mañana del tapón vaginal se definió como el día embrionario (E) 0.5. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se aislaron embriones E12.5, 14.5 y 16.5 en PBS estéril. Los tórax embrionarios se diseccionaron cuidadosamente en condiciones exentas de RNasa, se colocaron en medio de congelación de tejidos (TBS, Triangle Biomedical Sciences, Durham NC), se congelaron y se almacenaron a -80 °C. La distribución de los embriones según la edad y el origen materno se representa en la Tabla S1.

Se cortaron secciones de criostato (8 μ m) y se unieron a portaobjetos de microscopio SuperFrost Plus (Menzel Gmbh & Co KG, Braunschweig, Alemania). El corte y el procesamiento inmunohistoquímico adicional de los tórax embrionarios de diferentes edades se realizó aleatoriamente.

Inmunohistoquímica y microdissección de captura con láser. Se seleccionaron tres secciones tisulares de cada tórax embrionario al nivel de la vista biventricular del corazón. Estas se procesaron inmunohistoquímicamente en un lote. Las secciones de criostato se fijaron colocando los portaobjetos en acetona fría (4 °C) durante 2 minutos después de retirarlos del congelador a -80 °C. Todas las etapas inmunohistoquímicas adicionales se realizaron a 4 °C y todos los taponeros y soluciones de anticuerpos se mantuvieron a 4 °C. Se preparó tampón de PBS o D-PBS exento de RNasa diluyendo RNasecure (25x, AM7006, Ambion TX) a 1x en el tampón deseado. Todas las soluciones de anticuerpos se prepararon en PBS mientras que el conjugado de isolectina GS-IB₄ se diluyó en D-PBS. Superase.In (AM2696, Ambion, Austin, TX) se añadió a cada solución de anticuerpo en una concentración final de 1U/ μ l. Los portaobjetos se secaron al aire y las secciones tisulares se localizaron con un rotulador de barrera hidrófoba. Después de colocar los portaobjetos en un bloque de metal frío (4 °C), se aplicaron 30 μ l de PBS a cada sección tisular y se drenó. Posteriormente, se aplicaron por goteo 30 μ l de pan (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18) anticuerpo monoclonal de ratón anti-queratina (MAB1636, Chemicon) en una concentración de 10 μ g/100 μ l sobre la muestra. La solución de anticuerpo se drenó después de 2 minutos y la sección tisular se aclaró suavemente con 250 μ l de PBS. Después se aplicaron

treinta µl de conjugado de pollo anti-IgG (H+L) de ratón Alexa-fluor-488 (A21200, Invitrogen CA) en una concentración de 10 µg/100 µl durante 2 minutos, seguido de nuevo por un lavado suave con 250 µl de PBS. Por último, un tercer ciclo de 2 minutos de tinción con 30 µl de conjugado de isolectina GS-IB₄ Alexa Fluor 594 (121413, Invitrogen, CA) en una concentración de 10 µg/100 µl completó el procedimiento de tinción. Las secciones tisulares se deshidrataron a temperatura ambiente: EtOH al 75 % (30 s), EtOH al 95 % (30 s), EtOH al 100 % (30 s), EtOH al 100% (120 s), xileno (180 s). La microdissección de captura con láser se realizó en un instrumento de microdissección Veritas (Arcturus Bioscience Inc., Mountain View, CA) inmediatamente después de las etapas de deshidratación. Diseccionamos 3x 300 a 400 células (como muestras por triplicado) de las vías respiratorias intrapulmonares o vasos sanguíneos en los pulmones embrionarios de tres secciones tisulares al nivel de la vista biventricular del corazón. Las células que se tiñen para el conjugado de pan anticuerpo monoclonal de ratón anti-queratina/IgG Alexa-fluor-488 de pollo anti-ratón se identificaron como células fluorescentes verdes (filtro azul). Estas células fluorescentes verdes se definieron como células epiteliales de las vías respiratorias (células *ker+*) y se diseccionaron aleatoriamente, independientemente de su morfología de las vías respiratorias proximal o distal. Las células que se tiñían para conjugado de isolectina GS-IB₄ Alexa-fluor-594 se identificaron como células fluorescentes rojas (filtro verde). Estas células se definieron como células mesenquimatosas con características endoteliales (células *il+*). No se observó tinción de células para ambos marcadores en los tres puntos temporales embrionarios (E 12.5, 14.5, 16.5). De hecho, las células fluorescentes verdes y rojas podrían observarse como una imagen positiva/negativa entre sí. Las células *ker+* o *il+* microdisseccionadas se recogieron en un tubo Gene Amp (Applied Biosystems, Foster City CA) cargado con 75 µl de tampón de lisis RNeasy (RLT; Qiagen, Hilden, Alemania) que contenía β-mercaptoetanol 0,14 M y 200 ng de ácido polinosínico (Sigma).

Aislamiento, amplificación, marcaje e hibridación de micromatrices de ARN. Las muestras capturadas con láser se incubaron a 42 °C durante 20 minutos y después se enfriaron en hielo. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento posterior. Después de descongelar, se añadió un volumen igual de etanol al 70 % a cada muestra y después se transfirió a Columnas de RNeasy MinElute Spin (Qiagen). Se limpió ARN según las instrucciones del fabricante, se eluyó en 14 µl de agua sin RNasa y se ajustó a 4 µl mediante secado al vacío. Fueron necesarios dos ciclos de amplificación de ARNm lineal para generar cantidades suficientes de ARNc. La síntesis de ADNc de dos ciclos y síntesis de ARNc marcado con biotina se realizaron según el Manual de procesamiento de matrices y muestras eucariotas GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA). Como controles de "adición", se utilizó el kit de control de ARN poli-A GeneChip (Affymetrix). Se utilizó el kit MEGAscript T7 (Ambion, Austin, TX) para transcripción *in vitro* de la segunda cadena de ADNc en el primer ciclo de amplificación, produciendo de 112 a 457 ng de ARNa. El segundo ciclo de amplificación, a partir de 100 ng de ARN de primer ciclo, produjo de 11 a 86 µg de ARNc utilizando el kit de marcaje de transcripción *in vitro* GeneChip (IVT). El ARN marcado se hibridó con matrices de genoma de ratón MG-430_2.0 GeneChip (Affymetrix). Se realizó hibridación utilizando 12,5 µg de ARN marcado con biotina a 45 °C durante 16 horas en rotación continua. Las matrices se tiñeron en las estaciones de Affymetrix Fluidics usando estreptavidina-ficoeritrina (SAPE), seguido de tinción con anticuerpo antiestreptavidina y una segunda tinción con SAPE. Posteriormente, las matrices se exploraron con un explorador de láser Agilent (Affymetrix).

Análisis estadístico. Los datos del nivel de la sonda Affymetrix se resumieron utilizando FARMS (Análisis de factores para resumen de micromatrices robusto)¹. Se transformaron intensidades sin procesar mediante log₂ para obtener datos distribuidos de forma normal. En primer lugar, un método de proyección multivariante sin supervisión, análisis de mapas espectrales², se aplicó para reducir la complejidad de datos altamente dimensionales (*n* genes frente a *p* muestras). El análisis de mapas espectrales proporciona una identificación imparcial de los grupos predominantes de genes y sujetos que están presentes en el conjunto de datos. En segundo lugar, se realizaron ensayos para expresión diferencial de genes entre los dos orígenes celulares (células *ker+* frente a *il+*) en LIMMA (modelos lineales para datos de micromatrices)³, ya que este método utiliza información entre genes que hace que los análisis sean estables incluso para experimentos con un número pequeño de matrices³. En tercer lugar, las diferencias entre los compañeros de camada con desactivación de *Vegf120/120* y de tipo silvestre en los perfiles de expresión sobre la edad embrionaria se ensayaron a través de una interacción bidireccional del genotipo de *Vegf* y el tiempo, usando de nuevo LIMMA³. Los datos de E12.5 y E14.5 se agruparon, ya que los inventores solo estaban interesados en el perfil de tiempo de contraste de E16.5 frente a E14.5 y E12.5. Este ensayo se realizó en las muestras *ker+* e *il+* por separado, debido a que estos dos tejidos se originaron a partir de los mismos embriones. Los modelos como LIMMA asumen que todas las muestras se han recogido de manera aleatoria e independiente. La corrección de esta dependencia habría necesitado modelos demasiado complejos si el *ker+* e *il+* se hubieran analizado simultáneamente. También se descubrió variación genómica de la interacción única del tipo tisular (muestra *ker+* frente a *il+*) mediante el análisis LIMMA. Se realizó asignación de la expresión diferencial a lo largo del genoma completo usando MACT (Herramienta de análisis de cromosoma de micromatrices).

RESULTADOS/ANÁLISIS

Al nacer, O₂ y CO₂ deben intercambiarse en el pulmón a través de una gran interfaz de vías respiratorias distales y vasos sanguíneos. El desarrollo de pulmones embrionarios en el ratón experimenta un cambio notable en E (= día post conceptual) 16.5¹. En este momento, la vía respiratoria entrelazada y los árboles vasculares brotan al multiplicar y refinar sus ramas distales. Las vías respiratorias distales o los túbulos respiratorios se multiplican por subdivisión en sáculos de pared delgada antes del nacimiento. Estos sáculos se convierten con el tiempo en alvéolos postnatales². Las vías respiratorias de paredes delgadas requieren células planas para facilitar el transporte de gas. La

diferenciación fenotípica a células de vías respiratorias planas, que se produce alrededor de E16.5, es por lo tanto una fase crucial en el desarrollo embrionario de los pulmones. Las células epiteliales que cubren las vías respiratorias se originan a partir del endodermo del trasto digestivo superior ramificado. A partir de E16.5, las células epiteliales en la vía respiratoria distal comienzan a aplanarse, mientras que las células proximales conservan su forma columnar. Las más distales de estas células alinearán los sáculos y alvéolos y desarrollarán una morfología plana o incluso escamosa para E18.5. Los capilares están revestidos con células endoteliales planas y representan los vasos sanguíneos distales del árbol vascular. Las células endoteliales que cubren los vasos sanguíneos pulmonares proceden del mesénquima mesodérmico. Su crecimiento debe coincidir estrechamente con el crecimiento de sus homólogos epiteliales para proporcionar la gran interfaz alveolar-capilar sobre la cual se inicia el intercambio de gases al nacer. La interferencia recíproca entre el epitelio de la vía respiratoria procedente del endodermo y el mesénquima mesodérmico circundante se inicia en la morfogénesis pulmonar temprana^{3,4}. A partir de E9.5, Fgf10 producido por células mesenquimatosas en el mesodermo circundante es la señal más importante para la ramificación del endodermo. La estrecha interacción con al menos los factores de señalización Shh, Bmp, TGF- β y Wnt modula este mecanismo de ramificación temprano. Sin embargo, la maquinaria molecular que sustenta los cambios fenotípicos celulares posteriores y la interferencia epitelial-endotelial en E16.5 se entiende menos.

Con el fin de obtener más información sobre la diferenciación tardía del pulmón después de E12.5, los inventores han desarrollado un protocolo de tinción inmunohistoquímica compatible con el ARN para la microdissección por captura con láser de células epiteliales en las vías respiratorias en desarrollo. Los inventores han razonado que los perfiles de expresión génica corriente abajo de ARN aislado de células de las vías respiratorias que comparten un antígeno epitelial común a diferentes edades embrionarias, deberían destacar sus cambios transcripcionales a lo largo del tiempo. Este programa debe al menos reflejar características epiteliales, preferentemente del tipo de vía respiratoria pulmonar. La misma suposición se ensayó en células pulmonares marcadas para un marcador endotelial expresado universalmente a diferentes edades embrionarias. Adicionalmente, en este enfoque se incorporó un modelo de desactivación de ratón con morfogénesis de ramificación pulmonar anómala tardía. Los inventores eligieron el modelo de *Vegf120/120*, como vía respiratoria periférica y diferenciación vascular^{5,6,7} se deteriora gravemente en estos pulmones embrionarios con desactivación de *Vegf120/120*. Se esperaba que las células epiteliales y endoteliales de tipo silvestre expresaran un conjunto de genes de diferenciación vascular y de las vías respiratorias, que carecían de sus homólogos de desactivación de *Vegf120/120*. Los ratones *Vegf120/120* carecen de las isoformas 164 y 188 de VEGF-A, pero todavía expresan la isoforma 120. Las isoformas 164 y 188 de VEGF-A (VEGF164 y VEGF188) están unidas más estrechamente a la matriz extracelular que la variante de VEGF120 más soluble, y se concentran localmente alrededor de las vías respiratorias distales. La visión convencional establece que las células epiteliales pulmonares secretan estas isoformas de VEGF-A, por lo que VEGF164 y VEGF188 estimulan el crecimiento local de células endoteliales pulmonares a través de la estimulación de tirosina quinasas receptoras Flk1 (receptor de VEGF-2) y Flt1 (receptor de VEGF-1). La expansión confinada de células endoteliales refina el árbol vascular pulmonar y permite un crecimiento coincidente de células epiteliales^{8,9}. Esta interferencia epitelial-endotelial permite el intercambio de gases al nacer mediante la formación de una unión estrecha entre los alvéolos de las vías respiratorias distales y los capilares de la vasculatura pulmonar. Sin embargo, este tipo de interacción no puede explicar la presencia de VEGF-A en células mesenquimatosas alrededor de las células epiteliales de las vías respiratorias distales.

La tinción inmunohistoquímica se realizó en secciones tisulares congeladas cortadas a partir de tórax embrionarios aislados en E12.5, E14.5 y E16.5 (Fig. 2). La distribución genómica de los embriones se muestra en la Tabla S1. Los inventores seleccionaron anticuerpos que muestran suficiente ancho de banda para unirse a antígenos epiteliales o endoteliales en el marco temporal embrionario del estudio. Se eligió anti-citoqueratina (dirigida contra la citoqueratina 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18) para el marcaje de células epiteliales (células *ker+*) que revisten las vías respiratorias, como células epiteliales primitivas y diferenciadas expresan globalmente filamentos intermedios de diferentes queratinas. Las células endoteliales en la misma sección tisular se tiñeron con conjugado de isolectina GS-IB₄ (Griffonia simplicifolia) Alexafluor-594, que se une con células endoteliales tempranas¹⁰ y tardías^{11,12} en el ratón (células *il+*). No se observó tinción de células para ambos marcadores inmunohistoquímicos en los tres puntos temporales embrionarios. Se aislaron selectivamente de trescientas a cuatrocientas células *ker+* y *il+* mediante microdissección por captura con láser. Dos ciclos de amplificación de ARNm lineal produjeron suficiente ARNc para la hibridación con Affymetrix Mouse 430_2.0 Genechips.

En primer lugar, los inventores examinaron si los perfiles de expresión génica corriente abajo reflejaban diferenciación con respecto a la edad embrionaria y el origen epitelial frente a endotelial. El análisis exploratorio, no supervisado, de datos de expresión génica reveló que los cambios en la expresión génica durante el desarrollo embrionario representaron la mayor variación (35 %) en el conjunto de datos. Esta variación estuvo bien representada gráficamente en el primer componente principal (eje X o PC₁) de un mapa espectral¹³ (Fig. 3). Se encuentran genes que presentan cambios de expresión más fuertes en los tres estadios embrionarios en los extremos del eje X. Uno de estos genes, se sabe que la proteína C asociada a tensioactivo (*Sftpc*) tiene una importante regulación fisiológica positiva durante la embriogénesis y se necesitan cantidades suficientes de su producto proteico para la respiración normal al nacer^{14,15}. El segundo componente principal (eje Y o PC₂), que explica otro 17 % de la variación en el conjunto de datos, podría asignarse a diferencias de la expresión génica en origen celular. Algunos de los conjuntos de sondas más extremos en el eje de PC₂ representan genes que se sabe que son altamente característicos para el epitelio o endotelio pulmonar. Entre los ocho conjuntos de sondas más extremos, los inventores identificaron el antígeno CD 93 (CD93)¹⁶ y claudina 5 (*Cldn5*)¹⁷ como genes endoteliales ilustrativos y, en el lado opuesto del eje Y, caja de horquilla A1 (*Foxa*

1)¹⁸ y queratina 8 (*Krt8*)¹⁹ como genes epiteliales expresivos. La superposición de las diferentes muestras en el mapa espectral mostró su distribución a lo largo de los dos primeros componentes principales. Los grupos *ker+* e *il+* estaban claramente separados según su origen celular a lo largo de PC₂ (Fig. 3). Las muestras *Ker+* se agruparon hacia genes de tipo epitelial y las muestras *il+* ensambladas hacia genes de tipo endotelial. Ambos orígenes celulares se reunieron en PC₁ a las mismas edades embrionarias. Esto indica que los cambios generales en la expresión génica del desarrollo son similares para células epiteliales (*ker+*) y endoteliales (*il+*). En conjunto, las muestras se agrupan con respecto al origen celular (células *ker+* frente a *il+*) y la edad embrionaria cuando se aplica un análisis basado en datos no supervisados. El análisis del mapa espectral subraya que la microdissección de captura con láser selectiva reveló una buena resolución de los perfiles de expresión génica. Un análisis univariante (gen a gen) supervisado independiente del efecto del origen tisular de las muestras (*ker+* frente a *il+*) confirmó que las células *ker+* e *il+* correspondían al nivel genómico con células epiteliales o endoteliales, respectivamente (Fig. 1).

A continuación, el perfil transcripcional asociado con la morfogénesis de ramificación anómala en el fenotipo de desactivación de *Vegf120/120* se trazó en células *il+* y *ker+*. Para cada gen, se ensayó si su perfil de expresión sobre la edad embrionaria difería significativamente entre compañeros de camada con desactivación de *Vegf120/120* y de tipo silvestre (*Vegf+/+*). Esta diferencia en el perfil de expresión dependiente de la edad entre *Vegf+/+* y *Vegf120/120* desplegó una hoja de ruta genómica en tres direcciones. Hubo varios genes identificados solamente con el genotipo *Vegf+/+* una clara regulación positiva sobre la edad embrionaria, por ejemplo, *Hmr* (Fig. 2). El genotipo *Vegf120/120* mostró una alteración en esa inducción dependiente de la edad.

En primer lugar, la causa del déficit estructural en las vías respiratorias de pulmones con desactivación de *Vegf120/120* se hizo evidente. Las células *ker+* de tipo silvestre expresaron en gran medida un excedente de 44 genes específicos epiteliales en E16.5 en comparación con sus homólogos de desactivación de *Vegf120/120*. Un grupo de genes del complejo de diferenciación epidérmica (EDC) dominó el perfil de expresión (Fig. 4). *S100a8* y *S100a9* figuraron entre este subconjunto de EDC y se sabe que son quimioatrayentes sensibles a VEGF-A²⁰. También estuvieron presentes otros elementos del EDC, tales como genes de región rica en prolina pequeña (*Sprr*) y constituyentes tardíos de la envoltura epidérmica queratinizada. Se coexpresó queratina citoesquelética *Krt2-6* con este subconjunto de EDC en células *ker+* de tipo silvestre en E16.5. Los inhibidores de serina-cisteína proteinasa y los tres genes del complejo de SCC (gen de la proteína secretada por el epitelio estratificado) completaron la cohorte de genes regulados positivamente (Fig. 4).

Estudio de la interacción entre la edad embrionaria y el genotipo en células *il+* de tipo silvestre descubrieron de nuevo una regulación positiva profunda de un conjunto limitado de genes en E16.5. Esta respuesta condujo a la adopción de un programa de transformación específica epitelial en células *il+* de tipo silvestre en E16.5 en comparación con células con desactivación de *Vegf120/120*. Como en células *ker+* de tipo silvestre, el grupo de EDC, el grupo de SCC, los inhibidores de cisteína proteinasa y genes exclusivos de la queratina estaban claramente regulados positivamente sobre la edad embrionaria. *R/ken1110020A10*, correspondiente al gen *Dsc1*, estaba muy regulado positivamente en células *il+* de tipo silvestre en E16.5. Asimismo, *Pkp1* (placofilina 1) presentó un perfil transcripcional idéntico en E16.5 (Fig. 5). Un patrón muy lógico pareció impulsar la regulación positiva de estos genes. Las queratinas son proteínas de filamentos intermedios que otorgan resistencia estructural a la célula, más normalmente en células epiteliales²¹. Las proteínas codificadas por el grupo de EDC y SCC, e inhibidores de serina-cisteína proteinasa refuerzan esta red de queratina. *Dsc1* (desmocolina 1) codifica una de las proteínas que dan forma a los desmosomas^{22,23}. Los filamentos intermedios de queratina están unidos a desmosomas intercelulares que forman la unión celular junto con las uniones estrechas y uniones adherentes. La proteína codificada por *Pkp1* es sobre todo un regulador positivo del contenido de proteína desmosómica^{24,25} y es un constituyente del propio complejo desmosómico. *Pkp1* también se une con filamentos intermedios de queratina a las proteínas de cadherina de las uniones adherentes. Estos resultados identifican la estimulación de tirosina quinasa receptora por las isoformas 164 y 188 de VEGF-A como un interruptor maestro en el ensamblaje de la maquinaria de filamento desmosómico/intermedio en el pulmón. Este mecanismo añade otro componente básico a la arquitectura citoesquelética e intercelular en la parte superior de la unión adherente dependiente de Wnt/B-catenina (E-cadherina). De hecho, la regulación positiva de *Eps8l1* en E16.5 en células *il+* de tipo silvestre reveló incluso la interferencia directa con actina, una proteína estructural clave no relacionada con el sistema de filamentos intermedios. La expresión coordinada y agrupada de estos genes citoesqueléticos y desmosómicos permite la configuración de disposiciones celulares planas o escamosas en las vías respiratorias distales.

En segundo lugar, aparte de la activación de genes que codifican proteínas estructurales específicas, un hallazgo intrigante fue la regulación positiva de *Mapkapk3* en células *il+* de tipo silvestre en E16.5. *Mapkapk3* integra rutas de señalización de ERK y p38²⁶ en respuestas a la tensión y de mitógenos tales como la estimulación por VEGF-A de la célula endotelial. *Cdkn2b* (*p15^{Ink4b}* o *Ink4b*), parte del locus supresor de tumores *Ink4b-ARF-Ink4a*, se reguló positivamente de forma simultánea. Pruebas sustanciales apuntan a la supresión de este locus por complejos represores asociados del grupo polycomb (Pcg). Se produce desrepresión del locus tras la disociación de complejos de Pcg por activación o sobreexpresión de *Mapkapk3*²⁷. Este pedal de freno en el ciclo celular permite la diferenciación durante estímulos proliferativos²⁸ y se demostró aquí por primera vez *in vivo*. En efecto, la detención del ciclo celular que permite la transformación epitelial de células *il+* es dependiente de VEGF164 y VEGF188 en el pulmón. Curiosamente, la regulación positiva de *Krt5*, *Krt14* y *Tcfap2c* fue sorprendentemente similar a la huella de expresión del progenitor de células basales en el epitelio de las vías respiratorias²⁹. El fenotipo de células basales solo aparece

al nacer en el epitelio de las vías respiratorias pulmonares y normalmente se une a isolectina. Por otro lado, la expresión génica de grupo *Krt1*, EDC y SCC es un programa de diferenciación escamosa. Las proteínas Δ Np63 y TAp63 impulsan al progenitor de la queratina y el programa de diferenciación escamosa respectivamente. El gen *Trp63* que codifica estas dos proteínas estaba regulado positivamente en las células *il+* de tipo silvestre. Como se ha mencionado, no se observó tinción de células tanto para anti-citoqueratina (anti-4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18) como para isolectina GS-IB₄ en los puntos temporales estudiados. La falta de unión de *Krt1* y *Krt14* por el anticuerpo anti-citoqueratina, permitió por lo tanto la identificación del programa de transformación epitelial específico de células *il+* de tipo silvestre en E16.5. Parece poco probable que las células epiteliales *ker+* generen este programa transcripcional epitelial. Esto requeriría perder la capacidad de unión del anticuerpo anti-citoqueratina para escapar el marcaje *ker+*. Al mismo tiempo, las células *ker+* tendrían que adquirir tinción exclusiva con isolectina GS-IB₄. Como resultado, los inventores proponen que las células *il+* pulmonares albergan un depósito de células que crecen hacia la madurez epitelial en E16.5. En otras palabras, las células *il+* mesenquimatosas pulmonares abarcan células con competencia endotelial y epitelial.

En tercer lugar, el gen representado por la sonda Affymetrix 1437019_at (gen de ADNc de RIKEN 2200001I15) y el gen representado por la sonda Affymetrix 1437145_s_at (gen de ADNc de RIKEN 2310002J15) ambos estaban regulados positivamente en E16.5 en células epiteliales teñidas con anti-citoqueratina 4-5-6-8-10-13-18 de tipo silvestre y células de unión a GS-IB₄ de tipo silvestre. Los inventores descubrieron que estos dos genes (que carecen de anotación biológica) se coexpresan estrechamente con el programa de transcripción de células escamosas y basales. Desempeñan un papel importante en la producción y regeneración de células de las vías respiratorias diferenciadas. (Fig. 6, Fig. 7, Tabla 1, Tabla 2). Partiendo del contig más largo construido a partir de clones secuenciados, los inventores descubrieron el homólogo humano del transcrito del gen de ADNc de RIKEN 2200001I15 (Fig. 8) y transcrito del gen de ADNc de RIKEN 2310002J15 (Fig. 10). Asimismo, los alineamientos de secuencias proteicas confirmaron la existencia de una proteína homóloga humana para la proteína traducida respectiva del gen de ADNc de RIKEN 2200001I15 (Fig.9) y gen de ADNc de RIKEN 2310002J15 (Fig. 11). Los inventores sugieren el nombre R2R¹ para los homólogos de mamíferos del gen de ADNc de RIKEN 2200001I15, transcrito y proteína, y R2R² para el gen de ADNc de RIKEN 2310002J15, transcrito y proteína, ya que estos genes y sus productos proteicos son responsables de la función regeneradora en el sistema respiratorio.

En cuarto lugar, los inventores han descubierto que VEGF-A se expresa en células *ker+* e *il+*, independientemente del estado de tipo silvestre o desactivación de *Vegf120/120*. Por otra parte, el gen que codifica el receptor 1 de VEGF (*Flk-1* o *Kdr*) se expresó abundantemente en células *il+*, pero también aumentó significativamente tan pronto como E14.5 en células *ker+*. Este patrón de expresión del receptor de VEGF-A y VEGF desafía el punto de vista clásico del mesénquima que espera pasivamente un estímulo de VEGF-A del epitelio pulmonar. Coincide esencialmente con un trabajo reciente que demuestra la necesidad de expresión de VEGF-A endógena y señalización autocrina en la supervivencia de las células endoteliales^{30,31}. A partir de la huella genómica de células *il+* con desactivación de *Vegf120/120* de tipo silvestre, también se hizo evidente que las células *il+* son las responsables del envío de estímulos de transformación epitelial. La regulación positiva de *Fgfbp1*, *Lgals7*, *Lgals3* y *Il 18* en células *il+* de tipo silvestre en E16.5 representó estos estímulos. La regulación positiva del gen que codifica la proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 1 (*Fgfbp1*) indica que la gemación pulmonar controlada por FGF primordial también está actuando en los estadios finales de la diferenciación pulmonar. *Fgfbp1* actúa concentrando FGF2 y es un modulador fino del crecimiento y la diferenciación de los tejidos epiteliales en respuesta a los estímulos de FGF del mesénquima. El gen del receptor de FGF 2 (*Fgfr2*) estaba en este sentido ricamente expresado en el compartimento *ker+* y *il+*.

En resumen, se realizó microdissección de captura por láser de células que compartían un marcador específico a diferentes edades embrionarias. Esto permitió la diferenciación de perfiles de expresión génica con respecto a la edad embrionaria, origen celular y genotipo de *Vegf*. El programa de transcripción revelado por este enfoque destacó la importancia del filamento intermedio y la red desmosómica en el refinamiento de la arquitectura pulmonar. Este mecanismo añade otro componente básico a la arquitectura citoesquelética e intercelular en la parte superior de la unión adherente dependiente de Wnt/B-catenina (E-cadherina). Los filamentos intermedios proporcionan la resistencia necesaria a células que estarán expuestas a grandes cantidades de tensión mecánica y oxidativa. No es sorprendente que las células pulmonares adoptan el mismo programa genómico defensivo que las células cutáneas, que están expuestas a los mismos retos. En paralelo con la sofisticación citoesquelética, el programa progenitor de células basales es adquirido por células *il+* tardías en la vida embrionaria, y es dependiente de VEGF164-188.

Los inventores han demostrado que la regulación negativa de la familia FAM25 y la regulación negativa de la expresión del gen C90rf169 reducen la expresión de KRT14. Además, se sabe que la expresión de la familia FAM25 (el homólogo de R2R¹ humano) y C90rf169 (el homólogo de R2R² humano) está regulada positivamente por VEGFA/VEGF¹⁶⁵. ¿Cómo actúan estos genes en la ruta de VEGFA/VEGF¹⁶⁵? Puede usarse atenuación mediada por ARNip de los homólogos de R2R para descubrir el papel específico de los homólogos de R2R en la ruta. De hecho, el papel de los homólogos de R2R es modular la respuesta de VEGFA/VEGF¹⁶⁵ en la célula. La expresión basal de VEGFA y la isoforma de VEGF¹⁶⁵ es alta en el epitelio pulmonar. Las funciones y estructuras epiteliales son mucho más complejas que sus homólogas endoteliales. Por lo tanto, los efectos de VEGFA/VEGF¹⁶⁵ habituales de 'crecer y multiplicarse' en el endotelio deben ser más refinados en el endotelio. ¿Cómo se realiza esto? Los homólogos de R2R de expresión conducen a la modulación simultánea de la señalización de HIF1A (que confiere tolerancia al oxígeno), y modulación de una ruta antiapoptótica específica (PERP). Esto permitirá la (re)generación de células epiteliales fuertes (con una

barrera de defensa importante contra la tensión), sin la implantación de potencial de crecimiento ilimitado. En otras palabras, la modulación de una ruta antiapoptótica específica no es un "permiso" para la tolerancia general a la apoptosis. La tolerancia general a la apoptosis conduciría a la situación peligrosa de inmortalización de la célula: la célula se convierte en una célula cancerosa.

Este estudio arroja nueva luz sobre determinadas enfermedades pulmonares humanas. En recién nacidos prematuros, el desarrollo pulmonar embrionario tardío se interrumpe cuando el bebé nace prematuramente. Niveles insuficientes de proteína tensioactiva en los alvéolos pulmonares conducen a una dificultad respiratoria grave en un grupo grande de bebés prematuros. La instilación de tensioactivo en el pulmón neonatal ha ayudado a la prevención y el tratamiento de la insuficiencia respiratoria en bebés prematuros. Sin embargo, niveles altos de oxígeno y fuerzas de tensión de tracción de la ventilación mecánica todavía conducen a daño pulmonar crónico o displasia broncopulmonar (DBP). La aceleración de la diferenciación escamosa en vías respiratorias distales de bebés prematuros puede prevenir esta afección debilitante. La red de filamentos intermedios y la reposición sincronizada del grupo de células basales también pueden ser de suma importancia en la búsqueda de una cura de determinadas enfermedades pulmonares en adultos. La adopción de un fenotipo escamoso con expresión de algunos genes agrupados de EDC caracteriza la metaplasia escamosa en las vías respiratorias de adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Este mecanismo de defensa contra estímulos nocivos, sin embargo, se acompaña de la pérdida de células basales regenerativas³². Por el contrario, el embrión logra desarrollar un programa de diferenciación escamosa mientras que simultáneamente construye un depósito de células basales mediante una hoja de ruta bien definida. Esta hoja de ruta sirve como guía en la intervención farmacológica en el filamento intermedio o maquinaria transcripcional de células basales. También apunta a células *il+* transformadas como una fuente de células epiteliales pulmonares.

Características funcionales de R2R¹ y R2R²

La expresión dependiente de VEGF-A (isoforma de ratón VEGF¹⁶⁴ = isoforma VEGF¹⁶⁵) del grupo de filamento intermedio de genes se ha confirmado en el embrión de ratón. La expresión de estos genes de filamentos intermedios conduce a la diferenciación de células epiteliales pulmonares y el desarrollo del programa de células basales en células mesenquimatosas pulmonares.

Asimismo, la expresión dependiente de VEGF-A (isoforma de ratón VEGF¹⁶⁴ = isoforma VEGF¹⁶⁵) de genes de filamentos intermedios también se ha confirmado en células epiteliales primarias humanas adultas. La estimulación de estas células por la isoforma de VEGF-A VEGF¹⁶⁵ conduce a la regulación positiva de la expresión de genes de filamentos intermedios. La expresión de genes de filamentos intermedios en estas células está regulada negativamente por ARNip específicos de isoforma VEGF¹⁶⁵. En resumen, la expresión de genes de filamentos intermedios actúa como un paradigma de diferenciación y regeneración de las vías respiratorias. R2R¹ y R2R² desempeñan un papel específico en este programa de expresión.

R2R¹

La expresión de R2R¹ es VEGF-A (isoforma de ratón VEGF¹⁶⁴ = isoforma humana VEGF¹⁶⁵) dependiente del ratón. Las células mesenquimatosas del pulmón (células de tinción positivas para GS-IB4) adquieren un programa de expresión génica de células epiteliales basales. La expresión de R2R¹ es esencial para la transición mesenquimatosas a epitelial (MET).

El papel de R2R¹ en MET se ha confirmado ahora en tejido embrionario distinto del pulmón: se realiza terminación del tabique ventricular del corazón mediante MET. En el ratón, R2R¹ se expresa mucho en el tabique ventricular en desarrollo y es dependiente de VEGF-A (isoforma de ratón VEGF¹⁶⁴ = isoforma humana VEGF¹⁶⁵). Por el contrario, la expresión de R2R¹ no se encuentra en el tracto de salida del ventrículo derecho en desarrollo: se sabe que el desarrollo de esta estructura es independiente de MET (véase Figura 12)

R2R¹ es un gen candidato en ratón y ser humano para la transición mesenquimatosas a epitelial: la expresión de este gen transduce el efecto de VEGF-A (isoforma de ratón VEGF¹⁶⁴ = isoforma humana VEGF¹⁶⁵) sobre MET. El proceso inverso de MET es EMT (transición epitelial a mesenquimatosas). La EMT es una parte esencial de la progresión del cáncer y la metástasis. Por lo tanto, R2R¹ puede desempeñar un papel importante en la biología y la terapia del cáncer.

Asimismo, el análisis por ordenador reveló que el producto proteico de R2R¹ probablemente interactúe con el ribosoma. Aparte del impacto científico, la interacción de la estructura proteica de R2R¹ con el ribosoma tiene implicaciones para el desarrollo de fármacos en el campo de la biología del cáncer y la MET.

R2R²

Se ha descubierto que R2R² está muy expresado en células epiteliales primarias de pulmón del ser humano adulto. *In vitro*, se ha descubierto que la expresión de R2R¹ está regulada positivamente a lo largo del tiempo y que es dependiente de VEGF-A (isoforma VEGF¹⁶⁵). El producto proteico de R2R² es importante para la diferenciación y el mantenimiento normales del epitelio pulmonar adulto (véase Figura 13).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de identificación u obtención de agentes que modulan la expresión de los genes de R2R¹ y/o R2R², comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto los genes de R2R¹ y/o R2R² con un agente de ensayo y detectar cualquier modulación de la expresión génica de R2R^{1/2},
5 en donde el gen de R2R^{1/2} está codificado por una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las designadas SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11, o una secuencia al menos el 70 % idéntica a las mismas.
2. Un método *in vitro* según la reivindicación 1, en donde el método se realiza en un sistema a base de células o sin
10 células modificado para incluir los genes de R2R¹ y/o R2R².
3. Un método *in vitro* según la reivindicación 2, que comprende además transfectar las células con un ácido nucleico que comprende los genes de R2R¹ y/o R2R².
- 15 4. Un método *in vitro* según la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico es un vector.
5. Un método *in vitro* según cualquier reivindicación anterior, que comprende además comparar los resultados con los resultados obtenidos de un método de control en el que los genes de R2R¹ y/o R2R² no han entrado en contacto con un agente de ensayo.
20
6. Un método *in vitro* según la reivindicación 5, en donde cuando un nivel de expresión génica de R2R¹ y/o R2R² es menor o mayor que el nivel de expresión detectado en el método de control, el agente de ensayo puede ser útil como un modulador de la expresión génica de R2R¹ y/o R2R².
- 25 7. Un método *in vitro* según cualquier reivindicación anterior, en donde los agentes de ensayo se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos, oligonucleótidos antisentido, proteínas, péptidos, aminoácidos, anticuerpos, carbohidratos y moléculas orgánicas pequeñas.



Factor de cambio

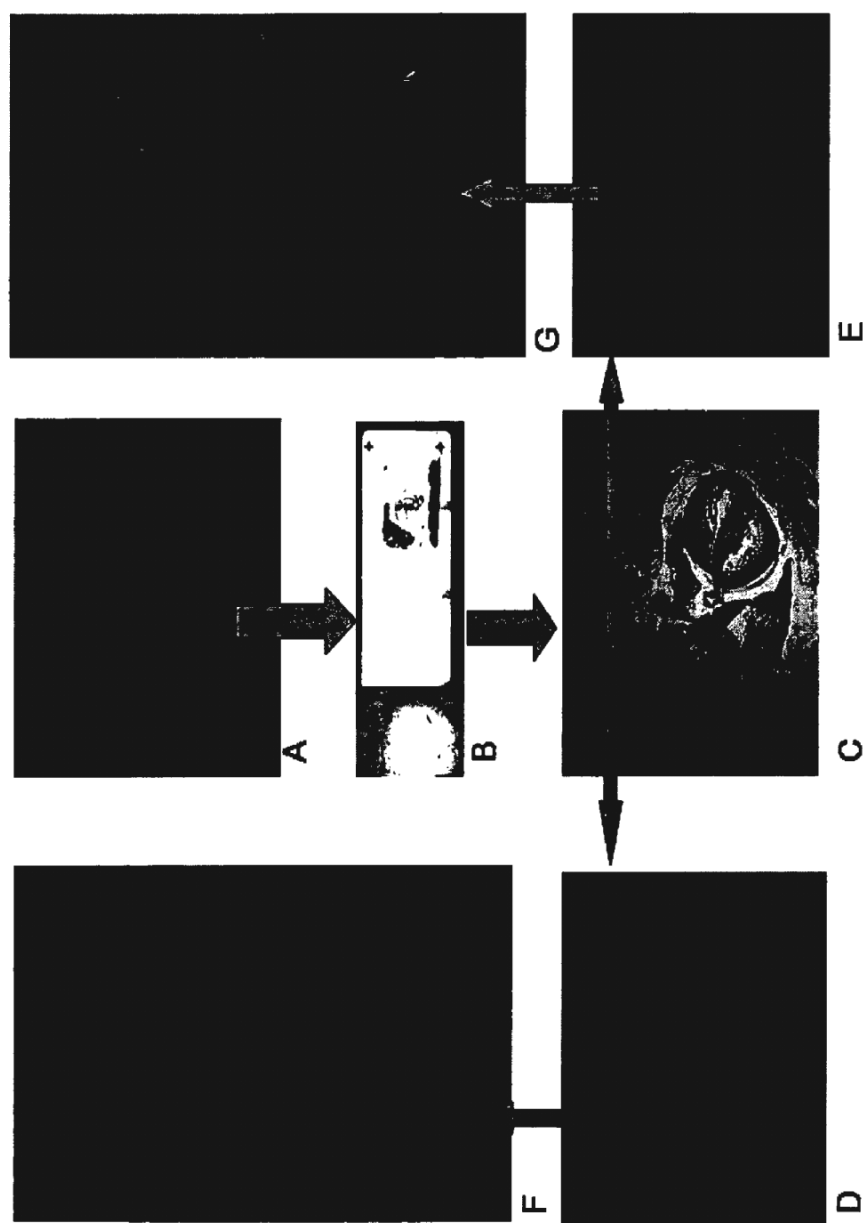


Figura 2



Figura 3

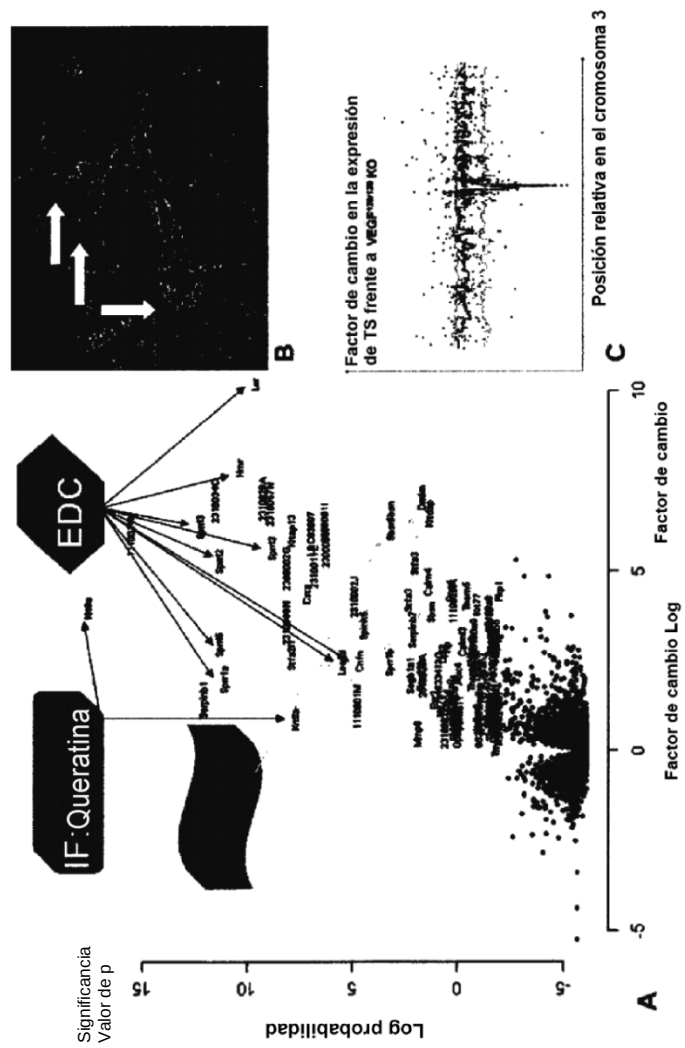


Figura 4

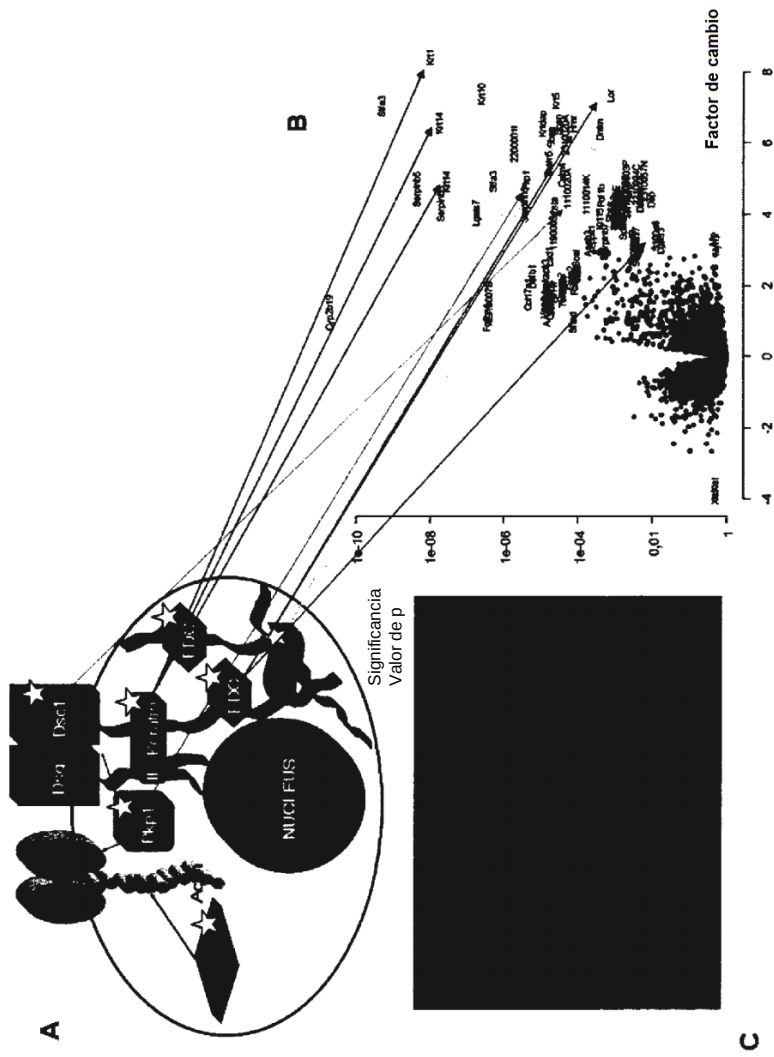


Figura 5



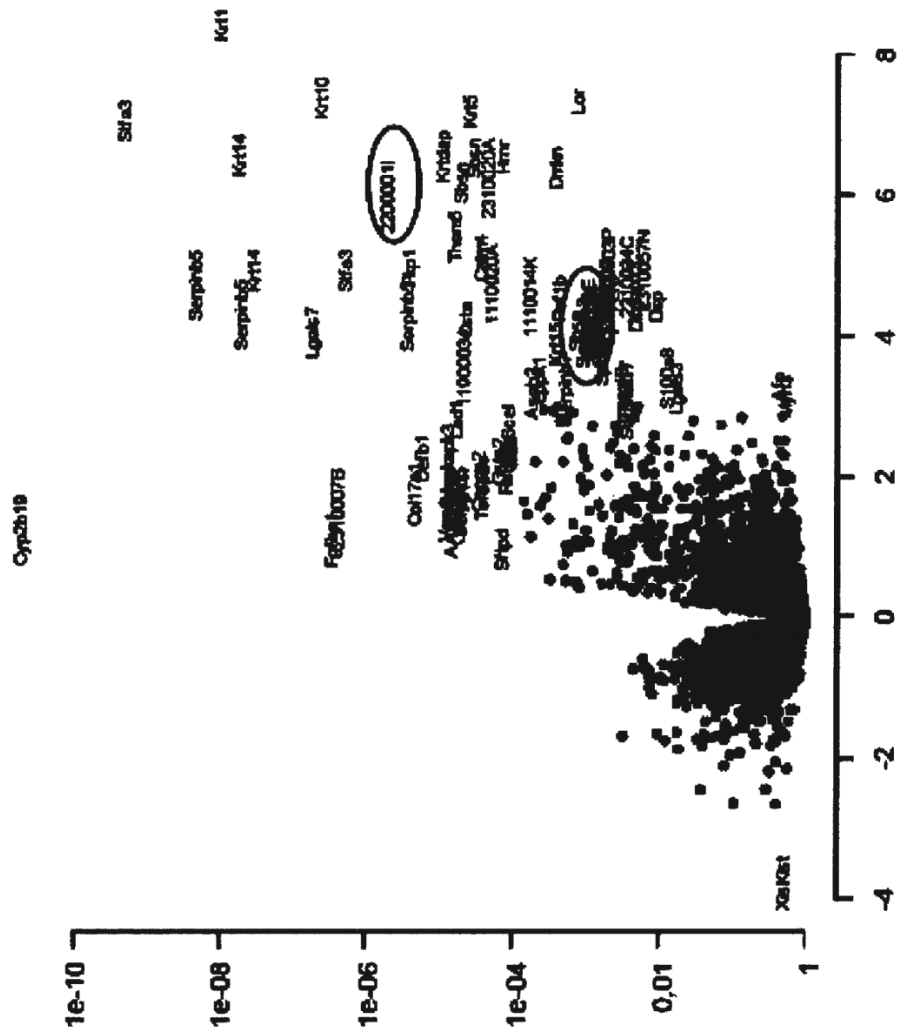


Figura 7

		(1)	1	10	20	30	41
hR4RA__ENST00000343959	(1)	-----					
R4Ra_pDONR201	(1)	ACACTGACACGGACCGAAGGAGTGGAAAAAGCTTTACCTGT					
Consenso	(1)						
		Sección 2					
		(42)	42	50	60	70	82
hR4RA__ENST00000343959	(1)	-ACTGTCTGCTGCCACACGATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGC					
R4Ra_pDONR201	(42)	CACTGTCTGCTGCCATACGATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGC					
Consenso	(42)	ACTGTCTGCTGCCA ACGATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGC					
		Sección 3					
		(83)	83	90	100	110	123
hR4RA__ENST00000343959	(41)	TGGCTGCCGAAGGCCTGGCCACCGCACCGAGAAGGCCACC					
R4Ra_pDONR201	(83)	TGGCGGCCGAGGGCCTGGCCACCGCACAGAGAAAGCCACT					
Consenso	(83)	TGGC GCCGA GGCCTGGCCACCGCAC GAGAA GCCAC					
		Sección 4					
		(124)	124	130	140	150	164
hR4RA__ENST00000343959	(82)	GAGGGAGCCATTTCATGCCGTGGAAGAAGTGGTGAAGGAGGT					
R4Ra_pDONR201	(124)	GGGGGAGCAGTTCACGCAGTGGGAAGAGGTGGTGAGCGAGGT					
Consenso	(124)	G GGGAGC TTCA GC GTGGAAGA GTGGTGA GAGGT					
		Sección 5					
		(165)	165	170	180	190	205
hR4RA__ENST00000343959	(123)	GGTGGGACACGCCAAGGAGACTGGAGAGAAAGCCATTGCTG					
R4Ra_pDONR201	(165)	GGTGGGCCACGCCAAGGAGGTGGAGAGAAAGACCATTAATG					
Consenso	(165)	GGTGGG CACGCCAAGGAG TGGAGAGAA CCATT TG					
		Sección 6					
		(206)	206	220	230	246	
hR4RA__ENST00000343959	(164)	AAGCCATAAAGAAAGCCCAAGAGTCAGGGGACAAAAAGATG					
R4Ra_pDONR201	(206)	ACGCCCTAAAGAAAGCCCAAGAATCAGGAGACAGGGTGGTG					
Consenso	(206)	A GCC TAAAGAAAGCCCAAGA TCAGG GACA G TG					
		Sección 7					
		(247)	247	260	270	287	
hR4RA__ENST00000343959	(205)	AAGGAAATCACTGAGACAGTGACCAACACAGTCACAAATGC					
R4Ra_pDONR201	(247)	AAGGAGGTCACTGAGAAGGTCACCCACACCATCACTGATGC					
Consenso	(247)	AAGGA TCACTGAGA GT ACC ACAC TCAC ATGC					
		Sección 8					
		(288)	288	300	310	328	
hR4RA__ENST00000343959	(246)	CATCACCCATGCAGCAGAGAGTCTGGACAAACTTGGACAGT					
R4Ra_pDONR201	(288)	TGTTACCCATGCGGCAGAAAGGCCTGGGAAGACTGGGACAGT					
Consenso	(288)	T ACCCATGC GCAGA G CTGG A ACT GGACAGT					
		Sección 9					
		(329)	329	340	350	369	
hR4RA__ENST00000343959	(287)	GAGTGCACCTGCTACCAACGGC---CCTTCCCCAGTCTCAA					
R4Ra_pDONR201	(329)	GAGCCTGCCTACCAGCATGGCTGGCCCTTCTGAAGGTCAA					
Consenso	(329)	GAG CCT C A CA GGC CCTTCC A TCAA					

Figura 8

						Sección 1	
		(1)	1	10	20	34	
Traducción de hR4RA	ENST00000343959	(1)	MLGGLGKLAAEGLAHRTEKATEGA				HAVEEVVKE
Traducción de R4Ra_pDONR201		(1)	MLGGLGKLAAEGLAHRTEKATGGA				HAVEEVVSE
	Consenso	(1)	MLGGLGKLAAEGLAHRTEKAT				GAIHAVEEVV E
						Sección 2	
		(35)	35	40	50	68	
Traducción de hR4RA	ENST00000343959	(35)	VVGHAKETGERAIA				A KKAQESGD K KE TET
Traducción de R4Ra_pDONR201		(35)	VVGHAKEVGEKTIN				A KKAQESGD V KE TEK
	Consenso	(35)	VVGHAKE GER I				DAIKKAQESGD K MKEITE
						Sección 3	
		(69)	69	80	90		
Traducción de hR4RA	ENST00000343959	(69)	VTNT TNA				THAAESLD LGQ-
Traducción de pDONR201		(69)	VTHT TDA				THAAEGLG LGQ-
	Consenso	(69)	VT TIT AI				THAAE L KLGQ

Figura 9

Sección 10					
	(370)	370	380	390	400 410
hR4Rd_ENST00000359069	(370)	CCCTCAGAGCCCAGGCCTGGGCTGCCACCCACCTGAGGACG			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(1)	-----			
Consenso	(370)				
Sección 11					
	(411)	411	420	430	440 451
hR4Rd_ENST00000359069	(411)	AGGGCTGGGCCAGCTGTCGTGCTCCAGTTGCTGGGGCCTCT			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(1)	-----GTGACTGGCTGCTGT-CTCTAGTTGTTGAGGCCTCT			
Consenso	(411)	G C GCTG GT CTC AGTTG TG GGCCTCT			
Sección 12					
	(452)	452	460	470	480 492
hR4Rd_ENST00000359069	(452)	TGGGATCTTGGG---AACCCCAT-CTCT-GAGCCCC-----			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(36)	TGGGATCTYGGCGCTMACMCCWTGCTYTAGWGA CTCCGATA			
Consenso	(452)	TGGGATCT GG AC CC T CT T G G C C			
Sección 13					
	(493)	493	500	510	520 533
hR4Rd_ENST00000359069	(483)	-----GCCCA-TGGCCCCGCCCTCCCAAGGAGGGA			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(77)	GCTCCCRMGGCTCCAGTGSASMCCCTCGGKCGGNGGNAGGGA			
Consenso	(493)	GC CCA TG C C C G AGGGA			
Sección 14					
	(534)	534	540	550	560 574
hR4Rd_ENST00000359069	(514)	AAAGGCGGCTGCCAGTCGCTCAACTCAG--GCACTGGGACC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(118)	AAAGGCACTTGCTGGTAGCTCTGCTCACCCGCACTGGGACC			
Consenso	(534)	AAAGGC TGC GT GCTC CTCA GCACTGGGACC			
Sección 15					
	(575)	575	580	590	600 615
hR4Rd_ENST00000359069	(553)	TAGAGCTCAGAAGACCGAGAGGACAGACTGCCGTGTTGCCA			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(159)	TGGAGCTG-GAGGACTAAGAAGACAGACGGC--TGCTGCTT			
Consenso	(575)	T GAGCT GA GAC AGA GACAGAC GC TG TGC			
Sección 16					
	(616)	616	630	640	656
hR4Rd_ENST00000359069	(594)	-CCACAGGCTGGACCATGGACCCCCAAGAGATGGTCGTCAA			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(197)	GCCACAGCCTGGACCATGGACCCCCATGAGATGGTTGTGAA			
Consenso	(616)	CCACAG CTGGACCATGGACCCCCA GAGATGGT GT AA			
Sección 17					
	(657)	657	670	680	697
hR4Rd_ENST00000359069	(634)	GAACCCATATGCCCACATCAGCATCCCCGGGCTCACCTGC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(238)	GAATCCATATGCCCACATCAGCATTCCTCGGGCTCACCTGC			
Consenso	(657)	GAA CCATATGCCCACATCAGCAT CC CGGGCTCACCTGC			
Sección 18					
	(698)	698	710	720	738
hR4Rd_ENST00000359069	(675)	GGCCTGACCTGGGGCAGCAGTTAGAGGTGGCTTCCACCTGT			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(279)	GCTCTGACCTGGGGCAGCAGTTAGAGGAGGTTCTTCTTCA			
Consenso	(698)	G CTGACCTGGGGCAGCAGTTAGAGG GG T C C T			

Figura 10

Sección 19					
	(739)	739	750	760	779
hR4Rd_ENST00000359069	(716)	TCCTCATCCTCGGAGATGCAGCCCCTGCCAGTGGGGCCCTG			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(320)	TCTTCCTCCTCTGAGACTCAGCCTCTGCCTGCAGGAACATG			
Consenso	(739)	TC TC TCCTC GAGA CAGCC CTGCC G GG C TG			
Sección 20					
	(780)	780	790	800	820
hR4Rd_ENST00000359069	(757)	TGCCCCAGAGCCAACCCACCTCTTGCCAGCCGACCGAGGTCC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(361)	TATCCCAGAGCCAGTGGGCCTCTTACAACTACTGAAGCCC			
Consenso	(780)	T CCCAGAGCCA CCTCTT CA C AC GA G CC			
Sección 21					
	(821)	821	830	840	861
hR4Rd_ENST00000359069	(798)	CAGGGCCCCAAGGGCGCCAAGGGTAACCAGGGGGCTGCCCCC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(402)	CTGGGGCCCCAAGGTATCAAGGGCATCAAGGGTACTGCTCCT			
Consenso	(821)	C GGGCCCCA GG CAAGGG A C AGGG CTGC CC			
Sección 22					
	(862)	862	870	880	902
hR4Rd_ENST00000359069	(839)	ATCCAGAACCAGCAGGCCTGGCAGCAGCCTGGCAACCCCTA			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(443)	GAGCACGGCCAGCAGACCTGGCAGTCACCCTGCAATCCCTA			
Consenso	(862)	CA CCAGCAG CCGGCAG CC GCAA CCCTA			
Sección 23					
	(903)	903	910	920	943
hR4Rd_ENST00000359069	(880)	CAGCAGCAGTCAGCGCCAGGCCGGACTGACCTACGCTGGCC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(484)	TAGCAGTGGGCAACGTCCATCGGGACTGACTTATGCTGGCC			
Consenso	(903)	AGCAG G CA CG C C G GACTGAC TA GCTGGCC			
Sección 24					
	(944)	944	950	960	984
hR4Rd_ENST00000359069	(921)	CTCCGCCCCGCGGGGCGCGGGGATGACATCGCCCACTGTC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(525)	TGCCACCTGTAGGGCGTGGTGATGACATTGCCCACTGTC			
Consenso	(944)	CC CC G GGGCG GG GATGACAT GCCCACTGTC			
Sección 25					
	(985)	985	990	1000	1025
hR4Rd_ENST00000359069	(962)	TGCTGCTGCCCCCTGCTGCCACTGCTGCCACTGCCCCCCTT			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(566)	TGCTGCTGCCCCCTGCTGCTCCTGCTGCCACTGTCCTCGCTT			
Consenso	(985)	TGCTGCTGCCC TGCTGC CTGCTGCCACTG CC C CTT			
Sección 26					
	(1026)	1026	1040	1050	1066
hR4Rd_ENST00000359069	(1003)	CTGCCGCTGCCACAGCTGCTGCTGCTGTGTCATCTCCTAGC			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(607)	CTGCCGTTGTACAGCTGTT-----GTGTTATCTCCTAGC			
Consenso	(1026)	CTGCCG TG CACAGCTG T GTGT ATCTCCTAGC			
Sección 27					
	(1067)	1067	1080	1090	1107
hR4Rd_ENST00000359069	(1044)	CCAGCCCACCCTGCCAGGGCCAGGACCCAGACTTCAGCAAA			
R4Rd_2310002J15Rikcontig	(642)	-----TGACTATTGAACCTCCAGGGCTGTG----CAGCCCA			
Consenso	(1067)	AC T A CCAGG C G CAGC A			

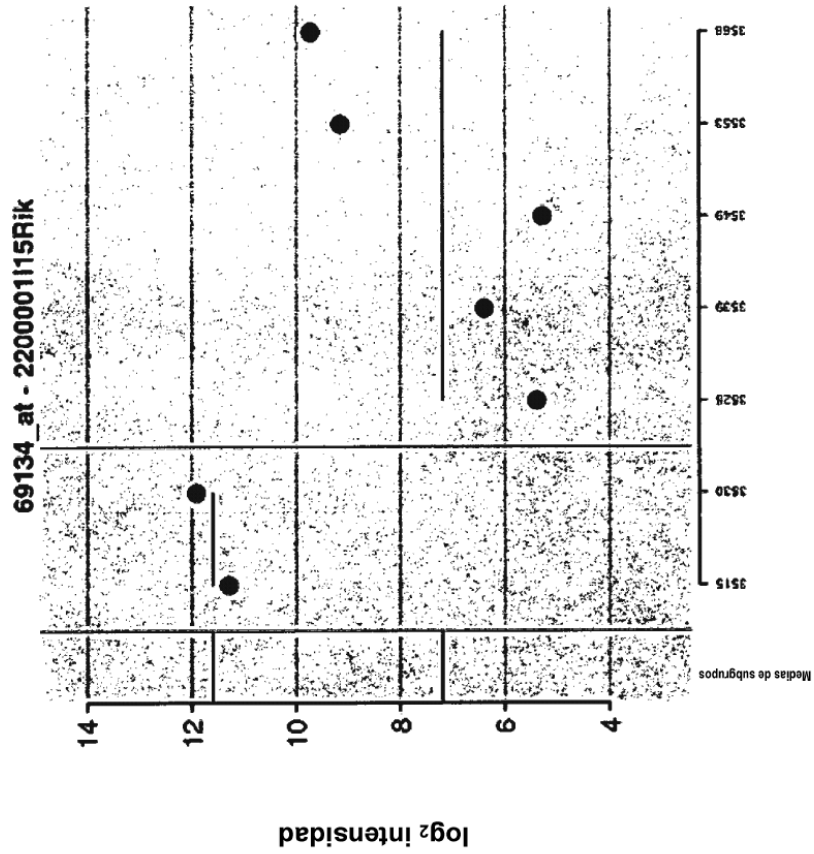
Figura 10 cont

					Sección 28
(1108)	1108	1120	1130	1148	
hR4Rd_ENST00000359069 (1085)	TGTGGCTCACACAGTGCCGGGACATGCCGGGACATGCCGGG				
R4Rd_2310002J15Rikcontig (674)	GGTTCCTG-CTCAATGCCAAAGTGTGCTGGACATCAGGAG				
Consenso (1108)	GT	CT	C CA TGCC	T C GGACAT GG G	
					Sección 29
(1149)	1149	1160	1170	1189	
hR4Rd_ENST00000359069 (1126)	TGGCTGTTGTCATGGGCGTCTGCCCTTCACACCAGGCACT				
R4Rd_2310002J15Rikcontig (714)	CAGCCGTTGTCATGAGCATCAGCCATTTCTGCTGCCCTGAGCA				
Consenso (1149)	GC	GTTGTCATG	GC TC GCC TTC	CC G C	
					Sección 30
(1190)	1190	1200	1210	1220	1230
hR4Rd_ENST00000359069 (1167)	GGGGCTCAGACCCACCAGGAAGGTGGCCGTTTCAGCCCGAGC				
R4Rd_2310002J15Rikcontig (755)	GGGGAGCCTGTCCACCAG-----CGTTCAGCTGTAGC				
Consenso (1190)	GGGG	C	CCACCAG	CGTTCAGC	AGC
					Sección 31
(1231)	1231	1240	1250	1260	1271
hR4Rd_ENST00000359069 (1208)	-TCCTGAAACGGAATCCCAGGTCCTGGC-----TGG-----				
R4Rd_2310002J15Rikcontig (787)	CTTCTGGAATAGGGTTCCAGCCACTAGCCATGTTGGCAACA				
Consenso (1231)	T	CTG AA	G T CCAG	CT GC	TGG
					Sección 32
(1272)	1272	1280	1290	1300	1312
hR4Rd_ENST00000359069 (1238)	AGAGGGACACCCCTGATTACCTT-AAGGCCAGGCAATAAA				
R4Rd_2310002J15Rikcontig (828)	ACAGGGACACCCCTCACGTCCTGCAAGACTTTGGCAATAAA				
Consenso (1272)	A	AGGGACACC	T A	CCT AAG C	GGCAATAAA
					Sección 33
(1313)	1313	1320	1330	1340	1353
hR4Rd_ENST00000359069 (1278)	GCAGGGTGATCTTC-----				
R4Rd_2310002J15Rikcontig (869)	GCAGGATGAGCGTTGCTGNNCCTGNTGAAAANAAAMWAAAW				
Consenso (1313)	GCAGG	TGA	C T		

Figura 10 cont

		Sección 1			
	(1)	1	10	20	33
Traducción de hR4Rd_ENST00000359069	(1)	MAPPLPRREKAAASRSTQALGPRAQKTERTD CR			
Traducción de R4Rd_2310002J15Rikontig	(1)	-----			
Consenso	(1)				
		Sección 2			
	(34)	34	40	50	66
Traducción de hR4Rd_ENST00000359069	(34)	VATTGWTMDPQEMVVKNPYAHISIPRAHLRPDL			
Traducción de R4Rd_2310002J15Rikontig	(1)	-----MDPHEMVVKNPYAHISIPRAHLRSDL			
Consenso	(34)	MDP EMVVKNPYAHISIPRAHLR DL			
		Sección 3			
	(67)	67		80	99
Traducción de hR4Rd_ENST00000359069	(67)	GQOLEVAS CSSSSEMQLPVGPCAPEPTHLLQ			
Traducción de R4Rd_2310002J15Rikontig	(27)	GQOLEEVP SSSSSETQLPAGTCIPEPVGLLQ			
Consenso	(67)	GQOLE S SSSSE QPLP G C PEP LLQ			
		Sección 4			
	(100)	100	110	120	132
Traducción de hR4Rd_ENST00000359069	(100)	PTEVPGPKGARGNQGAAPIONQQAQQPGNPYS			
Traducción de R4Rd_2310002J15Rikontig	(60)	TTEAPGPKGIRKIKGTAPHEGQQTWQSPCNPYS			
Consenso	(100)	TE PGPKG KG G AP QQ WQ P NPYS			
		Sección 5			
	(133)	133	140	150	165
Traducción de hR4Rd_ENST00000359069	(133)	SSQRQ GLTYAGPPPAGRGDDIAHHCCCCPCC			
Traducción de R4Rd_2310002J15Rikontig	(93)	SGQRP GLTYAGLPPVGRGDDIAHHCCCCPCC			
Consenso	(133)	S QR AGLTYAG PP GRGDDIAHHCCCCPCC			
		Sección 6			
	(166)	166		184	
Traducción de hR4Rd_ENST00000359069	(166)	CCHCPFFCRCHSCCCCVIS			
Traducción de R4Rd_2310002J15Rikontig	(126)	CCHCPRFCHSCCVIS--			
Consenso	(166)	CCHCP FCRCHSCC			

Figura 11



VEGF-A (regulación positiva de R2R¹ dependiente de VEGF¹⁶⁴ en el septo ventricular en desarrollo del embrión de ratón). Rojo = tipo silvestre, azul = ratón con desactivación de VEGF^{120/120}, que carece de la isoforma VEGF¹⁶⁴.

Figura 12

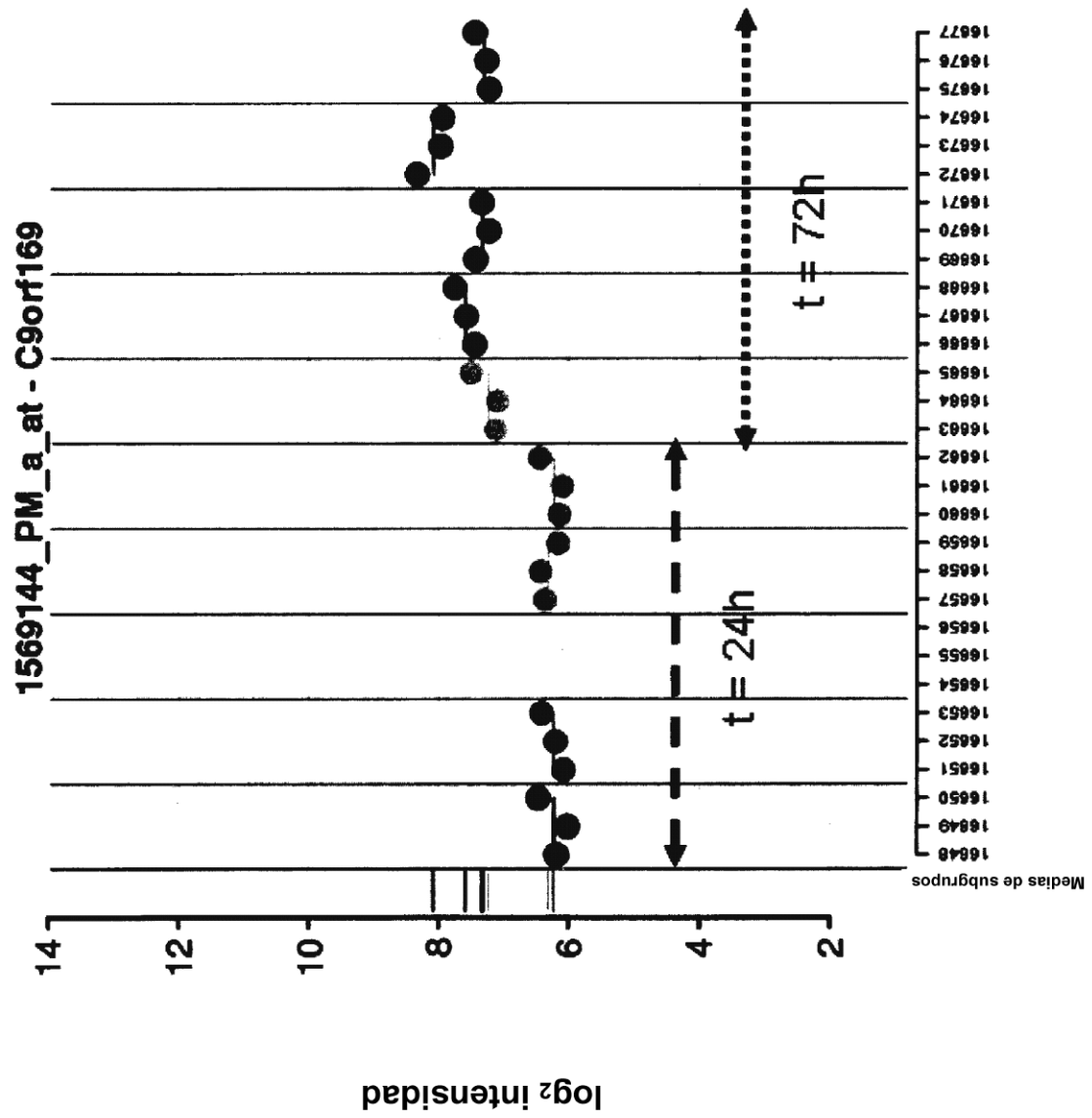


Figura 13

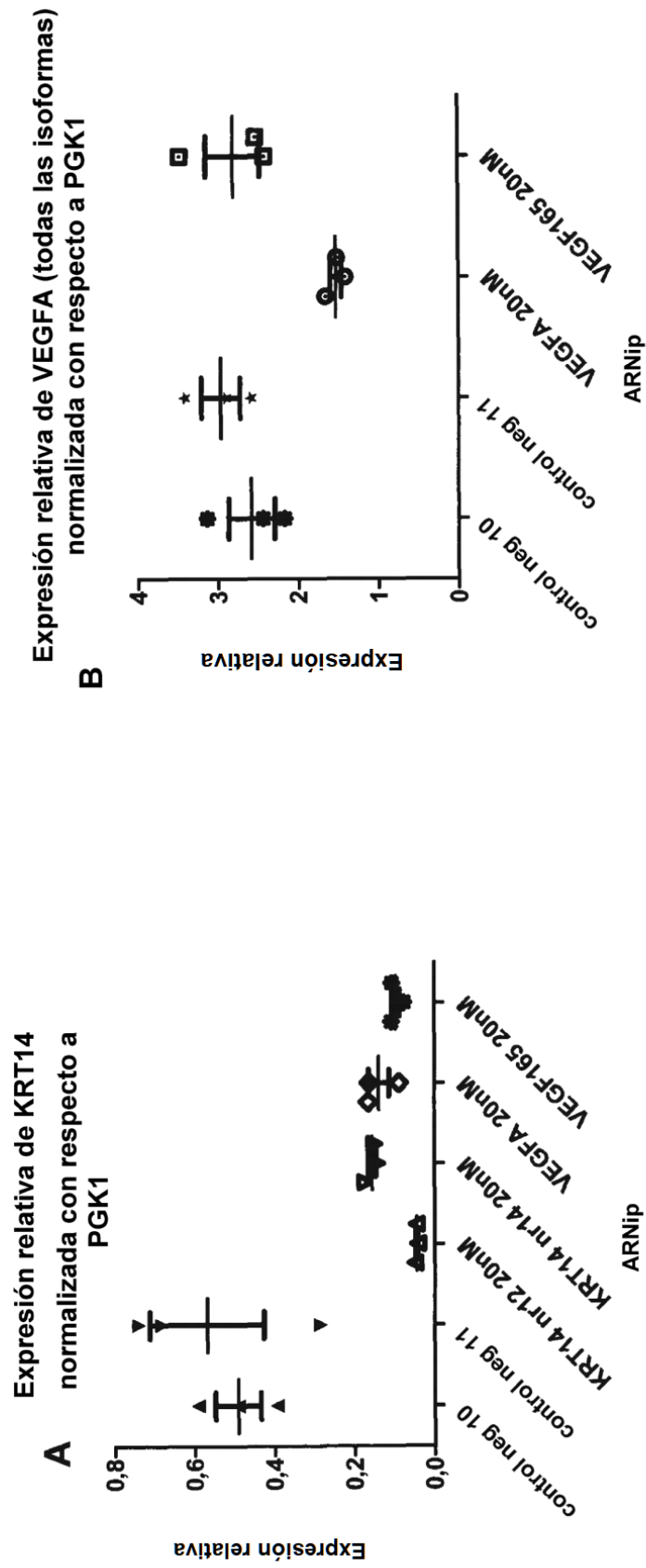


Figura 14

Expresión relativa de VEGFA165 (específica de isoforma)
normalizada con respecto a PGK1

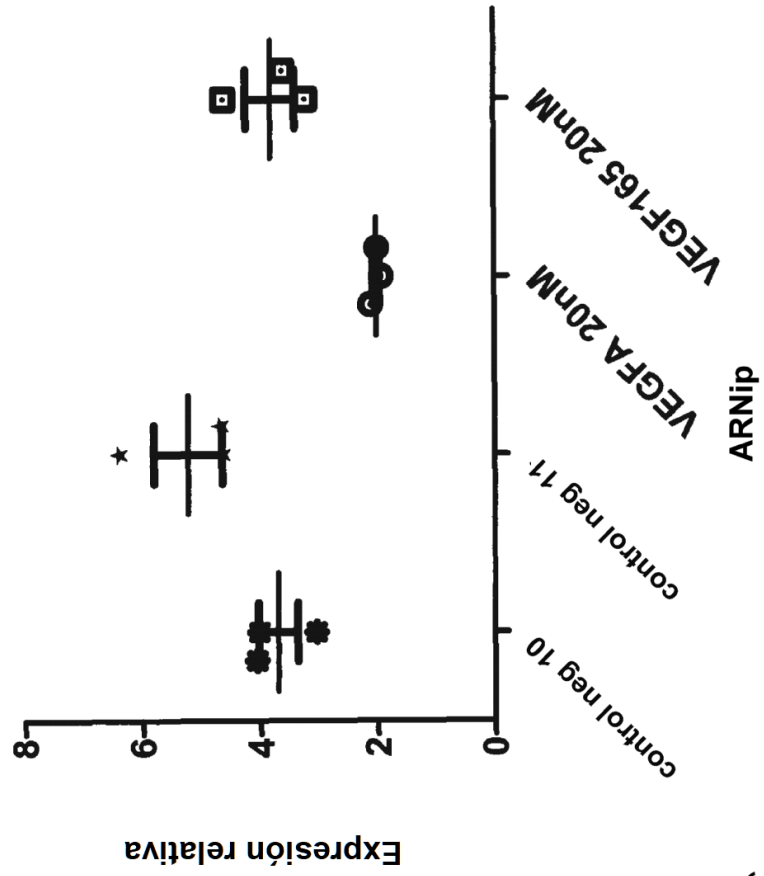


Figura 14 C

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes GO:0030216:9606

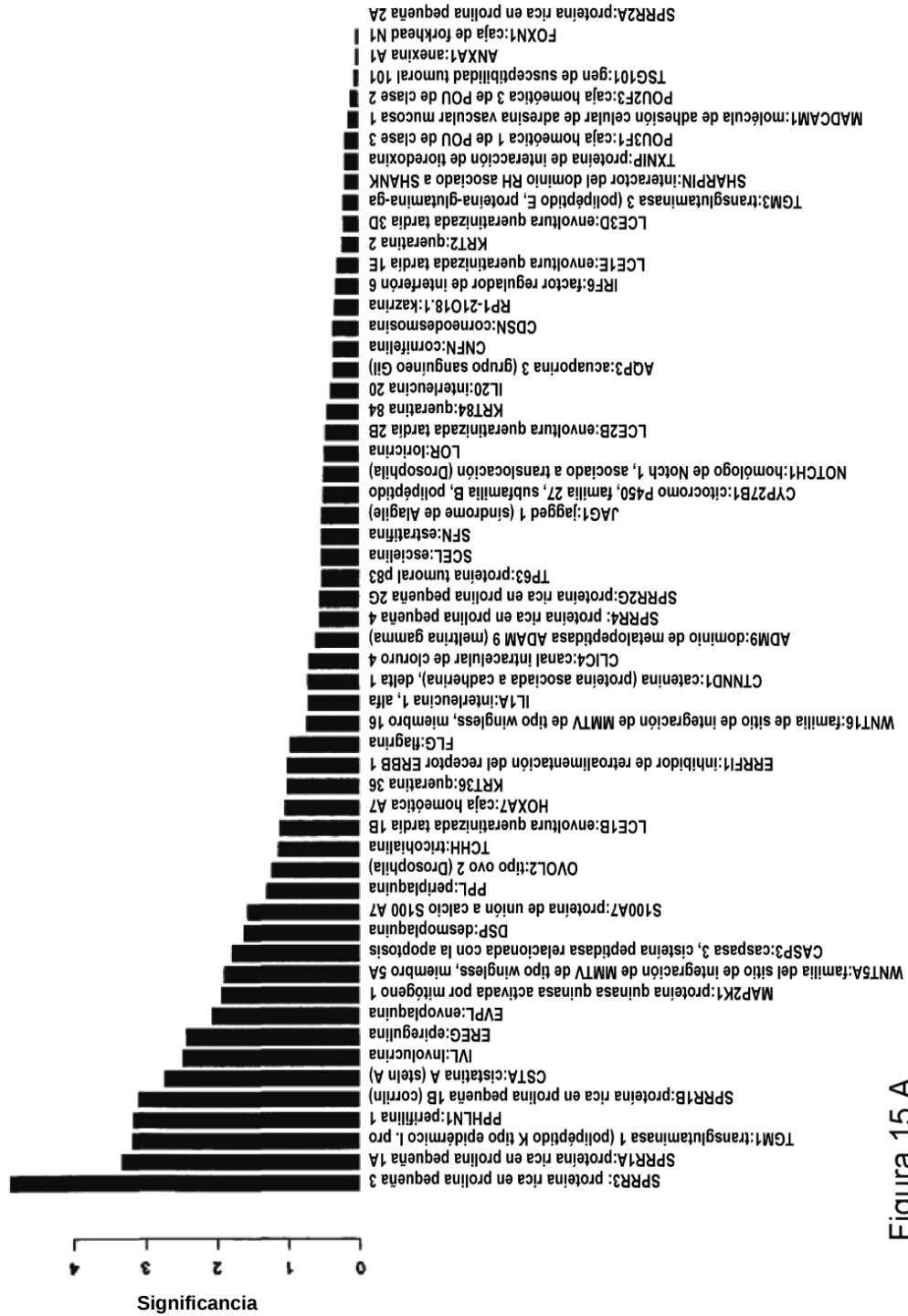


Figura 15 A

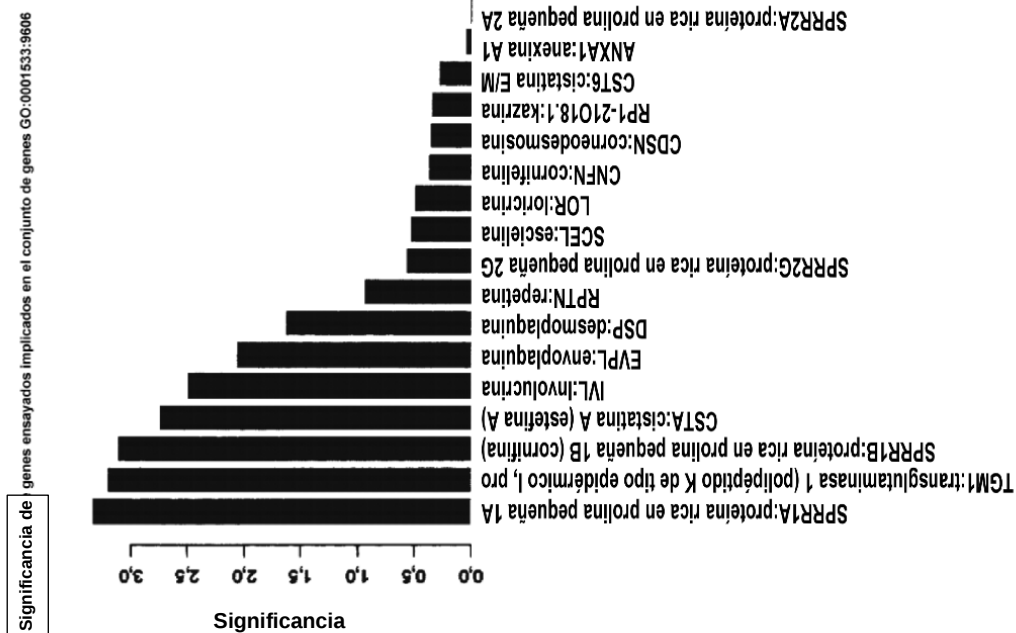
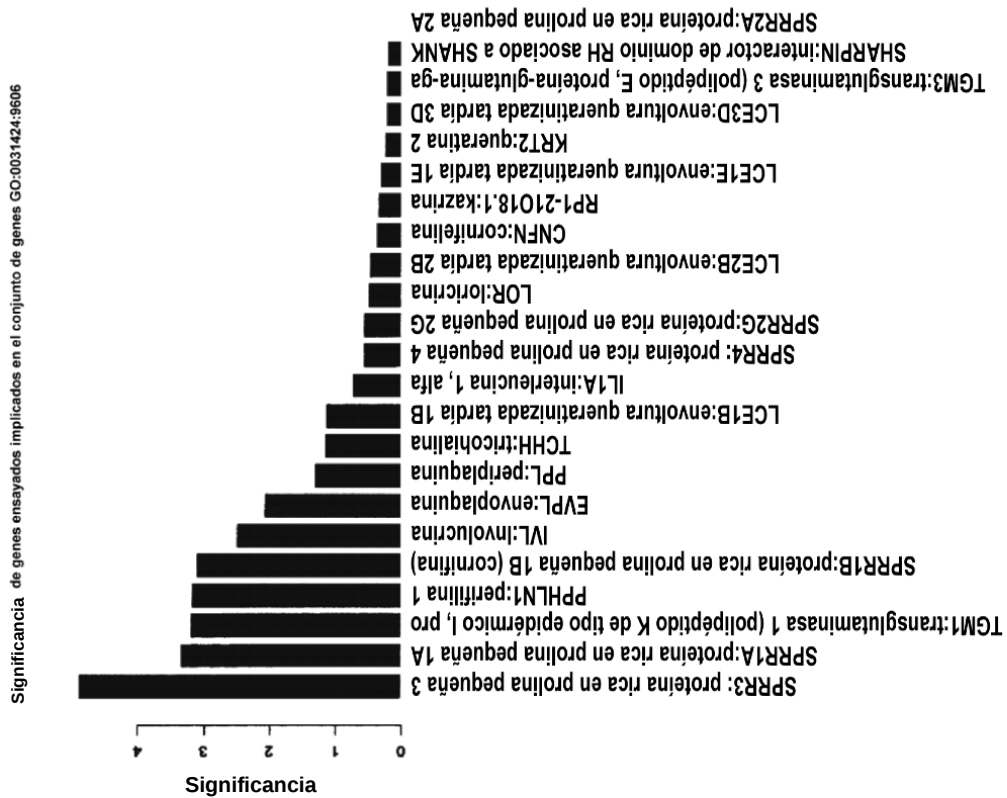
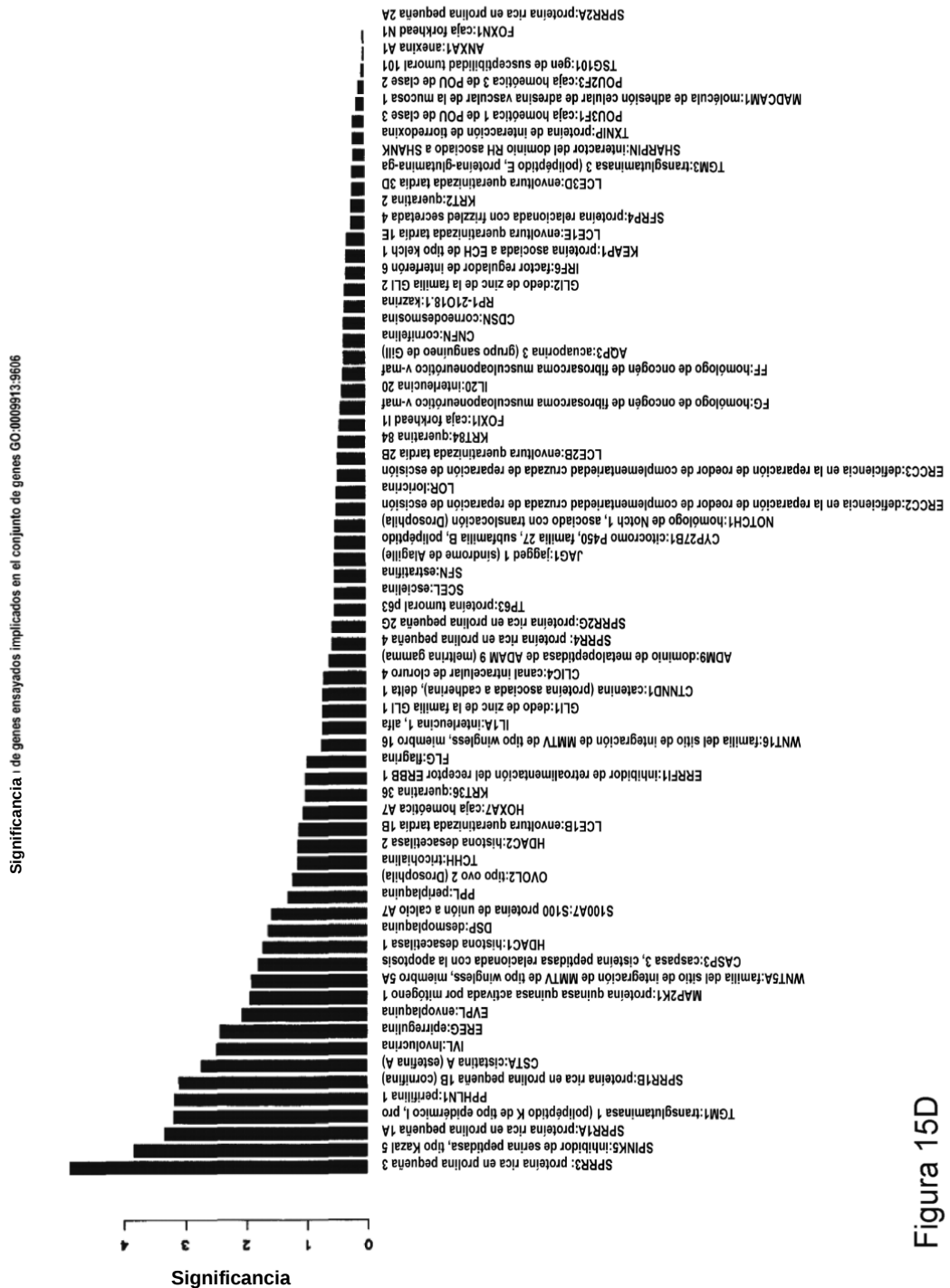


Figura 15 B y C



Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes GO:0030216:10090



Figura 15E

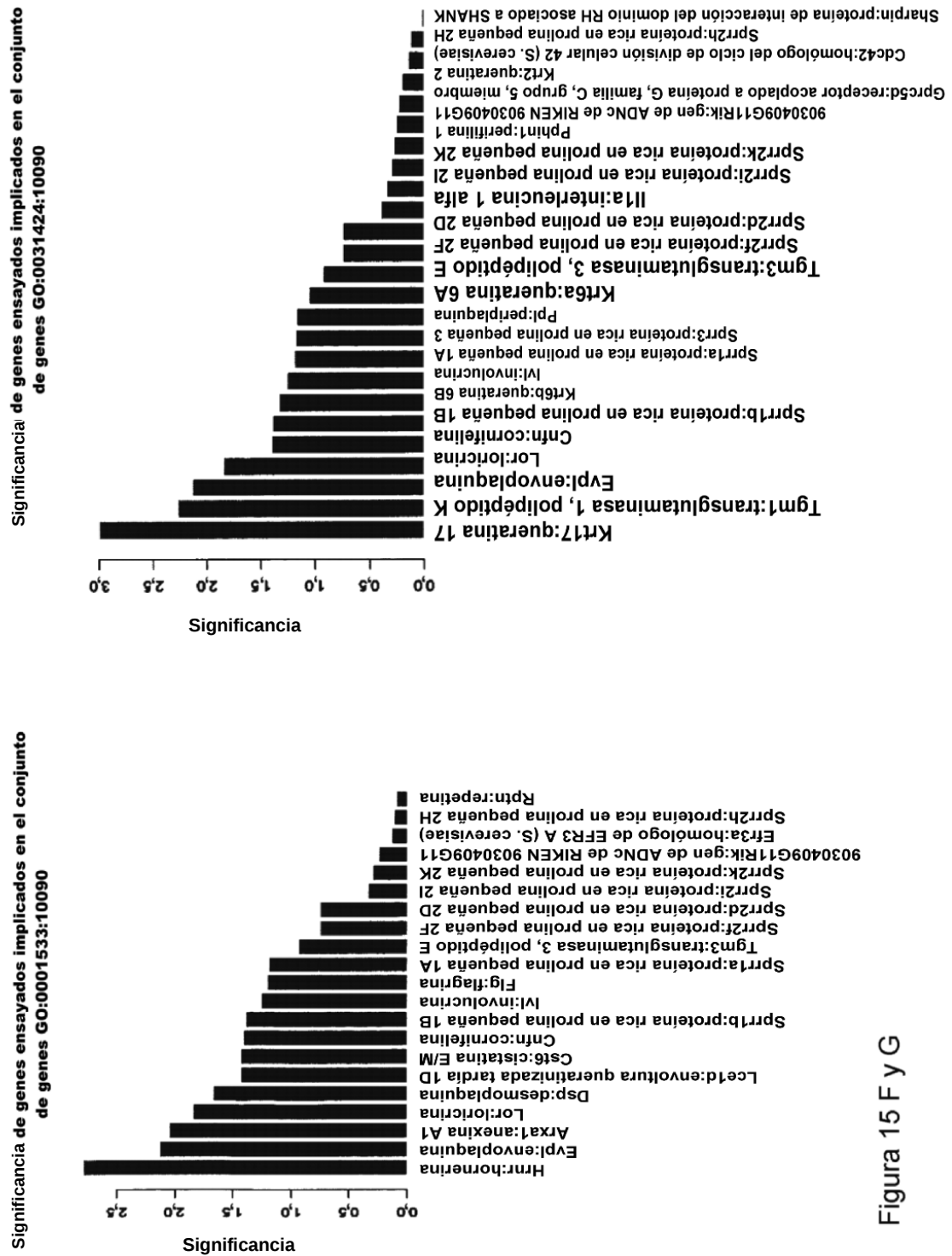


Figura 15 F y G

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes GO:0009913:10090

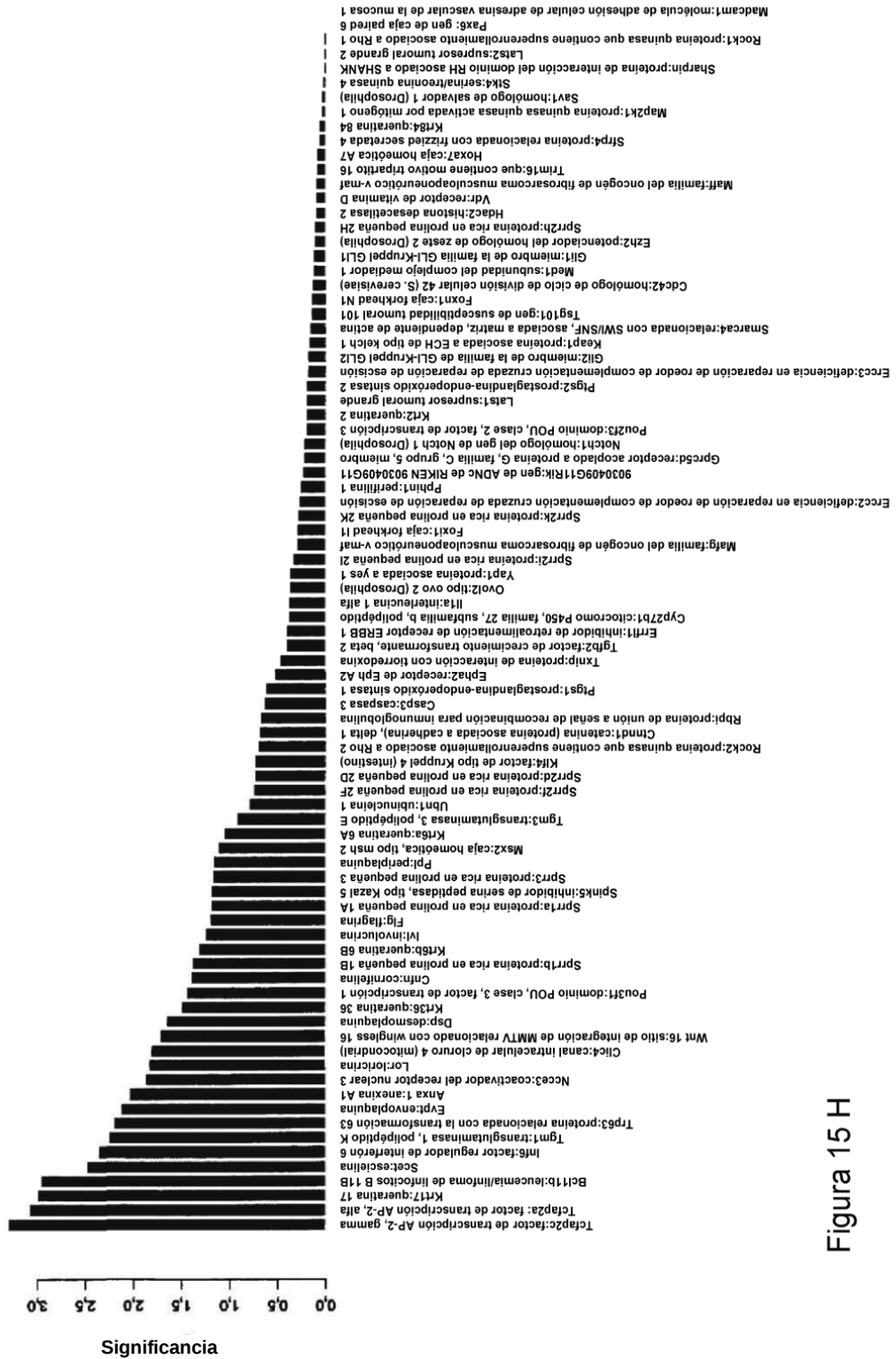


Figura 15 H

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes 1488:10090

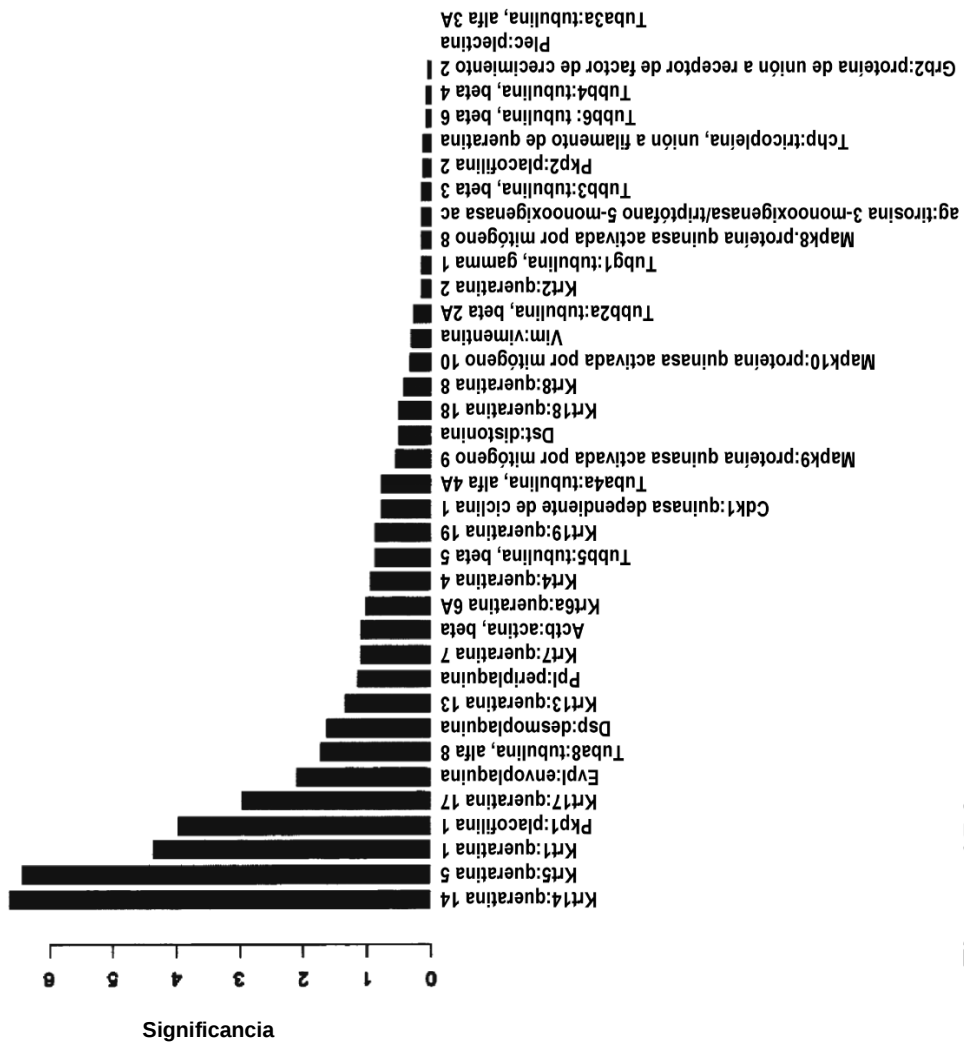


Figura 15 I

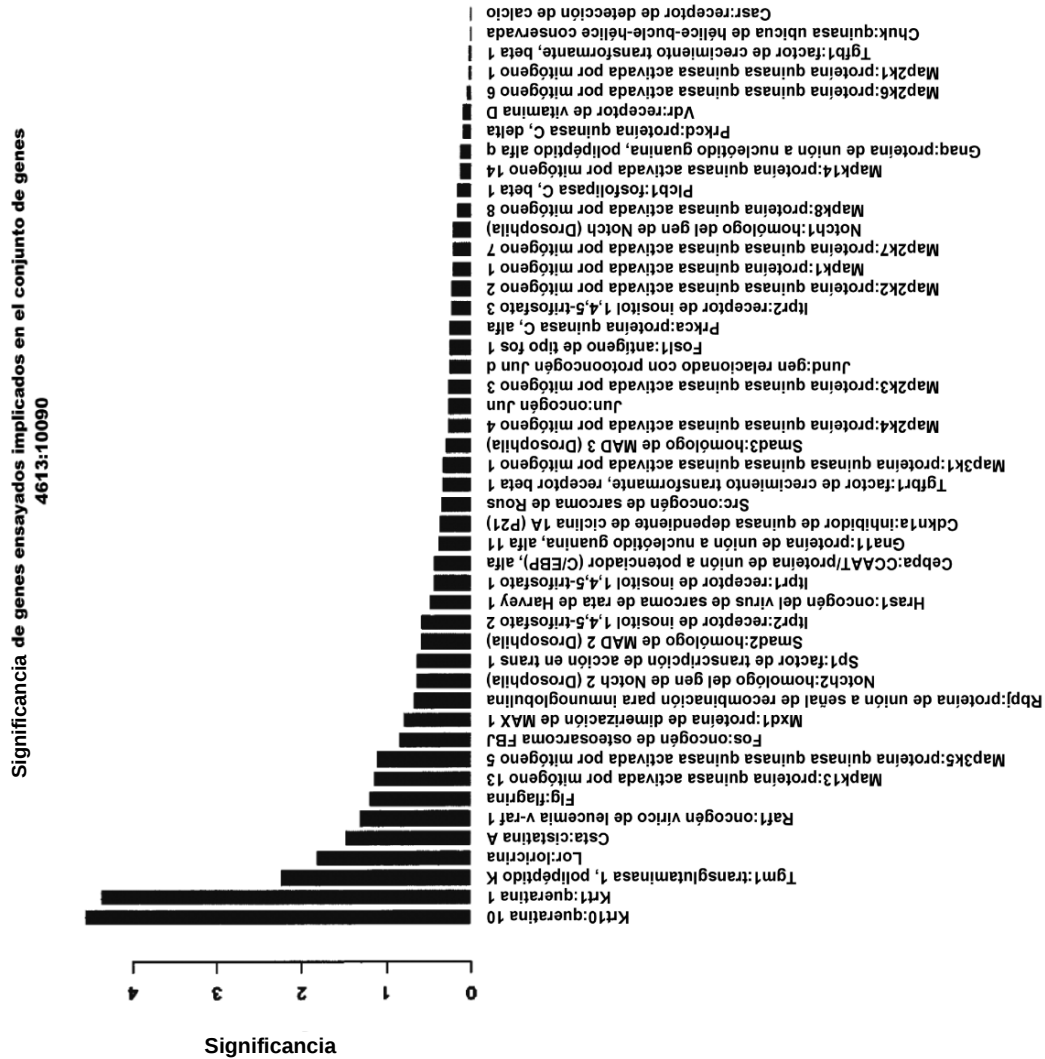


Figura 15 J

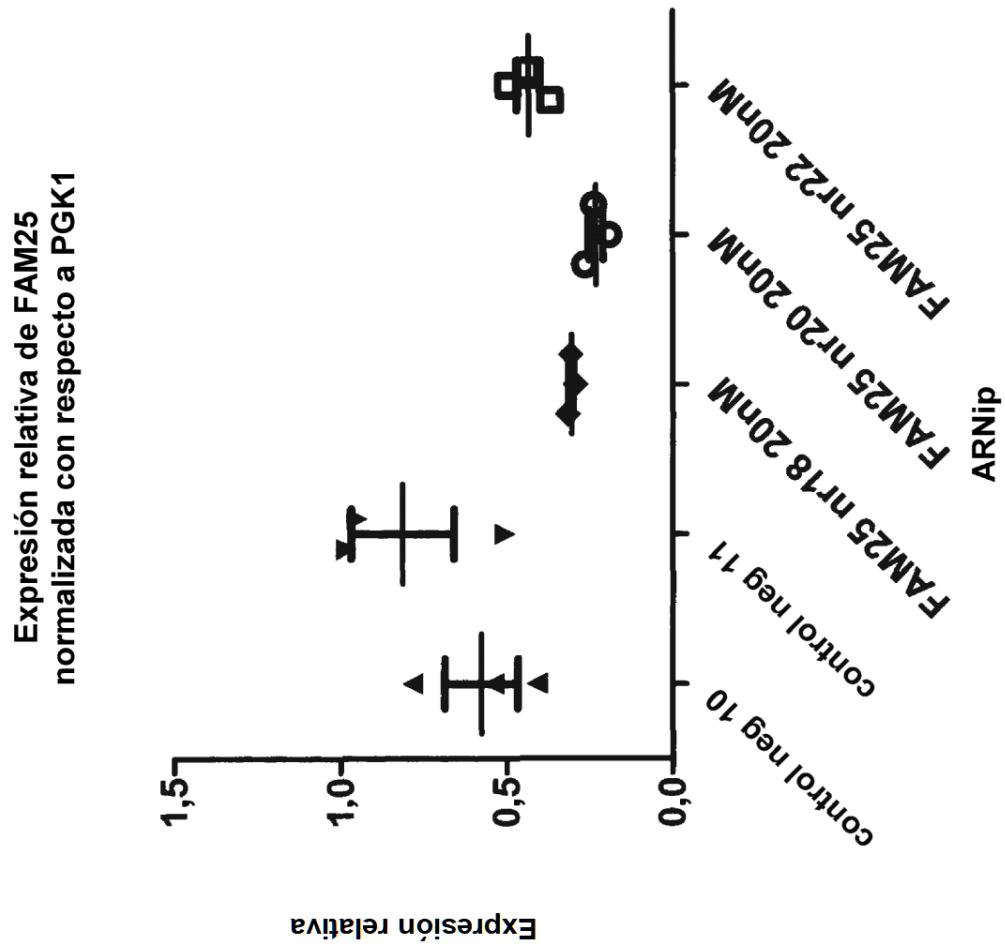


Figura 16 A

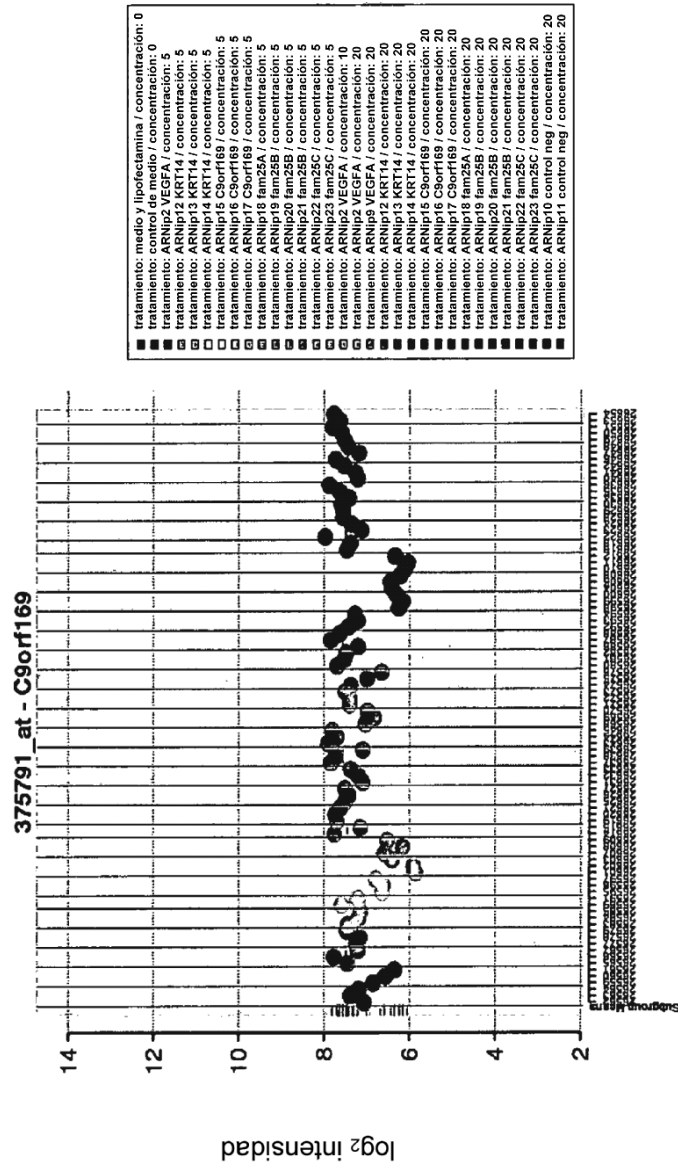


Figura 16B

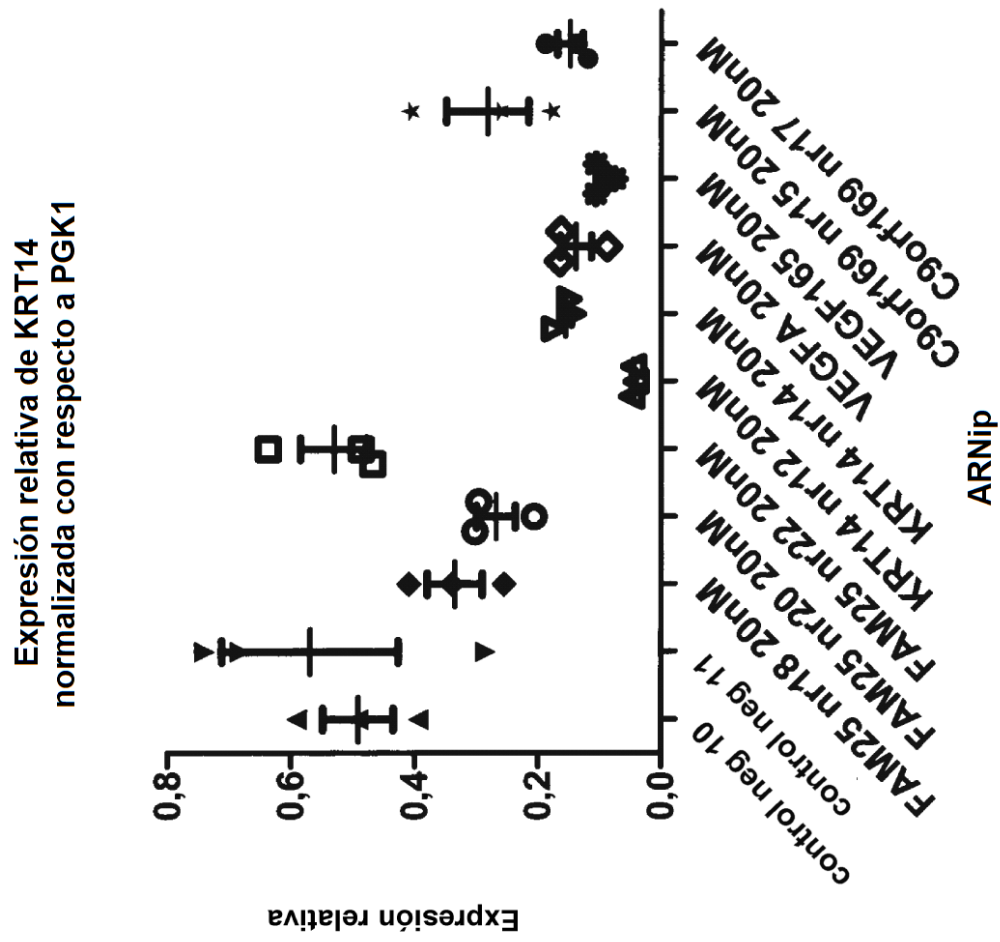


Figura 16C

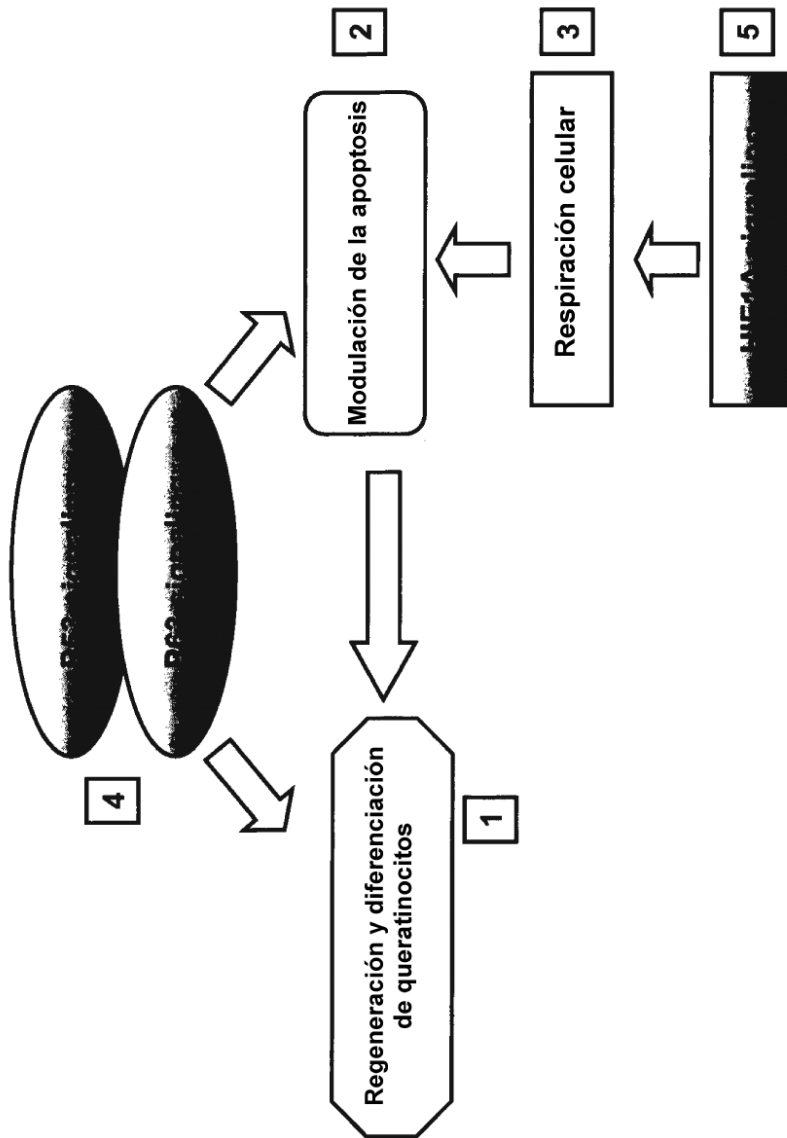


Figura 17

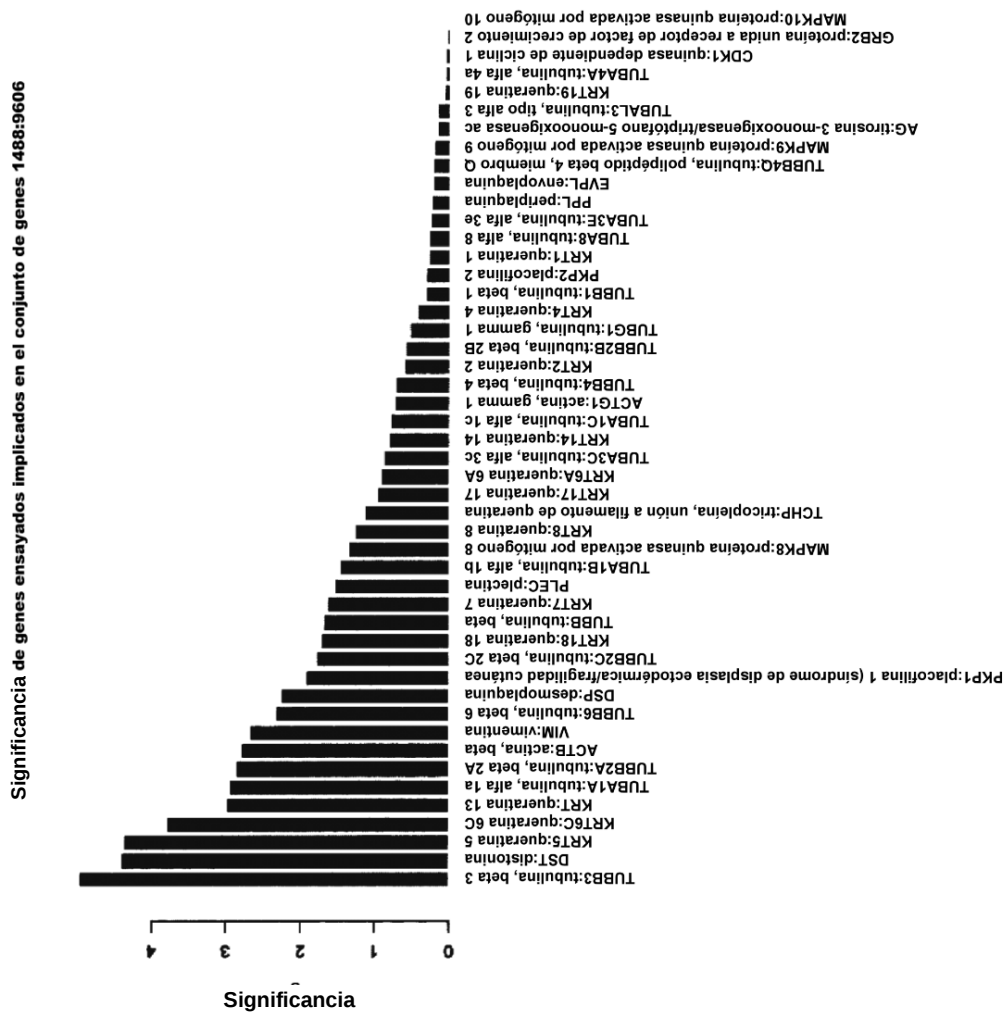


Figura 18 A

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes - 1110667637:9606

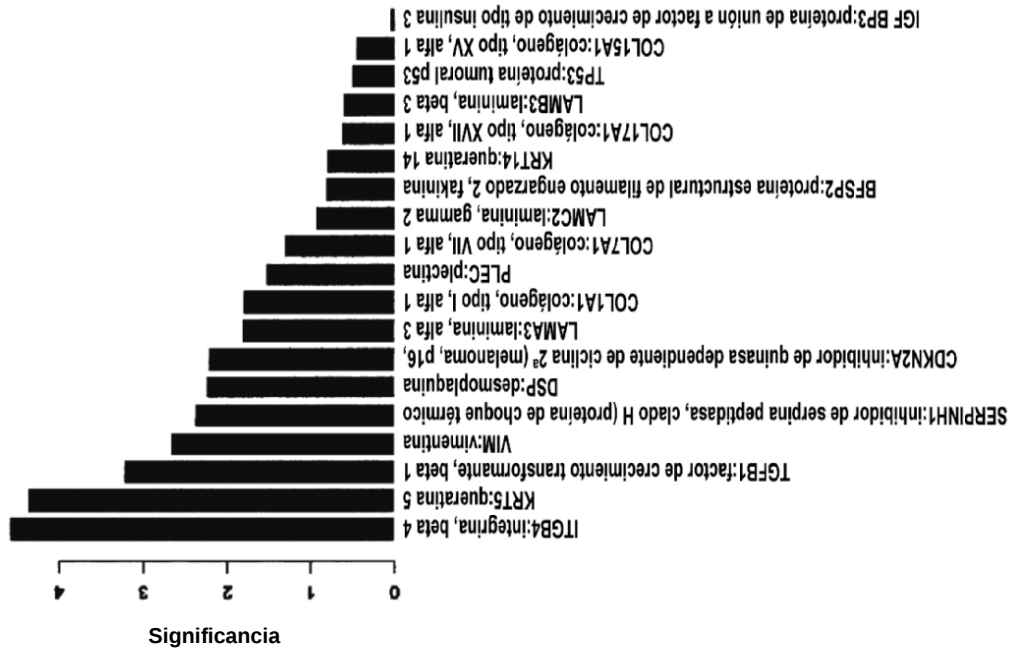
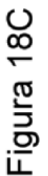


Figura 18B



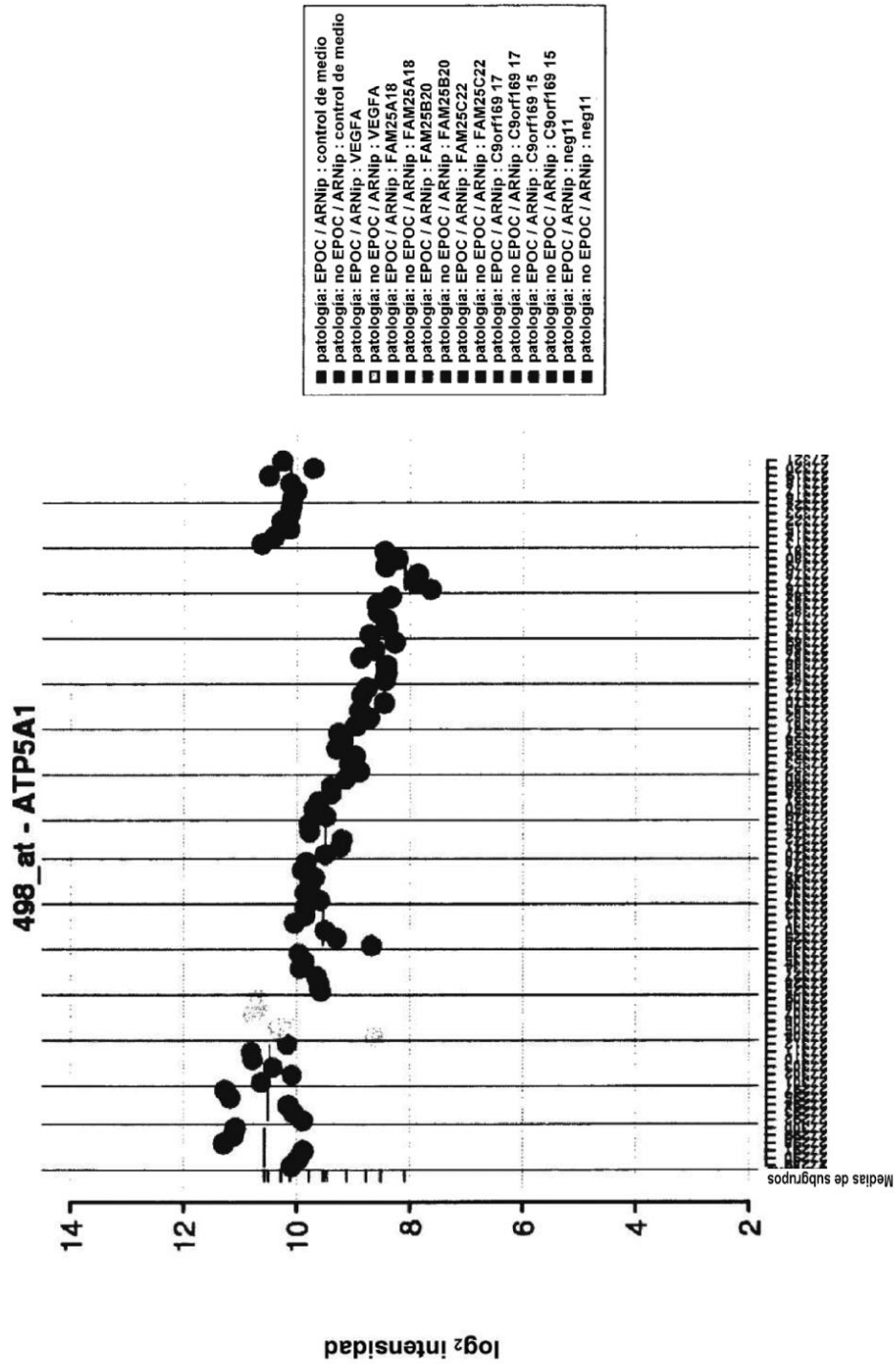


Figura 19A

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes 920:9606



Figura 19B

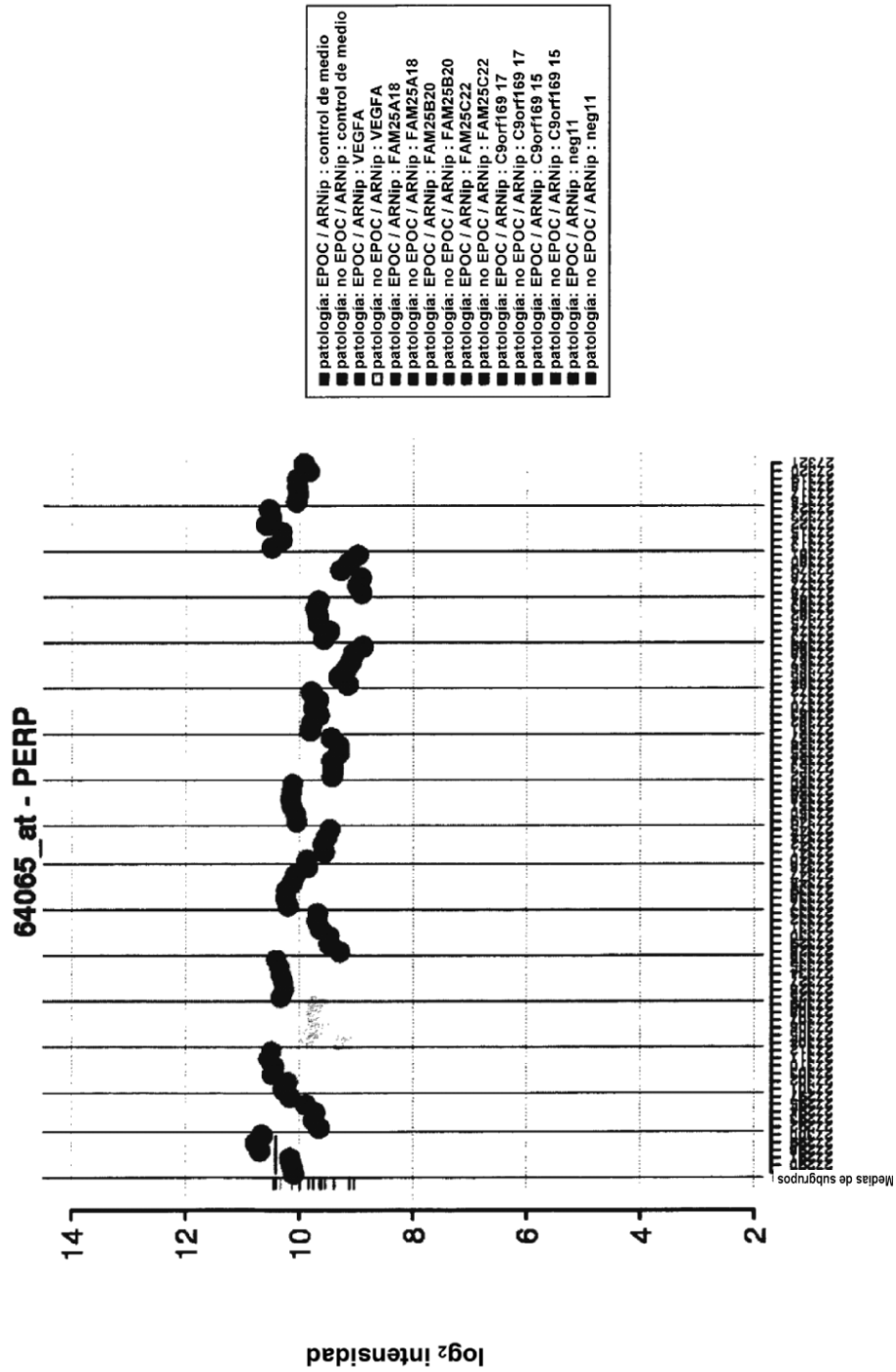


Figura 20

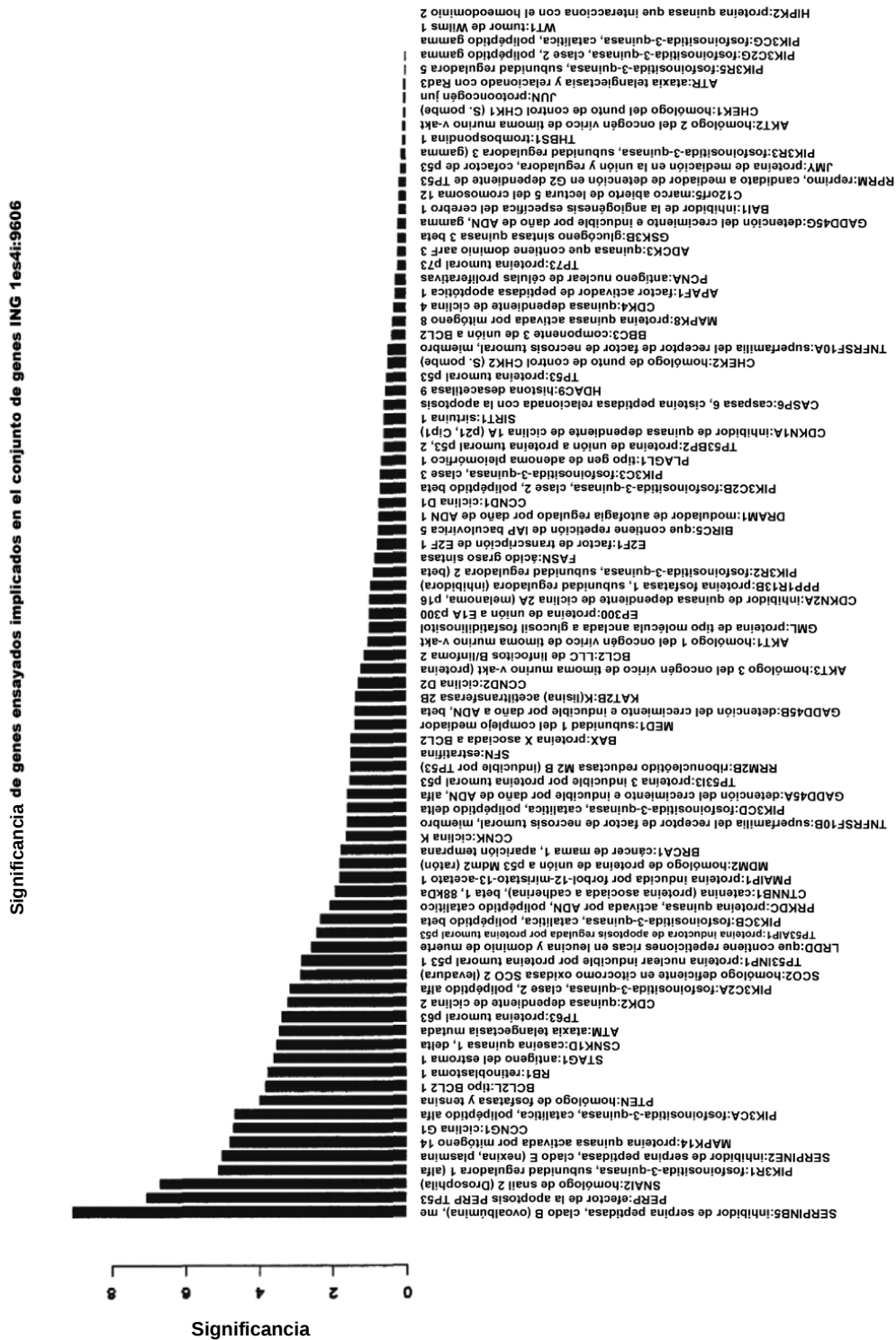


Figura 21

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes ING 1es4i:9606

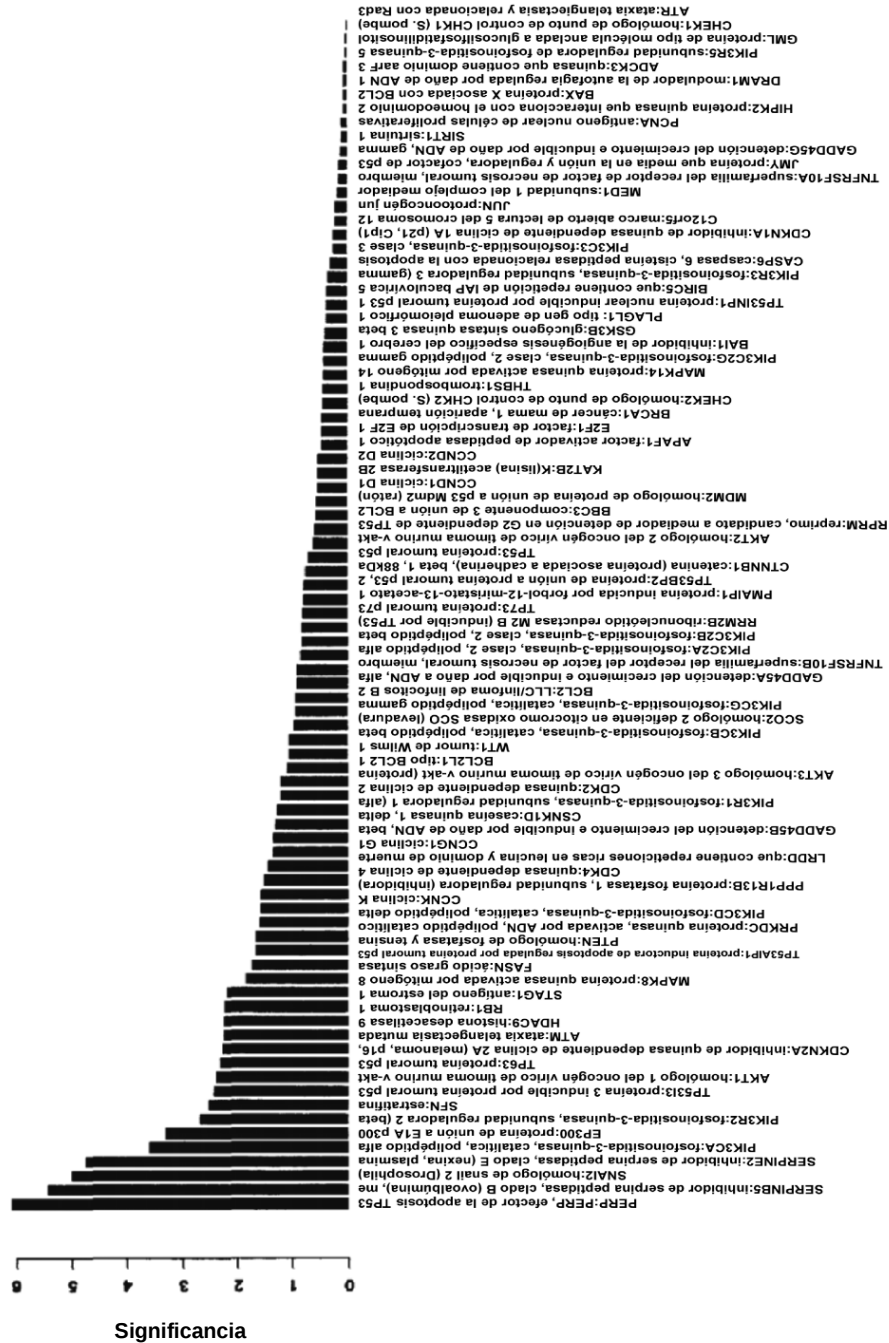


Figura 22

Significancia de genes ensayados implicados en el conjunto de genes ING 1es4i:9606



Figura 23

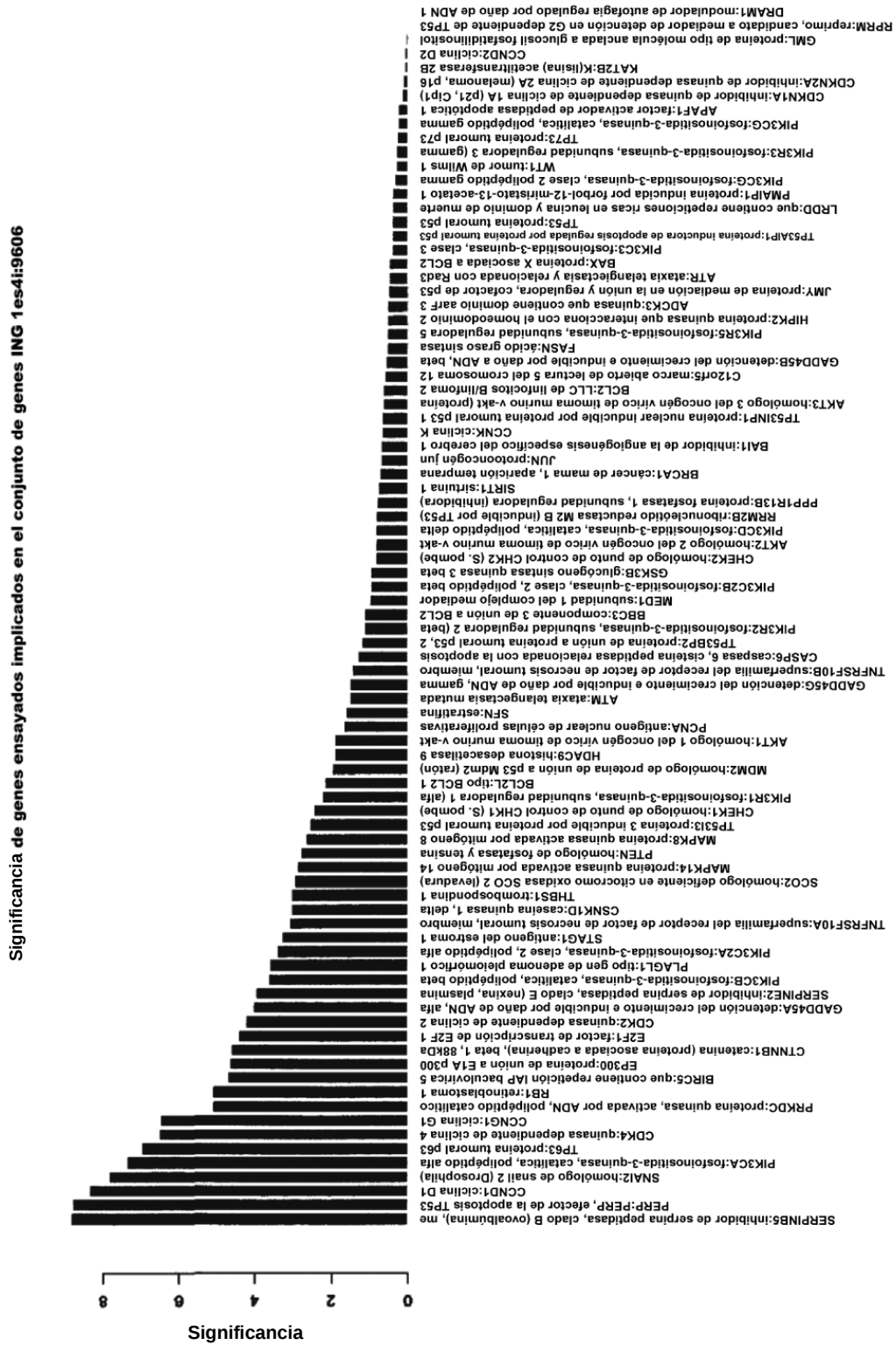


Figura 24

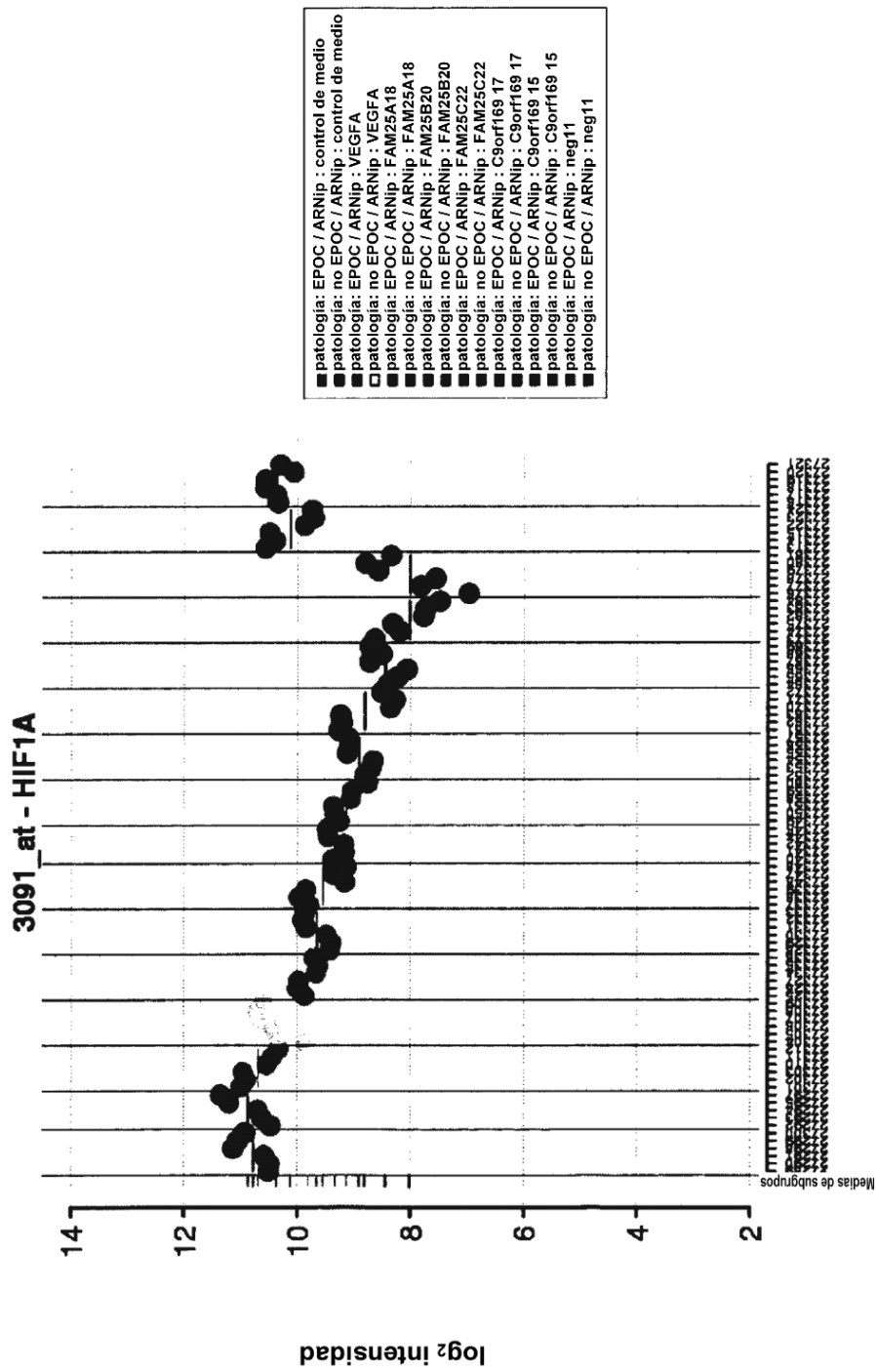


Figura 25A

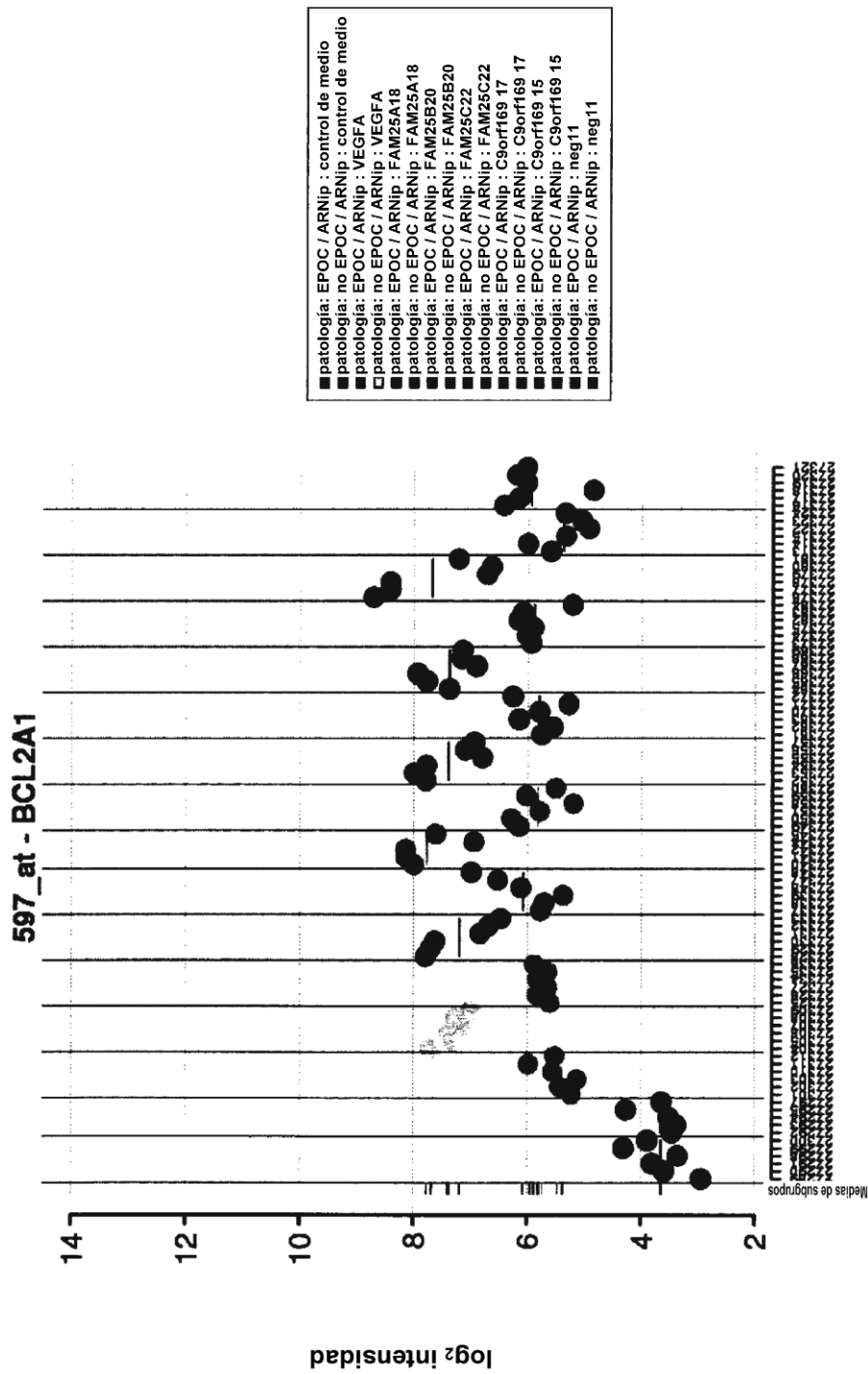


Figura 25B

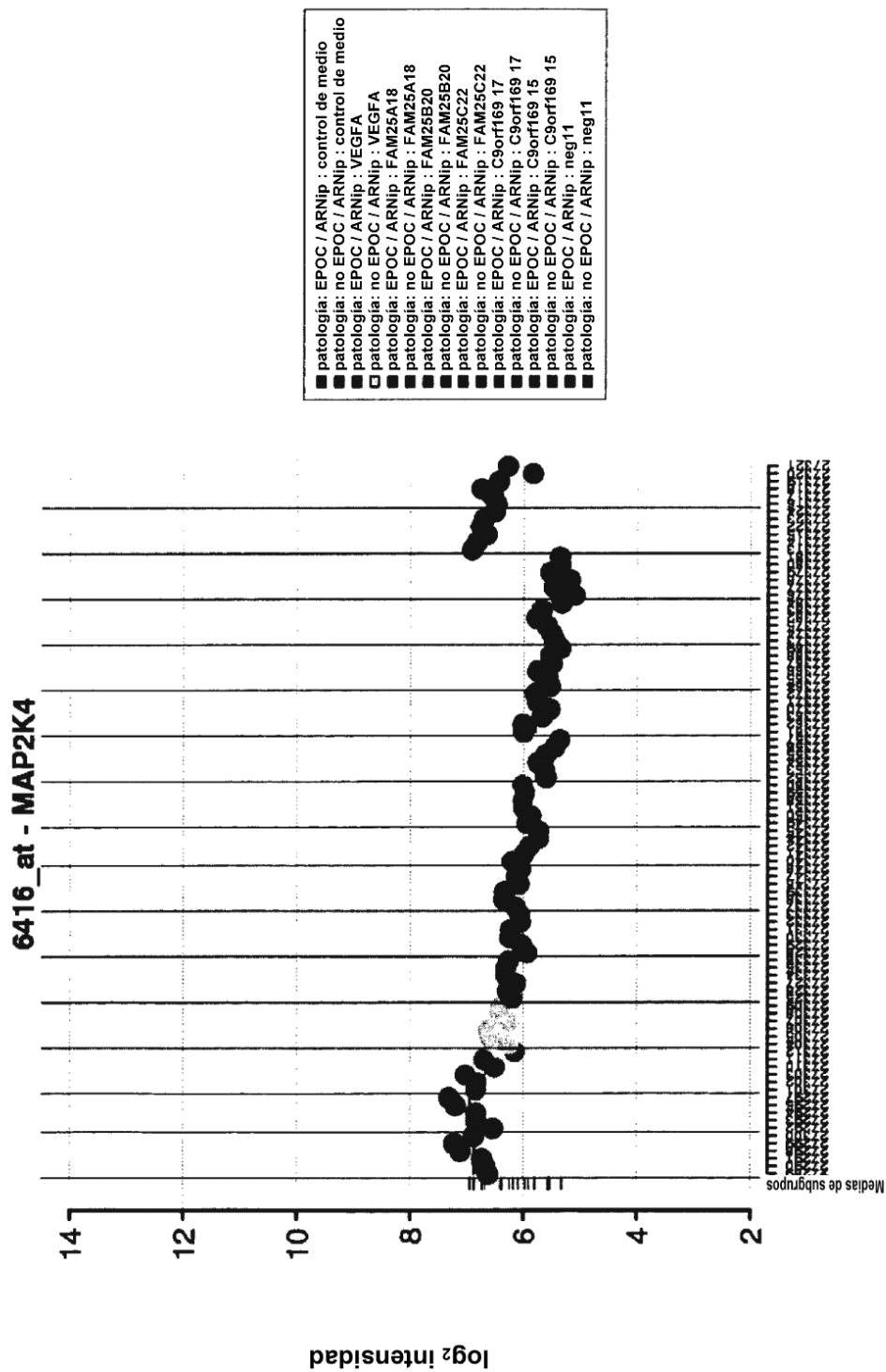


Figura 25C