

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 215 494**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2001 PCT/EP2001/13968**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2002 WO02044321**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2001 E 01985833 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.11.2017 EP 1407044**

54 Título: **Moléculas de RNA pequeñas que median la interferencia de RNA**

30 Prioridad:

01.12.2000 EP 00126325
30.03.2001 US 279661 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
28.12.2017

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.**
(50.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE y
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR
MOLEKULARBIOLOGIE (50.0%)

72 Inventor/es:

TUSCHL, THOMAS;
ELBASHIR, SAYDA;
LENDECKEL, WINFRIED;
WILM, MATTHIAS y
LÜHRMANN, REINHARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Moléculas de RNA pequeñas que median la interferencia de RNA

La presente invención se refiere a características de secuencia y estructurales de moléculas de RNA bicatenario (ds) que se requieren para mediar la interferencia de RNA específica de la diana.

5 La expresión "interferencia de RNA" (RNAi) fue acuñada después del descubrimiento de que la inyección de dsRNA en el nematodo *C. elegans* conduce a silenciación específica de genes altamente homólogos en secuencia al dsRNA administrado (Fire et al., 1998). Se observó posteriormente también RNAi en insectos, ranas (Oelgeschlager et al., 2000) y otros animales con inclusión de ratones (Svoboda et al., 2000; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000) y es probable que exista también en humanos. La RNAi está ligada estrechamente al mecanismo post-transcripcional de silenciación de genes (PTGS) de co-supresión en plantas y muerte en hongos (Catalanotto et al., 2000; Cogoni y Macino, 1999; Dalmay et al., 2000; Ketting y Plasterk, 2000; Mourrain et al., 2000; Smardon et al., 2000) y algunos componentes de la maquinaria de RNAi son necesarios también para la silenciación post-transcripcional por co-supresión (Catalanotto et al., 2000; Dernburg et al., 2000; Ketting y Plasterk, 2000). El tópico ha sido revisado también recientemente (Bass, 2000; Boshier y Labouesse, 2000; Fire, 1999; Plasterk y Ketting, 2000; Sharp, 1999; Sijen y Kooter, 2000), véase también el ejemplar completo de *Plant Molecular Biology*, vol. 43, número 2/3, (2000).

En las plantas, además de la PTGS, los transgenes introducidos pueden conducir también a silenciación transcripcional de genes por la vía de la metilación de las citosinas del DNA dirigida por RNA (véanse referencias en Wasenegger, 2000). Dianas genómicas tan cortas como 30 pb se metilan en las plantas de una manera dirigida por RNA (Pelissier, 2000). La metilación de DNA está presente también en los mamíferos.

20 La función natural de RNAi y la co-supresión parece ser la protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles tales como retro-transposones y virus que producen RNA o dsRNA aberrantes en la célula hospedadora cuando aquéllos se vuelven activos (Jensen et al., 1999; Ketting et al., 1999; Ratcliff et al., 1999; Tabara et al., 1999). La degradación específica de mRNA previene la replicación de transposones y virus, aunque algunos virus son capaces de resolver o prevenir este proceso por expresión de proteínas que suprimen la PTGS (Lucy et al., 2000; Voinnet et al., 2000).

El dsRNA desencadena la degradación específica de RNAs homólogos únicamente dentro de la región de identidad con el dsRNA (Zamore et al., 2000; Brenda L. Ban, 2000; Yang et al., 2000; Elbashir et al., 2001; WO 01/7516). El dsRNA se procesa a fragmentos de RNA de 21–23 nt y los sitios de escisión del RNA diana se espacian regularmente con distanciamiento de 21–23 nt. Por esta razón se ha sugerido que los fragmentos de 21–23 nt son los RNAs guía para reconocimiento de dianas (Zamore et al., 2000). Estos RNAs cortos se detectaron también en extractos preparados a partir de células Schneider 2 de *D. melanogaster* que se transfectaron con dsRNA antes de la lisis celular (Hammond et al., 2000); sin embargo, las fracciones que exhibían actividad de nucleasa específica de la secuencia contenían también una gran fracción de dsRNA residual. El papel de los fragmentos de 21–23 nt en el guiado de la escisión del mRNA está respaldado adicionalmente por la observación de que fragmentos de 21–23 nt aislados de dsRNA procesado son capaces, en cierto grado, de mediar la degradación específica del mRNA (Zamore et al., 2000). Moléculas de RNA de tamaño similar se acumulan también en tejido de plantas que exhibe PTGS (Hamilton y Baulcombe, 1999).

En este documento, los autores utilizan el sistema establecido in vitro de *Drosophila* (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000) para explorar adicionalmente el mecanismo de RNAi. Se demuestra que RNAs cortos de 21 y 22 nt, cuando se aparean sus bases con extremos 3' salientes, actúan como RNAs guía para la degradación de mRNA específica de la secuencia. Los dsRNAs cortos de 30 pb son incapaces de mediar RNAi en este sistema debido a que ya no se procesan a RNAs de 21 y 22 nt. Adicionalmente, se definieron los sitios de escisión de RNA diana con relación a los RNAs de interferencia cortos de 21 y 22 nt (siRNAs) que proporcionan evidencia de que la dirección del procesamiento de dsRNA determina si un RNA diana de sentido o antisentido puede ser escindido por el complejo de endonucleasas siRNP producido. Adicionalmente, los siRNAs pueden ser también herramientas importantes para modulación de la transcripción, v.g. por silenciación de genes de mamífero por metilación del DNA guía.

Experimentos posteriores en sistemas de cultivo de células humanas in vivo (células HeLa) demuestran que moléculas de RNA bicatenario que tienen una longitud de preferiblemente 19–23 nucleótidos tienen actividad RNAi.

50 El objeto fundamental de la presente invención es proporcionar nuevos agentes capaces de mediar la interferencia de RNA específica de la diana, teniendo dichos agentes una eficacia y seguridad mejoradas en comparación con agentes de la técnica anterior.

La solución de este problema es proporcionada por una molécula de RNA bicatenario aislada, en la cual cada cadena de RNA tiene una longitud de 19–23 nucleótidos y en la cual al menos una cadena tiene un saliente 3' de 1–3 nucleótidos, siendo dicha molécula de RNA capaz de mediar la interferencia de RNA. Al menos una cadena tiene un

saliente 3' de 1–3 nucleótidos y muy preferiblemente 2 nucleótidos. La otra cadena puede tener extremos romos o tiene saliente 3' de hasta 6 nucleótidos.

5 La molécula de RNA es preferiblemente una molécula de RNA sintética que está sustancialmente exenta de contaminantes existentes en extractos de células, v.g. de embriones de *Drosophila*. Adicionalmente, la molécula de RNA está con preferencia sustancialmente exenta de cualesquiera contaminantes no específicos de la diana, particularmente moléculas de RNA no específicas de la diana, v.g. de contaminantes existentes en extractos celulares.

Adicionalmente, la invención se refiere al uso in vitro de moléculas de RNA bicatenario aisladas, en donde cada cadena de RNA tiene una longitud de 19–23 nucleótidos y en donde al menos una cadena tiene un saliente 3' de 1–3 nucleótidos para mediar la RNAi en células de mamífero, particularmente en células humanas.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado que las moléculas cortas sintéticas de RNA bicatenario con extremos 3' salientes, son mediadores de RNAi específicas de la secuencia y median la escisión eficiente del RNA diana, estando localizado el sitio de escisión cerca del centro de la región abarcada por el RNA guía corto.

15 Preferiblemente, cada cadena de la molécula de RNA tiene una longitud de 20–22 nucleótidos, pudiendo ser la longitud de cada cadena igual o diferente. La longitud del saliente 3' alcanza de 1 a 3 nucleótidos, pudiendo ser la longitud del saliente igual o diferente para cada cadena. Las cadenas de RNA tienen preferiblemente grupos 3' hidroxilo. El término 5' comprende preferiblemente un grupo fosfato, difosfato, trifosfato o hidroxilo. Los dsRNAs más eficaces están compuestos de cadenas de 21 nt que están apareadas de tal manera que están presentes en ambos extremos del dsRNA salientes 3' de 1–3, particularmente 2 nt.

20 La reacción de escisión del RNA diana guiada por siRNAs es altamente específica de la secuencia. Sin embargo, no todas las posiciones de un siRNA contribuyen por igual al reconocimiento de la diana. Los desapareamientos en el centro del dúplex de siRNA son sumamente críticos y anulan esencialmente la escisión del RNA diana. En contraste, el nucleótido 3' de la cadena de siRNA (v.g. la posición 21) que es complementario al RNA diana monocatenario, no contribuye a la especificidad del reconocimiento de la diana. Adicionalmente, la secuencia del saliente 3' de 2 nt no apareado de la cadena de siRNA con la misma polaridad que el RNA diana no es crítico para la escisión del RNA diana dado que únicamente la cadena de siRNA antisentido guía el reconocimiento de la diana. Así pues, de los nucleótidos salientes monocatenarios únicamente la posición penúltima del siRNA antisentido (v.g., la posición 20) precisa coincidir con el mRNA de sentido de la diana.

30 Sorprendentemente, las moléculas de RNA bicatenario de la presente invención exhiben una alta estabilidad in vivo en suero o en medio de crecimiento para cultivos celulares. Con objeto de mejorar adicionalmente la estabilidad, los salientes 3' pueden estabilizarse contra la degradación, v.g. pueden seleccionarse de tal manera que estén constituidos por nucleótidos de purina, particularmente nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de los nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, v.g. sustitución de salientes 3' de 2 nt de uridina por 2'-desoxitimidina es tolerada y no afecta a la eficiencia de la interferencia de RNA. La ausencia de un hidroxilo en posición 2' mejora significativamente la resistencia a las nucleasas del saliente en el medio de cultivo de tejido.

35 En una realización especialmente preferida de la presente invención, la molécula de RNA puede contener al menos un análogo de nucleótido modificado. Los análogos de nucleótidos pueden estar localizados en posiciones en las cuales la actividad específica de la diana, v.g. la actividad mediadora de RNAi no se ve afectada sustancialmente, v.g. en una región en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de RNA bicatenario. Particularmente, los salientes pueden estar estabilizados por incorporación de análogos de nucleótidos modificados.

40 Los análogos de nucleótidos preferidos se seleccionan de ribonucleótidos modificados en el azúcar o la cadena principal. Debe anotarse, sin embargo, que también son adecuados ribonucleótidos modificados con nucleobases, es decir ribonucleótidos que contienen una nucleobase no existente naturalmente en lugar de una nucleobase existente naturalmente tales como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, v.g. 5-(2-amino)propil-uridina, 5-bromo-uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, v.g. 8-bromo-guanosina; desaza-nucleótidos, v.g. 7-desaza-adenosina; nucleótidos alquilados en O y N, v.g. N6-metil-adenosina. En los ribonucleótidos preferidos modificados en el azúcar, el grupo 2'-OH está reemplazado por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es alquilo, alqueno o alquino C₁–C₆ y halo es F, Cl, Br o I. En los ribonucleótidos preferidos modificados en la cadena principal, el grupo fosfoéster que está conectado a los ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo modificado, v.g. un grupo fosfotioato. Debe indicarse que las modificaciones anteriores pueden combinarse.

50 La secuencia de la molécula de RNA bicatenario de la presente invención debe tener una identidad suficiente con una molécula diana de ácido nucleico a fin de mediar la RNAi específica de la diana. Preferiblemente, la secuencia tiene una identidad de al menos 70% con la molécula diana deseada en la porción bicatenaria de la molécula de RNA. Más preferiblemente, la identidad es de al menos 85% y muy preferiblemente 100% en la porción bicatenaria

de la molécula de RNA. La identidad de una molécula de RNA bicatenario con una molécula diana de ácido nucleico predeterminada, v.g. una molécula diana de mRNA, puede determinarse como sigue:

$$I = \frac{n}{L} \times 100$$

5 donde I es la identidad en porcentaje, n es el número de nucleótidos idénticos en la porción bicatenaria del dsRNA y la diana y L es la longitud de la superposición de secuencias de la porción bicatenaria del dsRNA y la diana.

10 Alternativamente, la identidad de la molécula de RNA bicatenario respecto a la secuencia diana puede definirse también incluyendo el saliente 3', particularmente un saliente que tiene una longitud de 1–3 nucleótidos. En este caso, la identidad de secuencia es preferiblemente al menos 70% y más preferiblemente al menos 85% de la secuencia diana. Por ejemplo, los nucleótidos del saliente 3' y hasta 2 nucleótidos del término 5' y/o 3' de la doble cadena pueden modificarse sin pérdida significativa de actividad.

Métodos de síntesis de moléculas de RNA se conocen en la técnica. En este contexto, se hace referencia particularmente a los métodos de síntesis química que se describen en Verma y Eckstein (1998).

15 Los RNAs monocatenarios pueden prepararse también por transcripción enzimática a partir de moldes de DNA sintéticos o de plásmidos de DNA aislados de bacterias recombinantes. Típicamente, se utilizan RNA-polimerasas de fago tales como RNA-polimerasa T7, T3 o SP6 (Milligan y Uhlenbeck (1989)).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método in vitro de mediación de las interferencias de RNA específicas de diana en una célula eucariota, que comprende los pasos:

20 (a) poner en contacto dicha célula con la molécula de RNA bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones en las cuales pueden ocurrir interferencias de RNA específicas de la diana, y

(b) mediar una interferencia de RNA específica de la diana efectuada por el RNA bicatenario hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia que corresponde sustancialmente al RNA bicatenario.

25 Preferiblemente, el paso de puesta en contacto (a) comprende introducir la molécula de RNA bicatenario en una célula diana, v.g. una célula diana aislada, v.g. en cultivo de células. Más preferiblemente, el paso de introducción comprende un suministro mediado por un portador, v.g. por portadores liposómicos o por inyección.

30 El método in vitro de la invención puede utilizarse para determinar la función de un gen en una célula o incluso para modular la función de un gen en una célula o un organismo, que es capaz de mediar la interferencia de RNA. La célula es una célula o una línea de células eucariota(s), v.g. una célula vegetal o una célula animal, tal como una célula de mamífero, v.g. una célula embrionaria, una célula madre pluripotencial, una célula tumoral, v.g. una célula de teratocarcinoma o una célula infectada por un virus.

35 El gen diana al que está dirigida la molécula de RNA de la invención puede estar asociado con una condición patológica. Por ejemplo, el gen puede ser un gen asociado a un patógeno, v.g. un gen viral, un gen asociado a un tumor o un gen asociado a una enfermedad autoinmune. El gen diana puede ser también un gen heterólogo expresado en una célula recombinante o un organismo alterado genéticamente. Por determinación o modulación, particularmente, inhibición de la función de un gen de este tipo pueden obtenerse información valiosa y beneficios terapéuticos en el campo de la agricultura o en el campo de la medicina o la medicina veterinaria.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una molécula de RNA bicatenario como se define en una de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de un medicamento para modular la función de un gen asociado a un patógeno. En realizaciones particularmente preferidas, el gen asociado a un patógeno es un gen viral, un gen asociado a un tumor o un gen asociado a una enfermedad autoinmune.

45 El dsRNA se administra usualmente como una composición farmacéutica. La administración puede realizarse por métodos conocidos, en los cuales se introduce un ácido nucleico en una célula diana deseada in vitro o in vivo. Técnicas de transferencia de genes utilizadas comúnmente incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y microinyección, y métodos virales (Graham, F.L. y van der Eb, A.J. (1973) *Virology* 52, 456; MeCutchan, J.H. and Pagano, J.S. (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351; Chu, G. et al (1987), *Nucl. Acids Res.* 15, 1311; Fraley, R. et al. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10431; Capecchi, M.R. (1980), *Cell* 22, 479). Una adición reciente a este arsenal de técnicas para introducción de DNA en células es el uso de liposomas catiónicos (Felgner, P.L. et al., (1987), *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413). Formulaciones de lípidos catiónicos disponibles comercialmente son v.g. Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin 2000 (Life Technologies).

Así pues, también se describe a una composición farmacéutica que contiene como agente activo al menos una molécula de RNA bicatenario como se describe arriba y un vehículo farmacéutico. La composición puede utilizarse para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas en medicina humana o en medicina veterinaria.

Para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas, la composición puede encontrarse en forma de una solución, v.g. una solución inyectable, una crema, un ungüento, una tableta, una suspensión o análogas. La composición puede administrarse de cualquier modo adecuado, v.g. por inyección, por aplicación oral, tópica, nasal, rectal, etc. El vehículo puede ser cualquier vehículo farmacéutico adecuado. Preferiblemente, se utiliza un vehículo que es capaz de aumentar la eficacia de las moléculas de RNA para introducirse en las células diana. Ejemplos adecuados de vehículos de este tipo son liposomas, particularmente liposomas catiónicos. Un método de administración particularmente preferido es la inyección.

Una aplicación preferida adicional del método RNAi es un análisis funcional de células eucariotas, u organismos eucariotas no humanos, preferiblemente células u organismos de mamífero y muy preferiblemente células humanas, v.g. líneas de células tales como HeLa o 293 o de roedores, v.g. ratas y ratones. Por transfección con moléculas de RNA bicatenario adecuadas que son homólogas respecto a un gen diana predeterminado o moléculas de DNA que codifican una molécula de RNA bicatenario adecuada, puede obtenerse un fenotipo de desactivación específico en una célula diana, v.g. en cultivo de células o en un organismo diana. Sorprendentemente, se ha encontrado que la presencia de moléculas de RNA bicatenario cortas no da como resultado una respuesta de interferón por la célula hospedadora o el organismo hospedador.

Adicionalmente, la presente invención se explica con mayor detalle en las figuras y los ejemplos siguientes.

Leyendas de las Figuras

Figura 1: Un RNA bicatenario tan corto como 38 pb puede mediar la RNAi.

(A) Representación gráfica de dsRNAs utilizados para direccionar mRNA de Pp-luc. Se prepararon tres series de dsRNAs con extremos romos, que cubrían un intervalo de 29 a 504 pb. La posición del primer nucleótido de la cadena de sentido del dsRNA se indica con relación al codón de comienzo de mRNA Pp-luc (p1). (B) Ensayo de interferencia de RNA (Tuschl et al., 1999). Las relaciones de actividad de Pp-luc diana a Rr-luc de control se normalizaron para un tampón de control (barra negra). Los dsRNAs (5 nM) se preincubaron en lisado de *Drosophila* durante 15 min a 25°C antes de la adición de Pp-luc con casquete 7-metil-guanosina y mRNAs Rr-luc (~ 50 pM). La incubación se continuó durante una hora más y se analizó luego por el ensayo dual de luciferasa (Promega). Los datos son el valor medio de al menos 4 experimentos independientes \pm la desviación estándar.

Figura 2: Un dsRNA de 29 pb ya no se procesa para dar fragmentos de 21–23 nt. Evolución temporal de la formulación de 21–23 meros por procesamiento de dsRNAs marcados internamente con ^{32}P (5 nM) en el lisado de *Drosophila*. Se indican la longitud y la fuente del dsRNA. Se ha cargado un marcador de tamaños de RNA (M) en la pista de la izquierda y se indican los tamaños de los fragmentos. Las dobles bandas para tiempo cero se deben a dsRNA incompletamente desnaturalizado.

Figura 3: Los dsRNAs cortos escinden la diana de mRNA una sola vez.

(A) Electroforesis en gel desnaturalizador de los productos estables de escisión en 5' producidos por incubación durante 1 h de RNA sentido o antisentido marcado con ^{32}P , 10 nM en el casquete con dsRNAs 10 nM de la serie p133 en lisado de *Drosophila*. Se generaron marcadores de longitud por digestión parcial con nucleasa T1 e hidrólisis alcalina parcial (OH) del RNA diana marcado en el casquete. Las regiones direccionadas por los dsRNAs se indican como barras negras en ambos lados. Se muestra el espaciamiento de 20–23 nt entre los sitios de escisión predominantes para el dsRNA de 111 pb de longitud. La flecha horizontal indica escisión inespecífica no debida a RNAi. (B) Posición de los sitios de escisión en RNAs diana de sentido y antisentido. Las secuencias de los RNAs diana de sentido de 177 nt y antisentido de 180 nt con casquete se representan en orientación antiparalela de tal manera que las secuencias complementarias están enfrentadas una a otra. La región direccionada por los diferentes dsRNAs se indica por barras de diferentes colores posicionadas entre las secuencias diana de sentido y antisentido. Los sitios de escisión se indican por ciclos: círculo grande para escisión fuerte, círculo pequeño para escisión débil. El grupo fosfato radiomarcado con ^{32}P está marcado por un asterisco.

Figura 4: Los fragmentos de RNA de 21 y 22 nt se generan por un mecanismo semejante al de la RNasa III.

(A) Secuencias de RNAs de ~21 nt después de procesamiento de dsRNA. Los fragmentos de RNA de ~21 nt generados por procesamiento de dsRNA se clonaron y secuenciaron direccionalmente. Los oligorribonucleótidos origina-

rios de la cadena de sentido del dsRNA se indican como líneas azules, y los originarios de la cadena antisentido como líneas rojas. Se utilizan barras gruesas si la misma secuencia estaba presente en clones múltiples, indicando el número a la derecha la frecuencia. Los sitios de escisión de RNA diana mediados por el dsRNA se indican como círculos anaranjados, el círculo grande para escisión fuerte y el círculo pequeño para escisión débil (véase la Figura 3B). Los círculos situados en la parte superior de la cadena de sentido indicaban sitios de escisión en el interior de la cadena de sentido y los círculos en la parte inferior del dsRNA indican sitios de escisión en la diana antisentido. Hasta cinco nucleótidos adicionales se identificaron en fragmentos de ~ 21 nt derivados de los extremos 3' del dsRNA. Estos nucleótidos son combinaciones aleatorias constituidas predominantemente por residuos C, G o A, y se añadieron muy probablemente sin molde durante la transcripción por T7 de las cadenas constitutivas del dsRNA. (B) Análisis bidimensional por TLC de la composición de nucleótidos de RNAs de ~ 21 nt. Los RNAs de ~ 21 nt se generaron por incubación de dsRNA Pp-luc de 504 pb radiomarcado internamente en lisado de *Drosophila*, se purificaron en gel y se digirieron luego a mononucleótidos con nucleasa P1 (fila superior) o ribonucleasa T2 (fila inferior). El dsRNA se sometió a radiomarcación internamente por transcripción en presencia de uno de los α - ^{32}P nucleósido-trifosfatos indicados. La radioactividad se detectó por fosfoluminiscencia. Los nucleósido-5'-monofosfatos, nucleósido-3'-monofosfatos, nucleósido-5',3'-difosfatos, y el fosfato inorgánico se indican como pN, Np, pNp, y p_i , respectivamente. Los círculos negros indican puntos de absorción UV a partir de nucleótidos portadores no radiactivos. Los 3',5'-bisfosfatos (círculos rojos) se identificaron por co-migración con patrones radiomarcados preparados por fosforilación en 5' de nucleósido 3'-monofosfatos de con polinucleótido-quinasa T4 y γ - ^{32}P -ATP.

Figura 5: Los RNAs sintéticos de 21 y 22 nt median la escisión del RNA diana.

(A) Representación gráfica del dsRNA de control de 52 pb y los dsRNAs sintéticos de 21 y 22 nt. La cadena de sentido de RNAs interferentes cortos de 21 y 22 nt (siRNAs) se representa en color azul, y la cadena antisentido en color rojo. Las secuencias de los siRNAs se derivaron de los fragmentos clonados de dsRNAs de 52 y 111 pb (Figura 4A), excepto en lo que respecta a la cadena antisentido de 22 nt del dúplex 5. Los siRNAs en los dúplex 6 y 7 eran exclusivos de la reacción de procesamiento de dsRNA de 111 pb. Los dos nucleótidos 3' salientes indicados en verde están presentes en la secuencia de la cadena sintética antisentido de los dúplex 1 y 3. Ambas cadenas del dsRNA de control de 52 pb se prepararon por transcripción *in vitro*, y una fracción de los transcritos puede contener adición de nucleótido 3' sin molde. Los sitios de escisión de RNA diana dirigidos por los dúplex de siRNA se indican como círculos anaranjados (véase la leyenda a la Figura 4A) y se determinaron como se muestra en la Figura 5B. (B) Posición de los sitios de escisión en los RNAs diana de sentido y antisentido. Las secuencias de RNA diana son como se describe en la Figura 3B. El dsRNA de control de 52 pb (10 nM) o los dúplex de RNA de 21 y 22 nt 1-7 (100 nM) se incubaron con RNA diana durante 2,5 h a 25°C en lisado de *Drosophila*. Los productos estables de escisión 5' se resolvieron en el gel. Los sitios de escisión se indican en la Figura 5A. La región direccionada por el dsRNA de 52 pb o las cadenas de sentido (s) o antisentido (as) se indican por las barras negras al lado del gel. Los sitios de escisión están localizados todos ellos dentro de la región de identidad de los dsRNAs. Para determinación precisa de los sitios de escisión de la cadena antisentido, se utilizó un gel de menor concentración.

Figura 6: Los salientes 3' largos en dsRNAs cortos inhiben la RNAi.

(A) Representación gráfica de constructos de dsRNA de 52 pb. Las extensiones 3' de la cadena de sentido y antisentido se indican en azul y rojo, respectivamente. Los sitios de escisión observados en los RNAs diana se representan como círculos anaranjados análogamente a la Figura 4A, y se determinaron como se muestra en la Figura 6B. (B) Posición de los sitios de escisión en RNAs diana de sentido y antisentido. Las secuencias de RNA diana son como se describe en la Figura 3B. Se incubó dsRNA (10 nM) con RNA diana durante 2,5 h a 25°C en lisado de *Drosophila*. Los productos de escisión 5' estables se resolvieron en el gel. Los sitios de escisión principales se indican con una flecha horizontal y se representan también en la Figura 6A. La región direccionada por el dsRNA de 52 pb se representa como una barra negra a ambos lados del gel.

Figura 7: Modelo propuesto para la RNAi.

Se predice que la RNAi comienza con el procesamiento de dsRNA (cadena de sentido en negro, cadena antisentido en rojo) a RNAs interferentes cortos, predominantemente de 21 y 22 nt (siRNAs). Los nucleótidos 3' salientes cortos, en caso de estar presentes en el dsRNA, pueden ser beneficiosos para el procesamiento de los dsRNAs cortos. Las proteínas de procesamiento de dsRNA, que no están caracterizadas todavía, se representan como óvalos verdes y azules, y se ensamblan en el dsRNA de manera asimétrica. En el modelo de los autores, esto se ilustra uniendo una proteína o un dominio hipotético de proteína azul con la cadena de siRNA en dirección 3' a 5', en tanto que la proteína o dominio hipotético de proteína verde se une siempre a la cadena de siRNA opuesta. Estas proteínas o un subconjunto de las mismas se mantienen asociadas con el dúplex de siRNA y preservan su orientación como se determina por la dirección de la reacción de procesamiento del dsRNA. Únicamente la secuencia de siRNA asociada con la proteína azul es capaz de guiar la escisión del RNA diana. Se hace referencia al complejo con endonucleasa como un complejo interferente pequeño de ribonucleoproteína o siRNT. Se supone aquí, que la endonucleasa que escinde el dsRNA puede escindir también el RNA diana, probablemente por desplazamiento temporal de la cadena de siRNA pasiva no utilizada para el reconocimiento de la diana. El RNA diana se escinde luego en el centro de la región reconocida por el siRNA guía complementario de la secuencia.

Figura 8: Constructos informadores y dúplex de siRNA

(a) Se ilustran las regiones de genes informadores de luciferasa de luciérnaga (Pp-luc) y pensamiento de mar (Rr-luc) de los plásmidos pGL2-Control, pGL3-Control y pRL-TK (Promega). Se indican los elementos reguladores de SV40, el promotor HSV de timidina-quinasa y dos intrones (líneas). La secuencia de GL3-luciferasa es idéntica en un 95% a GL2, pero RL no tiene relación alguna con ambas. La expresión de luciferasa por pGL2 es aproximadamente 10 veces menor que la de pGL3 en células de mamífero transfectadas. La región direccionada por los dúplex de siRNA se indica como barra negra bajo la región codificante de los genes de luciferasa. (b) Se muestran las secuencias de sentido (arriba) y antisentido (abajo) de los dúplex de siRNA que direccionan las luciferasas GL2, GL3 y RL. Los dúplex de siRNA GL2 y GL3 difieren únicamente en 3 sustituciones simples de nucleótidos (recuadrados en gris). Como control inespecífico, se sintetizó un dúplex con la secuencia GL2 invertida, invGL2. El saliente 3' de 2 nucleótidos de la 2'-desoxitimidina se indica como TT; uGL2 es similar a siRNA de GL2, pero contiene salientes 3' de ribouridina.

Figura 9: Interferencia de RNA por dúplex siRNA.

Las relaciones de luciferasa diana de control se normalizaron a un control de tampón (bu, barras negras); las barras grises indican relaciones de luciferasa GL2 o GL3 de *Photinus pyralis* (Pp-luc) a luciferasa RL de *Renilla reniformes* (Rr-luc) (eje de la izquierda), las barras blancas indican relaciones de RL a GL2 o GL3 (eje de la derecha). Los paneles a, c, e, g, e i describen experimentos realizados con la combinación de los plásmidos informadores pGL2-control y pRL-TK, y los paneles b, d, f, h y j con los plásmidos informadores pGL3-Control y pRL-TK. La línea de células utilizada para el experimento de interferencia se indica en la parte superior de cada gráfico. Las relaciones de Pp-luc/Rr-luc para el control de tampón (bu) variaban entre 0,5 y 10 para pGL2/pRL y entre 0,03 y 1 para pGL3/pRL, respectivamente, antes de normalización y entre las diversas líneas de células ensayadas. Los datos representados gráficamente se promediaron a partir de tres experimentos independientes \pm S.D.

Figura 10: Efectos de siRNA de 21 nt, y dsRNAs de 50 pb y 500 pb sobre la expresión de luciferasa en células HeLa.

La longitud exacta de los dsRNAs largos se indica bajo las barras. Los paneles a, c y e describen experimentos realizados con los plásmidos informadores pGL2-Control y pRL-TK, y los paneles b, d y f con los plásmidos informadores pGL3-Control y pRL-TK. Se promediaron los datos de dos experimentos independientes \pm S.D. (a), (b) Expresión absoluta de Pp-luc, representada en unidades de luminiscencia arbitrarias. (c), (d) Expresión de Rr-luc, representada en unidades de luminiscencia arbitrarias. (e), (f) Relaciones de diana normalizada a luciferasa de control. Las relaciones de actividad de luciferasa para los dúplex siRNA se normalizaron a un control de tampón (bu, barras negras); las relaciones de luminiscencia para los dsRNAs de 50 ó 500 pb se normalizaron a las relaciones respectivas observadas para dsRNA de 50 y 500 pb a partir de GFP humanizada (hG, barras negras). Debe indicarse que las diferencias globales en secuencias entre los dsRNAs de 49 y 484 pb direccionados a GL2 y GL3 no son suficientes para conferir especificidad entre las dianas GL2 y GL3 (identidad ininterrumpida de 43 nt en segmento de 49 pb, identidad ininterrumpida máxima de 239 nt en segmento de 484 pb).

Figura 11: Variación del saliente 3' de los dúplex de siRNAs de 21 nt.

(A) Reseña de la estrategia experimental. Se representa el mRNA diana de sentido con casquete y poliadenilado y se muestran las posiciones relativas de los siRNAs de sentido y antisentido. Se prepararon ocho series de dúplex, de acuerdo con las ocho cadenas antisentido diferentes. Las secuencias de siRNA y el número de nucleótidos salientes se cambiaron en pasos de 1 nt. (B) Luminiscencia relativa normalizada de la luciferasa diana (*Photinus pyralis*, Pp-luc) a luciferasa de control (*Renilla reniformes*, Rr-luc) en un lisado de embrión de *D. melanogaster* en presencia de dsRNAs 5 nM con extremos romos. Las relaciones de luminiscencia determinadas en presencia de dsRNA se normalizaron a la relación obtenida para un control de tampón (bu, barra negra). Las relaciones normalizadas menores que 1 indican interferencia específica. (C-J) Relaciones de interferencia normalizadas para 8 series de dúplex de siRNA de 21 nucleótidos. Las secuencias de los dúplex de siRNA se representan encima de los gráficos de barras. Cada panel muestra la relación de interferencia para una serie de dúplex formada con un siRNA guía antisentido dado y 5 siRNAs de sentido diferentes. El número de nucleótidos salientes (saliente 3', números positivos; salientes 5', números negativos) se indica en el eje x. Los puntos de datos se promediaron a partir de al menos tres experimentos independientes, representando las barras de error las desviaciones estándar.

Figura 12: Variación de la longitud de la cadena de sentido de los dúplex de siRNA.

(A) Representación gráfica del experimento. Tres cadenas antisentido de 21 nt se aparearon con 8 siRNAs de sentido. Los siRNAs se cambiaron en longitud en su extremo 3'. El saliente 3' del siRNA antisentido era de 1 nt (B), 2 nt (C) o 3 nt (D), mientras que el saliente de siRNA de sentido variaba para cada serie. Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA y las relaciones de interferencia correspondientes.

Figura 13: Variación de la longitud de los dúplex de siRNA con salientes 3' de 2-nt preservados.

(A) Representación gráfica del experimento. El dúplex de siRNA de 21 nt es idéntico en secuencia al representado en la Figura 11H o 12C. Los dúplex de siRNA se extendieron hasta el lado 3' del siRNA de sentido (B) o el lado 5' del siRNA de sentido (C). Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA y las respectivas relaciones de interferencia.

Figura 14: Sustitución de los grupos 2'-hidroxilo de los residuos ribosa de siRNA.

Los grupos 2'-hidroxilo (OH) en las cadenas de los dúplex de siRNA se reemplazaron por 2'-desoxi (d) o 2'-O-metilo (Me). Las sustituciones 2'-desoxi de 2 nt y 4 nt en los extremos 3' se indican como 2-nt d y 4-nt d, respectivamente. Los residuos uridina se reemplazaron por 2'-desoxi-timidina.

Figura 15: Mapeado de la escisión de RNA diana de sentido y antisentido por los dúplex de siRNA de 21 nt con salientes 3' de 2 nt.

(A) Representación gráfica de RNAs y dúplex de siRNA diana de sentido y antisentido marcados en el casquete con 32P (asterisco). La posición de la escisión del RNA diana de sentido y antisentido se indica por triángulos encima y debajo de los dúplex de siRNA, respectivamente. (B) Mapeado de los sitios de escisión de RNA diana. Después de 2 h de incubación de la diana 10 mM con dúplex de siRNA 100 nM en lisado de embrión de *D. melanogaster*, el sustrato con casquete 5' y los productos de escisión 5' se resolvieron en geles de secuenciación. Se generaron marcadores de longitud por digestión parcial con RNasa T1 (T1) e hidrólisis alcalina parcial (OH⁻) de los RNAs diana. Las líneas en negrita a la izquierda de las imágenes indican la región cubierta por las cadenas de siRNA 1 y 5 de la misma orientación que la diana.

Figura 16: El extremo 5' de un siRNA guía define la posición de la escisión del RNA diana.

(A, B) Representación gráfica de la estrategia experimental. El siRNA antisentido era el mismo en todos los dúplex de siRNA, pero la cadena de sentido variaba entre 18 y 25 nt por cambio del extremo 3' (A) o entre 18 y 23 nt por cambio en el extremo 5' (B). La posición de la escisión del RNA diana de sentido y antisentido se indica por triángulos encima y debajo de los dúplex de siRNA, respectivamente. (C, D) Análisis de la escisión del RNA diana utilizando RNAs diana de sentido (panel superior) o antisentido (panel inferior) marcados en el casquete. Se muestran únicamente los productos de escisión 5' marcados en el casquete. Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA, y la longitud de las cadenas de siRNA de sentido está marcada encima del panel. La línea de control marcada con un guión en el panel (C) muestra el RNA diana incubado en ausencia de siRNAs. Los marcadores fueron como se describe en la Figura 15. Las flechas en (D), panel del fondo, indican los sitios de escisión del RNA diana que difieren en 1 nt.

Figura 17: Variación de la secuencia del saliente 3' de los dúplex de siRNA.

El saliente 3' de 2 nt (NN, en gris) se cambió en secuencia y composición como se indica (T, 2'-desoxitimidina, dG, 2'-desoxiguanosina; asterisco, dúplex de siRNA de tipo salvaje). Las relaciones de interferencia normalizadas se determinaron como se describe en la Figura 11. La secuencia de tipo salvaje es la misma que se representa en la Figura 14.

Figura 18: Especificidad de secuencia de reconocimiento de diana.

Se muestran las secuencias de los dúplex de siRNA desapareados, y los segmentos de secuencia modificados o nucleótidos simples están subrayados en gris. El dúplex de referencia (ref) y los dúplex de siRNA 1 a 7 contienen salientes 2'-desoxitimidina de 2-nt. La eficiencia de silenciamiento del dúplex de referencia modificado con timidina era comparable a la secuencia de tipo salvaje (Figura 17). Las relaciones de interferencia normalizadas se determinaron como se describe en la Figura 11.

Figura 19: Variación de la longitud de los dúplex de siRNA con los salientes 3' de 2 nt preservados.

Los dúplex de siRNA se extendieron al lado 3' del siRNA de sentido (A) o al lado 5' del siRNA de sentido (B). Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA y las relaciones de interferencia respectivas. Para las células HeLa SS6, se transfectaron dúplex de siRNA (0,84 µg) direccionados a luciferasa GL2 junto con plásmidos pGL2-Control y pRL-TK. Para comparación, se indican las actividades in vitro de RNAi de los dúplex siRNA ensayados en lisado de *D. melanogaster*.

Ejemplo 1

Interferencia de RNA Mediada por RNAs Sintéticos Pequeños

1.1. Procedimientos Experimentales

1.1.1. RNAi in vitro

Se realizaron preparaciones in vitro de RNAi y de lisado como se ha descrito anteriormente (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Es crítico utilizar creatina-quinasa recién disuelta (Roche) para regeneración óptima de ATP. Los ensayos de traducción de RNAi (Fig. 1) se realizaron con concentraciones de dsRNA de 5 nM y un periodo de pre-incubación prolongado de 15 min a 25°C antes de la adición de mRNAs informadores Pp-luc y Rr-luc transcritos in vitro, con casquete y poliadenilados. La incubación se continuó durante 1 h y la cantidad relativa de proteína Pp-luc y Rr-luc se analizó utilizando el ensayo de luciferasa dual (Promega) y un luminómetro Monolight 3010C (PharMingen).

1.1.2. Síntesis de RNA

Se utilizaron procedimientos estándar para transcripción in vitro de RNA a partir de moldes de PCR que llevaban secuencias promotoras T7 o SP6, véase por ejemplo (Tuschl, et al., 1998). Se preparó RNA sintético utilizando fosforamiditos de RNA Expedite (Proligo). El nucleótido del adaptador 3' se sintetizó utilizando dimetoxitritil-1,4-bencenodimetanol-succinil-aminopropil-CPG. Los oligorribonucleótidos se desprotegeron en 3 ml de amoniac/etanol al 32% (3/1) durante 4 h a 55°C (RNA Expedite) o 16 h a 55°C (oligonucleótidos quiméricos DNA/RNA adaptador 3' y 5') y se desililaron luego y purificaron en gel como se ha descrito previamente (Tuschl et al., 1993). Se generaron transcritos de RNA para preparación de dsRNA que incluían salientes 3' largos a partir de moldes PCR que contenían un promotor T7 en dirección de sentido y un promotor SP6 en dirección antisentido. El molde de transcripción para el RNA diana de sentido y antisentido se amplificó por PCR con

GCGTAATACGACTCACTATAGAACAATTGCTTTTACAG (subrayado, promotor T7) como iniciador 5' y

ATTTAGGTGACACTATAGGCATAAAGAATTGAAGA (subrayado, promotor SP6) como iniciador 3' y el plásmido linealizado Pp-luc (secuencia pGEM-luc) (Tuschl et al., 1999) como molde; el RNA de sentido transcrito por T7 tenía una longitud de 17 nt con la secuencia Pp-luc entre las posiciones 113 y 273 con relación al codón de partida y seguido por 17 nt del complemento de la secuencia promotora SP6 en el extremo 3'. Se prepararon transcritos para la formación de dsRNA con extremos romos por transcripción a partir de dos productos PCR diferentes que contenían solamente una secuencia de promotor simple.

Se llevó a cabo la reasociación de dsRNA utilizando una extracción con fenol/cloroformo. Se incubaron concentraciones equimolares de RNA de sentido y antisentido (50 nM a 10 µM, dependiendo de la longitud y cantidad disponibles) en NaOAc 0,3M (pH 6) durante 30 s a 90°C y se extrajeron luego a la temperatura ambiente con un volumen igual de fenol/cloroformo, lo que fue seguido por una extracción con cloroformo para eliminar el fenol residual. El dsRNA resultante se precipitó por adición de 2,5-3 volúmenes de etanol. El pellet se disolvió en tampón de lisis (KCl 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, Mg(OAc)₂ 2 mM) y la calidad del dsRNA se comprobó por electroforesis estándar en gel de agarosa en tampón TAE 1 x. Los dsRNAs de 52 pb con los salientes 3' de 17 nt y 20 nt (Figura 6) se reasociaron por incubación durante 1 min a 95°C, se enfriaron luego rápidamente a 70°C y se enfriaron a continuación lentamente hasta la temperatura ambiente durante un periodo de 3 h (reacción de reasociación de 50 µl, concentración de la cadena 1 µM, NaCl 300 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Los dsRNAs se extrajeron luego con fenol/cloroformo, se precipitaron con etanol y se disolvieron en tampón de lisis.

La transcripción del RNA radiomarcado internamente con ³²P utilizado para la preparación del dsRNA (Figuras 2 y 4) se realizó utilizando ATP, CTP, y GTP 1 mM, UTP 0,1 ó 0,2 mM, y ³²P-UTP 0,2-0,3 µM (3000 Ci/mmol), o la relación respectiva para nucleósido-trifosfatos radiomarcados distintos de UTP. La marcación del casquete de los RNAs diana se realizó como se ha descrito previamente. Los RNAs diana se purificaron en gel después de la marcación del casquete.

1.1.3. Mapeado del Sitio de Escisión

Se llevaron a cabo reacciones RNAi estándar por pre-incubación de dsRNA 10 nM durante 15 min seguido por adición de RNA diana 10 nM marcado en el casquete. La reacción se paró después de 2 horas adicionales (Figura 2A) o incubación durante 2,5 h (Figura 5B y 6B) por tratamiento con proteinasa K (Tuschl et al., 1999). Las muestras se analizaron luego en geles de secuenciación al 8 o al 10%. Los dúplex de RNA sintéticos de 21 y 22 nt se utilizaron a una concentración final de 100 nM (Fig. 5B).

1.1.4. Clonación de RNAs de ~21 nt

Los RNAs de 21 nt se produjeron por incubación de dsRNA radiomarcado en lisado de *Drosophila* en ausencia de RNA diana (reacción de 200 μ l, incubación durante 1 h, dsP111 50 nM, o dsP52 o dsP39 100 nM). La mezcla de reacción se trató subsiguientemente con proteinasa K (Tuschl et al., 1999) y los productos de procesamiento de dsRNA se separaron en un gel de poliamida desnaturante al 15%. Se cortó una banda que incluía un intervalo de tamaños de al menos 18 a 24 nt, se eluyó en NaCl 0,3M durante una noche a 4°C y en tubos siliconizados. El RNA se recuperó por precipitación con etanol y se desfosforiló (reacción de 30 μ l, 30 min, 50°C, 10 U de fosfatasa alcalina, Roche). La reacción se paró por extracción con fenol/cloroformo y el RNA se precipitó con etanol. El oligonucleótido adaptador 3' (pUUUaaccgcatccttctcx: mayúsculas, RNA; minúsculas, DNA; p, fosfato; x, 4-hidroximetilbencilo) se ligó luego al RNA de ~ 21 nt desfosforilado (reacción de 20 μ l, 30 min, 37°C, adaptador 3' 5 μ M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 0,2 mM, BSA acetilada 0,1 mg/ml, 15% DMSO, 21 U de RNA-ligasa T4, Amersham-Pharmacia) (Pan y Uhlenbeck, 1992). La reacción de ligación se paró por la adición de un volumen igual de mezcla de parada urea 8M/EDTA 50 mM y se cargó directamente en un gel al 15%. Los rendimientos de ligación eran mayores que 50%. El producto de ligación se recuperó del gel y se fosforiló en posición 5' (reacción de 20 μ l, 30 min, 37°C, ATP 2 mM, 5 U de polinucleótido-quinasa T4, NEB). La reacción de fosforilación se paró por extracción con fenol/cloroformo y el RNA se recuperó por precipitación con etanol. A continuación, se ligó el adaptador 5' (tactaatacgactcactAAA: mayúsculas, RNA; minúsculas, DNA) al producto de ligación fosforilado como se ha descrito arriba. El nuevo producto de ligación se purificó en gel y se eluyó de la rodaja de gel en presencia del iniciador de transcripción inversa (GACTAGCTGGAATTC AAGGATGCGGTTAAA; negrita, sitio *eco*RI) utilizado como vehículo. La transcripción inversa (reacción de 15 μ l, 30 min, 42°C, 150 U de transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) fue seguida por PCR utilizando un iniciador 5' CAGCCAACGGAATTCATACGACTCACTAAA (negrita, sitio *Eco*RI) y el iniciador 3'-RT. El producto PCR se purificó por extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El producto PCR se digirió luego con *Eco*RI (NEB) y se concatemerizó utilizando DNA-ligasa T4 (alta concentración, NEB). Los concatémeros de un intervalo de tamaños de 200 a 800 pb se separaron en un gel de agarosa de punto de fusión bajo, se recuperaron del gel por un procedimiento estándar de fusión y extracción con fenol, y se precipitaron con etanol. Los extremos no apareados se rellenaron por incubación con polimerasa Taq en condiciones estándar durante 15 min a 72°C, y el producto DNA se ligó directamente al vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Se seleccionaron las colonias utilizando PCR y los iniciadores de secuenciación M13-20 y M13 Reverse. Los productos PCR se sometieron directamente a secuenciación especial (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Alemania). Como promedio, se obtuvieron por cada clon 4 a 5 secuencias 21-meras.

1.1.5. Análisis 2D-TLC

La digestión con la nucleasa P1 de siRNAs radiomarcados y purificados en gel y 2D-TLC se llevó a cabo como se ha descrito (Zamore et al., 2000). La digestión con nucleasa T2 se realizó en reacciones de 10 μ l durante 3 h a 50°C en acetato de amonio 10 mM (pH 4,5) utilizando 2 μ g/ μ l de tRNA portador y 30 U de ribonucleasa T2 (Life Technologies). La migración de los patrones no radiactivos se determinó por sombreado UV. La identidad de los nucleósido-3',5'-difosfatos se confirmó por comigración de los productos de digestión con T2 con patrones preparados por fosforilación con ³²P en posición 5' de nucleósido-3'-monofosfatos comerciales utilizando γ -³²P-ATP y polinucleótido-quinasa T4 (datos no presentados).

1.2. Resultados y discusión

1.2.1. Requerimientos de Longitud para el Procesamiento de dsRNA a Fragmentos de RNA de 21 y 22 nt

Un lisado preparado a partir de embriones sincitiales de *D. melanogaster* resume la RNAi in vitro proporcionando una nueva herramienta para el análisis bioquímico del mecanismo de la RNAi (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). El análisis in vitro e in vivo de los requerimientos de longitud de dsRNA para RNAi ha revelado que los dsRNA cortos (<150 pb) son menos eficaces que los dsRNAs más largos en la degradación del mRNA diana (Caplen et al., 2000; Hammond et al., 2000; Ngo et al., 1998; Tuschl et al., 1999). Las razones para la reducción en la eficiencia de la degradación del mRNA no se conocen. Por esta razón se examinó el requerimiento preciso de longitud de dsRNA para degradación de RNA diana en condiciones optimizadas en el lisado de *Drosophila* (Zamore et al., 2000). Se sintetizaron varias series de dsRNAs y dirigieron contra el RNA informador de luciferasa de luciérnaga (Pp-luc). La supresión específica de la expresión de RNA diana se monitorizó por el ensayo de luciferasa dual (Tuschl et al., 1999) (Figuras 1A y 1B). Se detectó la inhibición específica de la expresión de RNA diana para dsRNAs tan cortos como 38 pb, pero dsRNAs de 29 a 36 pb no eran eficaces en este proceso. El efecto era independiente de la posición de la diana y el grado de inhibición de la expresión de mRNA de Pp-luc estaba en correlación con la longitud del dsRNA, es decir que los dsRNAs largos eran más eficaces que los dsRNAs cortos.

Se ha sugerido que los fragmentos de RNA de 21-23 nt generados por el procesamiento de dsRNAs son los mediadores de la interferencia y cosupresión de RNA (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Por esta razón se analizó la tasa de formación de fragmentos de 21-23 nt para un subconjunto de dsRNAs de tamaño comprendido entre 501 y 29 pb. la formación de fragmentos de 21-23 nt en lisado de *Drosophila* (Figura 2) era ya detectable para dsRNAs de 39 a 501 pb de longitud pero se retardaba significativamente para el dsRNA de 29 pb. Esta observación es consistente con un papel de los fragmentos 21-23 nt en el seguimiento de la escisión del mRNA y proporciona una explicación de la falta de RNAi para los dsRNAs de 30 pb. La dependencia de la longitud

de la formación de 21–23 meros refleja probablemente un mecanismo de control biológicamente relevante para prevenir la activación indeseada de RNAi por estructuras intramoleculares cortas apareadas en bases de RNAs celulares regulares.

1.2.2. El dsRNA de 39 pb Media la Escisión de RNA en un Solo Sitio

5 La adición de dsRNA y RNA diana con casquete 5' al lisado de *Drosophila* da como resultado una degradación específica de la secuencia del RNA diana (Tuschl et al., 1999). El mRNA diana se escinde solamente en la región de identidad con el dsRNA y muchos de los sitios de escisión diana están separados por 21–23 nt (Zamore et al., 2000). Así, se esperaba que el número de sitios de escisión para un dsRNA dado correspondiera grosso modo a la longitud del dsDNA dividida por 21. Se mapearon los sitios de escisión diana en un RNA diana de sentido y antisentido que estaba radiomarcado con 5' en el casquete (Zamore et al., 2000) (Figuras 3A y 3B). Los productos estables escindidos en 5' se separaron en un gel de secuenciación y se determinó la posición de escisión por comparación con una RNasa T1 parcial y una escalera de hidrólisis alcalina a partir del RNA diana.

15 Consistentemente con la observación previa (Zamore et al., 2000), todos los sitios de escisión del RNA diana estaban localizados dentro de la región de identidad para el dsRNA. La diana de sentido o antisentido era escindida una sola vez por el dsRNA de 39 pb. Cada sitio de escisión estaba localizado a 10 nt del extremo 5' de la región cubierta por el dsRNA (Figura 3B). El dsRNA de 52 pb, que comparte el mismo extremo 5' con el dsRNA de 39 pb, produce el mismo sitio de escisión en la diana de sentido, localizado a 10 nt del extremo 5' de la región de identidad con el dsRNA, además de dos sitios de escisión más débiles situados 23 y 24 nt aguas abajo del primer sitio. La diana antisentido era escindida una sola vez, de nuevo a una distancia de 10 nt del extremo 5' de la región cubierta por su dsRNA respectivo. El mapeado de los sitios de escisión para los dsRNAs de 38 a 49 pb que se muestran en la Figura 1, demostró que el primer y predominante sitio de escisión estaba localizado siempre a una distancia de 7 a 10 nt aguas abajo de la región cubierta por el dsRNA (datos no presentados). Esto sugiere que el producto de escisión del RNA diana está determinado por el extremo del dsRNA y podría implicar que el procesamiento a 21–23 meros se inicie a partir de los extremos del dúplex.

25 Los sitios de escisión en la diana de sentido y antisentido para el dsRNA más largo de 111 pb eran mucho más frecuentes que lo previsto y la mayoría de ellos aparecen en agrupaciones separadas por 20 a 23 nt (Figuras 3A y 3B). Como en el caso de los dsRNAs más cortos, el primer sitio de escisión en la diana de sentido se encuentra a 10 nt del extremo 5' de la región abarcada por el dsRNA; y el primer sitio de escisión en la diana antisentido está localizado a 9 nt del extremo 5' de la región cubierta por el dsRNA. No está claro qué es lo que pueda causar esta escisión desordenada, pero una posibilidad podría ser que dsRNAs más largos pueden ser procesados no sólo a partir de los extremos sino también internamente, o que existen algunos determinantes de especificidad para procesamiento de dsRNA que no se conocen todavía. Algunas irregularidades respecto a la separación de 21 a 23 nt se observaron también previamente (Zamore et al., 2000). Para comprender mejor la base molecular del procesamiento del dsRNA y el reconocimiento del RNA diana, se decidió analizar las secuencias de los fragmentos de 21–23 nt generados por el procesamiento de dsRNAs de 39, 52 y 111 pb en el lisado de *Drosophila*.

1.2.3. El dsRNA se Procesa a RNAs de 21 y 22 nt por un Mecanismo Semejante a la RNasa III

40 Con objeto de caracterizar los fragmentos de RNA de 21–23 nt, se examinaron los términos 5' y 3' de los fragmentos de RNA. La oxidación con peryodato de RNAs de 21–23 nt purificados en gel, seguida por eliminación en β indicó la presencia de grupos hidroxilo terminales 2' y 3'. Los 21–23 meros eran sensibles también al tratamiento con fosfatasa alcalina, lo que indicaba la presencia de un grupo fosfato en el terminal 5'. La presencia de términos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo sugiere que el dsRNA podría ser procesado por una actividad enzimática similar a la RNasa de *E. coli* (para revisiones, véase Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982)).

45 La clonación direccional de fragmentos de RNA de 21–23 nt se realizó por ligación de un oligonucleótido con adaptadores 3' y 5' a los 21–23 meros purificados utilizando RNA-ligasa T4. Los productos de ligación se transcribieron inversamente, se amplificaron por PCR, se concatemerizaron, clonaron y secuenciaron. Más de 220 RNAs cortos se secuenciaron a partir de las reacciones de procesamiento de dsRNA de los dsRNAs de 39, 52 y 111 pb (Figura 4a). Se encontró la distribución de longitudes siguiente: 1% 18 nt, 5% 19 nt, 12% 20 nt, 45% 21 nt, 28% 22 nt, 6% 23 nt, y 2% 24 nt. El análisis de la secuencia del nucleótido del terminal 5' de los fragmentos procesados indicó que los oligonucleótidos con una guanosina en posición 5' estaban infrarrepresentados. Este sesgo fue introducido muy probablemente por la RNA-ligasa T4 que discrimina contra la guanosina fosforilada en 5' como oligonucleótido donante; no se apreció desviación significativa alguna de la secuencia en el extremo 3'. Muchos de los fragmentos de ~21 nt derivados de los extremos 3' de la cadena de sentido o antisentido de los dúplex incluyen nucleótidos 3' que se derivan de la adición sin molde de nucleótidos durante la síntesis del RNA utilizando RNA-polimerasa T7. Es interesante que un número importante de RNAs endógenos de ~21 nt procedentes de *Drosophila* se clonaron también, algunos de ellos a partir de retrotransposones LTR y distintos de LTR (datos no presentados). Esto es consistente con un posible papel para la RNAi en la silenciamiento de transposones.

Los RNAs de ~21 nt aparecen en grupos arracimados (Figura 4a) que cubren las secuencias de dsRNA enteras. Aparentemente, la reacción de procesamiento corta el dsRNA dejando extremos 3' escalonados, otra característica de la escisión por RNasa III. Para el dsRNA de 39 pb, se encontraron dos racimos de RNAs de ~21 nt procedentes de cada cadena constitutiva del dsRNA, con inclusión de extremos salientes 3', pero se detectó un solo sitio de escisión en la diana de sentido y antisentido (Figuras 3A y 3B). Si los fragmentos de ~21 nt estuvieran presentes como RNAs de guía monocatenarios en un complejo que media la degradación de mRNA, podría suponerse que existen al menos dos sitios de escisión diana, pero este no era el caso. Ello sugiere que los RNAs de ~21 nt pueden estar presentes en forma bicatenaria en el complejo de endonucleasa, pero que solamente una de las cadenas puede utilizarse para reconocimiento y escisión del RNA diana. El uso de una sola de las cadenas de ~21 nt para escisión de la diana puede determinarse simplemente por la orientación en la que el dúplex de ~21 nt está unido al complejo de nucleasa. Esta orientación está definida por la dirección en la que se procesó el dsRNA original.

Las agrupaciones de ~21 mers para el dsRNA de 52 pb y 111 pb están menos bien definidas en comparación con el dsRNA de 39 pb. Las agrupaciones se extienden sobre regiones de 25 a 30 nt que representan muy probablemente varias subpoblaciones distintas de dúplex de ~21 nt y por consiguiente guían la escisión de la diana en varios sitios próximos. Estas regiones de escisión están todavía separadas predominantemente por intervalos de 20 a 23 nt. Las reglas que determinan el grado de regularidad en que el dsRNA puede procesarse a fragmentos de ~21 nt no se conocen todavía, pero se observó previamente que el espaciamiento de aprox. 21–23 nt de los sitios de escisión podría alterarse por una serie de uridinas (Zamore et al., 2000). La especificidad de escisión del dsRNA por RNasa III de *E. coli* parece estar controlada principalmente por antideterminantes, es decir por la exclusión de algunos pares de bases específicos en posiciones dadas con relación al sitio de escisión (Zhang y Nicholson, 1997).

Para ensayar si estaba presente modificación en el azúcar, la base o el casquete en los fragmentos de RNA procesados de ~21 nt, se incubó dsRNA de Pp-luc de 505 pb radiomarcado en el lisado durante 1 h, se aislaron los productos de ~21 nt, y se digirieron con nucleasa P1 o T2 para dar mononucleótidos. La mezcla de nucleótidos se analizó luego por cromatografía en capa fina bidimensional (Figura 4B). Ninguno de los cuatro ribonucleótidos naturales se modificaron, como se indica por digestión con P1 o T2. Los autores de la invención analizaron previamente la conversión de adenosina en inosina en los fragmentos de ~21 nt (después de una incubación de 2 h) y detectaron un pequeño grado de desaminación (<0,7%) (Zamore et al., 2000); una incubación más breve en el lisado (1 h) reducía esta fracción de inosina hasta niveles apenas detectables. La RNasa T2, que escinde en posición 3' del enlace fosfodiéster, producía nucleósido-3'-fosfato y nucleósido-3',5'-difosfato, indicando con ello la presencia de un monofosfato en posición terminal 5'. Los cuatro nucleósido-3',5'-difosfatos se detectaron y sugieren que el enlace internucleotídico se escindía con poca o ninguna especificidad de secuencia. En resumen, los fragmentos de ~21 nt no están modificados y se generaron a partir de dsRNA de tal modo que estaban presentes 5'-monofosfatos y 3'-hidroxilos en el extremo 5'.

1.2.4. Los RNAs sintéticos de 21 y 22 nt Median la Escisión del RNA Diana

El análisis de los productos del procesamiento de dsRNA indicaba que los fragmentos de ~21 nt son generados por una reacción con todas las características de una reacción de escisión por la RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982). La RNasa III realiza dos cortes escalonados en ambas cadenas del dsRNA, dejando un saliente 3' de aproximadamente 2 nt. Los autores de la invención sintetizaron químicamente RNAs de 21 y 22 nt, idénticos en secuencia a algunos de los fragmentos de ~21 nt clonados, y ensayaron los mismos respecto a su capacidad para mediar la degradación del RNA diana (Figuras 5A y 5B). Los dúplex de RNA de 21 y 22 nt se incubaron a concentraciones 100 nM en el lisado, concentraciones 10 veces mayores que el dsRNA de control de 52 pb. En estas condiciones, la escisión del RNA diana es fácilmente detectable. La reducción de la concentración de dúplex de 21 y 22 nt desde 100 a 10 nM causa todavía escisión del RNA diana. Sin embargo, el aumento de la concentración del dúplex desde 100 nM a 1000 nM, no aumenta ulteriormente la escisión de la diana, debido probablemente a un factor limitante proteínico existente en el lisado.

En contraste con los dsRNAs de 29 ó 30 pb que no mediaban la RNAi, los dsRNAs de 21 y 22 nt con extremos 3' salientes de 2 a 4 nt mediaban la degradación eficiente del RNA diana (dúplex 1, 3, 4, 6, Figuras 5A y 5B). Los dsRNAs de 21 ó 22 nt con extremos romos (dúplex 2, 5, y 7, Figuras 5A y 5B) se redujeron en su capacidad para degradar la diana e indicaban que los extremos salientes 3' son críticos para reconstitución del complejo RNA-proteína nucleasa. Los salientes monocatenarios pueden ser necesarios para unión de afinidad alta del dúplex de ~21 nt a los componentes proteínicos. Un fosfato 5'-terminal, aunque estaba presente después del procesamiento con dsRNA, no era necesario para mediar la escisión del RNA diana y estaba ausente de los RNAs sintéticos cortos.

Los dúplex sintéticos de 21 y 22 nt guiaban la escisión de las dianas de sentido y antisentido en la región abarcada por el dúplex corto. Éste es un resultado importante considerando que un dsRNA de 39 pb, que forma dos pares de racimos de fragmentos de ~21 nt (Fig. 2), escindía la diana de sentido o antisentido una sola vez y no dos veces. Los autores interpretan este resultado sugiriendo que únicamente una de las dos cadenas presentes en el dúplex de ~21 nt es capaz de guiar la escisión del RNA diana y que la orientación del dúplex de ~21 nt en el complejo de nucleasa está determinada por la dirección inicial de procesamiento del dsRNA. Sin embargo, la presentación de un dúplex de ~21 nt ya perfectamente procesado al sistema in vitro, no permite la formación del complejo de nucleasa

activo específico de la secuencia con dos orientaciones posibles del dúplex de RNA simétrico. Esto da como resultado la escisión de la diana de sentido y antisentido dentro de la región de identidad con el dúplex de RNA de 21 nt.

El sitio de escisión de la diana está localizado 11 ó 12 nt aguas abajo del primer nucleótido que es complementario a la secuencia guía de 21 ó 22 nt, es decir, que el sitio de escisión está próximo al centro de la región abarcada por los RNAs de 21 ó 22 nt (Figuras 4A y 4B). El desplazamiento de la cadena de sentido de un dúplex de 22 nt por dos nucleótidos (compárense los dúplex 1 y 3 en la Figura 5A) desplazaba el sitio de escisión de la diana antisentido únicamente por dos nucleótidos. El desplazamiento tanto de la cadena de sentido como de la cadena antisentido por 2 nucleótidos desplazaba ambos sitios de escisión por dos nucleótidos (compárense los dúplex 1 y 4). Se predice que sería posible diseñar un par de RNAs de 21 ó 22 nt para escindir un RNA diana prácticamente en cualquier posición dada.

La especificidad de la escisión del RNA diana guiada por RNAs de 21 y 22 nt parece exquisita, dado que no se detecta sitio aberrante alguno (Figura 5B). Sin embargo, debe observarse que los nucleótidos presentes en el Saliente 3' del dúplex de RNA de 21 y 22 nt pueden contribuir menos al reconocimiento del sustrato que los nucleótidos cercanos al sitio de escisión. Esto está basado en la observación de que el nucleótido más próximo a 3' en el saliente 3' de los dúplex activos 1 ó 3 (Figura 5A) no es complementario a la diana. Un análisis detallado de la especificidad de la RNAi puede emprenderse ahora fácilmente utilizando RNAs sintéticos de 21 y 22 nt.

Basándose en la evidencia de que los RNAs sintéticos de 21 y 22 nt con salientes 3' median la interferencia del RNA, se propuso designar los RNAs de ~21 nt como "RNAs de interferencia corta" o siRNAs, y el complejo RNA-proteína respectivo como una "partícula de ribonucleoproteína interferente pequeña" o siRNP.

1.2.5.3. Los Salientes 3' de 20 nt en los dsRNAs cortos inhiben la RNAi

Se ha demostrado que parecen procesarse dsRNAs cortos con extremos romos a partir de los extremos del dsRNA. Durante el estudio de la dependencia de la longitud del dsRNA en la RNAi realizado por los autores de la invención, se han analizado también dsRNAs con extremos 3' salientes de 17 a 20 nt y se ha encontrado de modo sorprendente que los mismos eran menos potentes que los dsRNAs de extremos romos. El efecto inhibitorio de los extremos 3' largos era particularmente pronunciado para dsRNAs de hasta 100 pb, pero era menos espectacular para los dsRNAs más largos. El efecto no era debido a una formación imperfecta de dsRNA basada en el análisis de gel nativo (datos no representados). Se ensayó si el efecto inhibitorio de los extremos 3' salientes largos podría utilizarse como herramienta para dirigir el procesamiento de dsRNA a uno solo de los dos extremos de un dúplex de RNA corto.

Se sintetizaron cuatro combinaciones del dsRNA molde de 52 pb, la extensión 3' con extremos romos solamente en la cadena de sentido, la extensión 3' solamente en la cadena antisentido, y la extensión 3' doble en ambas cadenas, y se mapearon los sitios de escisión del RNA diana después de incubación en el lisado (Figuras 6A y 6B). El sitio de escisión primero y predominante de la cadena de sentido se perdió cuando se extendía el extremo 3' de la cadena antisentido del dúplex, y viceversa, el sitio de escisión fuerte de la cadena antisentido se perdía cuando se extendía el extremo 3' de la cadena de sentido del dúplex. Las extensiones en 3' de ambas cadenas hacían que el dsRNA de 52 pb se volviera virtualmente inactivo. Una explicación para la desactivación del dsRNA por las extensiones 3' de ~20 nt podría ser la asociación de proteínas de fijación de RNA monocatenarias que podrían interferir con la asociación de uno de los factores de procesamiento del dsRNA en este extremo. Este resultado es consistente también con el modelo de los autores de la invención en el cual una sola de las cadenas del dúplex de siRNA en el siRNP ensamblado es capaz de guiar la escisión del RNA diana. La orientación de la cadena que guía la escisión del RNA está definida por la dirección de la reacción de procesamiento del dsRNA. Es probable que la presencia de extremos 3' escalonados pueda facilitar el ensamblaje del complejo de procesamiento. Un bloque en el extremo 3' de la cadena de sentido permitirá únicamente el procesamiento de dsRNA desde el extremo 3' opuesto de la cadena antisentido. Esto genera a su vez complejos siRNP en los cuales únicamente la cadena antisentido del dúplex de siRNA es capaz de guiar la escisión del RNA de sentido diana. Lo mismo es cierto para la situación recíproca.

El efecto inhibitorio menos pronunciado de extensiones 3' largas en el caso de dsRNAs más largos (≥ 500 pb, datos no presentados) sugiere a los autores de la invención que los dsRNAs largos pueden contener también señales de procesamiento de dsRNA internas o pueden llegar a ser procesados cooperativamente debido a la asociación de factores de escisión múltiples.

1.2.6. Un Modelo para la Escisión de mRNA Dirigido por dsRNA

Los nuevos datos bioquímicos actualizan el modelo en cuanto al modo en que el dsRNA direcciona el mRNA para su destrucción (Figura 7). El RNA bicatenario se procesa primeramente a dúplex de RNA cortos que tienen predominantemente una longitud de 21 y 22 nt y con extremos escalonados 3' similares a una reacción análoga a la de la RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1982). Basándose en la longitud de 21–23 nt de los fragmentos de RNA procesados, se ha especulado ya que puede estar implicada una actividad análoga a la de RNasa III en la RNAi (Bass, 2000). Esta hipótesis se ve respaldada adicionalmente por la presencia de 5'-fosfatos y 3'-hidroxilos en

los términos de los siRNAs tal como se observa en los productos de reacción de RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999). Se ha demostrado que la RNasa III bacteriana y los homólogos eucariotas Rnt1p en *S. cerevisiae* y Pac1p en *S. pombe* funcionan en el procesamiento del RNA ribosómico así como en snRNA y snoRNAs (véase por ejemplo Chanfreau et al., 2000).

5 Se sabe poco acerca de la bioquímica de los homólogos de la RNasa III de plantas, animales o humanos. Dos familias de enzimas RNasa III han sido identificadas predominante por análisis de la secuencia guiada por bases de datos o clonación de cDNAs. La primera familia de RNasa III está representada por la proteína drosha de 1327 aminoácidos de longitud de *D. melanogaster* (Acc. AF116572). El término C se compone de dos dominios de fijación de RNasa III y un solo dominio de fijación de dsRNA, y el término N tiene una función desconocida. Se encuentran también homólogos próximos en *C. elegans* (Acc. AF160248) y humanos (Acc. AF18911) (Filippov et al., 2000; Wu et al., 2000). La RNasa III humana semejante a drosha ha sido clonada y caracterizada recientemente (Wu et al., 2000). El gen se expresa ubicuamente en tejidos y líneas de células humanas(as), y la proteína está localizada en el núcleo y el nucléolo de la célula. Sobre la base de los resultados deducidos de estudios de inhibición antisentido, se sugirió un papel de esta proteína respecto al procesamiento del rRNA. La segunda clase está representada por el gen K12H4.8 de *C. elegans* (Acc. S44849) que codifica una proteína de 1822 aminoácidos de longitud. Esta proteína tiene un motivo de RNA helicasa N-terminal que va seguido por dos dominios catalíticos de RNasa III y un motivo de fijación de dsRNA, similar a la familia de RNasa III de drosha. Existen homólogos próximos en *S. pombe* (Acc. QO9884), *A. thaliana* (Acc. AF187317), *D. melanogaster* (Acc. AE003740) y humanos (Acc. AB028449) (Filippov et al., 2000; Jacobsen et al., 1999; Matsuda et al. 2000). Posiblemente, la RNasa III/helicasa K12H4.8 es el candidato probable que está implicado en la RNAi.

Selecciones genéticas en *C. elegans* identificaron rde-1 y rde-4 como esenciales para la activación de RNAi sin un efecto sobre la movilización o co-supresión de transposones (Dernburg et al., 2000; Grishok et al., 2000; Ketting y Plasterk, 2000; Tabara et al., 1999). Esto condujo a la hipótesis de que estos genes son importantes para el procesamiento de dsRNA pero no están implicados en la degradación de la diana mRNA. La función de ambos genes es todavía desconocida, siendo el producto del gen rde-1 un miembro de una familia de proteínas similares a la proteína eIF2C de conejo (Tabara et al., 1999), y no habiéndose descrito todavía la secuencia de rde-4. La caracterización bioquímica futura de estas proteínas debería revelar su función molecular.

El procesamiento a los dúplex de siRNA parece iniciarse desde los extremos de ambos dsRNAs con extremos romos o dsRNAs con salientes 3' cortos (1–5 nt), y procede en pasos de aproximadamente 21–23 nt. Los extremos escalonados 3' largos (~20 nt) en dsRNAs cortos suprimen la RNAi, debido posiblemente a interacción con proteínas de fijación de RNA monocatenarias. La supresión de la RNAi por regiones monocatenarias flanqueantes de dsRNA corto y la ausencia de formación de siRNA a partir de dsRNAs cortos de 30 pb puede explicar por qué las regiones estructuradas que se encuentran frecuentemente en los mRNAs no conducen a la activación de la RNAi.

Sin pretender quedar ligados a la teoría, se supone que las proteínas de procesamiento de dsRNA o un subconjunto de éstas se mantienen asociadas con el dúplex de siRNA después de la reacción de procesamiento. La orientación del dúplex de siRNA con relación a estas proteínas determina cuál de las dos cadenas complementarias funciona como guía en la degradación del RNA diana. Los dúplex de siRNA sintetizados químicamente guían la escisión del RNA diana tanto de sentido como antisentido, dado que son capaces de asociarse con los componentes proteínicos en cualquiera de las dos orientaciones posibles.

El notable descubrimiento de que dúplex de siRNA sintéticos de 21 y 22 nt pueden utilizarse para degradación eficiente del mRNA proporciona nuevas herramientas para la regulación específica de secuencia de la expresión génica en genómica funcional así como en estudios biomédicos. Los siRNAs pueden ser eficaces en sistemas de mamífero en los que no puede utilizarse dsRNA largos debido a la activación de la respuesta PKR (Clemens, 1997). Como tales, los dúplex de siRNA representan una nueva alternativa a la terapéutica antisentido o con ribozimas.

45 Ejemplo 2

Interferencia de RNA en Cultivos de Tejido Humanos

2.1. Métodos

2.1.1. Preparación del RNA

Se sintetizaron químicamente RNAs de 21 nt utilizando RNA-fosforamiditos Expedite y timidina-fosforamidito (Proligo, Alemania). Se desprotegeron oligonucleótidos sintéticos y se purificaron en gel (Ejemplo 1), seguido por purificación con un cartucho SepPak C18 (Waters, Milford, MA, EE.UU.) (Tuschl, 1993). Las secuencias de siRNA direccionadas a GL2 (Acc. X65324) y luciferasa GL3 (Acc. U47296) correspondían a las regiones codificantes 153–173 con relación al primer nucleótido del codón de partida, y los siRNAs de direccionamiento de RL (Acc. AF025846) correspondían a la región 119–129 después del codón de partida. Los RNAs más largos se transcribían con RNA–

polimerasa a partir de productos PCR, seguido por purificación en gel y SepPak. Los dsRNAs de GL2 o GL3 de 49 y 484 pb correspondían a la posición 113–161 y 113–596, respectivamente, con relación al comienzo de la traducción; los dsRNAs de RL de 50 y 501 pb correspondían a las posiciones 118–167 y 118–618, respectivamente. Los moldes PCR para la síntesis de dsRNA que direccionaba GFP humanizada (hG) se amplificaron a partir de pAD3 (Kehlenbach, 1998), donde el dsRNA hG de 50 y 501 pb correspondía a las posiciones 118–167 y 118–618, respectivamente, con referencia al codón de partida.

Para la reasociación de siRNAs, se incubaron cadenas simples de 20 μ M en tampón de reasociación (acetato de potasio 100 mM, HEPES–KOH 30 mM a pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) durante 1 min a 90°C seguido por 1 h a 37°C. El paso de incubación a 37°C se prolongó durante una noche para los dsRNAs de 50 y 500 pb y estas reacciones de reasociación se realizaron para concentraciones de cadena de 8,4 μ M y 0,84 μ M, respectivamente.

2.1.2 Cultivo de Células

Se prepararon células S2 en medio *Drosophila* de Schneider (Life Technologies) complementado con 10% FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina a 25°C. Se cultivaron células 293, NIH/3T3, HeLa S3 y COS–7 a 37°C en medio de Eagle modificado de Dulbecco complementado con 10% de FDS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Las células se sometieron a pasadas regularmente a fin de mantener el crecimiento exponencial. 24 h antes de la transfección a aprox. 80% de la confluencia, se tripsinizaron células de mamífero y se diluyeron en relación 1:5 con medio reciente sin antibióticos ($1-3 \times 10^5$ células/ml) y se transfirieron a placas de 24 pocillos (500 μ l/pocillo). Las células S2 no se tripsinizaron antes de la división. La transfección se llevó a cabo con reactivo Lipofectamine 2000 (Life Technologies) como ha sido descrito por el fabricante para líneas de células adherentes. Se aplicaron por pocillo 1,0 μ g de pGL2–Control (Promega) o pGL3–Control (Promega), 0,1 μ g de pRL–TK (Promega) y 0,28 μ g de dúplex de siRNA o dsRNA, formulado en liposomas; el volumen final era 600 μ l por pocillo. Las células se incubaron 20 h después de la transfección y parecían sanas después de ello. La expresión de luciferasa se monitorizó subsiguientemente con el ensayo de luciferasa Dual (Promega). Las eficiencias de transfección se determinaron por microscopía de fluorescencia para líneas de células de mamífero después de co–transfección de 1,1 μ g hGFP que codificaba pAD3 y 0,28 μ g de siRNA invGL2 inGL2 y eran 70–90%. Los plásmidos informadores se amplificaron en XL–7 Blue (Stratagene) y se purificaron utilizando el kit Qiagen EndoFree Maxi Plasmid.

2.2. Resultados y Discusión

Para ensayar si los siRNAs son capaces también de mediar la RNAi en cultivo de tejido, se sintetizaron dúplex de siRNA de 21 nt con salientes 3' simétricos de 2 nt dirigidos contra los genes informadores que codifican el pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) y dos variantes de secuencias de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*, GL2 y GL3) (Fig. 8a, b). Los dúplex de siRNA se co–transfectaron con las combinaciones de plásmidos informadores pGL2/pRL o pGL3/pRL en células S2 *Schneider* de *D. melanogaster* o células de mamífero utilizando liposomas catiónicos. Las actividades de luciferasa se determinaron 20 h después de la transfección. En todas las líneas de células ensayadas, se observó una reducción específica de la expresión de los genes informadores en presencia de dúplex siRNA cognados (Fig. 9a–j). Es notable que los niveles de expresión de luciferasa absolutos no se veían afectados por los siRNAs no cognados, lo que indicaba la ausencia de efectos secundarios perjudiciales por los dúplex de RNA de 21 nt (v.g. Fig. 10 a–d para células HeLa). En las células S2 de *D. melanogaster* (Fig. 9a, b), la inhibición específica de las luciferasas era completa. En las células de mamífero, en las que los genes informadores se expresaban con intensidad de 50 a 100 veces mayor, la supresión específica era menos completa (Fig. 9c–j). La expresión de GL2 se reducía de 3 a 12 veces, la expresión de GL3 de 9 a 25 veces, y la expresión de RL de 1 a 3 veces, en respuesta a los siRNAs cognados. Para las células 293, el direccionamiento de RL–luciferasa por los siRNAs RL era ineficaz, aunque las dianas GL2 y GL3 respondían específicamente (Fig. 9i, j). La ausencia de reducción de la expresión de RL en las células 293 puede ser debida a su expresión de 5 a 20 veces mayor comparada con cualquier otra línea de células de mamífero ensayada y/o a la accesibilidad limitada de la secuencia diana debido a la estructura secundaria del RNA o de proteínas asociadas. Sin embargo, el direccionamiento específico de luciferasa GL2 y GL3 por los dúplex de siRNA cognados indicaba que la RNAi tiene lugar también en las células 293.

El saliente 3' de 2 nt en todos los dúplex de siRNA, excepto en el caso de uGL2, estaba compuesto por (2'–desoxi)–timidina. La sustitución de uridina por timidina en el saliente 3' era bien tolerada en el sistema de *D. melanogaster* in vitro y la secuencia del saliente no era crítica para el reconocimiento de la diana. Se seleccionó el saliente de timidina debido a que se supone que el mismo aumenta la resistencia de los siRNAs a las nucleasas en el medio de cultivo de tejidos y dentro de las células transfectadas. De hecho, el siRNA de GL2 modificado con timidina era ligeramente más potente que el siRNA uGL2 sin modificar en todas las líneas de células ensayadas (Fig. 9a, c, e, g, i). Puede imaginarse que modificaciones ulteriores de los nucleótidos del saliente 3' puedan proporcionar beneficios adicionales al suministro y la estabilidad de los dúplex de siRNA.

- En experimentos de co-transfección, se utilizaron dúplex de siRNA de 25 nM con respecto al volumen final de medio de cultivo de tejido (Fig. 9, 10). El aumento de la concentración de siRNA a 100 nM no mejoraba los efectos de silenciamiento específicos, pero comenzaba a afectar las eficiencias de transfección debido a competencia para la encapsulación de liposomas entre el DNA plasmídico y el siRNA (datos no presentados). La disminución de la concentración de siRNA hasta 1,5 nM no reducía el efecto de silenciamiento específico (datos no presentados) aun cuando los siRNAs estaban ahora sólo 2 a 20 veces más concentrados que los plásmidos de DNA. Esto indica que los siRNAs son reactivos extraordinariamente potentes para mediar la silenciamiento de genes y que los siRNAs son eficaces a concentraciones que son varios órdenes de magnitud menores que las concentraciones aplicadas en los experimentos convencionales de direccionamiento de genes antisentido o de ribozima.
- Con objeto de monitorizar el efecto de los dsRNAs más largos sobre las células de mamífero, se prepararon dsRNAs de 50 y 500 pb cognados a los genes informadores. Como control inespecífico, se utilizaron dsRNAs de GFP humanizada (hG) (Kehlenbach, 1998). Cuando se co-transfectaron dsRNAs, en cantidades (no concentraciones) idénticas a los dúplex de siRNA, la expresión de los genes informadores se redujo acusada e inespecíficamente. Este efecto se ilustra para las células HeLa como ejemplo representativo (Fig. 10a–d). Las actividades absolutas de luciferasa se redujeron inespecíficamente de 10 a 20 veces por dsRNA de 50 pb y de 20 a 200 veces por co-transfección con dsRNA de 500 pb, respectivamente. Se observaron efectos inespecíficos similares para las células COS-7 y NIH/3T3. Para las células 293, se observó únicamente una reducción inespecífica de 10 a 20 veces en el caso de los dsRNAs de 500 pb. La reducción inespecífica en la expresión de genes informadores por dsRNA >30 pb era de esperar como parte de la respuesta de interferones.
- Sorprendentemente, a pesar de la fuerte disminución inespecífica en la expresión de genes informadores, los autores de la invención detectaron reproduciblemente una silenciamiento adicional específica de la secuencia, mediada por dsRNA. Sin embargo, los efectos de silenciamiento específicos, eran sólo aparentes cuando las actividades relativas de los genes informadores se normalizaron para los controles de dsRNA hG (Fig. 10e, f). Se observó una reducción específica de 2 a 10 veces en respuesta al dsRNA cognado, al igual que en las otras 3 líneas de células de mamífero ensayadas (datos no presentados). Los efectos de silenciamiento específicos con dsRNAs (356–1662 pb) se consignaron previamente en células CHO-K1, pero las cantidades de dsRNA requeridas para detectar una reducción específica de 2 a 4 veces eran aproximadamente 20 veces mayores que en los experimentos realizados por los autores (Ui–Tei, 2000). Asimismo, las células CHO-K1 parecen ser deficientes en la respuesta de interferones. En otro informe, se ensayaron células 293, NIH/3T3 y BHK-21 respecto a RNAi utilizando combinaciones de informadores luciferasa/lacZ y 829 pb de dsRNA lacZ específico o GFP inespecífico de 717 pb (Caplen, 2000). El fallo en la detección de RNAi en este caso puede ser debido al ensayo informador luciferasa/lacZ menos sensible y a las diferencias de longitud del dsRNA diana y de control. Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos por los autores indican que RNAi es activa en células de mamífero, pero que el efecto de silenciamiento es difícil de detectar, si el sistema de interferón está activado por dsRNA >30 pb.
- En suma, se ha demostrado por primera vez la silenciamiento de genes mediada por siRNA en células de mamífero. El uso de siRNAs cortos se considera muy prometedor para la inactivación de la función de los genes en cultivos de tejido humanos y el desarrollo de terapéuticas específicas de genes.

Ejemplo 3

Inhibición Específica de la Expresión de Genes por Interferencia de RNA

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Preparación de RNA y ensayo de RNAi

- Se realizaron ensayos de síntesis química de RNA, reasociación, y RNAi basada en luciferasa como se describe en los Ejemplos 1 ó 2 o en publicaciones previas (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Todos los dúplex de siRNA estaban dirigidos contra la luciferasa de luciérnaga, y la secuencia de mRNA de luciferasa se derivaba de pGEM-luc (GenBank Acc. X63316) como ha sido descrito (Tuschl et al., 1999). Los dúplex de siRNA se incubaron en una reacción RNAi/traducción de *D. melanogaster* durante 15 min antes de la adición de mRNAs. Los ensayos de RNAi basados en traducción se realizaron al menos por triplicado.

- Para el mapeado de la escisión del RNA diana de sentido, se generó un transcrito de 177 nt, correspondiente a la secuencia de luciferasa de luciérnaga entre las posiciones 113 y 273 con relación al codón de partida, seguido por el complemento de 17 nt de la secuencia promotora SP6. Para el mapeado de la escisión de RNA diana antisentido, se produjo un transcrito de 166 nt a partir de un molde, que se amplificó a partir de la secuencia plasmídica por PCR utilizando el iniciador 5' TAATACGACTCACTATAGAGCCCATATCGTTTCATA (promotor T7 subrayado) y el iniciador 3' AGAGGATGGAACCGCTGG. La secuencia diana corresponde al complemento de la secuencia de luciferasa de luciérnaga entre las posiciones 50 y 215 con relación al codón de partida. La marcación con guanilil-transferasa se realizó como ha sido descrito previamente (Zamore et al., 2000). Para EL mapeado de la escisión del RNA diana,

se incubaron 100 nM de dúplex de siRNA con RNA diana 5 a 10 nM en lisado de embrión de *D. melanogaster* en condiciones estándar (Zamore et al., 2000) durante 2 h a 25°C. La reacción se paró por adición de 8 volúmenes de tampón de proteinasa K (Tris-HCl 200 nM, pH 7,5, EDTA 25 mM, NaCl 300 mM, dodecil-sulfato de sodio 2% p/v). La proteinasa K (E.M. Merck, disuelta en agua) se añadió a una concentración final de 0,6 mg/ml. Las reacciones se incubaron luego durante 15 min a 65°C, se extrajeron con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol. Las muestras se localizaron en geles de secuenciación al 6%. Los patrones de longitud se generaron por digestión parcial con RNasa T1 e hidrólisis parcial con base de los RNAs diana de sentido o antisentido con casquete.

3.2. Resultados

3.2.1 Variación del saliente 3' en los dúplex de siRNAs de 21 nt

Como se ha descrito arriba, 2 ó 3 nucleótidos no apareados en el extremo 3' de los dúplex DE siRNA eran más eficientes en la degradación del RNA diana que los dúplex de extremos romos respectivos. Para realizar un análisis más exhaustivo de la función de los nucleótidos terminales, se sintetizaron 5 siRNAs de sentido de 21 nt, cada uno de los cuales era presentado por un solo nucleótido con relación al RNA diana, y 8 siRNAs antisentido de 21 nt, cada uno de los cuales era desplazado por un nucleótido con relación a la diana (Figura 11a). Por combinación de los siRNAs de sentido y antisentido, se generaron 8 series de dúplex de siRNA con extremos salientes sintéticos, que abarcaban un intervalo de salientes 3' de 7 nt a salientes 5' de 4 nt. La interferencia de los dúplex de siRNA se midió utilizando el sistema de ensayo dual de luciferasa (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Los dúplex de siRNA se dirigían contra mRNA de luciferasa de luciérnaga, y se utilizó mRNA de luciferasa de pensamiento de mar como control interno. La relación de luminiscencia de la actividad de luciferasa de la diana al control se determinó en presencia de dúplex de siRNA y se normalizó para la relación observada en ausencia de dsRNA. Para comparación, se muestran las relaciones de interferencia de dsRNAs largos (39 a 504 pb) en la Figura 11B. Las relaciones de interferencia se determinaron para concentraciones de 5 nM para dsRNAs largos (Figura 11A) y a 100 nM para dúplex de siRNA (Figura 11C–J). Se eligieron las concentraciones 100 nM de siRNAs debido a que el procesamiento completo del dsRNA 5 nM de 504 pb podría dar como resultado dúplex de siRNA totales de 120 nm.

La capacidad de los dúplex de siRNA de 21 nt para mediar la RNAi depende del número de nucleótidos salientes o pares de bases formados. Los dúplex con 4 a 6 nucleótidos salientes 3' eran incapaces de mediar la RNAi (Figura 11C–F), como lo eran los dúplex con dos o más nucleótidos salientes 5' (Figura 11G–J). Los dúplex con salientes 3' de 2 nt eran muy eficientes en la mediación de la interferencia de RNA, aunque la eficiencia de silenciación era también dependiente de la secuencia, y se observaron diferencias de hasta 12 veces para dúplex diferentes de siRNA con salientes 3' de 2 nt (compárense las Figuras 11D–H). Los dúplex con extremos romos que tenían salientes 5' de 1 nt o salientes 3' de 1 a 3 nt eran funcionales en algunos casos. El pequeño efecto de silenciación observado para dúplex de siRNA con saliente 3' de 7 nt (Figura 11C) puede ser debido a un efecto antisentido del saliente 3' largo más bien que a RNAi. La comparación de la eficiencia de RNAi entre dsRNAs largos (Figura 11B) y los dúplex de siRNA de 21 nt más efectivos (Fig. 11E, G, H) indica que un solo dúplex de siRNA a concentración 100 nm puede ser tan eficaz como un dsRNA de 504 pb 5 nM.

3.2.2 Variación de la longitud del siRNA de sentido apareado a un siRNA antisentido invariante de 21 nt

Con objeto de investigar el efecto de la longitud de siRNA sobre la RNAi, se prepararon tres series de dúplex de siRNA, combinando tres cadenas antisentido de 21 nt con 8 cadenas de sentido de 18 a 25 nt. El saliente 3' del siRNA antisentido se fijó a 1, 2, ó 3 nt en cada serie de dúplex de siRNA, mientras que el siRNA de sentido se varió en su extremo 3' (Figura 12A). Independientemente de la longitud del siRNA de sentido, se encontró que los dúplex con salientes 3' de 2 nt de siRNA antisentido (Figura 12C) eran más activos que aquéllos que tenían salientes 3' de 1 ó 3 nt (Figura 12B, D). En la primera serie, con saliente 3' de 1 nt de siRNA antisentido, los más activos eran los dúplex con siRNAs de sentido de 21 y 22 nt, que llevaban un saliente 3' de 1 y 2 nt de siRNA de sentido, respectivamente. Los dúplex con siRNAs de sentido de 19 a 25 nt eran también capaces de mediar RNA, pero en menor grado. Análogamente, en la segunda serie, con saliente de 2 nt de siRNA antisentido, el dúplex de siRNA de 21 nt con saliente 3' de 2 nt era el más activo, y cualquier otra combinación con siRNAs de sentido de 18 a 25 nt era activa en un grado significativo. En la última serie, con saliente 3' de siRNA antisentido de 3 nt, únicamente el dúplex con un siRNA de sentido de 20 nt y el saliente 3' de sentido de 2 nt era capaz de reducir la expresión del RNA diana. En conjunto, estos resultados indican que la longitud del siRNA así como la longitud del saliente 3' son importantes, y que los dúplex de siRNAs de 21 nt con saliente 3' de 2 nt son óptimos para RNAi.

3.2.3 Variación de la longitud de los dúplex de siRNA con un saliente 3' constante de 2 nt

Se examinó luego el efecto del cambio simultáneo de la longitud de ambas cadenas de siRNA por mantenimiento de salientes 3' simétricos de 2 nt (Figura 13A). Se prepararon dos series de dúplex de siRNA que incluían el dúplex de siRNA de 21 nt de la Figura 11H como referencia. La longitud de los dúplex se varió entre 20 y 25 pb extendiendo el segmento de bases apareadas en el extremo 3' del siRNA de sentido (Figura 3B) o en el extremo 3' del siRNA anti-

sentido (Figura 13C). Los dúplex de 20 a 23 pb causaban represión específica de la actividad de luciferasa diana, pero el dúplex de siRNA de 21 nt era al menos 8 veces más eficiente que cualquiera de los otros dúplex. Los dúplex de siRNA de 24 y 25 nt no daban como resultado interferencia detectable alguna. Los efectos específicos de la secuencia eran menores, dado que las variaciones en ambos extremos del dúplex producían efectos similares.

5 3.2.4 Dúplex de siRNA modificados con 2'-desoxi y 2'-O-metilo

Para evaluar la importancia de los residuos ribosa de siRNA para la RNAi, se examinaron dúplex con siRNAs de 21 nt y salientes 3' de 2 nt con cadenas modificadas con 2'-desoxi o 2'-O-metilo (Figura 14). La sustitución de los salientes 3' de 2 nt por 2'-desoxi-nucleótidos no tenía efecto alguno, e incluso el reemplazamiento de dos ribonucleótidos adicionales adyacentes a los salientes en la región apareada, producía siRNAs significativamente activos. Así, 8 de un total de 42 nt de un dúplex de siRNA se reemplazaron por residuos de DNA sin pérdida de actividad. Sin embargo, la sustitución completa de una o ambas cadenas de siRNA por residuos 2'-desoxi, anulaba la RNAi, como lo hacía la sustitución por residuos 2'-O-metilo.

3.2.5 Definición de los sitios de escisión del RNA diana

Se determinaron previamente las posiciones de escisión del RNA diana para dúplex de siRNA de 22 nt y para un dúplex de 21 nt/22 nt. Se encontró que la posición de la escisión del RNA diana estaba localizada en el centro de la región abarcada por el dúplex de siRNA, 11 ó 12 nt aguas abajo del primer nucleótido que era complementario a la secuencia guía de siRNA de 21 ó 22 nt. Se incubaron cinco dúplex de siRNA de 21 nt distintos con saliente 3' de 2 nt (Figura 15a) con RNA diana de sentido o antisentido marcado en el casquete 5' en lisado de *D. melanogaster* (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Los productos de escisión 5' se resolvieron en geles de secuenciación (Figura 15B). La cantidad de RNA diana de sentido escindida está correlacionada con la eficiencia de los dúplex de siRNA determinada en el ensayo basado en traducción, y los dúplex de siRNA 1, 2 y 4 (Figura 15B y 11H, G, E) escinden el RNA diana más rápidamente que los dúplex 3 y 5 (Figura 15B y 11F, D). Es notable que la suma de radiactividad del producto con escisión 5' y el RNA diana de entrada no se mantuviera constante a lo largo del tiempo, y los productos de escisión 5' no se acumulaban. Presumiblemente, los productos de escisión, una vez liberados del complejo siRNA-endonucleasa, se degradan rápidamente, debido a la ausencia de la cola poli(A) del casquete 5'.

Los sitios de escisión para los RNAs diana tanto de sentido como antisentido estaban localizados en el centro de la región abarcada por los dúplex de siRNA. Los sitios de escisión para cada diana producida por los 5 dúplex diferentes variaban en 1 nt de acuerdo con el desplazamiento de 1 nt de los dúplex a lo largo de las secuencias diana. Las dianas se escindían con precisión 11 nt aguas abajo de la posición de la diana complementaria al nucleótido más próximo a 3' del siRNA guía complementario de la secuencia (Figura 15A, B).

A fin de determinar si el extremo 5' o el 3' del siRNA guía establece la pauta para la escisión del RNA diana, se ideó la estrategia experimental reseñada en la Figura 16A y B. Un siRNA antisentido de 21 nt, que se mantenía invariable para este estudio, se apareó con siRNAs de sentido que se modificaron en cualquiera de sus extremos 5' o 3'. La posición de la escisión del RNA diana de sentido y antisentido se determinó como se ha descrito arriba. Los cambios en el extremo 3' del siRNA de sentido, monitorizados para el saliente 5' de 1 nt hasta el saliente 3' de 6 nt, no afectaban a la posición de la escisión del RNA diana de sentido ni del RNA antisentido (Figura 16C). Los cambios en el extremo 5' del siRNA de sentido no afectaban a la escisión del RNA diana de sentido (Figura 16D, panel superior), como se esperaba, debido a que el siRNA antisentido se mantenía inalterado. Sin embargo, la escisión del RNA diana antisentido se veía afectada y era fuertemente dependiente del extremo 5' del siRNA de sentido (Figura 16D, panel inferior). La diana antisentido se escindía únicamente cuando el siRNA de sentido tenía un tamaño de 20 ó 21 nt, y la posición de escisión se diferenciaba en 1 nt, lo que sugería que el extremo 5' del siRNA que reconoce la diana establece la pauta para la escisión del RNA diana. La posición está localizada entre los nucleótidos 10 y 11 cuando se cuenta en dirección aguas arriba desde el nucleótido diana apareado al nucleótido más próximo a 5' del siRNA guía (véase también la Figura 15A).

3.2.6 Efectos de la secuencia y sustituciones con 2'-desoxi en el saliente 3'

Se prefiere un saliente 3' de 2 nt para la función de siRNA. Se deseaba conocer si la secuencia de los nucleótidos salientes contribuye al reconocimiento de la diana, o si es únicamente una característica requerida para reconstitución del complejo con endonucleasa (RSIC o siRNP). Se sintetizaron siRNAs de sentido y antisentido con salientes 3' AA, CC, GG, UU, y UG, e incluían las modificaciones con 2'-desoxi TdG y TT. Los siRNAs de tipo salvaje contenían AA en el saliente 3' de sentido y UG en el saliente 3' antisentido (AA/UG). Todos los dúplex de siRNA eran funcionales en el ensayo de interferencia y reducían la expresión de la diana al menos 5 veces (Figura 17). Los dúplex siRNA más eficientes que reducían la expresión de la diana más de 10 veces, eran del tipo de secuencia NN/UG, NN/UU, NN/TdG, y NN/TT (donde N es cualquier nucleótido). Los dúplex de siRNA con un saliente 3' de siRNA antisentido de AA, CC o GG eran menos activos por un factor de 2 a 4 cuando se comparaban con la secuencia de tipo salvaje UG o el mutante UU. Esta reducción en la eficiencia de RNAi es debida probablemente a la

contribución del penúltimo nucleótido 3' para el reconocimiento de la diana específica de la secuencia, dado que el nucleótido 3'-terminal se cambió de G a U sin efecto alguno.

Los cambios en la secuencia del saliente 3' del siRNA de sentido no revelaron efecto alguno dependiente de la secuencia, como era de esperar, dado que el siRNA de sentido no debe contribuir a reconocimiento del mRNA diana de sentido.

3.2.7. Especificidad de secuencia de reconocimiento de la diana

Con objeto de examinar la especificidad de secuencia del reconocimiento de la diana, se introdujeron cambios de secuencia en los segmentos apareados de dúplex de siRNA y se determinó la eficiencia de silenciamiento. Los cambios de secuencia se introdujeron invirtiendo segmentos cortos 3 ó 4 nt de longitud o como mutaciones puntuales (Figura 18). Los cambios de secuencia en una cadena de siRNA se compensaban en la cadena de siRNA complementaria a fin de evitar perturbar la estructura del dúplex de siRNA de bases apareadas. La secuencia de todos los salientes 3' de 2 nt era TT (T, 2'-desoxitimidina) para reducir los costes de síntesis. El dúplex de siRNA de referencia TT/TT era comparable en RNAi al dúplex de siRNA de tipo salvaje AA/UG (Figura 17). La capacidad para mediar la destrucción del mRNA informador se cuantificó utilizando el ensayo de luminiscencia basado en traducción. Los dúplex de siRNAs con segmentos de secuencia invertidos exhibían una capacidad espectacularmente reducida para direccionamiento del informador luciferasa de luciérnaga (Figura 18). Los cambios de secuencia localizados entre el extremo 3' y el centro del siRNA antisentido anulaban por completo el reconocimiento del RNA diana, pero mutaciones próximas al extremo 5' del siRNA antisentido exhibían un pequeño grado de silenciamiento. La transversión del par de bases A/U localizado directamente opuesto al sitio de escisión predicho del RNA diana, o un solo nucleótido más allá del sitio, evitaba la escisión del RNA diana, indicando con ello que una sola mutación dentro del centro del dúplex de siRNA discrimina entre las dianas con apareamiento erróneo.

3.3 Discusión

Los siRNAs son reactivos valiosos para la desactivación de la expresión génica, no sólo en células de insecto, sino también en células de mamífero, con un gran potencial para aplicación terapéutica. Se han analizado sistemáticamente los determinantes estructurales de los dúplex de siRNA requeridos para promover una degradación eficiente del RNA diana en lisado de embrión de *D. melanogaster*, proporcionando así pautas para el diseño de dúplex de siRNA muy potentes. Un dúplex de siRNA perfecto es capaz de silenciar la expresión génica con una eficiencia comparable a un dsRNA de 500 pb, dado que se utilizan cantidades comparables de RNA total.

3.4 La guía del usuario de siRNA

Los dúplex siRNA de silenciamiento eficientes se componen preferiblemente de siRNAs antisentido de 21 nt, y deberían seleccionarse para formar una doble hélice de 19 pb con extremos salientes 3' de 2 nt. Las sustituciones con 2'-desoxi de los ribonucleótidos 3' salientes de 2 nt no afectan a la RNAi, pero contribuyen a reducir los costes de la síntesis de RNA y pueden mejorar la resistencia a las RNasas de los dúplex de siRNA. Sin embargo, modificaciones más extensas de 2'-desoxi y 2'-O-metilo, reducen la capacidad de los siRNAs para mediar la RNAi, probablemente por interferir con la asociación de proteínas para el ensamblaje de siRNAP.

El reconocimiento de la diana es un proceso altamente específico de la secuencia, mediado por la complementariedad de siRNA a la diana. El nucleótido más próximo al extremo 3' del siRNA guía no contribuye a la especificidad del reconocimiento de la diana, mientras que el penúltimo nucleótido del saliente 3' afecta a la escisión del RNA diana, y un desapareamiento reduce la RNAi 2 a 4 veces. El extremo 5' de un siRNA guía parece ser también más permisivo para el reconocimiento del RNA diana desapareado cuando se compara con el extremo 3'. Los nucleótidos situados en el centro del siRNA, localizados frente al sitio de escisión del RNA diana, son determinantes importantes de la especificidad, e incluso cambios simples de nucleótidos reducen la RNAi a nivel indetectable. Esto sugiere que los dúplex de siRNA pueden ser capaces de discriminar alelos mutantes o polimórficos en experimentos de direccionamiento de genes, lo que puede llegar a ser una característica importante para desarrollos terapéuticos futuros.

Se ha sugerido que los siRNAs de sentido y antisentido, cuando se asocian con los componentes proteínicos del complejo de endonucleasas o su complejo de compromiso, juegan papeles distintos; la orientación relativa del dúplex siRNA en este complejo define qué cadena puede utilizarse para reconocimiento de la diana. Los dúplex de siRNA sintéticos tienen simetría de diada con respecto a la estructura de la doble hélice, pero no con respecto a la secuencia. La asociación de dúplex de siRNA con las proteínas de RNAi en el lisado de *D. melanogaster* puede conducir a la formación de dos complejos asimétricos. En tales complejos hipotéticos, el entorno quiral es distinto para el siRNA de sentido y antisentido, de lo que se deriva su función. Evidentemente, la predicción no es aplicable a secuencias de siRNA palindrómicas, o a proteínas RNAi que podrían asociarse como homodímeros. Para minimizar los efectos de la secuencia, que pueden afectar a la relación de los siRNPs de direccionamiento de sentido y antisentido, los autores de la invención sugieren utilizar secuencias de siRNA con secuencias salientes 3' idénticas. Se recomienda ajustar la secuencia del saliente del siRNA de sentido a la del saliente 3' antisentido, dado que el

5 siRNA de sentido no tiene una diana en experimentos de silenciación ("knock-down") típicos. La asimetría en la reconstitución de los siRNPs que se escinden con sentido y antisentido podría ser (parcialmente) responsable de la variación en la eficiencia de la RNAi observada para diversos dúplex de siRNA de 21 nt con salientes 3' de 2 nt utilizados en este estudio (Figura 14). Alternativamente, la secuencia de nucleótidos en el sitio diana y/o la accesibilidad de la estructura del RNA diana puede ser responsable de la variación en la eficiencia para estos dúplex de siRNA.

Referencias

- Bass, B. L. (2000).** Double-stranded DNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238.
- 5 **Bosher, J. M., and Labouesse, M. (2000).** RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* 2, E31-36.
- Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R. A. (2000).** dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252, 95-105.
- 10 **Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., and Cogoni, C. (2000).** Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245.
- Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. (2000).** Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3142-3147.
- 15 **Clemens, M. J. (1997).** PKR-a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 945-949.
- 20 **Cogoni, C., and Macino, G. (1999).** Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 657-662.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D. C. (2000).** An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- 25 **Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M. P., and Villeneuve, A. M. (2000).** Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Dev.* 14, 1578-1583.
- 30 **Dunn, J. J. (1982).** Ribonuclease III. In *The enzymes*, vol 15, part B, P. D. Boyer, ed. (New York: *Academic Press*), pp. 485-499.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschke, T. (2001).** RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15, 188-200.
- 35 **Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S. S. (2000).** A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.
- Fire, A. (1999).** RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363.
- 40 **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Grishok, A., Tabara, H., and Mello, C. C. (2000).** Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497.
- 45 **Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- 50 **Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000).** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* 404, 293-296.
- Jacobsen, S. E., Running, M. P., and M., M. E. (1999).** Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126, 5231-5243.
- 55 **Jensen, S., Gassama, M. P., and Heidmann, T. (1999).** Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat. Genet.* 21, 209-212.
- Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A. & Gerace, L. (1998).** Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT *In vitro*. *J. Cell Biol.* 141, 863-874.
- 60
- 65

- Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G., and Plasterk, R. H. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99, 133-141.
- Ketting, R. F., and Plasterk, R. H. (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296-298.
- Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., and Ding, S. W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672-1680.
- Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S., and Hamaguchi, M. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim. Biophys. Acta* 31, 1-2.
- Milligan, J.F., and Uhlenbeck, O.C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51-62.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayer, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A., and Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14687-14692.
- Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371-390.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D., and De Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757-763.
- Pan, T., and Uhlenbeck, O. C. (1992). *In vitro* selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb2+. *Biochemistry* 31, 3887-3895.
- Pelissier, T., and Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed methylation. *RNA* 6, 55-65.
- Plasterk, R. H., and Ketting, R. F. (2000). The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 562-567.
- Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., and Baulcombe, D. C. (1999). Gene Silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1216.
- Robertson, H. D. (1990). *Escherichia coli* ribonuclease III. *Methods Enzymol.* 181, 189-202.
- Robertson, H. D. (1982). *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell* 30, 669-672.
- Romaniuk, E., McLaughlin, L. W., Neilson, T., and Romaniuk, P. J. (1982). The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction. *Eur J Biochem* 125, 639-643.
- Sharp, P. A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes & Dev.* 13, 139-141.
- Sijen, T., and Kooter, J. M. (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22, 520-531.
- Smardon, A., Spoerke, J., Stacey, S., Klein, M., Mackin, N., and Maine, E. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 10, 169-178.
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., and Schultz, R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.
- Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benseler, F., and Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658-11668.

Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (1998). Selection *in vitro* of novel ribozymes from a partially randomized U2 and U6 snRNA library. *EMBO J.* 17, 2637-2650.

5 **Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999).** Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes & Dev.* 13, 3191-3197.

Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y. & Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Letters* 479, 79-82.

10 **Verma, S., and Eckstein, F. (1999).** Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 99-134.

Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.

15 **Wassenegger, M. (2000).** RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* 43, 203-220.

Wianny, F., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.

20 **Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., and Crooke, S. T. (2000).** Human RNase III is a 160 kDa Protein Involved in Preribosomal RNA Processing. *J. Biol. Chem.* 17, 17.

Yang, D., Lu, H. and Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *drosophila* embryos. *Curr. Biol.*, 10, 1191-1200.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

30 **Zhang, K., and Nicholson, A. W. (1997).** Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13437-13441.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Molécula de RNA bicatenario aislada, en la cual cada cadena de RNA tiene una longitud de 19 a 23 nucleótidos, y en la cual al menos una cadena tiene un saliente 3' de 1 a 3 nucleótidos, en el que dicha molécula de RNA es capaz de una interferencia de RNA específica de la diana.
- 5 2. La molécula de RNA de la reivindicación 1, en la que cada cadena tiene una longitud de 20 a 22 nucleótidos.
3. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el saliente 3' se estabiliza contra la degradación.
4. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene al menos un análogo de nucleótido modificado.
- 10 5. La molécula de RNA de la reivindicación 4, en la que el análogo de nucleótido modificado se selecciona de ribonucleótidos modificados en el azúcar o en la cadena principal.
6. La molécula de RNA según la reivindicación 4 o 5, en la que el análogo de nucleótido es un ribonucleótido modificado en el azúcar, en el que el grupo 2'-OH está reemplazado por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en los que R es alquilo, alqueno o alquino C₁-C₆, y halo es F, Cl, Br o I.
- 15 7. La molécula de RNA de la reivindicación 4 o 5, en la que el análogo de nucleótido es un ribonucleótido modificado en la cadena principal, que contiene un grupo fosforato.
8. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos 70 por ciento con una molécula diana de mRNA predeterminada.
- 20 9. Un método in vitro de mediación de las interferencias de RNA específicas de la diana en una célula eucariota, que comprende los pasos:
 - (a) poner en contacto dicha célula con la molécula de RNA bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones en las cuales pueden ocurrir interferencias de RNA específicas de la diana, y
 - (b) mediar una interferencia de RNA específica de la diana efectuada por el RNA bicatenario hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia que corresponde sustancialmente al RNA bicatenario.
- 25 10. Uso del método in vitro de la reivindicación 9 para determinar la función de un gen en una célula.
11. Uso del método in vitro de la reivindicación 9 para modular la función de un gen en una célula.
12. El uso de la reivindicación 10 u 11, en el que el gen está asociado con una condición patológica.
- 30 13. El uso de una molécula de RNA bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para la fabricación de un medicamento para modular la función de un gen asociado a un patógeno.
14. El uso de la reivindicación 13, en el que el gen asociado a un patógeno es un gen viral.
15. El uso de una molécula de RNA bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para la fabricación de un medicamento para modular la función de un gen asociado a un tumor.
- 35 16. El uso de una molécula de RNA bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para la fabricación de un medicamento para modular la función de un gen asociado a una enfermedad autoinmune.

FIGURA 1A

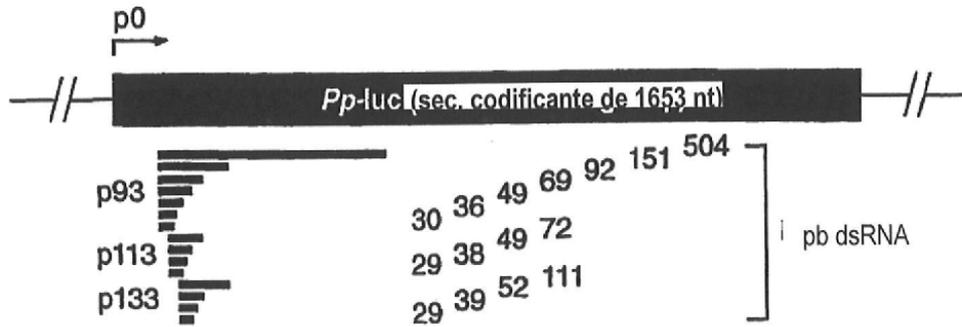


FIGURA 1B

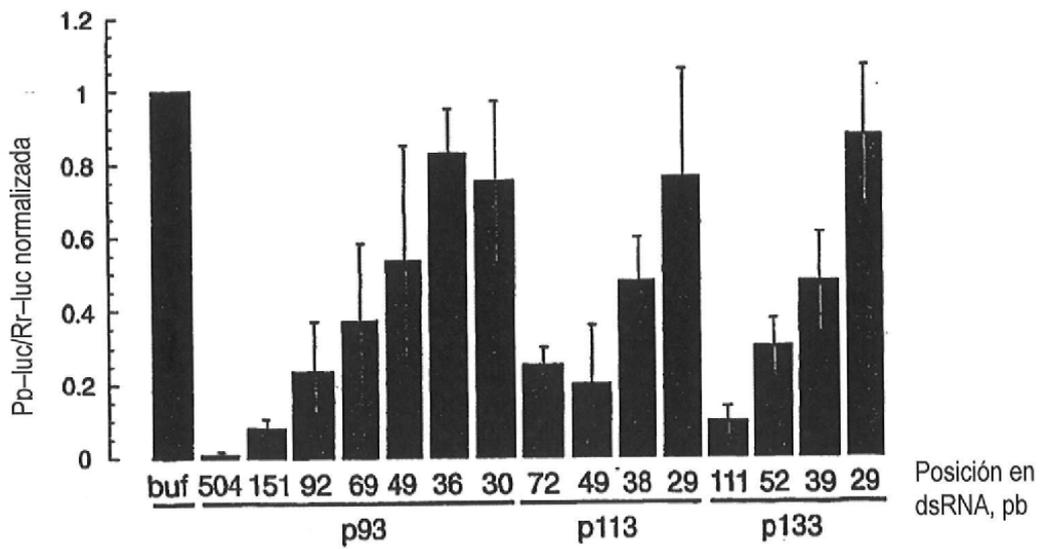


FIGURA 2

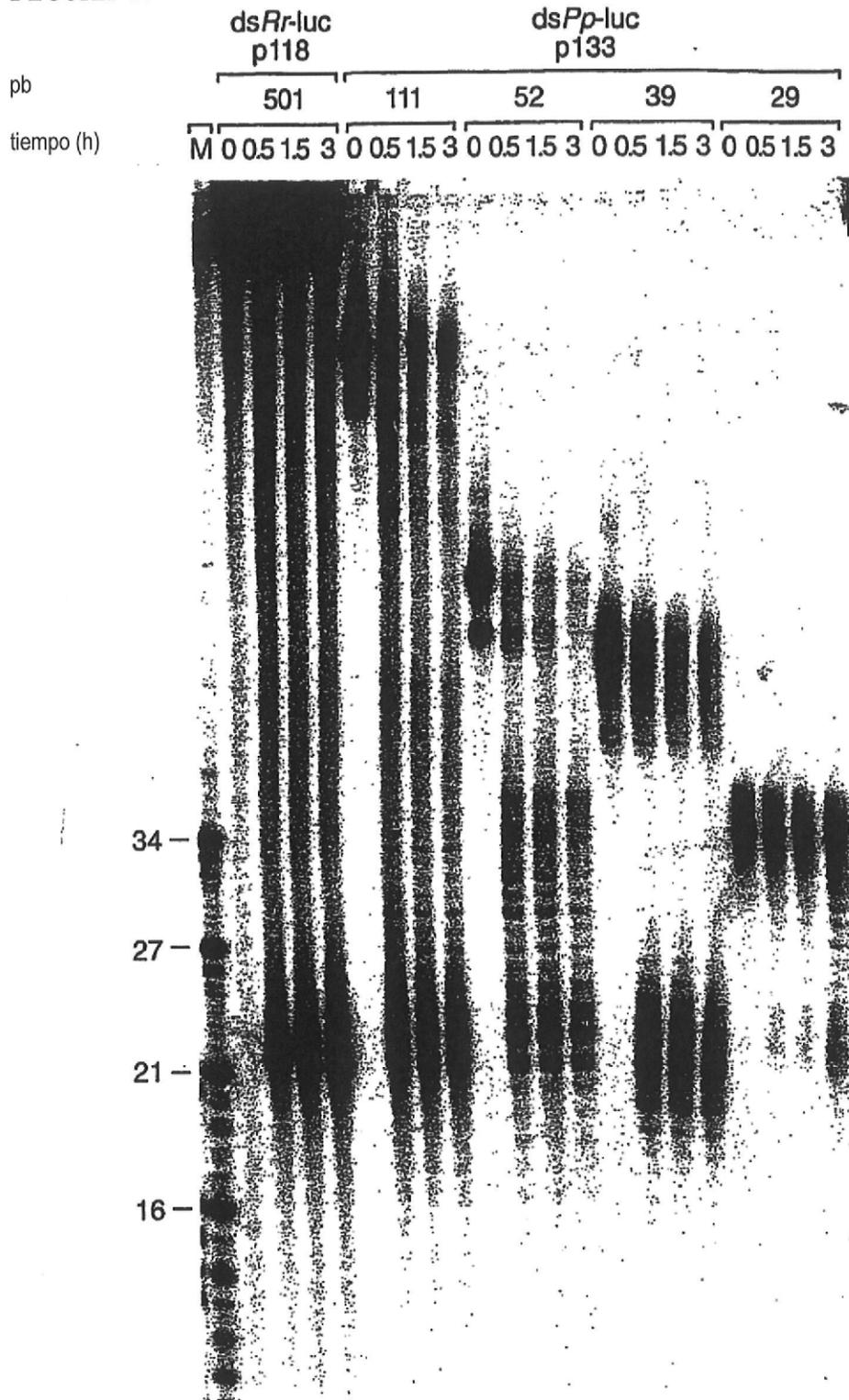


FIGURA 3A

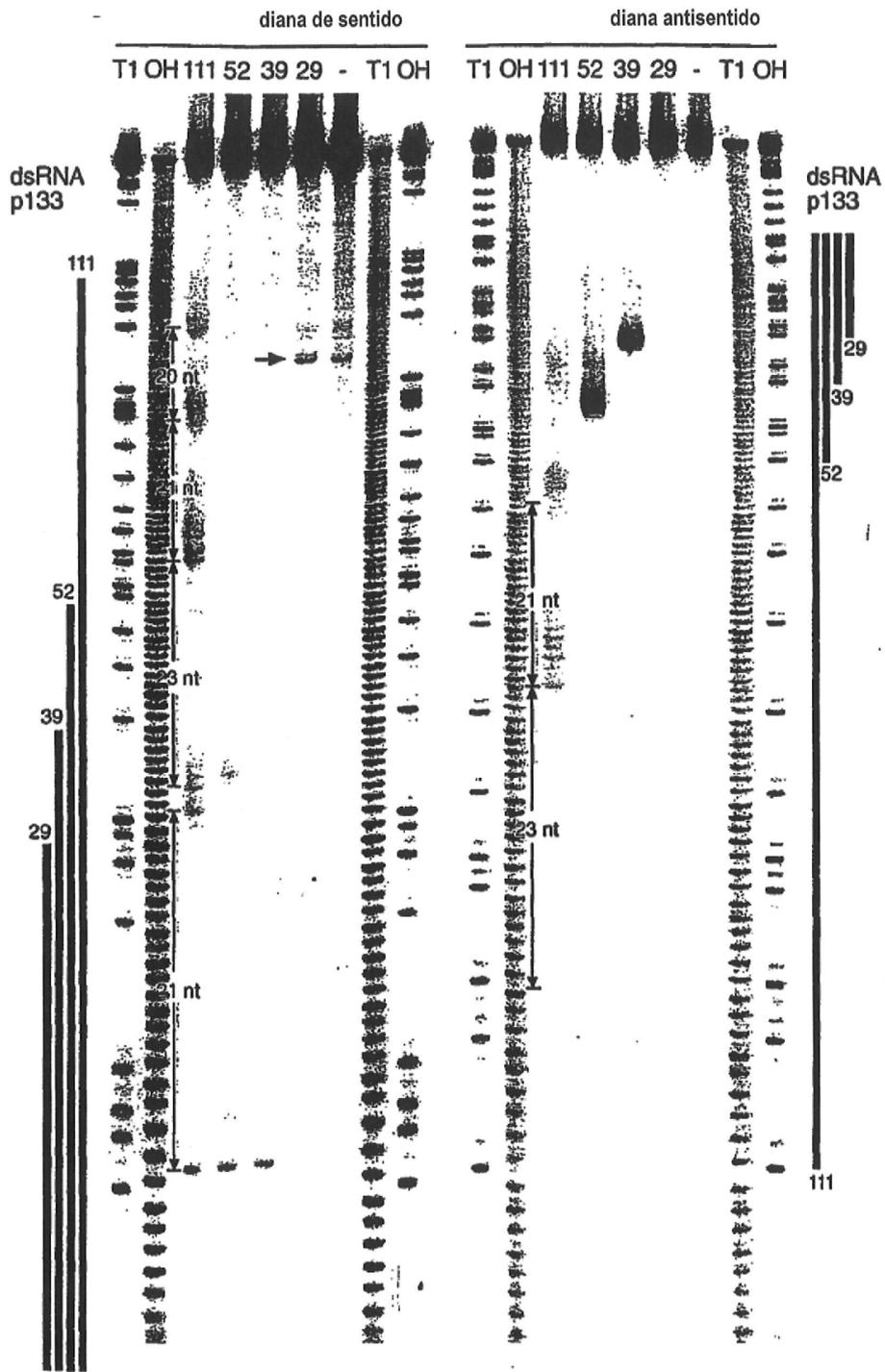


FIGURA 3B

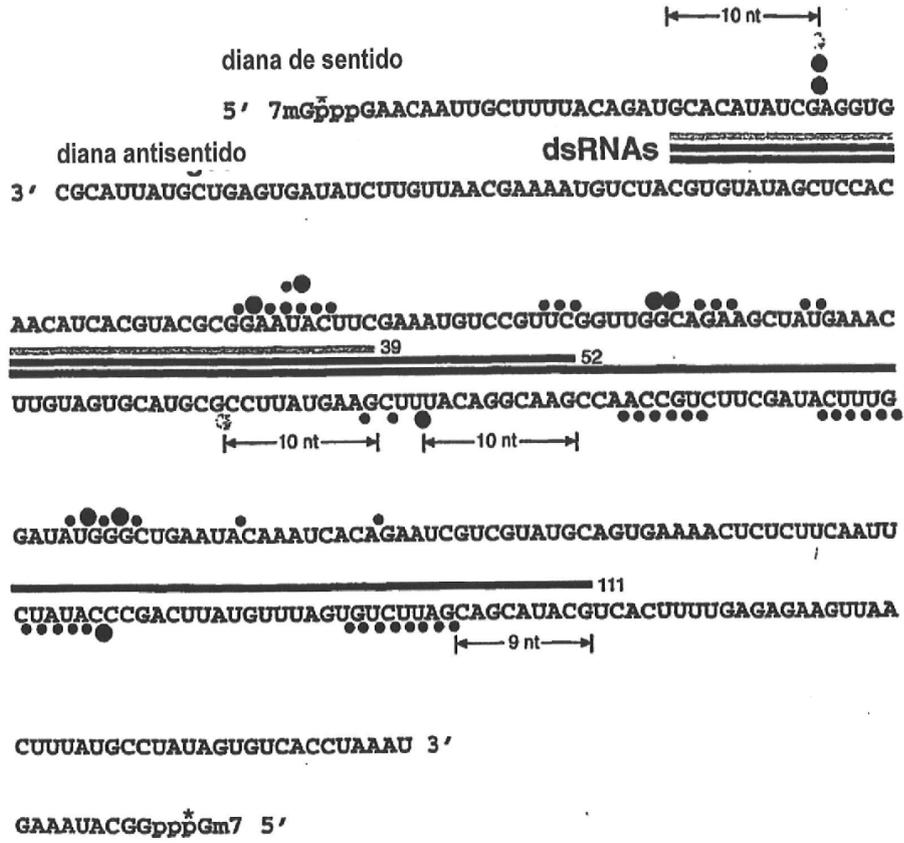
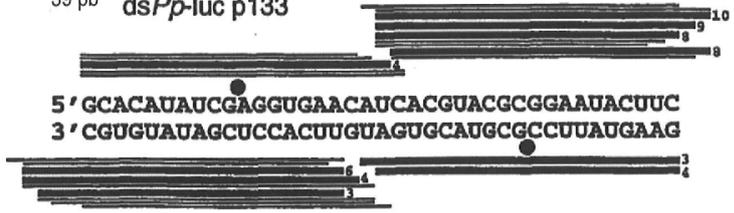


FIGURA 4A

39 pb ds*Pp*-luc p133



52 pb ds*Pp*-luc p133



111 pb ds*Pp*-luc p133

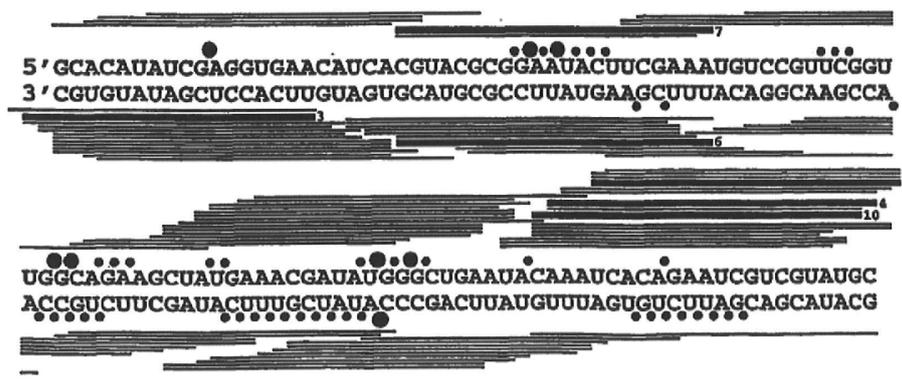


FIGURA 4B

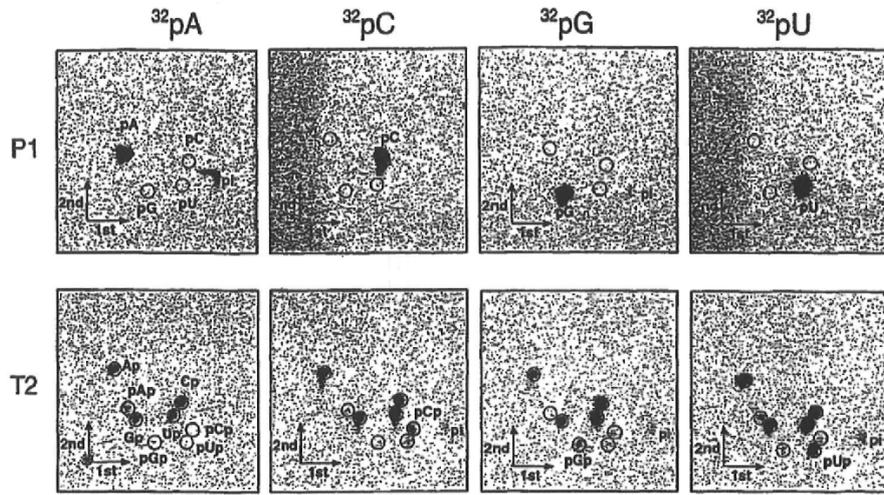


FIGURA 5A

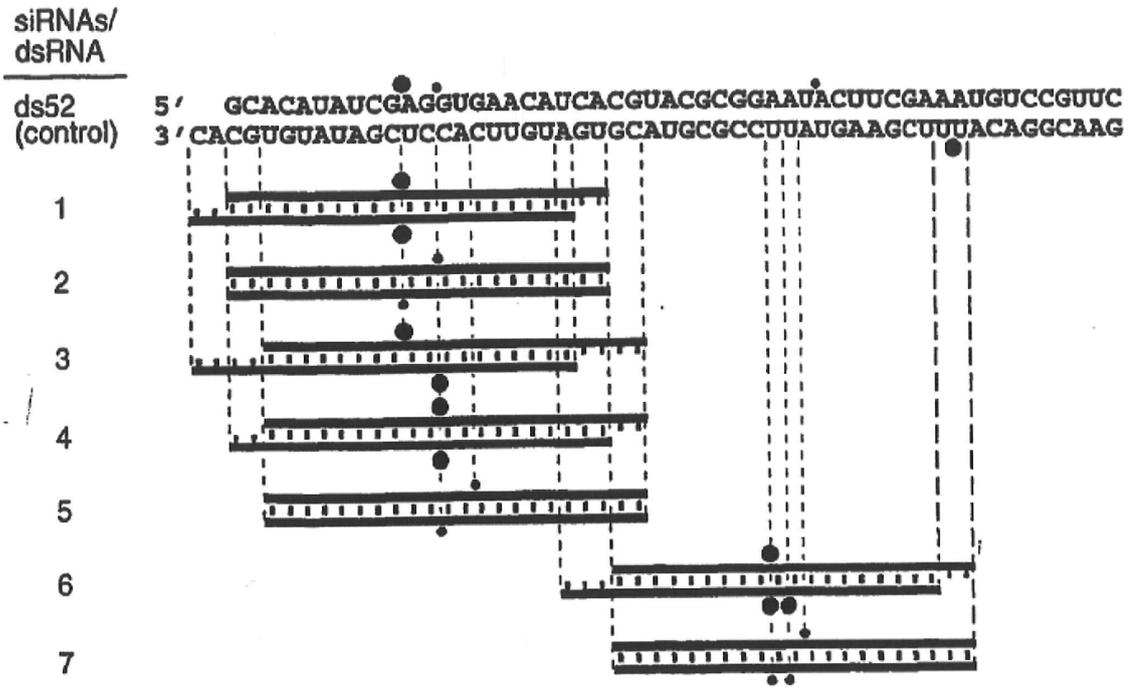


FIGURA 5B

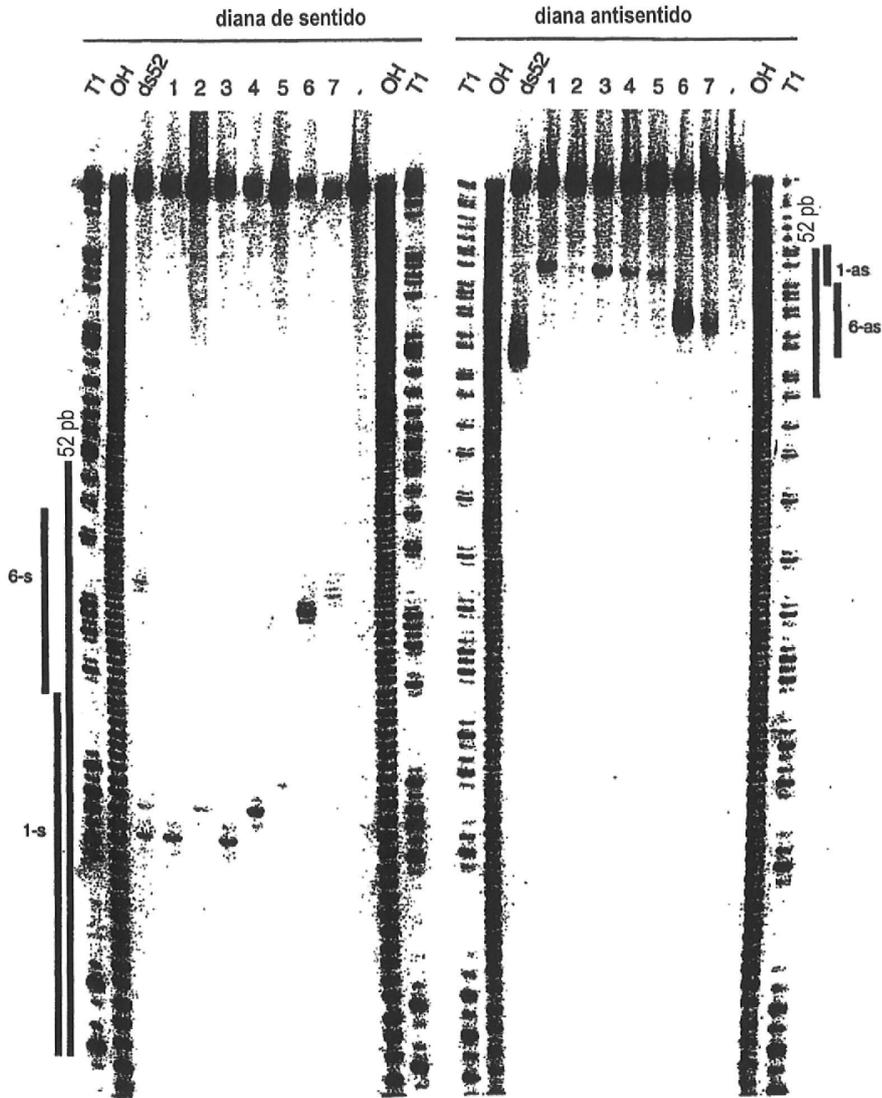


FIGURA 6A

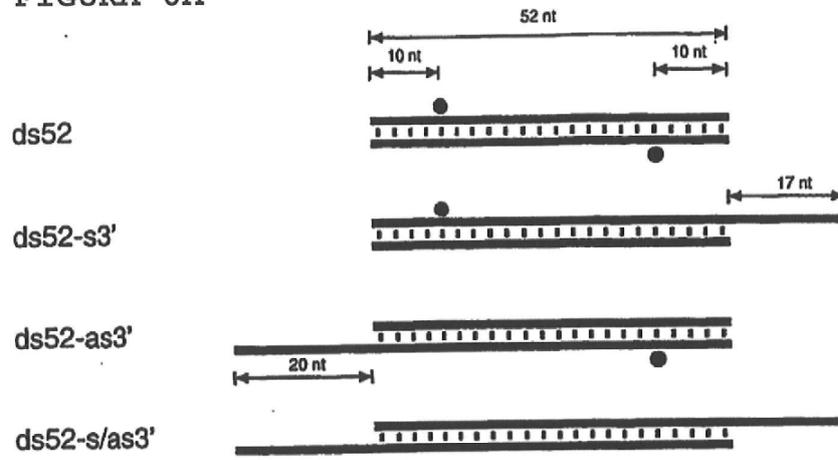
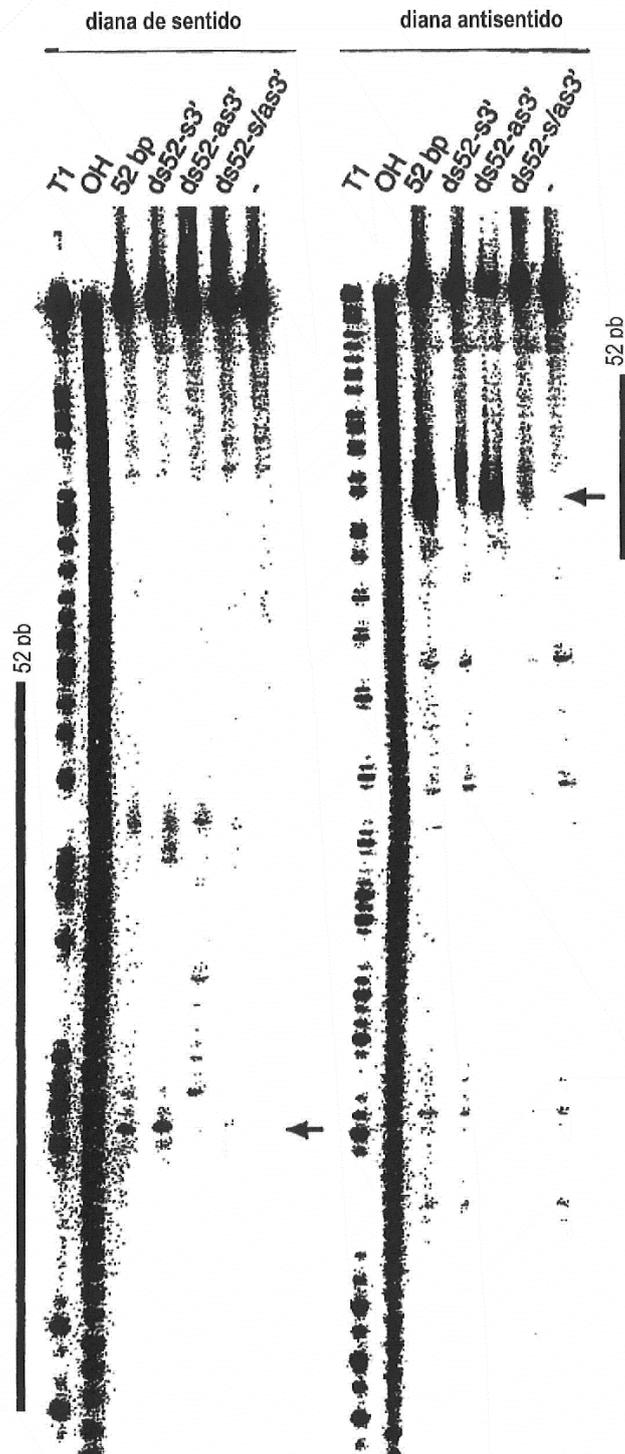


FIGURA 6B



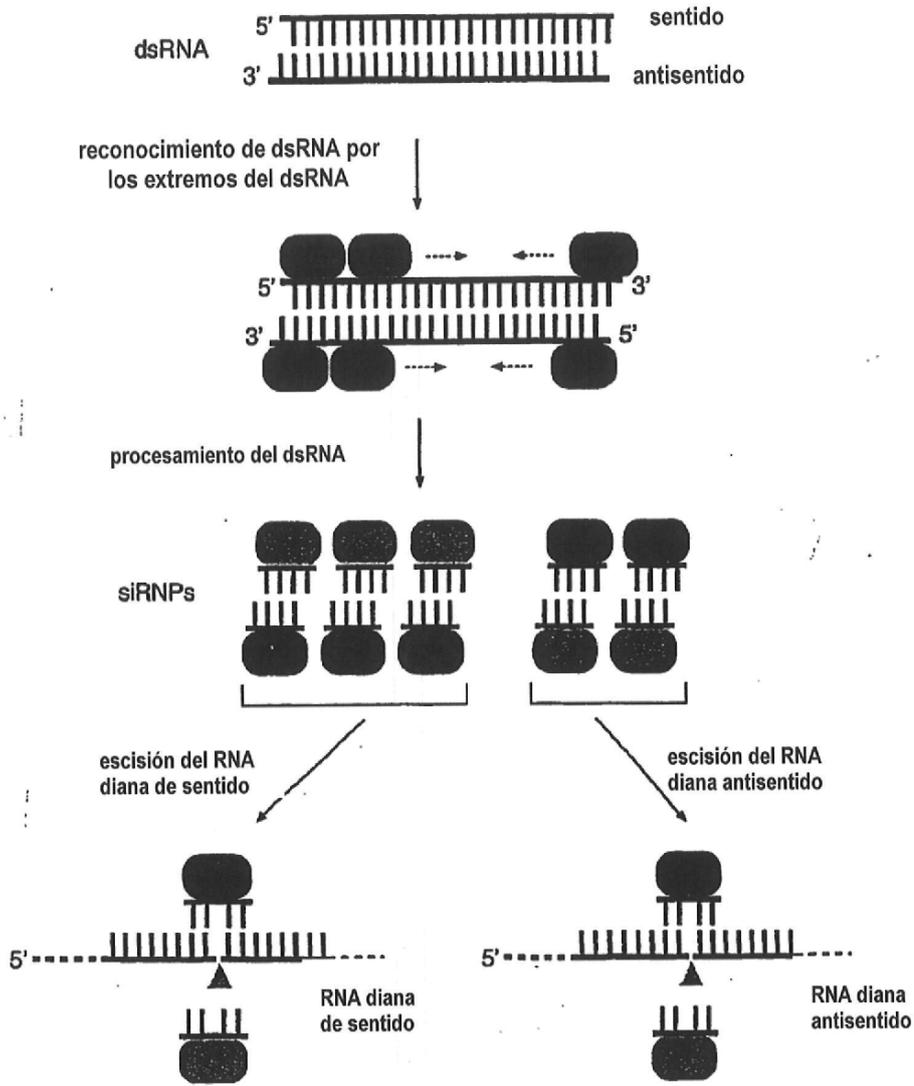
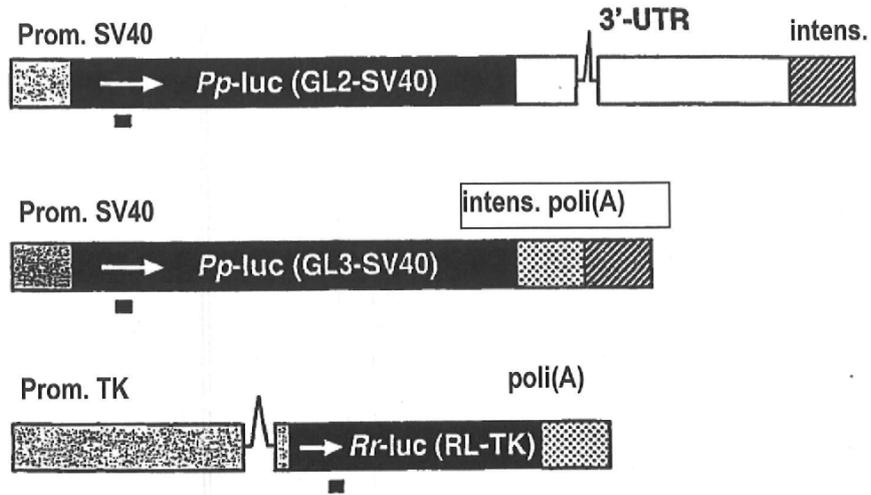


FIGURA 7

a



b

dúplex de siRNA

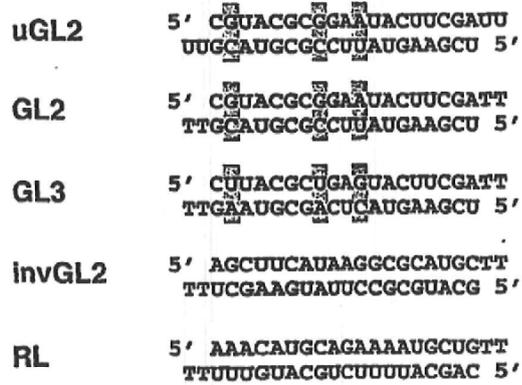


FIGURA 8

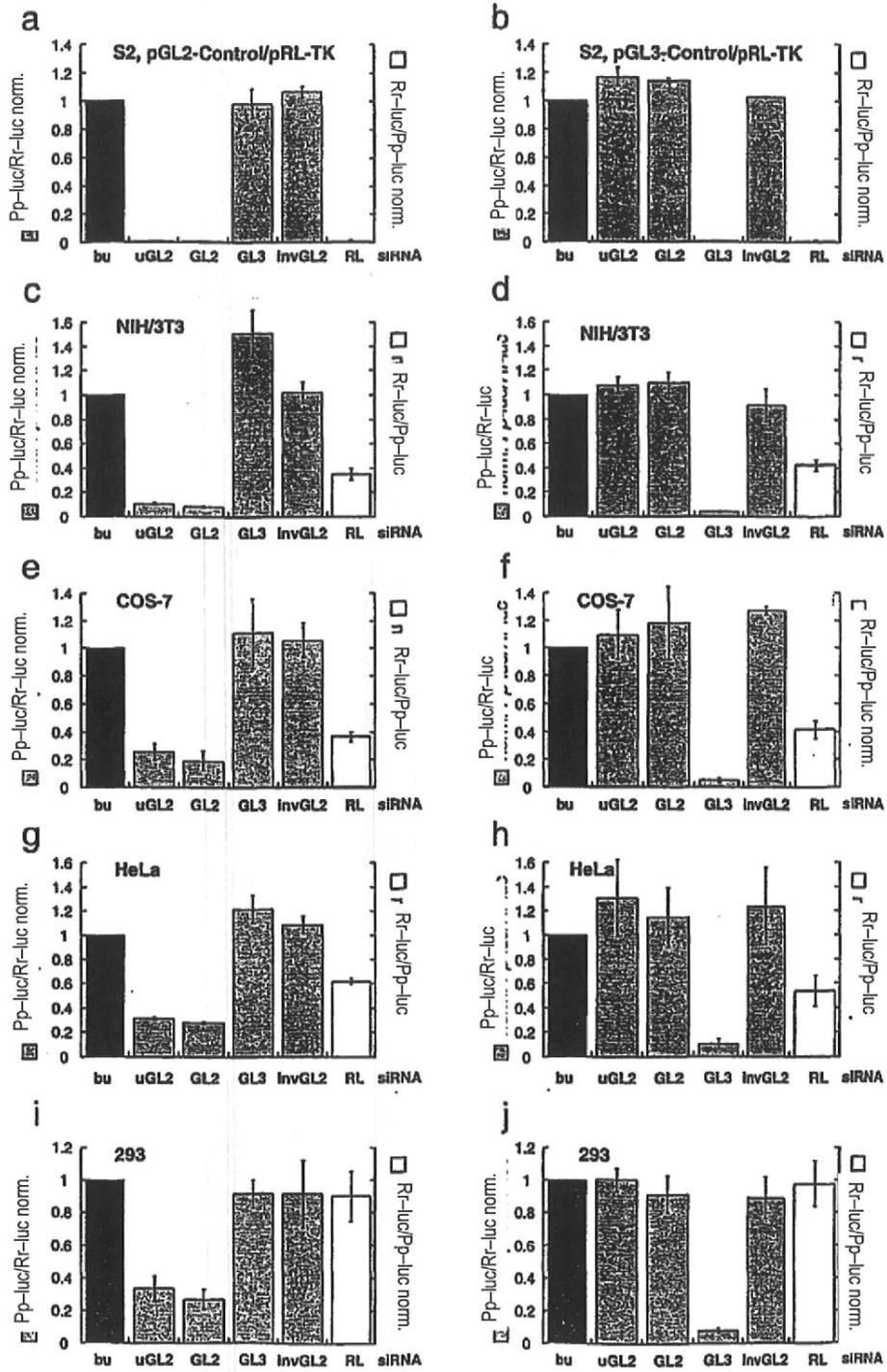


FIGURA 9

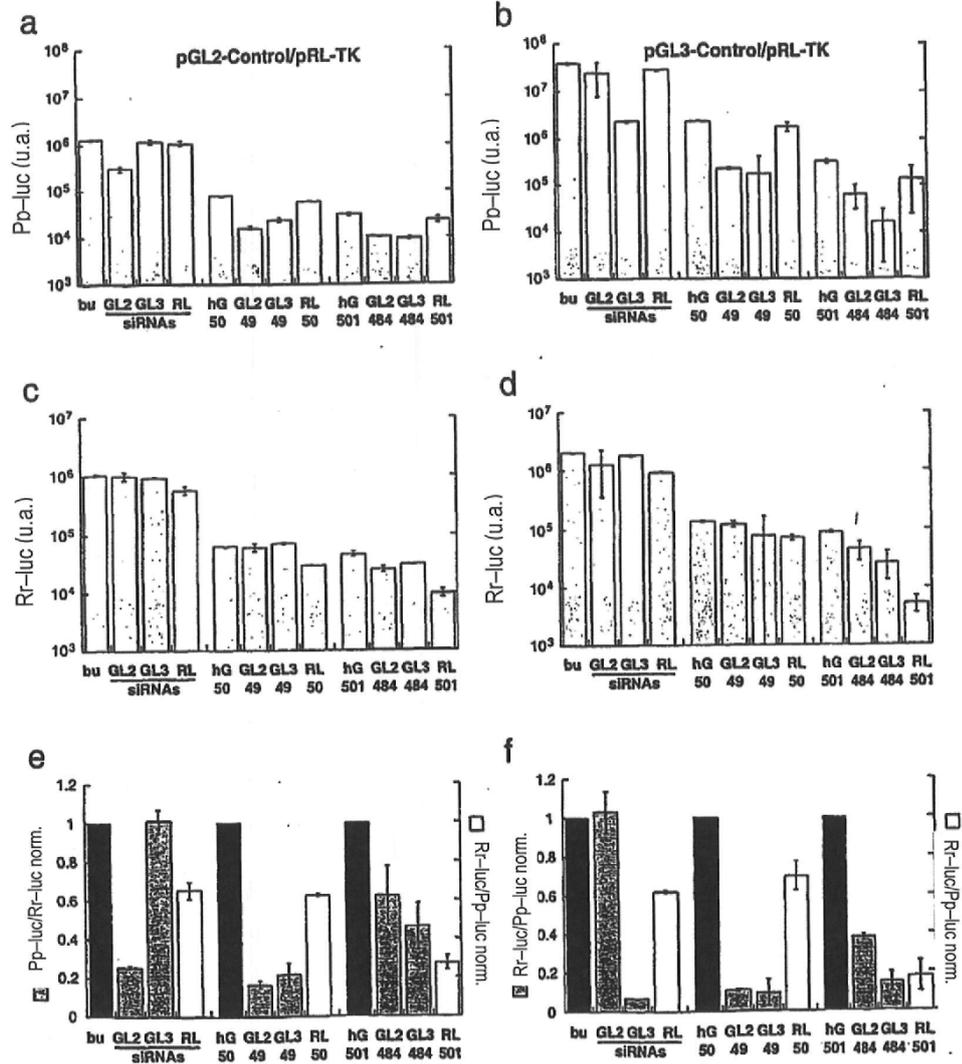


FIGURA 10

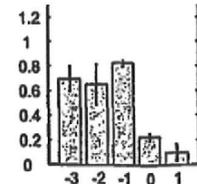
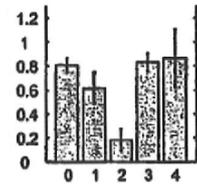
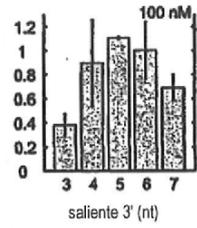
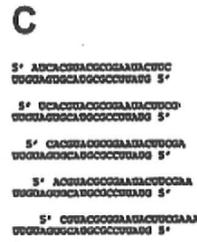
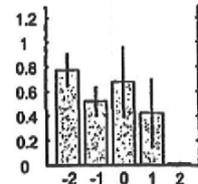
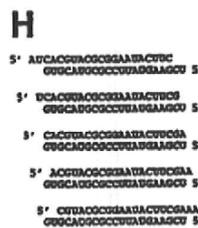
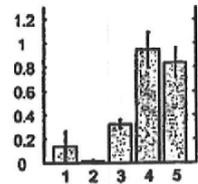
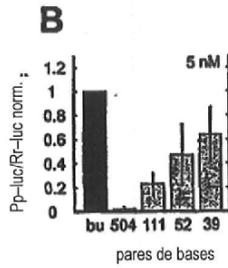
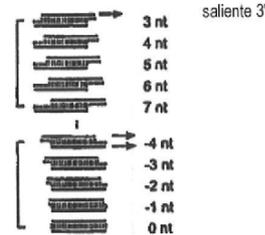
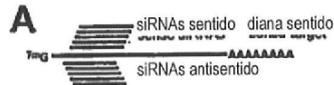
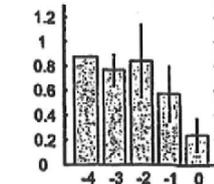
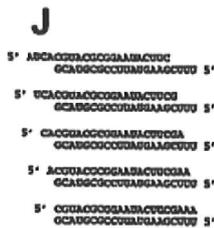
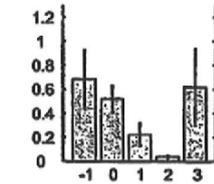
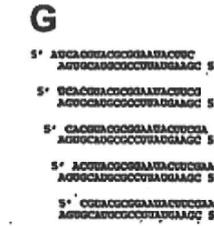
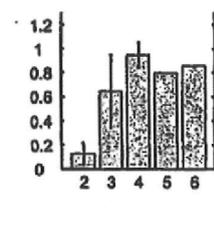
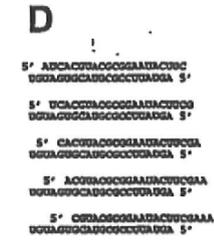
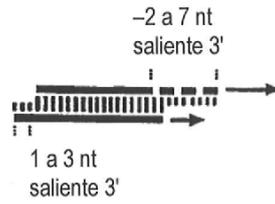


FIGURA 11



A

siRNA sentido (18–25 nt)
siRNA antisentido (21 nt)



B

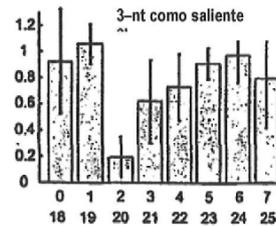
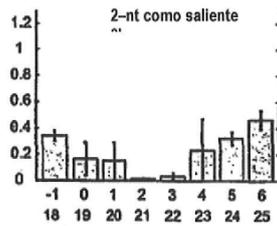
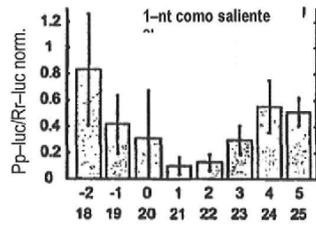
5' CGUACGCGGAUAUCUUCG
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGA
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAA
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAA
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAU
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUG
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUGU
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUGUC
UGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'

C

5' CGUACGCGGAUAUCUUCG
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGA
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAA
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAA
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAU
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUG
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUGU
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUGUC
GUGCAUGC GCCCUAUGAAGCU 5'

D

5' CGUACGCGGAUAUCUUCG
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGA
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAA
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAA
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAU
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUG
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUGU
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAUAUCUUCGAAUGUC
AGUGCAUGC GCCCUAUGAAGC 5'



saliente 3' de la cadena sentido
longitud de la cadena sentido (nt)

FIGURA 13

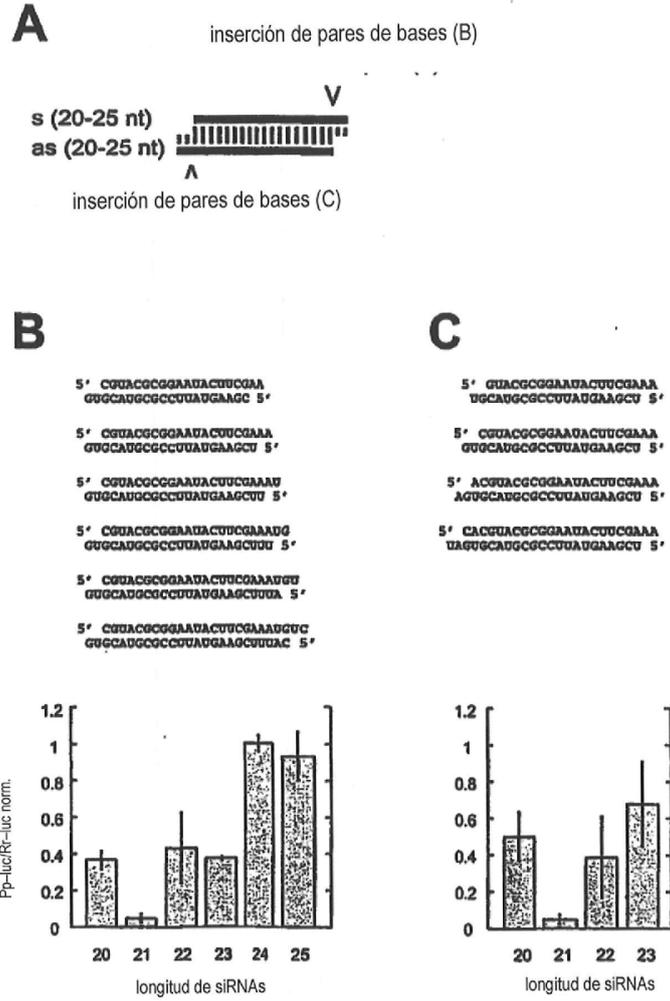


FIGURA 14

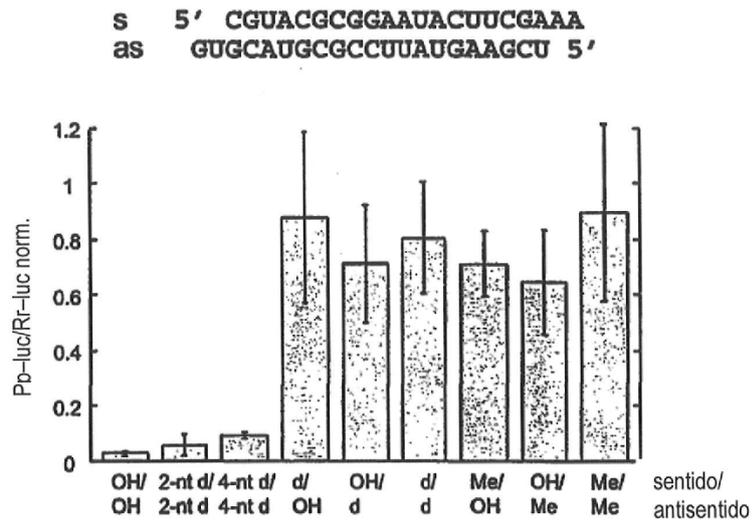


FIGURA 15

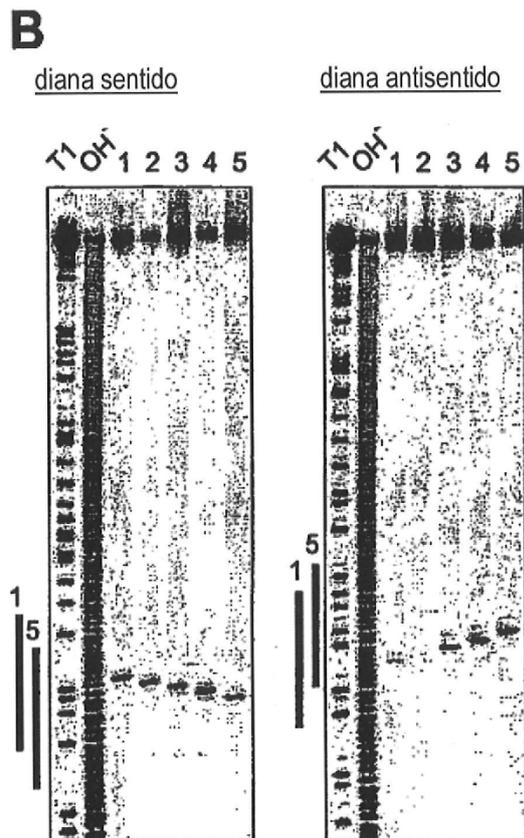
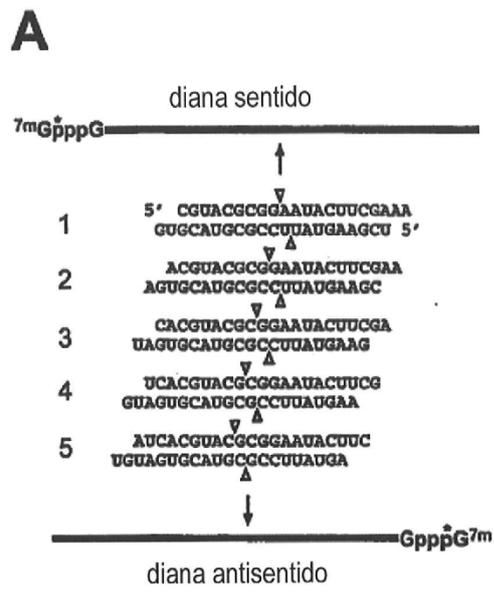


FIGURA 17

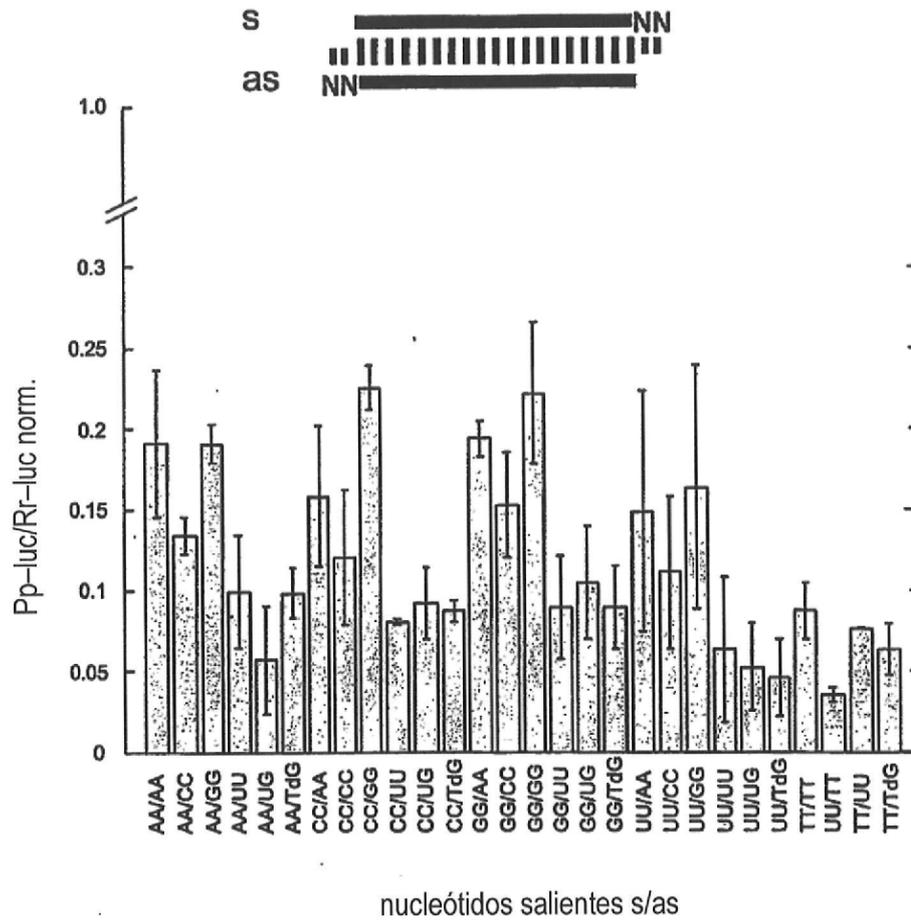


FIGURA 18

ref 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGC GCCUUAUGAAGCU 5'

1 5' AUGCGCGGAUACUUCGATT
TTUACGCCCUUAUGAAGCU 5'

2 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUCCGCCUUAUGAAGCU 5'

3 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGC GCCUUAUGAAGCU 5'

4 5' CGUACGCGGAUUCACGATT
TTGCAUGC GCCUUAAGUGCU 5'

5 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGC GCCUUAUGAAGCU 5'

6 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGC GCCUUAUGAAGCU 5'

7 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGC GCCUUAUGAAGCU 5'

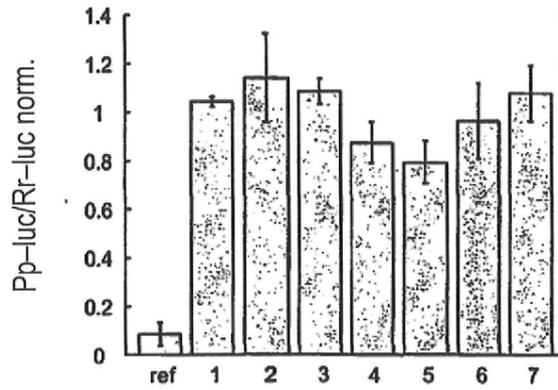


FIGURA 19

