



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 389**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07000056 .7**

96 Fecha de presentación : **18.05.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1775345**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Constructos de vectores.**

30 Prioridad: **19.05.2000 GB 0012233**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.04.2011**

73 Titular/es: **DEVGEN N.V.**  
**Technologiepark 30**  
**9052 Gent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es: **Plaetinck, Geert;**  
**Renard, Jean-Pierre y**  
**Bogaert, Thierry**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 356 389 T3

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

## DESCRIPCIÓN

**Campo de la Invención**

La invención se refiere a constructos de vectores mejorados para su uso en la expresión de ARN de doble hebra, concretamente para su uso en la expresión de ARN de doble hebra *in vitro* e *in vivo*.

5 **Antecedentes de la invención**

Desde la llegada de la inhibición del ARN de doble hebra (ARNi) como herramienta para controlar la expresión génica, como se describe en los documentos WO 99/32619 y WO 00/01846, se ha reconocido una necesidad de vectores especializados diseñados para la producción de ARN de doble hebra (ARNdh).

10 Los vectores de clonación diseñados para producir elevados niveles de ARNdh han sido previamente descritos por Plaetinck et al. (documento WO 00/01846) and Timmons et al. Nature, 395:854 (1998). Estos vectores contienen generalmente un sitio de clonación múltiple (SCM) en el cual se pueden clonar fragmentos de ADN diana flanqueados por dos promotores transcripcionales oponibles. Esencialmente, estos tres componentes (Promotor 1, SCM y Promotor 2) constituyen el sistema completo. En el sistema de expresión apropiado, el ADN clonado en el SCM puede ser transcrito en ambas direcciones, conduciendo a la producción de dos hebras de ARN complementarias.

15 Una desventaja de los sistemas conocidos es que no solamente se transcribe el fragmento clonado. La lectura de la ARN polimerasa dará como resultado la transcripción del vector completo, y esto también en ambas direcciones. Como solamente la transcripción del fragmento de ADN clonado dará como resultado un ARNdh activo para los fines del ARNi, la transcripción de la parte del vector da como resultado ARN inútil, ineficaz. Más específicamente, el 80% de estos transcritos pueden ser considerados no específicos y por lo tanto no eficaces.

20 Las grandes cantidades de ARN no específico generado por medio de los plásmidos y los sistemas de expresión de la técnica anterior producen algunos efectos secundarios no deseables. Primero, en los protocolos de ARNi basados en la introducción de ADNdh en *C. elegans* por medio de un organismo alimenticio tal como *E. coli* que expresa el ADNdh (véase el documento WO 00/01846), se considera que grandes hebras de ARN son tóxicas para el organismo alimenticio. Como resultado, las grandes cantidades de ARN que se acumulan en *E. coli* hacen que una porción significativa de la población muera. Segundo, y probablemente más importante, es la reducción del potencial de inhibición. La presencia de grandes cantidades de ADNdh no específico ocasiona un entorno competitivo para las secuencias especificadas. El potencial de las secuencias de ARNdh especificadas por el molde para inhibir la expresión de la proteína elegida como diana, por ejemplo, en células de *C. elegans* es reducido por la presencia de estas grandes regiones no específicas. Semejante inhibición por el ADNdh no específico ha sido desarrollada en *Drosophila* por Tushl et al., Genes & Development 13:3191-3197 (1999). No solamente resulta afectado el potencial para inhibir la expresión génica, si no que también se limita la cantidad de ARNdh específico producido. Tercero, la transcripción de la porción del esqueleto del vector, más concretamente la transcripción del origen de replicación y las estructuras relacionadas, da como resultado la inestabilidad del plásmido y la reorganización del plásmido, conduciendo a una reducción de la producción de ARNdh. Esta concentración relativamente baja de ARNdh eficaz conduce a su vez a un ARNi ineficaz.

35 Para concluir, los vectores previamente descritos tienen los siguientes defectos: son tóxicos para el organismo alimenticio, una mayor parte de los transcritos producidos son no específicos, el potencial inhibitor del ADNdh es reducido por la presencia de regiones no específicas, elevada incidencia de las reorganizaciones de plásmidos y pérdida del plásmido desde el organismo alimentador. Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar vectores mejorados para la producción de ADNdh que eviten las desventajas de los vectores de la técnica anterior.

40 Los vectores para su uso en la síntesis *in vitro* de transcritos de ARN, por ejemplo la producción de sondas de ARN, son conocidos y han sido utilizados comúnmente en la técnica durante algún tiempo (véase por ejemplo F. M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994); Jendrisak et al, Vectors for in vitro production of RNA copies of either strand of a cloned DNA sequence, documento US 4766072). En los protocolos de transcripción *in vitro* el problema de la transcripción de la lectura de las secuencias vectoras se evita generalmente linealizando el vector de transcripción en el sitio de restricción situado en el extremo 3' del transcrito deseado. No obstante, esta solución no es apropiada para la transcripción *in vivo* o para la producción de ARNdh donde es importante que el molde sea transcrito en ambas direcciones.

50 Los autores de la presente invención proponen ahora una solución novedosa a los problemas encontrados con los vectores de la técnica anterior para la producción de ARNdh, basada en el uso de terminadores de la transcripción. Generalmente la solución consiste en el uso de al menos un terminador de la transcripción conectado operablemente al menos a un promotor, donde el terminador detiene la transcripción iniciada por el promotor. Cualquier fragmento de ADN insertado entre el extremo 3' del promotor y el extremo 5' del terminador será transcrito después, sin la transcripción no deseada del esqueleto del vector. Preferentemente el vector consiste en dos promotores y dos terminadores, como se describe adicionalmente más abajo.

55 Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un constructo de ADN que comprende dos promotores oponibles flanqueando una región inter-promotores, comprendiendo adicionalmente el constructo al menos un terminador de la transcripción situado transcripcionalmente aguas abajo de uno de dichos

promotores. En particular, la invención proporciona:

un constructo de ADN que comprende:

a) un primer promotor y

b) un segundo promotor, en el cual el primero y segundo promotor están en orientación opuesta entre sí y definen:

c) una región inter-promotores situada aguas abajo del extremo 3' del primer promotor y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor, donde dicha región inter-promotores comprende una secuencia de nucleótidos que forma un molde para la producción de ARN de doble hebra.

e) un primer terminador de la transcripción, situado (como se observa desde el extremo 3' del primer promotor) aguas abajo del primer promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor; caracterizado porque el primer y segundo promotores son promotores de bacteriófago, promotores procarióticos o promotores eucarióticos.

La región inter-promotores también puede ser definida adicionalmente como: la región de ADN entre el extremo 3' del primer promotor y el extremo 3' del segundo promotor, y que está aguas abajo del primer promotor, y que está aguas abajo del segundo promotor, y que preferiblemente no contiene el extremo 5' del primer promotor y del segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor oponibles dirigen la expresión direccional desde sus extremos 5' a sus extremos 3' comenzando la transcripción aguas abajo de sus extremos 3', proporcionando de ese modo la transcripción de ambas hebras de cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentes en la región inter-promotores.

En un segundo aspecto la invención proporciona el uso de un constructo de ADN para la producción de ARN de doble hebra para la inhibición de ARN, en el que dicho constructo de ADN comprende:

a) un primer promotor y

b) un segundo promotor,

en el que el primer y segundo promotores están en orientación opuesta entre sí y definen:

c) una región inter-promotores situada aguas abajo del extremo 3' del primer promotor y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor;

y cuyo constructo de ADN comprende adicionalmente:

d) al menos un sitio de clonación situado en la región inter-promotores; y

e) un primer terminador de la transcripción, situado (como se observa a partir del extremo 3' del primer promotor) aguas abajo del primer promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor, y donde el primer terminador de la transcripción está situado en la región inter-promotores;

caracterizado porque el primer y segundo promotores son promotores eucarióticos o promotores eucarióticos, pero no promotores de bacteriófago.

Los dos promotores presentes en el constructo de ADN de la invención pueden ser idénticos o pueden ser diferentes y pueden ser esencialmente de cualquier tipo. La naturaleza exacta de los promotores utilizados en el constructo puede depender de la naturaleza del sistema de expresión en el cual se espera que funcione el constructo (p. ej., célula anfitriona procariótica vs. eucariótica). Se prefieren los promotores de bacteriófago, por ejemplo los promotores de T7, T3 y SP6, para su uso en los constructos de la invención, puesto que proporcionan las ventajas de un elevado nivel de transcripción que depende solamente de la unión de la ARN polimerasa apropiada. Cada uno de estos promotores puede ser seleccionado independientemente. Los promotores de fago también pueden funcionar en una amplia variedad de sistemas anfitriones, esto es, anfitriones tanto procarióticos como eucarióticos, siempre que la polimerasa cognada esté presente en la célula anfitriona.

La disposición de los dos promotores "oponibles" que flanquean una región inter-promotores de manera que el inicio de la transcripción dirigido por uno de los promotores de como resultado la transcripción de la hebra efectora de la región inter-promotores y el inicio de la transcripción dirigido por el otro promotor de como resultado la transcripción de la hebra antisentido de la región inter-promotores es una disposición bien conocida en la técnica, por ejemplo, en la serie de vectores pGEM7 de Promega Corp., Madison WI, USA.

Los constructos de ADN de la invención difieren de los de la técnica anterior debido a la presencia de al menos un terminador de la transcripción situado transcripcionalmente aguas abajo de uno de los promotores. El terminador de la transcripción puede ser uni- o bi-direccional, influyendo en la selección de terminadores uni- vs bi-direccionales el posicionamiento del terminador o los terminadores dentro o fuera de la región inter-promotores, como se explica más

abajo. El terminador puede ser de origen procariótico, eucariótico o de fago. Son particularmente preferidos los terminadores de fago, por ejemplo T7, T3 y SP6. El único requerimiento es que el terminador debe ser capaz de causar la terminación del inicio de la transcripción en el promotor con respecto al cual está transcripcionalmente aguas abajo. En la práctica, esto significa que el promotor y el terminador deben formar una "combinación funcional", esto es, el terminador debe ser funcional para el tipo de ARN polimerasa que se inicia en el promotor. A modo de ejemplo, un promotor de ARN pol II eucariótico y un terminador de ARN pol II eucariótico formarían generalmente una combinación funcional. La selección de una combinación funcional es particularmente importante cuando se van a utilizar promotores y terminadores de bacteriófago en los constructos de la invención, puesto que los promotores y terminadores de fago son ambos específicos de la polimerasa. Para formar una combinación funcional tanto el promotor como el terminador deben ser específicos para la misma polimerasa, p. ej. el promotor de T7 y el terminador de T7, el promotor de T3 y el terminador de T3 etc.

En una realización, el constructo de ADN de la invención puede comprender un único terminador de la transcripción, situado (como se observa desde el extremo 3' del primer promotor) aguas abajo del primer promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor, donde el único terminador de la transcripción está situado en la región inter-promotores.

En una disposición alternativa, el constructo de ADN comprende un único terminador de la transcripción situado fuera de la región inter-promotores. En una realización adicional, el constructo de ADN puede comprender dos terminadores de la transcripción, cada uno de los cuales está situado transcripcionalmente aguas abajo de uno de los dos promotores. En esta disposición, uno o ambos terminadores puede estar situado dentro de la región inter-promotores. Estas diferentes realizaciones de los constructos de ADN de la invención se describirán más completamente más abajo, con referencia a los dibujos adjuntos. La posición de un primer terminador de la transcripción fuera de la región inter-promotores también puede ser definida adicionalmente, esto es de manera que un primer terminador de la transcripción esté situado (como se observa desde el extremo 3' del primer promotor) aguas abajo del primer promotor, aguas abajo del al menos un sitio de clonación, y aguas abajo del extremo 5' del segundo promotor.

La posición de un segundo terminador de la transcripción fuera de la región inter-promotores también puede ser adicionalmente definida, esto es, de manera que un segundo terminador de la transcripción esté situado (como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor) aguas abajo del segundo promotor, aguas abajo del al menos un sitio de clonación, y aguas abajo del extremo 5' del primer promotor.

Por otra parte, cuando el terminador no está localizado en la región inter-promotores, la distancia entre el extremo 5' del primer promotor y el extremo 3' del segundo terminador, o la distancia entre el extremo 5' del segundo promotor y el extremo 3' del primer terminador es preferiblemente pequeña, esto es, de manera que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción esté separado del extremo 5' del segundo promotor por no más de 2000 nucleótidos, preferiblemente no más de 1000 nucleótidos, más preferiblemente no más de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente no más de 200 nucleótidos, especialmente preferiblemente no más de 100 nucleótidos, más especialmente preferible no más de 50 nucleótidos, incluso más especialmente preferiblemente no más de 20 nucleótidos, concretamente preferiblemente no más de 10 nucleótidos, más concretamente preferiblemente no más de 6 nucleótidos.

Además, cuando el segundo terminador de la transcripción está localizado fuera de la región inter-promotores, preferiblemente el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción se separa del extremo 5' del primer promotor no más de 2000 nucleótidos, preferiblemente no más de 1000 nucleótidos, más preferiblemente no más de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente no más de 200 nucleótidos, especialmente preferiblemente no más de 100 nucleótidos, más especialmente preferiblemente no más de 50 nucleótidos, incluso más especialmente preferiblemente no más de 20 nucleótidos, concretamente preferiblemente no más de 10 nucleótidos, más concretamente preferiblemente no más de 6 nucleótidos.

Como se ha definido antes el término "región inter-promotores" hace referencia a toda la secuencia de ADN entre los dos promotores. Como se ha explicado antes, en ciertas realizaciones de la invención los terminadores de la transcripción pueden estar situados dentro de la región inter-promotores. La región inter-promotores puede comprender, ventajosamente, una secuencia de nucleótidos que forma un molde para la producción de ARNdh. La longitud y la naturaleza exacta de esta secuencia no es sustancial para la invención. Se describen en la presente memoria constructos de ADN en los que la región inter-promotores comprende un sitio de clonación. La función del sitio de clonación es la de facilitar la inserción de un fragmento de ADN que forma un molde para la producción de ARNdh entre los dos promotores. De este modo, los autores de la presente invención describen en la presente memoria una serie de vectores de clonación que son de uso general en la construcción de vectores molde para la producción de ARNdh. Están incluidos en el alcance de la invención los vectores derivados de vectores de clonación que tienen un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación.

El sitio de clonación puede comprender adicionalmente uno o más de los siguientes:

- al menos un sitio de restricción, (como es sabido en

la técnica), o uno o más sitios de restricción adicionales, p. ej. para proporcionar un sitio de clonación múltiple (como es sabido en la técnica),

- un ADN de relleno, p. ej., flanqueado por al menos dos sitios de restricción, tales como dos sitios *BstXI*, o dos sitios de restricción *XcmI*,
- 5 - sitios de recombinación *attR1* y *attR2*,
- una secuencia de nucleótidos *ccdB*,
- un nucleótido *ccdB* que comprende adicionalmente al menos un único sitio de restricción con extremos romos, tal como un sitio de restricción *SrfI*, y/o
- un fragmento de ADN insertado en el al menos un
- 10 sitio de clonación. Todos los constructos de ADN proporcionados por la invención pueden, ventajosamente, formar parte de un vector de clonación replicable, tal como, por ejemplo, un vector plasmídico. Además de los promotores oponibles, la región inter-promotores y uno o varios terminadores de la transcripción, el "esqueleto" del vector puede contener adicionalmente uno o más de los rasgos generales encontrados comúnmente en los
- 15 vectores replicables, por ejemplo un origen de replicación para permitir la replicación autónoma en una célula anfitriona y un marcador selectivo, tal como un gen de resistencia a antibióticos. El gen marcador selectivo (p. ej. el gen de resistencia a antibióticos) puede contener a su vez un promotor y un terminador de la transcripción y se debe entender que estos son completamente independientes de los elementos promotores y terminadores requeridos por la invención y no deben ser tenidos en cuenta en la determinación de si un vector concreto entra dentro del alcance de la invención.

20 Los constructos de ADN de acuerdo con la invención pueden ser contruidos fácilmente a partir de los elementos de la secuencia componente utilizando mecanismos recombinantes convencionales bien conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, por F. M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994), como apreciará un experto en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y los Ejemplos adjuntos.

25 Sigue una descripción detallada de los constructos de ADN de acuerdo con la invención, con referencia a los siguientes dibujos esquemáticos en los que:

Las Figuras 1(a) a 1(e) son representaciones esquemáticas de varias realizaciones diferentes del constructo de ADN para su uso de acuerdo con la invención ilustrando la posición relativa de los elementos promotores y terminadores de la transcripción.

30 La Figura 2(a) es una representación esquemática de un vector de la técnica anterior incluida con fines comparativos.

Las Figuras 2(b) a 2(e) son representaciones esquemáticas de varias realizaciones adicionales del constructo de ADN para su uso de acuerdo con la invención que ilustra el uso de diferentes sitios de clonación en la región inter-promotores.

35 Referente a los Dibujos, la Figura 1(a) ilustra esquemáticamente un primer constructo de ADN que es un vector plasmídico que comprende dos promotores oponibles; un primer promotor a) y un segundo promotor b) 2 que flanquean una región inter-promotores c), cuya región inter-promotores está aguas abajo del 3' del primer promotor, y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor pueden ser idénticos o diferentes. Esta realización comprende un primer terminador de la transcripción e) y un segundo terminador de la transcripción f) ambos los cuales están situados dentro de la región inter-promotores. En esta realización, el primer terminador y el segundo

40 terminador son preferentemente terminadores unidireccionales.

Se puede insertar un fragmento de ADN en el al menos un sitio de clonación d). Semejante fragmento está sujeto a transcripción dirigida por el primer promotor a) y el segundo promotor b) (esto es, transcripción de ambas hebras), dando como resultado la generación de dos fragmentos de ARN que se pueden combinar con un ARN de doble

45 hebra del fragmento de ADN insertado (tanto *in vitro* como *in vivo*).

Cualquier secuencia de ADN deseada, tal como una secuencia de ADN genómico, o una secuencia de ADNc o cualquier otra secuencia codificante, puede ser insertada en el al menos un sitio de clonación. Sin estar limitado a ninguna explicación concreta, se supone que cuando a) y e) forman una combinación funcional, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en a) transcribirá la región inter-promotores incluyendo el al menos un sitio de clonación y el

50 fragmento de ADN insertado en el al menos un sitio de clonación y terminará cuando alcance e). De un modo similar, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en b) transcribirá la región inter-promotores incluyendo el al menos un sitio de clonación y el fragmento de ADN insertado en el al menos un sitio de clonación y terminará cuando alcance f). Los terminadores hacen que la ARN polimerasa se detenga, pare la transcripción y se separe del molde. Esto evita la

transcripción ilimitada del esqueleto vector, y reduce la transcripción no específica de ADN no esencial.

La región inter-promotores comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos correspondiente a una diana para la inhibición del ARN de doble hebra. Esta secuencia se denomina "TF" por fragmento diana (en sus siglas en inglés). Es esta secuencia la que, cuando se transcribe a ARNdh, será responsable de la inhibición específica del ARN de doble hebra de un gen diana. El fragmento diana se puede formar a partir de un fragmento de ADN genómico o ADNc del gen diana. Su longitud y su secuencia de nucleótidos exactas no son sustanciales para la invención.

En la disposición mostrada en la Figura 1(a) los dos terminadores se sitúan a cualquier lado del TF dentro de la región inter-promotores. Cada uno de los terminadores está situado transcripcionalmente aguas abajo de uno de los promotores, el primer terminador e) está transcripcionalmente aguas abajo del primer promotor a) y el segundo terminador f) está transcripcionalmente aguas abajo del segundo promotor b). Suponiendo que a) y e) forman una combinación funcional, como se ha descrito antes, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en a) transcribirá la región inter-promotores hasta e incluyendo TF y terminará cuando alcance e). De un modo similar, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en b) transcribirá la región inter-promotores hasta e incluyendo la TF de la hebra opuesta y terminará cuando alcance f). Los terminadores hacen que la ARN polimerasa se detenga, pare la transcripción y se separe del molde. Esto evita la transcripción ilimitada del esqueleto del vector, y reduce la transcripción no específica de ADN no esencial.

Los transcritos generados a partir de este vector pueden ser, dependiendo de la situación precisa de los terminadores en el vector, ARNdh casi completamente específicos correspondientes a la región TF. Por medio de la colocación directa de las secuencias terminadoras en el extremo aguas abajo de la región TF a ambos lados del fragmento de ADN insertado, la cantidad de material transcrito es completamente reducida a las secuencias especificadas por el molde. Por lo tanto, se obtiene una cantidad superior de ARNdh específico. Además los constructos son ahora más estables, debido a la no transcripción del esqueleto del vector. La última característica (estabilidad), combinada con la tasa de transcripción específica relativamente superior ahora, proporcionan un sistema adaptado a sintetizar cantidades superiores de hebras de ARNdh cortas específicas. Esta cantidad proporcionalmente superior de transcrito, que da como resultado concentraciones elevadas de ARNdh específico, aumenta el efecto inhibitor en los protocolos con ARNi. En los protocolos con ARNi basados en la expresión de ARNdh en un organismo alimenticio, la toxicidad para los organismos alimenticios debida a la levada expresión de ARN se lleva a un nivel mínimo mediante el uso de este vector.

Un ejemplo específico de un vector del tipo ilustrado en la Figura 1(a), considerado por los autores de la presente invención como la disposición óptima para aplicaciones de ARNi, es el plásmido pGN9 descrito en los Ejemplos adjuntos. Los terminadores transcripcionales utilizados en pGN9 son los terminadores específicos de la ARN polimerasa de T7, puesto que el vector contiene dos promotores de T7 oponibles. No obstante, se podrían utilizar otros sistemas tales como un sistema de expresión basado en el promotor, el terminador y la polimerasa de T3 o SP6, u otros promotores y terminadores procarióticos o eucarióticos.

La Figura 1(b) ilustra esquemáticamente un constructo de ADN adicional que es un vector plasmídico que comprende dos promotores oponibles a) y b) que flanquean una región inter-promotores c). Este vector también comprende dos terminadores de la transcripción e) y f) pero en esta disposición los dos terminadores están situados fuera de la región inter-promotores, de hecho los elementos terminadores flanquean ahora los dos promotores. La disposición es tal que e) está aguas abajo transcripcionalmente de a) mientras f) está aguas abajo transcripcionalmente de b). Aquí de nuevo e) termina la transcripción iniciada por a), mientras f) termina la transcripción iniciada por el promotor b). La colocación de los terminadores fuera de d) permite el uso de terminadores bidireccionales así como de terminadores unidireccionales, en contraste con la disposición de la Figura 1(a) donde se prefieren los terminadores unidireccionales debido a la colocación de los terminadores entre los promotores. Los numerosos terminadores bidireccionales de acuerdo con la invención que se podrían utilizar son conocidos en la técnica. Generalmente se observa que estos son no específicos de la polimerasa.

La realización mostrada en la Figura 1(b) proporciona esencialmente las mismas ventajas que las mostradas en la Figura 1(a) sobre los vectores de la técnica anterior para la producción de ARNdh. El vector mostrado en la Figura 1(b) conducirá a la producción de transcritos que son ligeramente más largos, incluyendo las regiones promotoras. Esta diferencia relativamente pequeña en la longitud del transcrito y por tanto del ARNdh formado no afectará gravemente a la eficacia en el sistema de ARNi.

La posición de los terminadores y el promotor en el ejemplo mostrado en la figura 1(b) se encuentra preferiblemente en íntima proximidad, de manera que el extremo 5' de los promotores está separado del extremo 3' de los terminadores de la transcripción por no más de 2000 nucleótidos, preferiblemente no más de 1000 nucleótidos, más preferiblemente no más de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente no más de 200 nucleótidos, especialmente preferiblemente no más de 100 nucleótidos, más especialmente preferiblemente no más de 50 nucleótidos, incluso más especialmente preferiblemente no más de 20 nucleótidos, concretamente preferiblemente no más de 10 nucleótidos, más concretamente preferiblemente no más de 6 nucleótidos.

La Figura 1(c) ilustra esquemáticamente un constructo de ADN adicional que es un vector plasmídico que comprende dos promotores oponibles a) y b) flanqueando una región inter-promotores c). En esta realización, un

terminador (en este caso e)) está situado dentro de c) y el otro (f)) está situado fuera de c). De nuevo, e) termina la transcripción iniciada por a) y f) termina la transcripción iniciada por b). Esta disposición puede proporcionar una solución útil al problema de que uno de los terminadores interfiera en la actividad polimerasa en la transcripción iniciada en la otra dirección (p. ej. f) interfiere con b)). Este vector proporciona esencialmente las mismas ventajas que las variaciones de vector mostradas en la Figura 1(a) y la Figura 1(b) sobre la técnica anterior. La diferencia relativamente pequeña en la longitud del transcrito debido a la transcripción de uno de los promotores no afectará significativamente a la eficacia de los sistemas de ARNi. Este es más concretamente el caso cuando el terminador que está localizado fuera de la región inter-promotores c) está en íntima proximidad al promotor, como se ha definido antes.

Las Figuras 1(d) y 1(e) ilustran esquemáticamente dos constructos de ADN adicionales que son sendos vectores plasmídicos que comprenden dos promotores oponibles a) y b) flanqueando una región inter-promotores c). Estas realizaciones comprenden solamente un único terminador. En la disposición mostrada en la Figura 1(d) un único terminador e) que termina la transcripción desde a) se coloca fuera de c). La situación del terminador fuera de la IPR permite el uso de un terminador bi-direccional o un terminador uni-direccional en este sistema. En la realización mostrada en la Figura 1(d) e) se coloca dentro de c). Por lo tanto a) debe ser preferiblemente un terminador uni-direccional.

Las realizaciones adicionales del constructo de ADN se ilustran esquemáticamente en las Figuras 2(b) a 2(e).

Estas realizaciones son todas vectores de clonación de plásmidos, basados en la disposición óptima de los promotores y los terminadores mostrados en la Figura 1(a), y descritos antes, que contienen sitios de clonación para facilitar la inserción de un fragmento de ADN en el al menos un sitio de clonación.

Estas realizaciones son todas vectores de clonación de plásmidos, basados en la disposición óptima de los promotores y terminadores mostrados en la Figura 1(a), que contienen sitios de clonación para facilitar la inserción de un fragmento de ADN diana en la región inter-promotores.

La Figura 2(a), que es una representación esquemática de un vector de clonación de la técnica anterior, se incluye con fines comparativos. Este vector comprende dos promotores oponibles a) y b), que pueden ser idénticos o diferentes, flanqueando un sitio de clonación múltiple (SCM).

La Figura 2(b) ilustra un primer tipo de vector de clonación plasmídico. El vector contiene un primer promotor oponible a) y un segundo promotor oponible b) flanqueando la región inter-promotores. La región inter-promotores se puede definir adicionalmente como: la región de ADN entre el extremo 3' del primer promotor y el extremo 3' del segundo promotor, y que está aguas abajo del primer promotor, y que está aguas abajo del segundo promotor, y que preferiblemente no contiene el extremo 5' del primer promotor ni del segundo promotor. La región promotora inter-promotores comprende adicionalmente los terminadores e) y f) flanqueando un sitio de clonación múltiple SCM. El SCM comprende al menos un sitio de restricción individual, preferiblemente más de un sitio de restricción como es sabido en la técnica, cualquiera de los cuales puede ser utilizado para la inserción de un fragmento de ADN.

La Figura 2(c) ilustra un tipo adicional de vector de clonación plasmídico. Este vector contiene de nuevo promotores oponibles a) y b) flanqueando una región inter-promotores que comprende los terminadores e) y f). En esta realización, a) y b) flanquean un sitio de clonación que está adaptado para facilitar la clonación de fragmentos de PCR, que comprende un ADN de relleno flanqueado por dos sitios de restricción idénticos, en este caso sitios BstXI. La secuencia específica del ADN de relleno no es esencial, siempre que dicho ADN de relleno no interfiera en el efecto deseado y/o la actividad deseada de los constructos de ADN de la invención. Un ejemplo específico de un vector de este tipo descrito en la presente memoria es el plásmido pGN29.

La clonación de productos de PCR utilizando sitios de reconocimiento de BstXI y adaptadores de BstXI es generalmente conocida en la técnica. Los adaptadores de BstXI se obtienen comercialmente, por ejemplo de Invitrogen (Groningen, Países Bajos). Estos adaptadores son adaptadores no palindrómicos diseñados para una clonación más fácil y eficaz de los productos de PCR en vectores. Este uso de estos adaptadores reduce la concatamerización de adaptadores o insertos de ADN por no tener salientes (CACA) complementarios. El ADN de relleno se incluye simplemente para permitir una fácil diferenciación entre el vector cortado con BstXI y el no cortado basándose en el tamaño. Su longitud y secuencia exactas no tienen importancia.

La Figura 2(d) ilustra un tipo de vector de clonación plasmídico adicional. Este vector contiene de nuevo los promotores oponibles a) y b) flanqueando una región inter-promotores que comprende los terminadores e) y f). En esta realización, a) y b) flanquean un sitio de clonación que facilita la clonación de "Alto Rendimiento" basándose en la recombinación homóloga en lugar de en la digestión y ligación con enzimas de restricción. Como se muestra esquemáticamente en la Figura 2(d), el sitio de clonación comprende los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* del bacteriófago lambda flanqueando un gen que es letal para *E. coli*, en este caso el gen *ccdB*.

Un método de clonación alternativo de fragmentos de ADN en este vector, (no mostrado en la Figura 2 (d)), consiste en una variante de este vector, donde la secuencia de ADN de *ccdB* comprende adicionalmente al menos un sitio de restricción único, preferiblemente el al menos un sitio de restricción único es un sitio de restricción con extremos romos, tal como un sitio de restricción *SrfI*. La inserción de un fragmento de ADN en el al menos un sitio de restricción único da como resultado la inactivación del gen *ccdB*, y por consiguiente la inactivación del gen *ccdB* letal.

Una variante adicional de un vector se muestra en la Figura 2(d) en la que attR1 y attE2 no están presentes. Semejante vector comprende al menos un sitio de clonación, consistiendo dicho al menos un sitio de clonación en una secuencia ccdB, comprendiendo dicha secuencia ccdB además al menos un sitio de restricción único, preferiblemente el al menos un sitio de restricción único es un sitio de restricción con extremos romos, tal como un sitio de restricción *SrfI*. La inserción de un fragmento de ADN en el al menos un sitio de restricción único da como resultado la inactivación del gen ccdB, y por consiguiente la inactivación del gen ccdB letal.

Estos sitios de clonación que comprenden la secuencia de nucleótidos ccdB y/o los sitios attR (R1 y/o R2) se obtienen a partir del sistema de clonación Gateway<sup>®</sup> asequible comercialmente de Life Technologies, Inc. El sistema de clonación Gateway<sup>®</sup> ha sido descrito extensamente por Hartley et al. en el documento WO 96/40724 (PCT/US96/10082). Un ejemplo específico de un vector de este tipo descrito en la presente memoria es pGN39.

Las Figuras 2(e) y 2(f) ilustran otro tipo más de vector de clonación plasmídico. Este vector contiene de nuevo los promotores oponibles a) y b) flanqueando una región inter-promotores c) que comprende los terminadores e) y f). En la realización mostrada en las Figura 2(e), e) y f) flanquean un sitio de clonación que facilita la clonación de "alto rendimiento" de los productos de la PCR mediante clonación TA<sup>®</sup>. Este sitio de clonación comprende un ADN de relleno flanqueado por dos sitios de restricción idénticos para una enzima que genera nucleótidos T sobresalientes. En este caso los sitios de restricción son sitios XcmI, pero se podrían utilizar otros sitios que son escindidos para generar nucleótidos T sobresalientes con un efecto equivalente. Los nucleótidos T sobresalientes facilitan la clonación de los productos de la PCR que tienen un nucleótido A sobresaliente. Este principio es conocido como clonación TA<sup>®</sup>. El vector cortado con los nucleótidos T sobresalientes puede ser "topomerizado" para generar un vector de clonación del tipo mostrado esquemáticamente en la Figura 2(f), conectando la enzima topoisomerasa con los nucleótidos T sobresalientes. El vector resultante también facilita la clonación de productos de la PCR por el principio conocido como clonación TOPO<sup>®</sup>.

Los sistemas de clonación TOPO<sup>®</sup> y TA<sup>®</sup>, aunque no para los vectores descritos en esta invención, son asequibles comercialmente de Invitrogen. El sistema de clonación TOPO<sup>®</sup> ha sido descrito extensamente por Shuman en el documento WO 96/19497 (PCT/US95/16099). El sistema de clonación TA<sup>®</sup> ha sido descrito extensamente por Herstadt et al. en el documento WO 92/06189 (PCT/US91/07147).

Un lector experto apreciará fácilmente que mientras las Figuras 2(b)-2(f) ilustran la inclusión de diferentes sitios de clonación en un vector del tipo ilustrado en la Figura 1(a), estos sitios de clonación podían ser incluidos en cualquiera de los constructos de ADN de la invención, incluyendo los ilustrados esquemáticamente en las Figuras 1(b) a 1(e).

### **Aplicación de los constructos de ADN de la invención en la tecnología de ARNi.**

Como se ha mencionado antes, una aplicación principal de los constructos/vectores de ADN descritos en la presente memoria está en la producción de ARN de doble hebra para su uso en la tecnología de ARNi. En particular, los constructos son útiles en protocolos de ARNi *in vivo* en el gusano nematodo *C. elegans*.

En *C. elegans*, el ARNi se ha realizado tradicionalmente mediante inyección de ARNd<sub>h</sub> en el gusano. Fire *et al.* describen estos métodos extensamente en la Solicitud Internacional Núm. WO 99/32619. En resumen, ambas hebras de ARN son producidas *in vitro* utilizando kits de transcripción *in vitro* asequibles comercialmente. Se permite que ambas hebras de ARN formen ARNd<sub>h</sub>, después de lo cual el ARNd<sub>h</sub> se inyecta en *C. elegans*.

El nuevo sistema vector desarrollado por los autores de la presente invención supone una mejora drástica de este método tradicional. Primero, el ARN puede ser producido en una etapa, por ejemplo utilizando dos promotores idénticos tales como en el vector pGN9. Segundo, y más importante, debido a la presencia de terminadores los transcritos, y por consiguiente el ARNd<sub>h</sub> formado, serán más específicos ya que sólo será transcrito el fragmento diana clonado. Esto dará como resultado un ARNi más eficaz.

Un método adicional para realizar experimentos de ARNi en *C. elegans* ha sido descrito por Plaetinck et al. en el documento WO 00/01846. En este método se alimentan gusanos de *C. elegans* con bacterias que producen ARNd<sub>h</sub>. El ARNd<sub>h</sub> atraviesa la barrera del intestino del gusano e induce el mismo ARNi que si se hubiera inyectado el ARNd<sub>h</sub>. Para estos experimentos, la cepa de *E. coli* preferida es HT115 (DE3), y la cepa de *C. elegans* preferida es nuc-1;gun-1. Los vectores mejorados proporcionados por la invención también mejoran la eficacia del ARNi en este método, como se muestra en el ejemplo de más abajo, ya que sólo se produce ARNd<sub>h</sub> eficaz.

Otro método para realizar el ARNi también ha sido descrito por Plaetinck et al. en el documento WO 00/01846. En resumen, este método se basa en la producción de ARNd<sub>h</sub> en el propio gusano. Esto se puede realizar utilizando promotores de gusano en los vectores descritos, o utilizando un gusano transgénico que exprese una polimerasa específica de promotores que no son de *C. elegans* presentes en el vector, de manera que esta polimerasa dirija la transcripción del ARNd<sub>h</sub>.

El ADN del vector plasmídico puede ser introducido en el gusano mediante varios métodos. Primero, se puede introducir el ADN mediante un método de inyección tradicional (Methods in Cell Biology, Vol. 48, C. elegans Modern Biological Analysis of an organism, ed. por Epstein y Shakes). Segundo, se puede introducir el ADN mediante



alimentación de ADN. Como han demostrado Plaetinck et al. en el documento WO 00/01846, se puede introducir ADN plasmídico en el gusano alimentando al gusano con una cepa de *E. coli* que alberga el plásmido. Preferentemente la cepa de *E. coli* es OP50, o MC1061 o HT115 (DE3) pero cualquier otra cepa se podría adaptar para este fin. La cepa de *C. elegans* es preferentemente una cepa mutante nuc-1 o una cepa nuc-1; gun-1. El ADN plasmídico de *E. coli* atraviesa la barrera del intestino y se introduce en el nematodo, dando como resultado la expresión del ARNdh. Como con los otros métodos de ARNi descritos antes, el uso del nuevo sistema vector aumentará el ARNi mediante la producción de ARNdh específico solamente.

La invención se comprenderá adicionalmente mediante la referencia a los siguientes Ejemplos experimentales, junto con las siguientes Figuras adicionales en las que:

10 La Figura 3 es una representación (mapa plasmídico) de pGN1.

La Figura 4 es una representación (mapa plasmídico) de pGN9.

La Figura 5 ilustra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de un plásmido pGN1, comentada para mostrar las posiciones de los promotores de T6 oponibles.

La Figura 6 representa la secuencia de nucleótidos del terminador de la transcripción de T7.

15 La Figura 7 ilustra las secuencias de oligonucleótidos oGN27, oGN28, oGN29 y oGN30 utilizadas para insertar los terminadores de la transcripción de T7 en pGN1. Se marcan las posiciones de las secuencias terminadoras de pol de T7 y de los diferentes sitios de restricción.

La Figura 8 ilustra la secuencia de nucleótidos de un fragmento del plásmido pGN9, comentado para mostrar las posiciones de los promotores de T7 oponibles y los terminadores de la transcripción de T7.

20 La Figura 9 (a) es una representación (mapa plasmídico) de pGN29; (b) es una representación (mapa plasmídico) de pGN39; (c) es una representación (mapa plasmídico) del plásmido TopoRNAi.

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido pGN9.

La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido pGN29.

La Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido pGN39.

25 La Figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido TopoRNAi.

La Figura 14 muestra la secuencia completa del plásmido pGN49A.

La Figura 15 muestra la secuencia completa del plásmido pGN59A.

La Figura 16 es una representación (mapa plasmídico) de pGN49A.

La Figura 17 es una representación (mapa plasmídico) de pGN59A.

### 30 **Ejemplo 1- Construcción del vector.**

El punto de partida para la construcción de los vectores ilustrados en la presente memoria fue el plásmido pGN1. Este plásmido, descrito en la Solicitud Internacional co-pendiente del solicitante Núm. WO 00/01846, contiene dos promotores de T7 oponibles flanqueando un sitio de clonación múltiple.

35 La construcción del vector se llevó a cabo de acuerdo con los mecanismos de la biología molecular convencional conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, por F. M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

#### **1) Construcción de pGN9**

40 Primero se digirió pGN1 con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI. Se recoció los oligonucleótidos oGN27 y oGN28 (Figura 7) para generar un fragmento de doble hebra que después se ligó en el vector cortado con EcoRI/KpnI. El plásmido resultante se volvió a digerir con XbaI y HindIII. Los oligonucleótidos oGN29 y oGN30 se recoció para generar un fragmento de doble hebra que después se recoció en el vector cortado con XbaI/HindIII. El vector resultante se designó pGN9 (Figuras 4 y 10).

#### **2) Construcción de vectores de clonación adicionales**

45 El pGN29 (Figura 9(a); Figura 11) fue generado reemplazando el SCM de pGN9 por un ADN de relleno flanqueado por los sitios BstXI. Los adaptadores de BstXI son asequibles comercialmente de Invitrogen (Groningen, Países Bajos).

El pGN39 (Figura 9 (b); Figura 12) generado por medio de las siguientes etapas; se digirió pGN29 con BstXI. Los adaptadores de BstXI (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) fueron ligados a la Casete A proporcionada por el sistema GATEWAYTM (Life Technologies, Inc.). La casete A contiene attR1, CmR, CcdA, CcdB, attR2. La casete A con los adaptadores fue ligada después en el pGN29 digerido, dando como resultado pGN39A. pGN39A contiene un sitio *SrfI* único en el gen *ccdB*.

El vector TopoRNAi (figura 9 (c); figura 13) fue generado de la siguiente manera; se digirió pGN29 con BstXI. Utilizando la PCR con los cebadores oGN103 y oGN104 y el molde pCDM8 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos), se generó un relleno que incluía sitios *XcmI*. Sobre el producto de la PCR, se ligaron los adaptadores de BstXI, y el producto de ligación resultante se ligó en el vector pGN29 digerido con BstXI dando como resultado el vector TopoRNAi.

oGN103:5'TACCAAGGCTAGCATGGTTTATCACTGATAAGTTGG 3'  
oGN104:5'TACCAAGGCTAGCATGGGCTGCCTGAAGGCTGC 3'

Se construyó PGN49A para insertar un sitio de restricción no romo único adicional y para suprimir el gen *CmR* pGN39. Se utilizó una PCR de solapamiento. Se llevó a cabo una primera PCR con los cebadores oGN126 y oGN127 y PGN39A como molde. Utilizando los cebadores oGN128 y oGN129 y el mismo molde se generó un segundo fragmento. La PCR de solapamiento utilizando los fragmentos resultantes y los cebadores oGN126P y oGN129P dio como resultado un producto de PCR final. A este producto de PCR final, se ligaron los adaptadores de BstXI, y el producto de ligación se ligó en pGN29 digerido con BstXI. El vector resultante se denominó pGN49A.

Se generó un vector de control para someter a ensayo la eficacia del vector de clonación pGN49A, semejante vector debe contener los promotores de T7, pero no los terminadores de T7. Para esto, se aisló el inserto *XbaI* de pGN49A y se clonó en pGN1 digerido con la misma enzima de restricción. El vector resultante se denominó pGN59A.

oGN126 pGATCTGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGC  
oGN127 GGAGACTTTATCGCTTAAGAGACGTGCACTGGCCAGGGGATCACC  
oGN128: CCAGTGCACGTCTCTTAAGCGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTACCC-  
GGTGG  
oGN129 pGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATCCCCAG

### **Ejemplo 2- Para ilustrar la utilidad de los vectores mejorados en ARN.**

Este experimento se diseñó para ilustrar la eficacia mejorada de los vectores mejorados de esta invención en la inhibición de ARN de doble hebra, en comparación con los vectores conocidos en la técnica anterior. Cabría esperar un aumento significativo de la eficacia del sistema, ya que se producía ARNdh más eficaz y por consiguiente el ARNi funcionaba mejor. El sistema experimental para esta prueba del experimento concepto fue medir el rescate de *C. elegans* a 25°C en mutantes de *C. elegans* *nuc-1/pha-1(e2123)ts* por medio de ARNi de *sup35* utilizando la alimentación con ARNdh de pGN-2 (-terminador) y pGN-12 (+ terminador), con PGN-1 (vector vacío) como control y diluidor. La mutación *pha-1 ts/sup-35* ha sido descrita extensamente por Schnabel en el documento WO 99/49066.

La mutación *nuc-1* en *C. elegans* proporciona una cepa de *C. elegans* que muestra mejores capacidades de absorción, tales como la absorción de complejos de ARNdh que *C. elegans* de tipo salvaje. Este mutante está suprimido en la mayoría de las enzimas ADNasa, y los autores de la invención han demostrado en solicitudes co-pendientes anteriores que esta cepa de *C. elegans* produce un ARNi mejorado mediante la alimentación del nematodo con ARNdh.

La mutación *pha-1(e2123)ts* proporciona una cepa de *C. elegans* mutante con un fenotipo de supervivencia a 15°C y letalidad a 25°C. Esta letalidad es suprimible mediante la inhibición de la expresión de *sup-35*. El ARNi de *sup-35* debe facilitar de este modo el rescate de *pha-1(e2123)ts* a 25°C. Los vectores de la presente invención, cuando el ARNdh de *sup-35*, deben incrementar la eficacia del ARNi de *sup-35* en el rescate de los mutantes *pha-1(e2123)ts* a 25°C, en comparación con los vectores que no contienen los terminadores.

Se utilizó el vector pGN1 como vector vacío. El vector pGN2 (-terminador) es un vector que alberga ADN de *sup-35* y que expresa ARNdh de *sup-35* cuando se introduce en el anfitrión apropiado, el vector no tiene insertado ningún terminador transcripcional. El vector pGN12 (+ terminator) es un vector como se ha descrito antes, que contiene los terminadores transcripcionales, y por consiguiente da como resultado una producción de ARNdh mejorada cuando se introduce en un anfitrión apropiado. De este modo, este vector tiene dos terminadores transcripcionales unidireccionales, ambos colocados dentro de la región inter-promotores, y flanqueando el fragmento *sup-35*. Se esperaba que el uso del último vector aumentara la eficacia del sistema, lo que significa aquí un mejor rescate (supervivencia) de los mutantes *pha-1(e2123)ts* a 25°C.

### **Condiciones experimentales**

Se llenaron placas de microtitulación de 12 pocillos con aproximadamente 2 ml de agar NGM por pocillo.

(Un litro de agar NGM: 15 g de Agar, 1 g de peptona, 3 g de NaCl, 1 ml de solución de colesterol (5 mg/ml en EtOH), con adición en condiciones estériles después de someter a autoclave 9,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, 9,5 ml de MgSO<sub>4</sub> 0,1 M, 25 ml de tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, pH 6, Ampicilina (100 µg/l), 5 ml de IPTG 0,1 M y 5 ml de solución de nistatina (disuelta a 10 mg/ml en EtOH:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 1:1 7,5 M).

5 Se aplicaron aproximadamente 50 µl de un cultivo durante la noche de bacterias HT115 (DE3) (Fire A, Carnegie Institution, Baltimore, MD) transformadas con los plásmidos a las placas secas. Después se colocaron en pocillos individuales nematodos individuales en la fase de crecimiento L4, el día 1. En cada pocillo 1 nematodo (P1). El día dos, se colocaron los nematodos P1 en un nuevo pocillo y se dejaron incubando durante un día. El día 3 se repitió el mismo procedimiento. Todas las placas se incubaron adicionalmente a 25°C para permitir que se formara la progenie.  
10 La supervivencia inducida por ARN1 Sup35 (rescate) se midió mediante el recuento de los vástagos.

**Resultados**

El experimento de ARNi en mutantes nuc-1/pha-1(e2123)ts de *C. elegans* mediante alimentación con *E. coli* que expresa ARNd<sub>h</sub> de sup-35.

Escenario:

- 15 pGN1 como control
- pGN2 (sup 35 - Term.)
- pGN12 (sup 35 + Term.)
- pGN2 + pGN1 diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32
- pGN12 + pGN1 diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

20 **Condiciones:**

Temperatura de incubación 25°C

**Lectura:**

Recuento de vástagos (hermafroditas adultos)									
<b>pGN1 (control)</b>									
Día 1	0	0	0	0	0				
Día 2	0	0	0	0	0				
Día 3	0	0	0	0	0				
<b>pGN2 (no diluido)</b>					<b>pGN12 (no diluido)</b>				
Día 1	12	4	48	32	Día 1	16	29	37	14
Día 2	24	23	80	85	Día 2	27	22	57	2
Día 3	5	0	9	16	Día 3	1	2	4	1
<b>pGN 2+1, dilución 1/2</b>					<b>pGN 12+1, dilución 1/2</b>				
Día 1	0	7	0	2	Día 1	22	28	103	61
Día 2	9	10	0	3	Día 2	36	45	53	40
Día 3	0	2	0	0	Día 3	3	3	25	1
<b>pGN 2+1, dilución 1/4</b>					<b>pGN 12+1, dilución 1/4</b>				

pGN 2+1, dilución 1/2					pGN 12+1, dilución 1/2				
Día 1	28	23	0	0	Día 1	*	6	36	5
Día 2	6	3	0	0	Día 2		24	55	3
Día 3	0	0	0	0	Día 3				
pGN 2+1, dilución 1/8					pGN 12+1, dilución 1/8				
Día 1	0	0	4	0	Día 1	31	12	16	38
Día 2	0	0	11	0	Día 2	4	5	37	4
Día 3	0	0	0	0	Día 3	0	0	2	1
pGN 2+1, dilución 1/16					pGN 12+1, dilución 1/16				
Día 1	0	0	0	0	Día 1	1	0	0	0
Día 2	0	0	0	1 peq.	Día 2	2	0	0	1
Día 3	0	0	0	0	Día 3	0	1	1	1
pGN 2+1, dilución 1/32					pGN 12+1, dilución 1/32				
Día 1	0	0	0	0	Día 1	0	0	1	0
Día 2	0	0	0	0	Día 2	0	L2	3	0
Día 3	0	0	0	0	Día 3	2	0	L3-L4	0
* madre muerta									

**Conclusiones**

5 Como se esperaba, los gusanos alimentados con bacterias que albergaban pGN1, no dieron como resultado una progenie viable, debido al efecto letal de la mutación pha-1 a esta temperatura. La alimentación de nematodos con *E. coli* que alberga pGN2 o pGN12 produce en ambos casos, una progenie viable. Esto se debe a la alimentación del gusano con ARNd<sub>h</sub> de sup-35. La diferencia notable entre los dos experimentos de alimentación se puede observar en las series de dilución. Cuando se diluye la bacteria que alberga pGN2 con la bacteria que alberga pGN1, disminuye drásticamente el número de vástagos, incluso a una baja dilución de uno a dos. Esta serie de dilución indica que se necesitan niveles elevados de ARNd<sub>h</sub> para tener una inducción de ARNi apropiada. En el experimento de alimentación con bacterias que albergaban pGN12, todavía se observó una progenie significativa a una dilución de uno a ocho. Esto indica que en las bacterias que albergan pGN12, se forma ARNd<sub>h</sub> mucho más eficaz. Este experimento muestra claramente que la adición de secuencias terminadoras en vectores para expresar ARNd<sub>h</sub> como se ha descrito antes proporciona una ventaja significativa en la generación del ARNi.

**Ejemplo 3: Comparación de la eficacia del ARNi de vectores con y sin terminadores de T7 (pGN49 vs pGN59)**

20 Se han clonado tres genes diferentes en los vectores pGN49A y pGN59A. La clonación se realizó amplificando los fragmentos génicos con ADN polimerasa de PfuI que produce extremos romos, facilitando la clonación en estos vectores. Estos fragmentos de PCR fueron clonados en los vectores digeridos con SrfI. La inserción del fragmento correcto en los clones se verificó mediante PCR. Los fragmentos se seleccionaron de manera que la expresión de dh y el ARNi produce un fenotipo letal de la progenie. Este procedimiento permite comparar rápida y fácilmente la eficacia de los dos vectores pGN49 y pGN59 en el ARNi.

plásmido	Gen (acedb)	Esqueleto vector
pGW5	B0511.8	pGN49A
pGW9	C01G8.7	pGN49A
pGW11	C47B2.3	pGN49A
pGW17	B0511.8	pGN59A
pGW21	C01G8.7	pGN59A
pGW23	C47B2.3	pGN59A

5 Todos los plásmidos (serie pGW) se transforman en bacterias *E.coli* AB301-105 (DE3) mediante la metodología convencional. Las bacterias se hacen crecer después en LB/amp a 37°C durante 14-18 h. Estos cultivos se centrifugaron y el sedimento bacteriano se disolvió en tampón S completo que contenía IPTG 1 mM 100 µg/µl de ampicilina.

En placas de 96 pocillos que contenían 100 µl de S-completo (que contenía IPTG 1 mM y 100 µg/µl de ampicilina concentración final) y 10 µl de solución de bacterias, se añadieron 3 nematodos a cada pocillo, estando los nematodos en la fase de crecimiento L1.

10 Las placas se incubaron a 25°C durante 5-6 días. Cada día se inspeccionaron las placas en busca del desarrollo de las larvas y la producción de vástagos F1.

### Resultados

15 El ARNi se realizó ocho veces para cada plásmido construido. Los resultados demuestran que cuando los terminadores de T7 se insertan en el esqueleto del vector, el fenotipo esperado produce una incidencia del 100%. Cuando no se utilizan terminadores de T7, la reproducibilidad puede disminuir hasta un 50%. Como en el experimento previo, los resultados demuestran que la adición de los terminadores aumenta significativamente el funcionamiento del ARNi.

fragmento de ADN	B0511.8	B0511.8	C01G8.7	C01G8.7	C47B2.3	C47B2.3
Vector	pGN49A	pGN59A	PGN49A	pGN59A	pGN49A	pGN59A
Plásmido Resultante	PGW5	PGW17	PGW9	PGW21	PGW11	PGW23
Porcentaje letal	100	75	100	87,5	100	50
Porcentaje progenie	0	25	0	12,5	0	50

**Fragmento de PCR generado por los cebadores oGN103 y oGN104 sobre el pCDM8 molde**

TACCAAGGCT AGCATGGTTT ATCACTGATA AGTTGG  
 ATAAGTTGGT GGACATATTA TGTTTATCAG TGATAAAGTG TCAAGCATGA  
 CAAAGTTGCA GCCGAATACA GTGATCCGTG CCGGCCCTGG ACTGTTGAAC  
 GAGGTCGGCG TAGACGGTCT GACGACACGC AAAGTGGCGG AACGGTTGGG  
 GGTGCAGCAG CCGGCGCTTT ACTGGCACTT CAGGAACAAG CGGGCGCTGC  
 TCGACGCACT GGCCGAAGCC ATGCTGGCGG AGAATCATA GCTTCGGTGC  
 CGAGAGCCGA CGACGACTGG CGCTCATTTT TGATCGGGAA TCCCGCAGCT  
 TCAGGCAGGC CCATGCTAGC CTTGGTACCA GCACAATGG

**Fragmento de PCR de solapamiento, que se utilizó para generar pGN49A**

gatctggatccggcttactaaaagccagataaacagtatgctgatttgcgcgctg  
 atttttgcggtataagaatatatactgatatgtataccgaagtatgtcaaaa  
 gaggtgtgctatgaagcagcgtattacagtgacagttgacagcgacagctatca  
 gttgctcaaggcatatatgatgtcaatatctccggctctggaagcacaaccatg  
 cagaatgaagcccgtcgtctgctgcccgaacgctggaaagcggaaaatcaggaa  
 gggatggctgaggtcgcccggtttattgaaatgaacggctcttttgctgacgag  
 aacagggactggtgaaatgcagtttaaggttacacctataaaaagagagagccg  
 ttatcgtctgtttggtgatgtacagagtgatattattgacacgcccgggca  
 cggatggtgatccccctggccagtgacgctctcttaagcgataaagtctccc  
 gtgaactttaccgggtggtgcatatcggggatgaaagctggcgcatgatgac  
 caccgatatggccagtggtgcccggctctccgttatcggggaagaagtggctgat  
 ctcagccaccgcaaaaatgacatcaaaaacgccattaacctgatgttctggg  
 gaataataatgtcaggctcccttatacacagc

5

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> DEVGEN NV
- <120> CONSTRUCTOS DE VECTORES
- <130> SCB/55178/001
- <140>
- <141>
- <160> 21
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 160
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>

10

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento de pGN1 que contiene que contiene promotores de T7 oponibles

<400> 1

```

ttgtaatacgc actcactata gggcgaattc gagctcggta cccggggatc ctctagagtc 60
gaaagcttct cgccctatag tgagtcgatat tacagcttga gtattctata gtgtcaccta 120
aatagcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt 160
    
```

5 <210> 2

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de ADN que contiene un terminador de T7

<400> 2

```

actagcataa cccctgggg cctctaaacg ggtctgagg ggtttttg 49
    
```

<210> 3

<211> 70

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN27

<400> 3

```

aattcaaaaa acccctcaag acccgtttag aggccccaag gggttatgct agtgaattct 60
gcagcgggtac 70
    
```

20

<210> 4

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:

Oligonucleótido oGN28

<400> 4

```

cgctgcagaa ttcactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt 60
tg 62
    
```

30 <210> 5

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN29

<400> 5

ctagacgcgt aagcttacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt 60  
 ttttg 65

<210> 6

5

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN30

10

<400> 6

agctcaaaaa acccctcaag acccgtttag aggcccaag gggttatgct agtaagctta 60  
 cgcgt 65

<210> 7

<211> 230

<212> ADN

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento del plásmido pGN9 que contiene promotores de T7 oponibles y terminadores de la transcripción de T7

<400> 7

ttgtaatacg actcactata gggcgaattc aaaaaacccc tcaagaccg tttagaggcc 60  
 ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccgggg atcctctaga cgcgtaagct 120  
 tactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag gggtttttg agcttctcgc 180  
 cctatagtga gtcgtattac agcttgagta ttctatagtg tcacctaaat 230

20

<210> 8

<211> 3323

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido pGN9

<400> 8

gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60  
 ggcgaaattg taaacgttaa tattttgta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc 120  
 tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataatcaaa agaatagacc 180  
 gagatagggt tgagtgtgtg tccagtttgg aacaagagtc cactatataa gaacgtggac 240



tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300  
 cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgaaa ccctaaaggg 360  
 agccccgat ttagagcttg acggggaaa cggcgaaacg tggcgagaaa ggaagggaa 420  
 aaagcgaaa gagcgggagc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480  
 accacaccg ccgcgcttaa tgcgcccgtc cagggcgctt ccattcgcca ttcaggtgc 540  
 gcaactgttg ggaagggcga tccgtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa 600  
 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagtggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660  
 gtaaaacgac ggccagtga ttgtaatac actcactata gggcgaattc aaaaaacccc 720  
 tcaagaccg ttttagaggc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccgggg 780  
 atcctctaga cgcgtaagc tactagcata accccttggg gcctctaacc gggcttgag 840  
 gggtttttg agcttctcg cctatagtga gtcgtattac agcttgagta tctatagtg 900  
 tcacctaaat agcttggcgt aatcatggtc atagctgtt cctgtgtgaa attgttatc 960  
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 1020  
 atgagtgagc taactcact taatgctgt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa 1080  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgag gggagaggcg gtttgcgtat 1140  
 tgggagctt tccgcttct cgtcactga ctgcgtgcg tcggctgttc ggctgcggcg 1200  
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 1260  
 aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgctt 1320  
 gctggcgctt ttcgataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 1380  
 tcagaggtg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 1440  
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc cttaccgga tacctgtcgc cctttctccc 1500  
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt 1560  
 cgctcgtccc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagccccacc gctgcgctt 1620  
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 1680  
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gatgtaggc ggtgtacag agttcttga 1740  
 gtgggtgctt aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctcgc ctctgtgaa 1800  
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctg 1860  
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaa gatctcaaga 1920  
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaact cacgtaag 1980  
 gaattttggt atgagattat caaaaaggat atccttttaa attaaaaatg 2040  
 aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 2100  
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 2160  
 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggccccca gtgctgcaat 2220  
 gataccgaga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 2280  
 aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 2340  
 ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcccagc ttggtggcat 2400  
 tgctacaggg atcgtggtgt cagcctcgtc gtttggtag gcttcatca gctccggtt 2460  
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 2520  
 cggctcctcc atcgttgtca gaagtaagtt ggccgagtg ttatcactca tggttatggc 2580  
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 2640  
 gtactcaacc aagtcattct gagaataccg cgcccggcga ccgagttgct ctgcccggc 2700  
 gtcaatacgg gataatagt tatgacatag cagaacttta aaagtgtc tcaattgaaa 2760  
 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga 2820  
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 2880  
 agcaaaaaa ggaaggcaaa atgcccgaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 2940  
 aatactcata ctcttctctt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 3000  
 gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggtt cgcgcacatt 3060  
 tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctata 3120  
 aaataggcgt atcacgagg cctttcgtct cgcgcttcc ggtgatgac gtgaaaacct 3180  
 ctgacacatg cagctcccgg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 3240  
 acaagcccgt cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 3300  
 ggcacagag cagattgtac tga 3323

<210> 9

<211> 3774

<212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido pGN29

<400> 9

```

gagtgcacca tatgCGGTgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaattg taacgTtaa tattttgtta aaatcgcgt taaatattg ttaaaccagc 120
tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaaaccctt ataatcaaa agaatagacc 180
gagatagggT tgagtgtTgt tccagttTgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaatcaa gttttttgCG gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcggaa ccctaaagg 360
agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaa 420
aaagcgaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
accacacccg ccgcgcttaa tgcgcgcgta cagggcgctt ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tCGGTgcgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa 600
ggggatgtgc tgcaagggcga ttaagtTgg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtGaa ttgtaatcag actcactata gggcgaattc aaaaaacccc 720
tcaagacccg ttagagggc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccgggg 780
atcctctaga gatccctcga cctcgagatc catgtgctg gcgcggattc tttatcactg 840
ataagtTggT ggacatatta tgtttatcag tgataaagtg tcaagcatga caaagtTgca 900
gccgaataca gtgatccgtg ccggccctgg actgttgaac gaggtcggcg tagacggctc 960
gacgacacgc aaactggcgg aacggTtggg ggtgcagcag ccggcgcttt actggcactt 1020
caggaacaag cgggcgctgc tgcagcact ggccgaagcc atgctggcgg agaatacatc 1080
gcttcggtgc cgagagccga cgacgactgg cgctcattc tgatcgggaa tcccgcagt 1140
tcaggcaagg gctgctcgcc taccgccagc acaatggatc tcgagggatc tccatacct 1200
accagttctg cgctgcagg tCGGGCCGC gactctctag acgcgtaagc ttactagcat 1260
aacccttgg ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gagcttctcg ccctatagt 1320
agtcgtatta cagcttgagt attctatagt gtcacctaaa tagcttggcg taatcatggt 1380
catagctgtt tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg 1440
gaagcataaa gtgtaaagcc tgggtgcctt aatgagtGag ctaactcaca ttaattgCGT 1500
tgcgctcact gccgctttc cagtcgggaa acctgctgTg ccagctgcat taatgaatcg 1560
gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta ttggcgctc ttcgcttcc tcgctcactg 1620
actcgtcgcg ctCGGTcgtt cggtgcggc gagcggTatc agctcactca aaggcgtaa 1680
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaagaa catgtgagca aaaggccagc 1740
aaaaggccag gaaccgTaaa aaggccgcgt tGctggcgtt ttcgatagg ctccgcccc 1800
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggTg gcgaaacccg acaggactat 1860
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgGg ctctcctgtt ccgaccctgc 1920
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cgtggcgctt tctcatagct 1980
cacgctgtag gtatctcagt tCGGTgtag tCGTtCGct caagctgggc tGtGtgcagc 2040
aaccctcgt tcagcccgac cgctgcgctt tatccgTaa ctatcgtctt gAgTccaacc 2100
cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 2160
ggtatgtagg cggTgctaca gAgTcttga agTgTggcc taactacggc tacataatag 2220
ggacagTatt tggtatctgc gctcgtgTga agccagTtac cttcggaaaa agagTtgta 2280
gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcggTgg tttttttgtt tgcaagcagc 2340
agattacgCG cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatctttct acggggctc 2400
acgctcagTg gaacgaaaa tcaCGTtaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 2460
tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagTtttaa atcaatctaa agtatatag 2520
agTaaactTg gtctgacagt taccaatgct taatcagTga ggcacctatc tcagcgatct 2580
gtctatTtcg tTcatccata gttgcctgac tcccctcgt gtagataact acgatacggg 2640
agggcttacc atctggcccc agTgctgcaa tgataccgCG agaccacgc tcaccggctc 2700
cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa 2760
ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagTtcg 2820
cagTtaatag tttgcgcaac gttgtTggca ttgctacagg catcgtggTg tcacgctcgt 2880
cgtttggTat ggcttcatc agctccggtt cccaacgac aaggcgagTt acatgatccc 2940
ccatgtTgtg caaaaaagcg gttagctcct tCGGTcctcc gatcgtTgtc agaagTaa 3000
tgccgcagT gttatcact atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc 3060
catccgTaaG atgctttct gtgactggT agTactcaac caagtcattc tgagaatacc 3120
gcgccccggc accgagTtgc tctgccccg cgTcaatacG ggataatagT gtatgacata 3180
gcagaacttt aaaagTgctc atcattggaa aacgttctc ggggcgaaaa ctctcaagga 3240
tcttaccgct gttgagatcc agTtcgatgt aaccactcG tgcacccaac tgatcttcaG 3300
catcttttac tttcaccagc gttctgggt gagcaaaaa aggaaggcaa aatgccgcaa 3360
aaaaaggaaT aagggcgaca cggaaatgTt gaatactcat actctcctt tttcaatatt 3420
attgaagcat ttatcagggT tattgtctca tgagcggata catattTgaa tGtatTtaga 3480
aaaaataaca aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agTgccacct gacgtctaag 3540
aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggCG tatcacgagg cccttctgctc 3600

tcgCGcttt cggTgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccG gagacggtca 3660
cagcttGct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccG tcagggcgcg tcagcgggtg 3720
ttggcgggtg tcgggctgG cttaaactatg cggcatcaga gcagattgta ctga 3774

```

<210> 10  
 <211> 5148  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido pGN39

<400> 10

```

taatacgact cactataggg cgaattcaaa aaaccctca agaccggtt agaggcccca 60
aggggttatg ctagtgaatt ctgcagcggg acccgggat cctctagaga tccctcgacc 120
tcgagatcca ttgtgctgga aagatcacia gtttgtacia aaaagctgaa cgagaaacgt 180
aaaatgatat aaatatcaat atattaaatt agattttgca taaaaaacag actacataat 240
actgtaaaac acaacatata cagtcactat ggccggcgcga ttaggcaccc caggctttac 300
actttatgct tccggctcgt ataagtgtg gattttgagt taggatccgg cgagattttc 360
aggagctaag gaagctaaaa tggagaaaa aatcactgga tataaccacc ttgatataatc 420
ccaatggcat cgtaaagaac attttgaggg atttcagtca gttgctcaat gtacctataa 480
ccagaccgtt cagctggata ttacggcctt ttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacia 540
gttttatccg gctttatct acatctctgc ccgcctgatg aatgctcatc cggaattccg 600
tatggcaatg aaagacggg agctggatg atgggatag gttcaccctt gttacacacg 660
tttccatgag caaacgaaa cgtttctatc gctctggagt gaataccacc acgatttccg 720
gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctatct 780
ccctaaaggg tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcc 840
cagttttgat ttaaactggt ccaatatgga caacttctc gcccccgtt tcaccatggg 900
caaatattat acgcaaggc acaagggtg gatgccgtg gcgattcagg ttcacatgag 960
cgtctgtgat ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcatga 1020
gtggcagggc gggcgtaaa gatctggatc cggttacta aaagccagat aacagtatgc 1080
gtatttgccc gctgattttt gcggtataag aatatatact gatattgata cccgaagtat 1140
gtcaaaaaga ggtgtgctat gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat 1200
cagttgctca aggcataat gatgtcaata tctccggtc ggtaagcaca accatgcaga 1260
atgaagcccg tcgtctcgtt gccgaacgct ggaaagcggg aaatcaggaa gggatggctg 1320
aggctcggcc gtttatgaa atgaacggct cttttgctga cgagaacagg gactggtgaa 1380
atgcagttta aggtttacac ctataaaaaga gagagccgtt atcgtctgtt tgtggatgta 1440
cagagtgata ttattgacac gcccgggcga cggatgggta tccccctggc cagtgcacgt 1500
ctgctgtcag ataaagtctc ccgtgaactt taccgggtgg tgcatatcgg ggtgaaagc 1560
tggcgcagta tgaccaccga tatggccagt gtgcccgtt ccgttatcgg ggaagaagtg 1620
gctgatctca gccaccgcca aaatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat gttctgggga 1680
atataaatgt caggctccct tatacacagc cagtctgcag gtcgaccata gtgactggat 1740
atgttgtgtt ttacagtatt atgtagctg ttttttatgc aaaatctaat ttaatatatt 1800
gatatttata tcattttacg tttctcgttc agctttcttg taaaaagtgg tgatctttcc 1860
agcacaatgg atctcgaggg atcttccata cctaccagt ctgcgcctgc aggtcgcggc 1920
cgcgactcta gacgcgtaag cttactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg 1980
aggggttttt tgagcttctc gccctatagt gagtctgatt acagcttgag tattctatag 2040
tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 2100
ccgctcacia ttccacacia catacagacc ggaagcacia agtgtaaagc ctgggggtgc 2160
taatgagtga gctaactcac ataatgtgc ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga 2220
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 2280
attgggcgct cttccgctc ctcgctcaet gactcgtgc gctcggctc tcggctgcgg 2340
cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccggc 2460
ttgctggcgt ttttcgatag gctccgccc cctgacgagc atcaaaaaa tcgacgctca 2520
agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taagataacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgctttctc 2640
ccttcgggaa gcgtggcgtt ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 2760
ttatccggtg actatcgtct tgagccaac ccggtaaagc acgacttatc gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 2880

```

```

aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcctgat ccggcaaaaa aaccaccgct 3000
ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa 3120
gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 3240
ttaatcagtg aggcacctat ctacagcgtc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 3300
ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggttac catctggccc cagtgtgca 3360
atgataccgc gagaccacag ctacaccggt ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 3420
ggaagggcgg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 3480
tgttgccggg aagctagagt aagttagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttggc 3540
attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggt 3600
tccaacgat caaggcagtg tacatgatcc ccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 3660
ttcggctcct cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcact catggttatg 3720
gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccacccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 3780
gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatac cgcgcccggc gaccgagttg ctcttgcccg 3840
gcgtaatac gggataatag tgtatgacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga 3900
aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 3960
taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcattcttta ctttcaccag cgtttctggg 4020
tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taaggcgac acggaatgt 4080
tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 4140
atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 4200
tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat 4260
aaaaataggg gtatcacgag gccctttcgt ctgcgctggt tcggtgatga cggtgaaaa 4320
ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct tgtaagcggg tgccgggagc 4380
agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat 4440
gcgcatcag agcagattgt actgagagtg caccatagc ggtgtgaaat accgcacaga 4500
tgcgtaagga gaaaataccg catcagggca aattgtaaac gttaatattt tgttaaaat 4560
cgcgttaaat atttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaat 4620
cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat agggttgagt gttggtccag tttggaacaa 4680
gagtcacta ttaaagaacg tggactcaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg 4740
cgatggccca ctacgtgaac catcacccaa atcaagttt ttgcggtcga ggtgccgtaa 4800
agctctaaat cgyaacccca aagggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc 4860
gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaagggagc ggcgtaggg cggtgcaag 4920
tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac accgcggcgc cttaatgccc cgctacaggg 4980
cgcgtccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggg gcgggctct 5040
tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg 5100
ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattg 5148

```

<210> 11

<211> 3715

<212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido TopoRNAi

<400> 11

```

gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgctg aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacgc 120
tcatttttta accaatagggc cgaaatcggc aaaatccctt ataatacaaa agaataagacc 180
gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgga cctaagaagg 360
agccccgat tttagccttg acggggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaaggggaa 420
aaagcgaag gagcgggccc tagggcgtg gcaagttag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
accacaccgg ccgcgcttaa tgcgcgcta cagggcgcgt ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa 600
gggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taaccagcag gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatac actcactata gggcgaattc aaaaaacccc 720

```

tcaagaccgg ttttagaggcc ccaagggggt atgctagtga attctgcagg gtaccggggg 780  
atcctctaga gatccctcga cctcgagatc cattgtggtg gaattctacc aaggctagca 840  
tgggcagccg aatacagtga tccgtgccgg ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga 900  
cggctctgac acacgcaaac tggcggaaac gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg 960  
gcacttcagg aacaagcggg cgctgctcga cgcactggcc gaagccatgc tggcggagaa 1020  
tcatacgctt cgggtgccgag agccgacgac gactggcgct ctttctgat cgggaatccc 1080  
gcagccatgc tagccttggg agaattccac cacaatggat ctcgagggat cttccatacc 1140  
taccagtctt gcgctgagc gtgcgggccc cgactctcta gacgcgtaag cttactagca 1200  
taaccctctg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgagcttctc gccctatagt 1260  
gagtcgtatt acagcttgag tattctatag tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg 1320  
tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc 1380  
ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgc taatgagtga gctaactcac attaatgagc 1440  
ttgcgctcac tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc 1500  
ggccaacgag cggggagagg cggtttgctg attgggctgt cttccgcttc ctcgctcact 1560  
gactcgtctc gctcgtctgt tcggctgctg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta 1620  
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 1680  
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggcggcg ttgctggcgt ttttcgatag gctccgcccc 1740  
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 1800  
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 1860  
ccgcttacgg gatacctgtc cgctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 1920  
tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgctcgtc ccaagctggg ctgtgtgac 1980  
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccgcta actatcgtct tgagtccaac 2040  
ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 2100  
aggatgtag gcgggtgtac agagtctctg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga 2160  
aggacagtat ttgggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagtgtgt 2220  
agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag 2280  
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct 2340  
gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg 2400  
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 2460  
gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 2520  
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg 2580  
gagggccttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacag ctcaccggct 2640  
ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccc agcgcagaag tggctcctgca 2700  
actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 2760  
ccagttaata gtttgccgca cgttgttggc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg 2820  
tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcagat tacatgatcc 2880  
cccatggtgt gcaaaaaaagc ggttagctcc ttcggtctc cgatcgttgt cagaagtaag 2940  
ttggccgagc tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 3000  
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatac 3060  
cgcgcccggc gaccgagttg ctcttggccc gcgtcaatac gggataatag tgtatgacat 3120  
agcagaactt taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 3180  
atcttaccgc tgttgagatc cagttcagat taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca 3240  
gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 3300  
aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat 3360  
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 3420  
aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 3480  
gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 3540  
ctcgcgctt tccggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 3600  
acagcttgct tgtaagcggg tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 3660  
ggtgcccggg gtcccgggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actga 3715

<210> 12

<211> 4107

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido pGN49A

<400> 12

tgtaatacga ctactatag ggcaattca aaaaaccct caagaccgt ttagaggcc 60

caaggggta tgctagtga tctgcagcg gtaccgggg atcctctaga gatccctcga 120  
 cctcgagatc cattgtgctg gaaaggatct ggatccggct tactaaaagc cagataacag 180  
 tatgctatt tgcgcgctga tttttgcggt ataagaatat atactgatat gtatacccg 240  
 agtatgtcaa aaagaggtgt gctatgaaagc agcgtattac agtgacagtt gacagcgaca 300  
 gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt caatatctcc ggtctggtaa gcacaacat 360  
 gcagaatgaa gcccgtcgtc tgcgtgcccga acgctggaaa gcggaaaatc aggaagggat 420  
 ggctgaggtc gcccggttta ttgaaatgaa cggctctttt gctgacgaga acagggactg 480  
 gtgaaatgca gtttaagggt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgg 540  
 atgtacagag tgatattatt gacacgcccg ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagt 600  
 cacgtctctt aagcgataaa gtctcccgtg aactttaccg ggtggtgcat atcggggatg 660  
 aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag 720  
 aagtggctga tctgacgac cgcaaaaac acatcaaaaa cgccattaac ctgatgttct 780  
 ggggaatata aatgtcagcg tcccttatac acagccttc cagcacaatg gatctcgagg 840  
 gatcttccat acctaccagt tctgcccgtg caggtcggcg cgcgactct agacgcgtaa 900  
 gcttactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgagcttct 960  
 cgccctatag tgagtctgat tacagcttga gtattctata gtgtacccta aatagetttg 1020  
 cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 1080  
 acatacagag cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtc ctaatgagtg agctaactca 1140  
 cattaattgc gttgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 1200  
 attaatgaa cgcaaccgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgcg tctcccgtt 1260  
 cctcgtcac tgactcgtg cgtcggctcg ttcggctgcg gcgagcggt tcaactcact 1320  
 caaagcggt aatacgggt tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 1380  
 caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg ttttccgata 1440  
 ggtcccggcc cctgacgag catcacaaaa atcgcagctc aagtcagagg tggcgaaacc 1500  
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 1560  
 ttccgaccct gccgcttacc ggatccctgt ccgcttctt cccttcggga agcgtggcg 1620  
 tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg 1680  
 gctgtgtgca gaaccccc gttcagcccc accgctgccc ctatccgggt aactatcgtc 1740  
 ttgagtcaa cccgtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 1800  
 ttagcagagc gaggatgta ggcggtgcta cagagtctt gaagtgtgg cctaactacg 1860  
 gctacactag aaggacgta tttggtatct gcgctctgt gaagccagt accttcggaa 1920  
 aaagtataa tgagtaaac ttgctgaca gttaccaatg ttgtagcggg ggtttttttg 1980  
 ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 2040  
 ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgta agggattttg gtcagatgat 2100  
 tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatc 2160  
 aaagtataa tgagtaaac ttgctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 2220  
 tctcagcagc ctgtctattt cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa 2280  
 ctacgatac gaggggctta ccatctggcc ccagtctgc aatgataacc cgagaccac 2340  
 gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggagggcc gagcgcagaa 2400  
 gtggctctgc gactttatcc gcctccatcc agtctatata ttggtgcccg gaagctagag 2460  
 taagtgttc gccagttaat agtttgcgca acggttggg cattgctaca ggcactgtg 2520  
 tgcacgctc gctgtttggt atggtctcat tcagctccgg tcccaacga tcaaggcgag 2580  
 ttacatgat ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgtt 2640  
 tcagaagtta gttggcgcga gtttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 2700  
 ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagctat 2760  
 tctgagaata ccgcccggcg cgaccgagtt gctcttggcc ggcgtcaata cgggataata 2820  
 gtgtatgaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 2880  
 aactctcaag gatcttaccg ccagttcagat gtaaccctact gtaaccctca cgtgcaacca 2940  
 actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 3000  
 aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 3060  
 tttttcaata ttattgaage atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatgtt 3120  
 aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgac atttccccga aaagtggcc 3180  
 ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 3240  
 ggccctttcg tctcgcgctg ttcggtgatg acgggtgaaa cctctgacac atgcagctcc 3300  
 cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgcccggag cagacaagcc cgtcagggcg 3360  
 cgtcagcggg tgttggcggg gtctgaggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 3420  
 tactgagagt gcaccatag cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3480  
 gcatcagggc aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa 3540  
 atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa 3600  
 tagaccgaga tagggttgag ttgtttcca gtttggaaaca agagtccact attaaaagaa 3660  
 gtggactcca acgtcaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa 3720  
  
 ccatcaccca aatcaagttt tttgcggtcg aggtgccgta aagctctaaa tcggaaccct 3780  
 aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 3840  
 ggaagaaag cgaaaggagc gggcgctag gcgctggcaa gtgtagcggg cacgctgcgc 3900  
 gtaaccacca caccgcccgc gcttaatgag ccgctacag gcgctccat tcgcccattca 3960  
 ggctgcgcaa ctggtgggaa gggcgatcgg tgcgggctc ttcgctatta cgcagctgg 4020  
 cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccaggggtt tcccagctac 4080  
 gacgttataa aacgacggcc agtgaat 4107

<210> 13

<211> 4001

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido pGN59A

<400> 13

```

gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaaattg taaacgttaa tttttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc 120
tcatttttta accaataggc cgaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
gagatagggt tgagtgttg tccagtttg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaacctca 300
cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgaa ccctaaaggg 360
agccccgat ttagagcttg acggggaaa cggcgcaacg tggcgagaaa ggaagggaa 420
aaagcgaag gagcgggccc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
accacaccg ccgcgcttaa tgcgcccgt cagggcgctg ccattcgcca tcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tcggtgccgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagtggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaacgac ggccagtga ttgtaatac actcactata gggcgaattc gagctcggta 720
cccgggatc ctctagagat ccctcgacct cgagatccat tgtgctggaa aggatctgga 780
tccggcttac taaaagccag ataacagtat gcgtatttg gcgctgattt ttgcggtata 840
agaatataa ctgatatga taccggaagt atgtcaaaa gaggtgtgct atgaagcagc 900
gtattacagt gacagttgac agcgacagct atcagttgct caaggcatat atgatgtcaa 960
tatctccggt ctgtaagca caaccatgca gaatgaagcc cgtcgtctgc gtgccgaacg 1020
ctggaaagcg gaaaatcagg aagggatggc tgaggtcgcc cggtttattg aaatgaacgg 1080
ctcttttgct gacgagaaca gggactggtg aaatgcagtt taaggtttac acctataaaa 1140
gagagagccg ttatcgtctg tttgtggatg tacagagtga tattattgac acgcccgggc 1200
gacggatggt gatccccctg gccagtgcac gtctcttaag cgataaagtc tcccgtgaac 1260
ttaccgggt ggtgcatac ggggatgaaa gctggcgcat gatgaccacc gatatggcca 1320
gtgtgccggt ctccgttatc ggggaagaag tggtgtatc cagccaccgc gaaaatgaca 1380
tcaaaaacgc cattaacctg atgttctggg gaatataaat gtcaggctcc cttatacaca 1440
gcctttccag cacaatggat ctcgagggat cttccatacc taccagttct gcgcctgcag 1500
gtcgcggccg cgactctcta gagtcgaaa cttctcgccc tatagtgagt cgtattacag 1560
cttgagtatt ctatagtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggatc atgctgtttc 1620
tgtgtgaaat tgttatccg tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg 1680
taaagcctgg ggtgccta atgagtgact actcacatta attgctgtgc gctcactgcc 1740
cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcgcc aacgcgagg 1800
gagagggcgt ttgcgtattg gccgctcttc cgcttccctg ctactgact cgctgcgctc 1860
ggtcgttcgg ctgcccggag ccggtatcagc tcaactcaaag gcggtatac ggttatccac 1920
agaaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 1980
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt cgataggctc cgccccctg acgagcatca 2040
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 2100
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgcgc ttaccggata 2160
ctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 2280
gcccgaccgc tgcgcttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga 2340
cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg 2400
tgctacagag ttcttgaagt ggtgcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttg 2460
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacct cgaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 2520
caaaaacacc accgctggta gcggtgggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgag 2580
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctac ggtctgacg ctcatggaa 2640

```

```

cgaaaactca cgtaagggg ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 2700
ccttttaaat taaaaatgaa gtttttaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 2760
tgacagttaac caatgcttaa tcagtggagc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 2820
atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 2880
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc 2940
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 3000
catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3060
gcgcaacggt gttggcattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgctgt ttggtatggc 3120
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 3180
aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgctaga agtaagttgg ccgcagtggt 3240
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg 3300
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaataccgcg cccggcgacc 3360
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taatagtgta tgacatagca gaactttaa 3420
agtgtcctc attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt 3480
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tctcagcat cttttacttt 3540
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag 3600
ggcgacacgg aaatggtgaa tactcact cttcctttt caatattatt gaagcattta 3660
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaa ataaacaaat 3720
agggttccg gcacacattc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 3780
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc ttcgtctcg cggtttcgg 3840
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gtcgccggag acggtcacag cttgtctgta 3900
agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgtg gcgggtgtcg 3960
ggctggctt aactatgcgg catcagaqca gattgtactg a 4001

```

<210> 14

<211> 36

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN103

<400> 14

taccaaggct agcatggttt atcactgata agttgg 36

10 <210> 15

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN104

<400> 15

taccaaggct agcatgggcc tgctgaagg ctgc 34

<210> 16

<211> 40

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN126

<400> 16

25 gatctggatc cggttacta aaagccagat aacagtatgc 40



<210> 17  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN127  
 <400> 17  
 ggagacttta tcgcttaaga gacgtgcaact ggccaggggg  
 atcacc 46  
 10 <210> 18  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN128  
 <400> 18  
 ccagtcacg tctcttaagc gataaagtct cccgtgaact ttaccgggtg g  
 51  
 <210> 19  
 20 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN129  
 25 <400> 19  
 gctgtgtata agggagcctg acatttatat tccccag 37  
 <210> 20  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: fragmento de PCR generado por cebadores oGN103 y oGN104  
 sobre pCDM8  
 <400> 20

```
taccaaggct agcatggttt atcactgata agttggataa gttggtggac atattatgtt 60
tatcagtgat aaagtgtcaa gcatgacaaa gttgcagccg aatacagtga tccgtgccgg 120
ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga cggctctgacg acacgcaaac tggcggaacg 180
gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg gcacttcagg aacaagcggg cgctgctcga 240
cgactggcc gaagccatgc tggcggagaa tcatacgctt cggtgccgag agccgacgac 300
gactggcgct catttctgat cgggaatccc gcagcttcag gcaggcccat gctagccttg 360
gtaccagcac aatgg 375
```

<210> 21

<211> 670

<212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: fragmento de PCR

<400> 21

```
gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc gtatttgccg gctgattttt 60
gcggtataag aatatatact gatatgtata cccgaagtat gtcaaaaaga ggtgtgctat 120
gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat cagttgctca aggcataat 180
gatgtcaata tctccggtct ggtaagcaca accatgcaga atgaagcccg tcgtctcgt 240
gccgaacgct ggaaagcggg aaatcaggaa gggatggctg aggtcgcccg gtttattgaa 300
atgaacggct cttttgctga cgagaacagg gactggtgaa atgcagtta aggtttacac 360
ctataaaaga gagagccgtt atcgtctgtt tgtggatgta cagagtgata ttattgacac 420
gcccgggcca cggatggtga tcccctggc cagtgcacgt ctcttaagcg ataaagtctc 480
ccgtgaactt taccgggtgg tgcatacgg ggatgaaagc tggcgcata tgaccaccga 540
tatggccagt gtgccggtct ccgttatcgg ggaagaagtg gctgatctca gccaccgcca 600
aatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat gttctgggga atataaatgt caggctccct 660
tatacacagc 670
```

**REIVINDICACIONES**

1. Un constructo de ADN que comprende:

- a) un primer promotor y
- b) un segundo promotor,

5 donde el primer y segundo promotores están en orientación opuesta entre si y definen:

c) una región inter-promotores situada aguas abajo del extremo 3' del primer promotor y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor, donde dicha región inter-promotores comprende una secuencia de nucleótidos que forma un molde para la producción de ARN de doble hebra;

y cuyo constructo de ADN comprende adicionalmente:

10 d) un primer terminador de la transcripción, situado en la región inter-promotores aguas abajo, como se observa desde el extremo 3' del primer promotor, del primer promotor, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor;

**caracterizado porque** el primer y segundo promotores son promotores de bacteriófago, promotores procarióticos o promotores eucarióticos.

15 2. Un constructo de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

e) un segundo terminador de la transcripción situado en la región inter-promotores aguas abajo del segundo promotor, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor,

donde el segundo terminador de la transcripción está conectado operablemente al segundo promotor.

20 3. Un constructo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el primer y el segundo promotores son idénticos.

4. Un constructo de ADN de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 donde el primer y el segundo promotores no son idénticos.

5. Un constructo de ADN de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, donde el primer promotor y el segundo promotor se seleccionan independientemente entre los promotores de T7, T3 o SP6.

25 6. El uso de un constructo de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la producción de ARN de doble hebra para la inhibición del ARN, con la condición de que el primer y segundo promotores del constructo de ADN no son promotores de bacteriófago.

7. Una cepa bacteriana que alberga un constructo de ADN, donde dicho constructo de ADN comprende:

- a) un primer promotor y
- b) un segundo promotor,

30 donde el primer y el segundo promotores están en orientación opuesta entre si y definen:

c) una región inter-promotores situada aguas abajo del extremo 3' del primer promotor y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor, donde la región inter-promotores comprende una secuencia de nucleótidos que forma un molde para la producción de ARN de doble hebra;

35 y cuyo constructo de ADN comprende adicionalmente:

d) un primer terminador de la transcripción situado en la región inter-promotores y aguas abajo del primer promotor, como se observa desde el extremo 3' del primer promotor, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor.

40 8. Una cepa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho constructo de ADN comprende adicionalmente:

e) un segundo terminador de la transcripción situado en la región inter-promotores y aguas abajo del segundo promotor, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor,

donde el segundo terminador de la transcripción está conectado operablemente al segundo promotor.

45 9. Una cepa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde el primer y el segundo promotores del constructo de ADN son idénticos.

10. Una cepa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde el primer y el segundo promotores del constructo de ADN no son idénticos.
11. Una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el primer y el segundo promotores son promotores de bacteriófago, promotores eucarióticos o promotores eucarióticos.
- 5 12. Una cepa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 9 o reivindicación 10, donde el primer promotor y el segundo promotor se seleccionan independientemente entre los promotores de T7, T3 o SP6.
13. Una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde dicha cepa bacteriana es una cepa de *E. coli*.
- 10 14. El uso de la cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o 13 para la producción de ARN de doble hebra para la inhibición del ARN, con la condición de que el primer y segundo promotores del constructo de ADN no son promotores de bacteriófago.
- 15 15. El uso de un constructo de ADN para la producción de ARN de doble hebra para la inhibición de ARN, donde dicho constructo de ADN comprende:
- a) un primer promotor y
- b) un segundo promotor,
- donde el primer y segundo promotores están en orientación opuesta entre si y definen:
- c) una región inter-promotores situada aguas abajo del extremo 3' del primer promotor y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor;
- y cuyo constructo de ADN comprende adicionalmente:
- 20 d) al menos un sitio de clonación situado en la región inter-promotores; y
- e) un primer terminador de la transcripción, situado (como se observa desde el extremo 3' del primer promotor) aguas abajo del primer promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor, y donde el primer terminador de la transcripción está situado en la región inter-promotores;
- 25 **caracterizado porque** el primer y segundo promotores son promotores procarióticos o promotores eucarióticos, pero no promotores de bacteriófago.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho constructo de ADN comprende adicionalmente:
- f) un segundo terminador de la transcripción situado, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor, aguas abajo del segundo promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación,
- 30 donde el segundo terminador de la transcripción se conecta operablemente al segundo promotor.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde el segundo terminador de la transcripción está situado en la región inter-promotores.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 donde el segundo terminador de la transcripción está situado, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor, aguas abajo del segundo promotor, aguas abajo del al menos un sitio de clonación, y aguas abajo del extremo 5' del primer promotor.
- 35 19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor por no más de 2000 nucleótidos.
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor por no más de 100 nucleótidos.
- 40 21. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, donde el primer y el segundo promotores son idénticos.
22. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, donde el primer y el segundo promotores no son idénticos.
- 45 23. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, donde el sitio de clonación comprende al menos un sitio de restricción.

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde el sitio de clonación comprende al menos dos sitios de restricción flanqueando una secuencia de ADN de relleno.

25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, donde los al menos dos sitios de restricción son idénticos.

5 26. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, donde el sitio de clonación comprende adicionalmente las secuencias de recombinación attR1 y attR2.

27. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, donde el sitio de clonación comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos ccdB.

28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, donde la secuencia de nucleótidos ccdB comprende adicionalmente al menos un sitio de restricción único.

10 29. El uso de acuerdo con la reivindicación 28, donde el al menos un sitio de restricción único es un sitio de restricción con extremos romos.

30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde los sitios de restricción con extremos romos son sitios SrfI.

15 31. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 30, donde el constructo de ADN comprende adicionalmente:

g) un fragmento de ADN insertado en el al menos un sitio de clonación.

32. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 31, donde el constructo de ADN es un plásmido o un vector.

20 33. El uso de una cepa bacteriana que alberga un constructo de ADN para la producción de ARN de doble hebra para la inhibición de ARN, donde dicho constructo de ADN comprende:

a) un primer promotor y

b) un segundo promotor,

donde el primer y el segundo promotores están en orientación opuesta entre sí y definen:

25 c) una región inter-promotores situada aguas abajo del extremo 3' del primer promotor y aguas abajo del extremo 3' del segundo promotor;

y cuyo constructo de ADN comprende adicionalmente:

d) al menos un sitio de clonación situado en la región inter-promotores; y

30 e) un primer terminador de la transcripción, situado (como se observa desde el extremo 3' del primer promotor) aguas abajo del primer promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación, donde el primer terminador de la transcripción está conectado operablemente al primer promotor, y donde el primer terminador de la transcripción está situado en la región inter-promotores, con la condición de que el primer y el segundo promotores del constructo de ADN no sean promotores de bacteriófago.

34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, donde dicho constructo de ADN comprende adicionalmente:

35 f) un segundo terminador de la transcripción situado (como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor) aguas abajo del segundo promotor y aguas abajo del al menos un sitio de clonación,

donde el segundo terminador de la transcripción está conectado operablemente al segundo promotor.

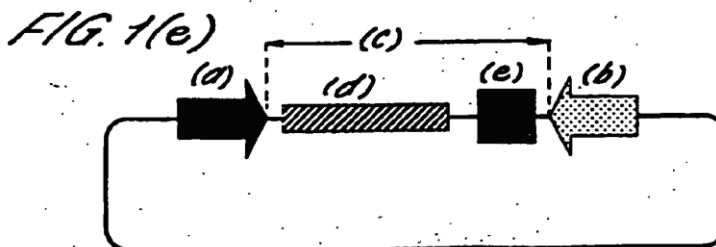
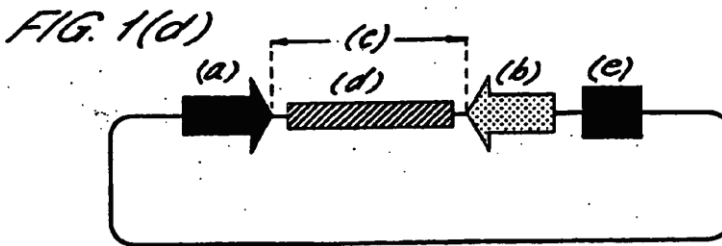
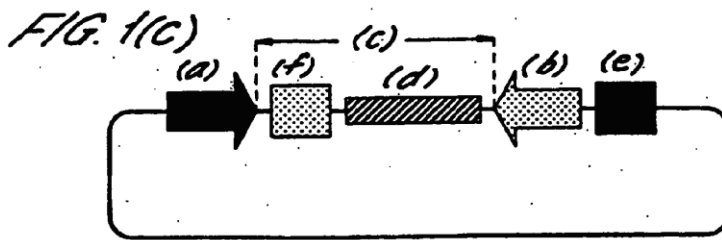
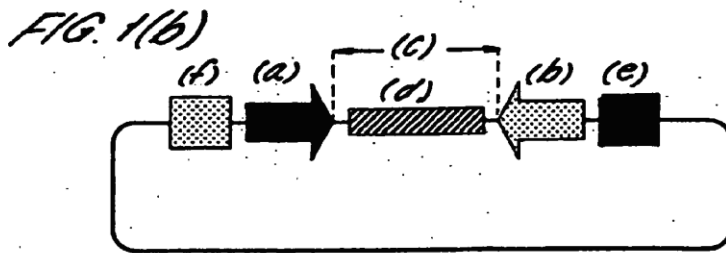
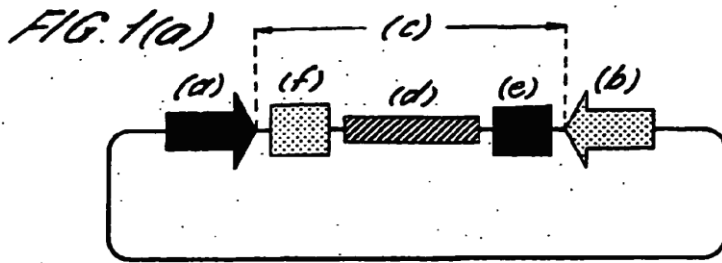
35. El uso de acuerdo con la reivindicación 34, donde el segundo terminador de la transcripción está situado en la región inter-promotores.

40 36. El uso de acuerdo con la reivindicación 34, donde el segundo terminador de la transcripción está situado, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor, aguas abajo del segundo promotor, aguas abajo del al menos un sitio de clonación, y aguas abajo del extremo 5' del primer promotor.

37. El uso de acuerdo con la reivindicación 36, donde el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor por no más de 2000 nucleótidos.

45 38. El uso de acuerdo con la reivindicación 36, donde el extremo 30 del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor por no más de 100 nucleótidos.

39. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38, donde el primer y el segundo promotores del constructo de ADN son idénticos.
40. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38, donde el primer y el segundo promotores del constructo de ADN no son idénticos.
- 5        41. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40, donde el primer y el segundo promotores del constructo de ADN son promotores procarióticos o promotores eucarióticos.
42. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 41, donde el constructo de ADN comprende adicionalmente un fragmento de ADN insertado en el al menos un sitio de clonación.
- 10      43. Una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 42, donde el constructo de ADN es un plásmido o vector.



(a): promotor 1

(b): promotor 2

(e): Terminador 1

(f): Terminador 2

FIG. 2(a)

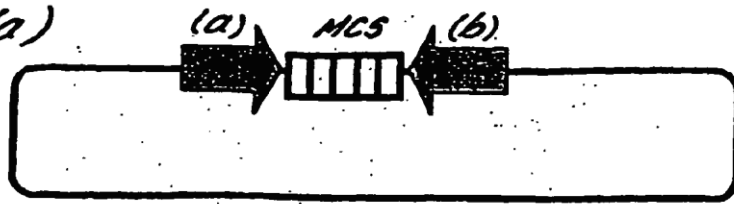


FIG. 2(b)

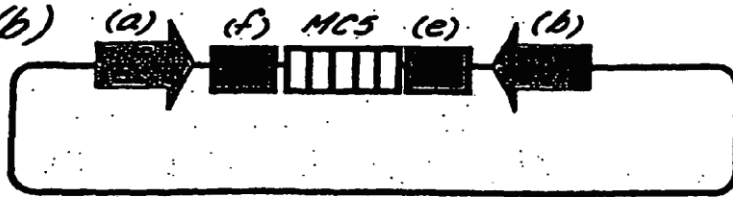


FIG. 2(c)

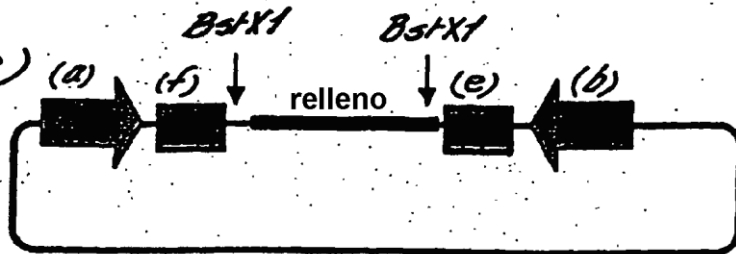


FIG. 2(d)

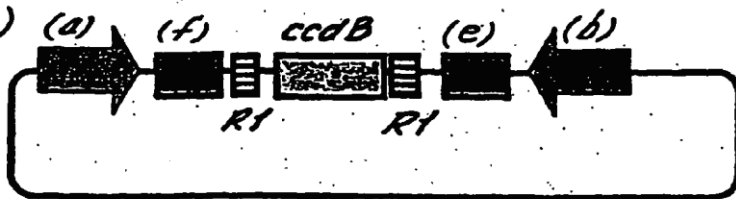


FIG. 2(e)

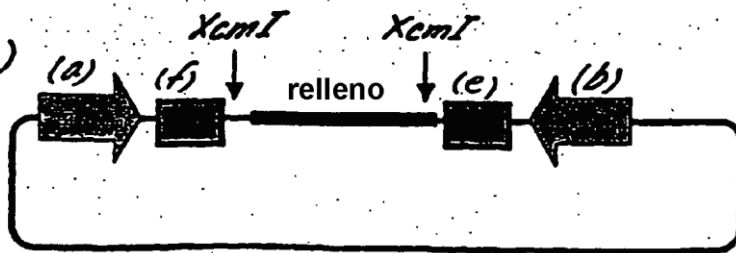
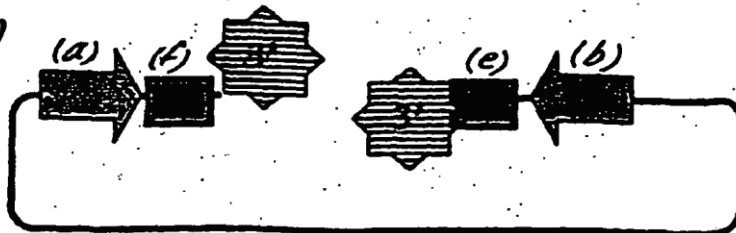


FIG. 2(f)





Construcción del vector ARNi con terminadores de T7

FIG. 3.

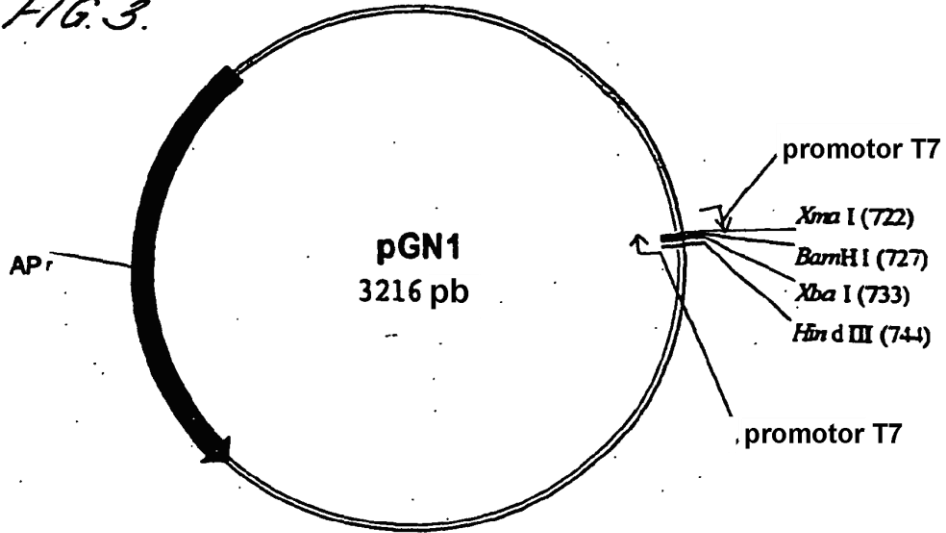


FIG. 4.

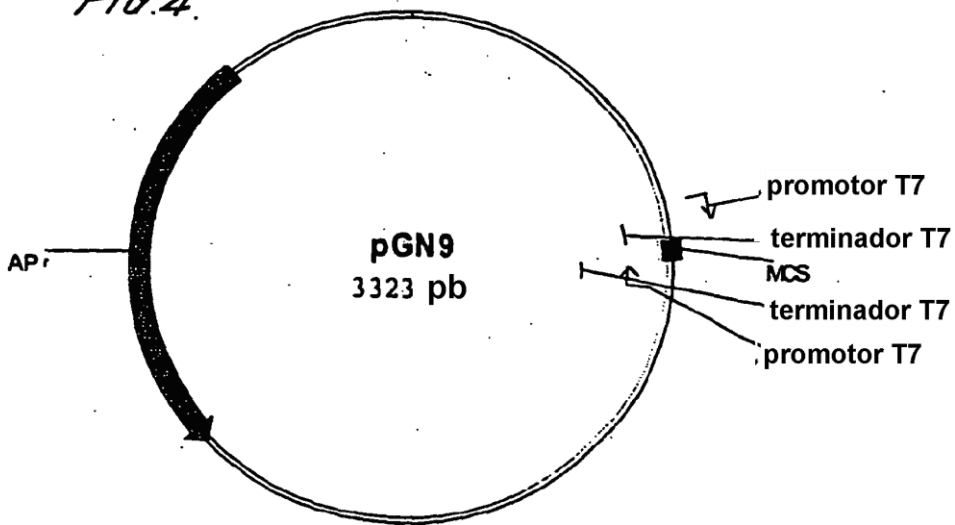


FIG. 5.

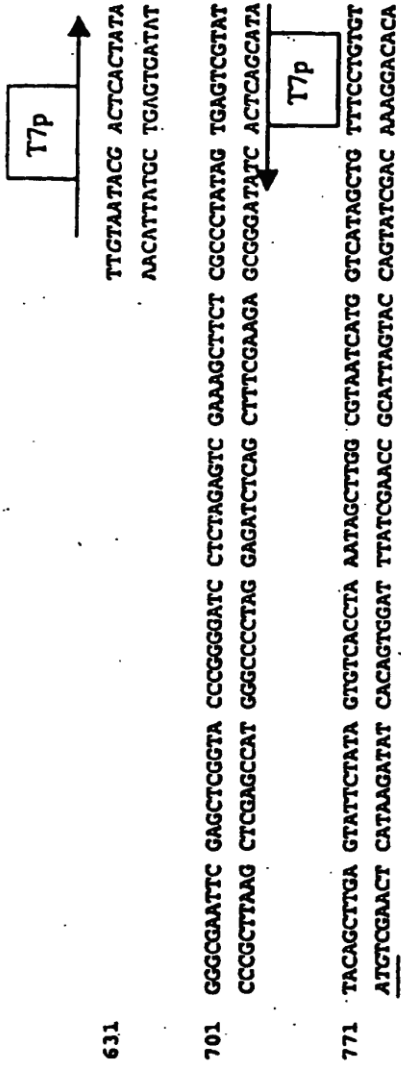


FIG. 6.

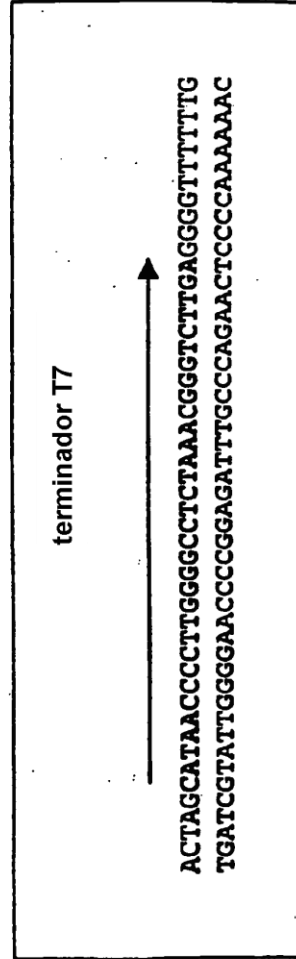


FIG. 7

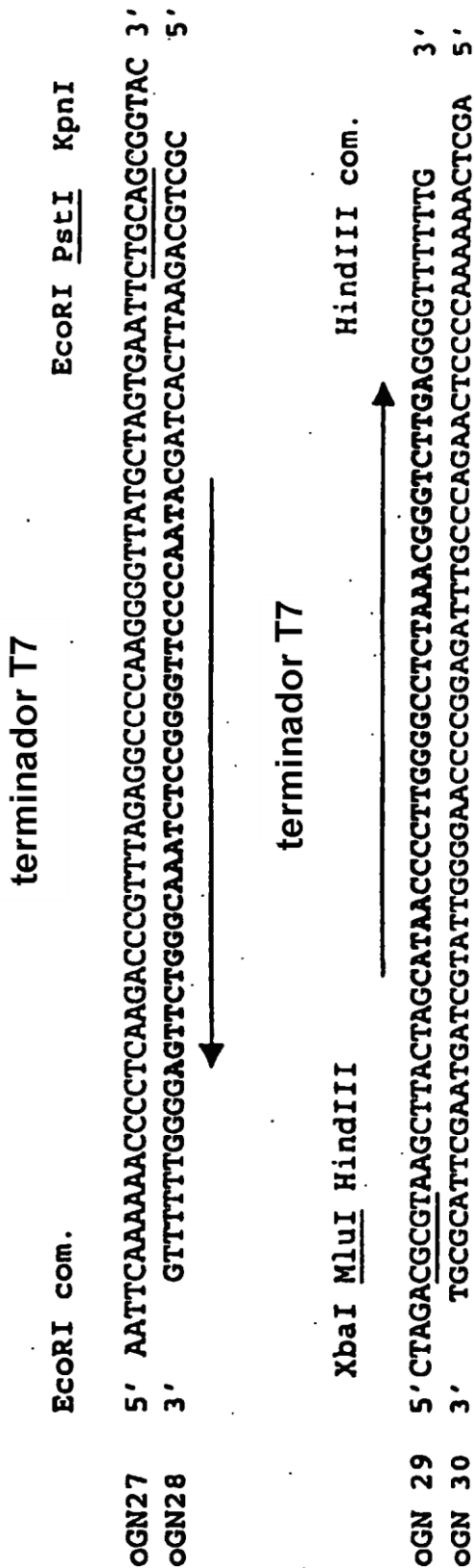
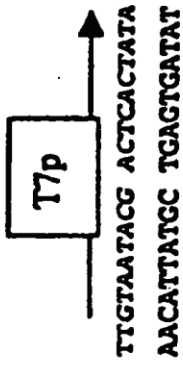
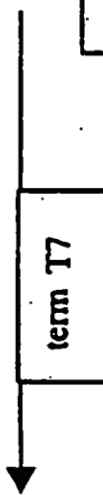


FIG. 8.

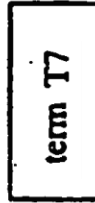


631

701 GGGCGAATTC AAAAAACCC TCAAGACCCG TTTAGAGGCC CCAAGGGGTT ATGCTAGTGA ATTCTGCAGG  
 CCCGCTTAAG TTTTTTGGGG AGTCTGGGC AANTCTCCGG GOTTCCCCAA TACGATCACT TAAGACGTCC



771 GTACCCGGG ATCCTCTAGA CGGTAAGCT TACTAGCATA ACCCCTTGG GCCTCTAAC GGTCTTGAG  
 CATGGGCCCC TAGGAGATCT GCGCATTCGA ATGATCGTAT TGGGGAACCC CGGAGATTG CCCAGNACTC



841 GGGTTTTTG AGCTTCTCG CCTATAGTA GTCGTATTAC AGCTTGAGTA TTCTATAGTG TCACCTAAT  
 CCCAAAAAC TCGAAGAGCG GGATATCACT CAGCATAATG TCGAACTCAT AAGATATCAC AGTGGATTTA

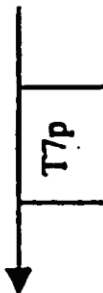


FIG. 9.

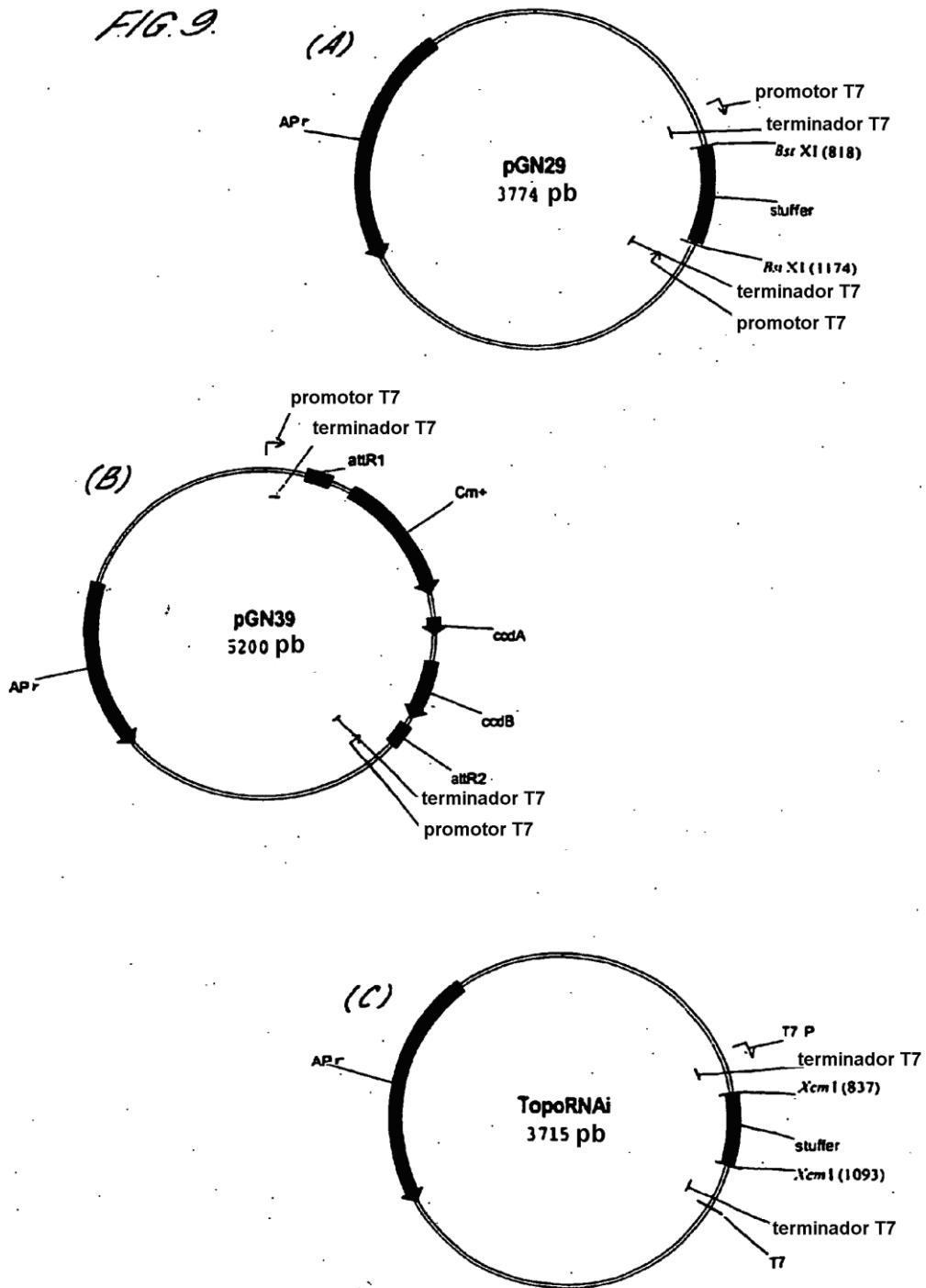


FIG. 10.

PGN9

```

1 gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca
61 ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatattg ttaaatacagc
121 tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc
181 gagatagggg tgagtggtgt tccagtttgg aacaagagtc cactatataa gaacgtggac
241 tccaaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaacctaca
301 cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcggaa ccctaaagg
361 agcccccgat ttagagcttg acggggaaa acggcgaaac tggcgagaaa ggaaggggaa
421 aaagcgaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtaacgct gcgctaacc
481 accacaccgg ccgctcttaa tgcgccgcta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc
541 gcaactgttg ggaagggcga tcggtgctgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa
601 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt
661 gtaaaacgac ggccagtga ttgtaatac actcactata gggcgaaattc aaaaaacccc
721 tcaagaccgg tttagaggcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccgggg
781 atcctctaga cgcgtaagct tactagcata accccttggg gcctctaaac gggtctgag
841 gggttttttg agcttctcgc cctatagtga gtcgtattac agcttgagta ttctatagt
901 tcacctaata agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc
961 gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta
1021 atgagtgagc taactcacat taattgctt gcgctcactg cccgcttcc agtccgggaa
1081 cctgtcgtgc cagctgcat aatgaatcgg ccaecgcgc gggagaggcg gtttgcgtat
1141 tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgccc tcggtcgttc ggctgcggcg
1201 agcgtatca gctcactcaa agcggtaat acggttatcc acagaaatcag gggataacgc
1261 aggaagaagc atgtgagcaa aagggcagca aaagccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt
1321 gctgctgctt ttcgataggg tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag
1381 tcagaggtgg cgaacccga caggactata aagataccag gcggttcccc ctggaagctc
1441 cctcgtgccc tctcctgttc cgaccctgcc gettaccgga tactgtccg cctttctccc
1501 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagtcc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg
1561 ctgtcgtccc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgctt
1621 atccgtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc
1681 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgtacag agtctctgaa
1741 gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggatctgccc ccttctccc
1801 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaacaa ccaccgctgg
1861 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga
1921 agatcctttg atctttteta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg
1981 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg
2041 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt
2101 aatcagtgag gcacctatct cagcgtatct tctatttctg tcatccatag ttgctgact
2161 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggctacca tctggcccca gtgctgcaat
2221 gataccgga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg
2281 aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg
2341 ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcccacg tttgtggcat
2401 tgctacagge atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc
2461 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt
2521 cggctectcc atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttactactca tggttatggc
2581 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactgggtg
2641 gtactcaacc aagtcattct gagaataccg cgcccggcga cccagttgct ctgcccggc
2701 gtcaatacgg gataatagtg tatgacatag cagaacttta aaagtgtca tcaatggaaa
2761 acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga
2821 acccaactgc gcacccaact gatcttcagc atctttact ttcaccagcg tttctgggtg
2881 agcaaaaa ca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaatggtg
2941 aatactcata ctcttctctt tcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt atgtctcat
3001 gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt
3061 tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taactataa
3121 aataggcgt atcacgagge cctttcgtct cgccggtttc ggtgatgacg ctgaaaacct
3181 ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag
3241 acaagcccgt cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cgggctggc ttaactatgc
3301 ggcacagag cacagttgtac tga

```

FIG. 11.

PGN29

```

1  gagtgcacca  tatgcggtgt  gaataaccgc  acagatgcgt  aaggagaaaa  taccgcatca
61  ggcgaaatgg  taaacgttaa  tattttgtta  aaattcgcgt  taaatatttg  ttaaatacagc
121  tcatttttta  accaataggc  cgaatcggc  aaaatccctt  ataatcaaa  agaatagacc
181  gagataggg  tgagtgtgt  cccagttgg  aacaagatc  cactatata  gaacgtggac
241  tccaacgtca  aaggcgaaa  aaccgtctat  cagggcgatg  gccactacg  tgaaccatca
301  cccaaataca  gtttttgcg  gtcgaggtgc  cgtaaagctc  taaatcggaa  cctaaaggg
361  agccccgat  ttagagcttg  acggggaag  cggcgcaacg  tggcgagaaa  ggaagggaa
421  aaagcgaag  gagcggcgc  tagggcgctg  gcaagtgtag  cggtcacgct  gcgcgtaacc
481  accacaccgg  ccgcgcttaa  tgcgccccta  cagggcgctg  ccatcgcca  ttcaggctgc
541  gcaactgttg  ggaagggcga  tcggtgctgg  cctcttcgct  attacgccag  ctggcgaaag
601  ggggatgtgc  tgcaaggcga  ttaagttggg  taacgccagg  gttttcccag  tcacgacgtt
661  gtaaaacgac  ggccagtga  ttgtaatcag  actcactata  gggcgaattc  aaaaaacccc
721  tcaagaccgg  tttagaggcc  ccaaggggtt  atgctagtga  attctgcagg  gtacccgggg
781  atcctctaga  gatccctcga  cctcgagatc  cattgtgctg  gcgcggttc  tttatcactg
841  ataagttggt  ggacatatta  tgtttatcag  tgataaagt  tcaagcatga  caaagttgca
901  gccgaataca  ggatccgtg  ccggccctgg  actgttgaac  gaggtcggcg  ttagcggctt
961  gacgacacgc  aaactggcgg  aacggttggg  ggtgcagcag  ccggcgctt  actggcactt
1021  caggaacaag  cgggcgctgc  tcgacgcact  ggccgaagcc  atgctggcgg  agaatacatc
1081  gcttcgggtg  cgagagccga  cgacgactgg  cgctcatttc  tgatcgggaa  tcccgcagct
1141  tcaggcaggg  gctgctcgg  taccgcccag  acaatggatc  tcgagggatc  ttcatacctt
1201  accagtctg  cgctgcagg  tcgcgccgc  gactcttag  acgcgtaagc  ttagcagcat
1261  aacccttgg  ggctctaaa  cgggtcttga  ggggttttt  gagcttctcg  ccctatagtg
1321  agtcttatta  cagcttgagt  attctatagt  gtcacctaaa  tagcttggcg  taaatcatggt
1381  catagctggt  tcctgtgtga  aattgttacc  cgctcacaat  tccacacaac  atacgagccg
1441  gaagcataaa  gtgtaaacgc  tgggtgctc  aatgagtgag  ctaactcaca  ttaatgtcgt
1501  tgcgctcact  gcccgcttcc  cagtcgggaa  acctgtcgtg  ccagctgcat  taatgaatcg
1561  gcccaacgcg  ggggagagcc  ggtttgcgta  ttggcgctc  ttccgcttc  tcgctcactg
1621  actcgcctgc  ctcgctcgt  cggctcggc  gagcggatc  agctcactca  aaggcggtaa
1681  taagggtatc  cacagatca  ggggataacg  caggaagaa  catgtgagca  aaagccagc
1741  aaaagggcag  gaaccgtaaa  aaggcccgct  tgctggcgtt  ttccgatagg  ctccgcccc
1801  ctgacgagca  tcacaaaaat  cgacgctcaa  gtcagaggtg  gcgaaacccg  acaggactat
1861  aaagatacca  ggcgtttccc  cctggaaact  cctcctgctg  ctctcctggt  cccagcctgc
1921  cgcttaccgg  atacctgtcc  gcccttctcc  ctccgggaa  cgtggcgctt  tctcatagct
1981  cacgctgtag  gtatctcagt  tcggtgtagg  tcgctcgtc  caagctggg  tgtgtgacg
2041  aacccccgct  tcagcccagc  cgctgcgctc  tatccggtaa  ctatcgtctt  gaggccaacc
2101  cggtaagaca  cgacttatcg  ccactggcag  cagccactgg  taacaggtt  agcagagcga
2161  ggtatgtagg  cgggtctaca  ggttcttga  agtggtggcc  taactacggc  tacactagaa
2221  ggacagtatt  tggtatctgc  gctctgctga  agccagttac  ctccgaaaa  agagtggta
2281  gctcttgatc  cggcaaaaa  accaccgctg  gtacggtgg  ttttttgtt  tgcaagcagc
2341  agattacggg  cagaaaaaaa  ggatctcaag  aagatccttt  gatctttct  acggggtctg
2401  acgctcagtg  gaacgaaaa  tcacgttaag  ggattttggt  catgagatta  tcaaaaaagg
2461  tcttcacct  gatcctttta  aattaaaaat  gaagttttaa  atcaatctaa  agtatatatg
2521  agtaaacctg  gtctgacagt  taccaatgct  taatcagtg  ggcacctatc  tcagcgatct
2581  gtctatttcc  ttcatccata  gttgctgac  tccccgctg  gtatataact  accgatcggg
2641  agggcttacc  atctggcccc  agtgctgcaa  tgataccgg  agaccacgc  tcaccggctc
2701  cagatttacc  agcaataaac  cagccagccg  gaagggccga  gcgcagaagt  ggtcctgcaa
2761  ctttatcccg  ctccatccag  tctattaatt  gttgcccgg  agctagagta  agtagtccg
2821  cagttaatag  tttgcccacc  gttgtggca  ttgctacagg  catcgtggtg  tcacgctcgt
2881  cgtttggtat  ggcttcattc  agctccggtt  cccaacgatc  aaggcgagtt  acatgatccc
2941  ccatgttgg  caaaaaagcg  gttagctcct  tcggctcctc  gatcgtgtgc  agaagtaagt
3001  tggccgagct  gttatcactc  atggttatgg  cagcactgca  taattctct  actgtcatgc
3061  catccgtaag  atgcttttct  gtgactggtg  agtactcaac  caagtcattc  tgagaatacc
3121  gcgcccggcg  accgagttgc  tcttcccgg  cgtcaatcag  ggataatagt  gtatgacata
3181  gcagaacttt  aaaagtgtc  atcatggaa  aacgttcttc  gggcgcaaaa  ctctcaagga
3241  tcttaccgct  gttgagatcc  agttcagatg  aaccactcg  tgcaaccaac  tgcacttcag
3301  catcttttac  tttcaccagc  gtttctgggt  gagcaaaaac  aggaaggcaa  aatgccgcaa
3361  aaaagggaa  aagggcgaca  cggaaatgtt  gaataactca  actcttctt  tttcaatatt
3421  attgaagcat  ttatcaggtt  tattgtctca  tgagcggata  catatttgaa  tgtatttaga
3481  aaaaataaca  aataggggtt  ccgcccacat  ttccccgaaa  agtgccacct  gacgtctaag
3541  aaaccattat  tatcatgaca  ttaacctata  aaaaagggcg  tatcacagg  ccttctcgtc
3601  tcgcccgttt  cgggtgatgc  ggtgaaaacc  tctgacacat  gcagctccc  gagcgggtca
3661  cagcttctc  gtaagcggat  gccgggagca  gacaagccg  tcagggcgg  tcagcgggtg
3721  ttgcccgggtg  tcggggctgg  cttactatg  cggcatcaga  gcagatttga  ctga

```

FIG. 12.

p6M39

TAATACGACT CACTATAGGG CGAATTCAAA AAACCCCTCA AGACCCGTTT  
 AGAGGCCCCA AGGGGTTATG CTAGTGAATT CTGCAGCGGT ACCCGGGGAT  
 CCTCTAGAGA TCCCTCGACC TCGAGATCCA TTGTGCTGGA AAGATCACAA  
 GTTTGTACAA AAAAGCTGAA CGAGAAACGT AAAATGATAT AAATATCAAT  
 ATATTA AATT AGATTTTGCA TAAAAACAG ACTACATAAT ACTGTAAAAC  
 ACAACATATC CAGTCACTAT GCGGCCCGCA TTAGGCACCC CAGGCTTTAC  
 ACTTTATGCT TCCGGCTCGT ATAATGTGTG GATTTTGAGT TAGGATCCGG  
 CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA TGGAGAAAAA AATCACTGGA  
 TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC  
 ATTTTCAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA  
 TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG  
 GCCTTTATTC ACATTCCTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTCGG  
 TATGGCAATG AAAGACGGTG AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTCACCCTT  
 GTTACACCGT TTCCATGAG CAAACTGAAA CGTTTTCATC GCTCTGGAGT  
 GAATACCACG ACGATTTCCG GCAGTTTCTA CACATATATT CGCAAGATGT  
 GCGGTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA  
 ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTTGAT  
 TFAAACGTGG CCAATATGGA CAACTTCTC GCCCCCGTTT TCACCATGGG  
 CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG GCGATTGAGG  
 TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA  
 TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGCGTAAA GATCTGGATC  
 CGGCTTACTA AAAGCCAGAT AACAGTATGC GTATTTGCGC GCTGATTTTT  
 GCGGTATAAG AATATATACT GATATGTATA CCCGAAGTAT GTCAAAAAGA  
 GGTGTGCTAT GAAGCAGCGT ATTACAGTGA CAGTTGACAG CGACAGCTAT  
 CAGTTGCTCA AGGCATATAT GATGTCAATA TCTCCGGTCT GGTAAGCACA  
 ACCATGCAGA ATGAAGCCCG TCGTCTGCGT GCCGAACGCT GGAAAGCGGA  
 AAATCAGGAA GGGATGGCTG AGGTCGCCCG GTTTATTGAA ATGAACGGCT  
 CTTTTGCTGA CGAGAACAGG GACTGGTGAA ATGCAGTTTA AGGTTTACAC  
 CTATAAAAGA GAGAGCCGTT ATCGTCTGTT TGTGGATGTA CAGAGTGATA  
 TTATTGACAC GCCCGGGCGA CGGATGGTGA TCCCCCTGGC CAGTGCACGT  
 CTGCTGTGAG ATAAAGTCTC CCGTGAACCT TACCCGGTGG TGCATATCGG  
 GGATGAAAGC TGGCGCATGA TGACCACCGA TATGGCCAGT GTGCCGGTCT  
 CCGTTATCGG GGAAGAAGTG GCTGATCTCA GCCACCGCGA AAATGACATC  
 AAAAACGCCA TTAACCTGAT GTTCTGGGGA ATATAAATGT CAGGCTCCCT  
 TATACACAGC CAGTCTGCAG GTCGACCATA GTGACTGGAT ATGTTGTGTT  
 TTACAGTATT ATGTAGTCTG TTTTTTATGC AAAATCTAAT TTAATATATT  
 GATATTTATA TCATTTTACG TTTCTCGTTC AGCTTTCTTG TACAAAGTGG  
 TGATCTTTCC AGCACAAATGG ATCTCGAGGG ATCTTCCATA CCTACCAGTT  
 CTGCGCCTGC AGGTCGCGGC CGCGACTCTA GACGCGTAAG CTTACTAGCA  
 TAACCCCTTG GGGCCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT TGAGCTTCTC  
 GCCCTATAGT GAGTCGTATT ACAGCTTGAG TATTCTATAG TGTCACCTAA  
 ATAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT  
 CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGAC



*FIG. 12* (continuación 1)

CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC  
 TGCCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC  
 GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC  
 CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT  
 CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC  
 GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA  
 AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCGATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC  
 ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA  
 TAAAGATAAC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT  
 TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA  
 GCGTGCGCGT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG  
 GTCGTTGCGT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCCG  
 CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC  
 ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG  
 AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG  
 CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA  
 CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT  
 GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA  
 AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT  
 GGAACGAAAA CTCACGTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG  
 ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA  
 AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG  
 AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGTTGCCTGA  
 CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TAGGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC  
 CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT  
 CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCTGCA  
 ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT  
 AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGGC ATTGCTACAG  
 GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT  
 TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC  
 GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGAG  
 TGTTATCACT CATGGTFATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCTATG  
 CCATCCGTAA GATGCTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT  
 CTGAGAATAC CGCGCCCGG GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC  
 GGGATAATAG TGTATGACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTTGA  
 AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC  
 CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA  
 CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA  
 AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCTT  
 TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT  
 ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA  
 TTTCCCGGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC  
 ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTCGCGGTT  
 TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC  
 ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC  
 GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG

*FIG. 12* (continuación 2)

AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA  
TTCGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCCA AATTGTAAAC GTTAATATTT  
TGTTAAAATT CGCGTTAAAT ATTTGTTAAA TCAGCTCATT TTTTAACCAA  
TAGGCCGAAA TCGGCAAAAT CCCTTATAAA TCAAAAGAAT AGACCGAGAT  
AGGGTTGAGT GTTGTTCAG TTTGGAACAA GAGTCCACTA TTAAAGAACG  
TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA  
CTACGTGAAC CATCACCCAA ATCAAGTTTT TGCGGTCGA GGTGCCGTAA  
AGCTCTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG  
GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG  
GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC  
ACCCGCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG CGCGTCCATT CGCCATTCAG  
GCTGCGCAAC TGTTGGGAAG GGCGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC  
GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAACG  
CCAGGGTTTT CCCAGTCAG ACGTTGTAAA ACGACGGCCA GTGAATTG

FIG. 13.

TopoRNA1

```

1  gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca
61  ggcgaaattg taaacggtta tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc
121 tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc
181 gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac
241 tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg tgaaccatca
301 cccaaatcaa gtttttgcg gtccgaggtgc cgtaaaagctc taaatcggaa ccctaaaggg
361 agccccgat ttagagcttg acgggaaaag cggcgcaacg tggcgagaaa ggaagggaaag
421 aaagcgaaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct cgcgtaacc
481 accacaccgg ccgcgcttaa tgcgccccta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc
541 gcaactggtg ggaagggcga tccgttccgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag
601 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taaccgcagg gttttcccag tcacgacgtt
661 gtaaaacgac ggccagtga tttgtaatac actcactata gggcgaattc aaaaaacccc
721 tcaagaccgg tttagaggcc ccaaggggtt atgctaagtg attctgcagg gtaccggggg
781 atcctctaga gatccctcga cctcgagatc cattgtgggt gaattctacc aagcgtagca
841 tgggcagccg aatacagtga tccgtgcggg ccctggactg ttgaaacgagg tcggcgtaga
901 cggctgcagc acacgcaaac tggcggaacg gttgggggtg cagcagccgg cgcttactg
961 gcacttcagg aacaagcggg cgtcgtcga cgcactggcc gaagccatgc tggcgagaa
1021 tcatacgcct cgggtcccag agccgacgac gactggcgct catctctgat cgggaaatccc
1081 gcagccatgc tagccttggg agaattccac cacaatggat ctcgagggat ctccataacc
1141 taccagttct gcgcctgcag gtccgcccgg cgaactctta gacgcgtaag cttactagca
1201 taaccccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggtttt tgagcttctc gccctatagt
1261 gagtcggtat acagcttgag tattctatag tgtcacctaa atagcttggc gtaactatgg
1321 tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacagacc
1381 ggaagcataa agtgtaaaag ctgggggtgc taatgagtg gctaactcac ataatgtgc
1441 ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgctgt gccagctgca ttaatgaatc
1501 gggcaacgag cggggagagg cggtttgcgt attggcgct cttccgcttc ctgcctcact
1561 gactcgcctg ctcgggtcgt tccgctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaagcggtga
1621 atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaag acatgtgagc aaaagggcag
1681 caaaaggcca ggaaccgtaa aaagggcgcg ttgctggcgt tttctgatag tctccgccc
1741 cctgacgagc atcacaajaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacagagca
1801 taaagatacc agcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg
1861 ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa cgggtggcgt ttctcatagc
1921 tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgag gtcttctgct ccaagctggg ctggtgacac
1981 gaaacccccg ttacagccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagccaac
2041 ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggtg tagcagagcg
2101 aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgtggc ctaactacgg ctacactaga
2161 aggacagtat ttggtatctg cgtctcgtcg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt
2221 agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag
2281 cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacggggtct
2341 gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgtaa gggatttgg tcatgagatt atcaaaaagg
2401 atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagttta aatcaatcta aagtataat
2461 gagtaaaact ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc
2521 tgtctatttc gttcatccat agttgectga ctcccgtcg ttagataatc tacgatcgg
2581 gagggttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct
2641 ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca
2701 actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgcggg aagctagagt aagtagtctg
2761 ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttggc atgtctacag gcacgtgggt gtcacgctcg
2821 tccgttggtg taagcttacc cagctccggt tcccaacgat caagcgaggt tacatgatcc
2881 ccgatgtgtg gcaaaaaaag ggttagctcc ttcggctcctc cgatcgttgt cagaagtaag
2941 ttggccgagc tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg
3001 ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatc
3061 cgcgcccggc gaccgagtgg ctcttgcggc gcgtcaatac gggataatg tgtatgacat
3121 agcagaactt taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg
3181 atcttaccgc ttttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaacca ctgatcttca
3241 gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca
3301 aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactttcct tttcaatat
3361 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag
3421 aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttcccggaa aagtgccacc tgacgtctaa
3481 gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gcccttctg
3541 ctgcgcgctt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc
3601 acagcttgc tgaagcggg tgcggggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt
3661 gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actga

```

*DGN49A* *FIG. 14.*

TGTAATACGA CTCACTATAG GCGAATTCA AAAAACCCT CAAGACCCGT  
 TTAGAGGCC CAAGGGTTA TGCTAGTGAA TTCTGCAGCG GTACCCGGG  
 ATCCTCTAGA GATCCCTCGA CCTCGAGATC CATTGTGCTG GAAAGGATCT  
 GGATCCGGCT TACTAAAAGC CAGATAACAG TATGCGTATT TCGCGCTGA  
 TTTTTCGGT ATAAGAATAT ATACTGATAT GTATACCCGA AGTATGTCAA  
 AAAGAGGTGT GCTATGAAGC AGCGTATTAC AGTGACAGTT GACAGCGACA  
 GCTATCAGTT GCTCAAGGCA TATATGATGT CAATATCTCC GGTCTGGTAA  
 GCACAACCAT GCAGAATGAA GCCCGTCGTC TCGGTGCCGA ACGCTGGAAA  
 GCGGAAAATC AGGAAGGGAT GGCTGAGGTC GCCCGGTTTA TTGAAATGAA  
 CGGCTCTTTT GCTGACGAGA ACAGGGACTG GTGAAATGCA GTTTAAGGTT  
 TACACCTATA AAAGAGAGAG CCGTTATCGT CIGTTTGTGG ATGTACAGAG  
 TGATATTATT GACACGCCCG GCGACGGAT GGTGATCCCC CTGGCCAGTG  
 CACGTCTCTT AAGCGATAAA GTCTCCCGTG AACTTTACCC GGTGGTGCAT  
 ATCGGGGATG AAAGCTGGCG CATGATGACC ACCGATATGG CCAGTGTGCC  
 GGTCTCCGTT ATCGGGGAAG AAGTGGCTGA TCTCAGCCAC CGCGAAAATG  
 ACATCAAAA CGCCATTAAC CTGATGTTCT GGGGAATATA AATGTCAGGC  
 TCCCTTATAC ACAGCCTTTC CAGCACAATG GATCTCGAGG GATCTTCCAT  
 ACCTACCAGT TCTGCGCCTG CAGGTCCGG CCGCGACTCT AGACGCGTAA  
 GCTTACTAGC ATAACCCCTT GGGCCTCTA AACGGGCTT GAGGGGTTTT  
 TTGAGCTTCT CGCCCTATAG TGAGTCGTAT TACAGCTTGA GTATTCTATA  
 GTGTCACCTA AATAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT  
 GAAATGTGTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA  
 AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATGC  
 GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGG AAACCTGTCC TGCCAGCTGC  
 ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTGCG TATTGGGCGC  
 TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG CGCTCGCTG TCCGGCTGCG  
 GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT  
 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGSCCA GCAAAGGCC  
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCGATA GGCTCCGCC  
 CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC  
 CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGSAAG CTCCCTCGTG  
 CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTCT  
 CCCTTCGGA AGCGTGGCG TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA  
 GTTCCGTGTA GGTGTTCCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC  
 GTTCAGCCCG ACCGCTGCG CTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA  
 CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA  
 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG  
 CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT  
 GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC  
 AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG  
 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC  
 TGACGCTCAG TGAACGAAA ACTCACGTTA AGGATTTTG GTCATGAGAT  
 TATCAAAAAG GATCTTACC TAGATCCTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT

*FIG. 14* (continuación)

AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG  
CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA  
TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA  
CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC  
TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA  
GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG  
GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGG  
CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT  
TCAGCTCCGG TCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG  
TGCAAAAAG CGTTAGCTC CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAAGTAA  
GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC  
TACTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA  
ACCAAGTCAT TCTGAGAATA CCGCGCCCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC  
GGCGTCAATA CGGGATAATA GTGTATGACA TAGCAGAACT TAAAAGTGC  
TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG  
CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC  
AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC  
AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC  
ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT  
CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG  
TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT  
ATTATCATGA CATTAACTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG  
TCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC  
CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC  
CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCT GGCTTAACTA  
TGCGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CCGTGTGAAA  
TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC GCATCAGGCG AAATTGTAAA  
CGTTAATATT TTGTTAAAAT TCGCGTTAAA TATTGTGTTAA ATCAGCTCAT  
TTTTTAACCA ATAGGCCGAA ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAGAA  
TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTTGTTCCA GTTTGGAACA AGAGTCCACT  
ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAAACC GTCTATCAGG  
GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCA AATCAAGTTT TTGCGGTTCG  
AGGTGCCGTA AAGCTCTAAA TCGGAACCTT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG  
AGCTTGACGG GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGGAAAGAAAG  
CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC  
GTAACCACCA CACCCGCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG GCGCGTCCAT  
TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG TCGGGCCCTC  
TTCGCTATTA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGTGCTGCA AGGCGATTAA  
GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC  
AGTGAAT

*pgN59A* *FIG. 15.*

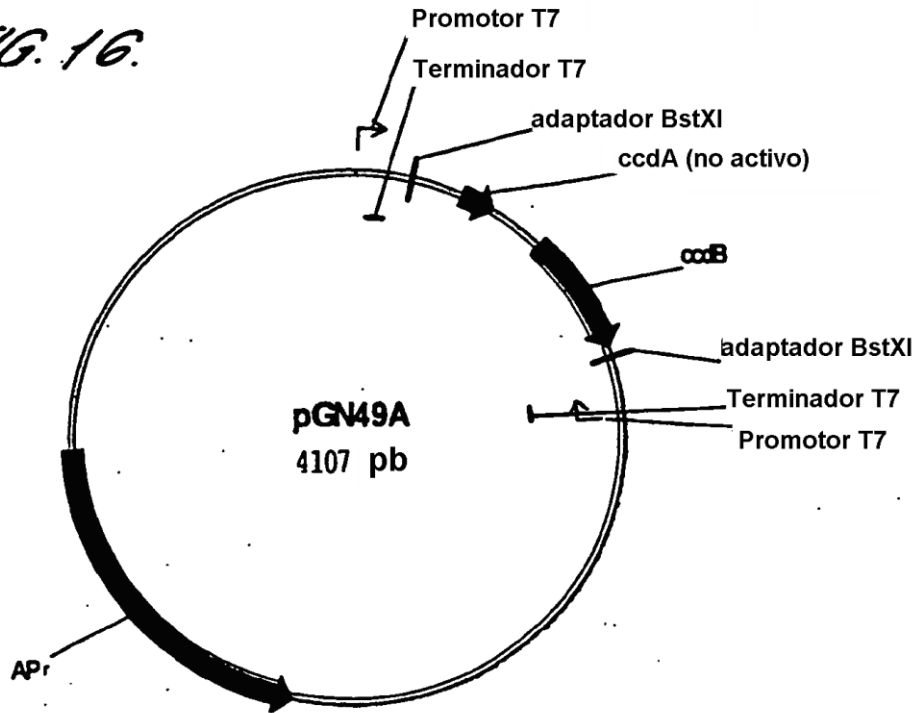
GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA  
 TACCGCATCA GCGGAAATTG TAAACGTTAA TATTTTGTTA AAATTCGCGT  
 TAAATATTTG TTAATCAGC TCATTTTTTA ACCAATAGGC CGAAATCGGC  
 AAAATCCCTT ATAAATCAA AGAATAGACC GAGATAGGGT TGAGTGTGTG  
 TCCAGTTTGG AACAAGAGTC CACTATTAAG GAACGTGGAC TCCAACGTCA  
 AAGGGCGAAA AACCGTCTAT CAGGGCGATG GCCCACTACG TGAACCATCA  
 CCCAAATCAA GTTTTTTGCG GTCGAGGTGC CGTAAAGCTC TAAATCGGAA  
 CCCTAAAGGG AGCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAAAG CCGGCGAACG  
 TGGCGAGAAA GGAAGGGAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC TAGGGCGCTG  
 GCAAGTGTAG CGGTCACGCT GCGCGTAACC ACCACACCCG CCGCGCTTAA  
 TGGCCCGCTA CAGGGCGCGT CCATTGCGCA TTCAGGCTGC GCAACTGTGTG  
 GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTTCGCT ATTACGCCAG CTGGCGAAAAG  
 GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCCAG  
 TCACGACGTT GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTGTAATACG ACTCACTATA  
 GGGCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGATC CTCTAGAGAT CCCTCGACCT  
 CGAGATCCAT TGTGCTGGAA AGGATCTGGA TCCGGCTTAC TAAAGGCCAG  
 ATAACAGTAT GCGTATTGCG GCGCTGATT TTGCGGTATA AGAATATATA  
 CTGATATGTA TACCCGAAGT ATGTCAAAAA GAGGTGTGCT ATGAAGCAGC  
 GTATTACAGT GACAGTTGAC AGCGACAGCT ATCAGTTGCT CAAGGCATAT  
 ATGATGTCAA TATCTCCGGT CTGGTAAGCA CAACCATGCA GAATGAAGCC  
 CGTCGTCTGC GTGCCGAACG CTGGAAAGCG GAAAATCAGG AAGGGATGGC  
 TGAGGTCGCC CGGTTTATTG AAATGAACGG CTCTTTTGCT GACGAGAACA  
 GGGACTGGTG AAATGCAGTT TAAGTTTAC ACCTATAAAA GAGAGAGCCG  
 TTATCGTCTG TTTGTGGATG TACAGAGTGA TATTATTGAC ACGCCCGGGC  
 GACGGATGGT GATCCCCCTG GCCAGTGCAC GTCTCTTAAG CGATAAAGTC  
 TCCCGTGAAC TTTACCCGGT GGTGCATATC GGGGATGAAA GCTGGCGCAT  
 GATGACCACC GATATGGCCA GTGTGCCGGT CTCCGTTATC GGGGAAGAAG  
 TGCTGATCT CAGCCACCGC GAAAATGACA TCAAAAACGC CATTAACTG  
 ATGTTCTGGG GAATATAAAT GTCAGGCTCC CTTATACACA GCCTTTCCAG  
 CACAATGGAT CTCGAGGGAT CTTCATACC TACCAGTTCT GCGCCTGCAG  
 GTGCGGCGCG GACTCTCTA GAGTCGAAAG CTTCTCGCCC TATAGTGAGT  
 CGTATTACAG CTTGAGTATT CTATAGTGC ACCTAAATAG CTTGGCGTAA  
 TCATGGTCAT AGCTGTTCC TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC  
 ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGT TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT  
 GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG  
 TCGGGAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG  
 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTACTGACT  
 CGCTGCGCTC GGTGCTTCGG CTGCGGCGAG CCGTATCAGC TCACTCAAAG  
 GCGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT  
 GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCTTGC  
 TGGCGTTTTT CGATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAATCGA  
 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC  
 GTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGGGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC  
 TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGCTTTCT

*FIG. 15* (continuación)

CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA  
 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT  
 CCGGTAAC TA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA  
 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCCG  
 TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA  
 CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA  
 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT  
 TTTTGTTC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG  
 ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAACTCA  
 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT  
 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT  
 AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA  
 GCGATCTGTC TATTCGTTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA  
 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA  
 TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCAG  
 CCAGCCGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC  
 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG  
 TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGGCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA  
 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTACAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG  
 GCGAGTTACA TGATCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG  
 GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG  
 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG  
 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATACCGCG  
 CCCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCC GGCGT CAATACGGGA TAATAGTGTA  
 TGACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG  
 GCGAAAAC TC AAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC  
 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT  
 TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG  
 GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT  
 GAAGCATT TA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT  
 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT  
 GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA  
 ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT  
 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA  
 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG  
 GCGGGTGTG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG

A

*FIG. 16.*



*FIG. 17.*

