

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 574**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2003 E 03747661 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 1504126**

54 Título: **Un método para regular la expresión génica**

30 Prioridad:

03.05.2002 US 377224 P

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

06.06.2014

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)
OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, P.O.
BOX 90083
DURHAM, NC 27708-0083, US**

72 Inventor/es:

**CULLEN, B.R y
ZENG, YANG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 465 574 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

Un método para regular la expresión génica

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere, en general, a la expresión génica y, en particular, a un método para inhibir la expresión de un gen diana, a construcciones adecuadas para su uso en dicho método y a plantas y animales no humanos que comprenden dichas construcciones. La descripción también se refiere a composiciones y kits que comprenden construcciones que pueden usarse para inhibir la expresión génica.

Antecedentes

Se ha demostrado recientemente que las células animales expresan una nueva clase de ARN no codificantes monocatenarios, de ~22 nucleótidos (nt), llamados micro ARN (miARN) (Lagos-Quintana et al, Science 294:853-858 (2001); Lau et al, Science 294:858-862 (2001); Lee y Ambros, Science 294:862-864 (2001)). Los miARN parecen derivar de precursores de ~70 nt que forman una estructura de tronco-bucle de ARN predicha. Sigue sin estar claro si estas moléculas precursoras de miARN se transcriben a partir de promotores autónomos o en su lugar están contenidos dentro de ARN más largos (Ambros, Cell 107:823-826 (2001); Lau et al, Science 294:858-862 (2001)).

Aunque se expresan más de 100 miARN distintos en organismos tan diversos como nematodos (Lau et al, Science 294:858-862 (2001), Lee et al, Science 294:862-864 (2001)), moscas de la fruta (Lagos-Quintana et al, Science 294:858-858 (2002), y seres humanos (Mourelatos et al, Genes Dev. 16:720-728 (2002)), así como en plantas (Tang et al, Genes Dev. 17:49-63 (2003), Reinhart et al, Genes Dev. 16:1616-1626 (2002)), su función sigue siendo en gran medida incierta. Sin embargo, la actividad biológica de dos miARN, let-7 y lin-4 de *C. elegans*, están bien establecidas (Lee et al, Cell 75:843-854 (1993); Reinhart et al, Nature 403: 901-906 (2000)). Tanto lin-4 como let-7 se expresan durante fases larvianas específicas y ambos miARN interaccionan con dianas de ARN parcialmente complementarias, localizadas en la región no traducida 3' (3' UTR) de ARNm específicos, para bloquear de forma selectiva su traducción. Esta inhibición es importante para una regulación apropiada del desarrollo en *C. elegans* (Wightman et al, Cell 75:855-862 (1993); Slack et al, Mol. Cell 5:659-669 (2000)).

Varios miARN, incluyendo let-7, están evolutivamente conservados de *C. elegans* a seres humanos, como varias dianas de let-7 (Ambros, Cell 107:823-826 (2001)). Esta conservación implica que let-7, así como otros miARN, también reprimen la expresión de especies específicas de ARNm en células de mamífero. Esta hipótesis también se sugirió por la similitud entre los miARN y pequeños ARN interferentes (ARNip), ARN bicatenarios de ~21 nt que pueden inducir la degradación de moléculas de ARNm que contienen dianas complementarias perfectamente apareadas, un proceso llamado interferencia de ARN (iARN) (revisado por Sharp, Genes Dev. 15:485-490 (2001), véase también Hutvagner et al, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:225-232 (2002) y Zamore et al, Science 296:1265-1269 (2002), véase adicionalmente el documento USP 6.506.559). Sin embargo, aunque los miARN se codifican dentro del genoma hospedador, los ARNip se escinden generalmente de precursores de ARNbc más grandes producidos durante infección vírica o introducidos de forma artificial.

Como la introducción de ARNip artificiales en células animales puede inducir la degradación de moléculas homologas de ARNm, la iARN ha surgido como herramienta experimental útil (Elbashir et al, Nature 411:494-498 (2001); Fire et al, Nature 391:806-811 (1998); Hammond et al, Nature 404:293-295 (2000)). Sin embargo, en células de mamífero, la inducción de iARN requería para la transfección de oligonucleótidos de ARN, que puede ser ineficaz y dar lugar a una inhibición solamente transitoria en la expresión del gen diana.

La presente descripción proporciona moléculas de ARN (miARN) funcionalmente equivalentes a ARNip que pueden transcribirse de forma endógena en células animales y vegetales. La invención hace posible la producción de miARN diseñados específicamente para inhibir la expresión de ARNm que contiene una secuencia diana complementaria. Las moléculas de miARN de la descripción pueden usarse de forma experimental o terapéutica para inhibir la función génica.

55 **Sumario de la invención**

La presente descripción se refiere a miARN artificiales y a un método para usar los mismos para inhibir específicamente la expresión de genes seleccionados en células animales humanas y no humanas y en células vegetales. De acuerdo con la descripción, se introduce una secuencia de ADN que codifica un miARN en las células y se induce la inhibición del gen diana mediante miARN transcritos de forma endógena. Cuando resulta ventajoso, la transcripción del miARN puede situarse bajo el control de un promotor inducible o un promotor específico de tejido. Como el presente método puede provocar una producción continua de miARN, puede realizarse una inhibición estable de la expresión del ARNm diana.

Quedarán claros los objetivos y las ventajas de la presente invención a partir de la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1B. Producción del miARN miR-30 en células transfectadas. (Fig. 1A) Diagrama del ARN precursor miR-30 humano predicho (Lagos-Quintana et al, Science 294:853-858 (2001)). Se indican con líneas el miR-30 maduro (brazo 3') y anti-miR-30 (brazo 5'). Las flechas apuntan a los extremos 5' del miARN maduro determinados por análisis de extensión de cebador. La posición de los extremos 3' puede contener un error de 1 nucleótido. (Fig. 1B) Análisis de transferencia de Northern de miR-30 y anti-miR-30 en células 293T transfectadas. Carriles 1 y 4: ARN de células 293T transfectadas de forma simulada. Carriles 2 y 5: células transfectadas con pCMV-miR-30. Carriles 3 y 6: células transfectadas con pCMV-mmR-30 (mmR=miR maduro). Se indica la movilidad relativa de oligos de ADN sintéticos. "*" indica la posición de una especie sospechosa anti-miR-30 endógena.

Figuras 2A-2C. El miARN miR-30 inhibe de forma selectiva la expresión de un ARNm indicador que contiene sitios diana de miR-30. (Fig. 2A) La presencia de un sitio diana diseñado parcialmente complementario a miR-30. pDM128/RRE/4XT se obtuvo de pDM128/RRE por inserción de cuatro copias de este sitio diana en el 3' UTR (recuadros negros). Se indican los sitios de corte y ajuste (ss), el RRE y la posición relativa de la sonda RPA. (Fig. 2B) Las células 293T se co-transfectaron, con 10 ng de un plásmido de control interno (pBC12/CMV/ β -gal) que expresaba β -galactosidasa (β -gal) y, como se indica, 10 ng de pDM128/RRE o pDM128/RRE/4XT, 10 ng pcRev, y 400 ng of pC-MV-mmR-30 o pCMV-miR-30. El plásmido parental pBC12/CMV sirvió como control negativo. Se determinaron las actividades CAT a las 48 horas tras la transfección y se normalizaron por las actividades β -gal. Las columnas 2 y 6 se establecieron arbitrariamente al 100 %. (Fig. 2C) Las células 293T se transfectaron con el plásmido pDM128/RRE/ 4XT, con o sin pcRev o pCMV-miR-30, como se describe en la Fig. 2B. A las 48 horas después de la transfección, las células se dividieron en las fracciones nuclear (N) y citoplasmática (C), se aisló el ARN total y se analizó por RPA. Se indican los fragmentos de sonda rescatados por los ARNm con corte y ajuste (S) y sin corte y ajuste (U) codificados por pDM128/RRE/4XT.

Figuras 3A-3D. El nuevo miARN miR-30-nxt inhibe específicamente la expresión citoplasmática de ARNm de pgTAT-nxt sin corte y ajuste. (Fig. 3A) Diseño del precursor del miARN miR-30-nxt. Se indican las secuencias insertadas derivadas del gen *nxt* global de Drosophila. (Fig. 3B) Detección de los nuevos miARN miR-30-nxt y anti-miR-30-nxt en células 293 transfectadas por análisis de Northern. Carriles 1 y 3: células transfectadas de forma simulada; carriles 2 y 4: células transfectadas con pCMV-miR-30-nxt. Se indica la movilidad relativa de los marcadores de ADN. (Fig. 3C) Transferencias de Western usando antisueros policlonales de conejo dirigidos contra Tat o Rev de VHI-1. Las células 293T se transfectaron usando 25 ng de pgTAT o pgTAT-nxt, 25 ng de pcRev, y 400 ng de pGMV-miR-30-nxt. El plásmido parental pBC12/CMV sirvió como control negativo. Este análisis de Western se realizó ~48 horas después de la transfección. (Fig. 3D) El miARN miR-30-nxt reduce el nivel citoplasmático de ARNm de pgTAT-nxt sin corte y ajuste. Las células 293T se transfectaron con pgTAT-nxt, con o sin pcRev o pCMV-miR-30-nxt. Dos días después de la transfección, se prepararon ARN nucleares (N) y citoplasmáticos (C) y se analizaron por RPA. El carril 1 representa aproximadamente el 3 % de las sonda de entrada (I). Se indican los fragmentos de sonda rescatados por ARNm con corte y ajuste (S) y sin corte y ajuste (U).

Figuras 4A-4D. Inhibición de la expresión génica endógena por los nuevos miARN en células 293T. (Fig. 4A) Detección de la expresión miR-30-PTB y anti-miR-30-PTB. Las células 293T se transfectaron de forma simulada (carriles 1 y 3) o se transfectaron con pCMV-miR-30-PTB (carriles 2 y 4). Después de 2 días, se aisló el ARN total y se usó para el análisis por extensión de cebador. Se indican las posiciones de los marcadores de ADN. (Fig. 4B) Reducción de la proteína PTB endógena y la expresión de ARNm por pCMV-miR-30-PTB. Las células se transfectaron con pC-MV-miR-30-nxt (carriles 1 y 3) o pCMV-miR-30-PTB (carriles 2 y 4). Después de cinco días, se prepararon los lisados celulares totales y los ARN. Carriles 1 y 2: transferencia de Western usando anticuerpos dirigidos contra PTB o CA150, que sirvieron como control de carga. Carriles 3 y 4: análisis de Northern para el ARNm de PTB. (Fig. 4C) Pérdida de Tag de SV40 en células transfectadas con pCMV-miR-30-Tag. Las células se co-transfectaron con pHRGFP-C (un plásmido de expresión de proteína fluorescente verde) y pCMV-miR-30-nxt o pCMV-miR-30-Tag, y tres días después, se analizaron por inmunofluorescencia. (Fig. 4D) Cuantificación de células que expresan Tag de SV40. Se contaron las células con tinción Tag nuclear transparente como positivas (la tinción citoplasmática era débil y también estaba presente en controles solamente de anticuerpo secundario). Se contaron al menos 200 células para cada muestra.

Figuras 5A y 5B. Diseño de construcción indicadora. (Fig. 5A) Secuencias de dianas de ARN sintéticas usadas y su apareamiento predicho con el miARN miR-30, anti-miR-30 o miR21 o el ARNip dNxt. Las secuencias diana eran perfectamente complementarias (P) o se diseñaron para formar una protuberancia central de 3 nt (B). Se usó una secuencia aleatoria, para la cual se sabe que no existe ARN pequeño complementario, como control. (Fig. 5B) Estructura de las construcciones indicadora pCMV-luc-Target y pC-MV-luc-Target-CAT. Las dianas, representadas por recuadros negros, son ocho repeticiones en tándem de una de las secuencias mostradas en la Fig. 5A. PA, señal de poliadenilación.

Figuras 6A-6C. Actividad biológica de los miARN miR-30 y anti-miR-30. (Fig. 6A) El nivel de expresión de miR-30, anti-miR-30 y de miR-21 en células 293 transfectadas de forma simulada, o en células 293T transfectadas

con los plásmidos de expresión de miARN indicados, se determinó por extensión de cebador (Zeng et al, RNA 9: 112-123 (2003)). (Fig. 6B) Se determinaron las actividades de enzima luc detectadas en cultivos celulares 293T transfectados con los plásmidos indicadores y efectores enumerados, así como el plásmido de control pBC12/CMV/ β -gal, ~48 horas después de la transfección y después se ajustaron basándose en variaciones minoritarias observadas en el control interno CAT. Estos valores se presentan normalizados al cultivo transfectado con pCMV-luc-random-CAT y pCMV-miR-21, que se estableció arbitrariamente a 1,0. Se indica el promedio de tres experimentos independientes con desviación típica. Se indica la cantidad de nanogramos de cada plásmido de expresión de miARN transfectado en cada cultivo. (Fig. 6C) Análisis de Northern en paralelo para detectar el miARN indicador luc (panel superior) y el ARNm β -gal de control (panel inferior). Encima del panel superior se muestran las cantidades de pCMV-miR-30 o pCMV-miR-21 introducidos por transfección por cultivo. El nivel de actividad enzimática luc detectada para cada construcción indicadora se da como un porcentaje del nivel obtenido tras la co-transfección con el plásmido de control pCMV-miR-21. Carril 1: ARN de células 293T transfectadas de forma simulada. La flecha indica la posición del producto de escisión de ARNm luc de 1,8 kb.

Figuras 7A y 7B. Actividad biológica del miARN humano miR-21. (Fig. 7A) Este experimento se realizó como se describe en la Fig. 6B. Los datos mostrados son el promedio de 4 experimentos independientes. (Fig. 7B) Análisis de Northern en paralelo de la expresión de ARNm luc (panel superior) y β -gal (panel inferior). El nivel de actividad enzimática luc detectada con cada construcción indicadora se da como un porcentaje del nivel obtenido tras co-transfección con el plásmido de control pCMV-miR-30. Carril 1, ARN de células 293T transfectadas de forma simulada. La flecha indica la posición del producto de escisión de mARN luc de ~1,8 kb.

Figuras 8A y 8B. Inhibición del uso de ARNm por un ARNip sintético. (Fig. 8A) Los cultivos se co-transfectaron con uno de los tras plásmidos indicadores enumerados junto con el ARNip dNxt o dTap y los plásmidos de control interno pRL-CMV y pBC12/CMV/ β -gal. La cantidad de cada ARNip usada se da en picomoles. Aproximadamente 40 horas después de la transfección, los cultivos se usaron para el ensayo doble de luciferasa o para el aislamiento de ARN. Las actividades luc de luciérnaga se ajustaron para variaciones minoritarias en el control interno de luc de Renilla y se presentan normalizadas a la actividad observada en el cultivo transfectado con el plásmido de control pCMV-luc-random y el ARNip de control dTap, que se estableció a 1,0. Estos datos representan el promedio de tres experimentos independientes, con la desviación típica indicada. (Fig. 8B) Análisis de Northern de la expresión de ARNm luc de luciérnaga (panel superior) y β -gal (panel inferior). El nivel de actividad enzimática luc de luciérnaga detectado para cada construcción indicadora se da como un porcentaje del nivel obtenido con el ARNip de control dTap. Carril 1, ARN de un cultivo transfectado de forma simulada. La flecha indica la posición del producto de escisión de ARNm luc de ~1,8 kb.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a un método para inhibir específicamente la expresión de genes diana seleccionados en células animales humanas y no humanas y en células vegetales usando miARN producido de forma endógena. De acuerdo con este método, se usan construcciones que codifican uno o múltiples miARN. Las construcciones se diseñan de tal modo que el procesamiento nuclear, el transporte y la escisión del miARN maduro se realicen de forma eficaz. El miARN resultante induce la degradación de un ARNm producido en la célula que contiene una secuencia diana complementaria o inhibe de otro modo la traducción del ARNm. La descripción se refiere adicionalmente a construcciones adecuadas para su uso en dicho método y a composiciones y kits que comprenden dichas construcciones.

De acuerdo con el presente método, se introduce una construcción de ADN en células (células hospedadoras) en que se expresa una secuencia génica diana. La construcción comprende un promotor funcional en las células hospedadoras unido de forma funcional a una secuencia que codifica un precursor del miARN. La introducción de la construcción en las células hospedadoras se realiza en condiciones tales que se produce el transcrito precursor de miARN y después se escinde el miARN maduro del precursor mediante una ribonucleasa endógena. El miARN maduro resultante induce la degradación del transcrito de ARNm de la secuencia génica diana producido en la célula o inhibe de otro modo la traducción del ARNm. (Se apreciará que la degradación de otros tipos de ARN, incluyendo ARN viral, puede inducirse de forma similar).

Los miARN adecuados para su uso en la presente invención tienen, de forma ventajosa, una longitud de aproximadamente 19-24 nucleótidos, preferiblemente, de aproximadamente 21 o 22 nucleótidos. Los miARN pueden diseñarse de modo que hibriden con cualquier transcrito de ARN con un elevado grado de especificidad. De forma ventajosa, el miARN se diseña de tal modo que sea perfectamente complementario a la secuencia diana dentro del ARN (por ejemplo, ARNm) ya que incluso una reducción de un único nucleótido en la complementariedad con la diana puede, dependiendo de su localización, atenuar el nivel de inhibición. Los datos presentados en el Ejemplo 2 indican que el miARN puede escindir ARNm que alberga un sitio diana completamente complementario mientras que el miARN puede inhibir la expresión de ARNm que alberga una secuencia parcialmente complementaria sin inducir necesariamente la escisión. El miARN puede diseñarse para que aborde una región no traducida 3' o 5' del ARNm o región codificante del ARNm.

Como se ha indicado anteriormente, el miARN se escinde de un precursor que incluye una estructura de tronco-bucle de ARN predicha (Lagos-Quintana et al, Science 294:853 (2001), Lau et al, Science 294:858 (2001), Lee y Ambrose, Science 294:362 (2001)). Esta estructura tronco-bucle puede diseñarse de modo que se reconozca por una ribonucleasa (por ejemplo, una enzima tipo ARNasa III, tal como DICER, o una enzima que tiene las propiedades de reconocimiento de la misma), con la escisión resultante del miARN maduro. Dichas estructuras precursoras de tronco-bucle pueden tener una longitud de aproximadamente 40 a 100 nucleótidos, preferiblemente, de aproximadamente 50 a 75 nucleótidos. La región de tronco puede tener una longitud de aproximadamente 19-45 nucleótidos (o más), preferiblemente, de aproximadamente 20-30 nucleótidos. El tronco puede comprender un dúplex perfectamente complementario (pero para cualquier cola 3'), sin embargo, pueden estar presentes "protuberancias" sobre cualquier brazo del tronco y puede preferirse. De forma ventajosa, cualquiera de dichas "protuberancias" son pocas en número (por ejemplo, 1, 2 o 3) y son de aproximadamente 3 nucleótidos o menos de tamaño. La parte de bucle terminal puede comprender aproximadamente 4 o más nucleótidos (preferiblemente, no más de 25); el bucle es preferiblemente de 6-15 nucleótidos de tamaño. La estructura precursora de tronco-bucle puede producirse como parte de un transcrito portador más grande del cual se escinde el miARN, o puede producirse como un transcrito preciso.

Los datos presentados en Zeng et al, RNA 9: 112-123 (2003), dejan claros ciertos requisitos de secuencia para un procesamiento eficaz del miARN y funcionamiento (por ejemplo, siendo significativo el mantenimiento del apareamiento de bases en la base del tronco predicho, fuera de la parte de tronco que codifica el miARN maduro). Los datos presentados también demuestran lo deseable de sustituir las secuencias de tronco de miARN de origen natural (por ejemplo, miR-30) para generar miARN adecuados para su uso en inhibir la expresión de cualquier gen diana. Los datos indican que aunque la presencia de un bucle miR-30 puede ser deseable, también pueden tolerarse variaciones de esa estructura (por ejemplo, pueden usarse bucles que sean más del 72 %, preferiblemente más del 79 %, más preferiblemente más del 86 %, y mucho más preferiblemente, más del 93 % idénticos a, por ejemplo, la secuencia miR-30 (determinada de forma convencional usando programas informáticos conocidos tales como el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711)).

La secuencia codificante de la descripción (por ejemplo, la secuencia codificante del precursor de miARN o secuencia codificante portadora más larga) puede estar presente en la construcción en unión funcional con un promotor. Los promotores apropiados pueden seleccionarse basándose en la célula hospedadora y efecto perseguido. Los promotores adecuados incluyen promotores constitutivos e inducibles, tales como promotores basados en la ARN polimerasa II (polII) inducible. Los promotores pueden ser específicos de tejido, siendo dichos promotores bien conocidos en la técnica. Ejemplos de promotores adecuados incluyen el promotor inducible o reprimible de tetraciclina, los promotores basados en ARN polimerasa I o III, los promotores virales dependientes de pol II tales como el promotor CMV-IE, y los promotores polIII U6 y H1. El promotor del bacteriófago T7 también puede usarse (en cuyo caso, se apreciará, debe también estar presente la polimerasa T7).

Las construcciones de la invención pueden introducirse en las células hospedadoras usando cualquiera de diversos enfoques. Puede realizarse infección con un vector viral que comprende la construcción. Ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores retrovirales deficientes en la replicación, vectores adenovirales, vectores adenoasociados y vectores lentivirales. La transfección con un plásmido que comprenda la construcción es un modo alternativo de introducción. El plásmido puede presentarse en forma de ADN desnudo o puede presentarse en asociación con, por ejemplo, un liposoma. La naturaleza del vehículo de suministro puede variar con la célula hospedadora.

Puede realizarse el suministro *in vivo* de la construcción (por ejemplo, presente en un vector viral) usando una cualquiera de diversas técnicas, dependiendo del tejido diana. El suministro puede ser, según sea apropiado, por inyección directa, inhalación, inyección intravenosa u otro método físico (incluyendo mediante microproyectiles para abordar regiones visibles y accesibles de tejido (por ejemplo, con ADN desnudo)). La administración puede ser mediante aguja de jeringa, trocar, cánula, catéter, etc., según sea apropiado.

Los miARN de la descripción pueden usarse para regular (por ejemplo, inhibir) la expresión de genes diana en células y tejidos en cultivo y en células presentes en plantas y en animales humanos y no humanos. Las secuencias diana pueden ser secuencias de origen natural, transgenes o pueden ser secuencias patógenas presentes, por ejemplo, como resultado de infección. Como un ejemplo, los miARN de la descripción pueden usarse para "apagar" virus de papiloma en seres humanos (por ejemplo, en el útero usando un vector viral adenoasociado diseñado de forma apropiada).

Las células cultivadas adecuadas como hospedadores de acuerdo con la descripción incluyen tanto células primarias como líneas celulares. Las células pueden ser células humanas, incluyendo células madre humanas. Una construcción de la descripción que codifica un miARN puede introducirse en células cultivadas para inactivar un gen específico de función desconocida. El silenciamiento del gen usando el método de la invención puede usarse como enfoque para evaluar su función. Como alternativa, puede introducirse una construcción que codifica un miARN en células a implantar en un animal humano o no humano para propósitos terapéuticos. Por ejemplo, pueden obtenerse células madre hepáticas de un paciente infectado con hepatitis C y colocarse en cultivo. Puede introducirse una

construcción de la descripción que codifica un miARN dirigido a un gen de hepatitis C esencial para, por ejemplo, la replicación o empaquetamiento, en las células explantadas en condiciones tales que el gen se silencie. Las células después pueden reimplantarse en el paciente en condiciones tales que se realice la regeneración.

Los miARN de la descripción también pueden introducirse en un animal no humano para producir un animal experimental de modelo, y en un animal humano o no humano para propósitos terapéuticos. En el caso de animales experimentales, los miARN pueden usarse para análisis a gran escala de función génica. Como la diana para el miARN es de aproximadamente 22 nucleótidos, los miARN pueden usarse para eliminar la expresión de isoformas individuales resultantes, por ejemplo, de corte y ajuste alternativo. En el caso de terapia, los miARN pueden diseñarse, por ejemplo, para bloquear la replicación viral. Pueden modificarse por ingeniería animales humanos y no humanos, por ejemplo, para expresar de forma permanente múltiples miARN dirigidos a secuencias conservadas en virus (por ejemplo, secuencias de empaquetamiento o elementos reguladores), volviendo de este modo a los seres humanos/animales permanentemente inmunes a exposición al virus, incluyendo exposición a VIH. Pueden usarse enfoques similares en plantas para volver a las plantas inmunes a los virus.

Los miARN diseñados de forma apropiada también pueden usarse en seres humanos y animales no humanos para apagar la expresión de oncogenes en células tumorales, o inhibir la expresión de genes asociados con otras afecciones médicas, por ejemplo, formas mutantes de Huntingtina o de la proteína priónica así como mutantes proteicos negativos dominantes observados en algunas enfermedades genéticas humanas. Los miARN de la invención pueden usarse, por ejemplo, para inhibir la expresión de genes pro-inflamatorios o genes de apoptosis donde son terapéuticamente deseables. Por ejemplo, la expresión de BCL-2 puede volver a las células tumorales resistentes a quimioterapia. Usando el presente enfoque, los miARN pueden usarse para inhibir la expresión de BCL-2 y potenciar la capacidad de los agentes quimioterapéuticos de causar que las células tumorales experimenten senescencia. Así mismo, pueden modificarse células T aisladas de un paciente que alberga tumor *ex vivo* usando el presente enfoque de modo que se inhiba la expresión del receptor de TGF β . Tras la reintroducción en el paciente, la capacidad de eliminación de las células T se potencia. Así mismo, las células T pueden modificarse *ex vivo* para inhibir la expresión del receptor Fas, aumentando de este modo la capacidad de eliminación tumoral de las células tras su reintroducción. Los miARN de la invención pueden usarse para tratar cualquier enfermedad donde sea beneficioso el rechazo de uno o una serie de productos génicos específicos.

Los miARN de la invención también pueden usarse para realizar diversas exploraciones de alto rendimiento para seleccionar la pérdida de fenotipo funcional. Por ejemplo, puede introducirse una biblioteca de construcciones aleatorias que codifican precursores de miARN en células (por ejemplo, usando un vector viral) para determinar la función de una secuencia genómica. Normalmente, el protocolo usado es tal que el virus se introduce por célula. Usando cualquiera de diversos enfoques, pueden seleccionarse aquellas células en que se pierde la función del gen diana (por ejemplo, si se busca un gen implicado en muerte celular resultante de infección viral, solamente aquellas células que contengan el miARN de direccionamiento permanecerán viables después de exposición al virus; como alternativa, pueden usarse marcadores (por ejemplo, proteínas indicadoras) para seleccionar células que contengan el miARN de direccionamiento). El miARN después puede clonarse de las células seleccionadas, determinarse la secuencia y usarse para identificar el gen diana.

La presente descripción incluye composiciones y kits que comprenden los miARN descritos anteriormente y/o secuencias de ácido nucleico que codifican los mismos (y construcciones que comprenden dichos ácidos nucleicos). Dichas composiciones pueden incluir adicionalmente, por ejemplo, un vehículo (por ejemplo, un vehículo estéril) y dichos kits pueden comprender adicionalmente, por ejemplo, reactivos auxiliares (por ejemplo, tampones) tales como aquellos necesarios para realizar los presentes métodos, y medios de contención.

Ciertos aspectos de la invención se describen en mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitantes (véase también Zeng et al, Mol. Cell 9:1327-1333 (2002), Coburn et al, J. Virol. 76:9225-9231 (2002) y Zeng et al, RNA 9:112-123 (2003), así como el documento USP 6.506.559, por ejemplo, para aplicaciones específicas).

EJEMPLO 1

Procedimientos experimentales

Construcción de plásmidos y descripción de oligonucleótidos

Los plásmidos de expresión pBCI2/CMV, pBCI2/CMV/ β -gal y pcRev, y las construcciones indicadoras pDM128/RRE y pgTat, se han descrito previamente (Malim et al., Nature 338:254-257 (1989); Bogerd et al., Crm1, J. Virol. 72:8627-8635 (1998); Hope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7787-7791 (1990); Cullen, Cell 46:973-982 (1986)). Un plásmido de expresión de GPP, phrGFP-6, se obtuvo de Strategene. Para preparar pC-MV-miR-30, se hibridaron los dos cebadores de ADN:

5'-TACTCGAGATCTGCGACTGTAAACATCCTC-GACTGGAAGCTGTGAAGCCACAGATGG-3'
y
5'-CGCTCGAGGATCCGCAGCTGCAAACATC-CGACTGAAAGCCCATCTGTGGCTTCACAG-3'

se extendieron usando la ADN polimerasa Taq, se cortaron con XhoI, y se clonaron en el sitio XhoI presente en el pBCI2/CMV. Para preparar pCMV-miR-30, se hibridaron 5'-ATCCCTTTTCAGTCGGATGTTTGCAGCT-3' y 5'-CTAGAGCTGCAAACATCCGACTGAAAGG-3' y se clonaron en pBCI2/CMV. Para preparar pDM128/RRE/4XT, se clonaron cuatro copias del sitio diana de miR-30 (Fig. 2A, separados por dos o cinco nucleótidos entre sí) en el sitio XhoI de pDM128/RRE. Para preparar pgTAT-nxt, se amplificó la secuencia codificante de *nxt* de *Drosophila* (nucleótidos 1-420) a partir de una biblioteca de ADNc embrionaria de *Drosophila* y se clonó entre los dos sitios BglII presentes en pgTAT. Los plásmidos de expresión pCMV-miR-30-PTB, pCMV-miR-30-nxt y pCMV-miR-30-TAg se prepararon como se ha descrito para pCMV-miR-30, excepto en que las secuencias troncales insertadas se obtuvieron de cada gen diana.

Cultivo celular y transfección

Se cultivaron células 293T como se ha descrito previamente (Bogerd et al., *Crm1*, *J. Virol.* 72:8627-8635 (1998)) y se transfectaron usando el reactivo FuGene 6 (Roche). Se realizaron ensayos CAT a las 48 h. después de la transfección, como se ha descrito (Bogerd et al., *Crm1*, *J. Virol.* 72:8627-8635 (1998)). Para la transferencia de Western, se fraccionaron los lisados en un gel de gradiente de SDS-acrilamida del 4-20 % (Bio-Rad), se transfirieron, y después se sondearon con un antisuero policlonal de conejo dirigido contra Tat, Rev (Malim et al., *Nature* 338:254-257 (1989)), CA 150 (Suné et al., *Mol. Cell. Biol.* 17:6029-6039 (1997)) o PTB. Las bandas reactivas se visualizaron usando ECL (Amersham). Se preparó un antisuero policlonal específico para PTB 1 humana por inmunización de conejos con una proteína de fusión recombinante purificada que constaba de glutatión-S-transferasa fusionada a PTB1 de longitud completa. Se realizaron análisis de inmunofluorescencia como se ha descrito (Wiegand et al., *Mol. Cell. Biol.* 22:245-256 (2002)) usando un anticuerpo monoclonal contra Tag de SV40 (Pab 108, Santa Cruz) y antisuero de cabra anti-ratón conjugado con rodamina (ICN) así como la cepa de ADN DAPI.

Análisis de ARN

El ARN total se aisló usando reactivo Trizol (Invitrogen). El fraccionamiento celular y RPA se realizaron como se ha descrito previamente (Kang y Cullen, *Genes Dev.* 13:1126-1139 (1999)). Para el análisis de Northern del miARN, se separaron aproximadamente 20 µg del ARN total en un gel de poliácridamida al 15 % desnaturizante, se transfirieron a una membrana Hy-Bond-N (Amersham), se reticularon con UV, y se sondearon con oligos 5' ³²P-fosforilados en solución ExpressHyb (Clontech). Para el análisis de Northern del ARNm, se fraccionaron 20 µg de ARN total en un gel de agarosa desnaturizante al 1 %, se transfirieron a la membrana, se fijaron, y se sondearon con una sonda de ADNc de PTB cebada de forma aleatoria.

Resultados

Expresión de una secuencia de miARN miR-30 introducida en células humanas

MiR-30 es uno de los varios miARN nuevos recientemente aislados de la línea celular humana HeLa (Lagos-Quintana et al., *Science* 294:853-858 (2001)). Se clonó una secuencia de ADNc que codificaba el precursor completo predicho de 71 nt de miR-30 (Fig. 1A) en el contexto de un ARNm irrelevante expresado bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE), en pCMV-miR-30. También se construyó un plásmido similar, pCMV-miR-30, que contenía solamente la secuencia de ADNc de miR-30 maduro. Después se transfectaron células 293T humanas con estos plásmidos de expresión y se analizó el ARN total para la presencia del miARN miR-30 por transferencia de Northern (Fig. 1B). El miR-30 maduro podía detectarse fácilmente en células transfectadas con pCMV-miR-30 (Fig. 1B). El miARN producido a partir del plásmido pCMV-miR-30 introducido por transfección parecía tener una longitud de ~22 nt y tenía el mismo extremo 5' que el presentado para miR-30 endógeno (Lagos-Quintana et al., *Science* 294:853-858 (2001)), determinado por análisis de extensión de cebador (Fig. 1A). En contraste, las células 293T transfectadas de forma simulada o transfectadas con pCMV-miR-30 no expresaban miARN miR-30 detectable (Fig. 1B, carriles 1 y 3). La producción del miARN miR-30 también podía detectarse en células HeLa o NIH3T3 transfectadas o cuando el ADN precursor de miR-30 se colocaba dentro de un intrón o en el 3'-UTR de otro ARNm expresado bajo el control del promotor CMV-IE. Por tanto, el miARN miR-30 maduro puede escindirse de la secuencia precursora de miR-30 cuando la última se expresa dentro del contexto de un ARN irrelevante.

El miR-30 maduro está codificado por el brazo 3' de su precursor (Fig. 1A), y un precursor de miARN generalmente da lugar a solamente una especie estable de miARN maduro, derivado del brazo 5' o 3' de la horquilla de ARN precursor (Lagos-Quintana et al., *Science* 294:853-858 (2001); Lau et al., *Science* 294:858-862 (2001); Lee y Ambros, *Science* 294:862-864 (2001)). No obstante, fue posible detectar también un miARN derivado del brazo 5' (miR-30 antisentido, o anti-miR-30) en células transfectadas (Fig. 1B, carril 5). Aunque no fueron detectables niveles significativos de miARN miR-30 endógeno en células 293T o, sorprendentemente, células HeLa, parecía haber un nivel constitutivo bajo de anti-miR-30 endógeno, o posiblemente de un miARN similar, en células 293T, HeLa y NIH3T3 (marcadas por "*" en la Fig. 1B).

MiR-30 inhibe la expresión de un ARNm que contiene sitios diana complementarios

Los miARN de *C. elegans* lin-4 y let-7 inhiben la traducción de ARNm que contienen múltiples secuencias complementarias en sus 3' UTR sin afectar de forma significativa al nivel en estado estacionario del miARN (Lee et al., Cell 75:843-854 (1993); Wightman et al., Cell 75:855-862 (1993)). Por lo tanto, se cuestionó si miR-30 humano podría actuar mediante un mecanismo similar. Se diseñó una secuencia diana de miR-30, y se insertaron cuatro copias de esta secuencia en el 3' UTR de la construcción indicadora pDM128/RRE para dar el plásmido pDM128/RRE/4XT (Fig. 2A). De forma importante, esta secuencia diana no es un complemento perfecto para miR-30 y en su lugar, como las dianas conocidas de lin-4 y let-7 (Lee et al., Cell 75:843-854 (1993); Slack et al. Mol. Cell 5:659-669 (2000)), contiene un desapareamiento central (Fig. 2A).

La construcción indicadora parental pDM128/RRE usada en estos experimentos contiene sitios de corte y ajuste 5' y 3' que flanquean un intrón, derivado del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que contiene tanto el gen *cat* como el elemento de respuesta Rev (RRE) (Hope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7787-7791 (1990)). Como se ha demostrado previamente (Hope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7787-7791 (1990); Bogerd et al., Crm1, J. Virol. 72: 8627-8635 (1998); Kang y Cullen, Genes Dev. 13: 1126-1139 (1999)); la exportación nuclear y de este ARNm de *cat* sin corte y ajuste es dependiente de la co-expresión de la proteína Rev de VIH-1, mientras que la exportación nuclear del ARNm con corte y ajuste codificado por pDM128/RRE, que no codifica CAT, sucede de forma constitutiva (Fig. 2). Como se muestra en la Fig. 2B, la co-transfección de pCMV-miR-30, que codifica el precursor completo del ARN de miR-30, provocó una marcada bajada en el nivel de actividad CAT expresada a partir del plásmido pDM12S/RRE/4XT, que contiene cuatro copias del sitio diana, pero no logró afectar a la expresión de CAT a partir del plásmido indicador parental pDM128/RRE (Fig. 2B). En contraste, la co-transfección de pCMV-miR-30, que contiene solamente la secuencia madura de miR-30, no redujo la expresión de CAT (Fig. 2B).

Para determinar si la reducción observada en la actividad CAT se debía a una reducción en la expresión del ARNm de *cat*, se realizó un ensayo de protección contra RNasa (RPA) usando fracciones nucleares y citoplasmáticas de ARN derivadas de las células 293T transfectadas. Como se muestra en la Fig. 2C, miR-30 no afectaba significativamente al nivel citoplasmático en estado estacionario del ARNm de *cat* sin corte y ajuste codificado por pDM128/RRE/4XT (compárense los carriles 6 y 8). Por tanto, la acción del miARN miR-30 en este sistema indicador parece imputar el efecto de los miARN lin-4 en *C. elegans* (Olsen y Ambros, Dev. Biol. 216:671-680 (1999)).

Pueden producirse *in vivo* miARN diseñados a partir de precursores artificiales de miARN

Para determinar si las características encontradas en el precursor de miR-30 podrían usarse para diseñar y sintetizar nuevos miARN en células humanas, la secuencia troncal en el precursor de miR-30 se sustituyó con una secuencia basada en el gen *nxt* de *Drosophila* (Gen CG10174, nucleótidos 121-143 desde el codón de inicio de la traducción) (Fig. 3A). Se ha demostrado previamente que ARNip sintéticos análogos pueden bloquear la expresión del ARNm de *nxt* en células S2 de *Drosophila* (Wiegand et al., Mol. Cell. Biol. 22:245-256 (2002)). De forma importante, esta secuencia no está conservada en los homólogos humanos de *nxt*.

El nuevo precursor de miARN, llamado miR-30-nxt, se expresó de nuevo como parte de un transcrito de ARNm más largo, como se ha descrito anteriormente para miR-30 de tipo silvestre. Inicialmente, el plásmido pC-MV-miR-30-nxt se introdujo por transfección en células 293T humanas, se aisló el ARN total, y se analizó la producción tanto del miARN miR-30-nxt maduro (el brazo 3', de acuerdo con miR-30) como del anti-miR-30-nxt (el brazo 5' predicho) por análisis de Northern. En la Fig. 3B (carriles 2 y 4), se muestra que tanto miR-30-nxt como anti-miR-30-nxt de hecho se expresaban. Usando análisis de extensión de cebador, fue posible determinar que los sitios de escisión 5' usados en la síntesis de estos nuevos miARN estaban cerca de los observados en el precursor de mir-30. Por tanto, pueden producirse nuevos miARN en células humanas usando el precursor existente natural de miARN miR-30 como molde.

Inhibición de la expresión de ARNm por miARN diseñados

Para determinar si los miARN transcritos de forma endógena podrían usarse como ARNip para iniciar iARN contra dianas específicas de ARNm en células de mamífero, se construyó una construcción indicadora, llamada pgTat-nxt, que contenía una secuencia de 402 nucleótidos insertada, derivada del gen *nxt* de *Drosophila*, que debe proporcionar un único sitio diana completamente complementario para el nuevo miARN miR-30-nxt. La construcción indicadora pgTat descrita previamente (Malim et al., Nature 333:254-257 (1989)) contiene los dos exones que codifican la proteína Tat de HLV-1 que flanquean un intrón, derivado del gen *env* de VIH-1, que también contiene RRE de VIH-1. En ausencia de Rev, pgTat produce exclusivamente la forma de 86 aminoácidos (aa), de dos exones de Tat codificada por el ARNm de *tat* con corte y ajuste (Fig. 3C, carril 2). Sin embargo, en presencia del factor de exportación nuclear Rev, el ARNm sin corte y ajuste codificado por pgTat también se exporta desde el núcleo, provocando la expresión de la forma corta de 72 aa de la proteína Tat (Fig. 3C, carril 3) (Malim et al., Nature 338:254-257 (1989)). La inserción de la secuencia *nxt* en el intrón de pgTat no alteró este patrón de expresión (Fig. 3C, carriles 5 y 6). Como la diana para pCMV-miR-30-nxt está presente solamente en el intrón, la expresión de miR-30-nxt debe afectar solamente a la producción de Tat de 72 aa (en presencia de Rev), pero no a Tat de 86 aa, proporcionando de este modo un ideal de control para la especificidad. Esta inhibición selectiva de hecho se observó (Fig. 3C, compárense los carriles 6 y 7). De forma importante, miR-30-nxt no inhibió la síntesis de la proteína Rev, de la forma larga de Tat producida tanto por pgTAT como por pgTAT-nxt o de la forma corta de 72 aa de Tat

expresada a partir del plásmido de control negativo pgTAT (Fig. 3C, carriles 4 y 7).

La iARN induce la degradación de ARNm diana (Hammond et al., Nature 404:293-295 (2000); Zamore et al., Cell 101:25-33 (2000)). Por lo tanto se realizó RPA para comparar los niveles de ARNm con corte y ajuste y sin corte y ajuste de Tat en ausencia o presencia de Rev y miR-30-nxt. MiR-30-nxt indujo una disminución específica (-7 veces) en el nivel citoplasmático de ARNm de *tat* sin corte y ajuste en presencia de Rev (compárense los carriles 7 y 9 en la Fig. 3D), pero no tuvo efecto sobre el ARNm de *tat* con corte y ajuste. Se obtuvieron resultados similares usando un ARNip sintético, sugiriendo de este modo firmemente que el miARN miR-30-nxt induce iARN.

Inhibición de la expresión génica endógena usando miARN artificiales

Para ensayar si nuevos miARN podrían inhibir la expresión de genes endógenos en células humanas, se eligió la proteína de unión a tracto de polipirimidina (PTB) (Wagner y Garcia-Blanco, Mol. Cell. Biol. 21:3281-3288 (2001)) como diana. El plásmido de expresión pCMV-miR-30-PTB (que contenía los nucleótidos 1179-1201 de PTB), se construyó del mismo modo que el descrito para pCMV-miR-30-nxt y se introdujo por transfección en células 293T. Ambos miARN miR-30-PTB y anti-miR-30-PTB se detectaron fácilmente por extensión de cebador (Fig. 4A). De forma importante, la introducción de pCMV-miR30-PTB provocó una reducción marcada y específica en el nivel de expresión de la proteína PTB endógena y el ARNm de PTB, en comparación con células de control (Fig. 4B).

Aunque la introducción de pCMV-miR-30-PTB provocó una bajada reproducible del 70-80 % en el nivel de proteína PTB y expresión de ARNm en células 293T transfectadas (Fig. 4B), la inhibición ni fue completa. Una posible explicación para el nivel residual de expresión de PTB es que la transfección de células 293T no es 100 % eficaz. Para abordar esta cuestión, se construyó un tercer plásmido de expresión de miARN, pCMV-miR-30-Tag, que se diseñó para que expresara miARN artificial dirigido contra el antígeno T de SV40 (Tag) (nt 639-661, Harborth et al., J. Cell Sci. 114:4557-4565 (2001)). Este plásmido de expresión después se introdujo en células 293T, que expresan Tag de forma constitutiva, junto con un plásmido que expresaba la proteína fluorescente verde (GFP) y se cuantificó la cantidad de células que expresaban Tag usando inmunofluorescencia. La co-transfección del plásmido de expresión de GFP hizo posible discriminar fácilmente células transfectadas de células no transfectadas (Fig. 4C). Como se muestra en la Fig. 4D, el ~90 % de las células que no estaban transfectadas, o que se transfectaron con GFP más pCMV-miR-30-nxt (como control negativo) expresaba niveles fácilmente detectables de TAG. En contraste, la co-transfección del plásmido de expresión pCMV-miR-30-Tag provocó una reducción drástica en la cantidad de células que eran tanto GFP como TAG positivas (Fig. 4C y 4D).

Posteriormente se demostró que un segundo miARN humano, llamado miR-21, también podría expresarse de forma eficaz cuando el precursor para el mismo formaba parte de un ARNm más largo (Zeng et al. RNA 9:112-123 (2003)). Tanto para miR-30 como para miR-21, la producción de miARN maduro era muy dependiente de la integridad del ARN troncal precursor, aunque la secuencia subyacente tenía poco efecto.

EJEMPLO 2

Procedimientos experimentales

Plásmidos y ARNip.

Los plásmidos pCMV-miR-30, pCMV-miR-21 y pBCI2/CMV/ β -gal están descritos (Zeng et al., RNA 9:112-123 (2003)). Los plásmidos indicadores pCMV-luc-Target (siendo Target miR30(B), miR-30(AB), miR-30(P), miR-30(AP), miR-21(B), miR-21(P), dNxt(B), dNxt(P) o aleatorio, Fig. 5A) se prepararon combinado oligos que codificaban dos copias de la secuencia Target e insertándolas tras el codón de parada de la luciferasa (*luc*) en pCMV-luc (Zeng et al., RNA 9:112-123 (2003)). Se introdujo una separación de al menos 2 pb entre secuencias diana adyacentes. Todos los plásmidos se secuenciaron para verificar las dianas insertadas. Entonces se clonó un casete de expresión de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) amplificado por PCR (Fig. 5B) en el sitio único *StuI* presente en cada intermedio pCMV-luc-Target. Los ARNip sintéticos dNxt y dTap se obtuvieron de Dharmacon, se hibridaron y se almacenaron como soluciones madre 20 μ M.

Transfecciones y ensayos indicadores.

Las transfecciones se realizaron por triplicado en placas de 24 pocillos. Se usó FuGene 6 (Roche) para introducir por transfección los plásmidos en células 293T. Cada pocillo recibió 10 ng de pCMV-luc-Target-CAT, 8 ng de pBCI2/CMV/ β -gal y 400 ng de pCMV-miR-30 y/o pCMV-miR-21. Para transfecciones que implicaban tanto plásmidos como ARNip, se usó Cellfectamine 2000 (Invitrogen). Cada pocillo recibió 15 ng de pC-MVluc-Target, 8 ng de pBCI2/CMV/ β -gal, 0,2 ng de pRL-CMV (Promega) y 40 pmol del ARNip dNxt y/o dTap. Unas 36-44 horas después, se lisó un pocillo de células y se ensayó para luciferasa de luciérnaga y CAT o luciferasa de Renilla (Zeng et al., RNA 9:112-123 (2003)). Los ARN se aislaron de los dos pocillos restantes usando reactivo Trizol (Invitrogen) o kits RNAeasy (Qiagen). La transferencia de Northern se realizó para al menos dos transfecciones independientes, como se ha descrito previamente (Zeng et al., RNA 9: 112-123 (2003)). Las membranas se hibridaron primero con una sonda luc, se hicieron tiras, y después se sondearon para el ARNm de β -galactosidasa (β -gal).

Resultados

Previamente, se demostró que un gen indicador puede reprimirse en traducción en células humanas tras la sobre-expresión del miARN humano miR-30, si el ARNm afín alberga cuatro copias en tándem de una secuencia diana de ARN protuberante en el 3'UTR (Zeng et al., Mol. Cell 9:1327-1333 (2002)). Las construcciones indicadoras similares usadas aquí se basan en el gen indicador de luciferasa de luciérnaga y contiene ocho sitios diana de ARN dispuestos en tándem en el 3'UTR (Fig. 5B). Esta cantidad es comparable a los siete sitios diana para el miARN lin-4 hallados en el 3'UTR del ARNm de lin-14 en *C. elegans* (Lee et al., Cell 75: 843-854 (1993), Wightman et al., Cell 75:855-862 (1993)) y se eligió en la sonda para maximizar el fenotipo de bajos niveles de miARN expresados de forma endógena. Los sitios diana introducidos eran perfectamente homólogos (P) a los miARN o ARNip usados, o contenían una protuberancia central de 3 nucleótidos predicha (B) (Fig. 5A). Es crítico un control interno para los experimentos descritos y los experimentos iniciales, por lo tanto, implicaban la co-transfección de construcciones indicadoras equivalentes a pCMV-luc-Target (Fig. 5B) con un plásmido de control que codifica luciferasa de Renilla. A la luz de los recientes datos que sugieren que los miARN pueden modular la composición de la cromatina de genes que albergan secuencias homólogas de ADN (Demburg et al., Cell 111:159-162 (2002)), también se construyó una segunda serie de construcciones indicadoras análogas, llamadas pCMV-luc-Target-CAT, en que el gen *cat* se expresaba a partir de un casete presente en el mismo plásmido (Fig. 5B). Se obtuvieron datos muy similares usando cualquier serie de plásmidos indicadores.

miARN humanos sobre-expresados pueden inducir escisión de ARNm.

Aunque la mayoría de los miARN se expresan como ARN monocatenarios derivados de un brazo de la estructura de tronco-bucle pre-miARN, una pequeña cantidad de pre-miARN da lugar a niveles detectables de un miARN derivado de ambos brazos (Lau et al., Science 294:858-862 (2001), Mourelatos et al. Genes Dev. 16:720-728 (2002)). Uno de estos miARN es miR-30 humano, y su forma antisentido anti-miR-30, ambos cuales se han detectado en células humanas (Lagos-Quintana et al., Science 294:853-858 (2001), Mourelatos et al. Genes Dev. 16:720-728 (2002)). Previamente, se había informado de que las células 293T humanas no expresan miR-30 detectable, pero expresan bajos niveles de anti-miR-30 (Fig. 6A, carriles 1 y 3) (Zeng et al., Mol. Cell 9:1327-1333 (2002)). La transfección de células 293T con pC-MV-miR-30, que codifica la estructura de tronco-bucle de pre-miARN miR-30 contenida dentro de un transcrito más largo (Zeng et al., Mol. Cell 9:1327-1333 (2002)), provoca la sobre-expresión de anti-miR-30 y la producción de niveles fácilmente detectables de miR-30 (Fig. 6A, carriles 2 y 4).

Para evaluar la actividad biológica de estos miARN, se transfectaron células 293T con construcciones indicadoras análogas a pCMV-luc-Target-CAT (Fig. 5B) que contenían ocho copias de una secuencia diana perfectamente homóloga a miR-30 [miR-30(P)] o anti-miR-30 [miR-30(AP)] o dianas similares con una forma predicha de una protuberancia central de ARN de 3 nucleótidos [miR-30(B) y miR-30(AB)]. Una secuencia aleatoria de 22 nt sirvió como control de especificidad (Fig. 5A). Cada construcción indicadora se co-transfectó con plásmidos de expresión previamente descritos (Zeng et al., RNA 9:112-123 (2003), Zeng et al., Mol. Cell 9:1327-1333 (2002)) que codificaban miR-30 (y anti-miR-30) o miR21 humano, que aquí sirve como control negativo. Además, estas células también se co-transfectaron con un plásmido que codificaba β -gal.

Como se muestra en la Fig. 6B, la co-transfección de pCMV-miR-30 suprimió la expresión de luc de las cuatro construcciones indicadoras que albergaban dianas de ARN con sentido o antisentido de miR-30, en comparación con el plásmido de control pCMV-miR-21, pero no afectó a la construcción indicadora de control que albergaba la diana aleatoria. Los dos plásmidos indicadores que codifican dianas de ARN perfectas completamente homólogas (P) se inhibieron de forma significativamente más eficaz que las dos construcciones que codificaban sitios diana de ARN protuberantes parcialmente desapareados (B) cuando se co-transfectaba un nivel similar del plásmido efectos pCMV-miR-30. Sin embargo, se pueden conseguir niveles equivalentes de inhibición de expresión de luc por, por ejemplo, co-transfección de un nivel ~10 veces inferior de pCMV-miR-30 con la construcción indicadora pCMV-luc-miR-30 (P)-CAT (Fig. 6B).

La construcción indicadora de control, que alberga ocho copias en tándem de una secuencia diana aleatoria, dio lugar de forma consistente a un nivel ~1,8 veces inferior de actividad luciferasa que el observado con la construcción indicadora que alberga el sitio diana de miR-30 (B) en ausencia de miARN miR-30 sobre-expresado. Aunque sin el deseo de limitarse por teoría alguna, se hipotetiza que esta actividad inferior puede reflejar un débil efecto *cis* no específico de la secuencia aleatoria usada. A pesar de la posibilidad de que la inserción de secuencias en el 3' UTR de un ARNm pudiera ejercer un efecto no específico sobre la función del ARNm, no obstante es de interés, dado que las células 293T expresan un bajo nivel de miARN endógeno anti-miR-30, pero no miR-30 (Fig. 6A), dado que ambas construcciones indicadoras con sensibilidad predicha a anti-miR30 dieron lugar a niveles significativamente inferiores de luciferasa que los plásmidos indicadores apareados específicos para miR-30 (Fig. 6B, compárense las columnas 3 y 5 con 9 y 11). Esta observación es coherente con la hipótesis de que estas construcciones indicadoras se someten a inhibición parcial por el miARN endógeno anti-miR-30.

Para obtener una idea sobre el mecanismo de inhibición de la expresión de luciferasa documentada en la Fig. 6B, a continuación se realizó un análisis de northern que midió el nivel de expresión tanto del ARNm de luc como del

ARNm de control interno de β -gal (Fig. 6C). Coherente con los datos de proteínas, los niveles de ARNm de luc codificados por la construcción indicadora que alberga sitios diana aleatorios no se veían afectados por la expresión de miR-30 o miR-21, aunque se redujeron bruscamente por co-transfección de un plásmido descrito previamente (Zeng et al., RNA 9:112-123 (2003)), llamado pCMV-miR30-luc, que codifica un ARNip que es específico para la fase de lectura abierta de *luc* (Fig. 6C, carriles 2-4). Una observación importante surgió tras la comparación del patrón de expresión del ARNm de luc en cultivos transfectados con plásmidos indicadores que albergaban dianas de ARN perfectas frente a protuberantes. Específicamente, aunque todos los cultivos dieron lugar a niveles detectables del ARNm de longitud completa de ~2,3 kb de luc, los cultivos transfectados con pCMV-miR-30 y plásmidos indicadores que albergaban dianas perfectas fueron diferentes también en dar lugar a una segunda banda de ARNm de luc de ~1,8 kb de tamaño (Fig. 6C, carriles 8, 9 y 13). Este es el tamaño predicho del fragmento 5' del miARN de longitud completa de *luc* que surgiría tras la escisión dentro de los sitios diana de 3' UTR (Fig. 5B) y por lo tanto sugiere que tanto miR-30 (Fig. 6C, carriles 8 y 9) como anti-miR-30 (Fig. 6C, carril 13) son capaces de inducir la escisión específica de un ARNm que alberga sitios diana perfectos cuando se sobre-expresan. De forma importante, la ausencia de escisión detectable de ARNm de luc muy similares que albergan sitios diana protuberantes (Fig. 6C, carriles 6 y 11) no se debe simplemente a un nivel inferior de inhibición, ya que la banda de ARNm de luc más corto seguía siendo fácilmente detectable cuando se preparaba el ARN de células co-transfectadas con la construcción indicadora que albergaba los sitios diana perfectos junto con un bajo nivel de pCMV-miR-30 diseñado para imitar el nivel de inhibición observado cuando los sitios diana eran protuberantes (compárense los carriles 6 y 8, Fig. 6C).

Escisión de un ARNm por un miARN humano endógeno.

A diferencia de miR-30, pero como la mayoría de miARN, el procesamiento del pre-miARN miR-21 da lugar a solamente un miARN maduro estable (Lagos-Quintana, Science 294:853-858 (2001), Zeng et al., RNA 9:112-123 (2003)). Aunque miR-21 se expresa a niveles fácilmente detectables en células 293T, este miARN (pero no su putativo compañero antisentido) puede sobre-expresarse por transfección de células 293T con el plásmido de expresión pCMV-miR-21 (Fig. 6A, carriles 5 y 6).

Se construyeron construcciones indicadoras análogas a pCMV-luc-Target-CAT, pero que contenían ocho copias de una diana perfecta o protuberante específica para miR-21 (Fig. 5A), y se analizó su actividad biológica. Como se muestra en la Fig. 7A, estas construcciones se comportaron de forma similar a las construcciones equivalentes analizadas en la Fig. 6A, en que tanto sitios diana protuberantes como perfectos soportaban la inhibición específica mediante el plásmido efector pCMV-miR-21 co-transfectado, con siendo de nuevo el indicador perfecto algo más sensible. Es de observar que la construcción indicadora pCMV-luc-miR-21(P)-CAT dio lugar a un nivel bastante bajo de expresión enzimática luc incluso en ausencia de un plásmido efector co-transfectado, sugiriendo por tanto de nuevo la inhibición por miR-21 endógeno (Fig. 7A, carril 7).

El análisis de la expresión de ARNm por análisis de transferencia de northern reveló niveles fácilmente detectables del producto de escisión del ARNm de luc de ~1,8 kb en cultivos transfectados con la construcción indicadora que albergaba la diana de miR-31 (P) pero no la diana de miR-21(B) (Fig. 7B, carriles 2, 4 y 5), como también se ha observado previamente con miR-30 (Fig. 6C). De forma importante, sin embargo, este producto de escisión también fue fácilmente detectable, aunque a un nivel inferior, en cultivos transfectados con pCMV-luc-miR-21(P)-CAT que no se co-transfectaron con pCMV-miR-21 (Fig. 6B, carril 6). La explicación más simple para esta observación es que el miARN endógeno miR-21 es responsable de la escisión del ARNm indicador de luc de miR-21(P) dentro de la secuencia diana completamente homóloga. En contraste, ni miR-21 endógeno ni sobre-expresado es capaz de inducir la escisión de ARNm cuando esta diana alberga un apareamiento central (Fig. 6C, carriles 2 y 3). Asimismo, el bajo nivel de miARN endógeno anti-miR-30 (Fig. 6A) también dio lugar a un bajo nivel de escisión del ARNm codificado por la construcción indicadora pCMV-luc-miR-30 (AP)-CAT en algunos experimentos, aunque el producto de escisión del ARNm resultante estuvo presente a niveles solamente apenas por encima del fondo (Fig. 6C, carril 12).

Inhibición de la traducción de ARNm por un ARNip sintético.

Habiendo establecido que los miARN tanto sobre-expresados como endógenos pueden escindir ARNm diana, la siguiente cuestión fue si los ARNip sintéticos pueden inhibir la función del ARNm sin inducir escisión del ARNm. Para abordar esta cuestión, se utilizaron dos ARNip sintéticos específicos para ARNm que codificaban las proteínas Nxt y Tap de *Drosophila*. Aunque estos reactivos pueden inhibir la proteína dNxt y dTap y la expresión del ARNm en células S2 de *Drosophila* transfectadas (Wiegand et al., Mol. Cell. Biol. 22:245-256 (2002)), estas secuencias nucleotídicas diana no están conservadas en los genes humanos *Nxt* y *Tap*.

Se introdujeron por transfección construcciones indicadoras basadas en pCMV-luc-Target, que albergaban secuencias diana perfectas o protuberantes homólogas al ARNip de dNxt (Fig. 5A) en células 293T junto con el ARNip de dNxt o dTap (el último como control negativo) y un plásmido de expresión de β -gal. Como se muestra en la Fig. 8A, tanto la diana protuberante como la perfecta de dNxt soportaron inhibición específica de la expresión de la proteína luc tras co-transfección con el ARNip de dNxt, aunque la diana perfecta fue de nuevo más sensible que la diana protuberante. El análisis de la expresión del ARNm de luc por transferencia de northern reveló una bajada en

el nivel de ARNm de longitud completa de ARNm y la aparición del fragmento truncado predicho del ARNm de luc en cultivos transfectados con la construcción que albergaba la diana perfecta de dNxt, incluso cuando la inhibición de la actividad enzimática luc era solamente de un relativamente modesto factor ~5 (Fig. 8B, carriles 7 y 8). En contraste, una inhibición equivalente de factor ~5 de la construcción que albergaba la diana protuberante de dNxt no logró dar lugar a ningún ARNm truncado detectable de luc y de hecho no logró afectar de forma significativa al nivel de expresión del ARNm de longitud completa de luc (Fig. 8B, carril 5). Por lo tanto se concluyó que la inhibición de la expresión enzimática luc observada con la construcción indicadora que albergaba las dianas protuberantes de dNxt se debe no a la escisión y degradación del ARNm diana de luc sin más bien a alguna forma de inhibición en la traducción.

En resumen, usando ensayos completamente *in vivo* en células humanas, se ha demostrado que el miARN endógeno humano miR-21, o formas sobre-expresadas de los miARN humanos miR-30 y anti-miR-30, puede inducir la escisión de ARNm que albergan sitios diana completamente complementarios, un fenotipo previamente observado como característico de ARNip (Fig. 5 y 7). A la inversa, también se ha demostrado que un ARNip sintético es capaz de regular negativamente la expresión de un ARNm que alberga sitios diana protuberantes parcialmente desapareados, sin inducir escisión detectable de ARNm o reducir los niveles de expresión de ARNm (Fig. 8), un tributo previamente observado como característico de miARN (Hutvágner et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 225-232 (2002))). En conjunto, estos datos indican que los miARN y los ARNip interaccionan de forma idéntica con moléculas de ARNm que albergan sitios diana de complementariedad equivalente, es decir, en ambos casos la homología perfecta conduce a la escisión de ARNm mientras que una protuberancia central induce inhibición en la traducción. Estas observaciones confirman y amplían los recientes datos *in vitro* que documentan la escisión específica de una diana artificial de ARN por un extracto citoplasmático que contiene el miARN humano let-7 (Hutvágner et al., Science 297:2056-2060 (2002)).

La interpretación de los datos anteriores se vio enormemente facilitada por el hallazgo de que el ARNm de ~2,3 kb de luc codificado por las construcciones indicadoras usadas da lugar a un producto estable de ruptura 5' de ~1,8 kb tras la escisión mediada por ARNip o miARN en los sitios diana introducidos. Este intermedio de ARN se detectaba invariablemente cuando un miARN o ARNip encontraba una diana artificial completamente complementaria pero nunca se observó cuando la diana se diseñaba con un desapareamiento central (Fig. 6C, Fig. 7B y Fig. 8B). Este ARN también difería del ARNm de longitud completa de luc en que solamente el último era detectable por análisis de Northern cuando se ensayaba una sonda específica para las secuencias 3' a los sitios diana introducidos. Aunque la estabilidad de este fragmento de ARNm es claramente fortuita, otros han detectado previamente la aparición de un intermedio estable de escisión del ARNm de luc en células tratadas con un ARNip específico para luc (Gitlin et al., Nature 418:320-434 (2002)).

Aunque los datos presentados anteriormente demuestran que los miARN y los ARNip pueden inhibir la expresión de ARNm por mecanismos aparentemente idénticos, podría alegarse que los ARNip podrían ser aún más eficaces en la degradación del ARN que en la inhibición en la traducción, mientras que los miARN podrían presentar la actividad inversa. Sin embargo, tanto para miARN como para ARNip, se observaba inhibición significativamente más eficaz de la actividad enzimática luc si el ARNm de luc albergaba una diana completamente complementaria y por lo tanto se sometía a escisión del ARN (Fig. 6B, 7A y 8A). Esto podría, por supuesto, reflejar simplemente un reclutamiento más eficaz de complejos de ribonucleoproteína que contiene miARN o ARNip a sitios de unión a ARN de mayor afinidad. Sin embargo, aunque RISC parece funcionar como una verdadera enzima de escisión de ARN cuando se presenta con sitios diana de ARN completamente complementarios (Hutvágner et al., Science 297:2056-2060 (2002)), se especula que los desapareamientos en el sitio diana que impiden la escisión, tales como una protuberancia central de ARN, pueden inmovilizar a RISC en su sitio sobre la diana de ARN desapareada. De este modo, dianas de ARN centralmente desapareadas pueden reducir la concentración eficaz de su complejo RISC afín y reducir de este modo la eficacia con que se inhibe la expresión de ARNm.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inhibir la expresión de un gen que comprende introducir en una célula vegetal o en una célula humana o animal no humana aisladas una construcción de ADN que comprende un promotor constitutivo o inducible funcional en dicha célula unido de forma funcional a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, como parte de una secuencia codificada más larga, un precursor de miARN, comprendiendo dicho precursor de miARN una estructura de tronco-bucle y comprendiendo en dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle una secuencia complementaria a una parte de un transcrito de ARN de dicho gen, donde dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle tiene una longitud de aproximadamente 19-45 pares de bases y el bucle de dicha estructura de tronco-bucle comprende aproximadamente 4-25 nucleótidos, donde, después de la introducción de dicha construcción en dicha célula:
 - (i) se transcribe dicha secuencia de nucleótidos,
 - (ii) el transcrito resultante de dicha secuencia de nucleótidos se procesa de modo que dicho precursor de miARN se escinde de dicho transcrito de dicha secuencia de nucleótidos,
 - (iii) dicho precursor de miARN se procesa de modo que un miARN maduro de aproximadamente 21 o 22 nucleótidos de longitud se escinde de dicho precursor de miARN, y
 - (iv) se realiza la inhibición de la expresión de dicho gen.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho bucle de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN comprende una secuencia correspondiente a un miARN de origen natural.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la base de dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN comprende una región de bases apareadas de al menos 3 pares de bases de longitud.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho promotor es un promotor basado en la polimerasa II.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha célula es una célula cultivada.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha célula es una célula humana o animal no humana aislada.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha célula es una célula vegetal.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho miARN maduro induce la degradación de dicho transcrito de ARN de dicho gen.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho transcrito de ARN de dicho gen es un ARNm.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN incluye al menos una protuberancia.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha construcción está presente en un vector viral o un plásmido.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho bucle de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN comprende 6-15 nucleótidos.
13. Una composición que comprende un vehículo y una construcción de ADN que comprende un promotor constitutivo o inducible unido de forma funcional a un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, como parte de una secuencia codificada más larga, un precursor de miARN, comprendiendo dicho precursor de miARN una estructura de tronco-bucle y comprendiendo en dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle una secuencia complementaria a una parte de un transcrito de ARN de un gen diana, donde dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle tiene una longitud de aproximadamente 19-45 pares de bases y el bucle de dicha estructura de tronco-bucle comprende aproximadamente 4-25 nucleótidos, donde dicha construcción es tal que, tras la introducción de dicha construcción en una célula que comprende dicho gen diana, dicho precursor de miARN se transcribe como parte de un transcrito de dicha secuencia codificada más larga que se procesa de modo que dicho precursor de miARN se escinde de la misma, dicho precursor de miARN después se procesa de modo que un miARN maduro de aproximadamente 21 o 22 nucleótidos de longitud se escinde de dicho precursor de miARN, y se realiza la inhibición de la expresión de dicho gen diana.
14. Una célula vegetal o célula humana o animal no humana aislada que comprende una construcción de ADN que comprende un promotor constitutivo o inducible funcional en dicha célula unido de forma funcional a un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, como parte de una secuencia codificada más larga, un precursor de miARN, comprendiendo dicho precursor de miARN una estructura de tronco-bucle y comprendiendo en dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle una secuencia complementaria a una

parte de un transcrito de ARN de un gen en dicha célula, donde dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle tiene una longitud de aproximadamente 19-45 pares de bases y el bucle de dicha estructura de tronco-bucle comprende aproximadamente 4-25 nucleótidos,

- 5 donde dicha construcción es tal que, tras la introducción de dicha construcción en dicha célula, dicho precursor de miARN se transcribe como parte de un transcrito de dicha secuencia codificada más larga que se procesa de modo que dicho precursor de miARN se escinde de la misma, dicho precursor de miARN después se procesa de modo que un miARN maduro de aproximadamente 21 o 22 nucleótidos de longitud se escinde de dicho precursor de miARN, y se realiza la inhibición de la expresión de dicho gen.
- 10 15. La célula vegetal o la célula humana o animal no humana aisladas de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho bucle de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN comprende una secuencia correspondiente a un miARN de origen natural.
- 15 16. La célula vegetal o la célula humana o animal no humana aisladas de acuerdo con la reivindicación 14, donde la base de dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN comprende una región de bases apareadas de al menos 3 pares de bases de longitud.
- 20 17. La célula vegetal o la célula humana o animal no humana aisladas de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho promotor es un promotor basado en la polimerasa II.
- 25 18. La célula vegetal o la célula humana o animal no humana aisladas de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho miARN maduro induce la degradación de dicho transcrito de ARN de dicho gen.
19. La célula vegetal o la célula humana o animal no humana aisladas de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho tronco de dicha estructura de tronco-bucle de dicho precursor de miARN incluye al menos una protuberancia.
20. La célula vegetal o la célula humana o animal no humana aisladas de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicha célula es una célula vegetal presente en una planta.

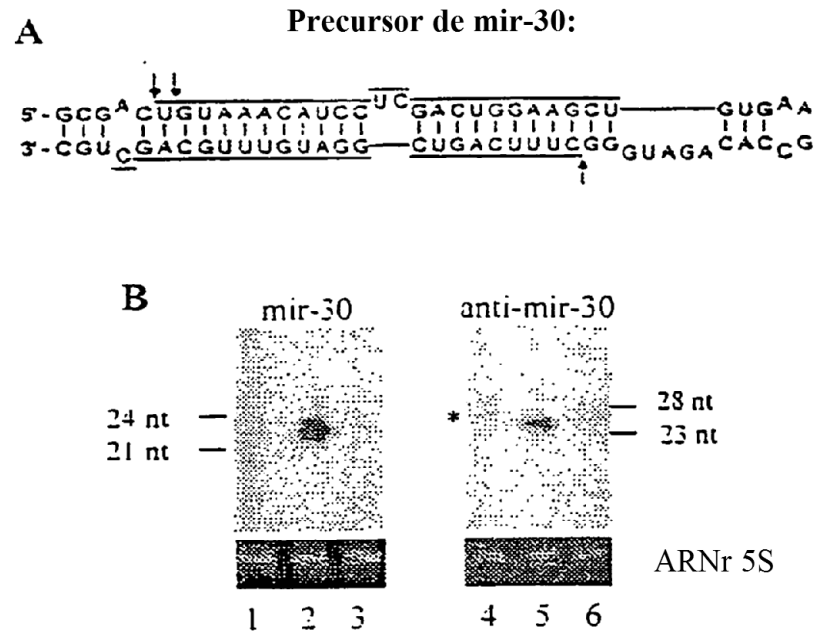
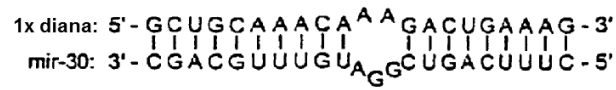
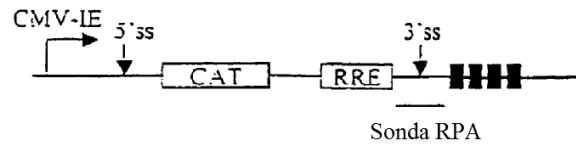


Figura 1

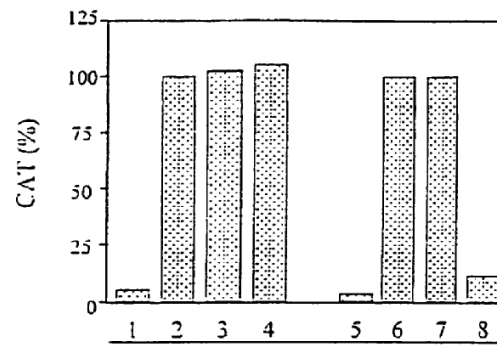
A



pDM128/RRE/4XT:



B



pDM128/RRE	+	+	+	+				
pDM128/RRE/4XT					+	+	+	+
pcRev		+	+	+		+	+	+
pCMV-mir-30			+				+	
pCMV-mir-30				+				+

C

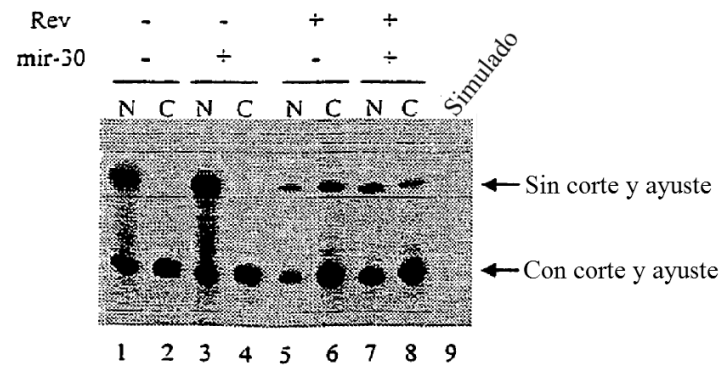


Figura 2

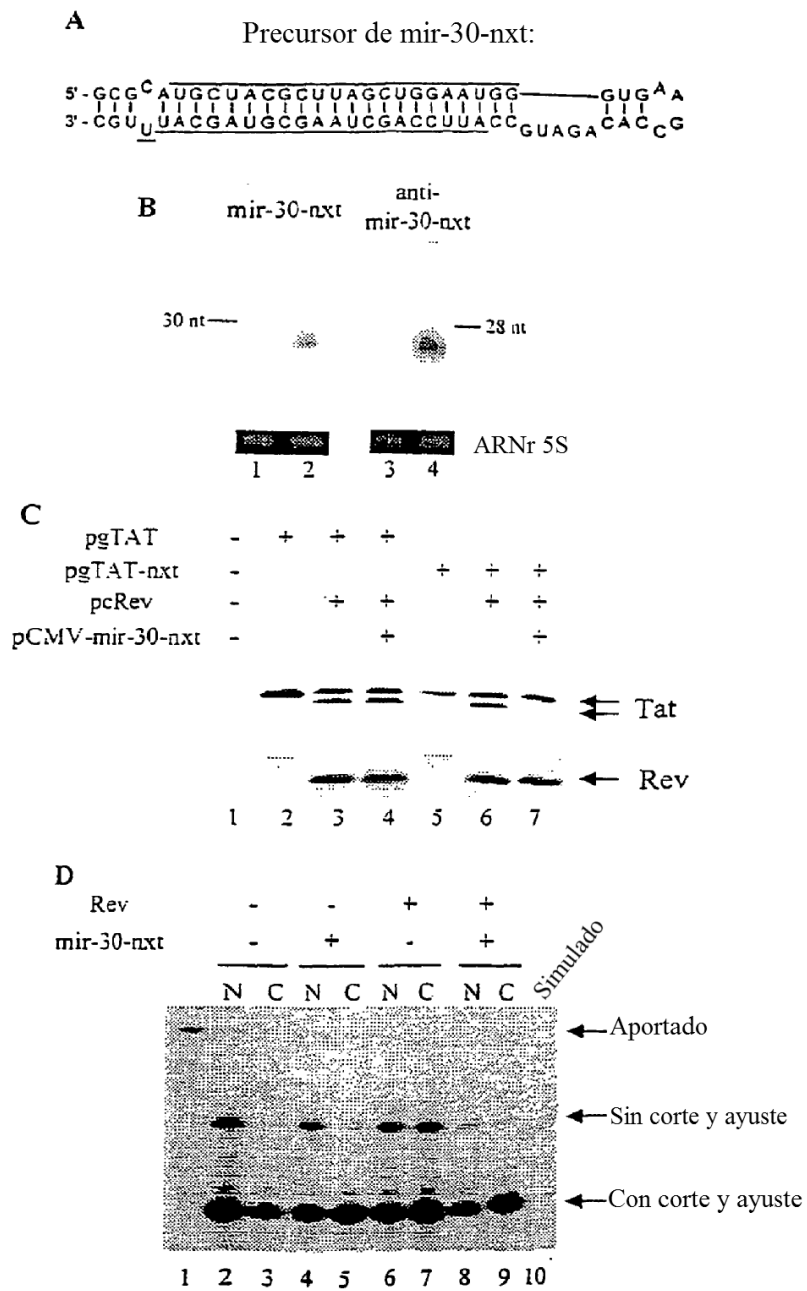


Figura 3

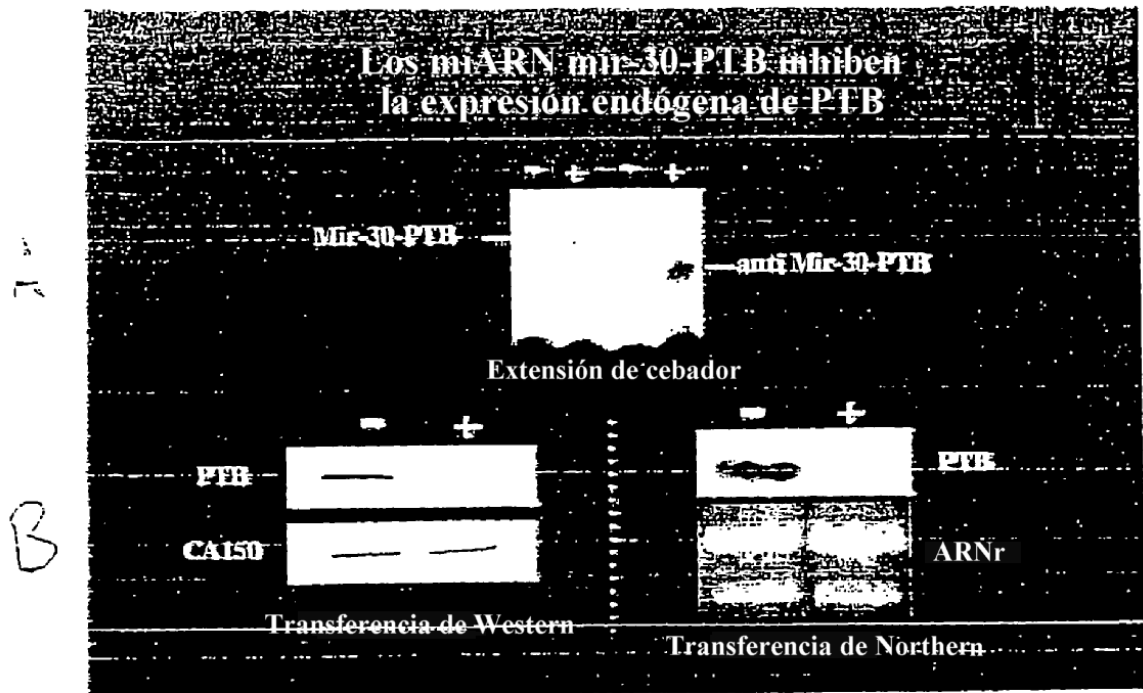


Figura 4

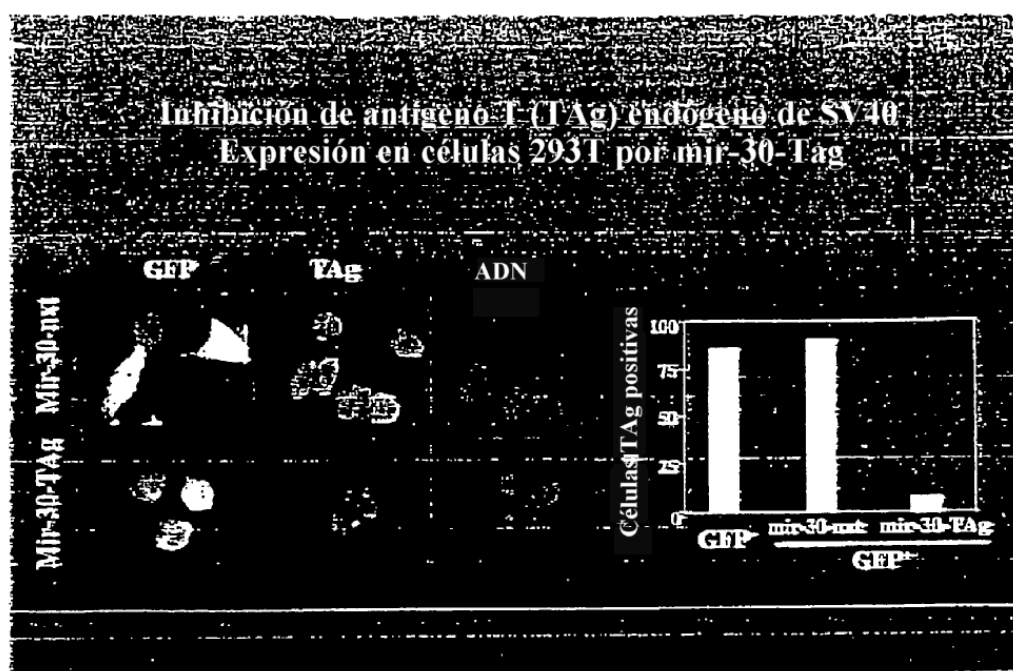


Figura 4

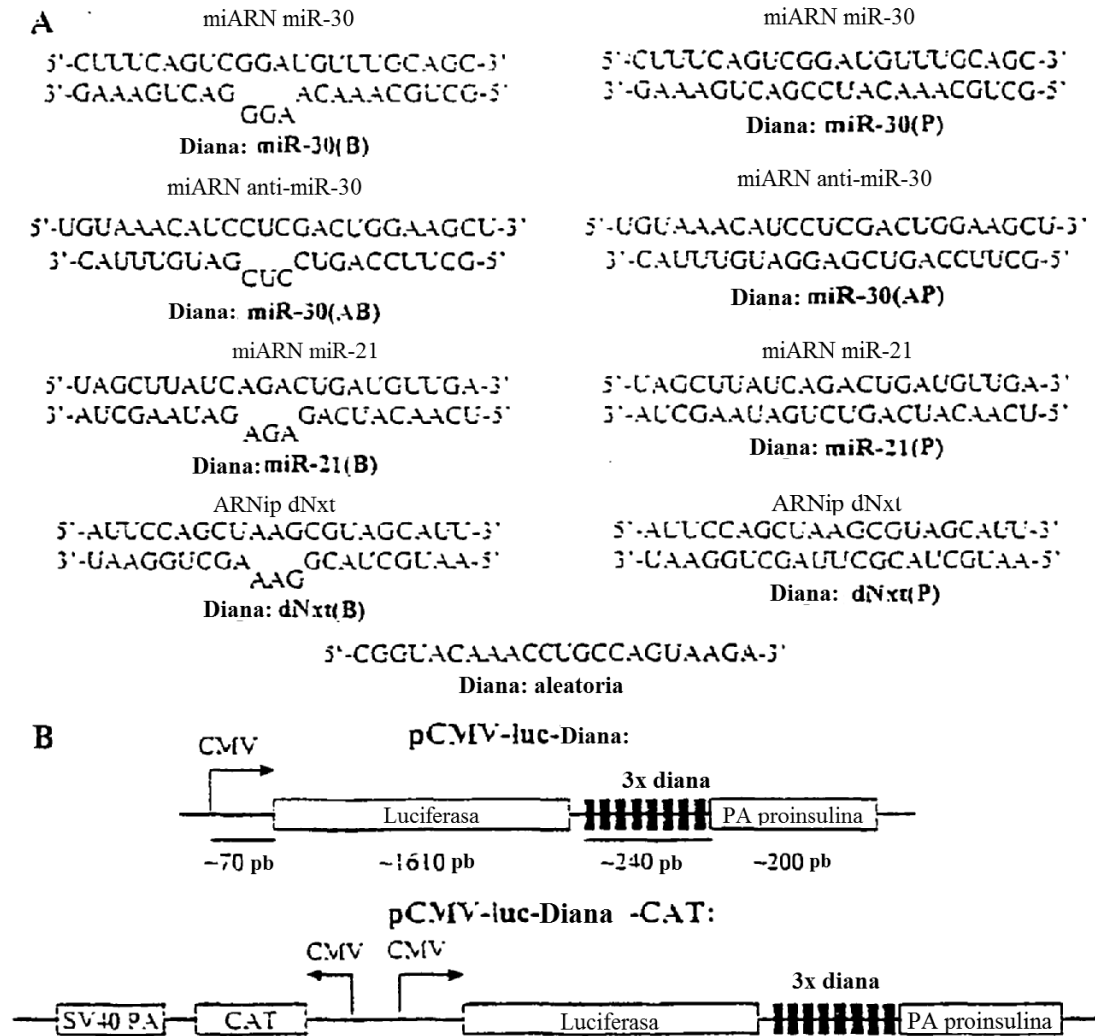


Fig. 5. Diseño de construcción indicadora. A) secuencias de las dianas sintéticas de ARN usadas en este texto y su apareamiento predicho con los miARN miR-30, anti-miR-30 o miR-21 o el ARNip dNxt. Las secuencias diana eran perfectamente complementarias (P) o se diseñaron para que formaran una protuberancia central de 3 nt (B). Una secuencia aleatoria, para la cual se sabe que no existe ARN pequeño complementario, se usó como control. B) Estructura de las construcciones indicadoras pCMV-luc-Target y pCMV-luc-Target-CAT. Las dianas, representadas por recuadros negros, son ocho repeticiones en tándem de una de las secuencias mostradas en el panel A. PA, señal de poliadenilación.

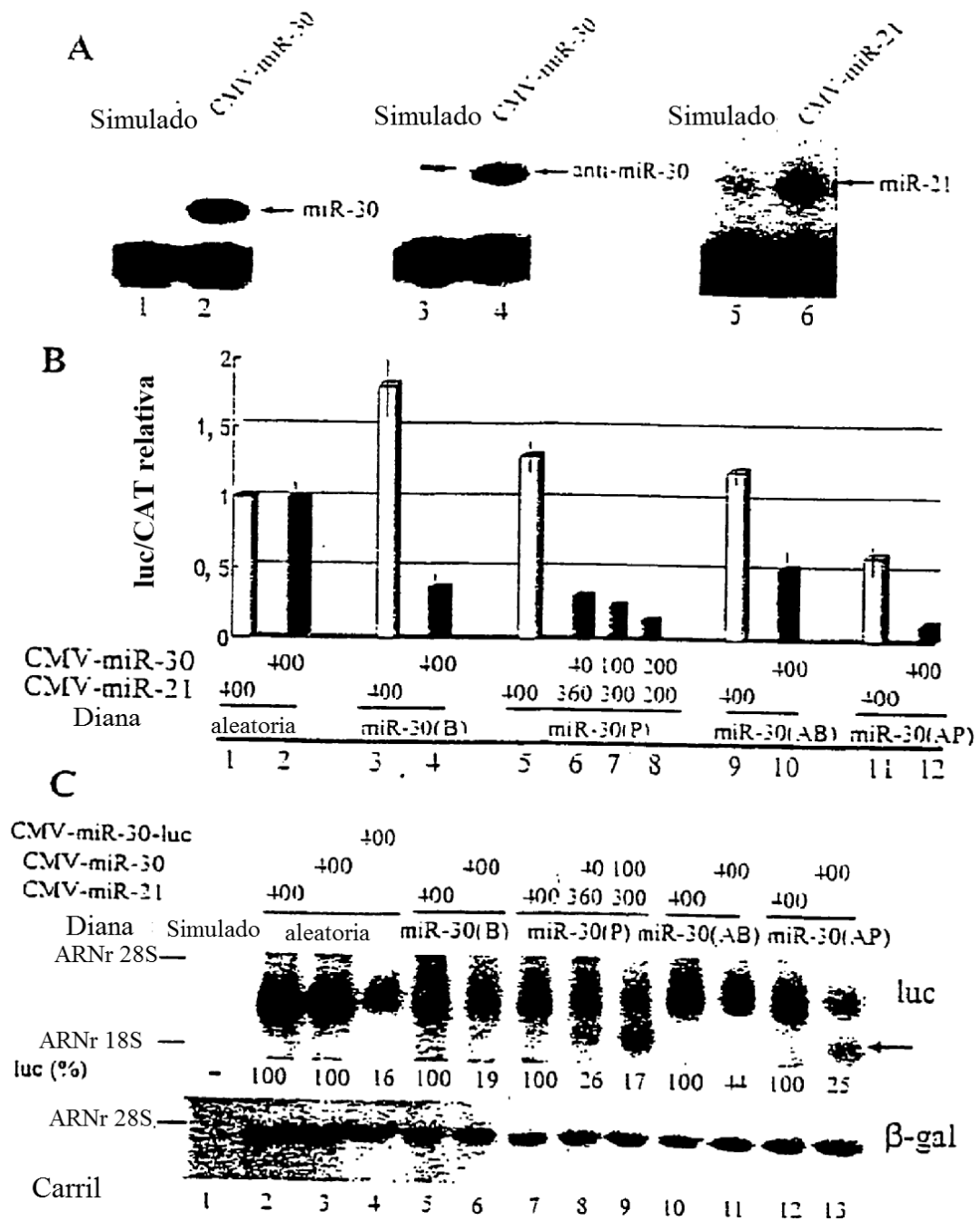


Figura 6

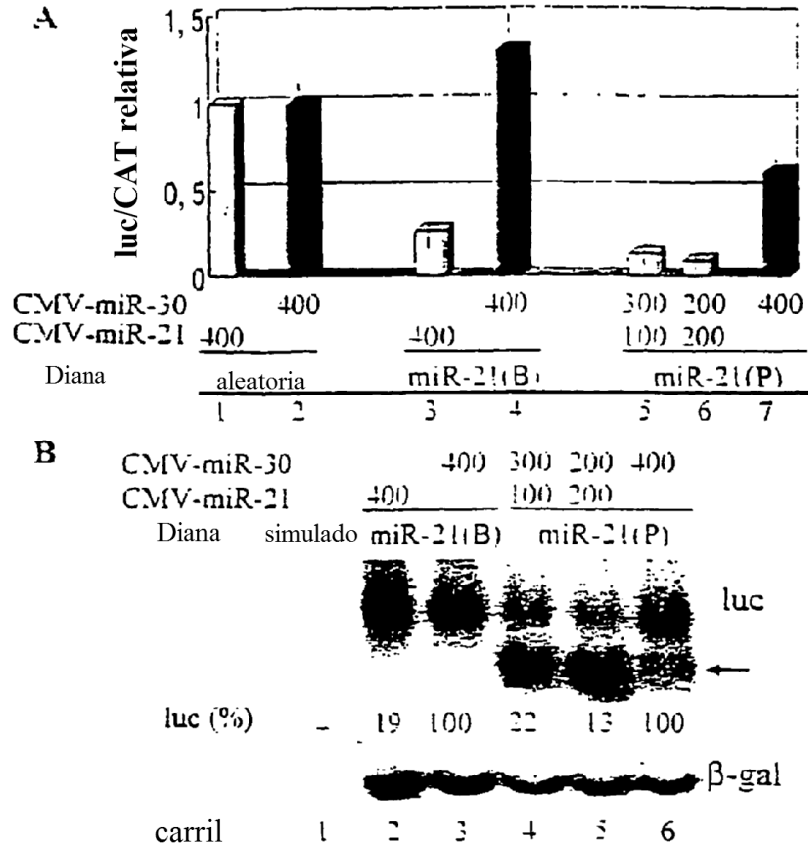


Fig. 7. Actividad biológica del miARN humano miR-21. A) Este experimento se realizó como se ha descrito en la Fig. 2B. Los datos muestran el promedio de 4 experimentos independientes. B) Análisis de northern en paralelo de la expresión de ARNm de luc (panel superior) y β -gal (panel inferior). El nivel de actividad enzimática luc detectado con cada construcción indicadora se da como un porcentaje del nivel obtenido tras co-transfección con el plásmido de control pCMV-miR-30. Carril 1, ARN de células 293T transfectadas de forma simulada. La flecha indica la posición del producto de escisión de ARNm de luc de ~1,8 kb.

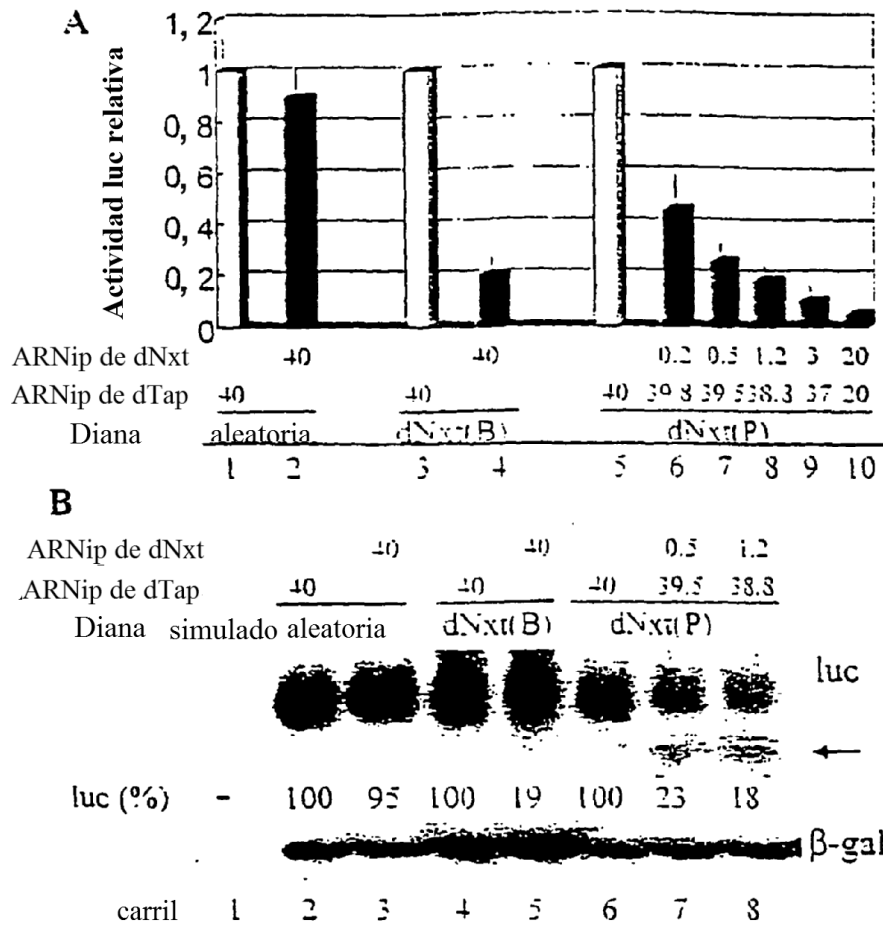


Fig. 8. Inhibición de utilización de ARNm por un ARNip sintético. A) Los cultivos se co-transfectaron con uno de los tres plásmidos indicadores enumerados junto con el ARNip de dNxt o dTap y los plásmidos de control interno pRL-CMV y pBCI2.CMVβ-gal. La cantidad de cada ARNip usada se da en picomoles. Aproximadamente 40 h después de la transfección, los cultivos se usaron para el ensayo dual de luciferasa o para el aislamiento de ARN. Las actividades luc de luciérnaga se ajustaron para variaciones minoritarias en el control interno de luc de Renilla y se presentan normalizadas a la actividad observada en el cultivo transfectado con el plásmido de control pCMV-luc-random y el ARNip de control de dTap, que se estableció a 1,0. Estos datos representan el promedio de tres experimentos independientes, con la desviación típica indicada. B) Análisis de Northern de la expresión del ARNm de luc luciérnaga (panel superior) y β-gal (panel inferior). El nivel de actividad enzimática luc de luciérnaga detectado para cada construcción indicadora se da como un porcentaje del nivel obtenido con el ARNip de control de dTap. Carril 1. ARN de un cultivo transfectado de forma simulada. La flecha indica la posición del producto de escisión del ARNm de luc de ~1,8 kb.