

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 661**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/22**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2012 E 12735349 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2718431**

54 Título: **Endorribonucleasas de ARNbc**

30 Prioridad:

**08.06.2011 PL 39517811  
08.06.2011 US 201161494574 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.01.2016**

73 Titular/es:

**MIEDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ I KOMORKOWEJ (100.0%)  
Ul. Ks. Trojdena 4  
02-109 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**BUJNICKI, JANUSZ MAREK;  
SKOWRONEK, KRZYSZTOF JERZY;  
PIANKA, DARIUSZ y  
SULEJ, AGATA AGNIESZKA**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 555 661 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

Endorribonucleasas de ARNbc

## 5 Campo técnico

El objeto de la invención es una endorribonucleasa de ARN bicatenario (ARNbc) que presenta actividad de escisión específica de secuencia de ARNbc, al uso de la endorribonucleasa de ARNbc para la escisión específica de secuencia de sustrato de ARNbc, al método de escisión específica de secuencia de ARNbc, al método de producción de la endorribonucleasa de ARNbc, a la construcción genética, a la célula hospedadora, al kit y a la enzima que presenta actividad endorribonucleolítica de ARNbc.

## Antecedentes de la técnica

15 Una de las herramientas básicas de la biología molecular son las proteínas con una actividad claramente definida, que se utilizan, por ejemplo, en ingeniería genética, diagnóstico, medicina e industria, en la fabricación y procesamiento de diversos productos.

Las endonucleasas de restricción de ADN son enzimas independientes de secuencia que reconocen y escinden 20 secuencias específicas de ADN bicatenario. También son enzimas conocidas que escinden el ARN en una secuencia determinada, sin embargo, dichas enzimas actúan en el ARN sobre sitios monocatenarios. Los ejemplos de estas enzimas incluyen una proteína de fago RegB, que escinde el ARN monocatenario en el centro de la secuencia GGAG y la Ribonucleasa Y, que escinde el ARN monocatenario en secuencias ricas en A o AU. Estas enzimas requieren determinantes adicionales para la escisión eficaz, tales como estructuras secundarias de ARN y, 25 en el caso de RegB, la interacción con la proteína ribosomal S1 (LebARNbcs, I., *et. al.*, J Biol Chem (2001) 276, 13264-13272, Saida, F. *et. al.*, (2003) Nucleic Acids Res, 31, 2751-2758 y Shahbadian, K. *et. al.*, The EMBO Journal (2009) 28, 3523 - 3533). También se ha intentado modificar la especificidad de la Ribonucleasa T1 y de la Ribonucleasa MC1 (Hoschler, K. *et. al.* J Mol Biol, (1999) 294, 1231-1238, Numata, T. *et. al.*, Biochemistry, (2003) 42, 5270 - 5278). En estos dos casos se crearon variantes enzimáticas en las que se aumentó su especificidad, de uno 30 a dos nucleótidos (Numata, T. y Al., Biochemistry, (2003) 42, 5270-5278, Czaja, R. *et. al.* Biochemistry, (2004) 43, 2854-2862; Struhalla, M. *et. al.* Chembiochem, (2004) 5, 200-205). Sin embargo, todas estas Ribonucleasas aún tienen una especificidad de secuencia muy limitada lo que hace que sean inadecuadas como herramientas de biología molecular en aplicaciones similares a las de las enzimas de restricción de ADN.

35 La ribonucleasa III es un prototipo de nucleasas que escinden el ARN bicatenario (ARNbc) y un miembro fundador de la superfamilia de proteínas Ribonucleasa III, que comparten un dominio catalítico conservado desde el punto de vista evolutivo. En función de la aparición de dominios adicionales, se dividen en cuatro clases. La Clase 1, es decir, las enzimas Ribonucleasa III ortodoxas, tienen un dominio de unión a ARN bicatenario (DURbc) y un solo dominio de Ribonucleasa III. Las enzimas de clase 2 y 3 se representan por Drosha y Dicer, respectivamente, ambas 40 comprende dos dominios de Ribonucleasa III junto con un solo DURbc. Además, las enzimas que pertenecen a la clase 2 poseen dominios adicionales, tales como un dominio de poliprolina y las que pertenecen a la clase 3 dominios DEXD helicasa, DUF283 y PAZ. La clase 4, denominada Mini III, incluye enzimas que solo constan del dominio de Ribonucleasa III.

45 El sustrato natural de la proteína Mini III de *Bacillus subtilis* es el pre-ARNr 23S, en el que los extremos 3' y 5' de la molécula se retiran para producir el ARNr 23S maduro. Sin embargo, se sabe que el sitio de escisión de esta enzima que está cerca del sitio de escisión del pre-ARNr bicatenario es un fragmento de pre-ARNr 23S que forma una hélice irregular, que se especuló que era necesario para el reconocimiento del sustrato (Redko, Y. *et. al.*, Molecular Microbiology, (2008) 68 (5), 1096-1106). Además, se observó que la actividad endorribonucleolítica *in vitro* de Mini III 50 estaba estimulada por la proteína ribosomal L3 unida al extremo 3' del ARNr 23S. Esto es una prueba indirecta de que la proteína L3 potencia la escisión del sustrato modificando la conformación del ARN (Redko, Y. *et. al.*, Molecular Microbiology, (2009) 71 (5), 1145-1154).

No se conocen enzimas que realicen una fragmentación específica y definida del ARNbc con propiedades similares 55 a las de las endonucleasas de restricción de ADN o ADN nickasas (documento JP 54059392 - A, 12.05.1979). El ARNbc puede escindirse por endorribonucleasas de la familia de Ribonucleasa III, pero no se conocen detalles de interacciones entre la Ribonucleasa III y el ARNbc (Herskovitz, M.A. *et. al.*, Molecular Microbiology, (2000) 38 (5), 1027-1033). Los criterios para la unión específica de sitio y el procesamiento selectivo aún continúan sin entenderse (Dasgupta S. *et. al.*, Molecular Microbiology, (1998) 28 (3), 629-640). Sin embargo, se usan endonucleasas de 60 ARNbc inespecíficas para generar fragmentos cortos de ARN bicatenario (documento US 2006057590 - A1, 16.03.2006, NOVARTIS). La obtención de enzimas que presentan especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc permitirá desarrollar todas las áreas de técnicas de manipulación de ARN, pero también desarrollar nuevos métodos de investigación, nuevas aplicaciones de dichas enzimas y nuevas tecnologías procedentes de las mismas.

**Descripción de la invención**

En vista del estado de la técnica descrito, el objeto de la presente invención es superar las desventajas indicadas y proporcionar una endorribonucleasa de ARNbc específica de secuencia, con alto reconocimiento y escisión.

5 También es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos de determinación, de aislamiento, de selección, de obtención y de preparación de dichas endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, y sus variantes mejoradas.

De manera inesperada, los autores de la invención han descubierto que una enzima de la superfamilia de  
10 Ribonucleasa III que, de acuerdo con técnicas de modelación por ordenador, contiene un bucle que localiza en, e interacciona con, el surco principal de la hélice de ARNbc, puede tener una preferencia para escindir una secuencia de nucleótidos de ARNbc particular. Los autores de la invención han descubierto que dicha preferencia depende únicamente de la secuencia de ARNbc y que es independiente de la presencia de la estructura de hélice del ARNbc irregular y/o de la interacción con otras proteínas. Los autores de la invención han descubierto que la enzima que  
15 pertenece a la superfamilia de Ribonucleasa III, que contiene fragmentos de la cadena polipeptídica que, en formas de modelación por ordenador, forma un bucle que se localiza en, e interacciona con, el surco principal de ARNbc, puede realizar la fragmentación específica y definida del ARNbc con propiedades similares a las de las endonucleasas de restricción para el ADN.

20 En un aspecto, la invención proporciona la endorribonucleasa de ARNbc que presenta propiedades específicas de secuencia en la escisión del ARNbc, que tiene un bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc que presenta especificidad de secuencia en la escisión de ARNbc. En la endorribonucleasa de ARNbc, el bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal del ARNbc, tiene la secuencia de aminoácidos de la endorribonucleasa de ARNbc, que corresponde al bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal del  
25 ARNbc en el modelo de estructura de endorribonucleasa Mini III en complejo con ARNbc.

También se describen endorribonucleasas de ARNbc, con el bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal del ARNbc que corresponde al bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc formado por un fragmento de endorribonucleasa FNU de *Fusobacterium nucleatum* como se muestra en la SEC ID  
30 N°: 3 y/o por un fragmento de endorribonucleasa BSU de *Bacillus subtilis* como se muestra en la SED ID N°: 4 y/o por un fragmento de endorribonucleasa BCE de *Bacillus cereus* como se muestra en la SEC ID N°: 5.

La endorribonucleasa de ARNbc de la invención, comprende la secuencia de aminoácidos de la endorribonucleasa de ARNbc BSU de *Bacillus Subtilis* de SEC ID N° 1, que muestra especificidad de secuencia en la escisión del  
35 ARNbc y que contiene una sustitución de aminoácido D94R.

También se desvela la endorribonucleasa de ARNbc, su derivado y/o variante que comprende la endorribonucleasa FNU de *Fusobacterium nucleatum* o un fragmento de endorribonucleasa FNU de *Fusobacterium nucleatum*, que muestra especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc. También se desvela la endorribonucleasa de ARNbc,  
40 su derivado y/o variante que también comprende la endorribonucleasa BCE de *Bacillus Cereus* o un fragmento de endorribonucleasa BCE de *Bacillus cereus*, que presenta especificidad de secuencia en la escisión de ARNbc.

También se desvela un método de obtención de una endorribonucleasa de ARNbc que presenta especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc, que comprende las siguientes etapas:  
45

a) la selección de la endorribonucleasa de ARNbc, su variante y/o derivado funcional que comprende una secuencia de aminoácidos que forma bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal del ARNbc, en el que el bucle está formado por la secuencia de aminoácidos de la endorribonucleasa de ARNbc, que corresponde al modelo de bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal del ARNbc determinado por el modelo tridimensional del complejo de endorribonucleasa Mini III con ARNbc;  
50 b) la clonación del gen o fragmento del mismo que codifica una endorribonucleasa de ARNbc, su variante y/o derivado funcional, que comprende la secuencia que forma un bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc.

55 Adicionalmente, el método de obtención de la endorribonucleasa de ARNbc incluye preferentemente que, después de la etapa b) en la etapa c) siguiente se exprese la proteína codificada por el gen, o fragmento del mismo, obtenida en la etapa b), y que preferentemente después de la etapa c) también venga la etapa d) en la que se determina la especificidad de secuencia de la endorribonucleasa de ARNbc aislada.

60 En un método desvelado de obtención de una endorribonucleasa de ARNbc, el bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc, corresponde a la secuencia de aminoácidos que forma un bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal del ARNbc formado por un fragmento de endorribonucleasa de ARNbc FNU de *Fusobacterium nucleatum* como se muestra en la SEC ID N°: 3 y/o por un fragmento de endorribonucleasa BSU de *Bacillus subtilis* como se muestra en la SEC ID N°: 4 y/o por un fragmento de  
65 endorribonucleasa BCE de *Bacillus cereus* como se muestra en la SEC ID N°: 5.

Por otra parte, se desvela el método de obtención de un derivado y/o variante de endorribonucleasa de ARNbc con selectividad de secuencia alterada para la escisión específica de secuencia del ARNbc, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) la introducción de uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente al bucle localizado en el surco principal del ARNbc para la endorribonucleasa de ARNbc obtenida en el método de obtención de endorribonucleasa de ARNbc de la descripción, que presenta especificidad de secuencia en la escisión de ARNbc.
- 10 b) la expresión del derivado y/o variante de la endorribonucleasa de ARNbc a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida en la etapa a), y
- c) la identificación de la especificidad de secuencia alterada del derivado y/o variante de la endorribonucleasa de ARNbc.

En dicho método el cambio en la selectividad del derivado y/o variante de la endorribonucleasa de ARNbc conduce a un derivado y/o a una variante con selectividad aumentada por la secuencia de nucleótidos en la escisión del ARNbc.

La invención también se refiere a un método para producir endorribonucleasa de ARNbc, que incluye la etapa de expresar la endorribonucleasa de ARNbc de la invención que presenta especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc.

La invención también se refiere a una construcción genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endorribonucleasa de ARNbc de la invención que presenta especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc.

Es también objeto de la invención una célula hospedadora que comprende una construcción genética de la invención.

También se desvela el uso del gen que codifica la endorribonucleasa de ARNbc FNU de *Fucobacterium nucleatum* o fragmento de la misma y/o su variante funcional y/o derivado para producir endorribonucleasas de ARNbc que presenten escisión de ARNbc específica de secuencia. En una aplicación de interés, la endorribonucleasa de ARNbc FNU de *Fucobacterium nucleatum*, su derivado y/o variante, comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 3.

También se desvela el uso del gen que codifica la endorribonucleasa de ARNbc BCE de *Bacillus cereus* o un fragmento de la misma y/o su variante funcional y/o derivado para producir endorribonucleasas de ARNbc que presenten especificidad de secuencia por la escisión de ARNbc. Preferentemente, la endorribonucleasa de ARNbc BCE de *Bacillus cereus*, su derivado y/o variante comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 5.

En el siguiente aspecto la invención se refiere al uso del gen que codifica la endorribonucleasa de ARNbc BSU de *Bacillus subtilis* mostrada en la SEC ID N°: 1 para producir una endorribonucleasa de ARNbc que presente escisión de ARNbc específica de secuencia. El gen que codifica la endorribonucleasa de ARNbc BSU de *Bacillus subtilis* comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, y el gen que codifica la endorribonucleasa de ARNbc BSU de *Bacillus subtilis* comprende la sustitución D94R.

La invención también se refiere al kit que comprende la endorribonucleasa de ARNbc de la invención que presenta especificidad de secuencia en la escisión de ARNbc. El kit contiene la endorribonucleasa de ARNbc BSU de *Bacillus subtilis* que comprende la sustitución D94R que presenta especificidad de secuencia en la escisión de ARNbc. También se desvelan kits que comprenden la endorribonucleasa de ARNbc FNU de *Fucobacterium nucleatum* y/o la endorribonucleasa de ARNbc DCE de *Bacillus cereus*.

La invención también se refiere a la enzima con actividad endorribonucleasa de ARNbc, que comprende una secuencia o un fragmento de la secuencia de aminoácidos de *Bacillus subtilis* mostrada en la SEC ID N: ° 1, que presenta especificidad de secuencia y escinde el ARNbc dentro de la secuencia consenso

5' DACCUHD 3'  
3' HUGGADH 5'

en la que H=A o C=U; D=A o G o U. La enzima preferida corta el ARNbc dentro de la secuencia consenso.

5' YGACCUCGNNG 3'  
3' RCUGGAGCNNC 5'

en la que Y=C o U; R=A o G; N=G o A o U o C.

La enzima comprende la sustitución D94R del resto de aminoácido 94 que se presenta en la SEC ID N°: 1.

La especificidad de secuencia de escisión de ARNbc significa la capacidad de la endorribonucleasa de ARNbc para reconocer y cortar el ARNbc dependiendo solo de su secuencia y no de la existencia de una estructura de hélice irregular en una o ambas cadenas de ARNbc y/o de la interacción de otras proteínas auxiliares.

La expresión un derivado y/o una variante de endorribonucleasa de ARNbc, de la manera en la que se describe en el presente documento, significa proteínas, polipéptidos, péptidos o proteínas, polipéptidos y péptidos recombinantes que comprenden la secuencia de aminoácidos, idéntica o muy similar, a la secuencia de aminoácidos de la endorribonucleasa de ARNbc que presenta especificidad de secuencia de escisión de ARNbc, que tiene un bucle que se localiza en, e interacciona con, el surco principal del ARNbc conservando la actividad característica y la preferencia de secuencia de la endorribonucleasa de ARNbc. Dichos ejemplos de derivados y variantes en el modelo de la estructura tendrán un bucle que se corresponde con el bucle que se localiza en, e interacciona con, el surco principal del ARNbc en el modelo estructural del complejo de endorribonucleasa Mini III con ARNbc. En los derivados y/o variantes de la endorribonucleasa de ARNbc que presentan especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc, las secuencias codificantes pueden modificarse mediante sustitución, remplazo, delección o inserción, u otros medios, en relación con la secuencia inicial. Por analogía, dicha expresión debe entenderse del mismo modo para el gen y/o derivado y/o una variante del gen que codifica la endorribonucleasa de ARNbc con dicha característica.

Las endorribonucleasas de ARNbc que presenta especificidad de secuencia, sus derivados y/o variantes de la divulgación y su uso, permiten desarrollar un campo de técnicas completamente nuevo para manipular el ARN, así como desarrollar nuevos métodos de investigación, nuevos usos de dichas enzimas y nuevas tecnologías derivadas de las mismas. Las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes, se utilizarán, por ejemplo, en estudios estructurales de ARN para entender la estructura de las moléculas de ARN y/o sus modificaciones, en la generación de moléculas de ARNi, en particular, ARNip, en el diagnóstico y en el tratamiento de enfermedades de plantas y animales causadas por virus, así como en aplicaciones de nanotecnología que están basadas en lo que se denomina 'tectónica de ARN'.

Las nuevas endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes de la divulgación, se utilizarán para nuevas aplicaciones biotecnológicas. Se sabe que son enzimas que cortan ARN monocatenario de una manera dependiente de secuencia, pero su actividad no solo depende de la secuencia del sustrato, sino también de su estructura secundaria, por tanto, en la práctica, no son muy útiles. Las nuevas endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia de ARNbc, sus derivados y/o variantes de la divulgación no tienen estos inconvenientes y pueden utilizarse como reactivos habituales de laboratorio, tales como las endonucleasas de restricción usadas en biología molecular. Además de las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes también pueden utilizarse en el campo de la medicina, del diagnóstico y de la nanotecnología. Por ejemplo, actualmente, la secuenciación directa de ARN en la reacción de transcripción inversa o en la espectrometría de masas se utiliza más frecuentemente para identificar modificaciones en estudios estructurales de ARN, pero en ambos casos, el análisis de moléculas de gran tamaño (por ejemplo ARNr o ARNm) no es fácil. En estos métodos, el ARN se fragmenta en productos de ARN cortos o en ribonucleótidos mediante ribonucleasas inespecíficas y la multitud de productos hace que sea difícil, o incluso imposible, interpretar los resultados. La aplicación de nuevas endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes, permiten realizar la escisión controlada de la molécula de ARN en fragmentos repetitivos más cortos. El peso molecular y las propiedades podrían determinarse independientemente, permitiendo analizar las modificaciones químicas de los ribonucleótidos y realizar estudios estructurales de ARN anteriormente imposibles o muy difíciles. Dichos estudios de modificaciones y estructuras de las moléculas de ARN ofrecerán información sobre posibles dianas terapéuticas, por ejemplo, mecanismos de resistencia de bacterias a los antibióticos. La aplicación de las nuevas endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes, permite desarrollar tecnologías basadas en moléculas de ARNi, de ARNbc interferencia corto. Las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes, se usarán en los métodos y aplicaciones del ARNip para el silenciamiento génico, por ejemplo, en medicina para tratar el cáncer, en enfermedades metabólicas y en trastornos neurodegenerativos. Actualmente, una de las estrategias que conducen a la obtención de un ARNbc corto es tratar el ARNbc largo, producido a partir de un segmento particular de ADN, con Ribonucleasa III de *Escherichia coli*. Esta enzima corta el ARNbc de una manera no específica, produciendo de 18 a 25 fragmentos de pares de bases. Los fragmentos cortos se utilizan para el silenciamiento génico. Para la producción de ARNip específico pueden utilizarse posibilidades completamente nuevas y desconocidas mediante endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes de la divulgación, que permitan la generación del conjunto de fragmentos de ARNbc definido que silencia de un modo eficaz, la expresión de un gen particular sin que se produzcan efectos distintos a los deseados.

Las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes, pueden aplicarse en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades causadas por virus de ARNbc. Dichos virus pertenecen a la familia *Reoviridae* en la cual tres grupos son patógenos para los seres humanos. Actualmente para detectar e identificar estos grupos se utiliza la reacción de transcripción inversa seguida de PCR. La disponibilidad de las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes de la divulgación, permiten

manipular el ARNbc lo cual acelera significativamente el diagnóstico. En la actualidad, el tratamiento de rotavirus es muy poco eficaz. Las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes, se utilizarán como fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por rotavirus, mediante escisión de un genoma viral específico, impidiendo de esta manera su replicación posterior.

5

Las endorribonucleasas de ARNbc específicas de secuencia, sus derivados y/o variantes también se utilizarán en nanotecnología, en particular en la "tectónica de ARNbc" y en la creación de nanoestructuras basadas en una secuencia y estructura determinadas de ARN.

10 Todas las publicaciones citadas en la descripción, así como sus referencias, se incluyen como referencia en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

15 Para un mejor entendimiento, la invención se ha ilustrado con los ejemplos y las figuras que se adjuntan, en las que:

La **Figura 1** representa un modelo estructural del complejo de endorribonucleasa Mini III de *Fusobacterium nucleatum* y el ARNbc. El bucle (B), localizado en el surco principal del ARNbc, se indica con una flecha.

20 La **Figura 2** muestra la escisión *in vitro* mediante la endorribonucleasa BSU de *Bacillus subtilis* realizada para determinar las condiciones de reacción óptimas. A – efecto del pH sobre la escisión de ARNbc de 234 pb. 1 - pH 6,8, 2 - pH 7,0, 3 - pH 7,5, 4 - pH 7,8, 5 - pH 8,0, 6 - pH 8,2, 7 - pH 8,5, 8 - pH 8,8, 9 - marcador de ARNbc (New England Biolabs No: N0363S). B – efecto de la temperatura sobre la escisión del ARNbc de 234pb. 1 – 15 °C, 2 – 25 °C, 3 – 30 °C, 4 – 35 °C, 5 – 40 °C, 6 – 45 °C, 7 – 50 °C, 8 – 55 °C. C – efecto de la concentración de NaCl sobre la escisión de ARNbc de 234 pb. 1 - 5 mM, 2 - 20 mM, 3 - 40 mM, 4 - 60 mM, 5 - 80 mM, 6 - 100 mM, 7 – sin sustrato escindido, 8 – marcador de ARNbc (New England Biolabs No: N0363S); D – efecto de la concentración de iones Mg<sup>2+</sup> en mM sobre la escisión de ARNbc de 234 pb. 1 - 0,03, 2 - 0,05, 3 - 0,08, 4-0,1, 5 - 0,25, 6 - 0,5, 7-1,8- 2,5, 9 - 5, 10 - 7,5, 11 - 10, 12 - 12,5, 13 - 15, 14 - 17,5 mM de Mg<sup>2+</sup>.

30 La **Figura 3** presenta la sensibilidad de la endorribonucleasa BSU con respecto a la metilación de la ribosa en las guanosinas cercanas al sitio de escisión. (A) secuencias de dos sustratos: el sitio de escisión se indica con flechas, la metilación de la ribosa se indica con un asterisco (B) escisión de sustratos con y sin metilación de ribosa. 1 – 30 pb de sustrato no escindido sin metilación, 2-30 pb de sustrato no escindido con metilación de la ribosa en la guanosina adyacente al sitio de escisión, 3-30 pb de sustrato no escindido con metilación de la ribosa en la guanosina en el segundo nucleótido adyacente al sitio de escisión, 4 – marcador de ARNbc (New England Biolabs No: N0363S), 5 - 30 pb de sustrato sin metilación tratado con endorribonucleasa BSU, 6 - 30 pb de sustrato con metilación de la ribosa en el resto de guanosina adyacente al sitio de escisión tratado con endorribonucleasa BSU, 7 - 30 pb de sustrato con metilación de la ribosa en la guanosina en el segundo nucleótido adyacente al sitio de escisión.

40

**Figura. 4.** Determinación de la longitud mínima del sustrato para la endorribonucleasa BSU. 1 - sustrato de 18 pb tratado con endorribonucleasa BSU, 2 - sustrato de 18 pb no tratado, 3 sustrato de 20 pb tratado con endorribonucleasa BSU, 4 - sustrato de 20 pb no tratado, 5- sustrato de 22 pb tratado con endorribonucleasa BSU, 6 - sustrato de 22 pb no tratado, 6 – marcador de ADN (ultra bajo intervalo, Fermentas nº: SM1211).

45

**Figura. 5.** Comparación de preferencias de secuencia de la endorribonucleasa BSU de tipo silvestre (endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>) y variante D95R (endorribonucleasa BSU<sup>D95R</sup>). 1 – genoma de ARNbc del bacteriófago Φ6, 2 – genoma de ARNbc del bacteriófago Φ6 escindido con endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>, 3 – genoma de ARNbc del bacteriófago Φ6 escindido con la endorribonucleasa BSU<sup>D94R</sup>, 4 – ARNbc de 234 pb, 5 – ARNbc de 234 pb escindido con endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>, 6 – ARNbc de 234 pb escindido con la variante D94R

50

**Figura. 6. (A):** Identificación del sitio de escisión de la endorribonucleasa BSU en la cadena superior del ARNbc de 234 pb. 1 – mapeo del sitio de escisión en la cadena superior, 2 – terminación de cadena con ddCTP, 3 – terminación de cadena con ddTTP 4 – terminación de cadena con ddATP, 5 – terminación de cadena con ddGTP.

55 **(B):** Identificación del sitio de escisión de la endorribonucleasa BSU en la cadena inferior del ARNbc de 234 pb. 1 – mapeo del sitio de escisión en la cadena inferior, 2 – terminación de cadena con ddGTP, 3 – terminación de cadena con ddATP, 4 – terminación de cadena con ddTTP, 5 – terminación de la cadena con ddCTP.

**Figura. 7 (A)** Identificación del sitio de escisión en el sustrato de ARNbc de 30 pb con la secuencia alrededor del sitio de escisión en el ARNbc de 234 pb. S - sustrato, P - producto, M - marcador, **(B):** muestra la geometría de la escisión del ARNbc mediante la endorribonucleasa BSU.

60

**Figura. 8.** Escisión de sustratos de ARNbc de 30 pb. 1- sustrato de 30 pb con secuencia preferida, 2 – sustrato de 30 pb con secuencia preferida tratada con endorribonucleasa BSU durante 15 min., 3 – sustrato de 30 pb con secuencia preferida tratada con endorribonucleasa BSU durante 30 min, 4 – sustrato de 30 pb con secuencia preferida tratada con endorribonucleasa BSU durante 60 min, 5 – marcador de ADN (ultra bajo intervalo, Fermentas

65

n°: SM1211), 6 – sustrato N1 de 30 pb, 7 – sustrato N1 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 15 min, 8 – sustrato N1 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 30 min, 9 – sustrato N1 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 60 min, 10 – sustrato N2 de 30 pb, 11 – sustrato N2 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 15 min, 12 – sustrato N2 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 30 min, 13 – sustrato N2 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 60 min, 14 – sustrato N3 de 30 pb, 15 – sustrato N3 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 15 min, 16 – sustrato N3 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 30 min, 17 – sustrato N3 de 30 pb tratado con endorribonucleasa BSU durante 60 min.

## 10 Descripción de las realizaciones

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar la invención y para explicar, sin limitar, sus diversos aspectos, y no deben equipararse con toda su gama, que se definen en las reivindicaciones adjuntas.

15 En los siguientes ejemplos, a menos que se indique otra cosa, se emplean los materiales y los métodos convencionales descritos en Sambrook J. *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición 1989. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press o se realizan según las recomendaciones del fabricante para los materiales y métodos específicos. En el presente documento, a menos que se indique otra cosa, se usan las abreviaturas convencionales de los aminoácidos y nucleótidos o ribonucleótidos.

20

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

25 Identificación informática de genes que codifican proteínas con actividad de escisión de ARNbc dependiente de secuencia.

El ARNbc bicatenario (ARNbc) corta enzimas que contienen un dominio de ribonucleasa III. Este grupo incluye las enzimas Dicer y Drosha, que contienen dominios adicionales que son necesarios para el funcionamiento de dichas enzimas. En el presente documento también se clasifican endorribonucleasas de ARNbc bacteriano, con dominios de unión a ARNbc adicionales y enzimas sin ningún dominio de unión a ARNbc adicional.

30

Los registros con los números 2EZ6, 2GSL, 1U61, están disponibles en la base de datos PDB (la base de datos PDB presenta las coordenadas espaciales de estructuras experimentalmente resueltas de proteínas y ácidos nucleicos y sus complejos: <http://www.pdb.org>), y se usaron para seleccionar proteínas con una especificidad de sustrato deseada. La proteína 2EZ6 presenta la estructura de la ribonucleasa III de *Aquifex aeolicus* que tiene un dominio de unión a ARNbc, junto con el sustrato de ARNbc. Las proteínas 2GSL y 1U61 presentan estructuras de endorribonucleasas Mini III (que no poseen dominio de unión a ARNbc) de *Fusobacterium nucleatum* y de *Bacillus cereus*, respectivamente. Usando el programa Swiss-PdbViewer (Guex, N., *et. al*, Electrophoresis, (1997) 18, 2714-2723), la estructura de la proteína 2GSL se superpuso en el centro catalítico de la proteína 2EZ6 en el complejo con el sustrato de ARNbc. Se descubrió que la endorribonucleasa 2GSL equiparable tenía un bucle que se localizaba en el surco principal del ARNbc (véase la Figura 1). El fragmento de la cadena polipeptídica, que se localiza en el surco principal, se identificó después de la retirada de la enzima original del complejo 2EZ6 y de la creación de un nuevo complejo con la proteína derivada de 2GSL y ARNbc de 2EZ6. Un modelo estructural del complejo proteína - Mini III indica que el bucle abarca la secuencia AKNSNIKTFPRSCT de la proteína Mini III de *Fusobacterium nucleatum* (FNU), y la alineación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas similar a la de la proteína Mini III indica que el bucle de la proteína Mini III de *Bacillus subtilis* (BSU) tiene una secuencia de aminoácidos GRNAKSGTTPKNTD. El bucle de cada miembro de la familia de proteínas Mini III tiene una secuencia de aminoácidos diferente, sin embargo puede localizarse en el surco principal del ARNbc y proporcionar una base para interacciones específicas de secuencia de Mini III con ARNbc. Las interacciones de este bucle en la proteína Mini III con el ARN pueden conducir a preferencias de secuencia de Mini III durante la escisión del ARNbc.

40

45

50

Esto significa que, en particular, la enzima Mini III, sus variantes funcionales y otras proteínas con secuencias similares, en su conjunto denominada "familia de proteínas Mini III" con un bucle B, como el que se indica en la Figura 1, localizado en el surco principal del ARNbc, puede tener una preferencia de nucleótidos por el procesamiento de ARNbc independiente de la estructura del ARNbc de hélice irregular, que se ha verificado en los ejemplos de la invención descritos adicionalmente.

55

Por lo tanto, para la clonación y posterior modificación de la enzima mediante ingeniería genética, se seleccionaron genes con fases de lectura abierta identificados por secuenciación de genomas bacterianos de los organismos *Bacillus subtilis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Bacillus cereus*.

60

En la base de datos PDB se encuentran las estructuras resueltas de FNU y BCE, por lo tanto los genes que las codifican también están identificados. Como resultado del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas que pertenecen a la familia Mini III, también se ha seleccionado otra enzima BSU para estudios

65

experimentales. Todas las proteínas que pertenecen a la familia Mini III pueden tener una preferencia por la escisión de especies particulares en el ARNbc.

### Ejemplo 2

5

Clonación de los genes diseñados en el Ejemplo 1 de *Bacillus subtilis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Bacillus cereus*

#### **a) Preparación del molde de ADN**

10 Células liofilizadas obtenidas en la colección de cepas de la ATCC se suspendieron en LB 500 µl y después 1 µl de dicha suspensión se añadió a la reacción de la PCR. El molde de ADN se obtuvo de cepas de *Bacillus subtilis* disponible como ATCC 23857, *Fusobacterium nucleatum* disponible como ATCC 25586 y *Bacillus cereus* disponible como ATCC 1457

#### **15 b) Preparación de Vectores**

Con las enzimas de restricción NdeI y XhoI 500 ng del vector pET28 (Novagen) se escindieron completamente y los productos se separaron en gel de agarosa. Un producto de un tamaño de 5.289 pb se recuperó del gel, usando un kit Gel Out (A & A Biotechnology) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20

#### **c) Aislamiento de los productos de la PCR para la clonación de genes que codifican proteínas con actividad dependiente de secuencia de ARNbc**

Con 1 µl del molde de ADN obtenido en el punto a) a partir de una cepa apropiada, se realizó PCR en un termociclador Biorad en una mezcla de reacción de 50 µl: tampón de reacción 5 µl, dNTP 200 µM, 1 U de Pfu polimerasa (Fermentas) y 50 pmol de cada cebador: Bsu28d y Bsu28i para la reacción con ADN de *B. subtilis*, Fnu28d y Fnu28i para la reacción con ADN de *F. nucleatum*, Bce28d y Bce28r para la reacción con el ADN de *B. cereus* (que se corresponde con las secuencias de cebadores que se presentan en la Tabla 1). Las reacciones de control se realizaron sin molde de ADN.

30

**Tabla 1.**

Organismo	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID N°
<i>Bacillus subtilis</i>	Bsu28d	TACCCATATGCTTGAATTTGATACG	6
	Bsu28i	TACTCGAGTCATGTTGCTGACTCATTG	7
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fnu28d	CCGCATATGGACAATGTAGATTTTTCAAAG	8
	Fnu28i	GTGCTCGAGTCATCATTCTCCCTTTATAACTATATTTATAATTTTTTTTATTTTC	9
<i>Bacillus cereus</i>	Bce28d	CCGCATATGGTCGATGCAAAGCAATTAACAG	10
	Bce28i	TACTCGAGTCATGATGATGTGCCCCCTTC	11

La reacción PCR se realizó en condiciones estándar. La mezcla de reacción se separó en gel de agarosa y los fragmentos correspondientes a los tamaños esperados de 447 pb, 408 pb y 422 pb se aislaron del gel usando un kit Gel Out (A & A Biotechnology) y se escindieron con NdeI y XhoI. El producto escindido se purificó usando el kit Clean Up (A & A Biotechnology) y se ligaron con el vector obtenido en el punto b). La reacción de ligamiento se realizó con ADN ligasa de T4 (Fermentas). Cien µ de bacterias quimiocompetentes de la cepa Top10 de *E. Coli* (Vitrogen) se transformaron con 10 µl de mezcla de ligamiento y los transformantes resultantes se seleccionaron en medio sólido LB con kanamicina 50 µg/ml. El ADN plasmídico se aisló de las colonias seleccionadas cultivando en 3 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml) usando el Mini kit Plasmid (A & A Biotechnology). La selección de transformantes que contenían los plásmidos recombinantes, se basó en el análisis de mapas de restricción y después, las muestras se secuenciaron para confirmar la exactitud de las construcciones ADN Sequencing and Synthesis Service at the IBB PAS).

45

De esta manera se obtuvieron los siguientes plásmidos:

pET28Bsu que codifica la endorribonucleasa de ARNbc específica de secuencia de tipo silvestre del gen *yazC* de *B. subtilis* (la secuencia de aminoácidos de la endorribonucleasa BSU se presenta en la SEC ID N°: 2);

pET28Fnu que codifica la endorribonucleasa de ARNbc específica de secuencia de tipo silvestre de *F. nucleatum*

(endorribonucleasa FNU);  
pET28Bce que codifica la endorribonucleasa de ARNbc específica de secuencia de tipo silvestre de *B. cereus* (endorribonucleasa BCE).

### 5 Ejemplo 3

#### **Expresión y purificación de la proteína del vector pET28Bsu que codifica la enzima de *Bacillus subtilis* de tipo silvestre**

- 10 La cepa ER2566 de *Escherichia coli* (New England Biolabs) se transformó con el plásmido pET28Bsu obtenido en el Ejemplo 2, las transformaciones se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las cepas se seleccionaron en medio sólido LB con 50 µg/ml de kanamicina y glucosa al 1 %. Se inocularon 25 ml de medio LB líquido con 50 µg/ml de kanamicina y glucosa al 1 % con transformantes seleccionados y se incubó durante 16 horas a 37 °C. Después, se inocularon 500 ml de LB líquido complementado con 50 µg/ml de kanamicina, con un cultivo de 25 ml y se incubó con agitación a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> de ~ 0,6 y después se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM. La inducción se realizó durante 3 horas a 37 °C con agitación. Los cultivos se centrifugaron a 5.000 g durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en tampón STE y de nuevo se centrifugaron. El sedimento se suspendió en 20 ml de solución de lisis (NaPO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol al 10 %, PMSF 1 mM, BME 10 mM, Triton X-100 al 0,1 %), y después las células bacterianas se disgregaron usando un solo pase a través del alterador celular (*Disruptor Cell*) (Constant Systems LTD) a una presión de 1360 atmósferas. Los lisados se depuraron por centrifugación en la ultracentrífuga a 20.000 g a 4 °C durante 20 min. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad usando la etiqueta de polihistidina presente en la cadena peptídica.
- 25 El lisado celular se aplicó a una columna de 1,5 cm 7x que contenía agarosa Ni-NTA 5 ml (Sigma-Aldrich) equilibrada con cuatro volúmenes de tampón de lisis. La columna se lavó secuencialmente con los siguientes tampones: tampón de lisis (50 ml), tampón de lisis complementado con NaCl 2 M (50 ml), tampón de lisis complementado con imidazol a una concentración de 20 mM (50 ml). La proteína se eluyó con tampón de lisis complementado con imidazol 250 mM y se recogieron fracciones de 1,5 ml. El caudal fue de 0,9 ml/min y la temperatura de 4 °C. Las fracciones que contenían la proteína se combinaron y se diluyeron a un volumen total de 50 ml en tampón R: NaPO<sub>4</sub> 30 mM pH 8,0, NaCl 30 mM, glicerol al 10 % BME 10 mM.

Para cortar la etiqueta de polihistidina, se añadieron 4 U de trombina (Sigma-Aldrich no. Catalogo T4648) y la mezcla se incubó a 4 °C durante una noche. Para purificar la proteína de la trombina y de la etiqueta de polihistidina se usó cromatografía de intercambio iónico usando una columna de Sefarosa SP (GE Healthcare). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de concentración de NaCl de 30 mM a 1 M en tampón R, se recogieron fracciones de 1,5 ml. Las fracciones con la proteína se combinaron, se diluyeron y se congelaron a -70 °C.

### Ejemplo 4

#### 40 **Preparación de sustratos de ARNbc**

Para las determinaciones de la actividad endorribonucleasa de las proteínas expresadas se usaron los siguientes sustratos:

- 45 a) genoma del bacteriófago Φ6 constituido por tres segmentos: 2948 pb (S), 4063 pb (M) y 6374 pb (L). Este sustrato contiene 46 secuencias de escisión consenso, pero no contiene ninguna secuencia de escisión preferida. El ARNbc del bacteriófago Φ6 se adquirió en Finnzymes.
- 50 b) sustrato de ARNbc sintetizado *in vitro*, longitud 234 pb. Este sustrato contiene un solo sitio de escisión preferido.

Para la síntesis del ARNbc de 234 pb se usó el plásmido pKSII, con la secuencia de ADN modificada cadena abajo del sitio del promotor de T7 (la secuencia de pKSII modificada se presenta en la SEC ID N°: 2) y los cebadores:

- 55 bsuARNd 5'GCGCGTAATACGACTCACTATAGGG 3' (SEC ID N°: 12), y  
bsuARNi 5'GGAAAAAATCCGGCTCGTATGTTGTG 3' (SEC ID N°: 13).

La síntesis se realizó con el kit Reprodutor de ARNi (Finnzymes, según el protocolo del fabricante).

c) ARNbc cortos de 18, 20, 22 y 30 pb.

- 60 Se sintetizaron oligonucleótidos de ARN monocatenario en Metabion. Se mezclaron oligonucleótidos complementarios (cada uno a 1,5 nmol) a una proporción de 1:1. Se calentó una mezcla de 30 µl a 95 °C, y después se enfrió durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se indica una lista de secuencias de oligonucleótidos:

- 65 • 18D - 5'ACCGUCGACCUCCGAGGGG 3' (SEC ID N° 14)

- 18I - 5'CCCCUCGAGGUCGACGGU 3' (SEC ID N°15)
- 20D - 5'AUACCGUCGACCUCGAGGGG 3' (SEC ID N° 16)
- 20I - 5'CCCCUCGAGGUCGACGGUAU 3' (SEC ID N° 17)
- 22D - 5'AUACCGUCGACCUCGAGGGGGG 3' (SEC ID N° 18)
- 5 • 22I - 5'CCCCCUCGAGGUCGACGGUAU 3' (SEC ID N° 19)
- 30D - 5'CGAUACCGUCGACCUCGAGGGGGGGCCCGG 3' (SEC ID N°20)
- 30I - 5'CCGGGCCCCCUCGUGGUCGACGGUAUCG 3' (SEC ID N°21)
- 30N1D - 5\*UCGAGUUGCCGGUUGCUGUGAUGGCCGUUC 3' (SEC ID N° 22)
- 30N1I - 5'GAACGGCCAUCACAGCAACCGGCAACUCGA 3' (SEC ID N° 23)
- 10 • 30N2D - 5'CCACUCUUAGAUACCCGAUUCGCCUGUUUC 3' (SEC ID N° 24)
- 30N2I - 5'GAAACAGGGGAAUCGGGUUAUCUAAGAGUGG 3' (SEC ID N° 25)
- 30N3D - 5'UCUGAUGGGCGCUACCGGUUCCGGUAAGUC 3' (SEC ID N° 26)
- 30N3I - 5'GACUUACCGGAACCGGUAGCGCCAUCAGA 3' (SEC ID N° 27)

## 15 **Ejemplo 5**

### **Escisión de los sustratos de ARNbc con las enzimas producidas**

Las reacciones de escisión de sustrato por la enzima se realizaron a 37 °C durante 1 hora. Las mezclas de reacción de 15 µl contenían 4 pmol de enzima correspondiente preparada de acuerdo con el ejemplo 3, 2 pmol de un sustrato obtenido de acuerdo con el ejemplo 4, 1,5 µl de tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 1 mg/ml). Los productos se separaron en una electroforesis convencional en gel de agarosa o en gel de poli(acrilamida) (poliacrilamida al 6%, TBE: Tris-HCl 135 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 2,5 mM). Después de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 10 minutos y los productos se visualizaron usando luz UV.

## **Ejemplo 6**

### **Determinación de sitios de escisión en el ARNbc**

30

#### **a) Marcaje del cebador**

El cebador RTi (*i inverso*) con secuencia 5'GAAACAGCTATGACCATGA 3' (SEC ID N°: 28) y el cebador RTd (*d directo*) con secuencia 5'GATCCCCACAATCCTGTC 3' (SEC ID N°: 29) se marcaron con radioactividad usando [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP. Durante 30 min. se efectuaron reacciones (volumen de 10 µl) que contenían 10 pmol de cebador, 1 µl de tampón de reacción, 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP y 1 U de polinucleótido quinasa de T4 (Fermentas) a 37 °C.

#### **b) Identificación del sitio de escisión en el ARNbc de 234 pb**

40 Se demostró que en el sustrato de ARNbc de 234 pb obtenido en el ejemplo 4, había un solo sitio de escisión para la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. El ARNbc de 234 pb se escindió como se describe en el Ejemplo 5 usando la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. Después, los productos de 90 pb y 144 pb se aislaron del gel. El sitio de escisión se localizó usando la reacción de transcripción inversa. Se mezclaron 0,1 µg de cada producto con 1 pmol de los cebadores marcados con radioactividad del Ejemplo 6a. Estas mezclas de 12,5 µl se incubaron a 95 °C durante 5 min. Después, las mezclas se complementaron con 4 µl de tampón de reacción (Fermentas), 20 U de inhibidor de ribonucleasa RiboLock (Fermentas), 2 µl de dNTP 10 mM, 10 U de AMV transcriptasa inversa (Fermentas) y las reacciones se realizaron a 45 °C durante 60 min. En paralelo se realizó secuenciación con los mismos cebadores y molde usando la reacción de transcripción inversa descrita anteriormente, con la excepción de que, a la mezcla de reacción, se añadió ddATP, ddCTP, ddGTP, o ddUTP a una proporción de 1:100 con respecto al dNTP (para separar las reacciones). Los productos de reacción se separaron en gel de poli(acrilamida) desnaturalizante al 6% (poliacrilamida al 6%, TBE: Tris-HCl 135 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 2,5 mM, urea 8M) y se sometieron a una exposición durante 18 horas con Storage Phosphor Screen (GE Healthcare), y se visualizaron usando un escáner Storm (GE Healthcare). El sitio de escisión se localizó entre la posición 90 y 91 de los nucleótidos en la cadena superior del ARNbc (véase la Fig. 6A, Tabla 2) y entre la posición 146 y 147 de la cadena inferior (véase la Fig. 6B).

55

#### **c) Identificación de sitios de escisión en las dos cadenas del ARNbc**

Para determinar los sitios de escisión en las dos cadenas, se preparó un sustrato de ARNbc de 30 pb mediante hibridación de oligonucleótidos de ARN, 30F y 30R. El extremo 5' de una cadena se marcó con [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP y se hibridaron con un oligonucleótido complementario no marcado. Se sintetizaron moléculas de ARN monocatenario con una secuencia de sitio de escisión derivada de ARNbc de 234 pb (Metabion). Los sustratos se escindieron con endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. Los productos se separaron en gel de poli(acrilamida) desnaturalizante al 15% (poliacrilamida al 15%, TBE: Tris-HCl 135 mM ácido bórico 45 mM, EDTA 2,5 mM, urea 8M). La visualización de los productos se realizó con el ejemplo 6b. Los resultados se muestran en la Figura 7. Se determinó el sitio de escisión exacto así como la geometría de los extremos generados. La endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>

65

genera 2 nucleótidos con salientes 3' (Fig. 7b)

**Tabla 2.** Sitio de escisión identificado – secuencia reconocida y corte en el sustrato de ARNbc de 234 pb por la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>

5

Posición de nucleótidos en el sustrato de ARNbc de 234 pb	-- 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 --	
Secuencia de nucleótidos en el sustrato de ARNbc de 234 pb	<b>CGUCGACCU CGAGG</b>	SEC ID Nº: 30

Se observó que la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> de *Bacillus subtilis* reconocía específicamente y cortaba en un solo sitio en el ARNbc de 234pb.

## 10 Ejemplo 7

**Determinación de las condiciones de reacción óptimas para la escisión de *in vitro* de sustratos de ARNbc mediante las enzimas producidas**

### 15 a) Impacto de los cambios de condición sobre la actividad enzimática de la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>

Se examinó la influencia de diversos factores sobre la actividad enzimática de la endorribonucleasa BSU de tipo silvestre. Las condiciones óptimas se determinaron en la escisión *in vitro*, a diversas temperaturas, pH, concentraciones de NaCl y de iones de Mg<sup>2+</sup>. La reacción de escisión se realizó como se indica en el Ejemplo 5, cambiando únicamente el parámetro ensayado. El efecto del pH sobre la escisión de sustrato se ensayó a valores de pH de: 6,8, 7,0, 7,5, 7,8, 8,0, 8,2, 8,5, 8,8. Se muestra que la mejor escisión del sustrato de ARNbc de 234 pb se obtiene a valores de pH de 6,8, 7,0, 7,5, 7,8 (Fig. 3A). El efecto de la temperatura sobre la actividad se ensayó a las temperaturas de: 15 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C. La temperatura óptima para la escisión fue entre 35 °C y 45 °C (Fig. 2B). Fuera de este intervalo de temperatura el sustrato se corta a una velocidad más lenta.

El efecto de la concentración de iones se estudió a concentraciones de NaCl de 5, 20, 40, 60, 80, 100 mM. El valor óptimo para la actividad enzimática varía de 5 a 60 mM de cloruro de sodio (Fig. 2C). El corte eficaz del sustrato disminuye a concentraciones salinas más elevadas. Se evaluó el efecto de la concentración de iones Mg<sup>2+</sup> a los valores de: 0,03, 0,05, 0,08, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5; 15 y 17,5 mM. El valor óptimo de la concentración de iones de Mg<sup>2+</sup> en la mezcla de reacción es de 1 a 2,5 mM (Fig. 2D). Fuera de este intervalo el sustrato se corta a una velocidad más lenta.

### b) El efecto de la metilación de ribosa cerca del sitio de escisión de la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>

Se analizó la sensibilidad de la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> para la metilación de ribosa en las proximidades del sitio de escisión. Se ensayaron sustratos de ARNbc de 30 pb con metilación de ribosa de dos guanosinas (Fig. 3A). La reacción de escisión se realizó como en el Ejemplo 5. Dos sustratos con la ribosa guanosina metilada no se cortan (Fig. 3B). La enzima es sensible a metilación de ribosa de dos restos de guanosina, que están próximos al sitio de escisión.

### 40 c) Identificación de un sustrato de longitud mínima para la escisión de ARNbc mediante la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>

Se identificó un sustrato de ARNbc de longitud mínima para la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. Para esta finalidad, se examinaron sustratos de 18, 20 y 22 pb. La endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> puede cortar el ARNbc con una longitud de 22 pares de bases (Fig. 4). Los sustratos más cortos no se cortan.

## Ejemplo 8

**Construcción de bibliotecas de sustratos con sustituciones y producción de sustratos de ARNbc**

50

### a) Construcción de bibliotecas de sustratos con sustituciones

Se construyeron bibliotecas con sustitución de 14 posiciones únicas en el fragmento del ácido nucleico que comprendía el sitio de escisión para el sustrato de 234 pb (Tabla 2). Para introducir sustituciones, se diseñaron

pares de cebadores con la mutación en una posición determinada. Uno de los pares de cebadores contenía la sustitución apropiada. El molde para la PCR fue un plásmido pKSII modificado, mostrado en la SEC ID N°: 2. La reacción de la PCR con cada par de cebadores se realizó de acuerdo con el método y las condiciones que se describen en el Ejemplo 2. En la Tabla 3 siguiente se presentan las secuencias de los cebadores que se utilizan para producir bibliotecas de sustitución.

**Tabla 3.** Muestra el número de posiciones, secuencias y nombres de los pares de cebadores que se utilizan en la creación de bibliotecas de sustitución (donde H = A o C o U; D = A o G o U; B = C o G o U; V = A o C o G).

Número de Biblioteca	Posición de la sustitución del nucleótido	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID N°
1	83	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub83i	GTCGACHGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 32
2	84	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub84i	GTCGADGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 33
3	85	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub85i	GTCGBCGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 34
4	86	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub86i	GTCHACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 35
5	87	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub87i	GTDGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 36
6	88	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub88i	GVCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 37
7	89	Subd	CTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 31
		Sub89i	HTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 38
8	90	Subd	DTCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 40
		Sub90i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39
9	91	Subd	CVCGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 41
		Sub91i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39
10	92	Subd	CTDGAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 42
		Sub92i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39
11	93	Subd	CTCHAGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 43
		Sub93i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39
12	94	Subd	CTCGBGGGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 44
		Sub94i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39
13	95	Subd	CTCGAHGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 45
		Sub95i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39
14	96	Subd	CTCGAGHGGGGGGCCCCGGTA	SEC ID N° 46
		Sub96i	GTCGACGGTATCGATAAGCTTG	SEC ID N° 39

10

Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa y después se aislaron como se describe en el Ejemplo 2. Los productos aislados se fosforilaron y se ligaron. La reacción se realizó a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de ligamiento de 20 µl contenía 100 ng de producto PCR, tampón de reacción 2 µl, ATP 10 mM, polinucleótido quinasa de T4 1 U y ADN ligasa de T4 1 U. Con 10 µl de mezcla de ligamiento se transformaron células de *E. coli* TOP10 como se describe en el Ejemplo 1. Después, las células se sembraron en placas de Petri LB con 100 µg/m de ampicilina. Para buscar clones con construcciones de sustituciones introducidas, las secuencias se analizaron por secuenciación como se describe en el Ejemplo 2. Los plásmidos con sustitución apropiada introducida, que sirvieron como molde para sintetizar ARNbc, se numeraron como biblioteca de 1 a 14.

15

## 20 b) Síntesis *in vitro* de sustratos de ARNbc de las bibliotecas de sustitución obtenidas en el punto a)

Las construcciones seleccionadas de las bibliotecas de sustitución identificadas como un número de 1 a 14 se usaron como moldes para sintetizar ARNbc usando cebadores los bsuARNd y bsuARNi descritos en el Ejemplo 4b.

## 25 Ejemplo 9

### Determinación de la secuencia se escisión preferida para la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>

La secuencia preferida se determinó usando los sustratos sintetizados en el Ejemplo 8b. La reacción de escisión se realizó como en el Ejemplo 5, usando la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> preparada de acuerdo con el Ejemplo 3. La siguiente Tabla 4 muestra la secuencia de preferencia determinada para la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>.

30

**Tabla 4.** Escisión de ARNbc de 234 pb de las bibliotecas de sustitución en las posiciones 83 a 96. Las letras “mayúsculas” representan eficacia de escisión del ARNbc en cuanto al sustrato inicial, las letras “minúsculas” representan escisión alterada del ARNbc; los espacios “-” representan que no hay escisión.

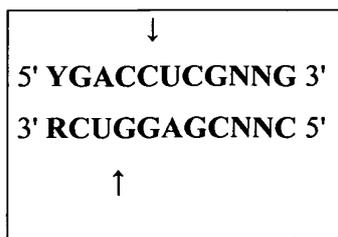
N.º	--	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	--	SEC ID N°
Secuencia de sustrato inicial		<b>C</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>		30
G		G	<b>G</b>	G	g	<b>G</b>	-	-	-	-	-	<b>G</b>	G	<b>G</b>	<b>G</b>		47 a 88
A		A	A	A	a	a	<b>A</b>	-	-	-	A	a	<b>A</b>	A	A		
U		U	U	<b>U</b>	U	u	-	-	-	<b>U</b>	U	u	U	U	U		
C		<b>C</b>	C	C	<b>C</b>	-	-	<b>C</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>	-	C	C	C		
Secuencia preferida		N	N	N	Y	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	N	N	<b>G</b>		

5

Durante de la escisión del ARNbc la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> ha mostrado preferencia de secuencia. La secuencia de escisión preferida puede escribirse como se muestra a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Secuencia de escisión preferida del ARNbc para la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. El sitio de escisión se indica con flechas (donde Y = C o U; R = A O o G; N = G o A o U o C)

10

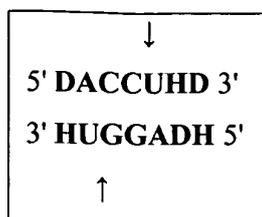


Sin embargo, la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> también puede cortar los sustratos de ARNbc que tienen una secuencia consenso como se muestra en la siguiente Tabla 6.

15

**Tabla 6.** Secuencia consenso de sustratos de ARNbc de la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. El sitio de escisión se indica con flechas (donde H = A o C o U; D = A o G o U).

20



La endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> genera extremos cohesivos con salientes de 2 nucleótidos en 3' en el ARNbc.

**Ejemplo 10**

**25 Creación de las variantes de la endorribonucleasa BSU**

La secuencia codificante recombinante ts de la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> (SEC ID N° 1) se sometió a mutagénesis de sustitución de codones seleccionados que codifican los restos situados en el bucle que se localiza en el surco principal del ARNbc (Fig. 1). Utilizando pares de cebadores apropiadamente diseñados, se introdujeron sustituciones en la proteína. El molde para la reacción de la PCR fue el plásmido pET28Bsu (Ejemplo 2). La reacción de PCR para amplificar las variantes de las secuencias codificantes con las sustituciones introducidas se realizó como se describe en el Ejemplo 2 usando los pares de cebadores indicados en la siguiente Tabla 7.

30

**Tabla 7.** Secuencias y nombres de los pares de cebadores usados para la introducción de sustituciones con la finalidad de obtener diferentes variantes de endorribonucleasa BSU en posiciones de aminoácidos seleccionadas. El tipo de sustitución se muestra en la Tabla 8.

Número de posición del resto de aminoácido	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID N°:
79	K79Ad	CCAGAGGCAGAAATGCCAAGTC	SEC ID N° 89
	K79Ai	CCAGCACCGCTTCCTCTTC	SEC ID N° 90
80	R80Ad	CCGGCAGAAATGCCAAGTCAGG	SEC ID N° 91
	R80Air	CCTTCAGCACCGCTTCCTCTTC	SEC ID N° 92
82	R82Ad	CCAATGCCAAGTCAGGGACAAC	SEC ID N° 93
	R82Ai	CGCCTCTTTTCAGCACCGC	SEC ID N° 94
83	N83Ad	CTGCCAAGTCAGGGACAAC	SEC ID N° 95
	N83Ai	CTCTGCCTCTTTTCAGCAC	SEC ID N° 96
85	K85Ad	CCTCAGGGACAACACCTAAAAATACAG	SEC ID N° 97
	K85Ai	CCGCATTTCTGCCTCTTTTCAGC	SEC ID N° 98
86	S86Ad	CTGGGACAACACCTAAAAATAC	SEC ID N° 99
	S86Ai	CTTTGGCATTCTGCCTC	SEC ID N° 100
88	T88Ad	CCACACCTAAAAATACAGATGTTT	SEC ID N° 101
	T88Ai	CGCCTGACTTGGCATTTC	SEC ID N° 102
91	K91Ad	CCAATACAGATGTTTCAGACGTACCG	SEC ID N° 103
	K91Ai	CCGGTGTGTCCCTGACTTG	SEC ID N° 104
92	N92Ad	CACAGATGTTTCAGACGTACCG	SEC ID N° 105
	N92Ai	GCCTTAGGTGTTGTCCCTG	SEC ID N° 106
94	D94Ad	CCGTTACAGACGTACCGCTAC	SEC ID N° 107
	D94Ai	CCGTATTTTAGGTGTTGTCCCTG	SEC ID N° 108
94	D94Rd	CGTGTTCAGACGTACCGCTACAGTACAG	SEC ID N° 109
	D94Ri	TGTATTTTAGGTGTTGTCCCTGACTTG	SEC ID N° 110

5

Los procedimientos de fosforilación, ligamiento, y transformación de construcción se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. Los extrasformantes se sembraron en placas de agar LB con kanamicina 50 µg/µl. Las colonias desarrolladas se inocularon como se indica el Ejemplo 2b, los plásmidos se aislaron como se indica en el Ejemplo 2b. La selección de transformantes adecuados y la confirmación de la exactitud de la secuencia de la sustitución deseada se basó en la secuenciación de la muestra (SSIS DNA IBB PAS).

10

### **Ejemplo 11**

#### **Expresión y purificación de variantes de la proteína endorribonucleasa BSU y ensayo de actividad endonucleolítica**

15

Se prepararon 10 variantes con sustituciones por alanina en las posiciones de los restos de aminoácidos K79, R80, R82, N83, K85, S86, T88, K91, N92, D94. La expresión y purificación de las variantes se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Después se examinaron las actividades endonucleolíticas. En la Tabla 8 se muestran los resultados. Las posiciones R80, R82, K85, T88, K91, N92, D94 pueden estar implicadas en la especificidad de secuencia de la enzima. Probablemente interaccionan con bases en el ácido nucleico de ARNbc, y por lo tanto para la mutagénesis de sustitución adicional se seleccionaron las posiciones en las que la sustitución por alanina inactivó la enzima o disminuyó su actividad.

20

25 **Tabla 8.** Actividad endorribonucleolítica de las variantes de sustituciones de alanina de la endorribonucleasa BSU. El símbolo “+” significa escisión de ARNbc en lo que respecta a la endorribonucleasa BSU de tipo silvestre (BSU<sup>TS</sup>); “+/-” significa escisión alterada de ARNbc; “+/-” significa escisión alterada de ARNbc; “-” significa que no hay escisión.

Sustitución de restos de aminoácido en la endorribonucleasa BSU <sup>TS</sup>	Actividad endorribonucleolítica de la variante
K79A	+
R80A	+/-
R82A	+/-
N83A	+

Sustitución de restos de aminoácido en la endorribonucleasa BSU <sup>TS</sup>	Actividad endorribonucleolítica de la variante
K85A	-
S86A	+
T88A	+/-
K91A	-
N92A	+/--
D94A	+/--

Se creó una variante de sustitución por arginina en la posición número 94 (D94R). La proteína se purificó como se indica en la etapa 3, y su actividad endorribonucleolítica se ensayó en dos sustratos: en el ARNbc del genoma del bacteriófago  $\Phi 6$  y en el de 234pb. El ARNbc de 234 pb, que tiene un sitio de escisión preferido, se escindió de manera similar por la enzima de tipo silvestre y por la variante D94R. El ARNbc de  $\Phi 6$ , que tiene 38 sitios de escisión consenso, no se escindió con la misma eficacia por ambas enzimas. La escisión por la variante D94R se alteró en comparación con la de la enzima de tipo silvestre. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. Se muestra que la variante D94R tiene una selectividad aumentada con respecto a la secuencia de ARNbc preferida. La selectividad aumentada de la enzima da como resultado la limitación del reconocimiento de secuencia y la escisión del ARNbc.

Los resultados anteriores indican que el bucle, que se localiza en el surco principal del ARNbc, determina especificidad de secuencia en la escisión del ARNbc determinada solo por la secuencia de ARNbc e independiente de la estructura de hélice irregular y/o de la actuación conjunta con otras proteínas. El método también demuestra que la selección conduce a derivados y/o a variantes de endorribonucleasas de ARNbc que presentan especificidad de secuencia aumentada en la escisión de ARNbc, preferentemente en dicho método de obtención de derivados y/o variantes con escisión específica de secuencia de ARNbc se generan los derivados y/o variantes de endorribonucleasa con selectividad aumentada, preferentemente alterada, por la secuencia específica en la escisión del ARNbc.

### **Ejemplo 12**

#### **Escisión de tres ARNbc cortos de 30 pb**

Se prepararon sustratos de ARNbc de 30 pb hibridando los oligonucleótidos de ARN, 30N1D y 30N1I, 30N2D y 30N2I, 30N3D y 30N3I, descritos en el ejemplo 4c. Como control se usó el ARNbc de 30 pb con secuencia preferida, preparado a partir de los nucleótidos 30D y 30I del ejemplo 4c. La reacción de escisión se realizó como se indicó en el Ejemplo 5 usando la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup> preparada de acuerdo con el Ejemplo 3. Los sustratos preparados se escindieron mediante la endorribonucleasa BSU<sup>TS</sup>. Los productos se separaron en gel de poliacrilamida al 15 % (poliacrilamida al 15 %; TBE: Tris-HCl 135 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 2,5 mM). La visualización de los productos se describe en el Ejemplo 6b. En la Figura 8 se muestran los resultados. Tres sustratos ensayados no se escindieron.

#### **Lista de secuencias identificadas en la descripción:**

- SEC ID N° 1 – secuencia de aminoácidos de la endorribonucleasa ARNbc BSU<sup>TS</sup> de *Bacillus subtilis*
- SEC ID N° 2 – una secuencia del vector pKS II modificado
- SEC ID N° 3 – fragmento de la cadena polipeptídica de la endorribonucleasa FNU de *Fusobacterium nucleatum* que forma un bucle que se localiza en, e interacciona con, el surco principal del ARNbc
- SEC ID N° 4 – fragmento de la cadena polipeptídica de la endorribonucleasa BSU de *Bacillus subtilis* que forma un bucle que se localiza en, e interacciona con, el surco principal de ARNbc
- SEC ID N° 5 – fragmento de la cadena polipeptídica de la endorribonucleasa BCE de *Bacillus cereus* que forma un bucle que se localiza en, e interacciona con, el surco principal del ARNbc
- SEC ID N° 6 – secuencia de nucleótidos del cebador para la amplificación del gen de endorribonucleasa BSU
- SEC ID N° 7 – secuencia de nucleótidos del cebador para la amplificación del gen de endorribonucleasa BSU
- SEC ID N° 8 – secuencia de nucleótidos del cebador para la amplificación del gen de endorribonucleasa FNU
- SEC ID N° 9 – secuencia de nucleótidos del cebador para la amplificación del gen de endorribonucleasa FNU
- SEC ID N° 10 – secuencia de nucleótidos del cebador para la amplificación del gen de endorribonucleasa BCE
- SEC ID N° 11 – secuencia de nucleótidos del cebador para la amplificación del gen de endorribonucleasa BCE
- SEC ID N° 12 – secuencia de nucleótidos del cebador bsuARNd para la síntesis de ARNbc de 234 pb
- SEC ID N° 13 – secuencia de nucleótidos del cebador bsuARNi para la síntesis de ARNbc de 234 pb
- SEC ID N° 14 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 18D para la preparación de ARNbc de 18 pb
- SEC ID N° 15 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 18I para la preparación de ARNbc de 18 pb
- SEC ID N° 16 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 20D para la preparación de ARNbc de 20 pb

- SEC ID Nº 17 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 20I para la preparación de ARNbc de 20 pb  
 SEC ID Nº 18 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 22D para la preparación de ARNbc de 22 pb  
 SEC ID Nº 19 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 22I para la preparación de ARNbc de 20 pb  
 SEC ID Nº 20 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30D para la preparación de ARNbc de 30 pb  
 5 SEC ID Nº 21 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30I para la preparación de ARNbc de 30 pb  
 SEC ID Nº 22 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30N1D para la preparación del ARNbc de 30 pb de N1  
 SEC ID Nº 23 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30N1I para la preparación de ARNbc de 30 pb de N1  
 SEC ID Nº 24 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30N2D para la preparación de ARNbc de 30 pb de N2  
 SEC ID Nº 25 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30N2I para la preparación de ARNbc de 30 pb de N2  
 10 SEC ID Nº 26 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30N3D para la preparación de ARNbc de 30 pb de N3  
 SEC ID Nº 27 – secuencia de nucleótidos del oligonucleótido 30N3I para la preparación de ARNbc de 30 pb de N3  
 SEC ID Nº 28 – secuencia de nucleótidos del cebador RTi para la reacción de transcripción inversa  
 SEC ID Nº 29 – secuencia de nucleótidos del cebador RTd para la reacción de transcripción inversa  
 SEC ID Nº 30 – secuencia de nucleótidos del sustrato de ARNbc de 234 pb  
 15 SEC ID Nº 31 – secuencia de nucleótidos del cebador Subd para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 32 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub83i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 33 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub84i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 20 SEC ID Nº 34 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub85i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 35 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub86i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 25 SEC ID Nº 36 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub87i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 37 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub88i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 38 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub89i para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 30 SEC ID Nº 39 – secuencia de nucleótidos del cebador Subi para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 40 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub90d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 35 SEC ID Nº 41 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub91d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 42 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub92d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 43 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub93d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 40 SEC ID Nº 44 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub94d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 45 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub95d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 45 SEC ID Nº 46 – secuencia de nucleótidos del cebador Sub96d para la creación de la biblioteca de sustitución de ARNbc de 234 pb  
 SEC ID Nº 47 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 83G  
 SEC ID Nº 48 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 83A  
 SEC ID Nº 49 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 83U  
 50 SEC ID Nº 50 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 84A  
 SEC ID Nº 51 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 84U  
 SEC ID Nº 52 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 84C  
 SEC ID Nº 53 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 85G  
 SEC ID Nº 54 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 85A  
 55 SEC ID Nº 55 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 85C  
 SEC ID Nº 56 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 86G  
 SEC ID Nº 57 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 86A  
 SEC ID Nº 58 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 86U  
 SEC ID Nº 59 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 87A  
 60 SEC ID Nº 60 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 87U  
 SEC ID Nº 61 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 87C  
 SEC ID Nº 62 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 88G  
 SEC ID Nº 63 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 88U  
 SEC ID Nº 64 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 88C  
 65 SEC ID Nº 65 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 89G

- SEC ID N° 66 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 89A  
 SEC ID N° 67 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 89U  
 SEC ID N° 68 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 90G  
 SEC ID N° 69 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 90A  
 5 SEC ID N° 70 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 90U  
 SEC ID N° 71 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 91G  
 SEC ID N° 72 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 91A  
 SEC ID N° 73 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 91C  
 SEC ID N° 74 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 92G  
 10 SEC ID N° 75 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 92A  
 SEC ID N° 76 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 92U  
 SEC ID N° 77 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 93A  
 SEC ID N° 78 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 93U  
 SEC ID N° 79 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 93C  
 15 SEC ID N° 80 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 94G  
 SEC ID N° 81 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 94U  
 SEC ID N° 82 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 94C  
 SEC ID N° 83 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 95A  
 SEC ID N° 84 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 95U  
 20 SEC ID N° 85 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 95C  
 SEC ID N° 86 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 96A  
 SEC ID N° 87 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 96U  
 SEC ID N° 88 – secuencia de nucleótidos del ARNbc de 234 pb 96C  
 SEC ID N° 89 – secuencia de nucleótidos del cebador K79Ad  
 25 SEC ID N° 90 – secuencia de nucleótidos del cebador K79Ai  
 SEC ID N° 91 – secuencia de nucleótidos del cebador R80Ad  
 SEC ID N° 92 – secuencia de nucleótidos del cebador R82Ai  
 SEC ID N° 93 – secuencia de nucleótidos del cebador R82Ad  
 SEC ID N° 94 – secuencia de nucleótidos del cebador R82Ai  
 30 SEC ID N° 95 – secuencia de nucleótidos del cebador N83Ad  
 SEC ID N° 96 – secuencia de nucleótidos del cebador N83Ai  
 SEC ID N° 97 – secuencia de nucleótidos del cebador K85Ad  
 SEC ID N° 98 – secuencia de nucleótidos del cebador K85Ai  
 SEC ID N° 99 – secuencia de nucleótidos del cebador S86Ad  
 35 SEC ID N° 100 – secuencia de nucleótidos del cebador S86Ai  
 SEC ID N° 101 – secuencia de nucleótidos del cebador T88Ad  
 SEC ID N° 102 – secuencia de nucleótidos del cebador T88Ai  
 SEC ID N° 103 – secuencia de nucleótidos del cebador K91Ad  
 SEC ID N° 104 – secuencia de nucleótidos del cebador K91Ai  
 40 SEC ID N° 105 – secuencia de nucleótidos del cebador N92Ad  
 SEC ID N° 106 – secuencia de nucleótidos del cebador N92Ai  
 SEC ID N° 107 – secuencia de nucleótidos del cebador D94Ad  
 SEC ID N° 108 – secuencia de nucleótidos del cebador D94Ai  
 SEC ID N° 109 – secuencia de nucleótidos del cebador D94Rd  
 45 SEC ID N° 110 – secuencia de nucleótidos del cebador D94Ri

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Miedzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komorkowej  
 50 <120> Endorribonucleasas de ARNbc  
 <130> PZ/1243/AGR/PCT  
 <160> 110  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 55 <210> 1  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus subtilis*  
 60 <400> 1

ES 2 555 661 T3

Leu Glu Phe Asp Thr Ile Lys Asp Ser Lys Gln Leu Asn Gly Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Tyr Ile Gly Asp Ala Ile Phe Glu Val Tyr Val Arg His His  
 20 25 30  
 Leu Leu Lys Gln Gly Phe Thr Lys Pro Asn Asp Leu His Lys Lys Ser  
 35 40 45  
 Ser Arg Ile Val Ser Ala Lys Ser Gln Ala Glu Ile Leu Phe Phe Leu  
 50 55 60  
 Gln Asn Gln Ser Phe Phe Thr Glu Glu Glu Glu Ala Val Leu Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Asn Ala Lys Ser Gly Thr Thr Pro Lys Asn Thr Asp Val Gln  
 85 90 95  
 Thr Tyr Arg Tyr Ser Thr Ala Phe Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Leu Phe  
 100 105 110  
 Leu Glu Lys Lys Glu Glu Arg Leu Ser Gln Leu Val Ala Glu Ala Ile  
 115 120 125  
 Gln Phe Gly Thr Ser Gly Arg Lys Thr Asn Glu Ser Ala Thr  
 130 135 140

<210> 2  
 <211> 2949  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> plásmido

10 <400> 2

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aattttggtt aaatcagctc 60  
 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga 120  
 gatagggttg agtgttgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180

ES 2 555 661 T3

caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc 240  
 ctaatcaagt tttttggggt cgagggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag 300  
 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggaagaa 360  
 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420  
 cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg 480  
 caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540  
 gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg tttcccagc cacgacgttg 600  
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggatccc ccacaatcct 660  
 gtcgttacct gtcattgatc cgtctagatg ggctgcagga attcgatata aagcttatcg 720  
 ataccgtcga ccgggggggc ccggtaccca gcttttgctt ccttttagtga gggtaattg 780  
 cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia 840  
 ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga 900  
 gctaactcac attaattgcg ttgctgctac tgcccgttt ccagtcggga aacctgctgt 960  
 gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgctt attgggctgt 1020  
 cttccgttc ctcgctcact gactcgtgc gctcggctgt tcggctgctg cgagcgggat 1080  
 cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 1140  
 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 1200  
 tttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcaaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 1260  
 ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 1320  
 gctctctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgctttctc ccttcgggaa 1380  
 gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct 1440  
 ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtta 1500  
 actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg 1560  
 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc 1620  
 ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 1680  
 ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaa aaccaccgct gtagcgggtg 1740  
 gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 1800  
 tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttg 1860  
 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 1920  
 aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 1980  
 aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 2040  
 tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc 2100  
 gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 2160  
 agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 2220

ES 2 555 661 T3

```

aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag 2280
gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 2340
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc 2400
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 2460
ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa 2520
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 2580
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 2640
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccctctc 2700
gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 2760
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaatgt tgaatactca 2820
tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 2880
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 2940
aagtgccac

```

<210> 3

<211> 14

5 <212> PRT

<213> *Fusobacterium nucleatum*

<400> 3

Ala Lys Asn Ser Asn Ile Lys Thr Phe Pro Arg Ser Cys Thr  
1 5 10

10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

15 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 4

Gly Arg Asn Ala Lys Ser Gly Thr Thr Pro Lys Asn Thr Asp  
1 5 10

20 <210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> *Bacillus cereus*

25 <400> 5

Gly Arg Asn Ala Asn Ser Gly Thr Val Pro Lys Asn Thr Asp  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una endorribonucleasa de ARNbc para la escisión específica de secuencia de un sustrato de ARNbc, en el que dicha endorribonucleasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 o SEC ID N° 1 con la mutación D94R;  
 5 y tiene el bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc, que corresponde al bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc en el modelo de estructura de endorribonucleasa Mini III en el complejo con ARNbc;  
 y en el que dicha endorribonucleasa de ARNbc presenta la actividad específica de secuencia de ARNbc dentro de la  
 10 secuencia consenso

**5' DACCUHD 3'**  
**3' HUGGADH 5'**

en la que H = A o C o U;  
 15 D = A o G o U;

preferentemente dicha endorribonucleasa de ARNbc presenta la actividad específica de secuencia de ARNbc dentro de la secuencia consenso

**5' YGACCUCGNNNG 3'**  
 20 **3' RCUGGAGCNNC 5'**

en la que Y = C o U;  
 R = A o G;  
 N = G o A o U o C;  
 25 y en la que la secuencia específica en el sustrato de ARNbc reconocida por dicha endorribonucleasa de ARNbc es la secuencia consenso

**5' DACCUHD 3'**  
**3' HUGGADH 5'**

en la que H = A o C o U;  
 30 D = A o G o U;  
 preferentemente es la secuencia consenso

**5' YGACCUCGNNNG 3'**  
**3' RCUGGAGCNNC 5'**

35 en la que Y = C o U;  
 R = A o G;  
 N = G o A o U o C,

y en el que dicho sustrato de ARNbc comprende y se escinde dentro de dicha secuencia de reconocimiento por  
 40 dicha endorribonucleasa de ARNbc.

2. Un método de escisión específica de secuencia de un sustrato de ARNbc dentro de la secuencia consenso específica reconocida por una endorribonucleasa de ARNbc, que comprende las etapas de

45 a) combinar la endorribonucleasa de ARNbc con un sustrato de ARNbc en una mezcla, en el que dicha endorribonucleasa de ARNbc comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 o SEC ID N° 1 con la mutación D94R; y tiene el bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc, que corresponde al bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc en el modelo de estructura de la endorribonucleasa Mini  
 50 III en complejo con ARNbc; y en el que dicha endorribonucleasa de ARNbc presenta la actividad específica de secuencia de ARNbc dentro de la secuencia consenso específica reconocida

**5' DACCUHD 3'**  
**3' HUGGADH 5'**

55

en la que H = A o C o U;

D = A o G o U;

preferentemente dicha endorribonucleasa de ARNbc presenta la actividad específica de secuencia de ARNbc dentro de la secuencia consenso reconocida específica

5

**5' YGACCUCGNNG 3'**

**3' RCUGGAGCNNC 5'**

en la que Y = C o U;

R = A o G;

10 N = G o A o U o C;

y en la que el sustrato de ARNbc comprende la secuencia consenso reconocida específica, que es la secuencia consenso reconocida específica

**5' DACCUHD 3'**

**3' HUGGADH 5'**

15

en la que H = A o C o U;

D = A o G o U;

preferentemente es la secuencia consenso reconocida específica

**5' YGACCUCGNNG 3'**

**3' RCUGGAGCNNC 5'**

20

en la que Y = C o U;

R = A o G;

N = G o A o U o C,

25

b) escindir dicho sustrato de ARNbc dentro de dicha secuencia consenso de reconocimiento específica por dicha endorribonucleasa de ARNbc.

3. El método de escisión específica de secuencia del sustrato de ARNbc de acuerdo con la reivindicación 2,

30 en el que la escisión de ARNbc se realiza

a una temperatura de 35 °C hasta 45 °C; y/o

con una concentración de cloruro de sodio de 5 a 60 mM;

y preferentemente con una concentración de Mg<sup>2+</sup> de 1 a 2,5 mM.

35 4. Una endorribonucleasa de ARNbc,

en la que la endorribonucleasa de ARNbc

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 con la mutación D94R;

y tiene el bucle que se localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc, que corresponde al bucle que se

localiza en, e interacciona con, un surco principal de ARNbc en el modelo de estructura de endorribonucleasa Mini III

40 en un complejo con ARNbc;

y en el que la secuencia específica en el sustrato en el ARNbc reconocida por dicha endorribonucleasa de ARNbc es la secuencia consenso

**5' DACCUHD 3'**

**3' HUGGADH 5'**

45

en la que H = A o C o U;

D = A o G o U;

preferentemente es la secuencia consenso

50

**5' YGACCUCGNNG 3'**

**3' RCUGGAGCNNC 5'**

en la que Y = C o U;

R = A o G;

55 N = G o A o U o C;

y en la que dicha endorribonucleasa de ARNbc presenta la actividad específica de secuencia de ARNbc dentro de dicha secuencia consenso.

- 5 5. Un método para producir una endorribonucleasa de ARNbc, en el que el método comprende la etapa de expresar la endorribonucleasa de ARNbc como se define en la reivindicación 4.
6. Una construcción genética, caracterizada porque comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la endorribonucleasa de ARNbc según se define en la reivindicación 4.
- 10 7. Una célula hospedadora que comprende la construcción genética según se define en la reivindicación 6.
8. El kit, en el que éste comprende la endorribonucleasa de ARNbc como se define en la reivindicación 4.

**Fig. 1**

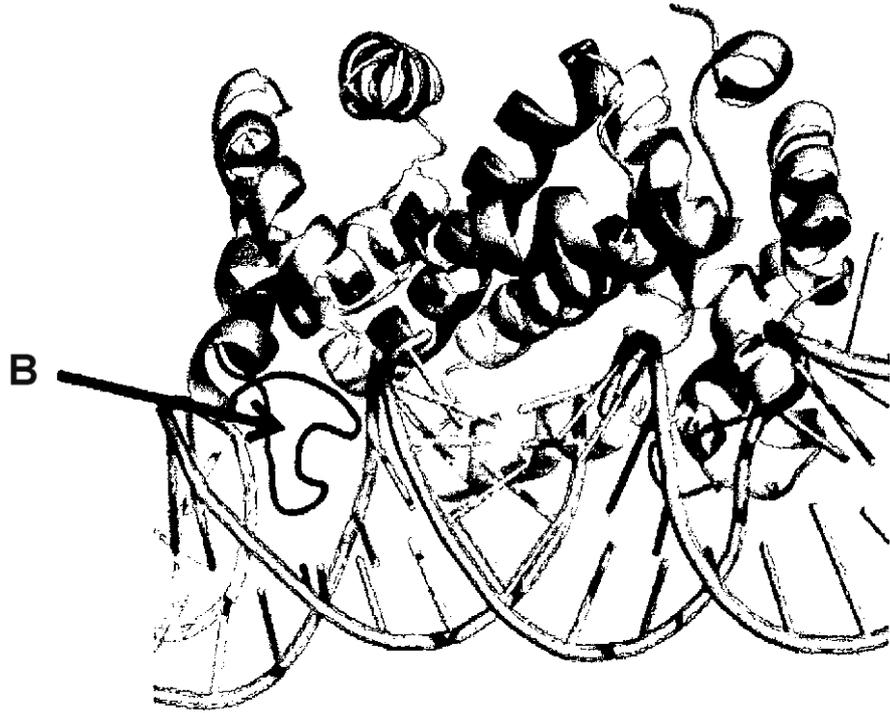
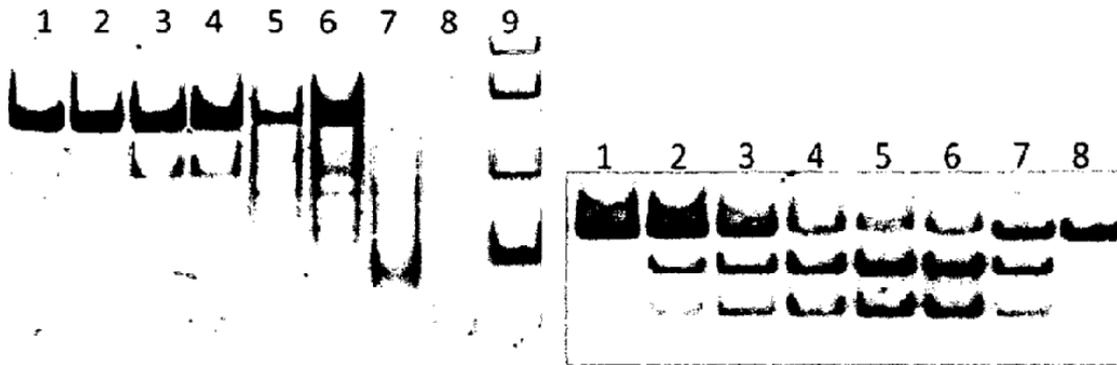
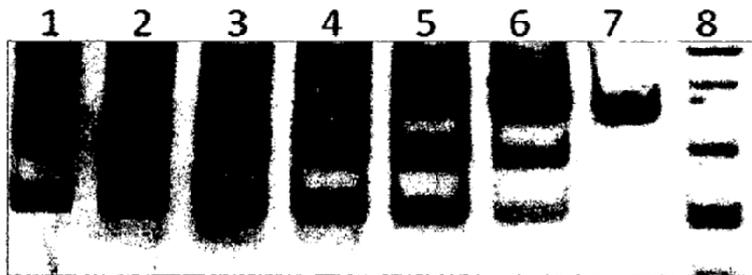


Fig. 2

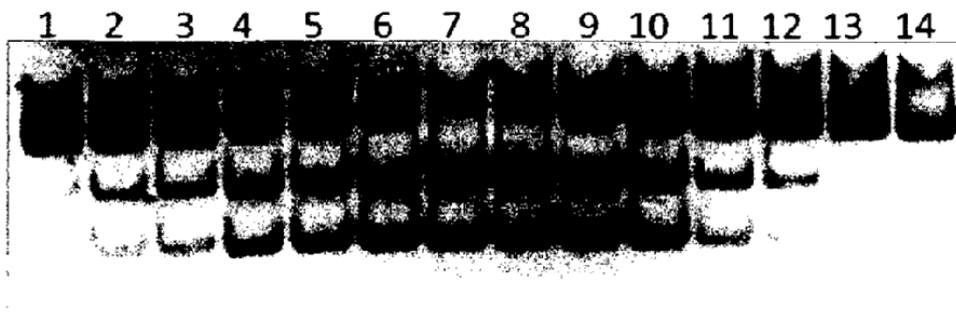


A

B

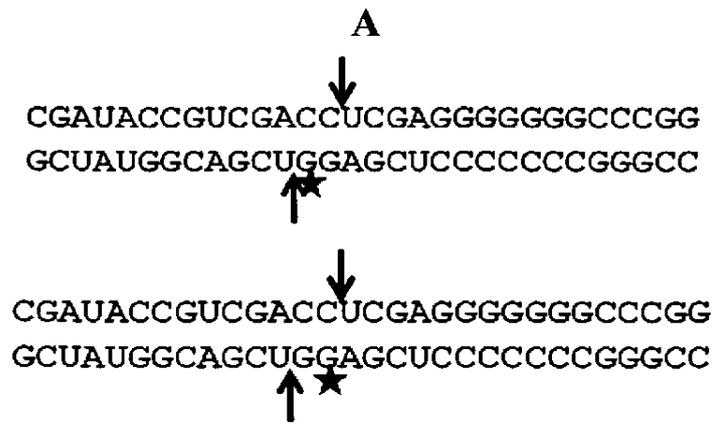


C

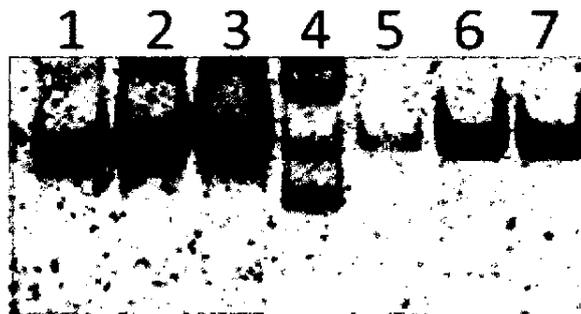


D

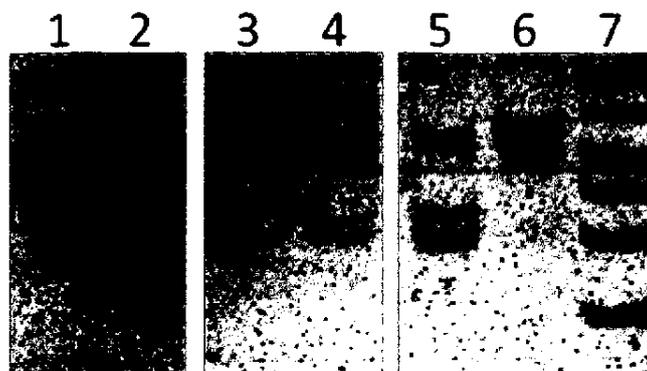
**Fig 3**



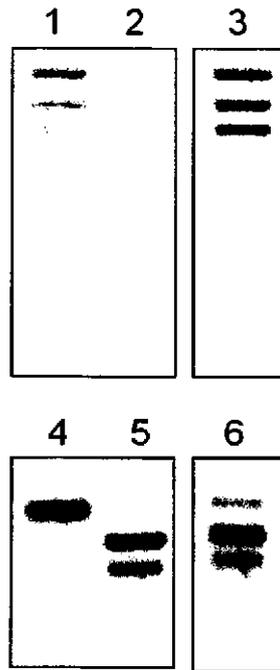
**B**



**Fig 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

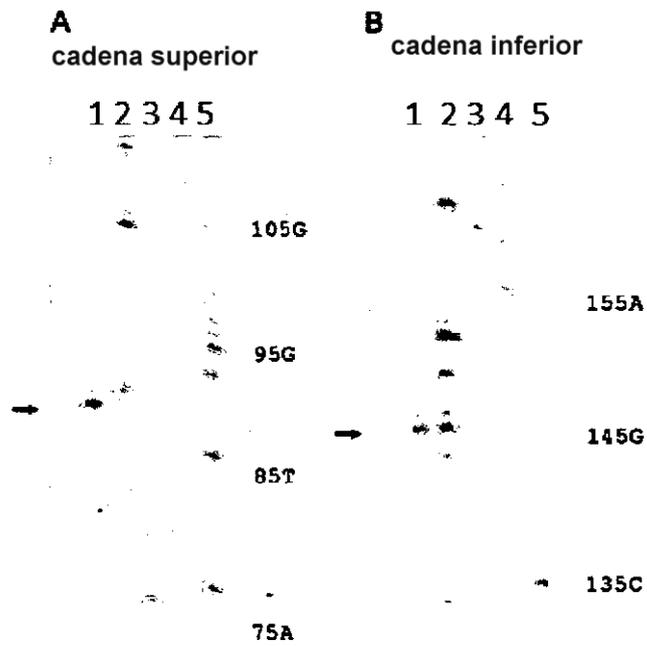
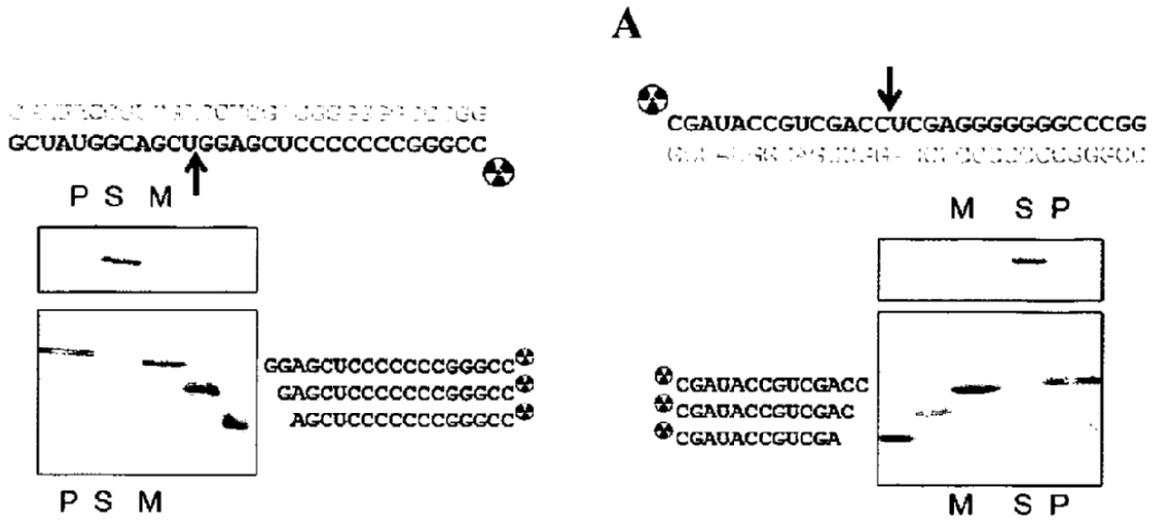


Fig. 7



**B**

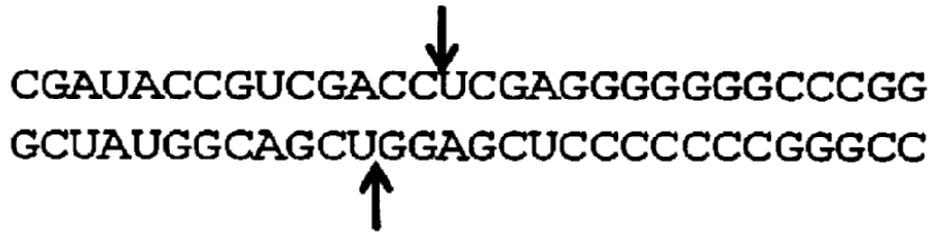
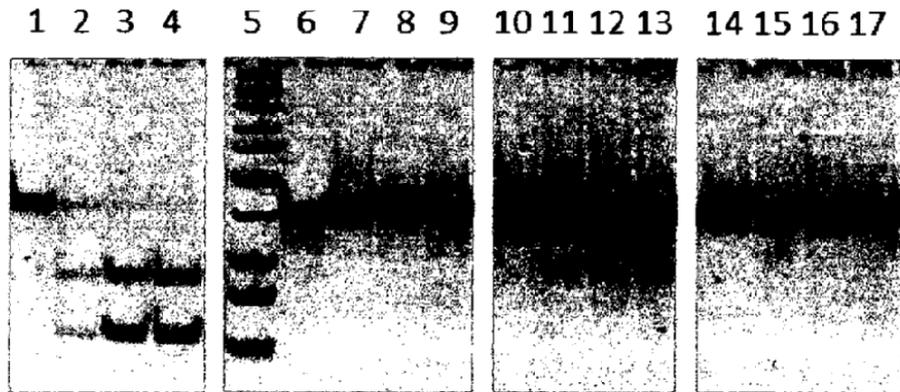


Fig. 8



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- 10
- JP 54059392 A [0006]
  - US 2006057590 A1 [0006]

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- 15
- **LEBARS, I.** *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 13264-13272 [0003]
  - **SAIDA, F.** *Nucleic Acids Res*, 2003, vol. 31, 2751-2758 [0003]
  - 20
  - **SHAHBABIAN, K.** *The EMBO Journal*, 2009, vol. 28, 3523-3533 [0003]
  - **HOSCHLER, K. et al.** *J Mol Biol*, 1999, vol. 294, 1231-1238 [0003]
  - 25
  - **NUMATA, T.** *Biochemistry*, 2003, vol. 42, 5270-5278 [0003]
  - **NUMATA, T.** *Biochemistry*, 2003, vol. 42, 5270-5278 [0003]
  - 30
  - **CZAJA, R.** *Biochemistry*, 2004, vol. 43, 2854-2862 [0003]
  - **STRUHALLA, M.** *Chembiochem*, 2004, vol. 5, 200-205 [0003]
  - **REDKO, Y.** *Molecular Microbiology*, 2008, vol. 68 (5), 1096-1106 [0005]
  - **REDKO, Y.** *Molecular Microbiology*, 2009, vol. 71 (5), 1145-1154 [0005]
  - **HERSKOVITZ, M.A.** *Molecular Microbiology*, 2000, vol. 38 (5), 1027-1033 [0006]
  - **DASGUPTA S.** *Molecular Microbiology*, 1998, vol. 28 (3), 629-640 [0006]
  - **SAMBROOK J. et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0034]
  - **GUDEX, N.** *Electrophoresis*, 1997, vol. 18, 2714-2723 [0036]

35