

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 562**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2009 PCT/US2009/056564**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO2010030818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09813630 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2324123**

54 Título: **Obtención de imágenes de moléculas de ARNm individuales, usando múltiples sondas marcadas con un solo marcador**

30 Prioridad:

**10.09.2008 US 191724 P**

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

**14.07.2017**

73 Titular/es:

**RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY (100.0%)**

**Old Queen's, Somerset Street  
New Brunswick, NJ 08909, US**

72 Inventor/es:

**RAJ, ARJUN y  
TYAGI, SANJAY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 624 562 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

Obtención de imágenes de moléculas de ARNm individuales, usando múltiples sondas marcadas con un solo marcador

### Relación con solicitudes anteriores

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre una Solicitud provisional estadounidense, 61/191.724, registrada el 10 de septiembre de 2008.

### Campo de la invención

Esta invención se refiere de manera general a métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos.

### Antecedentes

- 10 A medida que ha ido quedando cada vez más claro que la expresión génica en las células, tomadas de una en una, se aleja significativamente del comportamiento promedio de las poblaciones de células, se precisa de métodos nuevos que proporcionen recuentos exactos, en forma de números enteros, de los números de copias de ARNm contenidos en cada célula. En el caso idóneo, dichos métodos deberían asimismo revelar las localizaciones intracelulares de los ARNm, puesto que la localización del ARNm es a menudo usada por las células para restringir  
15 espacialmente el gen de actividad.

- La hibridación *in situ*, seguida de análisis mediante microscopía, es una manera bien establecida de estudiar la expresión génica. La primera generación de hibridaciones *in situ* se llevó a cabo con sondas radiactivas. Pronto se introdujeron mejoras en las que se unían las sondas a enzimas que catalizan reacciones cromogénicas o fluorogénicas. Sin embargo, dado que los productos de dichas reacciones eran pequeñas moléculas o precipitados  
20 que se alejan, por difusión, de la sonda, no podía determinarse con precisión la localización de las moléculas diana. Y si bien las sondas marcadas directamente con unos pocos fluoróforos mantenían la resolución espacial, la sensibilidad que se puede lograr con ellas es relativamente escasa.

- Robert Singer et col. desarrollaron un procedimiento de hibridación *in situ* que no solo era lo suficientemente sensible para posibilitar la detección de moléculas únicas de ARNm, sino que, además, restringía las señales a las cercanías más inmediatas de las dianas. Hibridaron cinco sondas de oligonucleótidos simultáneamente con cada ARNm diana; cada sonda tenía unos 50 nucleótidos de longitud y se marcó con cinco fracciones fluoróforo. Pese a que los autores demostraron convincentemente que se obtenía sensibilidad a un nivel de molécula única, y pese a que otros grupos han usado de manera satisfactoria estas sondas, el sistema no ha sido adoptado ampliamente. Uno de los motivos de la no adopción de dicho procedimiento es la dificultad de la síntesis y purificación de oligonucleótidos abundantemente marcados. Habitualmente, las fracciones fluoróforo se introducen mediante grupos amino primario que se incorporan a los oligonucleótidos durante la síntesis de estos últimos. Cuando se introducen varios grupos amino en el mismo oligonucleótido, algunos se pierden a causa de reacciones secundarias tales como la transamidación. La unión de los fluoróforos a los grupos amino que quedan es ineficiente y exige llevar a cabo varias reacciones de unión consecutivas; además, resulta difícil purificar, a partir de oligonucleótidos unidos  
30 parcialmente, oligonucleótidos en los que todos los sitios diseñados estén unidos a fluoróforos. Asimismo, cuando algunos fluoróforos están presentes en forma de varias copias en el mismo oligonucleótido, interaccionan entre sí, de modo tal que alteran las características de hibridación de los oligonucleótidos y realizan una severa autosupresión. Estos problemas se evitarían si cada sonda tuviese únicamente un solo grupo amino terminal que sirviese de sitio de unión.

- Otro problema que surge cuando se usan cantidades pequeñas de sondas abundantemente marcadas es que se pierde una porción significativa de fluorescencia por cada sonda que no se une a la diana; además, cada instancia de unión no específica aumenta el "ruido de fondo" (o "fondo"). Esto conduce a una distribución más diseminada del número de sondas unidas a cada ARNm diana. Por ejemplo, Femino et al. calcularon que, cuando se usaban 5 sondas fluorescentes que tenían como diana un único ARNm, la mayoría de los puntos fluorescentes observados  
45 tenían intensidades que indicaban la presencia de tan solo 1 o 2 sondas. *Science* 280, 585-590 (1998). Ello dificulta la identificación no ambigua de dichos puntos fluorescentes como moléculas de ARNm, puesto que es imposible determinar si la detección de una sonda individual se deriva de una unión deseada al ARNm diana o de una unión no específica. Estos problemas de "procesamiento mediante umbrales" limitan la capacidad de dichos métodos para proporcionar recuentos fiables de los números de moléculas de ARNm presentes en una célula concreta.

- 50 Por ello, existe la necesidad de lograr métodos mejorados que proporcionen recuentos fiables de los números de moléculas de ARNm presentes en células individuales, así como la necesidad de lograr sondas que sean fáciles de sintetizar y de purificar.

### Resumen de la invención

- 55 Esta invención da a conocer un método para detectar moléculas de ARNm individuales en células permeabilizadas fijadas, usando varias sondas de hibridación de ácidos nucleicos que se marcan fluorescentemente con un solo

5       marcador, como, por ejemplo, con el mismo fluoróforo. Los inventores han descubierto algo sorprendente: que si al  
menos 30, preferiblemente de 40 a 60, y muy preferiblemente 48 sondas diferentes, todas marcadas con el mismo  
fluoróforo, se hibridan simultáneamente con una secuencia diana de una molécula de ARNm, se crea un punto  
fluorescente que puede detectarse a partir de las fluorescencias combinadas de las múltiples sondas. Las sondas no  
se solapan; es decir, que la región de la secuencia diana con la que se hibrida cada sonda es única (no se solapa  
con otra de tales regiones). Las sondas, de un conjunto de 30 o más, destinadas a hibridarse con una secuencia  
diana seleccionada, pueden diseñarse de modo que se hibriden, de manera adyacente o no adyacente entre sí, con  
tramos de la secuencia diana (desde con un solo nucleótido hasta con cien nucleótidos o más) no complementarios  
de ninguna de las sondas. Por consiguiente, en uno de sus aspectos, la invención da a conocer un método para  
detectar una primera secuencia diana de moléculas de ARNm individuales en una célula permeabilizada fijada; dicho  
método comprende sumergir la célula permeabilizada fijada en una solución de hibridación que contiene un exceso  
de un primer conjunto de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos no solapadas, que tienen  
secuencias complementarias de dicha primera secuencia diana, que tienen de 7 a 30 nucleótidos de longitud y que  
se marcan con un solo marcador: el mismo primer marcador fluoróforo de un primer color; lavar la célula fijada, para  
retirar las sondas no unidas; y detectar los puntos de dicho primer fluoróforo en la célula fijada lavada.

Las sondas útiles en esta invención pueden ser ADN, ARN o mezclas de ADN y ARN. Pueden incluir nucleótidos no  
naturales, así como uniones internucleótido no naturales. Los nucleótidos no naturales que incrementan la afinidad  
de unión de las sondas incluyen 2'-O-metil-ribonucleótidos. Las longitudes de sonda útiles en esta invención son: de  
7 a 30 nucleótidos en el caso de las sondas típicas de ADN o ARN con afinidad de unión promedio. Las longitudes  
preferidas de las sondas de ADN y de ARN están comprendidas en el intervalo de 15 a 30 nucleótidos; más  
preferiblemente, en el intervalo de 17 a 25 nucleótidos; y aún más preferiblemente, en el intervalo de 17 a 22  
nucleótidos. Los inventores han construido las sondas de modo que tengan unos 20 nucleótidos de longitud. Si se  
incluyen formas de aumentar la afinidad de unión una sonda, la sonda puede ser más corta (de tan solo siete  
nucleótidos), como comprenderán los entendidos en la materia. Puede acoplarse un fluoróforo a una sonda en  
cualquier posición; por ejemplo, entre otras posibilidades, en un extremo de una sonda; preferiblemente, en el  
extremo 3'. Pueden incluirse las sondas en una solución de hibridación que contenga un exceso de las múltiples  
sondas; comúnmente, en el intervalo de 0,2 nanogramos a 1 nanogramo por microlitro. Se añade suficiente solución  
para cubrir y humedecer la célula de modo que ésta quede sumergida en la solución que contiene las sondas.

Se pueden aplicar simultáneamente a una sola célula sondas para múltiples secuencias diana de ARNm: para más  
de una secuencia diana de una molécula de ARNm, o para una o más secuencias de diferentes moléculas de  
ARNm. Además, puede aplicarse, a una secuencia diana de una molécula de ARNm, más de un conjunto de  
sondas, y cada uno de esos conjuntos se marca con un fluoróforo distinguible, y los fluoróforos son distinguibles  
entre sí. Por ejemplo, al aplicar sondas a la secuencia de un gen, se pueden usar al menos 30 sondas marcadas en  
verde que tengan una porción de la secuencia del gen como su secuencia diana, así como al menos 30 sondas  
marcadas en rojo que tengan una porción diferente de la secuencia del gen como su secuencia diana. El uso de más  
de un color para cada una de varias dianas permite usar esquemas de codificación por colores en los métodos de  
aplicación de múltiples sondas conformes con esta invención.

Los métodos de esta invención pueden incluir la simple comprobación de si están presentes uno o más puntos que  
representan una secuencia diana. Además, los métodos conformes con esta invención incluyen contar los puntos de  
un color determinado, correspondientes a una especie de ARNm determinada. En los casos en los que se desea  
detectar más de una especie de ARNm, se pueden usar, en la misma mezcla para hibridación, diferentes conjuntos  
de sondas marcadas con fluoróforos distintos. Contando los puntos de diferentes colores se elabora un perfil de  
expresión génica correspondiente a cada especie de ARNm.

Los puntos pueden detectarse utilizando microscopía. No resulta necesario usar un microscopio confocal; basta con  
un microscopio de fluorescencia de campo amplio. A fin de distinguir los puntos que reflejan indudablemente una  
secuencia diana a partir de los puntos difusos que pueden reflejar fluorescencia de fondo o uniones no específicas,  
los métodos conformes a esta invención incluyen la detección. En una realización, la detección comprende filtrar las  
imágenes mediante un filtro Laplaciano de la función Gaussiana (filtro LoG) lineal tridimensional y aplicar un umbral  
de detección. Si se representa gráficamente el número de puntos en tres dimensiones, correspondientes a todos los  
umbrales que oscilan entre cero y la intensidad de píxel máxima, de la imagen filtrada, se observa una meseta  
ancha, indicativa de una región en la que el número de puntos detectado no es sensible al umbral. Así, el método  
comprende, además, representar gráficamente el número de puntos, determinar los límites de una región meseta y  
seleccionar el umbral (preferiblemente, dentro de esa región).

En otro de sus aspectos, esta invención incluye conjuntos de sondas para hibridación *in situ* que permiten detectar  
moléculas de ARNm individuales presentes en las células. Las sondas hacen que cada molécula devenga tan  
intensamente fluorescente que puede ser vista, en forma de pequeño punto fluorescente, mediante microscopía de  
fluorescencia.

Se puede usar un programa informático para identificar y contar todas las moléculas de ARNm presentes en la  
célula, a partir de la imagen de microscopio. Las hibridaciones *in situ* que se llevan a cabo con los conjuntos de  
sondas de la invención que se han descrito hasta aquí permiten el análisis exacto y sencillo de la expresión génica,  
así como la detección de patógenos y de estados patogénicos tales como el cáncer.

Por consiguiente, en otro aspecto de esta invención se da a conocer un método para determinar si un compuesto de prueba afecta a la cantidad o a la distribución de una primera secuencia diana de moléculas de ARNm presentes en una célula, y dicho método comprende (a) incubar la célula con el compuesto de prueba durante un tiempo suficiente para generar una respuesta; (b) permeabilizar la célula; (c) sumergir dicha célula permeabilizada en una solución de hibridación que contiene un exceso de un primer conjunto de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos no solapadas, que tienen secuencias complementarias de dicha primera secuencia diana, que tienen una longitud de 7-30 nucleótidos, y que se marcan con un solo marcador del mismo primer marcador fluoróforo, de un primer color; (d) lavar dicha célula a fin de retirar las sondas no unidas; (e) detectar una cantidad o una distribución de puntos de dicho primer fluoróforo; y (f) comparar dicha cantidad o dicha distribución con la obtenida de un control tratado de modo similar, pero sin el compuesto de prueba.

Se puede usar un soporte legible por un ordenador, que comprenda instrucciones para: obtener una pila 3-D de imágenes fluorescentes 2-D; filtrar dicha pila 3-D usando un filtro para 3-D; contar un número total de puntos 3-D en dicha pila 3-D filtrada, correspondientes a cada uno de una diversidad de umbrales de intensidad; obtener un umbral de intensidad óptimo, representativo de una región meseta, en una representación gráfica de dicho número total de puntos 3-D frente al umbral de intensidad al que se contó dicho número total; y usar el número total de puntos 3-D obtenido con dicho umbral óptimo como representativo de un número de partículas fluorescentes detectadas en dicha pila 3-D.

Puede usarse un kit que, en general, comprenda el conjunto de sondas y los soportes legibles por ordenador, como se ha descrito anteriormente.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la detección simultánea de una sola secuencia, y de una secuencia repetida, en moléculas de ARNm individuales. La Figura 1A es una ilustración esquemática del constructo empleado. Las 48 sondas usadas para detectar la secuencia codificadora de la GFP (proteína fluorescente verde) fueron marcadas con Alexa-594, y las cuatro sondas diferentes usadas para detectar la repetición en tándem en la UTR (región no traducida) 3' fueron marcadas con TMR (tetrametilrodamina). La Figura 1B ilustra las fusiones de intensidad máxima de un par de pilas z de imágenes fluorescentes de células CHO (células ováricas de hámster chino), tomadas en el canal del Alexa-594 (izquierda) y en el canal de la TMR (derecha), correspondientes a las sondas de la región codificadora de la GFP y de la UTR, respectivamente. La Figura 1C ilustra una fusión, en color falso, de las imágenes de la Figura 1B, circundadas por los recuadros de color rojo (GFP) y verde (UTR), con círculos de color rojo que representan partículas de ARNm de GFP, identificadas informáticamente, círculos de color verde que representan partículas de la UTR, y círculos de color amarillo que representan partículas situadas en los mismos lugares ("colocalizadas"). Todas las barras de escala son de 5  $\mu\text{m}$  de longitud.

La Figura 2 muestra el análisis de intensidades de los puntos colocalizados. Las intensidades de punto correspondientes a las sondas que tienen como diana la GFP (canal del Alexa 594, eje y) y a las sondas multiméricas que tienen como diana la UTR (canal de la TMR, eje x) se calcularon restando, de la intensidad máxima presente en la región de puntos identificada informáticamente, la intensidad media de una región anular que rodea al punto. Los histogramas de los márgenes muestran las distribuciones de las intensidades de punto correspondientes a la GFP (derecha) y a la UTR (parte superior).

La Figura 3 muestra la sensibilidad del método en función de los diferentes números de sondas empleados. La Figura 3A ilustra la intensidad de punto (definida como intensidad máxima dentro del punto, menos la intensidad de fondo media registrada en una región anular que rodea al punto), como función del número de sondas elegido. Las intensidades correspondientes a las sondas 12 y 24 "presentan artefacto" (ruido), en cuanto a que no se podía identificar sin dificultades los puntos en esos casos, por lo que los puntos identificados se sesgaban hacia una mayor brillantez. La Figura 3B ilustra el número de puntos (es decir, componentes conectados) encontrado al establecer umbrales para la imagen filtrada; dicho número de puntos se representa como función del valor umbral (que oscila entre 0 y la intensidad máxima de la imagen filtrada [normalizada a 1]), correspondiente a diferentes números de sondas. La barra gris indica el umbral usado para el análisis de la Figura 3A.

La Figura 4 muestra una comparación con el método de detección de ARNm empleado en Femino et al. (Science 1998). La Figura 4A es un esquema que ilustra el método que se describe en este manuscrito, con 48 sondas marcadas con un solo marcador (izquierda), y el método de Femino et al., en el que cada sonda de 45 pb (pares de bases) contiene cinco fluoróforos y tiene como diana un elemento de secuencia que se repite 32 veces en la UTR 3' del ARNm diana que se expresa a partir de un transgén en células ováricas de hámster chino. La Figura 4B ilustra una comparación de las intensidades de punto que se obtienen usando 48 sondas marcadas con un solo marcador o usando una sonda de 45 pb marcada con cinco fluoróforos. Las barras de error representan una desviación estándar.

La Figura 5 muestra la identificación informática de los puntos de ARNm. La Figura 5A ilustra los datos de la imagen sin procesar (fusión de intensidad máxima) obtenidos al tomar imágenes de partículas de ARNm de FKBP5 (proteína 5 de unión a FK506) en células A549 inducidas con dexametasona. La Figura 5B ilustra la MAGE (fusión máxima) obtenida al filtrar los datos sin procesar mediante un filtro Laplaciano de la (función) Gaussiana a fin de mejorar los

puntos. La Figura 5C ilustra el número de puntos (es decir, componentes conectados) encontrados al procesar mediante umbrales la imagen filtrada de la Figura 5B, representados como función del valor umbral, que oscila entre 0 y la intensidad máxima de la imagen filtrada (normalizada a 1). La Figura 5D es una imagen que muestra los resultados del uso del umbral representado por la línea gris de la Figura 5C; a cada punto bien diferenciado se le asigna un color al azar. Todas las barras de escala son de 5  $\mu\text{m}$  de longitud.

La Figura 6 muestra la toma de imágenes simultánea de moléculas únicas de tres ARNm diferentes en células de mamífero. Las Figuras 6A-6C ilustran imágenes que muestran partículas de ARNm de FLJ11127, Cox-2 y FKBP5, en el mismo conjunto de células A549, no tratadas con dexametasona. Las Figuras 6D-6F ilustran imágenes que muestran partículas de FLJ11127, Cox-2 y FKBP5, en células tratadas durante 8 horas con dexametasona 24 nM. La Figura 6G ilustra la inducción (multiplicación por un número de veces) de la totalidad de los tres genes, conforme a lo medido mediante FISH (hibridación in situ fluorescente) y mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa) en tiempo real; las barras de error correspondientes a la FISH se obtuvieron mediante "bootstrapping" (remuestreo de datos), y las correspondientes a la RT-PCR se obtuvieron mediante repetición, conforme a lo descrito en la información suplementaria. Todas las imágenes son fusiones máximas de una pila z de imágenes fluorescentes que abarcan la extensión de las células con contratinción nuclear con DAPI en morado, y todas las barras de escala tienen 5  $\mu\text{m}$  de longitud.

La Figura 7 muestra el examen de la "bleedthrough" (transferencia no intencionada) de los puntos fluorescentes. La Figura 7A es una ilustración de las imágenes de un punto de ARNm de FLJ11127 marcado con TMR, tal y como se ve a través los canales de filtrado TMR, Alexa 594 y Cy5. Debajo se proporcionan digitalizaciones lineales de la intensidad fluorescente correspondiente a la línea que atraviesa la imagen; las diferentes digitalizaciones lineales son las correspondientes a las mediciones tomadas al aumentar z (espaciado de 0,25  $\mu\text{m}$ ). La digitalización lineal verde es la correspondiente al corte z que aparece en la imagen en sí. Se realizó un análisis similar respecto de un punto de ARNm de Cox-2 marcado con Alexa 594 (Figura 7B) y respecto de una partícula de ARNm de FKBP5 marcada con Cy5 (Figura 7C). En todas las mediciones de la intensidad de las digitalizaciones lineales, se restó la intensidad de fondo de la cámara; dichas mediciones oscilan entre 0 y 200 unidades de fluorescencia arbitrarias.

La Figura 8 ilustra la demostración de que el captador de oxígeno incrementa la fotoestabilidad del Cy5. La Figura 8A ilustra la media de la fluorescencia de punto máxima de una serie de ARNm de FLJ11127 marcados usando sondas conjugadas con TMR; se representó dicha fluorescencia como función del número de exposiciones de 2 segundos usando un filtro específico para TMR. Se generaron curvas correspondientes a las imágenes tomadas tanto con (azul) como sin (rojo) el sistema captador de oxígeno. Se realizó un análisis similar respecto de ARNm de Cox-2 marcados usando sondas conjugadas con Alexa-594, con exposiciones de 2 segundos (Figura 8B) y respecto de ARNm de FKBP5 marcados usando sondas conjugadas con Cy5, con exposiciones de 2,5 segundos (Figura 8C). La Figura 8D ilustra el porcentaje de blanqueo por exposición (en unidades de fracción de fluorescencia perdida por exposición) correspondiente a las sondas conjugadas con TMR, Alexa-594 y Cy5 (Figuras 8A-8C), tanto con como sin el sistema anti-blanqueo captador de oxígeno. El porcentaje de blanqueo se calculó ajustando la curva de degradación de cada partícula individual a un exponencial y tomando la media de las constantes de degradación ajustadas. Las barras de error corresponden a una desviación estándar. Se seleccionó un mínimo de 6 partículas en cada condición.

La Figura 9 muestra la obtención de imágenes de ARNm localizados en *C. elegans* y en *D. melanogaster*. La Figura 9A es una ilustración de moléculas de ARNm (rojo) de *elt-2* en un embrión en estadio temprano (estadio de ~100 células) de *C. elegans*; los núcleos han sido contratados con DAPI (azul). La Figura 9B es una ilustración de moléculas de ARNm de *elt-2* en una larva L1 (larva de primer estadio) de *C. elegans*. Dentro del recuadro azul, se muestra un solo plano focal en el que resulta visible el tracto intestinal. La Figura 9C es una ilustración esquemática de la expresión de los genes *dpp* y *engrailed* en los discos imaginales alares de larvas de tercer estadio de *D. melanogaster*. La Figura 9D es una imagen que muestra las ubicaciones de las moléculas de ARNm de *dpp* (círculos de color azul claro) y de la expresión de Engrailed detectadas mediante inmunofluorescencia (azul oscuro), identificadas informáticamente. La Figura 9E es una imagen que contiene señales mejoradas de moléculas de ARNm de *dpp* (azul claro) y de la expresión mejorada de la proteína Engrailed detectadas mediante inmunofluorescencia (azul oscuro). Todas las imágenes, excepto la porción recuadrada de la Figura 9B, son fusiones máximas de una pila z de imágenes fluorescentes, y todas las barras de escala tienen 5  $\mu\text{m}$  de longitud.

La Figura 10 muestra las imágenes obtenidas de moléculas únicas de ARNm en levaduras y en neuronas. La Figura 10A y la Figura 10B ilustran partículas de ARNm de *STL1* tanto en células inalteradas (Figura 10A) como en células sometidas a un choque de sal con NaCl 0,4M durante 10 minutos, con contratinción nuclear mediante DAPI en color morado (Figura 10B). La Figura 10C ilustra la expresión de ARNm de  $\beta$ -actina (verde) y de Map2 (rojo) en neuronas de hipocampo de rata en un cultivo de neuronas disociadas. La Figura 10D ilustra una imagen, ampliada y con contraste, de un segmento de una dendrita, que en la Figura 10C aparece rodeado por el recuadro rojo. Todas las barras de escala son de 5  $\mu\text{m}$  de longitud.

La Figura 11 es una ilustración de las secuencias diana y sondas empleadas en la presente invención.

**Descripción detallada de la invención**

Esta invención se refiere, en parte, a la concepción de un algoritmo de análisis de imágenes que hace uso de una estrategia rigurosa, objetiva, de procesamiento mediante umbrales, y demuestra que podemos identificar y contar, de manera exacta y no ambigua, todas las moléculas de ARNm diana presentes en la célula. La simplicidad y robustez de este enfoque permite la detección fiable de tres especies diferentes de ARNm dentro de las mismas células. Empleando un conjunto riguroso de criterios, los inventores han demostrado que el método permite obtener imágenes extremadamente específicas de ARNm únicos, en un amplio espectro de tipos de células y de organismos modelo.

Los inventores han aprovechado la disponibilidad de los sintetizadores de ADN de 96 pocillos para sintetizar muchas sondas más pequeñas, marcadas en el extremo, diferentes, que tienen establecida la misma diana. Los resultados obtenidos muestran que, cuando un conjunto de al menos 30, preferiblemente de al menos 40, más preferiblemente, de unos 48 (la mitad de una placa de 96 pocillos que se usa para la síntesis de grandes cantidades de ADN), o de más sondas, marcadas con un solo marcador, se unen a la misma molécula de ARNm, la tornan lo suficientemente fluorescente para que se pueda ver como un punto, limitado por difracción, en un microscopio de campo amplio. Los sitios no específicos únicamente se asocian con una sonda o con unas pocas sondas, y producen señales difusas, mientras que las dianas deseadas (específicas) se unen a la totalidad de las sondas, o a la mayoría de las sondas, y producen un punto claramente detectable correspondiente a cada molécula de ARNm.

Además, los inventores han concebido y desarrollado un algoritmo de análisis de imágenes que hace uso de una estrategia de procesamiento mediante umbrales rigurosa, objetiva, y que demuestra que es posible identificar y contar de manera exacta y no ambigua todas las moléculas de ARNm diana presentes en la célula. La simplicidad y robustez de este enfoque permite la detección fiable de tres especies diferentes de ARNm dentro de las mismas células. Empleando un conjunto riguroso de criterios, los inventores demuestran que el método permite obtener imágenes extremadamente específicas de ARNm únicos, en un amplio espectro de tipos de células y de organismos modelo.

Por lo tanto, 48 o más sondas de oligonucleótidos marcadas con un solo marcador permiten detectar moléculas de ARNm individuales. Las moléculas de ARNm se visualizaron como puntos limitados por difracción que se pueden detectar fácilmente mediante una configuración de microscopía de campo amplio estándar. Los puntos eran lo suficientemente brillantes para poder contarlos de manera exacta mediante el algoritmo de procesamiento de imágenes para detección de puntos que aquí se describe.

Los inventores obtuvieron recuentos cuantitativos de tres especies de moléculas de ARNm diferentes, dentro de células individuales. Tal análisis facilita la determinación exacta de múltiples perfiles de expresión génica de incluso genes que apenas se expresan, en una miríada de organismos modelo.

La base de la especificidad del sistema que aquí se describe es que la mayoría de las sondas, o la totalidad de las mismas, se unen al ARNm diana deseado, y producen una señal particulada, mientras que los sitios de unión no específica del resto de la célula se unen con una cantidad menor de moléculas de sonda y producen una señal difusa que el algoritmo de recuento de puntos ignora. Ello viene a subrayar una ventaja clave del presente método frente a otros métodos de hibridación *in situ*, en los que se usan sondas abundantemente marcadas, tales como los dendrímeros. Si cada molécula de sonda es detectable, cada instancia de unión no específica ocasionará un falso positivo y todo ARNm al que no se una la sonda ocasionará un falso negativo. En cambio, la probabilidad de falsos negativos y falsos positivos disminuye a medida que se incrementa el número de sondas y, en general, cuando se tiene una eficiencia de hibridación dada, aumentar el número de sondas diferentes estrecha la distribución de las sondas unidas por molécula. El análisis de imágenes conforme a la presente invención mostró que, aumentando el número de sondas se obtiene una robusta detección de puntos que no depende de umbrales elegidos arbitrariamente. Ello resulta crucial para contar con exactitud el número de ARNm por célula, que es una característica clave del método de la invención.

Una cuestión relacionada es el diseño de la sonda configurada; en dicho diseño, un posible factor es la uniformidad en las afinidades de hibridación. Puesto que la afinidad de los oligonucleótidos está dominada en gran medida por su contenido relativo en GC, los inventores han creado un programa informático con el que diseñar un conjunto de sondas con un contenido total en GC óptimamente uniforme. Dicho programa informático está a la disposición del público.

Desde un punto de vista práctico, el método aquí reivindicado proporciona además notables ventajas frente al método FISH para moléculas únicas de ARNm que se conocía anteriormente, tanto en términos de tiempo como en términos de coste. Gracias a los avances logrados en la síntesis en general, los investigadores pueden comprar, con facilidad y a un coste bajo, grandes cantidades de oligonucleótidos con modificadores amino 3'. Después, se puede agrupar, acoplar y purificar en masa dichos oligonucleótidos, lo que reduce notablemente el tiempo y la mano de obra asociados a los múltiples acoplamientos y a las múltiples purificaciones necesarias para generar una sonda marcada con múltiples marcadores. La simplicidad y la rentabilidad resultantes del presente método facilitarán los estudios de nivel genómico en los que haya que detectar muchos ARNm diferentes. Además, la flexibilidad del procedimiento de hibridación permite combinar éste con otras técnicas estándar como, por ejemplo, la

inmunofluorescencia.

En otra realización, se pueden incorporar los fluoróforos a las sondas durante la síntesis automatizada de ADN.

Otros métodos para la cuantificación del número de ARNm en células individuales son, entre otros, la RT-PCR de una sola célula y la RT-PCR digital. Uno de los problemas que presentan dichos métodos lo constituyen las dificultades prácticas asociadas al ensamblaje de grandes cantidades de reacciones individuales que exigen usar dispositivos microfluídicos o robóticos. Además, dichos métodos adolecen de problemas en cuanto a las variaciones estocásticas en la amplificación exponencial, cuando las entradas diana son únicamente unas pocas moléculas. Tal comportamiento estocástico complica el análisis de la expresión de los genes de una sola célula, y dicha expresión en sí está sujeta a fuerzas estocásticas. Asimismo, dichos métodos no proporciona información alguna sobre la ubicación espacial de los ARNm.

Dada la simplicidad y la amplia capacidad de aplicación de nuestro método de detección de moléculas de ARNm únicas, dicho método resulta adecuado para una amplia diversidad de estudios. Obteniendo recuentos exactos de ARNm en células individuales, se pueden realizar determinaciones exactas, tanto de las diferencias en la expresión en condiciones diferentes, como en la variabilidad entre células en cuanto a la expresión génica. Dado que este método proporciona mediciones cuantitativas, espaciales de los ARNm individuales en células individuales, resulta valioso en muchos estudios de los ámbitos de la biología de sistemas, la biología celular, la neurobiología y la biología del desarrollo.

De igual modo, este método puede utilizarse en multitud de ensayos, incluido, entre otros, un ensayo de determinación. En una realización, el ensayo de determinación determina si un compuesto de prueba afecta a una cantidad o a una distribución de una secuencia diana de moléculas de ácido ribonucleico mensajero (moléculas de ARNm); dicha secuencia diana incluye al menos 30 regiones, de 7-30 nucleótidos, no solapadas, de unión a sondas, en una célula. En general, el ensayo comprende los siguientes pasos: incubar una célula con un compuesto de prueba durante un período de tiempo suficiente para generar una respuesta; permeabilizar la célula; sumergir dicha célula en un exceso de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos (cada una de dichas sondas se marca con un solo marcador —el mismo marcador fluorescente—, y cada una de dichas sondas contiene una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria de una región de unión a sondas diferente de dicha secuencia diana); lavar dicha célula fijada, a fin de retirar las sondas no unidas; detectar una cantidad de fluorescencia, o una distribución de la fluorescencia, a partir de dichas sondas (las unidas); comparar dicha cantidad o dicha distribución con una cantidad o una distribución, respectivamente, obtenida a partir de una célula de control tratada de manera igual a la descrita, salvo por el hecho de que no se incubó con el compuesto de prueba.

Los compuestos que resultan adecuados como compuestos de prueba son, entre otros posibles, los siguientes: compuestos basados en péptidos (por ejemplo, anticuerpos o nanocuerpos), compuestos que interfieren con el ARN (por ejemplo, ARNsi, ARNsh, ARNm, etc.), y pequeñas moléculas. Todos estos compuestos se pueden producir de conformidad con los métodos conocidos en este campo del conocimiento. Por ejemplo, Naito (US 20080113351) y Khvorova (US 20070031844) proporcionan métodos para seleccionar compuestos que interfieren activamente con el ARN. Asimismo, pueden prepararse anticuerpos mediante técnicas conocidas como, entre otras posibles, las siguientes: uso de hibridomas, selección de anticuerpos monoclonales, uso de bibliotecas de exposición a fagos, humanización de anticuerpos y otras técnicas similares.

Los compuestos “pequeñas moléculas” pueden seleccionarse mediante análisis de las bibliotecas adecuadas. En un aspecto, se sintetizan bibliotecas de pequeñas moléculas conforme a métodos bien conocidos y puestos en práctica rutinariamente en este campo del conocimiento. Véase, por ejemplo, Thompson y Ellman, *Chem. Rev.* 1996, 96, 555-600, Shipps, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, páginas 11833-11838, octubre de 1997, y *Combinatorial Library Design and Evaluation – Principles, Software Tools and Applications in Drug Discovery*, Ghose y Viswanadhan (eds), Marcel Dekker 2001. Como alternativa, se pueden obtener bibliotecas de pequeñas moléculas de cualquiera de una serie de fuentes que incluye, por ejemplo, el “NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository” (repositorio de pequeñas moléculas de las bibliotecas moleculares del NIH [Instituto Nacional de la Salud] estadounidense). Otras fuentes alternativas son, entre otras, las siguientes: AnalytiCon Discovery GmbH (Potsdam, Alemania), que comercializa MEGAbolite®, bibliotecas de pequeñas moléculas obtenidas de productos naturales puros, y NatDiverse™, bibliotecas de pequeñas moléculas obtenidas de productos semisintéticos análogos de productos naturales; Quantum Pharmaceuticals Ltd. (Moscú, Federación Rusa); y Praecis Pharmaceuticals Incorporated (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Puede usarse software que ponga en práctica el algoritmo de procesamiento mediante umbrales ya descritos en esta invención. Así, un soporte legible por un ordenador puede comprender instrucciones para: obtener una pila 3-D de imágenes fluorescentes en 2-D; filtrar dicha pila 3-D usando un filtro para 3-D; contar un número total de puntos 3-D en dicha pila 3-D filtrada, correspondientes a cada uno de una diversidad de umbrales de intensidad; obtener un umbral de intensidad óptimo, representativo de una región meseta, en una representación gráfica de dicho número total de puntos 3-D frente al umbral de intensidad al que se contó dicho número total; y usar el número total de puntos 3-D obtenido con dicho umbral óptimo como representativo de un número de partículas fluorescentes detectadas en dicha pila 3-D.

El procesamiento mediante umbrales puede llevarse a cabo usando un filtro Laplaciano de la (función) Gaussiana (filtro LoG) lineal tridimensional.

5 Un kit puede comprender un soporte legible por un ordenador que ponga en práctica el algoritmo de procesamiento mediante umbrales, de la manera descrita, y un conjunto de sondas que tengan establecida como diana una secuencia diana previamente seleccionada. Las sondas descritas en relación con el método reivindicado son también adecuadas para dicho kit.

A continuación se describen, en los siguientes ejemplos, realizaciones concretas conformes con los métodos de la presente invención. Los ejemplos son meramente ilustrativos y no tienen como finalidad limitar el resto de la especificación/invención en modo alguno.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

Los procedimientos que se describen en esta sección son aplicables a la totalidad de los ejemplos, a menos que se indique lo contrario.

#### Diseño de las sondas

15 Se diseñaron conjuntos de sondas de manera tal que comprendiesen al menos 48 oligonucleótidos cada una, con longitudes que oscilasen entre 17 y 22 nucleótidos, y una modificación amino 3' (se aplicaron sondas a ARNm de FKBP5, FLJ11127 y Map2 usando 63, 53 y 72 oligonucleótidos respectivamente). Además, se mantuvo el contenido en GC de los oligonucleótidos lo más cercano posible a un 45%. Se agruparon los oligonucleótidos y se acoplaron a un fluoróforo, todo ello en una sola reacción; después, los oligonucleótidos no acoplados y los fluoróforos libres  
20 restantes se retiraron mediante purificación con HPLC.

#### Hibridación *in situ* fluorescente

De cara a la FISH (hibridación *in situ* fluorescente), se fijaron todas las muestras en formaldehído al 3,7% y se permeabilizaron con etanol. La hibridación se llevó a cabo usando tampones y condiciones similares a los que se describen en Femino et al., con una diferencia principal: la astringencia de la hibridación, que se redujo reduciendo  
25 la cantidad de formamida al 10%. Se determinó empíricamente la concentración de sonda que proporcionaba una señal óptima.

#### Obtención de imágenes y análisis de los datos

Todas las imágenes se adquirieron usando un microscopio de fluorescencia de campo amplio estándar. La detección y el recuento de partículas, asistidos por ordenador, se llevaron a cabo con filtros lineares diseñados para  
30 mejorar las señales particuladas.

### Ejemplo 2: Aplicación de sondas a secuencias repetidas y únicas presentes en la misma molécula de ARNm

Utilizando pequeñas sondas de oligonucleótidos marcadas con una sola fracción fluoróforo, los inventores han demostrado que las moléculas de ARNm individuales diseñadas de manera que contengan 32-96 copias en tándem  
35 de una secuencia que se une a sondas pueden detectarse mediante hibridación *in situ*. Además, los inventores demostraron que los puntos individuales que aparecen en la imagen representan moléculas únicas de ARNm; para ello, emplearon una serie de enfoques diferentes, entre ellos, correlacionar el número medio de copias de ARNm obtenido mediante recuento directo de los puntos limitados por difracción con una medición del número de moléculas diana obtenidas mediante RT-PCR en tiempo real. Así, si se utilizan muchas sondas diferentes, y cada una de ellas tiene como diana una región distinta de un ARNm natural, sería posible obtener sensibilidad a un nivel  
40 de molécula única sin tener que hacer uso de genes "diseñados".

Para la prueba inicial de esta hipótesis, los inventores construyeron un gen controlado por doxiciclina que producía un ARNm que codificaba la denominada "proteína fluorescente verde" (GFP, por sus siglas en inglés) y que presentaba 32 secuencias repetidas en tándem, cada una de ellas, de 80 nucleótidos de longitud, en su UTR 3';  
45 después, este gen "diseñado" se integró de manera estable en el genoma de una línea celular de células ováricas de hámster chino. Al ARNm expresado a partir de este gen se le aplicaron simultáneamente 48 oligonucleótidos diferentes, cada uno de ellos, complementario de una región única (una sola región) de la secuencia codificadora, así como un conjunto de cuatro oligonucleótidos, cada uno de ellos con una secuencia complementaria en el motivo repetido (un total de 128 sondas unidas) (Figura 1A). Cada oligonucleótido del conjunto de sondas que era específico de la secuencia codificadora se marcó con un solo fluoróforo Alexa-594, y cada oligonucleótido del  
50 conjunto, específico de la secuencia repetida, se marcó con un solo fluoróforo tetrametilrodamina (TMR). El uso de los conjuntos de filtros adecuados garantizó que la fluorescencia emitida por los fluoróforos TMR no se detectaba en el canal del Alexa-594, y viceversa, como se describe a continuación.

Tras efectuar FISH con estas sondas, los inventores descubrieron que muchas "partículas" con un diámetro de unos 0,25 micrómetros eran visibles tanto en el canal de la TMR como en el canal del Alexa-594 (Figura 1B). Las



partículas se identificaron informáticamente usando un programa de procesamiento de imágenes (que se describe en la siguiente sección) que categoriza las partículas como marcadas con las sondas que tienen como diana la secuencia codificadora de la GFP (TMR), o como marcadas con las sondas específicas de UTR (Alexa-594), o como marcadas con ambos tipos de sondas (Figura 1C). Tras identificar y localizar las partículas en cuatro campos de visión similares a los que se ilustran en la Figura 1C, se contó un total de 599 partículas correspondientes a las sondas que tienen como diana la secuencia codificadora de la GFP, y de 565 partículas correspondientes a las sondas específicas de UTR. De dichas partículas, el 85% de las “partículas de la UTR” estaban localizadas en el mismo lugar que (“colocalizadas con”) las “partículas de la GFP”; a su vez, el 81% de las partículas de la GFP estaban colocalizadas con las partículas de la UTR. El elevado grado de colocalización entre las partículas detectadas mediante el método de detección de la repetición en tándem determinada previamente y las partículas detectadas mediante aplicación simultánea de sondas (48 oligonucleótidos diferentes marcados con un solo marcador) demuestra la validez del uso de múltiples sondas marcadas con un solo marcador, para la detección de transcritos endógenos. Es probable que la fracción de partículas que no mostraban colocalización se corresponda a moléculas de ARNm que habían perdido su secuencia codificadora o su UTR 3' en el transcurso de los procesos naturales de degradación del ARNm.

Los inventores analizaron también la intensidad de la fluorescencia de los puntos colocalizados, tanto en el canal de la TMR como en el canal del Alexa-594, y descubrieron que las intensidades de punto mostraban una distribución unimodal (**Figura 2**); argumentan que las partículas detectadas no son grupos de muchos ARNm, sino moléculas individuales. Las intensidades de punto mostraron una fuerte correlación entre ambos canales (**Figura 3**). Puesto que no hay comunicación/contacto entre ambos canales, la fuerte correlación observada indica que la variabilidad en cuanto a la intensidad de punto no se debía principalmente a una variabilidad aleatoria en la hibridación de las sondas (que no estaría correlacionada entre diferentes conjuntos de sondas), sino a otros factores, tales como la integridad o accesibilidad del ARNm, que afectan a ambos tipos de sondas por igual.

Además, los inventores exploraron cómo la intensidad de señal variaría en función del número de sondas; para ello, efectuaron hibridaciones *in situ* usando las primeras 12, 24 o 36 sondas, o la totalidad de las 48 sondas del conjunto. En el caso de este ARNm diana concreto, se descubrió que se podía detectar las partículas con números (cantidades) menores de sondas, si bien la intensidad disminuía (**Figura 3A**). No obstante, el algoritmo de detección automática de puntos (que se describe detalladamente en la siguiente sección [en el siguiente Ejemplo]) proporcionó un rendimiento particularmente bueno con 48 sondas: detectó el mismo número de puntos usando un amplio intervalo de umbrales (**Figura 3B**, véase información detallada adicional en la siguiente sección). Sin embargo, es probable que el número de sondas necesario para obtener una señal robusta dependa de la secuencia diana, puesto que los inventores han obtenido señales de ARNm claras usando cantidades de sondas menores: por ejemplo, con tan solo 30 sondas. Cuando se comparó el método de la presente invención con el método de Femino et al. mediante el uso de un oligonucleótido de 45 pb de longitud marcado con 5 fluoróforos y complementario de una secuencia repetida 32 veces en la UTR 3' de un gen, lo que producía 160 fluoróforos por ARNm (**Figura 4A**), se descubrió que la relación señal/fondo era más o menos igual en ambos métodos (**Figura 4B**), lo que indica que el método reivindicado en la presente invención es como mínimo igual de sensible, pese a que en él se usan menos fluoróforos.

Además, células CHO que carecían del gen informador no produjeron señal alguna, mientras que con células CHO con el gen informador, que se desactivó mediante adición de doxiciclina, se obtuvieron partículas de ARNm en tan solo unas pocas células, lo que indica que las señales observadas eran específicas.

### Ejemplo 3: Algoritmo informático para la detección de puntos

A fin de identificar fiablemente números altos de moléculas de ARNm, los inventores concibieron un algoritmo informático semiautomatizado para la detección de puntos en una pila tridimensional de imágenes fluorescentes. Una de las dificultades asociadas a la detección de puntos es el “ruido de fondo” (o “fondo”) no uniforme derivado de la autofluorescencia celular y de los niveles bajos de hibridación no específica de las sondas. Para superar estas dificultades, los inventores filtraron pilas de imágenes usando un filtro Laplaciano de la (función) Gaussiana (filtro LoG) lineal tridimensional diseñado para mejorar las señales tipo punto del tamaño y de la forma geométrica correctos (**Figura 5A** y **Figura 5B**) y que, a la vez, elimina el fondo que varía con lentitud. En un paso posterior en el algoritmo, los inventores aplicaron un umbral a la imagen filtrada, a fin de definir los puntos. Para poder elegir racionalmente un umbral, se contó el número de puntos en tres dimensiones correspondiente a todos los umbrales de un intervalo comprendido entre cero y la intensidad de píxel máxima presente en la imagen filtrada. Cuando los inventores representaron gráficamente el número de partículas como función del umbral, se observó una meseta ancha, lo que indica que hay una región por encima de la cual el número de partículas detectado es bastante independiente del (no es sensible al) umbral concreto elegido (**Figura 5C**). Cuando se elige un umbral dentro de esa región, los puntos detectados se corresponden muy bien con los que se identifican visualmente, lo que demuestra la eficacia del algoritmo de detección de puntos (**Figura 5D**).

### Ejemplo 4: Determinación de los perfiles de expresión génica de tres especies de ARNm diferentes

Un posible uso del método reivindicado en la presente invención es la detección simultánea de moléculas únicas de múltiples ARNm en células individuales. A fin de demostrar que el método tiene esa capacidad, los inventores

diseñaron sondas específicas de tres ARNm codificadores de FKBP5, de Cox-2 y de FLJ1127 en la línea celular de carcinoma humano A549. Dichas sondas se acoplaron a los fluoróforos espectralmente distintos Cy5, Alexa 594 y TMR, respectivamente. Al efectuar FISH con la totalidad de las tres sondas simultáneamente, fueron visibles puntos individuales en los tres canales de fluorescencia diferentes (**Figuras 6A-6F**); un análisis de intensidades reveló que los puntos fluorescentes no se transfieren a los otros canales (**Figura 7**).

Para demostrar que el método reivindicado de detección del ARNm era específico y cuantitativo, se incubaron las células con el glucocorticoide dexametasona, que atraviesa la membrana celular; con ello, se aumentó la expresión de FKBP5 y de FLJ1127, y se redujo ligeramente la expresión de Cox-2 en esta línea celular concreta. Los inventores descubrieron que el número medio de ARNm de FKBP5 y de FLJ1127, medido combinando FISH con el algoritmo de detección de puntos de la presente invención, aumentó; en cambio, el número medio de ARNm de Cox-2, medido de la forma indicada, disminuyó (compárense las **Figuras 6A-6C** con las **Figuras 6D-6F**). Estos números se correspondían bien con las mediciones, efectuadas mediante RT-PCR, de la inducción (multiplicación por un número de veces) y represión (división por un número de veces) de la expresión de estos genes llevadas a cabo con las mismas muestras, lo que demuestra que los puntos fluorescentes son los ARNm correctos y que con los métodos reivindicados en la presente invención (**Figura 6G**) se detectó la mayoría de las moléculas de ARNm. Además, ello supone una demostración adicional de la eficacia del método de detección de puntos en lo referente a la cuantificación exacta de la expresión génica.

Una dificultad técnica que surgió a la hora de obtener imágenes de varios ARNm simultáneamente fue la fotolabilidad del fluoróforo; en particular, la del Cy5. A fin de obtener imágenes de la totalidad de las moléculas de ARNm presentes dentro de una sola célula, se adquirieron de 10 a 30 imágenes de un "corte z" por cada campo visual, utilizando una exposición de uno a tres segundos para cada imagen y un objetivo de alta apertura numérica. Solo la TMR y, en un grado menor, el Alexa-594, fueron capaces de soportar esta exposición intensa y relativamente prolongada a la luz; Cy5, por ejemplo, se mostró extremadamente fotolábil en estas condiciones (**Figura 8**). A fin de superar este problema, los inventores emplearon un medio de montaje especial en el que los fluoróforos son mucho más fotoestables (un método que se adaptó de Yildiz *et al.*, con modificaciones de escasa importancia). En dicho medio, una mezcla de catalasa, glucosa oxidasa y glucosa retira enzimáticamente el oxígeno molecular del medio, con lo que se inhiben las rutas iniciadas por la luz, dependientes de oxígeno, que destruyen a los fluoróforos. El uso de esas enzimas conduce a un aumento espectacular, de x10, en la fotoestabilidad del Cy5, y no perjudica la obtención de imágenes con TMR y Alexa-594, lo que facilita la adquisición de múltiples cortes z cuando se efectúa la obtención de imágenes con tres colores.

#### **Ejemplo 5: detección de ARNm en organismos y tipos celulares modelo**

Uno de los usos aceptados de la hibridación *in situ* ha sido la detección de la localización del ARNm durante el desarrollo. Los inventores probaron la eficacia del método aquí reivindicado en dos sistemas de desarrollo que se estudian frecuentemente: el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En el nematodo, los inventores construyeron sondas con las que detectar las moléculas de ARNm del gen *elt-2*, un factor de transcripción que solo se expresa en el intestino del nematodo y solo después de que el embrión del nematodo se ha desarrollado hasta alcanzar el estadio de 45 células. Tras la hibridación del conjunto de sondas en embriones y en larvas, se observó que las moléculas de ARNm de *elt-2* solo estaban presentes dentro de la región del intestino (**Figura 9A**), tanto en los embriones como en las larvas (**Figura 9B**), si bien, de conformidad con lo conocido sobre el momento de la aparición de la expresión en los embriones, solo se detectaron ARNm de *elt-2* en el intestino de los embriones con una edad superior al estadio de 45 células, lo que de nuevo subraya la especificidad del método reivindicado en la presente invención. Además, en esos estadios tempranos, solo se detectaron unos pocos transcriptos, lo que demuestra que este método es lo suficientemente sensible para detectar incluso cantidades pequeñas de transcriptos en tejidos complejos.

En la mosca de la fruta, que es uno de los ejemplos mejor estudiados de la localización de la expresión génica, esta última aparece durante el desarrollo de los discos imaginales alares. Los discos alares de las larvas de la mosca de la fruta muestran un conjunto muy interesante de patrones de expresión génica; uno de dichos patrones es la formación de una banda de expresión del gen *dpp* en respuesta a los gradientes de las proteínas "Hedgehog" y "Engrailed". En particular, Engrailed, que regula a la baja (reduce) la síntesis de ARNm de *dpp*, está presente en cantidades altas en el compartimento posterior del disco alar, y en cantidades bajas en el compartimento anterior del disco alar. De manera similar, Hedgehog, que regula al alza (aumenta) la síntesis de ARNm de *dpp*, está presente en cantidades altas en el compartimento posterior del disco alar, y en cantidades bajas en el compartimento anterior del disco alar. Sin embargo, hay una región, situada entre la región posterior y la región anterior, en la que los niveles de Hedgehog son lo suficientemente altos para activar a *dpp*, pero no lo suficientemente altos para activar a *engrailed*, lo que ocasiona la síntesis de ARNm de *dpp* en forma de una banda estrecha (**Figura 9C**).

Para comprobar si se pueden obtener imágenes de esta estrecha banda de síntesis de ARNm de *dpp*, los inventores construyeron un conjunto de sondas marcadas con un solo marcador que tenían como diana ARNm de *dpp*, y llevaron a cabo hibridación *in situ* en discos imaginales alares aislados de larvas de tercer estadio. Además, combinaron este procedimiento *in situ* con inmunofluorescencia dirigida contra la proteína Engrailed (se muestra en color azul). La **Figura 9D** muestra una imagen completa, en la que las localizaciones de las moléculas de ARNm identificadas algorítmicamente se presentan en forma de círculos azules; y la **Figura 9E** muestra una porción

agrandada de la imagen, con las señales del ARNm aumentadas. Las imágenes muestran que solo se encontraron moléculas de ARNm a nivel del borde anterior del área de expresión de *Engrailed*, lo que viene a confirmar, una vez más, la especificidad de la detección.

Además, los inventores probaron el método aquí reivindicado en *Saccharomyces cerevisiae*; para ello, diseñaron un conjunto de sondas que tenían como diana transcritos diana del gen *STL1*. *STL1* es un gen, de entre una serie de genes de levaduras, cuya expresión aumenta notablemente cuando se añade sal al medio de crecimiento. Se descubrió que las células no sometidas a choque de sal no contienen prácticamente ninguna molécula de ARNm de *STL1* (Figura 10A), mientras que las células no sometidas a un choque de sal 0,4M de diez minutos de duración presentaban números altos de moléculas de ARNm de *STL1* (Figura 10B).

Otro tipo de células en las que se estudia comúnmente la localización del ARNm son las neuronas. Para demostrar la eficacia del método aquí reivindicado en ese sistema, los inventores obtuvieron imágenes de ARNm de  $\beta$ -actina y de ARNm de Map2 (proteína 2 asociada a los microtúbulos) en neuronas hipocámpicas en cultivo. La **Figura 10C** muestra que un conjunto de sondas que tienen como diana la  $\beta$ -actina (marcadas con TMR) y un conjunto de sondas que tienen como diana la Map2, coloreadas con un color diferente (marcadas con Alexa-594), pueden usarse para obtener imágenes de sus dianas, y para distinguir dichas dianas, con una resolución tan grande que se distingue una molécula individual. Una fracción de estos ARNm migra hasta partes distantes de las dendritas (**Figura 10D**). Los recuentos de partículas indicaron que el 14% de las 791 moléculas de ARNm de  $\beta$ -actina estaban localizadas en las dendritas, y que el 37% de las 140 moléculas de ARNm de Map2 estaban localizadas en las dendritas; dichas cifras son similares a las distribuciones que se habían notificado con anterioridad.

## Referencias

1. Kaufmann, B. B. & van Oudenaarden, A. Stochastic gene expression: from single molecules to the proteome. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 107-112 (2007).
2. St Johnston, D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-375 (2005).
3. Gall, J. G. Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **60**, 553-560 (1968).
4. Levsky, J. M. & Singer, R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* **116**, 2833-2838 (2003).
5. Tautz, D. & Pfeifle, C. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-85 (1989).
6. Raap, A. K. *et al.* Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet* **4**, 529-534 (1995).
7. Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K. & Singer, R. H. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* **280**, 585-590 (1998).
8. Tsokas, P. *et al.* Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci* **25**, 5833-5843 (2005).
9. Maamar, H., Raj, A. & Dubnau, D. Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*. *Science* **317**, 526-529 (2007).
10. Femino, A. M., Fogarty, K., Lifshitz, L. M., Carrington, W. & Singer, R. H. Visualization of single molecules of mRNA in situ. *Methods Enzymol* **361**, 245-304 (2003).
11. Randolph, J. B. & Waggoner, A. S. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res* **25**, 2923-2929 (1997).
12. Sindelar, L. E. & Jaklevic, J. M. High-throughput DNA synthesis in a multichannel format. *Nucleic Acids Res* **23**, 982-987 (1995).
13. Vargas, D. Y., Raj, A., Marras, S. A., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17008-17013 (2005).
14. Raj, A., Peskin, C. S., Tranchina, D., Vargas, D. Y. & Tyagi, S. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol* **4**, e309 (2006).
15. Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 113-126 (2007).

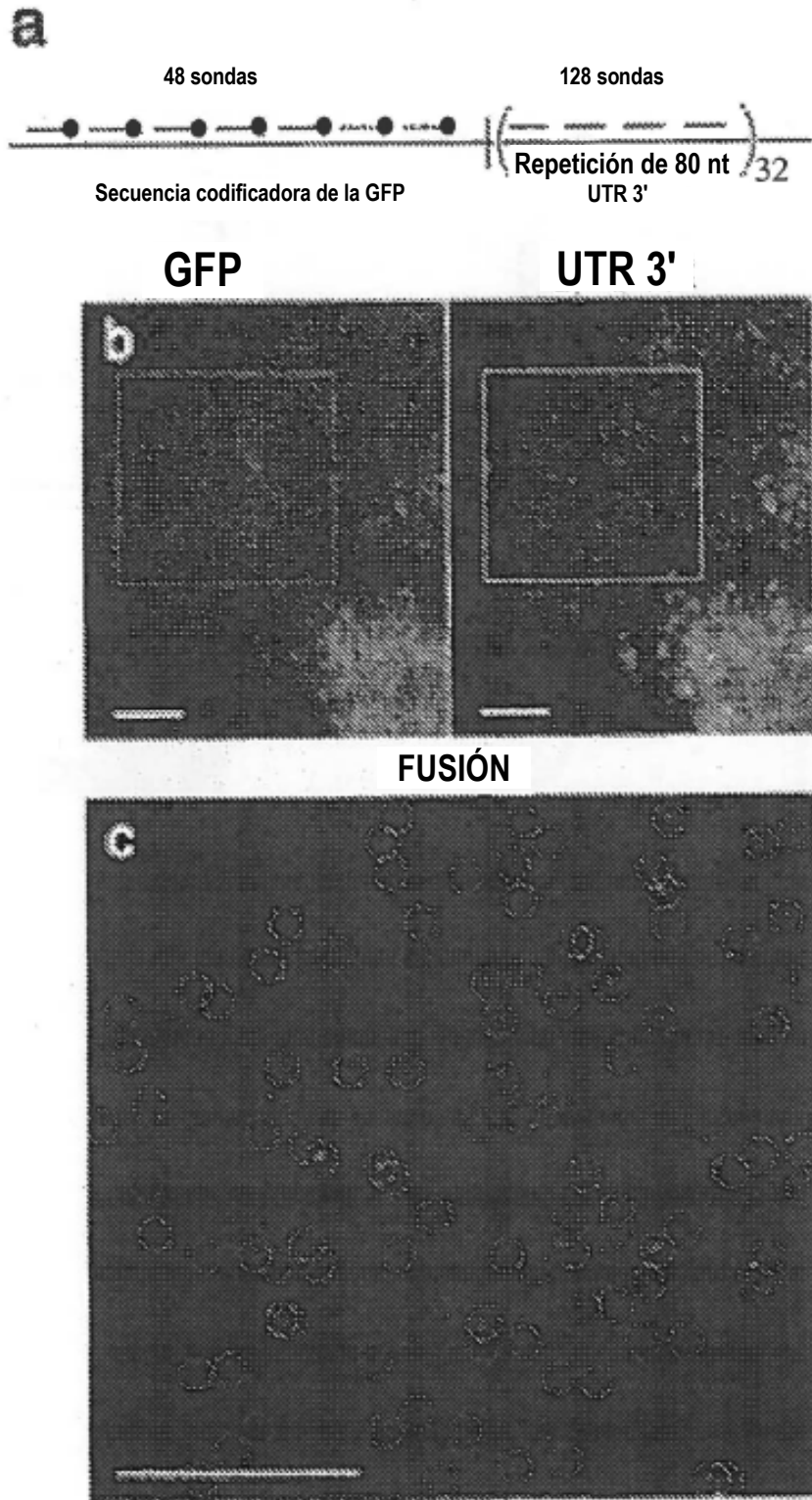
16. Gonzalez, R. C., Woods, R. E. & Eddins, S. L. Digital Image Processing Using Matlab. (Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.; 2004).
17. Wang, J. C. *et al.* Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15603-15608 (2004).
- 5 18. Yildiz, A. *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300**, 2061-2065 (2003).
19. Benson, D. M., Bryan, J., Plant, A. L., Gotto, A. M., Jr. & Smith, L. C. Digital imaging fluorescence microscopy: spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells. *J Cell Biol* **100**, 1309-1323 (1985).
- 10 20. Lecuyer, E. *et al.* Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**, 174-187 (2007).
21. Fukushige, T., Hawkins, M. G. & McGhee, J. D. The GATA-factor elt-2 is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **198**, 286-302 (1998).
22. Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S. & Gelbart, W. M. Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* **139**, 745-756 (1995).
- 15 23. Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M. & Hohmann, S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathwaydependent genes. *J Biol Chem* **275**, 8290-8300 (2000).
24. Tiruchinapalli, D. M. *et al.* Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* **23**, 3251-3261 (2003).
- 20 25. Blichenberg, A. *et al.* Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci* **19**, 8818-8829 (1999).
26. Warren, L., Bryder, D., Weissman, I. L. & Quake, S. R. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17807-17812 (2006).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar una primera secuencia diana de moléculas de ARNm individuales en una célula permeabilizada fijada, y dicho método comprende:
  - 5 sumergir la célula permeabilizada fijada en una solución de hibridación que contiene un exceso de un primer conjunto de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos no solapadas, que tienen secuencias complementarias de dicha primera secuencia diana, que tienen de 7 a 30 nucleótidos de longitud y que se marcan con un solo marcador: el mismo primer marcador fluoróforo de un primer color;
  - lavar la célula fijada para retirar las sondas no unidas; y
  - detectar los puntos de dicho primer fluoróforo en la célula fijada lavada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que las sondas del conjunto tienen secuencias complementarias de diana que tienen 15-30 nucleótidos de longitud.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que todas las sondas del conjunto se marcan, en su extremo 3', con un fluoróforo.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paso de detección de puntos incluye obtener imágenes con un microscopio de fluorescencia.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paso de detección de puntos incluye obtener imágenes de la célula fijada lavada, de manera que se observen los puntos del primer marcador fluoróforo, procesar la imagen a fin de mejorar los puntos, y analizar los puntos mejorados mediante el uso de un umbral de intensidad al que el número de puntos detectado no es sensible al valor umbral.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que la imagen se procesa filtrando la imagen mediante un filtro Laplaciano de la (función) Gaussiana (filtro LoG) lineal tridimensional.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la solución de hibridación contiene un exceso de un segundo conjunto de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos no solapadas, que tienen secuencias complementarias de una segunda secuencia diana, que tienen de 7 a 30 nucleótidos de longitud y que se marcan con un mismo segundo marcador detectable, de un segundo color, que es distinguible del primer marcador fluoróforo.
- 25 8. Un método para determinar si un compuesto de prueba afecta a la cantidad o a la distribución de una primera secuencia diana de las moléculas de ARNm presentes en una célula, y dicho método comprende:
  - 30 (a) incubar la célula con el compuesto de prueba durante un tiempo suficiente para generar una respuesta;
  - (b) permeabilizar la célula;
  - (c) sumergir dicha célula permeabilizada en una solución de hibridación que contiene un exceso de un primer conjunto de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos no solapadas, que tienen secuencias complementarias de dicha primera secuencia diana, que tienen una longitud de 7-30 nucleótidos, y que se marcan con un solo marcador: el mismo primer marcador fluoróforo, de un primer color;
  - 35 (d) lavar dicha célula a fin de retirar las sondas no unidas;
  - (e) detectar una cantidad o una distribución de puntos de dicho primer fluoróforo; y
  - 40 (f) comparar dicha cantidad o dicha distribución con la obtenida de un control tratado de modo similar, pero sin el compuesto de prueba.
9. El método de la reivindicación 8, en el que las sondas del conjunto tienen secuencias complementarias de diana que tienen 15-30 nucleótidos de longitud.
10. El método de las reivindicaciones 8 o 9, en el que todas las sondas del conjunto se marcan, en su extremo 3', con un fluoróforo.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 8 y la 10, en el que el paso de detección incluye el procesamiento a fin de mejorar la distribución y analizar la distribución mejorada, mediante el uso de un umbral de intensidad al que el análisis no es sensible al valor umbral.
12. El método de la reivindicación 8, en el que la solución de hibridación contiene un exceso de un segundo conjunto de al menos 30 sondas de hibridación de ácidos nucleicos no solapadas, que tienen secuencias

complementarias de una segunda secuencia diana, que tienen de 7 a 30 nucleótidos de longitud y que se marcan con un mismo segundo marcador detectable, de un segundo color, que es distinguible del primer marcador detectable.

- 5 13. El método de la reivindicación 8, en el que el paso de detección incluye contar los puntos correspondientes a moléculas únicas de ARN mensajero (ARNm), a fin de obtener un perfil de expresión génica.



**FIGURA 1**

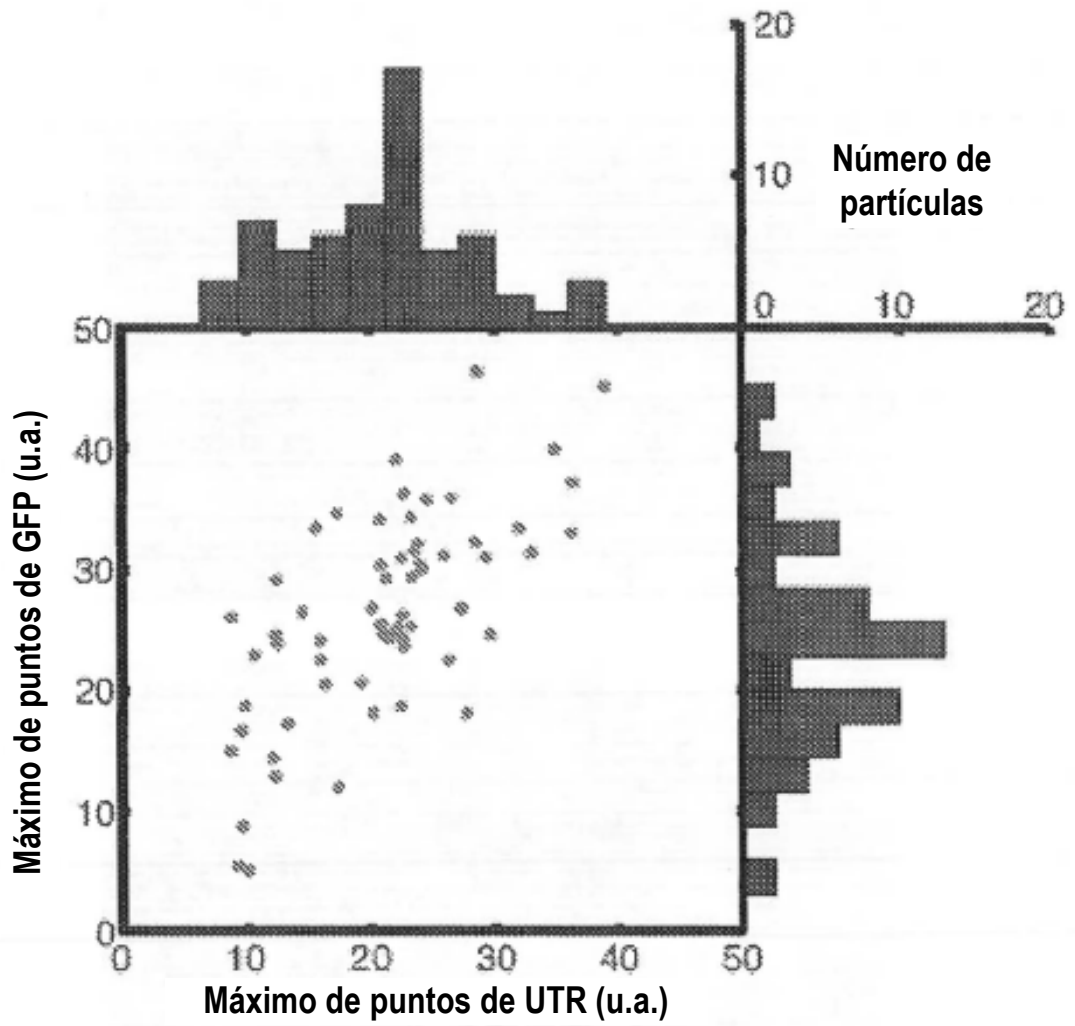


FIGURA 2



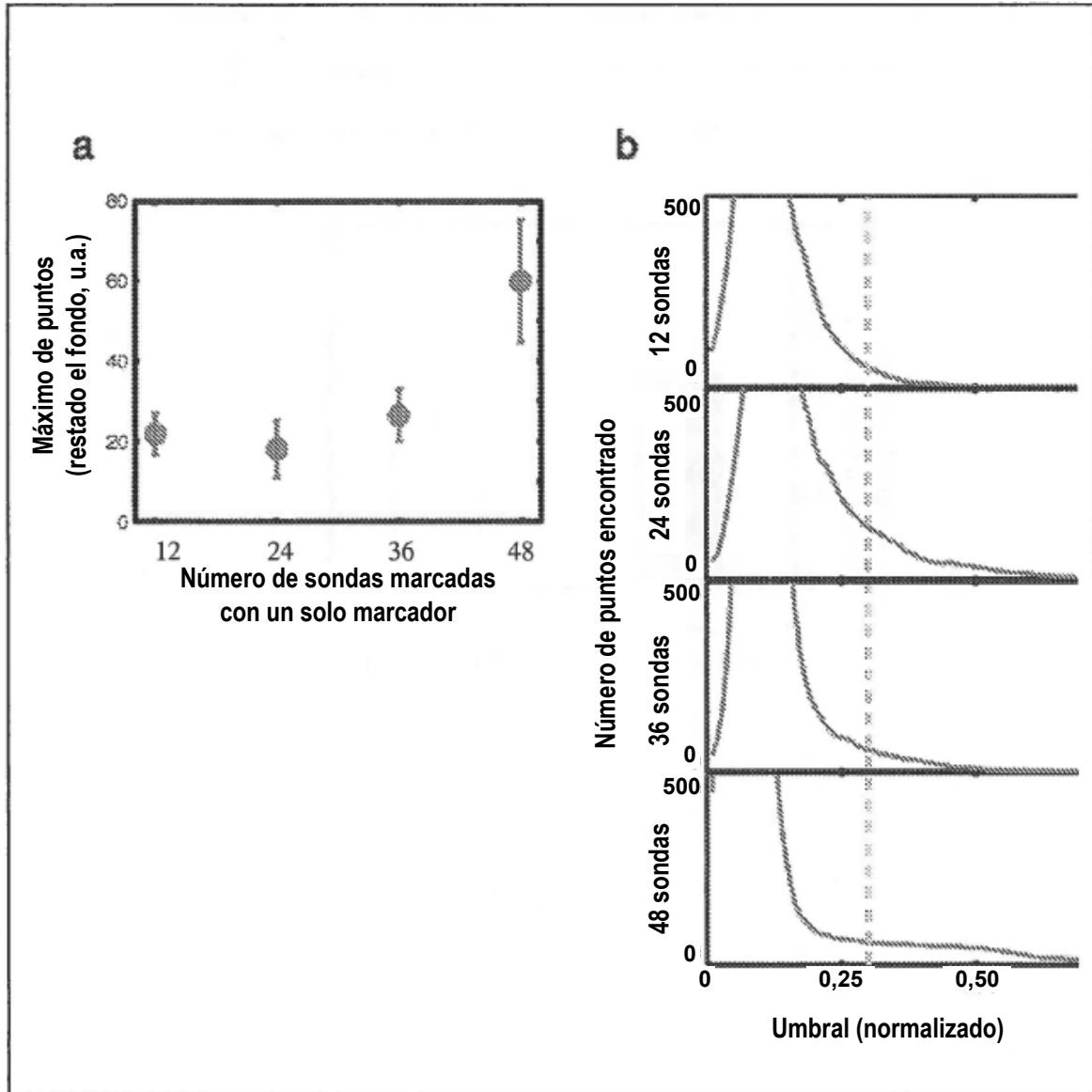
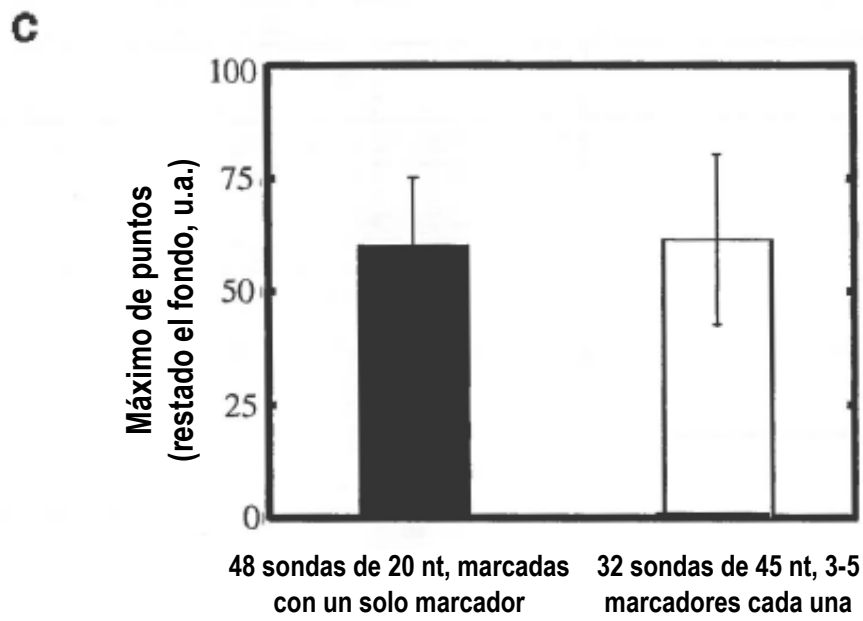
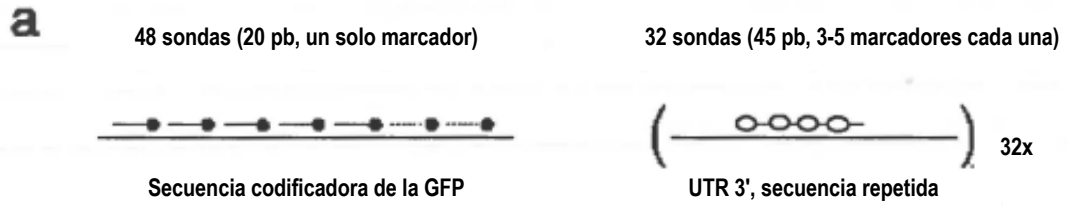


FIGURA 3



**FIGURA 4**

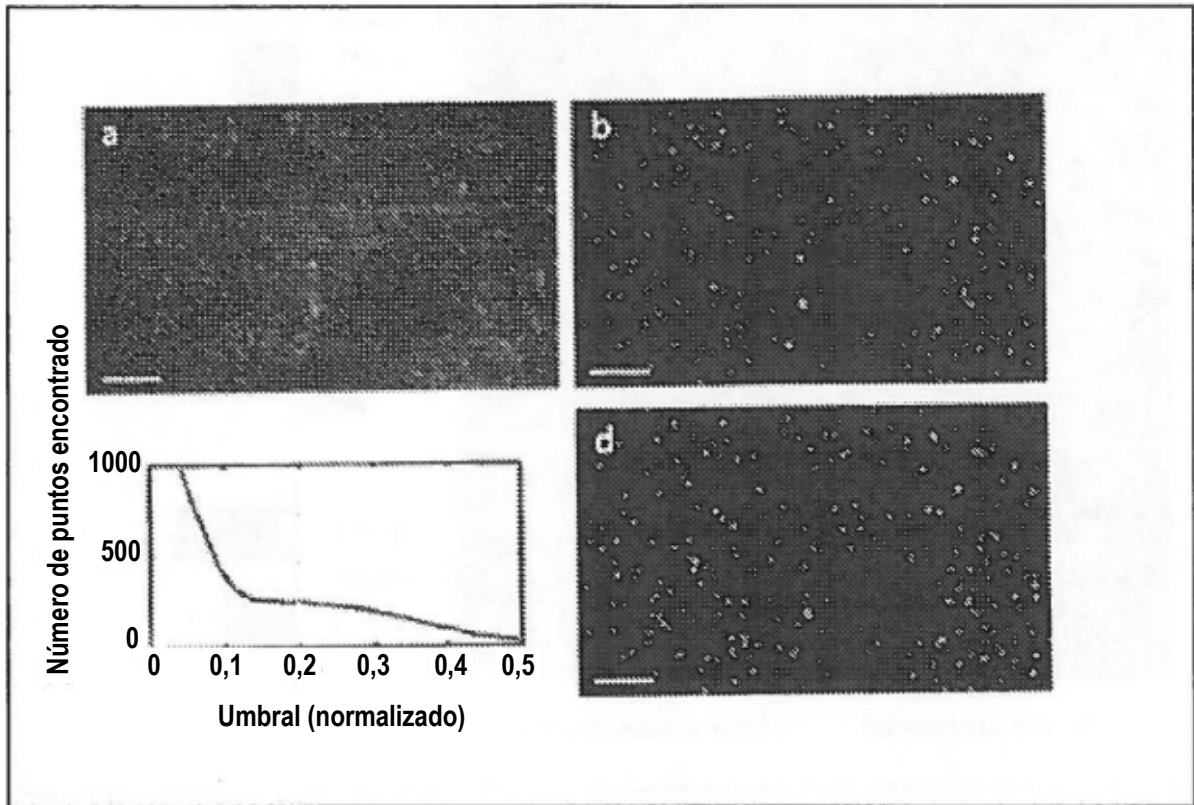


FIGURA 5

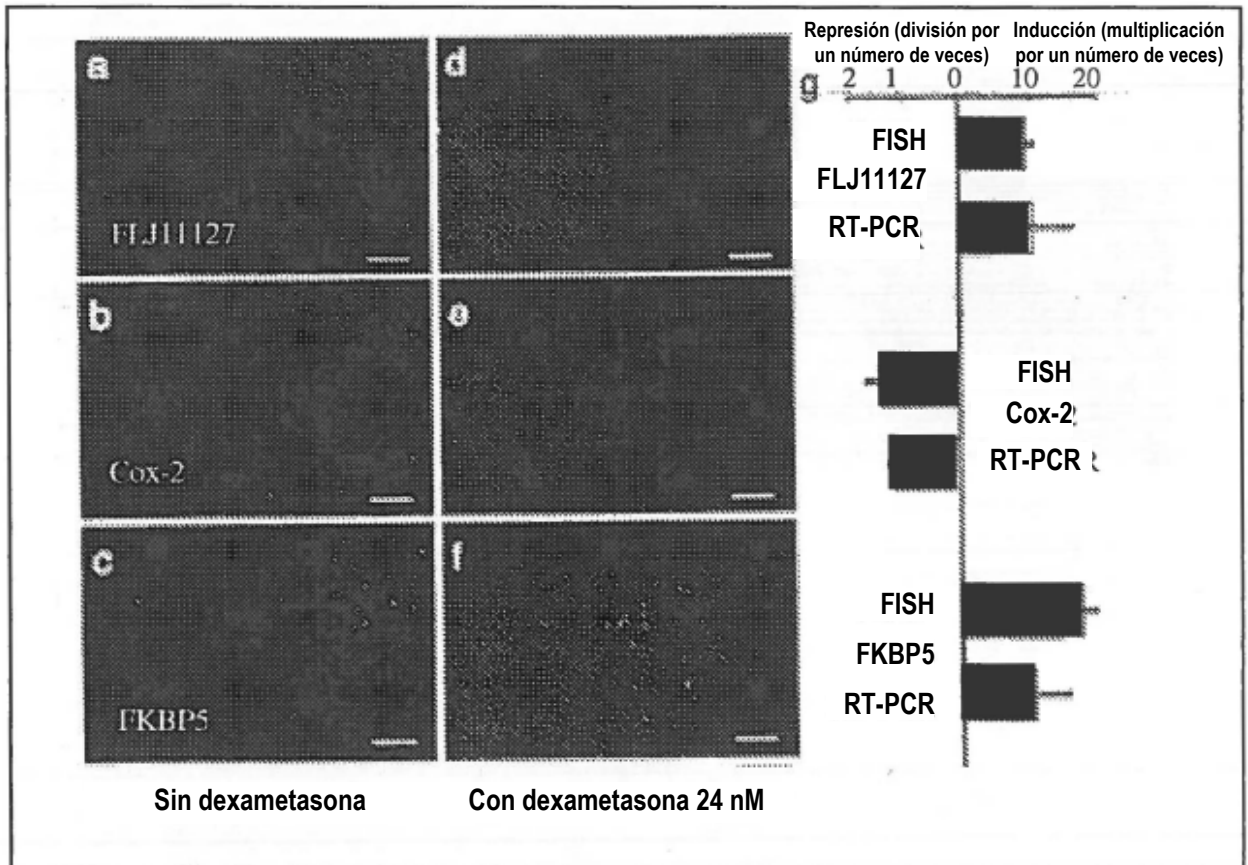
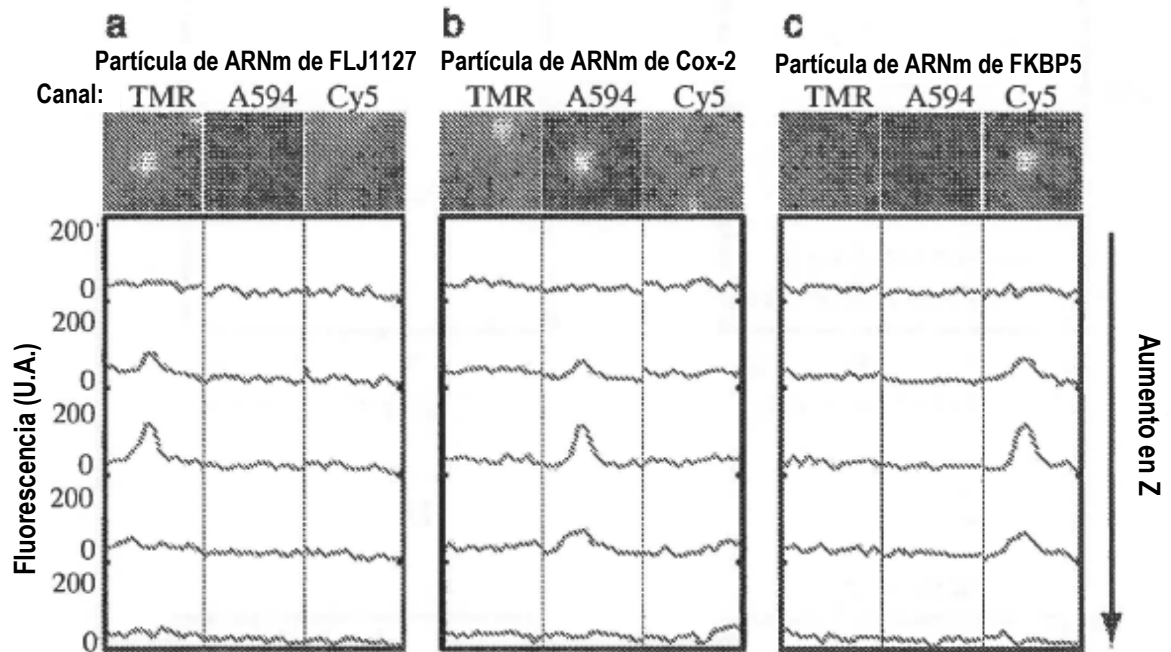


FIGURA 6



**FIGURA 7**

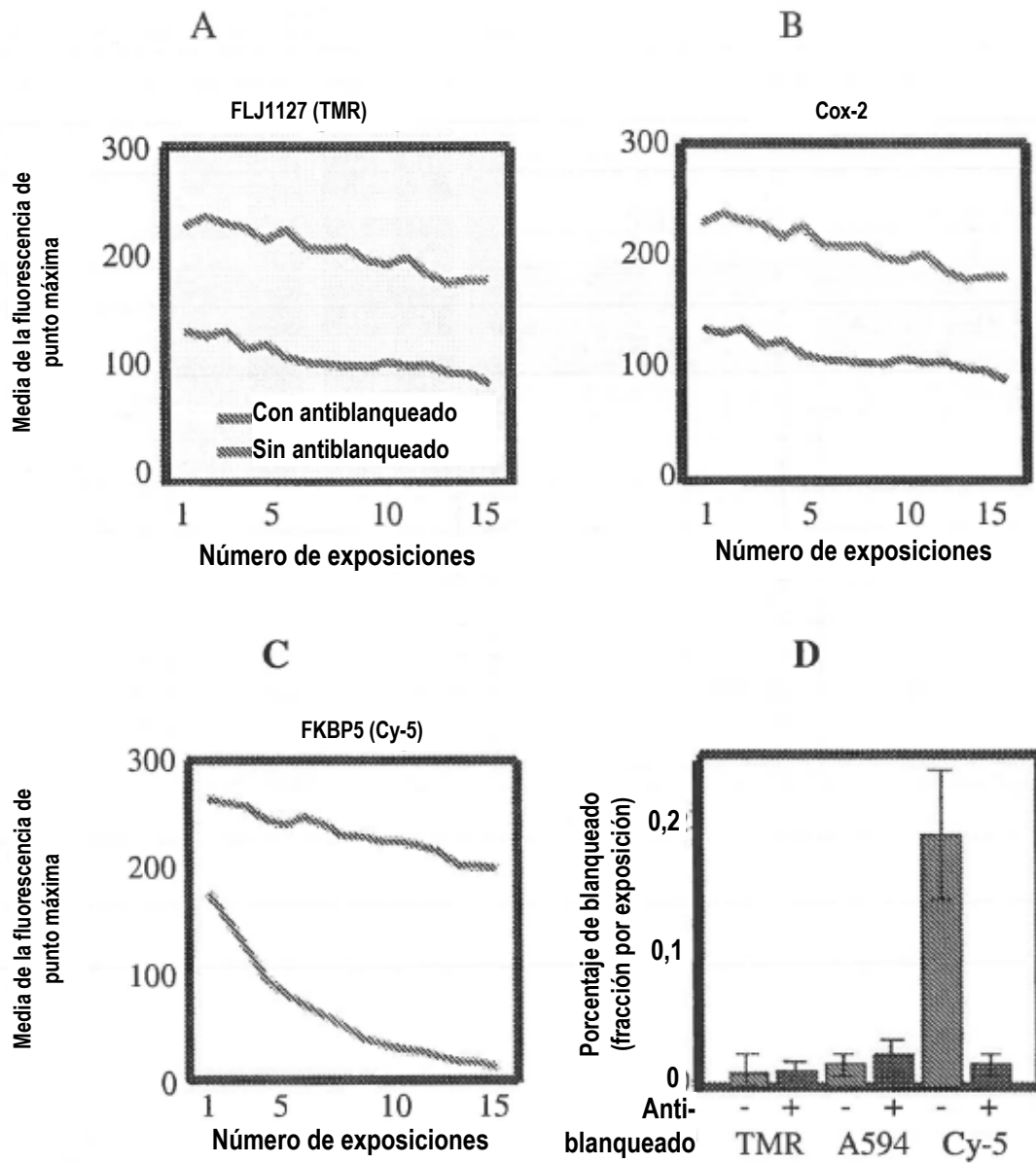


FIGURA 8

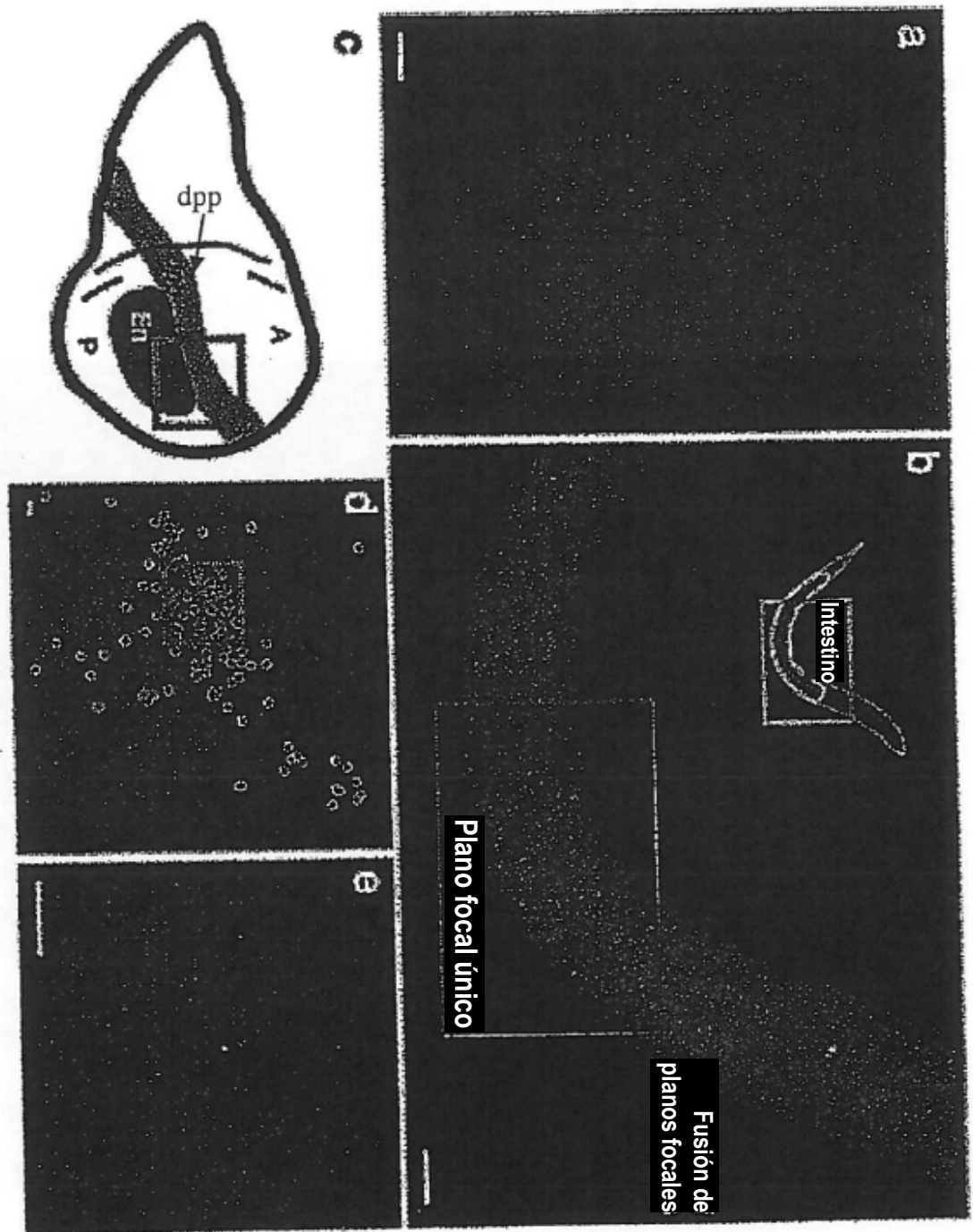
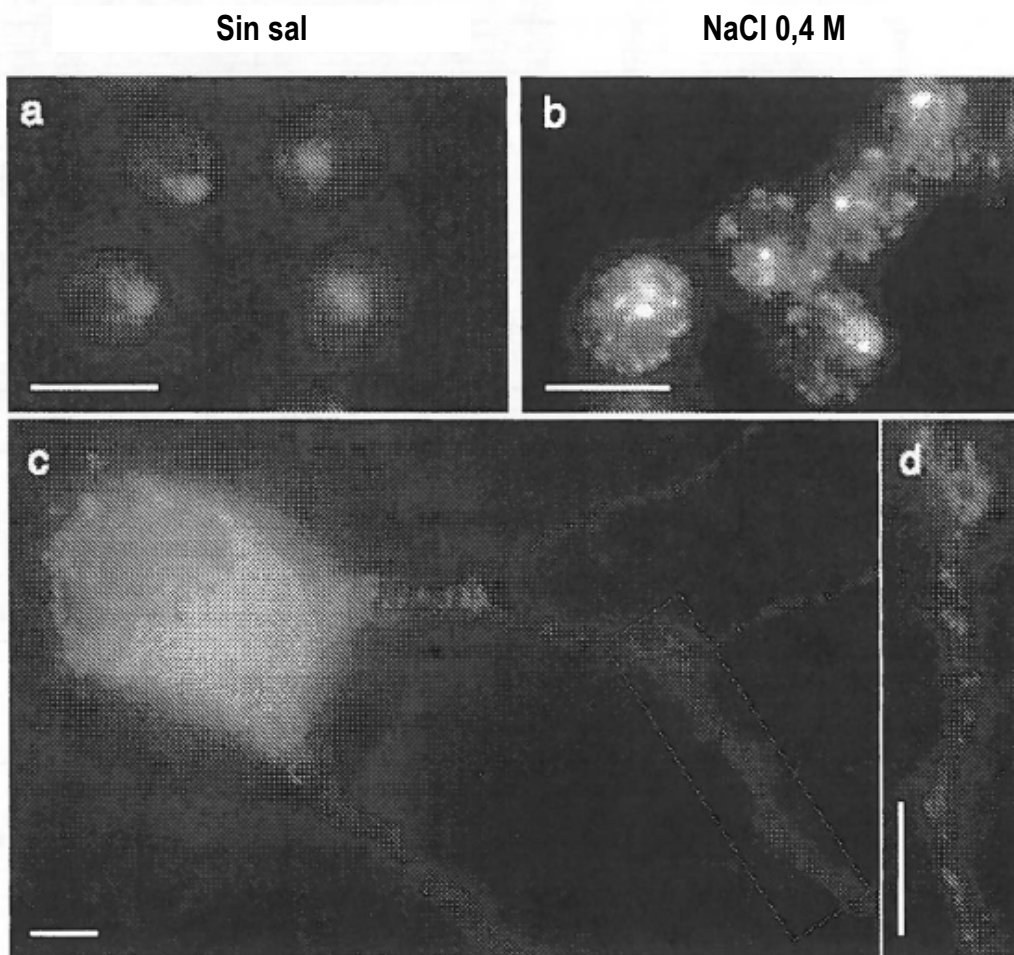


FIGURA 9



**FIGURA 10**



**A. Sondas para la secuencia multimérica repetida de la UTR 3' (4 oligonucleótidos):**

TCGACGCGGAGACCACGCTC-GGCTTGTCTTTTCGCGCGCAA-TGCGACGCACGCGGATAGTT-AGCTG  
AGCTGCGCCTCTGGTGCAG CCGAACAGAAAGCGCGGTT ACGCTGCGTGCGCCTATCAA TCGAC  
CGGCGACGAGGCACC  
GCCGCTGCTCCGTGG

**FIG. 11**

**B. Sondas para la  $\beta$ -actina (48 oligonucleótidos):**

ATGGATGACGATATCGCTGCGCTCGTCTGTCGACAAACGGCTCCGGCAITGTGCAAGGCCGGCTTCGC  
 CAGCTGTTGCCGAGGCCGTA GTTCGGCCGAAGCG  
 GGGCGACGATGCTCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGGTGTGATGGTGGGTAT  
 CCCGC TACGAGGGGCCCGGCAGAAG AGGTAGCACCCGGCGGGATC GTTCCACACTACCACCCAT  
 GGGTCAGAAGGACTCCTACGTGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTGACCCTGAAGTACCCCATTGA  
 CAGTCTTCTGAGGATGCAC CTGCTCCGGTCTCGTTCTC GTAGGACTGGGACTTCATGG AACT  
 ACACGGCATTGTCACCAACTGGGACGATATGGAGAAGATTTGGCACCACACTTTTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC  
 TGTGCCGTAACAGTGG ACCCTGCTATACCTCTTCTA CGTGGTGTGAAAGATGTTAC ACGCACACCG  
 CCCTGAGGAGCACCCCTGTGCTGCTCACCGAGGCCCTCTGAACCTAAGGCCAACCGTGAAGATGACCCAGAT  
 GGGACTCCTC GGACACGACGAGTGGCTCCG AGACTTGGGATTCCGGTTGG TTTCTACTGGGTCTA  
 CATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTGTTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCC  
 GTAC CTCTGGAAGTTGTGGGGTCC CATGCATCGGTAGGTCCGAC ACAGGGACATACGGAGACCA  
 TACCACTGGCATTGTGATGGACTCCGGAGACGGGGTACCCACACTGTGCCATCTAIGAGGGTTACGCGCTCCC  
 TGGTGACCGTAACACTACCT GCCTCTGCCCCAGTGGGTGT ACGGGTAGATACTCCCAATG GAGGG  
 TCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGCGTGG  
 AGTACCGTAGCACCC CCTGGACCCACCGGCCCTGG CTCTGATGGACTACTTCTAG TGGCTCGCACC  
 CTACAGCTTACCACCACAGCTGAGAGGGAAATCGTGCCTGACATTAAGAGAAGCIGTGCTATGTTGCCCTAGA  
 GATGTCGAA GTGGTGTGACTCTCCCTT ACGCACTGTAATTTCTCTC ACGATACAACGGGATCT  
 CTTGAGCAAGAGATGGCCACTGCCGATCCTCTTCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACGGTCAGGT  
 GAA CGTTCTTACCAGGTGACGGC GGAGAAGGAGGGACCTCTC ATACTCGACGGACTGCCAGT  
 CATCACTATCGGCAATGAGCGGTTCCGATGCCCGAGGGCTCTCTCCAGCCTTCTTCTGGGTATGGAATCCTG  
 GTAGTGATAGCCGTTACTCG AGGCTACGGGGCTCCGAGAG GTCGGAAGGAAGGACCCATA TAGGAC  
 TGGCATCCATGAAACTACATTCAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAGACCTCTATGCCAACAC  
 ACCGTAGGTACTTT GTAAGTTAAGGTAGTACTTC CTGCAACTGTAGGCATTTCT GATACGGTTGTG  
 AGTGTGTCTGGTGGCACCACCATGTACCCAGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTACTGCCCTGGCTCC  
 TCACGACA CACCGTGGTGTACATGGGT TAACGACTGTCCTACGTCTT CTAATGACGGGACCGAGG  
 TAGCACCATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGATTGGTGGCTCTATCCTGGC  
 AT GGTACTTCTAGTTCTAGTAA GGAGGACTCGCGTTCATGAG CACCTAACCACCGAGATAGG G  
 CTCACTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTGCACCG  
 GAGTGACAGGTGGAAGGTC TACACCTAGTCGTTCTGTCCT GCTACTCAGGCCGGGGAGGT ACGTGGC  
 CAAATGCTTCTAG  
 GTTACGAAGATC

**FIG. 11 (Cont.)**

**C. Sondas para COX-2 (48 oligonucleótidos):**

ATGCTCGCCCGCGCCCTGCTGCTGTGCGCGGTCTGGCGCTCAGCCATACAGCAAATCCTTGCTG  
 CGAGCGGGCGGGACGACG TGTCGTTTAGGAACGAC

TTCCACCCATGTCAAACCGAGGTGTATGTATGAGTGTGGGATTGACCAGTATAAGTGCATTGTACCCGGAC  
 AAG TTGGCTCCACATACATACTC AACTGGTCATATTCACGCTA

AGGATTCTATGGAGAAAACCTGCTCAACACCCGGAATTTTTGACAAGAATAAAATTATTTCTGAAACCCACTCCAAA  
 ACCTCITTTTGACGAGTTGIG AAGACTTTGGGTGAGGTTT

CACAGTGCCTACATACTTACCCACTTCAAGGGATTTTGGAACGTTGTGAATAACATTCCTTCCCTTCGAAATGC  
 G TGAATGGGTGAAGTTCCCTA AGGGAAGGAAGCITTACG

AATTATGAGTTATGTGTTGACATCCAGATCACATTTGATTGACAGTCCACCAACTTACAATGCTGACTATGGCTA  
 TT ACACAACGTAGGTCTAGTG ACTGTCAGGTGGTTGAATGT ACCGAT

CAAAGCTGGGAAGCCTTCTCTAACCTCTCCTATTATACTAGAGCCCTTCTCCTGTGCGCTGATGATTGCCCGAC  
 GTTTTCGACCCTTC AATATGATCTCGGGAAGGAG

TCCCTTGGGTGTCAAAGGTAAAAAGCAGCTTCTGATTCAAATGAGATTGTGGAAAAATTGCTTCTAAGAAGAAA  
 TCCATTTTTCGTGCAAGGAC ACTCTAACACCTTTTTTAACG TCTTCTTT

GTTTCATCCCTGATCCCCAGGGCTCAAACATGATGTTTGCATTCTTTGCCAGCACTTCACGCATCAGTTTTTCAA  
 CAAGTAGGGACT ACGTAAGAAAACGGGTCGTGA AAGTT

GACAGATCATAAGCGAGGGCCAGCTTTCACCAACGGGCTGGGCCATGGGGTGGACTTAAATCATATTTACGGTGA  
 CTGTCTAGTATTGCG AGTGGTTGCCCGACCCGGTA TAAATGCCACT

AACTCTGGCTAGACAGCGTAAACTGCGCCTTTTCAAGGATGGAAAAATGAAATATCAGATAATTGATGGAGAGAT  
 TTGAGACCG TTGACGCGGAAAAAGTTCCCTA ACTACCTCTCTA

GTATCCTCCACAGTCAAAGATACTCAGGCAGAGATGATCTACCCTCCTCAAGTCCCIGAGCATCTACGGTTTGC  
 CATAGGAG TCTATGAGTCCGTCTCTACT

TGTGGGGCAGGAGGTCTTTGGTCTGGTGCCTGGTCTGATGATGTATGCCACAATCTGGCTGCGGGAACACAACAG  
 ACCAGACCACGGACCAGACT AGACCGACGCCCTTGTGTTG

AGTATGCGATGTGCTTAAACAGGAGCATCCTGAAATGGGGTGTAGCAGTTGTTCCAGACAAGCAGGCTAATACT  
 ACGCTACACGAATTTGTCCT ACCCCACTACTCGTCAACAA TATGA

GATAGGAGAGACTATTAAGATTGTGATTGAAGATTATGTGCAACACTTGAGTGGCTATCACTTCAAACCTGAAATT  
 CTATCCTCTCTGATA ATACAGTTGTGAACTCACC TGACTTTAA

TGACCCAGAACTACTTTTTCAACAACAATTCCAGTACCAAAAATCGTATTGCTGCTGAATTTAACACCCTCTATCA  
 ACTGGGCTTTG AGTTGTTTGTAAAGTCAATG ACGACGACTTAAATTTGTTG

CTGGCATCCCTTCTGCTGACACCTTTCAAATTCATGACCAGAAAATACAATATCAACAGTTTATCTACAACAA  
 AAGTACTGGTCTTTATGTTG

CTCTATATIGCTGGAACATGGAATTACCCAGTTTGTGTAATCATTACCAGGCAAATIGCTGGCAGGGTTGCTGG  
 ACGACCTTGACCTTAATGG ACAACTTAGTAAGTGGTCCG

**FIG. 11 (Cont.)**

TGGTAGGAATGTTCCACCCGCGAGTACAGAAAGTATCACAGGCTTCCATTGACCAGAGCAGGCAGATGAAATACCA  
 TCATAGTGTCCGAAGGTAAC

GTCTTTTAATGAGTACCGCAAACGCTTTATGCTGAAGCCCTATGAATCATTGAAGAACTTACAGGAGAAAAGGA  
 AATTACTCATGGCGTTTGCG AGTAAACTTCTTGAATGICC TCCT

AATGCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTATGGTGACATCGATGCTGTGGAGCTGTATCCTGCCCTTCTGGIAGAAAA  
 TTACAGACGTCTCAAC ACCACTGTAGCTACGACACC AGGACGGGAAGACCATCTTT

GCCTCGGCCAGATGCCATCTTTGGTGAAACCATGGTAGAAGTTGGAGCACCATTCTCCTTGAAAGGACTTATGGG  
 ACCACTTTGGTACCATCTTC AGAGGAACTTTCTGAATAC

TAATGTTATATGTTCTCCTGCCTACTGGAAAGCCAAGCACTTTTGGTGGAGAAGTGGGTTTTCAAATCATCAACAC  
 TATACAAGAGGACGGATGAC AACCACCTCTTCACCCAAAA

TGCCTCAATTCAGTCTCTCATCTGCAATAACGTGAAGGGCTGTCCCTTTACTTCATTTCAGTGTCCAGATCCAGA  
 AAGTCAGAGAGTAGACGTTA ATGAAGTAAGTCAACAAGGTC

GCTCATTAAAACAGTCACCATCAATGCAAGTTCTTCCCGCTCCGGACTAGATGATATCAATCCCACAGTACTACT  
 TGTCAGTGGTAGTTACGTTTC

AAAAGAACGTTTCGACTGAACTGTAG  
 TTCTTGCAAGCTGACTTGAC

FIG. 11 (Cont.)

**D. Sondas para *d2EGFP* (48 oligonucleótidos):**

GCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGGACG  
 CTACCACCTCGTTCCCGC TCGACAAGTGGCCCCAC GGGTAGGACCAGCTCGA GC  
 GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA  
 CGCTGCATTTGCCGG TCAAGTCGCACAGGCCG CCGCTCCCGCTACGGIG GCCGTTTCGACTGGGACT  
 AGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGT  
 AGTAGACGTGGTGGCCG GACGGGCACGGGACCGG GGAGCACIGGTGGGACT TGCCGCACGTCA  
 GCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGG  
 CGAAG GCGATGGGGCTGGTGTGTA CGTCGTGCTGAAGAAGT GCGGTACGGGCTTCCG CAGGTCC  
 AGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG  
 TCGCGTGGTA GAAGTTCCTGCTGCCGT TGTTCTGGGCGCGGCTC TTCAAGCTCCCGCTGTG CC  
 TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC  
 ACTTGGCGTAGCTCG TCCCGTAGCTGAAGTTC CTGCCGTTGTAGGACC GTTCGACCTCATGTTGA  
 ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACA  
 TGTCGGTGTTCAGATA TACCGGCTGTTCTGCTT GCCGTAGTTCACCTTGA TCTAGGCGGTGT  
 ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGC  
 TGTAG CTGCCGTGCACGTGTA GCTGGTGATGGTCTGCT GGGGGTAGCCGCTGCCG CACGACG  
 TGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC  
 ACGGGCTGTT GATGGACTCGTGGGTCA GGGACTCGTTTCTGGGG CTCTTCGCGCTAGTGTA GG  
 TGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAGCTTAGCCATGGCTTCC  
 ACGACCTCAAGCACT GCGGCCCTAGTGAGAG TACCTGCTCGACATGTT CGAATCGGTACCGAAGG  
 CGCCGGAGGTGGAGGAGCAGGATGATGGCACGCTGCCCATGTCTTGTGCCAGGAGAGCGGGATGGACCGTCACC  
 GCCTCCACCTCCTCGTC CTACCGTGCAGCGGTA AACACGGGTCCCTCGC ACCTGGCAGTGG  
 CTGCAGCCTGTGCTTCTGCTAGGATCAATGTGTAGGAATTCGTGACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTGGACA  
 GACGT ACACGAAGACGATCCTA TTACACATCCTTAAGCA TACTATTCTATGTAAC CAAACCTGT  
 AACCACAACCTAGAATGCAGTGAATAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG  
 TTGGTGT CTTACGTCACTTTTTT AAATAAACACTTTAAAC ACGATAACGAAATAAAC

**FIG. 11 (Cont.)**



```

CCTGCGCCGCGAGCGCGGACGAGGCGCACGAGCGGTGGCAGCACAAGCAGCCGCTCCTGTTACCTACACGGACGA
GGAC      GTCGCGCCTGCTCCGCGTGC      CCGTCGTGTTTCGTCGGCGAG      GGAITGTCCTGCT

CGGGCGGCACAAGGCGCGCTCCATTTCGGGACGTGTCIGGGCGGAGAGGGCGGTGGCAAGGGCGGCCGGAACAAGCG
GCCCCGC      GACCGCCTCTCCCGCCACCG      C

GCAGCCGAGACGGCCTACGAGGCGCAAGAACCACGACGACACCTGCCGGCGGCACTCGCTGTACGTGGACTTCTC
CGTCGGCTCTGCCGGATGC      GTGGACGGCCGCCGTGAGCG      GAG

GGACGTGGGCTGGGACGACTGGATTGTGGCGCCTCTGGGCTACGATGCATATTACTGCCACGGGAAGTGCCCCTT
CCTGCACCCGACCCTGC      ACACCGCGGAGACCCGATGC      CACGGGGAA

CCCCTGGCCGACCACTTTAAGTACGACCAATCACGCCGTGGTGCAGACCCIGGTCAACAATAATGAATCCCGGCAA
GGGCGACCGGC      AGTGCGGCACCACGCTCTGGG      GGGCCGTT

GGTGCCGAAGGCGTGCTGCGTGCCACGCAACTGGACAGCGTGCCATGCTCTATCTCAACGACCAAAGTACGGT
CCACGGCTTCCG      CGCACGGGTGCGTTGACCTG      GCTGGTTTCATGCCA

GGTGCTGAAGAACTACCAGGAGATGACCGTGGTGGGCTGTGGCTGTCGATAG
CCACG      ACTGGCACCCCGACACCG

```

**FIG. 11 (Cont.)**

**F. Sondas para *elt-2* (48 oligonucleótidos):**

ATGGATAATAACTACAATGATAATGTCAACGGCTGGGCCGAAATGGAACCATCTCAACCAATGGG  
 GTTGCCGACCCGGCTTTACC TAGAGTTGGTTACCC  
 AGGTCTGCGCCTACCAACTCAGAACATGGATCCACCAGAGCAAAAATAATGAGTCACAATTGAGTGAACCTACCGAG  
 TCCAG GGATGGTTGAGTCTTGTACC TGGTCTCGTTTTATTACTCA TAACTCACTTGATGGCTC  
 AATGAAAATTGATAATGATTACGCATCTCCAATTGAACGGCAAGTGTATCACAGTGGCACAAAATAACTATGA  
 TT TTAACCTGCGCTTTCACAAT TTCACCGTGTATTATTGATAC  
 GCCGAAAGTGGAAACTGTTACATCATTTTTCCATACTGGCATAGACTACTCAAACCTTTGGAATGTTGGACCAAAC  
 CTTTCACCTTTGACAATGTA AAAGGTATGACCGTATCTGA TTTGAAACCTTACAACCTGG  
 TACCATGCAACCGTTTTATCCTCTTTACAGTGGAAATCCCCTAAACACTCTTGGAACTTTTTTCGGGATATACAAA  
 ATGGTACGTTGGCAAAATAG AATGT CACCTAAGGGCATT AGAACCTTGAAAAAGCCCTA TTT  
 CTCCATATACGACAAACCCTCTCTGTACGACCCAGTATTCTACCATTAACATCCCTTCTACTTATCCAACCTGT  
 GAGGTATATGCTGTTTG AGACATGCTGGGGTCATAAG GTAATTGTAGGGAAGATGAA TTGACA  
 GGCTCCAACCTTACGAATGCGTCAAATGCTCACAAAGTTGTGGGGCCGGGATGAAGGCAGTAAACGGAGGAATGAT  
 CCGAGGTTGAATGC GCAGTTTACGAGTGTITCAA CCGGCCCTACTTCCGTCATT TCCTTACTA  
 GTGCGTCAACTGTTCAACACCAAAAACCACGTATTCTCCTCCAGTCGCGTATAGCACTTCTTTGGGACAACCCCC  
 CACGCAGTIGA TTGIGGTTTTGGTGCAIAA AGGICAGCGCAIAICGIGAA CCCIGTIGGGGG  
 GATTCGGAATAACCTTCAGAGCAGCCAACTGCTAAAATTGCCAAGCAATCCTCTAAAAAGTCAAGTAGCTCAA  
 CTAAGACC TGGAAGTCTCGTCGGTTGAC TTAACGGTTCGTTAGGAGAT CAGTTCAICGAGTTT  
 TAGGGGGTCAAACGGATCTGCGTCCCGTCGGCAGGGACTTGTGTGCTCCAATTGCAATGGTACCAACACAACCTCT  
 ATCCC TTTGCCTAGACGCAGGGCAG CCCTGAACACACAGGGTTAA ACCATGGTTGTGTTGAGA  
 CTGGAGAAGAAATGCTGAAGGAGATCCGGTCTGCAATGCTTGGGGCTTTACTTCAAACCTCCATCACATCCCTCG  
 GA TTCTTTACGACTTCTCTAG GACGTTACGAACGCCCGAAA GTTTGAGGTAGTGTAGGGAG  
 GCCGACCTCAATGAAGAAAGAAGGTGCTTTACAGACAAGAAAGAGAAAATCAAAAAGCGGAGACTCTTCCACACC  
 CTGGAGTTACTTCTTTCTTC TTTTTCGCCTCTGAGAAGGT  
 ATCAACGTCACGGGCCGAGAAAGGAAGTTGAGAGAGCCTCTTCTTCGACCGAAAAGGCTCAAAGGTCATCTAA  
 TAGTTGCAGTGCCCGGGCTC CTTCAAACCTCTCTCGGAGAA CTGGCTTTTCCGAGTTTCCA ATT  
 CCGGCGTGCGGGAAGTGCAAAAGCAGACCAGAACTGAGCACTGCTGCCGTGCGAGCTGCGACTGCCACATAIGT  
 GGCCGCACGCCCTTAC TCGTCTGGCTCTTGACTCGT TATACA  
 GTCACATGCCGACTTGTATCCCGTTTTCTCAGCTGCCGTCACCTTGGCAGATCAAACGTACAGTAATTACTATCA  
 CAGTGTACGGCTGA AGGGCAAAGGAGTCGACGGC GAACGGTCTAGTTTGCAITG  
 ATGGAACACTGCCGCTACAGCTGGGTTGATGATGGTTCCAAACGATCAAACACTACGTGTATGCAGCAACAAACTA  
 ATGTCGACCCAACTACTACC TCGTTGTTTGAT  
 CCAGACTGGCCTAAGACCTGCCGATAACATCCAAGTTCAITGTAIGCCAGTTCAGGAIGATGAAACCAAAGCTGC  
 GGTCTGAC TTCTGGACGGCTATTGTAGG AGTACACTACGGTCAAGTCC ACTTTGGTTTCGACG

**FIG. 11 (Cont.)**



GGCTCGCGATTGGAAGCGGTCGACGGAGATTCTTAA  
CCGAG AAACCTTCGCCAGCTGCCTC

**FIG. 11 (Cont.)**

**G. Sondas para FKBP5 (63 oligonucleótidos):**

ATGACTACTGATGAAGGTGCCAAGAACAATGAAGAAAGCCCCACAGCCACTGTTGCTGAGCAGGG  
TACTTCCACGGTTCTTG

AGAGGATATTACCTCCAAAAAAGACAGGGGAGTATTAAGATTGTCAAAGAGTGGGGAATGGTGAGGAAACGCC  
TCCTTTGCGG

GATGATTGGAGACAAAGTTTATGTCATTACAAAGGAAAAATTGTCAAATGGAAAGAAGTTTGATTCCAGTCATGA  
CTACTAA CTGTTTCAAATACAGGT GTTTCCTTTTAACAGTT CTTTCTCAAACCTAAGG GTACT

TAGAAATGAACCATTTGTCCTTTAGTCTTGGCAAAGGCCAAGTCATCAAGGCATGGGACATTGGGGTGGCTACCAT  
ATCTTTACTTGG ACAGAAATCAGAACCGT CGGTTCAAGTAGTTCGT CTGTAACCCACCGATG

GAAGAAAGGAGAGATATGCCATTTACTGTGCAAACCAGAAATATGCATATGGCTCGGCTGGCAGTCTCCCTAAAT  
CTTCTTCCCTCTCTATA TAAATGACACGTTTGGT ATACGTATACCGAGCCG GTCAGAGGGATTTTA

TCCTCGAATGCAACTCTCTTTTTTGAGATTGAGCTCCTTGATTTCAAAGGAGAGGATTTATTTGAAGATGGAGG  
AG GCTTACGTTGAGAGAAA CTCTAACTCGAGGAAGT GTTTCCTCTCCTAAATA TTCTACCTCC

CATTATCCGGAGAACCAAACGGAAAGGAGAGGGATATTCAAATCCAAACGAAGGAGCAACAGTAGAAATCCACCT  
GTAATAG TCTTGGTTTGCCTTTC CCCTATAAGTTTAGGTT TTCTCGTTGTCACTT GTGA

GGAAGGCCGCTGTGGTGGAAAGGATGTTGACTGCAGAGATGTGGCATTCACTGTGGGCGAAGGAGAAGACCACGA  
CCTTCCGGCGAC ACCTTCTACAACTGA CTCTACACCGTAAGTGA CCGCTTCTCTTCTGGT

CATTCCAATTGGAATTGACAAAGCTCTGGAGAAAATGCAGCGGAAGAACAATGTATTTTATATCTTGGACCAAG  
GTAAGGTTAACCTTAAC TTCGAGACCTCTTTTAC GCCCTTCTTGTACATA TATAGAACCTGGTTC

ATATGGTTTTGGAGAGGCAGGGAAGCCTAAATTTGGCATTGAACCTAATGCTGAGCTTATATATGAAGTTACCT  
TA CAAAACCTCTCCGTCCC GGATTTAAACCGTAACT ATTACGACTCGAATATA TTCAATGTGA

TAAGAGCTTCGAAAAGGCCAAAGAATCCTGGGAGATGGATAACCAAAGAAAAATTGGAGCAGGCTGCCATTGTCAA  
ATTCTCG CTTTCCGGTTTCTTAG CCTCTACCTATGGTTTC TTAACCTCGTCCGACGG CAGTT

AGAGAAGGGAAACCGTATACTTCAAGGGAGGCAAATACATGCAGGCGGTGATTTCAGTATGGGAAGATAGTGTCTG  
TCTCTTCCCTG TATGAAGTTCCTCCGT TGTACGICCGCCACTAA ATACCTTCTATCACAG

GTTAGAGATGGAATATGGTTTATCAGAAAAGGAATCGAAAGCTTCTGAATCATTTCCTTGTGCTTCTGAA  
CAATCTCTACCTTATAC ATAGTCTTTTCTTAGC CGAAGACTTAGTAAAGA ACGACGGAAAGACTT

CCTGGCCATGTGCTACCTGAAGCTTAGAGAATACACCAAAGCTGTTGAATGCTGTGACAAGGCCCTTGGACTGGA  
GG GGTACACGATGGACTTC TCTCTTATGTGGTTTCG ACTTACGACACTGTTC AACCTGACCT

CAGTGCCAAATGAGAAAGGCTTGTATAGGAGGGGTGAAGCCCAGCTGCTCATGAACGAGTTTGAATCAGCCAAGG  
GTCACGG CTCTTCCGAACATATC CCCACTTCGGGTGACG ACTTGTCAAACCTCAGT TTCC

TGACTTTGAGAAAGTGTCTGGAAGTAAACCCCAAGAATAAGGCTGCAAGACTGCAGATCTCCATGTGCCAGAAAA  
ACTGAAACTCT CGACCTTCATTTGGGG TATTCCGACGTTCTGAC TAGAGGTACACGGTCTT

GGCCAAGGAGCACAAACGAGCGGGACCGCAGGATATACGCAACATGTTCAAGAAGTTTGCAGAGCAGGATGCCAA  
CCGTTTCTCGTGTTC CCCTGGCGTCTATATG TTGTACAAGTTCTTCAA TCTCGTCTACGGT

**FIG. 11 (Cont.)**

GGAAGAGGCCAATAAAGCAATGGGCAAGAAGACTTCAGAAGGGGTCACTAATGAAAAAGGAACAGACAGTCAAGC  
CC TCCGGTTATTTTCGTTAC TTCTTCTGAAGTCTTCC GTGATTACTTTTTTCCTT TGTCAGTTCG  
AATGGAAGAAGAGAAAACCTGAGGGCCACGTATGA  
TIACCTT CTCTTTGGACTCCCGGT

**FIG. 11 (Cont.)**

**H. Sondas para FLJ11127 (53 oligonucleótidos):**

```

ATGGCGGCGACAAGGAGCCCCACGCGGGCAAGGGAGCGGGAGCGGICTGGCGCTCCCGCCGCGAGG
TTCCTCGGGGTGCGCCC      CCTCGCCCTCGCCAGA      CGAGGGCGGGCGTCC

AAGTGACCAAGTTCACTCCTGGATGCTAGCTACAAGCCAAAGCCTTAGACACIGICTGGAGAATGGCAAAAGGCTT
TTC      GGTTCAAGTGAGGACCT      ATCGATGTTGCGGTTGCGG      CTGTGACAGACCTCTTA      TTTTCCGAA

TGTGATGTTGGCAGTTTCATTTCTGGTGGCTGCCATCTGCTACTTCCGGAGGCTACATTTATATTCAGGGCAGAA
ACACTACA      GTCAAAGTAAAGACCAC      CGGTAGACGATGAAGGC      CGATGTAAATATAAGTC      TGTT

GCTGAAATGGTGGATTGGATATCTGCAGAGAAAAATCAAAAAGGAACTCAGTGTGGAGGCAGAGGTTGATTTAAT
CGACTTTACCACC      CCTATAGACGTCCTTT      GTTTTCTTGGAGTCAC      TCCGICTCCAACATAAT

CAGTTAATGTGCAAGAGAATGGAAAGGAGAGACACCCCGTAACAAGCTGATGAGGAAGGCTTATGAGGAGCTATT
TCAATAACACGTTCTCT      CTTTCTCTCTGTGGGG      TGTTGACTACTCCTTC      ATACTCCTCGATAA

TTGGCGGCATCACATTAATGTGTTTCGACAAGTAAGGAGAGATAACTATGATGCTCTCAGATCAGTGTATTTC
AAC      CGTAGTGTAATTTACAC      CTGTTCAATTCCTCTTA      ATACTACGAGAGTCTAG      CAATAAAGT

GATATTCAGCCAGGGCATCTCTTTTCCATCATGGATGAAAGAAAAGGACATTGTTAAGCTTCTGAAAACTGCT
CTATAAGT      TCCCGTAGAGAAAAGGT      ACCTACTTCTTTTCT      ACAATTCGAAGGACTTT      ACGA

GTTTTCAAGGTTGTAATTGGATTGAGCAGTACAGTTTTGGTCTGAGAAGTATACAGGCTCGAATGTGTTTG
CAAAAGTGTCCA      TTAACCTAAGTCGTCAT      AAAACCAGGACTCTTCA      GTCCGAGCTTACACAAA

AAAACCTACGGAAATATGTGGAATTATTGAAAACACAGTGGACTGAATTTAATGGCATTAGAGATTATCACAAGAG
TTTGATGCCTTTATACA      TAATAACTTTTGTGTCA      GACTTAAATTACCGTAA      CTAATAGTGTCTC

AGGAAGTATGTGCAACACCCTTTTTTTCAGATGCCATTCTGGAAATATAAACTTTATGAAGCTTTAAAGTTCATCAT
TCC      ATACACGTTGTGGGAAA      GTCACGGTAAGACCTT      TTTGAAATACTTCGAAA      CAAGTAGTA

GCTGTATCAAGTCACTGAAGTTTATGAACAAATGAAGACTAAAAGGTCATTCCCAGICTTTTTAGACTCCTGTT
CGACATAG      AGTGACTTCAAATACTT      TACTTCTGATTTTTCCA      AGGGTCAGAAAAATCTG      ACAA

TTCCAGGGAGACATCCTCTGATCCTTTGAGCTTCAIGATGAATCACCTGAATCTGTAGGCGACACATGTGGACT
AAGTCCCTCTGT      AGACTAGGAAACTCGAA      CTACTTAGTGGACTTAA      ATCCGCTGTGTACACCT

AGAGCAGATTGATATGTTTATACTTGGATACTCCCTTGAAGTAAAGATAAAAAGTGTTCAGACTGTTCAAGTTTAA
GTGCTCTAACTATACAA      TGAACCTATGAGGGGAA      ATTTCTATTTTACAGAAG      GACAAGTTCAAATT

CTCCAGAGACTTTGAAGTCTGCTACCCAGAGGAGCCTCTCAGGGACTGGCCGGAGATCTCCCTGCTGACCCGAGAA
GAG      TCTGAAACTTCAGACGA      GTCCTCTCGGAGAGTCC      ACCGGCCTCTAGAGGGA      CTGGCTCTT

CGACCGCCACTACCACATTCAGTCTTTTAA
GCTGGCGG      TGGTGTAAAGTTCAGAAA

```

**FIG. 11 (Cont.)**

I. Sondas para Map2 (72 oligonucleótidos):

ATGGCTGACGAGAGGAAAGACGAAGGAAAGGCACCACACTGGACATCAGCCTCACTCACAGAGGC  
 CTGCTTCCTTTCCGTGGTGT CCGAGTGAGTGTCTCCG

AGCTGCACACCCCCACTCGCCAGAGATGAAGGACCAGGGTGGCTCAGGGGAAGGGCTGAGCCGCAGCGCCAATGG  
 TCG GTGAGCGGTCTCTACTTCT AGTCCCCTTCCGACTCGGC CC

ATTTCCATACAGAGAGGAGGAGGAAGGCGCCTTTGGGGAGCACGGGTACAGGGCACCTATTTCAGATACCAAAGA  
 TAAAGGTATGTCTCTCCT CGGAAACCCCTCGTGCCAG ATAAGTCTATGGTTTCT

GAAACGGGATCAACGGGAGAGCTGACCTCAGCTGACAGAGAAACAGCAGAGGAAGTGTCTGCAAGGATAGTTCAAGT  
 CTT CCTCTCGACTGGAGTCGACT CGTCTCCTTACAGACGTT CA

AGTCACAGCTGAAGCTGTAGCAGTCTGAAAGGTGAACAAGAGAAGGAGGCCCAACACAAGGATCAGCCTGCAGC  
 TCAGTGTGACTTTCGACA TTTCCACTTGTCTCTTCTTCT TTCCTAGTCGGACGTG

TCTGCCTTTAGCAGCTGAAGAAACAGTTAATCTGCCACCTTCCCCACCACCATCGCCAGCATCAGAACAACAGC  
 AGA CGACTTCTTTGTCAATTAGA GGTGGTGGTAGCGGTCTGAG CG

TGCACTGGAAGAAGCCTCGAAGATGGAATTCCTGAGCAGCAGAAATTGCCTTCTCATTGCTGAGCCTTTAGA  
 ACGTGACCTTCTTCGGAG AAGGGACTCGTCTCTTTAA AAGCGACTCGGAAATCT

CAAGGAGGAAACGGAGTTTTAAGATGCAAAGTAAGCCTGGTGAAGACTTTGAACATGCTGCCTTAGTTCTCAGCC  
 GTT CTCAAATCTACGTTTCATT CTGAAACTTGTACGACGGAA GG

GGACACAAGTAAACTCCCCAGGATAAAAAGGATCCCCAAGACATGGAAGGAGAAAAGTGCCTGCCAGTCCATT  
 CCTGTGTTCAATTTGAGG TTCCTAGGGTTCGTACCT AGCGGACGGTCAGGTAA

TGCGCAGACTTTCGGTACCAACCTGGAAGACATAAAACAGATCACAGAACCAAGCATAACAGTACCTAGCATTGG  
 ACG CCATGGTTGGACCTTCTGTA TGTCTTGGTTGATTGTCA CC

CCTCTCCGAGAGCCCCTAGCTCCAAAAGATCAGAAAGACTGGTTCATCGAAATGCCCGTGGAAATCAAAGAAGGA  
 GGAGAGGCGTCTCGGGGA CTAGTCTTTCTGACCAAGTA CACCTTAGTTTCTTCT

TGAATGGGGTTTTAGCTGCCCAATATCTCCTGGCCCTTGACACCCATGAGGGAAAAAGATGTGCTGGAGGATAT  
 ACT CGACGGGGTTATAGAGGACC GGTACTCCCTTTTTCTACA TA

CCCAAGATGGGAAGGAAAGCAGTTTACTCTCCCATGCCTAGCCCCTTCCACAGTGGAAAGTTTCACTCTCCCTT  
 GGGTCTACCTTCTCTT AGAGGGTACGGATCGGGGA TCAAAGTGAGAAGGGAA

AGATACTGTGAAAGATGAGAGAGTCACAGAAGGGTCAACAACCCTTTGCCCTGTCTTCTTCCAATCAGATGACAA  
 TCT CTACTCTCTCAGTGTCTTCC AAACGGGGACAGAAGAAGGT TT

AATGTCTCTGCAGGACACCAGTGGTTCAGCTACTTCCAAGAGAGTTCTAAAGATGAGGAGCCACAGAAAGATAA  
 TTACAGAGACGTCTGTG CGATGAAGGTTTCTCTCAAG CTCGGTGTCTTCTATT

AGCAGACAAAGTGGCAGATGTTCCCTGTCTCAGAAGCTACCCTGTACTGGGAGATGTTACAGTCCAGCTGTGGA  
 TCG CGTCTACAAGGACAGAGTCT CATGACCCTCTACAAGTGTCT CT

AGGCTTTGTGCGGGAGAACATTTACAGAGAAGAAAAGGGTACCACAGATCAAGAGAAAAAAGAGACTTCGACACC  
 TCCGAAACAGCCCCTCTT CTCTTTTCCCATGGTGTCT TTTCTCTGAAGCTGTGG

FIG. 11 (Cont.)



GCCACCTGTTGCTGATGACAGCCAACCCGTAACCAGACAGTCAACTTGAAGACATGGGGTACTGTGTGTTCAA  
 CAAGTACACAGTCCCTCTCCCATCGCCAGTTCAAGACAGTGAGAATTTGTCAGGAGAGAGTGGTTTCGTTTTATGA  
 GGGAGAGGGTAGCGGTCAAG

AGGAACCGATGACAAAGTCCGTAGAGATTTGGCCACTGACCTTTCACTAATTGAGGTAAAACCTTGCAGCTGCTGG  
 AAGAGTCAAAGATGAATTCACCTGCTGAGAAAGAGGCATCTCCACCCCTTCTGCTGACAAATCAGGACTGAGTAG  
 GGAGTTTGACCAAGACAGGAAAGCTAATGACAAGCTGGATACTGTCCCTAGAAAAGAGCGAAGAGCATGTTGATT  
 AAAAGAACATGCCAAGGAGTCAGAAGAGGTTGGGGATAAAGTAGAGCTCTTCGGATTAGGTGTAACCTATGAGCA  
 AACCTCTGCCAAAGAAGTATAACAATAAAGAAACAGCACCTGAGAGAGCAGAGAAAGGTCTCAGTTCAGTGCC  
 AGAGGTAGCTGAGGTAGAAACAACCAAAAAGCTGACCAAGGTCTAGATGTTGCTGCCAAGAAAGATGATCAGAG  
 TCCATTAGATATAAAAGTCAGTGACTTTGGACAGATGGCTTCTGGGATGAGTGTAGATGCTGGGAAAACCATAGA  
 GCTTAAGTTCGAGGTTGATCAGCAGCTGACTCTCTCATCCGAAGCACCTCAGGAAACAGATTCATTCATGGGTAT  
 TGAGTCCAGCCACGTGAAGGATGGTGCCAAAGTCAGTGAAACAGAAGTCAAAGAGAAGGTGGCAAAGCCTGACTT  
 GGTGCATCAGGAGGCTGTGGACAAAGAAGAGTCTATGAGTCTAGTGGTGAGCATGAAAGCCTCACCATGGAGTC  
 G

CCTGAAGCCTGATGAGGGCAAGAAAGAAACATCTCCAGAGACATCACTGATACAAGATGAAGTTGCCCTCAAAC  
 GGACTTCGGACTACTCCCG

GTCTGTAGAAATCCCTTGCCACCTCCAGTTTCCGAAGCTGATTCATCCATTGATGAGAAGGCGGAGGTCCAGAT  
 CTTCGCCTCCAGGTCTA

GGAATTTATTCAGCTGCCAAGGAAGAGAGCACAGAGACTCCGGATATACCTGCCATACCTTCTGATGTCACCCA  
 CC CAGTGGGT

GCCACAGCCTGAAGCAGTTGTGTCCGAACCAGCAGAGGTTTCAGGTTGAGGAAGAAGAGATCGAAGCTGAGGGAGA  
 CGGTGTCGGACT

ATATGACAAACTGCTCTTCCGCTCAGACACCCTCCAGATCACCGACCTGCTTGTTCAGGAAGTAGGGAGGAGTT  
 GGCGAGTCTGTGGGAGGTCT

TGTGGAGACCTGCCAGGGGAGCACAAAGGTGTGGTTGAGTCCGTGGIAACCATCGAGGATGATTTTCACTACTGT  
 CCTCTGGACGGGTCCCCTCG

FIG. 11 (Cont.)

AGTACAAACCACGACTGATGAGGGAGAGTTGGGATCCCACAGTGTGCGCTTTGCAGCTCCAGTTCAGCCTGAGGA  
 CCCTAGGGTGTCCACACGCGA

AGAAAGGAGACCATACCCTCATGATGAAGAGCTTGAAGTACTGATGGCAGCAGAAGCCCAGGCAGAGCCCAAGGA  
 CGGGTCGGTCTCGGGTTCTT

TGGCTCTCCAGATGCTCCAGCTACCCCTGAGAAAGAAGAGGTTCCATTCTCAGAATATAAAACAGAAACCTACGA  
 CCGAGAGGTCTACGAGGTG

CGATTACAAAGATGAGACCACCATTGATGACTCCATTATGGATGCCGACAGCCTGTGGGTGGACACTCAAGATGA  
 CGGCTGTCCGACACCCACCT

TGATAGAAGCATCTTGACAGAGCAGTTAGAACTATTCTTAAAGAGGAGAGAGCTGAGAAGGAAGCTCGGAGACC  
 CCTTCGAGCCTCTGG

GTCTCTCGAGAAACATAGAAAAGAAAACCTTTTAAAACCTGGGAGAGGCAGAATTTCCACTCCTGAAAGAAAAGT  
 CAGAG

AGCTAAAAGGAACCTAGCACGGTCTCCAGGGATGAAGTGAGAAGGAAAAAGCAGTTTATAAGAAGGCTGAACT  
 GGATCGTGCCAGAGGTCCCT

TGCTAAAAAATCAGAAGTTCAGGCCCACTCTCCTTCCAGGAACTCATTTTAAAACCTGCTATCAAATACACTAG  
 ACCAACTCATCTCTCCIGTGTAAAGCGGAAAACCACAGCAACAAGTGGTGAATCAGCTCAGGCTCCCAAGTGGT  
 GTCGAGTCCGAGGGTCCGCG

TAAACAGGCGAAGGACAAAGTCACTGATGGAATAACCAAGAGCCCAGAAAAACGTTCTTCCCTCCCAAGACCTTC  
 GGGAGGGTTCTGGAAG

CTCCATCCTCCCTCCTCGCAGGGGCGTATCAGGAGACAGGGAGGAGAACTCGTTCTCTCTGAACAGCTCCAATC  
 GAGG

TTCAGCACGACGGACCACCAGGTCAGAAACCAATTCGCAGAGCAGGAAAAAGCGGCACCTCAACACCTACTACCCC  
 TGGATCTACTGCAATCACCCCTGGCACTCCTCCAAGCTACTCTTACGTACCCCAAGCACCCTGGAACCCCGAG  
 CTATCCAGGACACCAGGAACCCCAAAATTTGGCATCTTGGTGGCCAGTGAAGAAGTTGCCATCATTGCGCAC  
 TCCTCCAAAGTCCCAAGCTACTCCCAAGCAGCTTCGGCTCATTAAACCAACCTCTGCCAGACCTGAAGAACGTCAA  
 GTCCAAAATCGGATCAACCGACAACATCAAATACCAGCCTAAGGGGGGTCAGGTACAAATTGTTACTAAGAAGAT  
 AGACTTAAGCCATGTGACTTCCAAATGTGGCTCTCTAAAGAACATCCGTCACAGGCCAGGTGGTGGACGCGTGAA  
 GATTGAGAGTGTAAGCTGGATTTCAAGGAGAAGGCCCAAGCTAAAGTTGGCTCACTTGACAATGCTCACCAATGT

**FIG. 11 (Cont.)**



ACCTGGAGGTGGTAACGTGAAGATTGACAGCCAAAAGCTGAACTTCCGAGAGCATGCAAAGGCCCGCGTCGACCA  
CGGGGCTGAGATCATCACACAGTCGCCAAGCAGGTCAAGCGTGGCGTCTCCCCGGCGACTCAGCAATGTCTCCTC  
TTCTGGAAGCATCAACCTGCTCGAATCCCCTCAGCTGGCCACTTTGGCTGAGGACGTCACTGCGGCGCTCGCTAA  
GCAGGGCTTGTGA

**FIG. 11 (Cont.)**

**J. Sondas para *STL1* (48 oligonucleótidos):**

```

ATGAAGGATTTAAAATTATCGAATTTCAAAGGCCAAATTTATAAGCAGAACCAGTCACTGGGGACT
      TTAATAGCTTAAAGTTTCCG      TATTCGTCTTGGTCAGTGAC

TACGGGTAAGAAGTTGCGGTATTTCACTACTATCGCATCTATGACGGGCTTCTCCCTGTTTGGATACGACCAAGG
TGCCCAATTTCAACGCCAT      AGCGTAGATACTGCCCGAAG      ACCTATGCTGGTTCC

GTTGATGGCAAGTCTAATTACTGGTAAACAGTTCAACTATGAATTTCCAGCAACCAAAGAAAATGGCGATCATGA
CAACT      AATGACCATTTGTCAAGTTG      TTACCGCTAGTACT

CAGACACGCAACTGTAGTGCAGGGCGCTACAACCTCTGTTATGAATTAGGTGTTCGCAGGTTCTCTATTTCGT
GTCTGT      AATCCAACAAAGCGTCCAAG      AGCA

TATGTTCTGCGGTGAAAGAATTGGTAGAAAACCATTAATCTCTGATGGGTTCCGTAATAACCATCATTGGTGCCGT
ATACAAGACGCCACTT      ATTAGGACTACCCAAGGCAT

TATTTCTACATGCGCATTTCGIGGTTACTGGGCATTAGGCCAGTTTATCATCGGAAGAGTCGTCACCGGTGTTGG
AAGATGTACGCGTAAAGCAC      ATCCGGTCAAATAGTAGCCT

AACAGGGTTGAATACATCTACTATTCCTGTTGGCAATCAGAAATGTCAAAGCTGAAAATAGAGGGTTGCTGGT
      AAGGGCAAACCGTTAGTCTT      TCGACTTTTATCTCCAACG

CAATTTAGAAGGTTCCACAATTGCTTTTGGTACTATGATTGCTTATTGGATTGATTTTGGGTTGTCTTATAACCA
AATCTTCCAAGGIGTTAACG      TAACCTAACTAAAACCCAAC      TGGTT

CAGTTCGTTCAGTGGAGATTCCCCGTTGTCATGCAAATCGTTTTTGTCTCTCTTCCTGCTTTGCTTTTCATGATTAA
GTCAAGACAAGTCAC      AGCAAAAACGAGAGAAGGAC      ATT

ACTACCTGAATCGCCACGTTGGCTGATTTCTCAAAGTCGAACAGAAGAAGCTCGCTACTTGGTAGGAACACTAGA
TGATGGACTTAGCGGTG      AAGAGTTTCAGCTTGTCTTC

CGACGCGGATCCAAATGATGAGGAAGTTA TAACAGAAGTTGCTATGCTTCACGATGCTGTTAACAGGACCAAACA
ACTACTCCTTCAATATTGTC      ACGAAGTGCTACGACAATTG      TGT

CGAGAAACATTCACTGTCAAGTTTGTTCPCAGAGGCAGGTCCCAAATCTTCAGAGGGCTTTGATTGCAGCTTC
GCTCTTTGTAAGTGACA      ACAAGAGGTCTCCGTCCAGG      AGAAGTCTCCCGAAACTAAC

AACGCAATTTTTCCAGCAATTTACTGGTTGTAACGCTGCCATATACTACTCTACIGTATTATTCAACAAAACAAT
      AAAIGACCAACATITGCGACG      TGAIGAGAIGACATAAIAAG

TAAATTAGACTATAGATTATCAATGATCATAGGTGGGGTCTTCGCAACAATCIACGCCITATCTACTATTGGTTC
TAGTTACTAGTATCCACCCC      AGATGCGGAATAGATGATAA

ATTTTTCTAATTGAAAAGCTAGGTAGACGTAAGCTGTTTTTATTAGGTGCCACAGGTCAAGCAGTTTCATTAC
TTCGATCCATCTGCATTGCA      ATAATCCACGGTGTCCAGTT

AATTACATTTGCATGCTTGGTCAAAGAAAATAAAGAAAACGCAAGAGGTGCTGCCGTCCGGCTTATTTTTGTTCAI
AATGTAAACGTACGAACCCAG      TTCTTTTGCCTTCTCCACG      AACAAGTA

TACATTCCTTTGGTTTGTCTTTGCTATCAT TACCATGGATATACCCACCAGAAATGTCATCAATGAAAGTTCGTGC
AIGTAAAGAAACC      ATGGTACCTATATGGGTGGT      TCAAGCACG
    
```

**FIG. 11 (Cont.)**

```

-----
ATCAACAAACGCTTTCTCCACATGTACTAATTGGTTGTGTAACTTTGCGGTTGTCATGTTACCCCAATATTTAT
TAGTTGTTTGC                      AACCAACACATTGAAACGCC                      AAATA

TGGACAGTCCGGTTGGGGTTGCTACTTATTTTTTGGCTGTTATGAATTATTTATACATTCCAGTTATCTTCTTTTT
ACCTGTCAGGCCAAC                      TAAAAAACGACAATACTTAA                      TAGAAGAAAAA

CTACCCTGAAACCGCCGGAAGAAGTTTGGAGGAAATCGACATCATCTTTGCTAAAGCATAACGAGGATGGCACTCA
GATGGGACT                      ACCTCCTTITAGCTGTAGTAG                      TTCGTATGCTCCTACCGTGA

ACCATGGAGAGTTGCTAACCATTTGCCCAAGTTATCCCTACAAGAAGTCGAAGATCATGCCAATGCATTGGGCTC
                      TGGTAAACGGGTTC AATAGG                      ACGTAACCCGAG

TTATGACGACGAAATGGAAAAAGAGGACTTTGGTGAAGATAGAGTAGAAGACACCTATAACCAAATTAACGGCGA
AATACTGC                      TACCTTTTTCTCCTGAAACC                      TCTCATCTTCTGTGGATATT                      TTGCCGCT

TAATTCGTCTAGTTCTTCAAACATCAAAAATGAAGATACAGTGAACGATAAAGCAAATTTTGAGGGTTGA
ATTAAGCAGATC                      TTTACTTCTATGTCACTTGC

```

**FIG. 11** (Cont.)