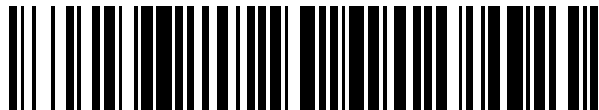


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 911**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2008 PCT/AU2008/001180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09021288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08782928 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2185706**

54 Título: **Métodos mejorados de silenciamiento génico**

30 Prioridad:

14.08.2007 EP 07015956
13.12.2007 US 13604 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2018

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (100.0%)**
Black Mountain Science and Innovation Park,
Clunies Ross Street
Acton ACT 2601, AU

72 Inventor/es:

WANG, MING-BO y
WATERHOUSE, PETER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 651 911 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

Métodos mejorados de silenciamiento génico

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de tecnología de ADN recombinante, más particularmente a la modificación de la expresión de ácidos nucleicos en plantas mediante la provisión de moléculas de ARN inhibidor. Se describen métodos para modificar el silenciamiento génico en plantas al proporcionar a la planta más de un tipo de ARN inhibidor, mediante lo cual dichos tipos diferentes de ARN inhibidor se procesan a través de diversas rutas de silenciamiento génico. La invención se puede aplicar en agricultura.

Técnica antecedente

10 El silenciamiento génico es un fenómeno común en eucariotas, mediante el cual se reduce la expresión de genes particulares, o incluso se anula, a través de un número de mecanismos diferentes que oscilan desde la degradación del ARNm (silenciamiento post-transcripcional) pasando por la represión de la síntesis de proteínas hasta la remodelación de la cromatina (silenciamiento transcripcional).

15 El fenómeno del silenciamiento génico se ha adoptado rápidamente para manipular la expresión de diferentes moléculas diana. Inicialmente se conocieron dos métodos predominantes para la manipulación de la expresión génica en organismos eucariotas, que se denominan en la técnica como disminución "antisentido" o disminución "sentido".

20 En la última década, se ha demostrado que la eficiencia del silenciamiento se podría mejorar enormemente tanto a nivel cuantitativo como cualitativo usando constructos quiméricos que codifican ARN capaz de formar un ARN bicatenario mediante emparejamiento de bases entre las secuencias nucleotídicas de ARN antisentido y sentido respectivamente complementarias y homólogas a las secuencias diana. Tal ARN bicatenario (ARNbc) también se denomina como ARN de horquilla (ARNh).

Las siguientes referencias describen el uso de tales métodos: Fire et al., 1998 (Nature 391, 806-811) describen la interferencia genética específica mediante introducción experimental de ARN bicatenario en *Caenorhabditis elegans*.

25 El documento WO 99/32619 proporciona un procedimiento para introducir un ARN en una célula viva para inhibir la expresión génica de un gen diana en esa célula. El procedimiento se puede poner en práctica ex vivo o in vivo. El ARN tiene una región con estructura bicatenaria. La inhibición es específica de la secuencia por cuanto las secuencias nucleotídicas de la región dúplex del ARN y o una porción del gen diana son idénticas.

30 Waterhouse et al. 1998 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13959-13964) describen que la resistencia a virus y el silenciamiento génico en plantas se puede inducir mediante expresión simultánea de ARN sentido y antisentido. El ARN sentido y antisentido puede estar localizado en un transcrito que tiene autocomplementariedad.

Hamilton et al. 1998 (Plant J. 15: 737-746) describen que un transgén con ADN repetido, es decir, copias invertidas de su región no traducida de 5', provoca la supresión post-transcripcional, de alta frecuencia, de la expresión de ACC-oxidasa en tomate.

35 El documento WO 98/53083 describe constructos y métodos para potenciar la inhibición de un gen diana en un organismo, que implican insertar en el vector del silenciamiento génico una secuencia repetida invertida de toda o parte de una región polinucleotídica en el vector.

40 El documento WO 99/53050 proporciona métodos y medios para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en células eucariotas, particularmente en células vegetales, introduciendo genes quiméricos que codifican moléculas de ARN sentido y ARN antisentido dirigidas contra el ácido nucleico diana. Estas moléculas son capaces de formar una región de ARN bicatenario mediante emparejamiento de bases entre las regiones con la secuencia nucleotídica sentido y antisentido, o introduciendo las propias moléculas de ARN. Preferiblemente, las moléculas de ARN comprenden simultáneamente tanto secuencias nucleotídicas sentido como antisentido.

45 El documento WO 99/49029 se refiere generalmente a un método para modificar la expresión génica, y a genes sintéticos para modificar la expresión de genes endógenos en una célula, tejido u órgano de un organismo transgénico, en particular a un animal o planta transgénica. También se proporcionan genes sintéticos y constructos genéticos, capaces de formar un ARNbc, que son capaces de reprimir, retrasar o de otro modo reducir la expresión de un gen endógeno o un gen diana en un organismo cuando se introducen en él.

50 El documento WO 99/61631 se refiere a métodos para alterar la expresión de un gen diana en una planta usando fragmentos de ARN sentido y antisentido del gen. Los fragmentos de ARN sentido y antisentido son capaces de emparejarse y formar una molécula de ARN bicatenario, alterando de ese modo la expresión del gen. La presente invención también se refiere a plantas, a su progenie y a semillas de las mismas obtenidas usando estos métodos.

El documento WO 00/01846 proporciona un método para identificar ADN responsable de conferir un fenotipo

particular en una célula, método el cual comprende a) construir un ADNc o genoteca genómica del ADN de la célula en un vector adecuado en una orientación con respecto a (a) promotor o promotores capaces de iniciar la transcripción del ADNc o ADN en ARN bicatenario (bc) al unir un factor de transcripción apropiado al promotor o promotores; b) introducir la genoteca en una o más células que comprenden el factor de transcripción, y c) identificar y aislar un fenotipo particular de una célula que comprende la genoteca, e identificar el fragmento de ADN o ADNc de la genoteca responsable de conferir el fenotipo. Usando esta técnica, también es posible asignar una función a una secuencia de ADN conocida a) identificando homólogos de la secuencia de ADN en una célula, b) aislando el homólogo u homólogos de ADN relevantes o un fragmento de los mismos, de la célula, c) clonando el homólogo o fragmento del mismo en un vector apropiado en una orientación con respecto a un promotor adecuado capaz de iniciar la transcripción del ARNbc a partir de dicho homólogo de ADN o fragmento al unir un factor de transcripción apropiado al promotor, y d) introduciendo el vector en la célula de la etapa a) que comprende el factor de transcripción.

El documento WO 00/44914 también describe composición y métodos para la atenuación in vivo e in vitro de la expresión génica usando ARN bicatenario, particularmente en pez cebra.

El documento WO 00/49035 describe un método para silenciar la expresión de un gen endógeno en una célula, implicando el método sobreexpresar en la célula una molécula de ácido nucleico del gen endógeno y una molécula antisentido que incluye una molécula de ácido nucleico complementaria a la molécula de ácido nucleico del gen endógeno, en el que la sobreexpresión de la molécula de ácido nucleico del gen endógeno y la molécula antisentido en la célula silencia la expresión del gen endógeno.

Smith et al., 2000 (Nature 407: 319-320), así como el documento WO 99/53050, describen que el intrón que contiene ARNbc incrementó adicionalmente la eficiencia del silenciamiento. El intrón que contiene ARN de horquilla también se denomina a menudo como ARNhi.

Aunque el silenciamiento génico fue pensado inicialmente como una consecuencia de la introducción de moléculas de ARN aberrantes, tal como al introducir transgenes (transcritos en moléculas de ARN antisentido sentido o bicatenario), recientemente está claro que estos fenómenos no son solamente artefactos experimentales. El silenciamiento génico mediado por ARN en eucariotas parece desempeñar un papel importante en diversos procesos biológicos, tales como la regulación espacial y temporal del desarrollo, la formación de heterocromatina, y la defensa antivírica.

Todos los eucariotas poseen un mecanismo que genera ARN pequeños, que entonces se usan para regular la expresión génica al nivel transcripcional o post-transcripcional. Diversos sustratos de ARN bicatenario se procesan en moléculas pequeñas de ARN de 21-24 nucleótidos de longitud, a través de la acción de ribonucleasas específicas (proteínas Dicer o similares a Dicer (DCL)). Las proteínas de unión a ARNbc dedicadas (DRB) se asocian con proteínas DCL para optimizar el procesamiento de sus diversos sustratos de ARNbc en ARN pequeños de un tamaño específicamente dimensionados. Estos ARN pequeños sirven como moléculas guía incorporadas en complejos proteicos (complejos del silenciamiento inducido por ARN (RISC)) que contienen además un miembro de la familia conservada de proteínas Argonautas (AGO), que conducen a los diversos efectos logrados a través del silenciamiento génico. Las plantas, tales como *Arabidopsis*, tienen un espectro amplio de rutas de silenciamiento por ARN endógenas, debido a la presencia de varias proteínas DCL especializadas (cuatro en *Arabidopsis*) y parálogos de AGO distintos (diez en *Arabidopsis*).

Los ARN pequeños implicados en la represión de la expresión génica en eucariotas a través de interacciones específicas de la secuencia con ARN o ADN se subdividen generalmente en dos clases: microARN (miARN) y ARN pequeños de interferencia (ARNpi). Estas clases de moléculas de ARN pequeño se distinguen por la estructura de sus precursores y por sus dianas. Los miARN se escinden del tronco corto, imperfectamente emparejado, de un transcrito plegado mucho más grande, y regulan la expresión de transcritos a los que pueden tener similitud limitada. Los ARNpi surgen de un ARN bicatenario largo (ARNbc), y típicamente dirigen la escisión de transcritos a los que son completamente complementarios, incluyendo el transcrito a partir del que derivan (Yoshikawa et al., 2005, *Genes & Development*, 19: 2164-2175).

El número de miembros de la familia Dicer varía enormemente entre organismos. En seres humanos y *C. elegans*, solamente hay un Dicer. En *Drosophila*, Dicer-1 y Dicer-2 son ambas requeridas para la escisión del ARNm dirigida por ARN pequeño de interferencia, mientras que Dicer-1, pero no Dicer-2, es esencial para la represión dirigida por microARN (Lee et al., 2004 *Cell* 75:843-854, Pham et al., 2004 *Cell* 117: 83-94).

Las plantas, tales como *Arabidopsis*, parecen tener al menos cuatro proteínas similares a Dicer (DCL), y se ha sugerido en la bibliografía científica que estas DCLs están funcionalmente especializadas (Qi et al., 2005 *Molecular Cell*, 19, 421-428).

DCL1 procesa los miARN procedentes de los ARN precursores con estructura en tallo-bucle parcialmente bicatenarios transcritos a partir de genes MIR (Kurihara y Watanabe, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12753-12758).

DCL3 procesa los ARNpi derivados de la región intergénica y repetida endógenos que dependen de ARN polimerasa

2 dependiente de ARN, y está implicada en la acumulación de los ARNpi de 24 nt en ADN y metilación de histona (Xie et al., 2004, PLoSBiology, 2004, 2, 642-652).

DCL2 parece funcionar en la respuesta de silenciamiento antivírico para algunos virus vegetales, pero no para todos (Xie et al., 2004, PLoSBiology, 2004, 2, 642-652).

5 Varias publicaciones han adscrito un papel a DCL4 en la producción de los ARNpi que actúan en trans (ARNpi-at). Los ARNpi-at son una clase especial de los ARNpi endógenos codificados por tres familias conocidas de genes, designadas TAS1, TAS2 y TAS3 en *Arabidopsis thaliana*. La ruta de biogénesis para los ARNpi-at implica la escisión, específica del sitio, de transcritos primarios guiada por un miARN. El transcrito procesado se convierte entonces en ARNbc a través de las actividades de RDR6 y SGS3. La actividad de DCL4 cataliza entonces la conversión del ARNbc en la formación del dúplex de ARNpi en incrementos de 21 nt (Xie et al. 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 12984-12989; Yoshikawa et al., 2005, Genes & Development, 19: 2164-2175; Gascioli et al., 2005 Current Biology, 15, 1494-1500). Como se indica en Xie et al. 2005 (más arriba), está todavía por determinar si DCL4 es necesaria para el silenciamiento transgénico y antiviral.

15 Dunoyer et al. 2005 (Nature Genetics, 37 (12) p. 1356 a 1360) describen que DCL4 es necesaria para la interferencia de ARN, y produce el componente de ARN pequeño de interferencia de 21 nucleótidos de la señal de silenciamiento célula a célula de la planta.

20 Dunoyer et al. 2007 (Nature Genetics 39 p. 848-856) resume las diferentes rutas en *Arabidopsis* como sigue: DCL1, junto con la proteína de DRB HYL1, cataliza la liberación de los miARN de transcritos precursores plegados imperfectos. En general, AGO1 cargada con miARN promueve entonces la escisión de transcritos celulares que portan secuencias diana de miARN8. DCL3 produce los ARNpi asociados a repeticiones de ADN de 24 nt que guían la formación de heterocromatina al reclutar AGO4 y/o AGO6. DCL4, junto con DRB4, genera los ARNpi que actúan en trans de 21 nt (ARNpiat) que requieren que AGO1 o AGO7 funcionen para mediar el silenciamiento post-transcripcional de genes que controlan la heteroblastia y la polaridad de la hoja. Finalmente, DCL2 produce los ARNpi de transcritos antisentido naturales que orquestan las respuestas a estrés16.

25 La solicitud PCT sin publicar PCT/AU07/000583 describe una modulación de y demuestra la implicación de DCL4 en el procesamiento de moléculas de ARN de horquilla largas en componentes de ARN de interferencia que finalmente efectúan el silenciamiento génico.

30 Aunque el silenciamiento génico mediado por ARNi se ha convertido en una herramienta de investigación aceptada, así como una herramienta para desarrollar rasgos particulares, hay informes relacionados que plantean cuestiones sobre la estabilidad a largo plazo del silenciamiento génico en condiciones particulares, o a lo largo del tiempo de vida de varias generaciones, particularmente en células vegetales y plantas. Por ejemplo, Szitty et al. 2003 (EMBO Journal 22, p. 633 a 640) dieron a conocer que una temperatura baja inhibe la defensa mediada por silenciamiento de ARN mediante el control de la generación de ARNpi. Karmada et al. 2004 dan a conocer un silenciamiento génico sensible a la temperatura mediante una repetición invertida expresada en *Drosophila* (Biochem. Biophys. Res. Comm. 315, 599-602). Niu et al. 2006 (Nature Biotechnology 24, 1420 - 1428) describen que los sistemas de infección víricos mediante síntomas de TYMV en plantas de *Arabidopsis* fueron más graves a 15°C que a 24°C, y que las plantas transgénicas que comprenden microARN dirigido a disminuir la expresión del virus exhibieron una resistencia al virus específica mediada por miARN artificial estable, mantenida a 15°C.

40 Además, algunas aplicaciones de interferencia por (ARNi), particularmente como una herramienta de desarrollo de rasgos, requieren una disminución seria del gen diana, preferiblemente incluso la disminución casi completa o completa, para todos los medios y fines prácticos, de la función del gen diana.

La aplicación de ARNi a diferentes genes diana usando diferentes genes quiméricos o moléculas de ARN que se procesan vía la misma ruta productora de la molécula de ARNpi puede conducir a una saturación de tales rutas.

45 En consecuencia, se describen aquí en lo sucesivo, en las diferentes realizaciones, ejemplos y reivindicaciones, métodos y medios para el silenciamiento génico que resuelven los problemas mencionados anteriormente, proporcionando y usando al menos dos moléculas de ARN inhibidor o genes que codifican tales moléculas de ARN dirigidas al mismo ácido nucleico diana, con lo que las moléculas de ARN inhibidor dan como resultado el silenciamiento génico a través de dos o más rutas distintas que procesan el ARNi en moléculas de ARNpi, habitualmente mediado mediante diferentes proteínas Dicer o proteínas similares a Dicer (opcionalmente en combinación con diferentes proteínas de unión a ARNbc y/o miembros de la familia Argonauta), y que finalmente conducen al silenciamiento génico. Para aliviar el problema de la saturación de las rutas de procesamiento de ARNi, se describen métodos y medios que proporcionan y usan al menos dos moléculas de ARN inhibidor o genes que codifican tales moléculas de ARN dirigidas a diferentes ácidos nucleicos diana, con lo que las moléculas de ARN inhibidor dan como resultado el silenciamiento génico a través de dos o más rutas distintas que procesan el ARNi en moléculas de ARNpi.

Sumario de la invención

En una realización, la invención proporciona un método para reducir la expresión de un ácido nucleico diana en una

célula vegetal o planta, que comprende la etapa de introducir una combinación de al menos dos moléculas de ARN inhibidor, cada una capaz de reducir la expresión de un primer ácido nucleico diana en una célula vegetal o planta, en el que una de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1, y la otra de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2, y en el que una de las moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en el que la otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una primera y segunda región complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo la primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, y comprendiendo la segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, en el que las regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.

En otra realización, la invención proporciona un método para reducir la expresión de los ácidos nucleicos diana primero y segundo en una célula vegetal o planta, que comprende la etapa de introducir una combinación de al menos dos moléculas de ARN inhibidor, en el que una de las moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana en la célula vegetal o planta, y la otra de las moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del segundo ácido nucleico diana en la célula vegetal o planta, en el que una de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1, y la otra de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2, y en el que una de las moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en el que la otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una región primera y segunda complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo la primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer o segundo ácido nucleico diana, y comprendiendo la segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer o segundo ácido nucleico diana, en el que las regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.

Las dos moléculas de ARN inhibidor se pueden expresar a partir de diferentes promotores, tal como una de las moléculas de ARN inhibidor se puede transcribir a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa II, y el otro ARN inhibidor se puede transcribir a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa III.

La molécula de ARN bicatenario puede ser una horquilla corta con una secuencia nucleotídica sentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica a la primera región de 20-30 nucleótidos del gen diana, y una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica al complemento de la primera región del gen diana, estando unidas covalentemente las secuencias sentido y antisentido mediante una región espaciadora de 3-20 nucleótidos.

La molécula de miARN puede ser una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20-25 nucleótidos consecutivos, al menos 95% idéntica al complemento de una segunda región de 20-30 o 20-25 nucleótidos del gen diana, pero que tiene una secuencia nucleotídica sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos que es como máximo 60-95% idéntica en secuencia a la segunda región del gen diana.

En una realización de la invención, el ARN de horquilla corto se expresa a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa III, y la molécula de miARN se transcribe a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa II como un pri-miARN o pre-microARN.

La invención también proporciona una célula vegetal que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión de un primer ácido nucleico diana en la célula vegetal, en la que una de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1, y la otra de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2, en la que una de las moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en la que la otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una región primera y segunda complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo la primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, y comprendiendo la segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, en la que las regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.

En todavía otra realización, la invención proporciona una célula vegetal que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión de ácidos nucleicos diana primero y segundo en la célula vegetal, en la que una de las moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana en la célula vegetal, y la otra de las moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del segundo ácido nucleico diana en la célula vegetal, en la que una de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente

vía DCL1, y la otra de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2, y en la que una de las moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en la que la otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una región primera y segunda complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo la primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del ácido nucleico diana primero o segundo, y comprendiendo la segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del ácido nucleico diana primero o segundo, en la que las regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.

En una célula vegetal según la invención, las dos moléculas de ARN inhibidor se pueden expresar a partir de diferentes promotores, tal como una de las moléculas de ARN inhibidor se puede transcribir a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa II, y la otra molécula de ARN inhibidor se puede transcribir a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa III. La molécula de ARN bicatenario puede ser una horquilla corta con una secuencia nucleotídica sentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica a la primera región de 20-30 nucleótidos del gen diana, y una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica al complemento de la primera región del gen diana, estando unidas covalentemente las secuencias sentido y antisentido mediante una región espaciadora de 3-20 nucleótidos, y la molécula de miARN puede ser una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20-25 nucleótidos consecutivos, al menos 95% idéntica al complemento de una segunda región de 20-30 o 20-25 nucleótidos del gen diana, pero que tiene una secuencia nucleotídica sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos que es como máximo 60-95% idéntica en secuencia a la segunda región del gen diana, en la que el ARN de horquilla corto se expresa a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa III, y la molécula de miARN se transcribe a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa II como un pri-miARN o pre-microARN.

La invención también proporciona plantas que consisten esencial o completamente en las células descritas aquí.

En todavía otra realización de la invención, se proporciona una composición de materia que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor como se describen aquí, capaces de reducir la expresión de un primer ácido nucleico diana en una célula vegetal, o de un primer y un segundo ácido nucleico diana en una célula vegetal.

La invención proporciona además un kit que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor como se describen aquí, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la reducción de la expresión de un primer ácido nucleico diana en una célula vegetal, o de un primer y segundo ácido nucleico diana en una célula vegetal.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.

Panel A: Los ARNh cortos derivados de transgenes de PDS_{hp42} dirigidos mediante CaMV35S (reconocido por Pol II) y AtU6 (reconocido por Pol III) se procesan de forma diferente: los patrones tanto de las especies de ARN intermedias como de los ARN_{pi} son diferentes entre las estirpes 35S y U6. Líneas 1-6: análisis Northern de especies de ARN pequeño en diferentes estirpes vegetales que comprenden los transgenes de PDS_{hp42} dirigidos por CaMV35S; líneas 7-12: análisis Northern de especies de ARN pequeño en diferentes estirpes vegetales que comprenden los transgenes de PDS_{hp42} dirigidos por AtU6.

Panel B: Silenciamiento de la expresión de PDS en diferentes estirpes transgénicas que comprenden los transgenes de PDS_{hp42} dirigidos por CaMV35S (35S-X; parte superior de cada placa), los transgenes de PDS_{hp42} dirigidos por AtU6 (U6-XX; parte inferior de cada placa), y estirpes vegetales que comprenden ambos transgenes (35S-X x U6-XX; parte central de cada placa).

Figura 2. Análisis de transferencia Northern que muestra el procesamiento diferencial de ARNh derivado de los transgenes 35S-GUS_{hp93} y U6-GUS_{hp93} en *Arabidopsis*. Panel A. Detección de los ARN_{pi}. Nótese la diferencia global en los patrones del tamaño de ARN_{pi} entre las estirpes 35S y U6. Panel B. Mejores separaciones de los ARN_{pi}. Se separaron subconjuntos de las muestras de ARN pequeño en A en gel de poliacrilamida al 15% (panel izquierdo) o al 18% (derecho), y se hibridaron con la misma sonda que para A. Obsérvese que los ARN_{pi} de las estirpes 35S tienen predominantemente un tamaño de 21 nt, mientras que los ARN_{pi} de las estirpes U6 tienen un tamaño de 22 y/o 24 nt. Panel C. Análisis de transferencia Northern de los ARN intermedios en plantas de *Arabidopsis* 35S-GUS_{hp93} y U6-GUS_{hp93}. Los ARN pequeños totales se separaron en geles de 5% de formaldehído-agarosa (NuSieve 3:1), y se hibridaron con ARN de GUS antisentido de longitud completa marcado con ³²P (panel superior). Panel D. Cuatro de las muestras de ARN pequeño total mostradas en C (#4, #6, #17 y #21) se dejaron sin tratar (-) o se trataron (+) con ARNasa I, se separaron en gel de 5% de formaldehído-agarosa (NuSieve 3:1), y se hibridaron con ARN sentido marcado

con ³²P, que corresponde al tallo y bucle del ARN de GUShp93 (es decir, nt. 512-697 del ORF de GUS), que debería detectar el ARN de longitud completa y el tallo del ARNbc, pero no el fragmento de bucle, del transcrito de GUShp93. N-35S y N-U6 son preparaciones de ARN nuclear de las plantas 35S-GUShp93 y U6-GUShp93 reunidas, respectivamente. Panel E. Las mismas cuatro muestras se dejaron sin tratar (-) o se trataron (+) con ARNasa I, se separaron en gel de 5% de formaldehído-agarosa (NuSieve 3:1), y se hibridaron con ARN antisentido marcado con ³²P, que corresponde al bucle de ARN de GUShp93 (es decir, nt. 605-697 del ORF de GUS). Obsérvese que el intermedio de ARN derivado de 35S-GUShp93 se hibridó solamente con las sondas antisentido (C y E) pero no con la sonda sentido (D), indicando que la banda hibridante fue el fragmento del bucle.

5
10
Figura 3. Análisis de la expresión de GUS en diferentes estirpes transgénicas que contienen el gen quimérico de 35S-GUShp93 o el gen quimérico de AtU6hp93, o ambos.

Figura 4.

15
Panel A: Análisis Northern de moléculas de ARN corto en estirpes transgénicas que contienen un ARNh dirigido a la región promotora y transcrita de EIN2 (hp); un ARN sentido dirigido contra el promotor de EIN2 (s), o estirpes transgénicas que comprenden ambos tipos de transgenes (hp x s).

20
Panel B: Silenciamiento de EIN2 en diferentes estirpes transgénicas que comprenden un transgén que codifica un ARN inhibidor sentido dirigido contra la región promotora del gen endógeno EIN2 (s); en estirpes transgénicas que comprenden un transgén que codifica un ARN inhibidor bicatenario contra la región promotora del gen endógeno EIN2, así como la 5' UTR de la región codificante de ARNm del gen endógeno EIN2 (hp); y en estirpes que comprenden ambos transgenes (s x hp). Se siembran semillas en medio que contiene ACC, y se hacen crecer en la oscuridad. Cuanto más alargado estén los hipocotilos, más fuerte será el silenciamiento de la expresión del gen EIN2.

Descripción detallada de diferentes realizaciones de la invención

25
La actual invención se basa en la demostración por los inventores que exhibe una reducción de la expresión de un ácido nucleico diana particular cuando se proporciona con al menos dos moléculas de ARN inhibidor dirigidas contra el ácido nucleico diana particular, ejerciendo cada una de las moléculas de ARN inhibidor su efecto final a través de una ruta de silenciamiento génico diferente, más pronunciada y más estable que la reducción en la expresión del ácido nucleico diana observada en células vegetales provistas de solamente una de las moléculas inhibidoras.

30
En particular, se demostró que el silenciamiento génico logrado por genes quiméricos que codifican una molécula de ARN bicatenario (particularmente un ARNh) en células vegetales estaba más potenciado cuando se proporcionó una combinación de un gen quimérico que codifica un ARNh bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa II y un gen quimérico que codifica un ARNh bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa III, particularmente el promotor de tipo 3. De forma similar, se pudo observar una reducción potenciada en la expresión del ácido nucleico diana mediante la provisión de dos genes quiméricos independientes, codificando uno de los genes quiméricos un ARN inhibidor (denominado constructo de cosupresión o de silenciamiento génico sentido) dirigido contra la región promotora, y codificando el otro gen quimérico un ARN inhibidor (ARNh) dirigido también contra la región transcrita del ácido nucleico diana. Adicionalmente, se espera una reducción potenciada de la expresión a partir de la combinación de un gen quimérico que codifica microARN y un gen que codifica ARNh. También se espera que tales combinaciones serán eficaces en otras células eucariotas tales como células de animales.

40
45
En consecuencia, la invención proporciona un método para reducir la expresión de un ácido nucleico diana en una célula vegetal o planta, mediante el cual se introducen en una célula vegetal dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión de un ácido nucleico diana presente en la célula vegetal, y mediante el cual las moléculas de ARN inhibidor se procesan en oligonucleótidos de 21 a 24 nucleótidos de longitud vía diferentes rutas de procesamiento de la molécula de ARNi. Tales métodos dan inesperadamente como resultado una reducción incrementada de la expresión del ácido nucleico diana. Además, puesto que las moléculas de ARN inhibidor dan como resultado el efecto final del silenciamiento génico a través de diferentes rutas, los métodos son menos propensos a estímulos externos que interfieren con una de las rutas de procesamiento, pero no con la otra.

50
55
Como se usa aquí, "efecto del silenciamiento génico" se refiere a la "reducción de expresión de un ácido nucleico diana" en una célula vegetal, que se puede lograr introduciendo un ARN de silenciamiento. La "expresión de un ácido nucleico diana" se refiere a la transcripción del ácido nucleico en la célula, y la expresión reducida se puede observar o medir mediante un nivel reducido de producción o acumulación del transcrito o de un producto procesado, por ejemplo de un ARNm, o de un producto de traducción del ARNm. El transcrito se puede procesar o no, por ejemplo mediante eliminación de intrones, y se puede traducir o no; "expresión" engloba la transcripción con o sin tales procesos. La reducción de la expresión puede ser el resultado de la reducción de la transcripción, incluyendo vía metilación de remodelación de cromatina, o modificación post-transcripcional de las moléculas de ARN, incluyendo vía degradación del ARN, o ambas. El silenciamiento génico no se debería de interpretar necesariamente como una abolición de la expresión del ácido nucleico diana o del gen. Es suficiente que el nivel de

expresión del ácido nucleico diana en presencia del ARN de silenciamiento sea menor que en su ausencia. El nivel de expresión se puede reducir en al menos alrededor de 10%, o al menos alrededor de 15%, o al menos alrededor de 20%, o al menos alrededor de 25%, o al menos alrededor de 30%, o al menos alrededor de 35%, o al menos alrededor de 40%, o al menos alrededor de 45%, o al menos alrededor de 50%, o al menos alrededor de 55%, o al menos alrededor de 60%, o al menos alrededor de 65%, o al menos alrededor de 70%, o al menos alrededor de 75%, o al menos alrededor de 80%, o al menos alrededor de 85%, o al menos alrededor de 90%, o al menos alrededor de 95%, o al menos alrededor de 100%. Como se usa aquí, excepto que se señale lo contrario, la frase “alrededor de” se refiere a cualquier intervalo razonable a la luz del valor en cuestión. En una realización preferida, el término “alrededor de” se refiere a +/-1% del valor especificado. Como se usa aquí, “en un mayor grado” se refiere a un incremento en el efecto de al menos 10% con respecto a la referencia. Los ácidos nucleicos diana pueden incluir genes endógenos, transgenes, o genes víricos, o genes introducidos por vectores víricos. El ácido nucleico diana puede incluir además genes que se introducen de forma estable en el genoma de la célula del hospedante, preferiblemente en el genoma nuclear de la célula del hospedante.

Como se usa aquí, “ARN de silenciamiento” o “molécula de ARN de silenciamiento”, también denominados aquí como “ARN inhibidor” o “molécula de ARN inhibidor”, indica cualquier molécula de ARN que, al introducirla en una célula hospedante, preferiblemente una célula vegetal, reduce la expresión de un gen diana, particularmente a través del silenciamiento transcripcional y/o post-transcripcional. Tal ARN de silenciamiento se puede denominar, por ejemplo, “ARN antisentido”, mediante el cual la molécula de ARN comprende una secuencia de al menos 20 nucleótidos consecutivos que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia del ácido nucleico diana, preferiblemente la secuencia codificante del gen diana. Sin embargo, el ARN antisentido también se puede dirigir contra secuencias reguladoras de genes diana, incluyendo las secuencias promotoras y las señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación. El ARN de silenciamiento incluye además el denominado “ARN sentido”, mediante el cual la molécula de ARN comprende una secuencia de al menos 20 nucleótidos consecutivos que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del ácido nucleico diana. El ARN sentido también se puede dirigir a secuencias reguladoras de genes diana, incluyendo las secuencias promotoras y las señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación.

Por supuesto, el ARN sentido o antisentido mencionado puede ser más largo, y puede tener alrededor de 30 nt, alrededor de 50 nt, alrededor de 100 nt, alrededor de 200 nt, alrededor de 300 nt, alrededor de 500 nt, alrededor de 1000 nt, alrededor de 2000 nt, o incluso alrededor de 5000 nt o mayor en longitud, teniendo cada uno una identidad de secuencia global de respectivamente alrededor de 40 %, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90 % o 100% con la secuencia nucleotídica del ácido nucleico diana (o su complemento). Cuanto más larga sea la secuencia, menos restrictivo es el requisito para la identidad de secuencia global. Sin embargo, las moléculas de ARN sentido o antisentido más largas con menos identidad de secuencia global deberían comprender al menos 20 nucleótidos consecutivos que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del ácido nucleico diana o su complemento, y pueden comprender al menos 20 nucleótidos consecutivos que tienen 100% de identidad de secuencia con la secuencia del ácido nucleico diana o su complemento. La longitud del ARN sentido o antisentido puede estar entre cualquier combinación de las cifras anteriores. En una realización, preferida para uso en células de animales, particularmente células de mamíferos, la longitud del ARN sentido o antisentido está entre 20 y 30 nucleótidos. En realizaciones, la longitud del ARN sentido o antisentido es 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, o 29 nucleótidos. Cuando el ARN de silenciamiento incluye ARN tanto sentido como antisentido, la longitud de cada uno puede ser independientemente cualquier cifra como se menciona anteriormente. En una realización preferida, las longitudes de los ARN sentido y antisentido son las mismas, o difieren hasta 10% o 20%, no más.

Las dos moléculas de ARN inhibidor pueden seleccionar como diana la misma región, regiones que se solapan, o preferiblemente regiones que no se solapan del ácido nucleico diana. Como se usa aquí, “que se solapan” significa que las dos regiones se solapan con al menos 2 nucleótidos consecutivos en común. En una realización más preferida, particularmente para uso en células de animales, tales como células de mamíferos, una de las dos moléculas de ARN inhibidor es un ARN de horquilla corto, que puede estar poliadenilado, pero preferiblemente no está poliadenilado, que tiene una secuencia nucleotídica sentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica a la primera región de 20-30 nucleótidos del gen diana, y una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica al complemento de la primera región del gen diana, estando unidas covalentemente las secuencias sentido y antisentido mediante una región espaciadora de 3-20 nucleótidos, y la segunda de las dos moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN que tiene una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20-25 nucleótidos consecutivos, al menos 95% idéntica al complemento de una segunda región de 20-30 o 20-25 nucleótidos del gen diana, pero que no tiene una secuencia nucleotídica sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica a la segunda región del gen diana. La molécula de miARN puede tener o no una secuencia nucleotídica sentido de 20-30 nucleótidos consecutivos que es 60-95% idéntica en secuencia a la segunda región del gen diana. Las regiones primera y segunda del gen diana no son preferiblemente las mismas, y más preferiblemente no se solapan. Preferiblemente, el ARN de horquilla corto se expresa a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa III (ARN Pol III), y la molécula de miARN se transcribe a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN Pol II como un ARN precursor (pri-miARN o pre-microARN), que se procesa subsiguientemente en la célula.

Otro ARN de silenciamiento puede ser “ARN no poliadenilado”, que comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia del ácido

nucleico diana, tal como se describe en los documentos WO01/12824 o US6423885 (ambos documentos se incorporan aquí como referencia). Aún otro tipo de ARN de silenciamiento es una molécula de ARN como se describe en los documentos WO03/076619 o WO2005/026356 (ambos documentos se incorporan aquí como referencia) que comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del ácido nucleico diana o su complemento, y que comprende además una región enormemente bicatenaria como se describe en el documento WO03/076619 o WO2005/026356 (incluyendo regiones enormemente bicatenarias que comprenden una señal de localización nuclear a partir de un viroide del tipo de viroide del tubérculo fusiforme de la patata, o que comprende repeticiones de trinucleotídicas CUG). El ARN de silenciamiento también puede ser un ARN bicatenario que comprende una hebra sentido y antisentido como se define aquí, en el que la hebra sentido y antisentido son capaces de emparejar las bases entre sí para formar una región de ARN bicatenario (preferiblemente, los mencionados al menos 20 nucleótidos consecutivos del ARN sentido y antisentido son complementarios entre sí). La región sentido y antisentido también pueden estar presentes en una molécula de ARN, de manera que se puede formar un ARN de horquilla (ARNh) cuando la región sentido y antisentido forman una región de ARN bicatenario. El ARNh es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO99/53050, incorporado aquí como referencia). El ARNh se puede clasificar como ARNh largo, que tiene regiones sentido y antisentido largas que son enormemente complementarias, pero no necesitan ser totalmente complementarias (típicamente mayores que alrededor de 200 pb, oscilando entre 200-1000 pb). El ARNh también puede ser más bien pequeño, oscilando en tamaño desde alrededor de 30 hasta alrededor de 42 pb, pero no mucho más largo que 94 pb (véase el documento WO04/073390, incorporado aquí como referencia). Las moléculas de ARN de silenciamiento también podrían comprender el denominado microARN o moléculas de microARN sintético o artificial, o sus precursores, como se describe, por ejemplo, en Schwab et al. 2006, *Plant Cell* 18(5):1121-1133.

El ARN de silenciamiento se puede introducir directamente en la célula vegetal, o indirectamente a través de la transcripción de un "gen quimérico de silenciamiento génico" introducido en la célula vegetal. El gen quimérico de silenciamiento génico se puede introducir de forma estable en el genoma de la célula vegetal, preferiblemente genoma nuclear, o se puede introducir de forma transitoria.

Todo ARN de silenciamiento como se define aquí tiene una fase intermedia en la que la molécula de ARN de silenciamiento comprende una región de ARN bicatenario. Una "región de ARN bicatenario", como se usa aquí, tiene dos hebras de ARN que se hibridan mediante emparejamiento de bases. Las dos hebras pueden ser hebras independientes (no unidas covalentemente), o pueden estar unidas covalentemente vía una región espaciadora o de bucle como partes de un ARN autocomplementario individual. "Emparejamiento de bases", en este contexto, incluye pares de bases G:U, así como el emparejamiento de Watson-Crick estándar. El ARN monocatenario se convierte parcial o completamente en un ARN bicatenario a través de la acción de, por ejemplo, una ARN polimerasa dependiente de ARN, o la molécula de ARN inhibidor introducida o transcrita es capaz por sí misma de formar tal región de ARN bicatenario. Si el organismo eucariota contiene más de una proteína Dicer o similar a Dicer (tal como, por ejemplo, en células vegetales), las diferentes proteínas Dicer o similares a Dicer pueden tener una preferencia por los sustratos de ARN bicatenario, y también pueden diferir en longitud de los ARN interferentes cortos producidos, y es esta diferencia en el procesamiento mediante diferentes proteínas Dicer o similares a Dicer, o a través de diferentes actividades de las proteínas Dicer o similares a Dicer, lo que se denomina como "diferentes rutas de procesamiento de la molécula de ARNi". Tal diferencia en la actividad y especificidad por un sustrato de ARNbc particular se puede extender además al asociarlo con diferentes proteínas de unión a ARN bicatenario dedicadas, así como mediante la incorporación de las moléculas de ARN pequeño de interferencia generadas en diferentes complejos de RISC que comprenden diferentes proteínas similares a argonauta.

Como se usa aquí, una "proteína Dicer" es una proteína que tiene actividad de ribonucleasa que está implicada en el procesamiento de moléculas de ARN bicatenario en ARN de interferencia corto (ARNpi). La actividad de ribonucleasa se denomina actividad de ribonucleasa III, que escinde predominante o preferentemente sustratos de ARN bicatenario en vez de regiones de ARN monocatenario, seleccionando de ese modo como diana la porción bicatenaria de la molécula de ARN. Como se usa aquí, el término "predominantemente" significa al menos 51% hasta e incluyendo 100%, o que tiene mayor actividad de un tipo que de otro. El término Dicer incluye proteínas similares a Dicer (DCL). Las proteínas Dicer están implicadas preferentemente en el procesamiento de los sustratos de ARN bicatenario en moléculas de ARNpi de alrededor de 21 a 24 nucleótidos de longitud. Como se usa aquí, una proteína "dicer vegetal" o "similar a dicer" vegetal es una proteína que tiene actividad de ribonucleasa sobre sustratos de ARN bicatenario (actividad de ribonucleasa III) que se caracteriza por la presencia de al menos los siguientes dominios: un a dominio DExD o DExH (dominio DEAD/DEAH), un dominio de Helicasa-C, preferiblemente un dominio Duf283 que puede estar ausente, un dominio PAZ, dos dominios de ARNasa III, y al menos un y preferiblemente 2 dominios dsRB.

Helicasa C: El dominio que define este grupo de proteínas se encuentra en una amplia variedad de helicasas y proteínas relacionadas con helicasas. Puede ser que ésta no sea una unidad que se pliega autónomamente, sino una parte integral de la helicasa (PF00271; IPR001650).

Dominio PAZ: Este dominio se nombra tras las proteínas Piwi Argonaut y Zwillie. También se encuentra en la proteína CAF de *Arabidopsis thaliana*. La función del dominio es desconocida, pero se ha encontrado en la región media de un número de miembros de la familia de proteínas Argonauta, que también contiene el dominio Piwi en su

región C-terminal. Varios miembros de esta familia han estado implicados en el desarrollo y mantenimiento de células madre a través de los mecanismos de represión génica mediada por ARN asociados con la proteína Dicer. (PF02170; IPR003100)

5 Duf283: Este dominio putativo se encuentra en miembros de la familia de proteínas Dicer. Esta proteína es una ARNbc nucleasa que está implicada en ARNi y procedimientos relacionados. Este dominio de alrededor de 100 aminoácidos no tiene función conocida, pero contiene 3 ligandos de cinc posibles. (PF03368, IPR005034).

10 DExD: Los miembros de esta familia incluyen las helicasas de la caja DEAD y DEAH. Las helicasas están implicadas en el desenrollamiento de ácidos nucleicos. Las helicasas de la caja DEAD están implicadas en diversos aspectos del metabolismo del ARN, incluyendo transcripción nuclear, preayuste de ARNm, biogénesis de ribosomas, transporte nucleocitoplásmico, traducción, degradación del ARN y expresión génica organular (PF00270, IPR011545).

ARNasa III: firma de las proteínas ribonucleasa III (PF00636, IPR000999)

15 DsRB (motivo de unión a ARN bicatenario): Secuencias reunidas para semillas mediante el motivo putativo HMM_iterative_training compartido por proteínas que se unen a ARNbc. Al menos algunas proteínas DSRM parecen unirse a dianas de ARN específicas. Ejemplificadas por Staufen, que está implicada en la localización de al menos cinco ARNm diferentes en el embrión prematuro de Drosophila. También en seres humanos mediante proteína cinasa inducida por interferón, que es parte de la respuesta celular a ARNbc (PF00035, IPR001159).

20 Estos dominios se pueden reconocer fácilmente mediante búsquedas basadas en ordenador usando, por ejemplo, los perfiles de PROSITE PDOC50821 (dominio PAZ), PDOC00448 (dominio de ARNasa III), PDOC50137 (dominio de dsRB) y PDOC00039 (dominio DExD/DexH) (PROSITE está disponible en www.expasy.ch/prosite). Como alternativa, se puede usar la base de datos y el algoritmo de BLOCKS (blocks.fhcr.org) para identificar los dominios PAZ(IPB003100) o DUF283(IPB005034). También están disponibles otras bases de datos y algoritmos (pFAM: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/> INTERPRO: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; los números PF citados anteriormente se refieren a la base de datos pFAM y al algoritmo, y los números IPR se refieren a la base de datos pFAM y al algoritmo de INTERPRO).

30 Típicamente, en plantas, una proteína DCL2 procesará ARN bicatenario en moléculas de ARN de interferencia corto de alrededor de 22 nucleótidos, una proteína DCL3 procesará ARN bicatenario en moléculas de ARN de interferencia corto de alrededor de 24 nucleótidos, y una proteína DCL4 procesará ARN bicatenario en moléculas de ARN de interferencia corto de alrededor de 21 nucleótidos. DCL1 está implicada en el procesamiento de los microARN a partir de moléculas pre-microARN. Sin pretender limitar la invención a un modo particular de acción, se piensa generalmente que los oligonucleótidos de 24 nucleótidos de longitud median la metilación y el modelado de cromatina, mientras que los oligonucleótidos de 21 y 22 nucleótidos de longitud median típicamente la degradación del ARN específica de la secuencia (tanto en combinación con otras proteínas como polipéptidos).

35 Las proteínas similares a dicer son bien conocidas en la técnica. Las enzimas similares a dicer 3 son aquellas que codifican una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de 60% o al menos alrededor de 65% o al menos alrededor de 70% o al menos alrededor de 75% o al menos alrededor de 80% o al menos alrededor de 85% o al menos alrededor de 90% o al menos alrededor de 95% de identidad de secuencia, o que son esencialmente idénticas a las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos disponible de las bases de datos con los siguientes números de acceso: NP_189978.

40 Las proteínas similares a dicer 4 son aquellas que codifican una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de 60% o 65% o 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% de identidad de secuencia, o que son esencialmente idénticas a las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos disponible de las bases de datos con los siguientes números de acceso: AAZ80387; P84634.

45 Las proteínas similares a dicer 2 son aquellas que codifican una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de 60% o 65% o 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% de identidad de secuencia, o que son esencialmente idénticas a las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos disponible de las bases de datos con los siguientes números de acceso: NP_001078101.

50 Las proteínas similares a dicer 1 son aquellas que codifican una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de 60% o 65% o 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% de identidad de secuencia, o que son esencialmente idénticas a las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos disponible de las bases de datos, por ejemplo con los siguientes números de acceso: Q9SP32.

55 En Lamontagne et al., Mol Cell Biol. febrero de 2000; 20(4): 1104-1115, por ejemplo, se describe un ensayo enzimático que se puede usar para detectar la actividad enzimática de ARNasa III. Los productos de escisión resultantes se pueden analizar posteriormente según los métodos estándar en la técnica para la generación de los ARNpi de 21-24 nt.

Para los fines de la invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos

relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias alineadas óptimamente que tienen restos idénticos (x100) dividido entre el número de posiciones comparadas. Un espacio, es decir, una posición en un alineamiento en el que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra se considera como una posición con restos no idénticos. El alineamiento de las dos secuencias se lleva a cabo mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch 1970). El alineamiento de secuencias asistido por ordenador anterior se puede llevar a cabo convenientemente usando un programa de software estándar, tal como GAP, que es parte del Wisconsin Package Versión 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), usando la matriz de puntuación por defecto con una penalización de creación de espacio de 50 y una penalización de extensión de salto de 3. Las secuencias se indican como “esencialmente similares” cuando tal secuencia tiene una identidad de secuencia de al menos alrededor de 75%, particularmente al menos alrededor de 80%, más particularmente al menos alrededor de 85%, bastante particularmente alrededor de 90%, especialmente alrededor de 95%, más especialmente alrededor de 100%, muy especialmente son idénticas. Está claro que cuando las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con las secuencias de ADN, se considera que la timina (T) en la secuencia de ADN es igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. De este modo, cuando en esta solicitud se señala que una secuencia de 19 nucleótidos consecutivos tiene al menos 94% de identidad de secuencia con una secuencia de 19 nucleótidos, esto significa que al menos 18 de los 19 nucleótidos de la primera secuencia son idénticos a 18 de los 19 nucleótidos de la segunda secuencia.

De este modo, la invención proporciona métodos para reducir la expresión de un ácido nucleico diana en una célula vegetal (o planta u organismo eucariota) mediante la introducción de al menos dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión del mismo ácido nucleico diana presente en la célula vegetal, por lo cual una de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1 o una ARNasa similar, mientras que la otra de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o una ARNasa similar. Sin pretender limitar la invención, tal método se puede llevar a cabo introduciendo en una célula un microARN dirigido contra el ácido nucleico de interés y un ARN de horquilla bicatenario, particularmente un ARNh más largo (que comprende, por ejemplo, una región de ARN bicatenario de al menos 50, 60, 90, 120, 150, 300 nucleótidos), dirigido contra el mismo ácido nucleico de interés.

Este documento también describe métodos para reducir la expresión de un ácido nucleico diana en una célula vegetal (o planta) mediante la introducción de al menos dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión del mismo ácido nucleico diana presente en la célula vegetal, por lo que una de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL3 o una ARNasa similar, mientras que la otra de las moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o una ARNasa similar. Sin pretender limitar la invención, tal método se puede llevar a cabo introduciendo en una célula un ARN inhibidor dirigido contra las regiones reguladoras de un gen diana (tal como la región promotora), mientras que el otro ARN inhibidor se dirige contra la región transcrita del gen diana. De otro modo, tal método se puede llevar a cabo proporcionando a la célula dos genes quiméricos que codifican el ARN inhibidor, dirigiéndose la expresión de un gen quimérico mediante un promotor reconocido por una ARN polimerasa II dependiente de ADN, mientras que la expresión del otro gen quimérico está dirigida por un promotor reconocido por una ARN polimerasa III dependiente de ADN, tal como un promotor del subtipo 3.

De forma similar, se describen otras combinaciones de ARN inhibidor, tales como:

- Un ARN inhibidor escindido predominantemente mediante DCL1 o una ARNasa similar, y un ARN inhibidor escindido predominantemente por DCL2 o una ARNasa similar;
- Un ARN inhibidor escindido predominantemente mediante DCL1 o una ARNasa similar, y un ARN inhibidor escindido predominantemente por DCL3 o una ARNasa similar;
- Un ARN inhibidor escindido predominantemente mediante DCL2 o una ARNasa similar, y un ARN inhibidor escindido predominantemente por DCL3 o una ARNasa similar;
- Un ARN inhibidor escindido predominantemente mediante DCL2 o una ARNasa similar, y un ARN inhibidor escindido predominantemente por DCL4 o una ARNasa similar.

Como se usa aquí, el término “promotor” significa cualquier ADN que es reconocido y es unido (directa o indirectamente) mediante una ARN polimerasa dependiente de ADN durante el inicio de la transcripción. Un promotor incluye el sitio de iniciación de la transcripción, y sitios de unión para factores de iniciación de la transcripción y para ARN polimerasa, y puede comprender otros diversos sitios (por ejemplo, potenciadores), a los cuales se pueden unir las proteínas reguladoras de la expresión génica.

La expresión “región reguladora”, como se usa aquí, significa cualquier ADN que está implicado en conducir la transcripción y controlar (es decir, regular) el momento y nivel de transcripción de una secuencia de ADN dada, tal como un ADN que codifica una proteína o polipéptido. Por ejemplo, una secuencia reguladora de 5' (o “región promotora”) es una secuencia de ADN situada en dirección 5' (es decir, 5') de una secuencia codificante, y que comprende el promotor y la secuencia líder no traducida de 5'. Una región reguladora de 3' es una secuencia de ADN situada en dirección 3' (es decir, 3') de la secuencia codificante, y que comprende señales de terminación (y/o

regulación) de la transcripción adecuadas, incluyendo una o más señales de poliadenilación.

En una realización de la invención, el promotor es un promotor reconocido por ARN polimerasa II. Los promotores de ARN PolIII incluyen los promotores más habitualmente conocidos. En otra realización de la invención, el promotor es un promotor reconocido por ARN polimerasa III. Como se usa aquí, "un promotor reconocido por la ARN polimerasa III dependiente de ADN" es un promotor que dirige la transcripción de la región asociada del ADN a través de la acción de polimerasa de la ARN polimerasa III. Éstos incluyen genes que codifican ARN 5S, ARNt, ARN 7SL, ARNnp U6, y unos pocos ARN estables pequeños, muchos implicados en el procesamiento del ARN. La mayoría de los promotores usados por Pol III requieren elementos de secuencia en dirección 3' de +1, en la región transcrita. Sin embargo, una minoría de moldes de pol III carecen de cualquier requisito de elementos promotores intragénicos. Éstos se denominan como promotores de tipo 3. En otras palabras, los "promotores de Pol III de tipo 3" son aquellos promotores que son reconocidos por ARN polimerasa III y contienen todos los elementos que actúan en cis, que interaccionan con la ARN polimerasa III en dirección 5' de la región normalmente transcrita por ARN polimerasa III. Tales promotores de Pol III de tipo 3 se pueden combinar así fácilmente en un gen quimérico con una región heteróloga, cuya transcripción se desea, tal como las regiones codificantes de ARNbc de la actual invención.

Típicamente, los promotores de Pol III de tipo 3 contienen una caja TATA (situada entre -25 y -30 en el gen de ARNnp U6 humano) y un elemento de secuencia proximal (PSE; situado entre -47 y -66 en el ARNnp U6 humano). También pueden contener un Elemento de Secuencia Distal (DSE; situado entre -214 y -244 en ARNnp U6 humano).

Los promotores de Pol III de tipo 3 se pueden encontrar asociados, por ejemplo, con los genes que codifican ARN 7SL, ARNnp U3 y ARNnp U6. Tales secuencias se han aislado de Arabidopsis, arroz y tomate, y se pueden encontrar en bases de datos de secuencias nucleotídicas bajo las entradas para el gen de A. thaliana AT7SL-1 para ARN 7SL (X72228), el gen de A. thaliana AT7SL-2 para ARN 7SL (X72229), el gen de A. thaliana AT7SL-3 para ARN 7SL (AJ290403), el gen de Humulus lupulus H17SL-1 (AJ236706), el gen de Humulus lupulus H17SL-2 (AJ236704), el gen de Humulus lupulus H17SL-3 (AJ236705), el gen de Humulus lupulus H17SL-4 (AJ236703), el gen de A. thaliana de ARNnp U6-1 (X52527), el gen de A. thaliana de ARNnp U6-26 (X52528), el gen de A. thaliana de ARNnp U6-29 (X52529), el gen de A. thaliana de ARNnp U6-1 (X52527), el gen de Zea mays de ARNnp U3 (Z29641), el gen de Solanum tuberosum de ARNnp U6 (Z17301; X 60506; S83742), el gen de tomate de ARN nuclear pequeño U6 (X51447), el gen de A. thaliana de ARNnp U3C (X52630), el gen de A. thaliana de ARNnp U3B (X52629), el promotor de Oryza sativa de ARNnp U3 (X79685), el gen del tomate de ARN nuclear pequeño U3 (X14411), el gen de Triticum aestivum de ARNnp U3 (X63065), el gen de Triticum aestivum de ARNnp U6 (X63066).

No hace falta decir que los promotores de Pol III de tipo 3 variantes se pueden aislar de otras variedades de tomate, arroz o Arabidopsis, o de otras especies vegetales, con poca experimentación. Por ejemplo, se pueden aislar bibliotecas de clones genómicos de tales plantas usando como sonda secuencias codificantes de ARNnp U6, ARNnp U3 o ARN 7SL (tales como las secuencias codificantes de cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente identificadas mediante su número de acceso, y adicionalmente la secuencia codificante de ARNnp U6 de Vicia faba (X04788), el ADN de maíz para ARNnp U6 (X52315), o el ADN de maíz para ARN 7SL (X14661)), y las secuencias en dirección 5', preferiblemente en la dirección 5' de alrededor de 300 a 400 pb de las regiones transcritas, se pueden aislar y usar como promotores de Pol III de tipo 3. Como alternativa, para aislar las secuencias genómicas, incluyendo las secuencias promotoras adyacentes a regiones transcritas conocidas, se pueden usar técnicas a base de PCR, tales como PCR inversa o PCR TAIL®. Además, cualquiera de las secuencias de los promotores de PolIII de tipo 3 anexas, o de las secuencias promotoras mencionadas anteriormente, identificadas mediante sus números de acceso, se pueden usar como sondas en condiciones de hibridación restrictivas o como una fuente de información para generar cebadores de PCR para aislar las secuencias promotoras correspondientes de otras variedades o especies vegetales.

"Condiciones de hibridación restrictivas", como se usa aquí, significa que la hibridación se producirá generalmente si hay al menos 95%, y preferiblemente al menos 97% de identidad de secuencia entre la sonda y la secuencia diana. Los ejemplos de condiciones de hibridación restrictivas son incubación durante toda la noche en una disolución que comprende 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), disolución de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano, y 20 µg/ml de ADN portador desnaturalizado y cizallado, tal como ADN de esperma de salmón, seguido del lavado del soporte de hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Otras condiciones de hibridación y de lavado son bien conocidas, y se ejemplifican en Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente el capítulo 11.

Aunque los promotores de Pol III de tipo 3 no tienen ningún requisito de elementos que actúan en cis situados en la región transcrita, está claro que las secuencias normalmente situadas en dirección 3' del sitio de iniciación de la transcripción se pueden incluir no obstante en los constructos quiméricos de la invención.

También se ha observado que los promotores de Pol III de tipo 3 aislados originalmente de plantas monocotiledóneas se pueden usar con buenas consecuencias tanto en células vegetales y plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas, mientras que los promotores de Pol III de tipo 3 aislados originalmente de plantas dicotiledóneas solamente se pueden usar eficientemente en células vegetales y plantas dicotiledóneas. Además, el

silenciamiento génico más eficiente se ha obtenido cuando se usaron genes quiméricos que comprenden un promotor de Pol III de tipo 3 derivado de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas.

5 Típicamente, las regiones terminadoras para la transcripción mediada por PolIII polimerasa constituyen un tramo de oligo dT, un tramo de restos T consecutivos que comprenden al menos 4 restos de T, pero obviamente puede contener más restos de T.

En una realización de la invención, el promotor es un promotor constitutivo. En otra realización de la invención, la actividad promotora está potenciada por estímulos externos o internos (promotor inducible), tal como, pero sin limitarse a, hormonas, compuestos químicos, impulsos mecánicos, condiciones de estrés abiótico o biótico. La actividad del promotor también se puede regular de una manera temporal o espacial (promotores específicos de los tejidos; promotores regulados mediante el desarrollo).

En una realización particular de la invención, el promotor es un promotor expresable en una planta. Como se usa aquí, la expresión "promotor expresable en una planta" significa una secuencia de ADN que es capaz de controlar (iniciar) transcripción en una célula vegetal. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal, es decir, ciertos promotores de origen vírico o bacteriano tal como el CaMV35S (Hapster et al., 1988 Mol. Gen. Genet. 212, 182-190), el promotor del virus del trébol subterráneo nº 4 o nº 7 (documento WO9606932), o los promotores del gen de ADN-T, pero también los promotores específicos de tejidos o promotores específicos de órganos, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores específicos de semillas (por ejemplo, documento WO89/03887), promotores específicos de los primordios de un órgano (An et al., 1996 The Plant Cell 8, 15-30), promotores específicos del tallo (Keller et al., 1988 EMBO J. 7: 3625-3633), promotores específicos de la hoja (Hudspeth et al., 1989 Plant Mol Biol 12: 579-589), promotores específicos del mesófilo (tales como los promotores Rubisco inducibles por la luz), promotores específicos de la raíz (Keller et al., 1989 Genes Devel. 3: 1639-1646), promotores específicos del tubérculo (Keil et al., 1989 EMBO J. 8: 1323-1330), promotores específicos del tejido vascular (Peleman et al., 1989 Gene 84: 359-369), promotores selectivos del estambre (documentos WO 89/10396, WO 92/13956), promotores específicos de la zona de dehiscencia (documento WO 97/13865), y similares.

La invención también contempla el uso de moléculas de microARN artificiales o hechas por el hombre, en combinación con un ARN inhibidor procesado predominantemente vía una ruta de procesamiento de ARNi diferente de la ruta de procesamiento de microARN. En plantas, esto se refiere a una ruta de procesamiento de ARNi diferente de la actividad de ARNasa III de proteína similar a Dicer 1. La generación de moléculas de microARN artificiales dirigidas contra un ácido nucleico diana particular ya está bastante consolidado en la técnica.

Como se usa aquí, un "miARN" es una molécula de ARN de alrededor de 20 a 22 nucleótidos de longitud que se puede cargar en un complejo de RISC y dirige la escisión de otra molécula de ARN, en el que la otra molécula de ARN comprende una secuencia nucleotídica esencialmente complementaria a la secuencia nucleotídica de la molécula de miARN, por lo que se pueden producir uno o más de los siguientes emparejamientos erróneos:

- 35 • un emparejamiento erróneo entre el nucleótido en el extremo 5' de dicho miARN y la secuencia nucleotídica correspondiente en la molécula de ARN diana;
- un emparejamiento erróneo entre uno cualquiera de los nucleótidos en la posición 1 a la posición 9 de dicho miARN y la secuencia nucleotídica correspondiente en la molécula de ARN diana;
- 40 • tres emparejamientos erróneos entre uno cualquiera de los nucleótidos en la posición 12 a la posición 21 de dicho miARN y la secuencia nucleotídica correspondiente en la molécula de ARN diana, con la condición de que no haya más de dos emparejamientos erróneos consecutivos.
- No se permite ningún emparejamiento erróneo en las posiciones 10 y 11 del miARN (todas las posiciones de miARN se indican partiendo del extremo 5' de la molécula de miARN).

Un miARN se procesa a partir de una molécula de "pre-miARN" mediante proteínas, tales como proteínas DCL, presentes en cualquier célula vegetal y cargadas en un complejo de RISC, en el que puede guiar la escisión de las moléculas de ARN diana.

Las moléculas de pre-microARN se procesan habitualmente a partir de moléculas de pri-microARN (transcritos primarios). En animales, la maduración de microARN se inicia mediante el complejo de Drosha-DGCR8 mediante escisión precisa de los tallos-bucles que están embebidos en los transcritos primarios. Los segmentos de ARN monocatenario que flanquean el pre-microARN son importantes para el procesamiento del pri-miARN en el premiARN. El sitio de escisión parece que está determinado por la distancia de la unión del tallo-ARNmc (Han et al. 2006, Cell 125, 887-901, 887-901).

Como se usa aquí, una molécula de "pre-miARN" es una molécula de ARN de alrededor de 100 a alrededor de 200 nucleótidos, preferiblemente alrededor de 100 a alrededor de 130 nucleótidos, que puede adoptar una estructura secundaria que comprende un tallo de ARN bicatenario y un bucle de ARN monocatenario, y que comprende además la secuencia nucleotídica del miARN (y su secuencia complemento) en el tallo del ARN bicatenario.

Preferiblemente, el miARN y su complemento están situados alrededor de 10 a alrededor de 20 nucleótidos desde los extremos libres del tallo de ARN bicatenario de miARN. La longitud y la secuencia de la región del bucle monocatenaria no son críticas, y pueden variar considerablemente, por ejemplo entre 30 y 50 nt en longitud. Preferiblemente, la diferencia en energía libre entre la estructura de ARN no emparejado y emparejado está entre -20 y -60 kcal/mol, particularmente alrededor de -40 kcal/mol. La complementariedad entre el miARN y el miARN* no necesita ser perfecta, y se pueden tolerar alrededor de 1 a 3 protuberancias de nucleótidos sin emparejar. La estructura secundaria adoptada por una molécula de ARN se puede predecir mediante algoritmos de ordenador convencionales en la técnica, tal como mFOLD. La hebra particular del tallo de ARN bicatenario del pre-miARN, que se libera mediante la actividad de DCL y se carga en el complejo de RISC, se determina mediante el grado de complementariedad en el extremo 5', con lo que la hebra que en su extremo 5' es la menos implicada en el enlazamiento de hidrógeno entre los nucleótidos de las diferentes hebras del tallo de ARNbc escindido se carga en el complejo de RISC y determinará la especificidad de secuencia de la degradación de la molécula de ARN diana. Sin embargo, si empíricamente la molécula de miARN procedente de una molécula de pre-miARN sintético particular no es funcional (debido a que la hebra "errónea" se carga en el complejo de RISC), inmediatamente será evidente que este problema se puede resolver intercambiando la posición de la molécula de miARN y su complemento en las hebras respectivas del tallo de ARNbc de la molécula de pre-miARN. Como se sabe en la técnica, la unión entre A y U que implica dos enlaces de hidrógeno, o G y U que implica dos enlaces de hidrógeno, es menos fuerte que entre G y C, que implica tres enlaces de hidrógeno.

Las moléculas de miARN de origen natural pueden estar comprendidas en sus moléculas de pre-miARN de origen natural, pero también se pueden introducir en armazones de moléculas de pre-miARN existentes intercambiando la secuencia nucleotídica de la molécula de miARN normalmente procesada de tal molécula de pre-miARN existente por la secuencia nucleotídica de otro miARN de interés. El armazón del pre-miARN también puede ser completamente sintético. Igualmente, las moléculas de miARN sintéticas pueden estar comprendidas en, y procesarse a partir de, armazones de moléculas de pre-miARN existentes o armazones de pre-miARN sintéticos. De forma interesante, se ha observado que algunos armazones de pre-miARN pueden ser preferidos con respecto a otros por su eficiencia para ser procesados correctamente en los microARN designados, particularmente cuando se expresan como un gen quimérico en el que otras regiones de ADN, tales como secuencias líder no traducidas o regiones de terminación de la transcripción y de poliadenilación, se incorporan en el transcrito primario, además del pre-microARN. En particular, se ha encontrado que la transcripción de un transcrito primario que comprende un pre-microARN y otras regiones más o menos complementarias puede interferir con el procesamiento correcto del transcrito primario en pre-microARN, y finalmente en el micro-ARN designado. Otros armazones de pre-microARN, tales como, por ejemplo, premicroARN398, pueden ser menos propensos a tal procesamiento incorrecto. Se espera que la presencia de una o más regiones monocatenarias no estructuradas, en una localización fija particular desde el sitio de escisión de la molécula de pre-miARN en una región global de ARN mayoritariamente bicatenaria, influya en el procesamiento correcto de las moléculas de pre-miARN designadas, y contribuya al hecho de que, por ejemplo, el procesamiento de armazones derivados de pre-miR398 del transcrito primario sea menos propenso a errores que, por ejemplo, el procesamiento de armazones derivados de pre-miR171 de transcritos primarios.

Estará inmediatamente claro para el experto que la presencia de secuencias adicionales puede tener una influencia sobre el plegamiento de la molécula de ARN del transcrito primario en una estructura de ARN secundaria, y particularmente en la presencia y localización de protuberancias o estructuras de ARN monocatenarias en (sub)estructuras de tallo de ARN de otro modo bicatenario. La localización de estructuras de ARN monocatenario o de protuberancias con respecto al pre-miARN, es decir, la distancia en nucleótidos, se debería mantener cuidadosamente. Las estructuras de ARN secundarias para una secuencia nucleotídica de ARN particular se pueden predecir fácilmente usando herramientas de software y algoritmos bien conocidos en la técnica, tal como MFOLD (Zucker et al. 2003 *Nucleic Acids Research* 31, 3406-3415). Además, está dentro de la pericia de la técnica diseñar o modificar un nucleótido sustituyendo nucleótidos en una secuencia nucleotídica, de manera que los nucleótidos recientemente introducidos exhiben más o menos complementariedad con otra parte de la secuencia nucleotídica, y de este modo influyen en la generación de bucles de ARN bicatenario o de protuberancias de ARN monocatenario.

También es un objeto de la invención proporcionar células vegetales o plantas que contienen la combinación de moléculas de ARN inhibidor según la invención. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención los gametos, semillas, embriones, ya sea cigóticos o somáticos, la progenie o los híbridos de las plantas que comprenden la combinación de moléculas de ARN inhibidor de la presente invención, que se producen mediante métodos de reproducción tradicionales.

Como se usa aquí, "molécula de ARNbc introducida artificialmente" se refiere a la introducción directa de una molécula de ARNbc, que puede ocurrir, por ejemplo, exógena o endógenamente mediante transcripción de un gen quimérico que codifica tal molécula de ARNbc; sin embargo, no se refiere a la conversión de una molécula de ARN monocatenario en un ARNbc en el interior de la célula vegetal.

Se cree que los métodos y medios descritos aquí son adecuados para todas las células vegetales y plantas, gimnospermas y angiospermas, células vegetales y plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, incluyendo, pero sin limitarse a, *Arabidopsis*, alfalfa, cebada, haba, maíz o maíz, algodón, lino, avena, guisante, colza, arroz, centeno, alazor, sorgo, soja, girasol, tabaco y otras especies de *Nicotiana*, incluyendo *Nicotiana benthamiana*, trigo, espárrago, remolacha, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, pepino, berenjena, lechuga,

cebolla, colza, pimiento, patata, calabaza, rábano, espinaca, calabacín, tomate, calabacín, almendra, manzana, albaricoque, banana, mora, arándano, cacao, cereza, coco, arándano rojo, dátil, uva, pomelo, guayaba, kiwi, limón, lima, mango, melón, nectarina, naranja, papaya, fruta de la pasión, melocotón, cacahuete, pera, piña, pistacho, ciruela, frambuesa, fresa, mandarina, nuez y sandía, vegetales de Brassica, caña de azúcar, vegetales (incluyendo endibia, lechuga, tomate), Lemnaceae (incluyendo especies de los géneros Lemna, Wolffia, Spirodela, Landoltia, Wolffia), y remolacha.

La introducción de genes quiméricos (o moléculas de ARN) en la célula hospedante se puede lograr mediante una variedad de métodos, incluyendo transfección mediante fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación, bombardeo con microproyectiles, microinyección en núcleos, y similares.

10 Los métodos para la introducción de genes quiméricos en plantas son bien conocidos en la técnica, e incluyen transformación mediada por *Agrobacterium*, suministro mediante pistola de partículas, microinyección, electroporación de células intactas, transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol, electroporación de protoplastos, transformación mediada por liposomas, transformación mediada por triquitos de silicio, etc. Las células transformadas obtenidas de esta manera se pueden regenerar entonces en plantas fértiles maduras.

15 También se incluyen dentro del alcance de la presente invención los gametos, semillas, embriones, progenie, híbridos de plantas que comprenden los genes quiméricos de la presente invención, que se producen mediante métodos de reproducción tradicionales.

Como se usa aquí, "la secuencia nucleotídica del gen de interés" se refiere habitualmente a la secuencia nucleotídica de la hebra de ADN que corresponde en secuencia a la secuencia nucleotídica del ARN transcrito a partir de tal gen de interés, excepto que se especifique de otro modo.

20

Estará claro que los métodos anteriores se pueden aplicar a células vegetales in vivo o in vitro.

Los siguientes Ejemplos no limitantes describen métodos y medios según la invención. Excepto que se señale de otro modo en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como se describen en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK. Otras referencias para técnicas de biología molecular estándar incluyen Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Volúmenes I y II de Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Segunda Edición, Academic Press (UK). Los materiales y métodos estándar para reacciones en cadena de la polimerasa se pueden encontrar en Dieffenbach y Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y en McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania.

25

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Combinación de genes quiméricos transcritos mediante P_{III} y transcritos mediante P_{III} dirigidos contra un gen informador (para referencia solamente).

Para evaluar si una combinación de transgenes que codifican ARN_h que comprenden uno expresado a partir de un promotor reconocido por ARN polimerasa II (por ejemplo, un promotor de CaMV35S) y otro expresado a partir de un promotor reconocido por ARN polimerasa III (por ejemplo, un promotor de AtU6) potenciaría la eficacia del silenciamiento de un gen diana, se realizaron cruces entre plantas de *Arabidopsis* que comprenden transgenes que codifican ARN inhibidor de 35S- o AtU6-PDS_h42, y se identificaron plantas de progenie que comprenden ambos transgenes, y el grado de silenciamiento del gen diana de PDS se comparó con plantas que contienen solamente uno de los transgenes. De forma similar, se realizaron cruces entre plantas de *Arabidopsis* que expresan transgenes de ARN_h de GUS dirigidos por 35S o AtU3, para comparar la eficacia de la combinación comparada con los transgenes individuales.

40

a) Genes quiméricos

Las estirpes transgénicas de *Arabidopsis* que comprenden los transgenes de PDS_h42 dirigido por 35S o AtU6 y de hpGUS dirigido por 35S o AtU3 se han descrito con detalle en el documento WO2004/073390 (incorporado aquí como referencia; véase particularmente el Ejemplo 2 y el Ejemplo 5).

50

De forma breve, para producir los genes quiméricos de PDS_h42, se hibridaron oligonucleótidos para generar un fragmento de ADN bicatenario que cuando se transcribiera produciría un transcrito de ARN que tiene autocomplementariedad (regiones sentido y antisentido de complementariedad, cada una de 42 nucleótidos), de manera que el transcrito al plegarse tuvo una región bicatenaria (dúplex) de 42 pares de bases contiguos unidos mediante un bucle monocatenario de 9 nt. La secuencia nucleotídica de la región sentido correspondió a parte de la secuencia (nucleótidos 1570 a 1611 de AT4G14210.2 disponible en

55

<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT4G14210>) del gen de fitoeno-desaturasa de *Arabidopsis*, y la región antisentido correspondió al complemento de los 42 nucleótidos. El fragmento de ADN se enlazó operablemente a una secuencia promotora de CaMV35S y una región terminal de 3' de octopina sintasa (señal de terminación de la transcripción/poliadenilación), o a un promotor del gen de ARN pequeño U6 de *A. thaliana* y una secuencia oligo dT (8 T) que fue capaz de funcionar como un terminador de la transcripción para un promotor de tipo Pol III. Cuando los constructos de silenciamiento se transfirieron a *A. thaliana*, la disminución eficaz de la expresión del gen de PDS endógeno dio como resultado el hecho de que las hojas exhibiesen un fotoblanqueamiento (véase, por ejemplo, la Figura 1B). El grado de fotoblanqueamiento fue indicativo del grado de silenciamiento génico, y por lo tanto de la eficacia del constructo o constructos de silenciamiento.

Para producir los genes quiméricos que codifican GUShp92, se sintetizó una secuencia de ADN repetida invertida de GUS que comprendió 186 nucleótidos que corresponden a la secuencia sentido del gen de GUS (nt 512-697 del ORF de GUS), fusionada en el extremo 3' con una secuencia antisentido que corresponde a los primeros 93 nucleótidos del fragmento de 186 nt (nucleótidos 512-604 del ORF de GUS). Por lo tanto, la transcripción de la secuencia repetida invertida de GUS produjo un ARN con regiones sentido y antisentido de la complementariedad, capaz de hibridarse para formar una región dúplex de 93 pares de bases, unida mediante un bucle monocatenario. Esta secuencia repetida invertida se enlazó operablemente a una secuencia promotora de CaMV35S y una región terminal de 3' de octopina sintasa, o a un promotor del gen de ARN pequeño U3 de *A. thaliana* y una secuencia oligo dT (9 T) para la terminación de la transcripción, o a un promotor del gen de ARN pequeño U6 de *A. thaliana* y una secuencia oligo dT. Cuando se transfirió a *A. thaliana* que comprende un transgén de CaMV35S-GUS como un gen diana, la eficiencia de la disminución del gen de GUS mediante los genes quiméricos que codifican ARN inhibidor o su combinación se midió usando ensayos de GUS convencionales que usan MUG como sustrato.

b) Análisis Northern

Un análisis de transferencia Northern mostró que los ARNh producidos a partir de los dos tipos de transgenes de GUShp93 se procesaron diferentemente en formas más cortas en las plantas transgénicas (Figura 2). Las estirpes 35S mostraron predominantemente la especie de 21 nt (Figura 2, panel A, líneas 1-6, panel B, líneas 1, 2, 4, 6), mientras que las estirpes U6 mostraron las especies 24 nt y/o 22 nt (Figura 2, panel A, 7-22, panel B, 8, 9, 10, 11, 12, 15-18 y 22). Además, se observaron diferencias en los patrones de las especies de procesamiento del ARN intermedias. Las estirpes de 35S-GUShp93 mostraron una especie de ARN predominante de ~90 nt, que corresponde al bucle del ARN GUShp93, mientras que las estirpes U6-GUShp93 mostraron que el fragmento predominante fue el ARN de GUShp93 de longitud completa.

De forma similar, un análisis de transferencia Northern mostró que los ARNh producidos a partir de los dos tipos de transgenes de PDSHp42 también se procesaron diferentemente en formas más cortas (Figura 1A). De hecho, las líneas 1-6 (que corresponden a plantas que comprenden el transgén conducido por el promotor de 35S) mostraron especies de ARNpi de 24 nt y 21 nt de longitud, mientras que las líneas 7-12 (que corresponden a plantas que comprenden el transgén de PDSHp42 dirigido por el promotor U6) mostraron solamente la especie de 24 nt. Además, se observaron diferencias en los patrones de la especie de procesamiento del ARN intermedia.

Tomados juntos, estos resultados indicaron que los ARNh transcritos mediante U6 y 35S se procesaron de forma diferente, siendo el transcrito conducido por U6 procesado predominantemente, si no totalmente, por la ruta de procesamiento dependiente de DCL3 y/o DCL2, mientras que el transcrito conducido por 35S se procesó predominantemente mediante las rutas de DCL4 y/o DCL3. Esto también indicó que el silenciamiento dirigido por ARNh de 35S y de AtU6 funcionó a través de diferentes rutas. Por lo tanto, se analizaron las plantas para establecer si la combinación de los dos tipos de constructos proporcionaría un silenciamiento mejorado en grado y/o duración y/o estabilidad.

c) Análisis fenotípico de plantas que comprenden ambos tipos de transgenes hp.

Plantas parentales heterocigotas que contienen el transgén 35S-PDSHp42 (masculino) se cruzaron con plantas parentales heterocigotas para el transgén AtU6-PDSHp42 (femenino), y se obtuvieron plantas de la progenie F1 que comprenden ambos transgenes y se compararon con las plantas parentales que contienen uno o el otro de los transgenes.

Estirpe PolII	Estirpe PolIII	Semilla F1 obtenida
35S-PDSHp42	AtU6-PDSHp42	35S-2 X U6-32 35S-2 X U6-36 35S-7 X U6-33 35S-7 X U6-40 35S-16 X U6-33 35S-16 X U6-40 35S-19 X U6-32 35S-19 X U6-36

En base a la intensidad del blanqueamiento de la hoja, las plantas F1 de al menos cuatro de los cruces mostraron un mayor grado de silenciamiento génico de PDS en comparación con las estirpes U6 parentales (Figura 1B).

De forma similar, las plantas que contienen los transgenes 35S-GUS_{hp93} se cruzaron con plantas que contienen el transgén AtU6-GUS_{hp93} o AtU3-GUS_{hp93}, y se obtuvo una progenie que comprende ambos transgenes. Las estirpes F2 que resultan de la autofecundación de la población F1 se identificaron mediante PCR a partir de los cruces entre las estirpes de GUS_{hp93} dirigidas por 35S y AtU3/AtU6, que contenían el transgén individual dirigido por 35S o por Pol III, o ambos tipos de transgenes. Las estirpes F2 habrían sido homocigotas o heterocigotas (segregantes) para los genes que codifican los ARN inhibidores. Aunque no se pudieron excluir en este experimento los efectos del número de copias, se pudo determinar un grado promedio de silenciamiento analizando suficientes estirpes.

Estirpe PolII	Estirpe PolIII	F1 obtenida	F2 obtenida
35S-GUS _{hp93} (pMBW479)	AtU6+20-GUS _{hp93} (pMBW488)	479-A X 488-6 488-13 X 479-1 479-1 X 488-6 479-4 X 488-1 488-1 X 479-2	479-A X 488-6 488-13 X 479-1 479-4 X 488-1 488-1 X 479-2
35S-GUS _{hp93} (pMBW479)	AtU6-GUS _{hp93} (pMBW486)	479-5 X 486-2 486-2 X 479-4	486-2 X 479-4
35S-GUS _{hp93} (pMBW479)	AtU3+136-GUS _{hp93} (pMBW480)	479-1 X 480-2 479-4 X 480-6	479-1 X 480-2
35S-GUS _{hp93} (pMBW479)	AtU3-GUS _{hp93} (pMBW481)	479-2X481-1 479-5 X 481-8	479-5 X 481-8

Las diferentes plantas transgénicas que comprenden transgenes individuales o la combinación de los mismos se analizaron para determinar la expresión de GUS. El análisis de plantas F3 procedentes de un cruce (479-A X 488-6) reveló que estas plantas parecen tener un silenciamiento más uniforme que aquellas que contienen solamente un transgén. Los resultados del ensayo de MUG para diferentes plantas F3 de un cruce 35S-GUS_{hp93} x U6-GUS_{hp93} se representan gráficamente en la Figura 3.

Las diferencias en las rutas de procesamiento usadas mediante los transcritos de PolII y PolIII estaban aparentemente relacionados no solo con los diferentes promotores usados – los promotores de PolIII son activos preferentemente en la región nucleolar del núcleo, mientras que los promotores de PolII son activos en otras regiones del núcleo – sino también con la estructura de los transcritos. Los transcritos de PolIII también contienen una porción líder en 5' derivada de la transcripción del promotor 35S que se usó para obtener el constructo, así como una región 3' UTR derivada mediante transcripción del terminador ocs de 3' que se usó, y una cola de poliA. Estas secuencias de 5' y 3' adicionales sumaron hasta 200-300 nt para el transcrito de polII producido mediante el constructo de 35S. Por el contrario, los constructos de U6 que se obtuvieron expresaron un transcrito que comprende la porción de horquilla (región dúplex más el bucle monocatenario) con una región de 5' adicional de aproximadamente 20 nt, pero sin ninguna cola de poliA. Por lo tanto, los transcritos de PolII y de PolIII se plegarían en estructuras bastante diferentes. Se piensa que los transcritos de ARN están unidos mediante proteínas de unión a ARN bicatenario (DRBP) poco después de la transcripción, y que los diferentes transcritos se pueden unir mediante diferentes DRBP, conduciendo a un acceso diferencial a proteínas DCL y a la incorporación en diferentes tipos de complejos de RISC. A su vez se esperaba que esto condujera a diferentes contribuciones al silenciamiento génico transcripcional (TGS), que implica en particular metilación de regiones promotoras, y PTGS. Se piensa que los transcritos dirigidos por PolIII que producen 24meros que corresponden a las regiones promotoras son particularmente eficaces en la mediación de TGS.

Ejemplo 2: Combinación de microARN y ARNh dirigida contra genes endógenos de PHYB

Se construyó un primer gen quimérico que codifica un ARNh inhibidor dirigido contra una región codificante de fitocromo B de *Arabidopsis* usando técnicas de ADN recombinante convencionales enlazando operablemente las siguientes regiones de ADN por orden: una región promotora, una región de ADN que, cuando se transcribe, produce una molécula de ARN sentido, que corresponde a la secuencia de la región codificante de PHYB desde el nucleótido 789 al nucleótido 809 del número de Acceso EF193580, y una molécula de ARN antisentido complementaria a la molécula de ARN sentido, y una región terminal de 3'.

Usando técnicas de ADN recombinante convencionales, se construyó un segundo gen quimérico que comprende una región transcrita que codifica un armazón de miR159 pri-microARN, en el que la región de microARN se adaptó para comprender una secuencia nucleotídica (TTATAAGTTTCATGAAGATGA) de la región codificante de PHYB, y se realizaron cambios correspondientes en la región de microARN*. La región codificante del pre-microARN se

enlazó operablemente a una región promotora expresable en planta y a una región de terminación de la transcripción.

5 Los genes quiméricos se introdujeron por separado en vectores de ADN-T, acompañados mediante un gen marcador seleccionable, y se produjeron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que comprendieron los genes quiméricos (Figura ZZ). Las plantas F1 transgénicas que comprenden ambos genes quiméricos también se generaron cruzando los transformantes iniciales. Estas plantas se autofecundaron entonces para producir la semilla F2, que se analizará para determinar el grado de silenciamiento. El grado de silenciamiento se puede determinar midiendo la longitud de los hipocotilos de plántulas que se hacen crecer a partir de la semilla bajo luz blanca. Cuanto más largos son los hipocotilos, más fuerte es el grado de silenciamiento del gen de PHYB, puesto que PHYB es un represor de la extensión de los hipocotilos bajo luz blanca.

10 Las plantas que contienen ambos transgenes exhiben un mayor grado de silenciamiento del gen de PHYB que las plantas que contienen cada uno de los transgenes por separado.

Ejemplo 3: Combinación de ARN sentido dirigido contra la región promotora de EIN2 y ARNh dirigido contra la región codificante de EIN2, y promotor (para referencia solamente).

15 Para examinar si la coexpresión de transgenes que codifican ARN sentido y que codifican ARNh introduciría un silenciamiento del promotor (TS) más fuerte que cualquier constructo solo, se produjeron dos constructos. Ambos seleccionaron como diana la región promotora del gen de EIN2 de *Arabidopsis*; sin embargo, el constructo de ARNh comprendió además parte de la región transcrita del gen de EIN2 en la porción del dúplex. Plantas transgénicas que comprenden el constructo promotor de ARNh se cruzaron con plantas que comprenden el constructo promotor sentido. El grado de silenciamiento de EIN2 se evaluó en la población F2 mediante comparación con las estirpes parentales. Los resultados indicaron que la combinación de los transgenes de EIN2 sentido y de ARNh dirigidos contra la región promotora de EIN2 produjo un mayor silenciamiento que el transgén que codifica ARNh o que codifica ARN sentido solo (Figura 2).

a) Genes quiméricos

25 Se construyó un primer gen quimérico que codifica un ARN sentido dirigido contra el promotor del gen de EIN2 usando técnicas de ADN recombinante convencionales, y comprendió las siguientes regiones de ADN enlazadas operablemente: una región promotora, una región de ADN que cuando se transcribió produjo una molécula de ARN que corresponde a nt. 1-1217 de la secuencia de longitud completa del gen de EIN2 (número de Acceso AF141202) – incluyendo parte de la región promotora (~810 pb) -, y una región terminal de 3' para el gen de octopina sintasa.

30 Se construyó un segundo gen quimérico que codifica un ARN de horquilla dirigido contra el promotor del gen de EIN2, que comprende las siguientes regiones de ADN enlazadas operablemente: una región promotora, una región de ADN que cuando se transcribe produce una molécula de ARN sentido que corresponde a la secuencia del gen de EIN2 (desde el nucleótido 1 al nucleótido 1217), que incluye parte de la región promotora y parte de la región del ADN transcrito, y una molécula de ARN antisentido complementaria a la molécula de ARN sentido, y una región terminal de 3' de ocs.

35 Los genes quiméricos se insertaron en un vector de ADN-T acompañados de un gen marcador seleccionable (neomicina fosfotransferasa o higromicina transferasa), y se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que comprenden los genes quiméricos.

b) Análisis fenotípico

40 El silenciamiento de la expresión de EIN2 se evaluará haciendo germinar semillas transgénicas que comprenden uno de los transgenes o una combinación de ambos en medio que contiene ACC (ácido aminociclopropano-1-carboxílico) en la oscuridad. Los resultados de tales ensayos se indican en la Figura 4B, indicando que el grado de silenciamiento de EIN2 se potenció en algunos de los cruces de sentidoxARNh cuando se compara con el silenciamiento logrado en las estirpes parentales.

45 c) Análisis Northern

El análisis de transferencia Northern de los ARN pequeños aislados de las plantas transgénicas mostró que los ARNpi se acumularon en presencia de los constructos dirigidos contra el promotor de EIN2 (Figura 4A), indicando que los constructos del promotor de EIN2 se obtuvieron correctamente y se expresaron apropiadamente. De forma interesante, en dos de los cuatro grupos de estirpes sentido, ARNh y sentidoxARNh analizados, los cruces de sentidoxARNh (hp-2xs-2 y hp-3xs-3, indicados por flechas) parecieron acumular más los ARNpi que sus estirpes parentales sentido (s) y ARNh (hp) correspondientes (Figura 4A). Esto fue consistente con los resultados fenotípicos para el silenciamiento de EIN2 mostrados en la Figura 4B, en la que el silenciamiento de EIN2 se potenció en algunas de las plantas de la progenie producidas a partir de los cruces de sentidoxARNh.

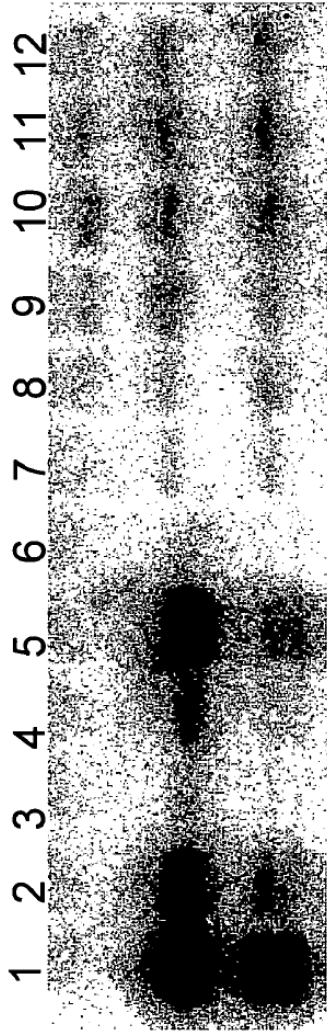
55 Una posible mejora en la estrategia de combinación de ARNh y sentido es usar promotores diferentes para conducir la expresión de transgenes de ARNh y sentido respectivamente. Esto puede minimizar el silenciamiento

transcripcional de los transgenes, lo que es más probable que ocurra si se usa el mismo promotor para ambos transgenes.

REIVINDICACIONES

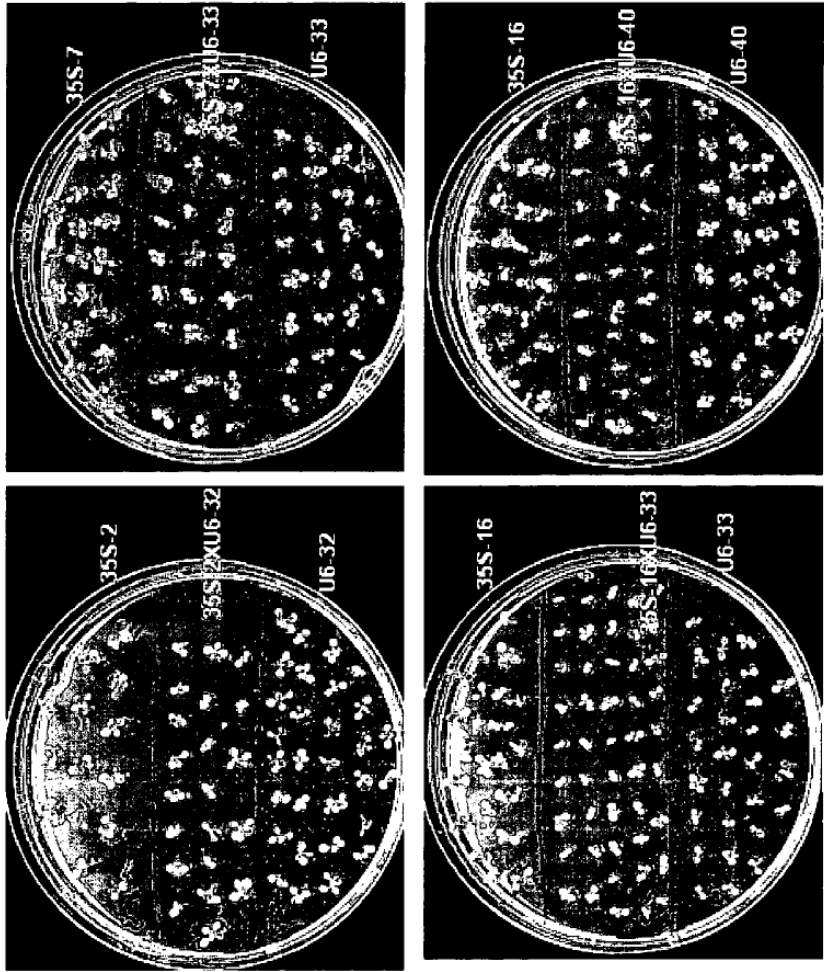
1. Un método para reducir la expresión de un ácido nucleico diana en una célula vegetal o planta, que comprende la etapa de introducir una combinación de al menos dos moléculas de ARN inhibidor cada una capaz de reducir la expresión de un primer ácido nucleico diana en dicha célula vegetal o planta,
- 5 en el que una de dichas moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1, y la otra de dichas moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2,
- y en el que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN, o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana,
- 10 y en el que dicha otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una primera y segunda región complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo dicha primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, y comprendiendo dicha segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, en el que dichas regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.
- 15
2. Un método para reducir la expresión de un primer y un segundo ácidos nucleicos diana en una célula vegetal o planta, que comprende la etapa de introducir una combinación de al menos dos moléculas de ARN inhibidor,
- 20 en el que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana en dicha célula vegetal o planta, y la otra de dichas moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del segundo ácido nucleico diana en dicha célula vegetal o planta,
- en el que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es escindida predominantemente vía DCL1, y la otra de dichas moléculas de ARN inhibidor es escindida predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2,
- 25 y en el que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN, o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en el que dicha otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una primera y segunda región complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo dicha primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer o segundo ácido nucleico diana, y comprendiendo dicha segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer o segundo ácido nucleico diana, en el que dichas regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.
- 30
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que las dos moléculas de ARN inhibidor se expresan a partir de promotores diferentes.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una de dichas moléculas de ARN inhibidor se transcribe a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa II, y dicho otro ARN inhibidor se transcribe a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa III.
- 35
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha molécula de ARN bicatenario es una horquilla corta con una secuencia nucleotídica sentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica a la primera región de 20-30 nucleótidos del gen diana, y una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica al complemento de la primera región del gen diana, estando unidas covalentemente las secuencias sentido y antisentido mediante una región espaciadora de 3-20 nucleótidos.
- 40
6. El método de la reivindicación 5, en el que la molécula de miARN tiene una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20-25 nucleótidos consecutivos, al menos 95% idéntica al complemento de una segunda región de 20-30 o 20-25 nucleótidos del gen diana, pero que tiene una secuencia nucleotídica sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos que es como máximo 60-95% idéntica en secuencia a la segunda región del gen diana.
- 45
7. El método de la reivindicación 6, en el que el ARN de horquilla corto se expresa a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa III, y la molécula de miARN se transcribe a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa II como un pri-miARN o pre-microARN.
- 50
8. Una célula vegetal que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión de un primer ácido nucleico diana en dicha célula vegetal, en la que una de dichas moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1, y la otra de dichas moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2,
- en la que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN, o

- una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en la que dicha otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una primera y segunda región complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo dicha primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, y comprendiendo dicha segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer ácido nucleico diana, en la que dichas regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.
9. Una célula vegetal que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor capaces de reducir la expresión de ácidos nucleicos diana primero y segundo en dicha célula vegetal, en la que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana en dicha célula vegetal, y la otra de dichas moléculas de ARN inhibidor es capaz de reducir la expresión del segundo ácido nucleico diana en dicha célula vegetal,
- en la que una de dichas moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL1, y la otra de dichas moléculas de ARN inhibidor se escinde predominantemente vía DCL4 o DCL3 o DCL2,
- y en la que una de dichas moléculas de ARN inhibidor es una molécula de miARN, una molécula de pre-microARN, o una molécula de pri-miARN, capaz de reducir la expresión del primer ácido nucleico diana, y en la que otra molécula de ARN inhibidor es una molécula de ARN bicatenario de horquilla que comprende una primera y segunda región complementaria o esencialmente complementaria, comprendiendo dicha primera región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica del primer o segundo ácido nucleico diana, y comprendiendo dicha segunda región de ARN al menos 19 nucleótidos consecutivos que corresponden a una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del primer o segundo ácido nucleico diana, en la que dichas regiones de ARN primera y segunda se hibridan entre sí con al menos 18 o 19 pares de bases.
10. La célula vegetal según la reivindicación 8 o 9, en la que las dos moléculas de ARN inhibidor se expresan a partir de diferentes promotores.
11. La célula vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que una de dichas moléculas de ARN inhibidor se transcribe a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa II, y dicho otro ARN inhibidor se transcribe a partir de un gen que codifica ARN inhibidor bajo el control de un promotor reconocido por ARN polimerasa III.
12. La célula vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que dicha molécula de ARN bicatenario es una horquilla corta con una secuencia nucleotídica sentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica a la primera región de 20-30 nucleótidos del gen diana, y una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos al menos 95% idéntica al complemento de la primera región del gen diana, estando unidas covalentemente las secuencias sentido y antisentido mediante una región espaciadora de 3-20 nucleótidos.
13. La célula vegetal de la reivindicación 12, en la que la molécula de miARN tiene una secuencia nucleotídica antisentido de 20-30 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20-25 nucleótidos consecutivos, al menos 95% idéntica al complemento de una segunda región de 20-30 o 20-25 nucleótidos del gen diana, pero que tiene una secuencia nucleotídica sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos que es como máximo 60-95% idéntica en secuencia a la segunda región del gen diana, en la que el ARN de horquilla corto se expresa a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa III, y la molécula de miARN se transcribe a partir de un gen quimérico que tiene un promotor de ARN polimerasa II como un pri-miARN o un pre-microARN.
14. Una planta que consiste esencial o completamente en las células según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.
15. Una composición de materia que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, capaz de reducir la expresión de un primer ácido nucleico diana en una célula vegetal, o de un primer y un segundo ácidos nucleicos diana en una célula vegetal.
16. Un kit que comprende al menos dos moléculas de ARN inhibidor como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la reducción de la expresión de un primer ácido nucleico diana en una célula vegetal, o de un primer y un segundo ácido nucleico diana en una célula vegetal.



A.

24nt—
21nt—



B.

Figura 1

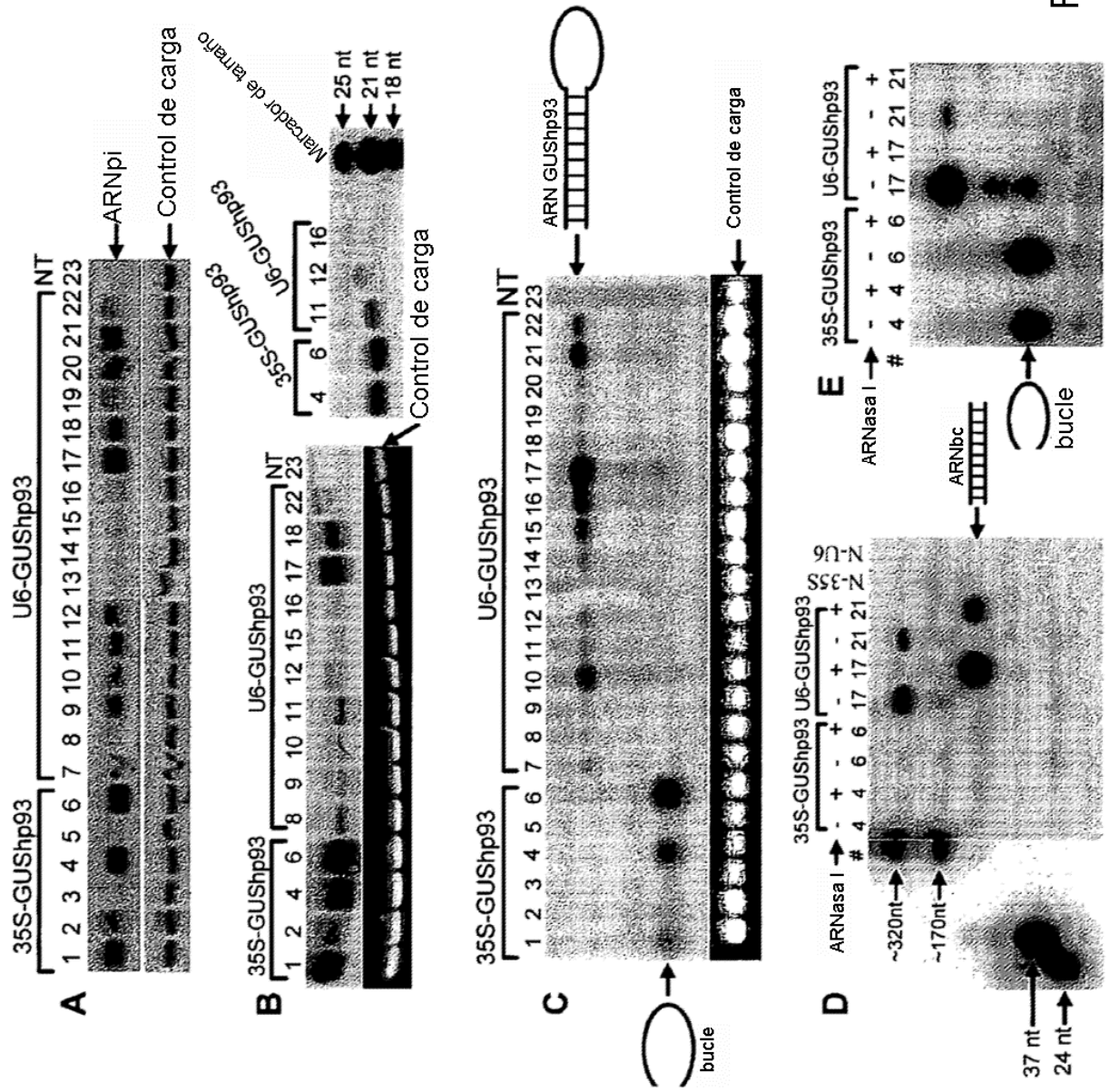


Figura 2

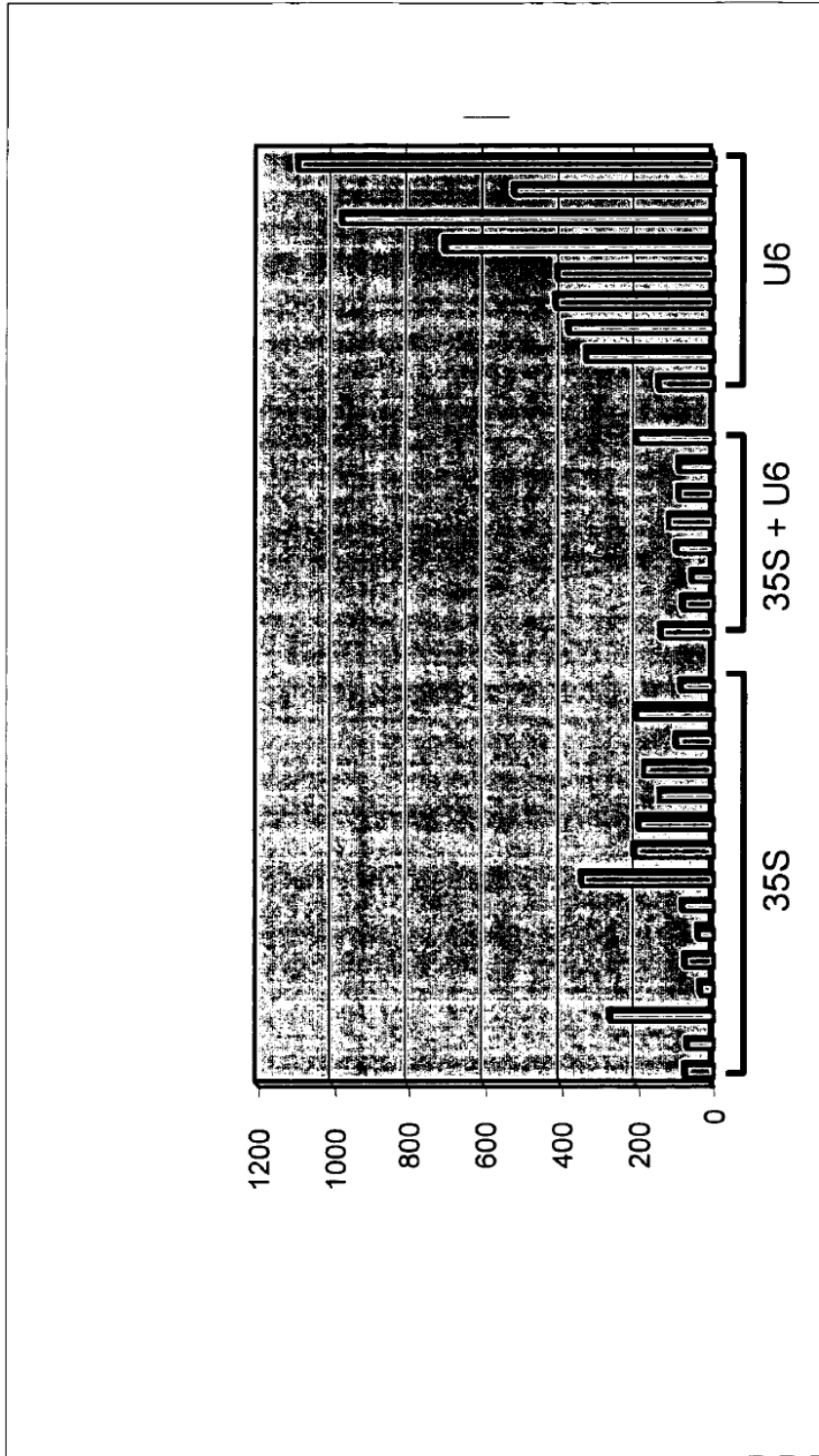


Figura 3

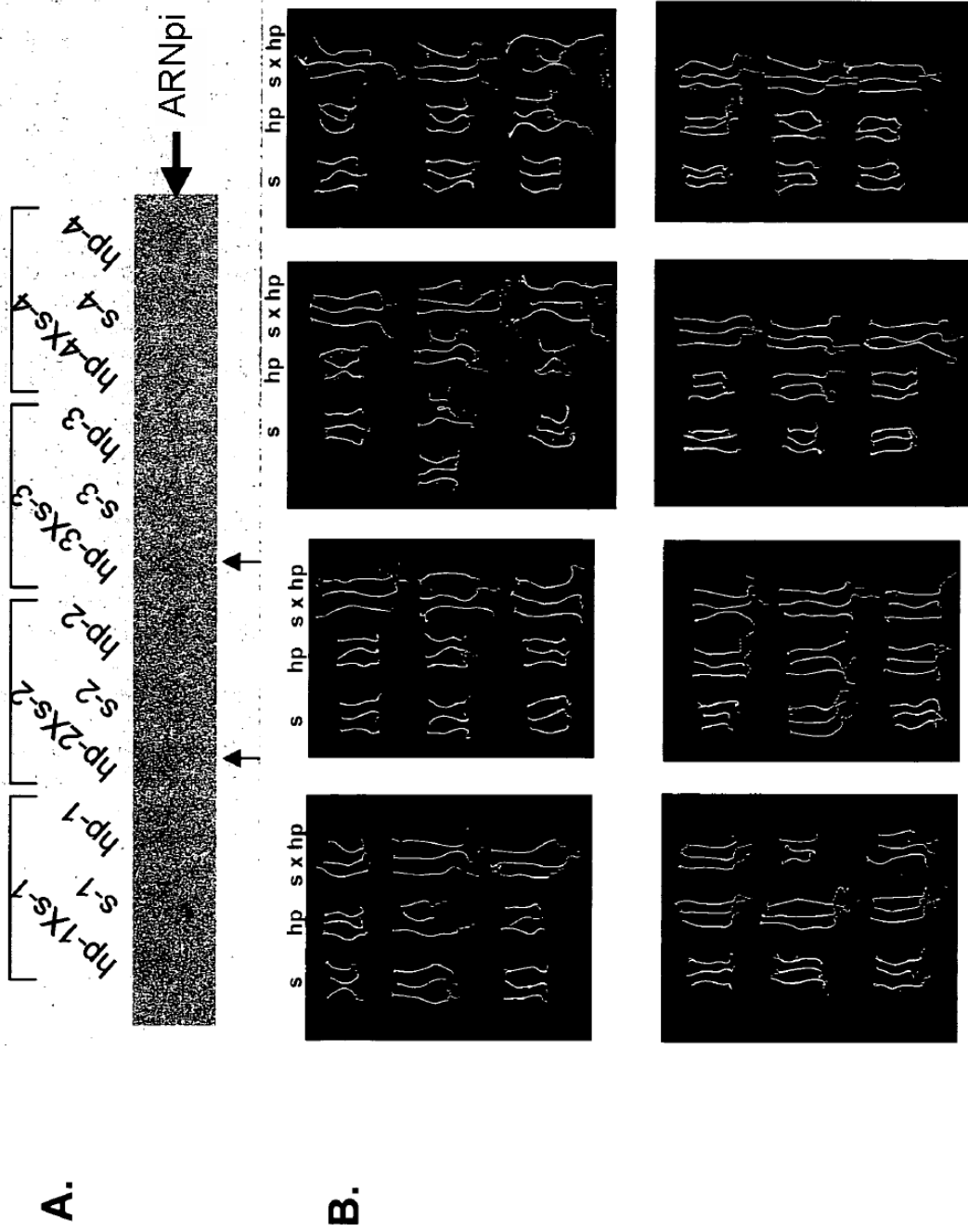


Figura 4