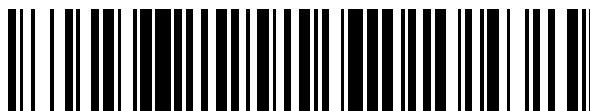


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 549**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2014 PCT/EP2014/072451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055857**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2014 E 14786886 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3058089**

54 Título: **ARN pequeños derivados de RNY como biomarcadores para trastornos relacionados con la aterosclerosis**

30 Prioridad:

18.10.2013 EP 13306439

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

12.09.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**TRABUCCHI, MICHELE;
MARTINEZ, LAURENT y
REPETTO, EMANUELA**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

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

ES 2 724 549 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

ARN pequeños derivados de RNY como biomarcadores para trastornos relacionados con la aterosclerosis

5 La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro de diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis mediante la detección de un ARN Y pequeño (s-RNY), así como al uso de un inhibidor de S-RNY como medicamento contra los trastornos relacionados con la aterosclerosis. La invención también se refiere a un procedimiento para el cribado de un compuesto adecuado para el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El descubrimiento de ARN pequeños reguladores es uno de los avances biomédicos más importantes en la historia reciente. Hasta la fecha, se han identificado tres clases principales de ARN pequeños, a saber, el microARN (miRNA), el ARN interferente pequeño (siRNA), y el ARN de interacción con piwi (piRNA). Estas clases difieren en su biogénesis, su longitud, y su distribución en los tejidos (Ghildiyal, M., y Zamore, PD (2009) Nat Rev Genet 10, 94-108; Kim, VN et al (2009) Nature Reviews 10, 126-139). Los miRNA tienen ~ 22 nucleótidos (nt) de longitud y se generan a partir de transcritos primarios en forma de horquilla mediante dos etapas de procesamiento secuencial mediadas por una endonucleasa ARNasa III nuclear (Drosha) y citoplasmática (Dicer). Los miRNA están cargados en RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), cuyo componente principal es Argonaute 2 (Ago2), para mediar el bloque de degradación y/o traducción de ARN mensajero de dianas específicas (ARNm) a través de la complementariedad de secuencias parciales por emparejamiento de bases de Watson-Crick (Fabian, MR, et al. (2010). Annual review of biochemistry 79, 351-379). Los miRNAs se expresan ubicuamente y controlan una amplia gama de actividades celulares, incluyendo el desarrollo, la función inmunitaria y la muerte celular (Fabian, MR, et al. (2010). Annual review of biochemistry 79, 351-379). Los siRNAs derivan de ARN de doble cadena que son procesados por Dicer en ARN pequeños de 19 nt. Los siRNAs también se incorporan en RISC para silenciar la post-transcripcionalmente los ARNm diana específicos en células madre (Ghildiyal, M., y Zamore, PD (2009). Nat Rev Genet 10, 94-108). Los piRNAs derivan de ARN de una cadena que son procesados por un mecanismo poco entendido en ARN pequeños de 24-30 nt. Los piRNAs median el silenciamiento génico epigenético y post-transcripcional de retrotransposones y otros elementos genéticos en las células germinales (Ghildiyal, M., y Zamore, PD (2009). Nat Rev Genet 10, 94-108). Es importante destacar que, los recientes análisis de los datos procedentes de tecnologías de secuenciación de nueva generación, también conocidas como secuenciación profunda o de alto rendimiento, a partir de cultivos de células y tejidos han revelado la existencia de otras clases de ARN pequeños, incluidos los sno-ARN y tRNAs o de repeticiones Alu. En general, estos hallazgos sugieren que las células pueden generar una amplia gama de ARN pequeños reguladores con una amplia variedad de mecanismos y funciones de procesamiento.

Los inventores han explorado si los estímulos aterogénicos regulan la expresión de nuevos ARN pequeños reguladores, que a su vez pueden modular la apoptosis y la inflamación en macrófagos. La aterosclerosis es causada por un engrosamiento de la pared de la arteria, también conocido como lesión, como resultado de la acumulación de lípidos, células, y la matriz extracelular en la zona entre el endotelio y las células musculares lisas subyacentes (Moore, KJ, y Tabas, I. (2011). Cell 145, 341-355). Una etapa de inicio clave de la aterosclerosis es la acumulación subendotelial de ApoB-LPS (lipoproteínas que contienen apolipoproteína B) compuesto de ésteres de ácido graso de colesterol y triglicéridos, que son transportados en la sangre como LDL (lipoproteína de baja densidad) (Moore, KJ, y Tabas, I. (2011). Cell 145, 341-355). La activación de las células endoteliales por ApoB-LP conduce al reclutamiento de macrófagos, que desempeñan un papel importante a lo largo de la aterosclerosis desde las fases tempranas de formación de la lesión a las avanzadas. De hecho, en fases tempranas, los macrófagos fagocitan las lipoproteínas y lípidos, y se convierten en las así llamadas células espumosas, que secretan citoquinas inflamatorias y se someten a apoptosis. El aclaramiento eferocítico rápido de las células espumosas apoptóticas conduce a la supresión de la respuesta inflamatoria en última instancia, retardando la progresión de la lesión. Sin embargo, en lesiones avanzadas, la apoptosis de los macrófagos no se acopla correctamente con el aclaramiento de fagocitosis, lo que conduce a la formación de placa necrótica. La acumulación de restos necróticos en última instancia promueve la inflamación, rotura de la placa, y, finalmente, la trombosis. Tanto la tasa de mortalidad de los macrófagos como la eficiencia de aclaramiento celular por apoptosis son procesos que controlan la progresión de la lesión (Moore, KJ, y Tabas, I. (2011). Cell 145, 341-355). La inducción de la apoptosis de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas implica el efecto crónico y acumulativo de varias características, incluyendo el estrés oxidante, citoquinas, LDL oxidada (LDL ox), la activación de la vía de Fas death, ácidos grasos saturados, y factores de estrés del retículo endoplásmico (Moore, KJ, y Tabas, I. (2011). Cell 145, 341-355). Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la apoptosis en los macrófagos tras estímulos relevantes para el ateroma es un objetivo clave en el desciframiento de la progresión de la lesión.

Los inventores han demostrado que, en macrófagos estimulados con lípidos aterogénicos, los RNYs (también llamados "ARN Y") se procesan en ARN pequeños que tienen alrededor de 24-34 nucleótidos (nt) de longitud y son referidos como RNY pequeños (s-RNY). Estos s-RNY causan la degradación de un subconjunto de ARNm cruciales para la atrogénesis y en última instancia modulan la apoptosis y la respuesta inflamatoria en macrófagos cargados de lípidos.

65

Los RNYs son ARN no codificantes que tienen ~110 nt de longitud citoplasmática que se caracterizan por un amplio apareamiento de bases de las regiones 5' y 3' y por la asociación con las proteínas Ro60 y La/SSB para formar el complejo de ribonucleoproteína Ro. En los macrófagos incubados con estímulos aterogénicos, tales como ácido palmítico (PA), la generación de s-RNY requiere Ago2 y la proteína de unión a ARN de cadena simple hnRNP A1 que es la proteína del núcleo más abundante del complejo de ribonucleoproteínas. hnRNP A1 se desplaza al citoplasma para unirse directamente a RNY y modular el posicionamiento/reclutamiento de Ago2 que a su vez participa en la catálisis y la maduración de RNY en s-RNY.

s-RNY regulan vías pro-inflamatorias y pro-apoptóticas en macrófagos cargados de lípidos mediante el control de los niveles de expresión de un subconjunto de las transcripciones o transcritos que son críticos en la regulación de la patogénesis de la aterosclerosis, tales como Fos, KLF2, y NR4A1. Es importante destacar que s-RNY son responsables, al menos en parte, para la activación de p38 y vías de señalización de NF-κB en los macrófagos tratados con PA, induciendo en última instancia la muerte celular y la respuesta inflamatoria.

Según el hallazgo anterior de que los s-RNY son los principales ARN pequeños que regulan la respuesta inmunitaria en la patogénesis de la aterosclerosis, se demostró un aumento significativo de la expresión de s-RNY en modelos de ratón para la aterosclerosis y en el suero de una cohorte de pacientes con enfermedad estable de las arterias coronarias (CAD). Además, los niveles de expresión de s-RNY en pacientes con CAD se correlacionaron positivamente con lípidos pro-aterogénicos y afección inflamatoria, mientras que se encontró una asociación negativa con HDL ateroprotector.

En conjunto, los resultados de los inventores indican que la expresión s-RNY se puede utilizar como un marcador diagnóstico y una diana terapéutica para la aterosclerosis.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Procedimiento de diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis

La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro de diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis en un individuo, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador que consiste en un Y ARN pequeño (s-RNY) en una muestra biológica de dicho individuo,
- b) comparar el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador con un valor de referencia,
- c) deducir de dicha comparación si el individuo ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

La descripción también se refiere al uso de al menos un ARN Y pequeño (s-RNY) como biomarcador de trastornos relacionados con la aterosclerosis.

Tal como se usa en este documento, un "**trastorno relacionado con la aterosclerosis**" es una enfermedad que resulta del desarrollo de la aterosclerosis en cualquier arteria del cuerpo, incluyendo arterias en el corazón, el cerebro, los brazos, las piernas, la pelvis y los riñones. Un trastorno relacionado con la aterosclerosis puede ser, por ejemplo, enfermedad renal crónica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, enfermedad isquémica del corazón, enfermedad de la arteria carótida, o enfermedad de la arteria coronaria (también llamada enfermedad cardíaca coronaria (CHD)).

Un trastorno relacionado con la aterosclerosis se diagnostica generalmente mediante angiografía cuando un estrechamiento severo (estenosis) de la arteria ya está presente, y en menor medida por las pruebas de estrés cardíaco. La detección temprana de un trastorno relacionado con la aterosclerosis actualmente se basa en la detección anatómica, tal como la evaluación de calcio coronario mediante tomografía computarizada, medición del grosor promedio de la íntima carótida (IMT) por ultrasonidos, y formación de imágenes por ultrasonido intravascular (IVUS), y/o medición fisiológica, tal como el análisis de subclases de lipoproteínas o medición de HbA1c, hs-CRP, y/o homocisteína.

El término "**diagnosticar**" o "**diagnóstico**" se utiliza en el presente documento para referirse a la identificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológica, tal como la identificación de un trastorno relacionado con la aterosclerosis o para referirse a la identificación de un paciente que ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

El término "**pronosticar**" o "**pronóstico**" se utiliza en el presente documento para referirse a la predicción de la probabilidad de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

Según la invención, el término "**biomarcador**" significa un indicador biológico o indicador derivado biológicamente de un proceso, un evento o condición. El término biomarcador, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un s-RNY que se expresa diferencialmente en un individuo que ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar un

trastorno relacionado con la aterosclerosis en comparación con un individuo o población de control.

El término "ARN Y pequeño" o "s-RNY" se refieren a un ARN pequeño de aproximadamente 24-34 nucleótidos que derivan del procesamiento de un ARN Y (también llamado RNY).

Los RNY son altamente conservados en eucariotas. El genoma humano contiene cuatro genes que codifican RNY respectivamente llamados ARN hY1 (hRNY1) de la secuencia de SEQ ID NO: 1 (gij161087011|ref|NR_004391.1), ARN hY3 (hRNY3) de la secuencia de SEQ ID NO: 2 (gij161087012|ref|NR_004392.1), ARN hY4 (hRNY4) de la secuencia de SEQ ID NO: 3 (gij161087013|ref|NR_004393.1) y ARN hY5 (hRNY5) de la secuencia de SEQ ID NO: 4 (gij197209873|ref|NR_001571,2 |) (hY2 es un producto de degradación de hY1). En el genoma de *Mus musculus*, los genes que codifican RNY se llaman ARN Y1 de *Mus musculus* (mRNY1) de la secuencia de SEQ ID NO: 5 (gij161333869|ref|NR_004419.1 |); ARN Y3 de *Mus musculus* (mRNY3) de la secuencia de SEQ ID NO: 6.

Los s-RNY humanos incluyen s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7) y s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8) ambos derivados de hRNY1 mediante el procesamiento en su lado 3' o 5', respectivamente; s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9) y s-RNY3-3p (SEQ ID NO: 10) ambos derivados de hRNY3 mediante el procesamiento en su lado 5' o 3', respectivamente; s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11) y s-RNY4-3p (SEQ ID NO: 12) ambos derivados de hRNY4 mediante el procesamiento en su lado 5' o 3', respectivamente; y s-RNY5-3p (SEQ ID NO: 13) que deriva de hRNY5 mediante el procesamiento en su lado 3'.

Los RNY pequeños s-RNY3-5p y s-RNY4-5p han sido recientemente identificados por los inventores. Por lo tanto, la invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p).

s-RNY de *Mus Musculus* incluyen s-RNY1-5p de *Mus Musculus* (SEQ ID NO: 14) y s-RNY1-3p de *Mus Musculus* (SEQ ID NO: 15) ambos derivados de mRNY1 mediante el procesamiento en su lado 5' o 3', respectivamente, y s-RNY3-5p de *Mus Musculus* (SEQ ID NO: 16) y s-RNY3-3p de *Mus Musculus* (SEQ ID NO: 17) ambos derivados de mRNY3 mediante el procesamiento en su lado 5' o 3', respectivamente.

En una realización, dicho al menos un biomarcador se selecciona del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), s-RNY3-3p (SEQ ID NO: 10), s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11), s-RNY4-3p (SEQ ID NO: 12), y s-RNY5-3p (SEQ ID NO: 13) o variantes de los mismos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**variante**" de un s-RNY indica secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico variante tendrá al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico sobre la longitud completa de una secuencia de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento. La identidad de secuencia de ácido nucleico se puede calcular mediante procedimientos bien conocidos para un experto en la técnica. El porcentaje de identidad se puede calcular mediante la realización de una alineación global por parejas basada en el algoritmo de alineación de Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluidos los huecos) de dos secuencias a lo largo de toda su longitud, por ejemplo, utilizando Needle, y el uso de la matriz DNAFULL con una penalización de apertura de hueco de 10 y una penalización de extensión de hueco de 0,5. Con ese fin, las secuencias de ARN serían escritas en bases de ADN.

En el marco de la invención, se puede determinar el nivel de expresión de dos, tres o más biomarcadores de acuerdo con la invención.

En una realización, el nivel de expresión de al menos un biomarcador se compara con un valor de referencia.

Según la invención, un nivel de expresión de al menos un biomarcador de la invención superior al valor de referencia es indicativo de que el individuo ha desarrollado o se encuentra en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**determinar**" incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (es decir, detectar y/o medir el nivel de expresión) con o sin referencia a un control o un valor predeterminado. Como se usa en este documento, "**detectar**" significa la determinación de si s-RNY está presente o no en una muestra biológica y "**medir**" significa la determinación de la cantidad de un s-RNY en una muestra biológica. Habitualmente, el nivel de expresión de un s-RNY puede determinarse por ejemplo mediante RT-PCR realizada en una muestra biológica y más particularmente un procedimiento de RT-PCR de stem-loop, tal como se describe en Chen et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 2005 Nov 27; 33 (20): e179.

Por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de la invención, la determinación de un nivel de expresión de al menos s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9) o s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11) superior a sus respectivos valores de referencia es indicativo de que el individuo ha desarrollado o está en

riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

El término "**el nivel de expresión de un biomarcador es superior al valor de referencia**" como se usa en el presente documento, significa que hay un aumento estadísticamente significativo entre el nivel de expresión de dicho biomarcador, tal como se determina en la muestra biológica, y el valor de referencia. En una realización, el nivel de biomarcador puede ser comparado con el valor de referencia usando la relación del nivel de dicho biomarcador en comparación con el valor de referencia o usando el valor de p.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**valor de referencia**" se refiere a la cantidad de un s-RNY en muestras biológicas obtenida a partir de la población general o de una población seleccionada de individuos. El valor de referencia predeterminado puede ser un valor umbral o un intervalo. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta de sujetos aparentemente sanos, tales como personas que no han tenido previamente cualquier signo o síntoma que indique la presencia de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

El valor de referencia puede ser cualquier número de medidas estadísticas para distinguir entre un nivel indicativo de que un individuo ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis y un nivel indicativo de que un individuo no ha desarrollado o no está en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis, incluyendo los niveles de expresión promedio y mediana, y/o expresión de s-RNY corte o umbral o valores del número de cambio, tal como se determina en un individuo o un grupo de individuos.

El nivel de expresión de ARN Y pequeños se puede medir mediante el uso de técnicas similares como se puede usar para cuantificar la transcripción de genes, en particular, ensayos basados en la hibridación directa y ensayos basados en la amplificación, con una cierta adaptación experimental, bien conocidos en la técnica, debido a las secuencias cortas de los ARN Y pequeños. Por ejemplo, la transcripción inversa del ARN Y pequeño a ADNc se realizó utilizando cebadores hairloop, tal como se ha desarrollado por la compañía Applied Biosystems (Perkin Elmer).

Por ejemplo, los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que presentan complementariedad u homología de secuencia al s-RNY de interés en el presente documento encuentran utilidad como cebadores de amplificación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, pero son habitualmente al menos aproximadamente 80% idénticos con la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente 85% idénticos y aún más preferiblemente 90-95% idénticos.

En ciertas realizaciones, será ventajoso emplear ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Una amplia variedad de indicadores apropiados son conocidos en la técnica incluyendo, ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

Los cebadores son habitualmente ácidos nucleicos de cadena sencilla más cortos, de entre 10 a 25 nucleótidos de longitud, diseñados para adaptarse perfectamente a o casi a la perfección con un ácido nucleico de interés, a amplificar. Los cebadores son "específicos" a los ácidos nucleicos a los que se hibridan, es decir, preferiblemente se hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión más alta, T_f, por ejemplo, formamida al 50%, 5x o 6x SCC. SCC es un NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M).

En una realización particular, los procedimientos de la invención comprenden las etapas de proporcionar el total de los ARN extraídos de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre y someter los ARN a amplificación con cebadores específicos, más particularmente mediante una RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa, tal como se describe a continuación.

Según una realización, dicho al menos un biomarcador se selecciona del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), y s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11).

De hecho, s-RNY1-3p, s-RNY1-5p, s-RNY3-5p, y s-RNY4-5p se han identificado como inducidos por estímulos aterorelevantes en los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) o macrófagos primarios humanos. Por otra parte, se ha encontrado que s-RNY1-3p tiene un único sitio de unión en el ARNm de *factor 2 de tipo Kruppel* (KLF2) y s-RNY1-3p regula por disminución el gen de KLF2 en el nivel post-transcripcional en macrófagos cargados de lípidos. KLF2 tiene un papel anti-apoptótico y un papel anti-inflamatorio en los macrófagos y es conocido como un gen crítico en la regulación de la patogénesis de la aterosclerosis. Adicionalmente, s-RNY1-5p y s-RNY4-5p se detectaron en el suero humano y se encontraron como no regulados en pacientes con CAD en suero en comparación con los individuos de control. Los inventores encontraron además que s-RNY1-5p y s-RNY4-5p se correlacionaron positivamente con los lípidos proaterogénicos y se correlacionaron negativamente con marcadores de HDL. Los marcadores de HDL se asocian con un menor riesgo de trastorno relacionado con la aterosclerosis.

En una realización preferida, el procedimiento de diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis comprende la etapa de determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico de secuencia de s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7) y/o s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11). Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de

fluido, en particular, sangre entera, plasma o suero.

Según otra realización, el procedimiento de diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis comprende la etapa de determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), y s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11).

El término "**muestra biológica**" se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de la evaluación in vitro. Las muestras biológicas que pueden ser utilizadas para realizar los procedimientos de acuerdo con la invención abarcan cualquier muestra biológica derivada de un paciente que contiene ARN y más particularmente s-RNY, incluyendo cualquier fluido, tejido, muestras celulares, órganos, biopsias, etc. Las muestras habituales que se utilizan en los procedimientos de acuerdo con la invención son muestras de sangre (por ejemplo, muestra de sangre entera), plasma o suero. En una realización preferida, dicha muestra de sangre es una muestra de sangre entera obtenida de un paciente a analizar.

El término "paciente" o "individuo" puede ser, por ejemplo un mamífero humano o no humano (tal como un roedor (ratón, rata), un felino, un canino o un primate) afectados por o que puede verse afectado por un trastorno relacionado con la aterosclerosis. Preferiblemente, el paciente o el individuo es un ser humano. El paciente puede presentar factores de riesgo para el desarrollo de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, tales como la obesidad, la diabetes y la hipertensión. Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende además la etapa de determinar el nivel de expresión de al menos un lípido proaterogénico, preferiblemente triglicéridos, lipoproteína que contiene ApoB o ApoE y/o marcadores de HDL, preferiblemente HDL-C y apoA-I.

Procedimientos de tratamiento

Los inventores mostraron que la expresión de s-RNY es inducida en macrófagos expuestos a diversos tipos de estímulos apoptóticos, incluyendo aquellos que son relevantes para el desarrollo de la aterosclerosis (ejemplo 2). También se ha demostrado que la expresión s-RNY afecta a la modulación de la expresión génica en macrófagos cargados de lípidos mediante la regulación de forma directa, a nivel post-transcripcional, un subconjunto crítico de ARNm de la patogénesis de desarrollo de la aterosclerosis (ejemplo 4). Adicionalmente, los s-RNY inducidos por estímulos aterogénicos son un componente intrínseco de la maquinaria que regule la apoptosis en los macrófagos cargados de lípidos, a través de la activación de los mecanismos de p38 y de NF-KB para promover en última instancia la muerte celular y la respuesta proinflamatoria en macrófagos (ejemplo 5). En conjunto, estos resultados identifican los s-RNY como responsables de regular las vías proinflamatorias y proapoptóticas en los macrófagos cargados de lípidos.

Así, la descripción también se refiere a un inhibidor de un ARN Y pequeño (s-RNY) para su uso como un medicamento. La invención además se refiere a un inhibidor de un s-RNY para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

El inhibidor de un s-RNY puede ser dirigido contra cualquier s-RNY como se define anteriormente, es decir, cualquier s-RNY humano o variante del mismo.

Según una realización, dicho inhibidor de s-RNY es un inhibidor de un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9) o s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**inhibidor de s-RNY**" se refiere a un compuesto que inhibe o reduce la actividad biológica de s-RNY. La actividad biológica de s-RNY depende de la cantidad del ácido nucleico de s-RNY (es decir, su nivel de expresión), así como de la cantidad de RNY a partir de la cual se procesa y se madura s-RNY, o de la interacción de s-RNY con sus secuencias diana.

Por lo tanto, el inhibidor de s-RNY puede reducir o inhibir la expresión de s-RNY (es decir, inhibir el procesamiento de RNY, por ejemplo, mediante la inhibición de la interacción de RNY con su pareja de unión) o reducir o inhibir la capacidad de interacción de s-RNY con sus secuencias diana.

"**Expresión de s-RNY**" se refiere a los acontecimientos de modificación de RNY post-transcripcional, mediante escisión y maduración, para proporcionar un s-RNY funcional, en particular cualquier reacción que da lugar a la inhibición del procesamiento de RNY.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**secuencia diana**" de s-RNY de acuerdo con la invención es una secuencia a la que s-RNY se hibrida específicamente los. Una secuencia diana interacciona con un s-RNY mediante un emparejamiento de bases Watson-Crick, e incluye, por ejemplo, ARNm del *factor 2 de tipo Krüppel* (KLF2), tal como se describe en la sección de Ejemplos a continuación.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pareja de unión" se refiere a una molécula (peptídica o no

peptídica) que interactúa directamente con el biomarcador de la invención. Preferiblemente, dicha pareja de unión es una pareja de proteína o una pareja de proteína de fusión o su dominio de unión o un anticuerpo, variantes de anticuerpos, moléculas derivadas de anticuerpos. Preferiblemente, dicha pareja de unión es una proteína implicada en la maduración de hRNY1, hRNY3, hRNY4 o hRNY5.

En particular, se ha identificado por los inventores que, en los macrófagos incubados con estímulos aterogénicos, la generación de s-RNY requiere Ago2 y la proteína de unión a ARN de cadena simple hnRNP A1 que forma parte del complejo de ribonucleoproteínas. Por otra parte, los RNY, los precursores de s-RNY, se asocian con las proteínas Ro60 y La/SSB para formar el complejo de ribonucleoproteínas Ro. Por consiguiente, un inhibidor de s-RNY puede ser una molécula que inhibe o reduce la interacción de RNY con Ago2, complejo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), Ro60 o La/SSB, o una molécula que inhibe o reduce el procesamiento de Ago2 de RNY.

"Complejo de ribonucleoproteínas (RNP) Ro" o partículas de ribonucleoproteínas RO (RNPs) contienen al menos tres proteínas: la proteína La, que está implicada en la terminación correcta de la transcripción de ARN polimerasa III y las proteínas Ro específicas de RNP de 52 kDa (Ro52) y 60 kDa (Ro60). Las RNP Ro pueden contener componentes adicionales, tales como componentes de ARN. Los componentes de ARN de RNP Ro en células humanas consisten en uno de cada cuatro RNY pequeños diferentes. Ro60 (también conocido como Ro/SSA) es una proteína de la secuencia SEQ ID NO: 20 (P10155.2 GI: 52788235). La (también conocida como SSB o La/SSB) es una proteína de la secuencia SEQ ID NO: 21 (La/SSB: gi|10835067|ref|NP_003133.1).

Proteína Argonauta-2 (Ago2) es una enzima de la secuencia de SEQ ID NO: 18 (Acc No gi|29171734|ref|NP_036286.2). Ago2 tiene una actividad endorribonucleasa para ARN de doble cadena y es el componente catalítico del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Ago2 está implicada en jugar un papel en el silenciamiento de genes mediada por ARN de interferencia cortos.

Las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A1 (hnRNP A1) es una proteína de desplazamiento núcleo-citoplasma de la secuencia de SEQ ID NO: 19 (Acc No gi|4504445|ref|NP_002127.1) con funciones en muchos aspectos del metabolismo de ARN. Las hnRNP están asociadas con pre-ARNm en el núcleo y parecen influir en el procesamiento de pre-ARNm y otros aspectos del metabolismo y transporte de ARNm. hnRNP A1 está involucrado en el empaquetamiento de pre-ARNm en partículas hnRNP, transporte de poli (A) ARNm desde el núcleo hasta el citoplasma y puede modular la selección del sitio de empalme.

De acuerdo con una realización, el inhibidor de s-RNY es un inhibidor de la expresión génica de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en Ago2 (SEQ ID NO: 18), complejo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP, tales como hnRNP A1 de la secuencia SEC ID NO: 19), Ro60 (SEQ ID NO: 20) y La/SSB (SEQ ID NO: 21). Preferiblemente, dicho inhibidor de s-RNY previene o reduce el procesamiento de RNY en s-RNY.

Un **"inhibidor de la expresión génica"** se refiere a cualquier compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen.

Por lo tanto, un **"inhibidor de la expresión génica de Ago2"** indica un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de la expresión génica de Ago2.

Por lo tanto, un **"inhibidor de la expresión génica de hnRNP A1"** indica un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de la expresión génica de hnRNP A1.

Por lo tanto, un **"inhibidor de la expresión génica de Ro60"** indica un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de la expresión génica de Ago2.

Por lo tanto, un **"inhibidor de la expresión génica de La/SSB"** indica un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de la expresión génica de hnRNP A1.

En una realización de la invención, dicho inhibidor de la expresión génica es un siRNA.

Los ARN inhibidores pequeños (siRNAs) pueden funcionar como inhibidores de la expresión de genes para uso en la invención. La expresión génica se puede reducir con un ARN pequeño de doble cadena (dsRNA), o un vector o constructo que causa la producción de un ARN pequeño de doble cadena, de manera que la expresión del gen se inhibe específicamente (es decir, interferencia de ARN o ARNi). Los procedimientos para la selección de un dsRNA apropiado o vector de codificación de dsARN son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, ver Tuschli, T. et al (1999); Elbashir, SM et al (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT et al (2002); Brummelkamp, TR et al (2002); Patentes de Estados Unidos nº 6.573.099 y 6.506.559; Patentes Internacionales nº WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836).

En una realización particular, la secuencia del siRNA que reconoce Ago2 está representada por SEQ ID NO: 22.

En una realización particular, la secuencia del siRNA que reconoce hnRNP está representada por SEQ ID NO: 23.

En una realización particular, la secuencia del siRNA que reconoce Ro60 está representada por SEQ ID NO: 24.

En una realización particular, la secuencia del RNAsi que reconoce La/SSB está representada por SEQ ID NO: 25.

Según otra realización, el inhibidor de s-RNY interactúa específicamente con al menos un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en hRNY1 (SEQ ID NO: 1), hRNY3 (SEQ ID NO: 2), hRNY4 (SEQ ID NO: 3) y hRNY5 (SEQ ID NO: 4), preferentemente que consiste en SEQ ID NO: 1 (hRNY1) y SEQ ID NO: 2 (hRNY3).

Habitualmente, dicho inhibidor de s-RNY puede ser un inhibidor de la interacción entre la proteína Ago2 o complejo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) y al menos un RNY, en particular un RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (hRNY1) y SEQ ID NO: 2 (hRNY3).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "**inhibidor de la interacción**" significa la prevención o reducción de la asociación directa o indirecta de una o más moléculas, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas. Como se usa en este documento, el término "**inhibidor de la interacción entre Ago2 o el complejo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) y al menos un RNY**" es una molécula que puede prevenir la interacción entre Ago2 o hnRNPs con al menos un RNY por la competición o mediante la fijación a una de las moléculas.

Los s-RNY proporcionan una nueva herramienta identificada para controlar la expresión de genes diana. Más particularmente, los s-RNY permiten la inhibición de la expresión de dichos genes diana mediante la explotación de una maquinaria asociada a Ago2 para provocar la degradación de ARNm que contienen secuencias complementarias a s-RNY. Una posible forma de interferir con la actividad de s-RNY, es utilizar oligonucleótidos (ODN) que comprende secuencias de ácido nucleico complementarias de estos s-RNY como competidores de la secuencia endógena dentro de los ARNm de los genes diana, para la unión a s-RNY. Al igual que los elementos naturales, los señuelos son capaces de unirse a s-RNY. Por lo tanto, cuando estos elementos están en excedencia atraerán los s-RNY lejos de elementos transcripcionales naturales. Cuando se evita que los factores de regulación, s-RNY, en particular, se unan a sus secuencias diana, sus efectos reguladores sobre la expresión de genes están generalmente impedidos. La estrategia de señuelo tiene como objetivo proporcionar un excedente intracelular de ODN que se unen a s-RNY, secuestrándolos así de su sitio o sitios naturales. De esta manera, se evita la degradación de ARNm inducida por s-RNY.

Los inhibidores de dichos s-RNY para su uso en la invención pueden estar basados en constructos de oligonucleótidos antisentido (ODN). Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de ARN anti-sentido y moléculas de ADN anti-sentido, actuarían para bloquear directamente la actividad de s-RNY mediante la unión al mismo y por lo tanto evitando la unión que conduce a la degradación del ARNm.

Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcripción de s-RNY se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse mediante, por ejemplo, inyección intravenosa o infusión. Los procedimientos para utilizar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse las patentes de Estados Unidos N° 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; y 5,981,732). Debe observarse además que los oligonucleótidos antisentido pueden ser modificados con fosforotioato para evitar su hidrólisis in vivo por nucleasas. Tales modificaciones son bien conocidas en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido útiles como inhibidores de s-RNY se pueden preparar mediante procedimientos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química, tal como, por ejemplo, mediante síntesis química de fosforamídita en fase sólida. Alternativamente, se pueden generar moléculas de ARN anti-sentido mediante transcripción in vitro o in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como promotores de polimerasa T7 o SP6.

Diversas modificaciones a los oligonucleótidos de la invención se pueden introducir como medio de aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiéster dentro del esqueleto de oligonucleótidos.

Por consiguiente, en una realización preferida, el inhibidor de dicho s-RNY es un ácido nucleico que hibrida específicamente con al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), s-RNY3-3p (SEQ ID NO: 10), s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11), s-RNY4-3p (SEQ ID NO: 12), y s-RNY5-3p (SEQ ID NO: 13) o variantes de los mismos.

Habitualmente, dicho inhibidor es un ácido nucleico de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22 (siRNA que reconoce Ago2), SEQ ID NO: 23 (siRNA que reconoce hnRNP), SEQ ID NO: 24 (siRNA que reconoce Ro60), SEQ ID NO: 26 (2'-OMe-ARN antisentido a s-RNY1-5p humano o de ratón), y SEQ ID NO: 54 (2'-

OMe-ARN antisentido a s-RNY4-5p humano: 5'-AGUUCUGUAUACCCACUACCAUCGGACCAGCC-3').

La descripción se refiere además a un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de un s-RNY.

De acuerdo con una realización, dicho s-RNY se selecciona del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9) y s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11).

El inhibidor de un s-RNY se formula ventajosamente en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semi-sólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen naturalmente dependerán de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o fosfato de disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de varios parámetros, y en particular en función del modo de administración utilizado, de la patología pertinente, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto a tratar. Un medicamento habitualmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Según la invención, "**tratamiento**" incluye tanto el tratamiento terapéutico como el tratamiento profiláctico o preventivo, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar la afección o trastorno patológico objetivo. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. El término "**tratar**" incluye reducir, aliviar o inhibir o eliminar los síntomas o el progreso de un trastorno.

El tratamiento de acuerdo con la invención incluye un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tratamiento, un inhibidor del s-RNY o la composición farmacéutica que contiene dicho inhibidor. Preferentemente, el tratamiento comprende además administrar a dicho paciente un fármaco anti-aterosclerosis, tal como secuestrante de ácidos biliares, niacina (ácido nicotínico), las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa), fibratos o probucol, o combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, se administra una cantidad eficaz, preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor del s-RNY de la invención. Una "**cantidad eficaz**" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con el fármaco con el que se coadministra el inhibidor del s-RNY.

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un inhibidor del s-RNY de la invención puede variar según factores, tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del inhibidor de s-RNY para provocar un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del inhibidor de s-RNY es superada por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad terapéuticamente eficaz también abarca una cantidad suficiente para conferir beneficios, por ejemplo, un beneficio clínico.

La descripción proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que comprende las etapas de:

- 5 a) diagnosticar o pronosticar un trastorno relacionado con la aterosclerosis en un individuo mediante la determinación del nivel de expresión de al menos un biomarcador que consiste en un ARN Y pequeño (s-RNY) en una muestra biológica de dicho individuo, como se describe anteriormente, y
 b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de fármaco anti-aterosclerosis a dicho individuo diagnosticado o pronosticado con un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

10 De acuerdo con dicho aspecto, la invención se refiere también a un medicamento anti-aterosclerosis para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis en un individuo, en el que el individuo se ha diagnosticado o pronosticado con un trastorno relacionado con la aterosclerosis mediante la determinación del nivel de expresión de al menos un biomarcador que consiste en un ARN Y pequeño (s-RNY) en una muestra biológica de dicho individuo. En particular, dicho uso puede comprender el diagnóstico o pronóstico de la persona con un
 15 trastorno de trastorno relacionado con la aterosclerosis mediante la medición del nivel de expresión de al menos un biomarcador que consiste en un ARN Y pequeño (s-RNY) en una muestra biológica de dicho individuo.

De acuerdo con dicho aspecto de la invención, el fármaco anti-aterosclerosis puede ser, sin limitación, un sequestrante de ácidos biliares, niacina (ácido nicotínico), estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa), fibratos o probucol, un inhibidor de s-RNY como se describe anteriormente, o combinaciones de los mismos.

Un procedimiento para el cribado de un compuesto adecuado para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con la aterosclerosis

25 La invención además se refiere a un procedimiento de cribado de un compuesto adecuado para el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un compuesto candidato con un s-RNY o un RNY,
 b) identificar como un compuesto adecuado para el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que inhibe la maduración de dicho RNY en s-RNY o que inhibe la actividad de dicho s-RNY.

30 Dicho s-RNY puede ser s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), s-RNY3-3p (SEQ ID NO: 10), s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11), s-RNY4-3p (SEQ ID NO: 10), s-RNY5-3p (SEQ ID NO: 13) o variantes de los mismos. Preferiblemente, dicho s-RNY se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o una variante de los mismos.

Dicho RNY puede ser RNY1, RNY3, RNY4 o RNY5, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (hRNY1), SEQ ID NO: 2 (hRNY3) y SEQ ID NO: 3 (hRNY4), aún más preferentemente SEQ ID NO: 1 (hRNY1), SEQ ID NO: 2 (hRNY3).

40 Según la invención, un compuesto adecuado para el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis puede inhibir la interacción de un RNY con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 (Ago2), SEQ ID NO: 20 (Ro60), SEQ ID NO: 19 (hnRNP A1) y SEQ ID NO: 21 (La/SSB).

45 Habitualmente, la determinación de la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la actividad de un s-RNY puede comprender la etapa de determinar el nivel de expresión de un polipéptido de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29 (*c-Fos*; *gi|4885241|ref|NP_005243.1*), SEQ ID NO: 30 (factor 2 del tipo Kruppel (KLF2) *gi|7706469|ref|NP_057354.1*), SEQ ID NO: 31 (*Zfyve28 gi|187953521|gb|AAI37311.1*), SEQ ID NO: 32 (*familia-1 romboidal* (Rhbdf1) *gi|190341097|ref|NP_071895.3*), SEQ ID NO: 33 (*Fgfr1, gi|105990522|ref|NP_075598.2*), SEQ ID NO : 34 (*lisil oxidasa* (LOX) *gi|20149540|ref|NP_002308.2*) y SEQ ID NO: 35 (*Nr4A1* (también conocido como Nur77) *gi|27894344|ref|NP_775180.1*). Estos polipéptidos son conocidos por ser importantes en la regulación de la patogénesis de la aterosclerosis y se han identificado como potenciales s-RNY que dirigen ARNm diana por los inventores.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" o "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de la longitud o modificación post-traducciona.

60 El nivel de expresión de una proteína o un polipéptido puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen habitualmente procedimientos basados en la determinación de la expresión de ARNm correspondiente y procedimientos basados en la determinación del nivel de expresión de una proteína.

65 El nivel de expresión de una proteína o un polipéptido puede ser evaluada mediante la determinación de la expresión del ARNm correspondiente (productos de transcripción). Esta medición puede realizarse mediante diversos procedimientos que son bien conocidos por la persona experta en la técnica, incluyendo los procedimientos cuantitativos que implican PCR transcriptasa inversa (RT-PCR), tales como RT-PCR (qRT-PCR), y procedimientos

que implican el uso de arrays (macroarrays o microarrays) de ADN e hibridación in situ.

El nivel de expresión de una proteína o un polipéptido puede ser evaluado mediante el uso de procedimientos inmunológicos. Los procedimientos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), sándwich, ensayos de ELISA directos, indirectos, o competitivos, ensayos inmunospot ligados a enzimas (ELIspot), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica, transferencia Western, ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), ensayos de chip de proteínas utilizando, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ligandos de receptores u otros agentes de unión a las proteínas codificadas por la secuencia. El nivel de expresión de tales proteínas se cuantifica utilizando tecnologías bien conocidas por el sector.

Cebadores y kits que contienen los mismos para usar en el diagnóstico o pronóstico de trastornos relacionados con la aterosclerosis

La invención se refiere al uso de una pareja de cebadores adecuados para la amplificación de un s-RNY en el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

La presente invención también se refiere al uso de una sonda que se hibrida específicamente a un s-RNY para diagnosticar o pronosticar un trastorno relacionado con la aterosclerosis. Por consiguiente, el uso de un ácido nucleico que se hibrida específicamente a una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) se proporciona como una sonda para el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con aterosclerosis.

Dicho s-RNY puede ser s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), s-RNY3-3p (SEQ ID NO: 10), s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11), s-RNY4-3p (SEQ ID NO: 12), s-RNY5-3p (SEQ ID NO: 13) o variantes de los mismos. Preferiblemente, dicho s-RNY se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o variantes de los mismos.

El término "sonda" se refiere a un ácido nucleico aislado capaz de hibridarse a un ácido nucleico diana. Un marcador o molécula informadora detectable puede unirse a una sonda. Los marcadores típicos incluyen isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. Se discuten procedimientos para el marcaje y guía en la elección de las marcadores apropiadas para diversos fines, por ejemplo, en Sambrook et al. ((1989) Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). Las sondas son preferiblemente de al menos 12, 15, 20, 25, o 30 nucleótidos de largo. Las sondas pueden ser de menos de 60, 50, 40 o preferiblemente 35 nucleótidos de longitud.

Las sondas se pueden utilizar para el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis mediante la identificación de que al menos un s-RNY como se describe anteriormente, en particular un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o variantes de los mismos está sobreexpresado en una muestra biológica en comparación con una muestra de control o un valor de referencia. El contacto de una muestra de ARN total (transcriptoma) de una muestra biológica con la sonda en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con su correspondiente fragmento en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido de ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido puede detectarse (por ejemplo, mediante el marcaje del ácido nucleico o la sonda), con lo cual la formación de este híbrido indica la expresión de la secuencia correspondiente. Tales procedimientos de identificación basados en hibridación con una sonda específica (sea sobre un soporte de fase sólida o en solución) han sido descritos en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente con al menos un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p).

Preferiblemente, la sonda comprende una secuencia que es al menos 80%, preferiblemente entre 80 y 85%, más preferiblemente entre 85 y 90%, especialmente preferiblemente entre 90 y 95%, lo más preferiblemente entre 95% y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferiblemente, la sonda comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 40, o 20 a aproximadamente 40 y, en particular, 15, 20, 25, 30, 35, 38, o todos los nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a un s-RNY, en particular a un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p), SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p), SEQ ID NO: 10 (s-RNY3-3p), SEQ ID NO: 12 (s-RNY4-3p) y SEQ ID NO: 13 (s-RNY5-3p) o variantes de los mismos, preferiblemente, un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o variantes de los mismos.

Una sonda de acuerdo con la invención pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID

NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52. Preferiblemente, dicha sonda de acuerdo con la invención pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 52.

5 El término "cebador" se entiende como moléculas cortas de ácido nucleico, tales como un oligonucleótido de ADN, que pueden hibridarse a una molécula de ácido nucleico diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ácido nucleico diana. Un cebador se puede extender a lo largo de la molécula de ácido nucleico diana mediante una enzima polimerasa. Por lo tanto, los cebadores pueden usarse para amplificar una molécula de ácido nucleico diana. Se pueden usar pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante PCR, PCR en tiempo real, u otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. Los procedimientos para preparar y utilizar cebadores se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. ((1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York). Dicho cebador puede ser un cebador de sentido y/o un cebador antisentido, comprendiendo o consistiendo dicho cebador de sentido en 15 a 40 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir al menos 75%, 80%, 90%, 95% o 98% idéntica) a la secuencia de nucleótidos de un s-RNY, en particular a un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p), o una variante de los mismos, y comprendiendo o consistiendo dicho cebador antisentido en 15 a 40 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, al menos 75%, 80%, 90%, 95% o 98% idéntica) a la secuencia de nucleótidos de un s-RNY, en particular a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p), o una variante de los mismos. Preferiblemente, los cebadores pueden ser de menos de 100, 50, 40, 25 o preferiblemente 20 nucleótidos de largo.

Un cebador de acuerdo con la invención pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 SEQ ID NO: 40 , SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEC ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52. Preferiblemente, dicho cebador de acuerdo con la invención pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 52.

La invención también se refiere a una pareja de cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p), siendo ambos s-RNY recientemente identificados por los inventores.

La descripción también se refiere a una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p).

La descripción también proporciona una sonda o cebadores que se hibridan específicamente a un s-RNY, tal como se describe anteriormente, en particular a un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o variantes de los mismos, para su uso para el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

La descripción también se refiere a un kit que comprende medios para determinar el nivel de expresión de al menos un s-RNY, en particular de un s-RNY seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o una variante de los mismos, tal como la pareja de cebadores y/o sondas de acuerdo con la invención.

Los kits pueden utilizarse para su uso en el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis determinando el nivel de expresión de al menos un biomarcador de la invención. El kit puede comprender así una combinación de reactivos que permiten determinar el nivel de expresión de al menos un s-RNY, en particular de un s-RNY de la secuencia de SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY1-3p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) o una variante de los mismos y opcionalmente las instrucciones del fabricante para su uso en el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis. Por consiguiente, comprende, para cada uno de los biomarcadores a ensayar, al menos una sonda o una pareja de cebadores que se hibridan selectivamente con dichos biomarcadores.

El kit puede comprender además al menos un valor de referencia.

La invención se describirá adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: (A) Análisis bioinformático de la secuenciación de alto rendimiento de ARN pequeños que muestra la distribución de las diferentes clases de ARN pequeños identificados y la regulación por incremento de los ARN pequeños derivados de RNY. (B) (s-RNYs) en macrófagos primarios humanos estimulados con 1 μ M de estaurosporina (STS) en los puntos de tiempo indicados.

Figura 2: (A) Análisis bioinformático de conjuntos de datos pequeños de secuencias de ARN pequeños que identifican una secuencia de consenso de ARN pequeños (los s-RNY) derivados de los RNYS en macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM) después del tratamiento de extracción de M-CSF durante 36 h. El gráfico de barras en la parte superior muestra la localización de los s-RNYs en RNYS. (B) Modelos de estructura secundaria de RNY de ratón utilizando servidor web RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Las puntas de flecha indican los s-RNY maduros, las flechas indican los sitios de escisión potenciales de Ago2 recombinante en un ensayo de procesamiento in vitro. Se destacan los supuestos sitios de unión de hnRNP A1.

Figura 3: (A) Análisis con RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en BMDM incubados durante 18 h con 10 mg/ml de LTA (ácido lipoteicoico) solo o en combinación con 0,25 μ M de tapsigargina (Tg). Los datos se normalizaron por U2 snRNA. (B) Análisis con RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en BMDM incubados durante 28 h con 0,25 μ M de tapsigargina (Tg) sola o tapsigargina en combinación con las concentraciones indicadas de LDL oxidada (LDL ox). Los datos se normalizaron por U2 snRNA y presentan como media y SD (n = 8). (C) Análisis con RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en BMDM incubados durante 28 h con 0,25 μ M Tg en combinación con la concentración indicada de LDL acetilada (acLDL). Los datos se normalizaron por U2 snRNA.

Figura 4: (A) Análisis con RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en BMDM incubados durante 18 h con 0,25 μ M de tapsigargina (Tg) con BSA, 0,25 mM de los ácidos grasos indicados en complejo con BSA, o tapsigargina más los ácidos grasos. Los datos se normalizaron por U2 snRNA y se presentan como media y SD (n = 8). Los ácidos grasos insaturados son el ácido linoleico (LA) y ácido oleico (OA), y los ácidos grasos saturados fueron ácido esteárico (SA) y ácido palmítico (PA). Análisis con RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en control o arcos aórticos con *ApoE*^{-/-} (B) o *LDLR*^{-/-} (C). Los ratones fueron alimentados con dieta de pienso o dieta alta en colesterol (HCD). Los datos se normalizaron por U2 snRNA y se presentan como media y SD (n = 8 para "B" y n = 5 para "C"). Prueba t de Student: * p <0,05; ** P <0,01.

Figura 5: La eficacia de la eliminación mediada por siRNAs SMARTPool comprados de Thermo Scientific se evaluó en BMDM. Después de 48 horas a partir de la transfección, el ARN total fue aislado y analizado por análisis de RT-PCR cuantitativa. Los datos se normalizaron por U2 snRNA y se presentan como media y SD (n = 4). Prueba t de Student: ** P <0,01.

Figura 6: El agotamiento de los reguladores conocidos de las vías de biogénesis de ARN pequeños y el metabolismo del ARN muestra que la pérdida de La/SSB, Ro60, p53, Ago2, y hnRNP A1 (todo en gris claro) conduce a una reducción estadísticamente significativa (prueba t de Student: P <0,05) de los s-RNY indicados, mientras que el agotamiento de Dicer conduce a una inducción significativa (prueba t de Student: p <0,05). Los BMDM se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h, y se aisló el ARN total y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se normalizaron por U2 snRNA. Los datos se presentan como media y SD (n = 4).

Figura 7: Análisis de inmunoprecipitación de ARN usando los anticuerpos indicados y los ARN indicados en BMDM. Los BMDM se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 horas y se aisló el ARN total y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se presentan como media y SD (n = 6) y se normalizó con la IgG y la entrada.

Figura 8: (A) Análisis de inmunoprecipitación de ARN de Ro60 y los s-RNY indicados en BMDM. Los BMDM se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h. Se aisló ARN de inmunoprecipitación y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se presentan como media y SD (n = 6) y se normalizaron con la IgG y la entrada. Prueba t de Student: ** P <0,01. (B) Inmunoprecipitación de ARN de cualquiera de Ago2 o La/SSB y los s-RNY indicados en BMDM. Los BMDM se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h. Se aisló ARN de inmunoprecipitación y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se presentan como media y SD (n = 6). Prueba t de Student: ** P <0,01.

Figura 9: (A) Inmunoprecipitación de ARN de cualquiera de Ago2 o IgG y los RNY indicados en BMDM. Los BMDM fueron transfectados con los RNAsi indicados y, o bien se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h. Se aisló ARN de inmunoprecipitación y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se presentan como media y SD (n = 6). Prueba t de Student: ** P <0,01. (B) Análisis de inmunoprecipitación de ARN de GW182 y los s-RNY indicados. Los BMDM se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h. Se aisló ARN de inmunoprecipitación y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se presentan como media y SD (n = 6) y se normalizó con la IgG y la entrada.

Figura 10: (A) Diagrama de Venn que muestra los potenciales ARNm que reconocen s-RNY entre los ARNm

regulados por disminución detectados a partir de un análisis de microarray de BMDM que sobreexpresan s-RNY y control a partir de 4 experimentos independientes. (B) Diagrama de Venn que muestra el número de posibles sitios de unión a diana para cada s-RNYs tanto en la región codificante como 3UTR de ARNm regulados por disminución de BMDM que sobreexpresan s-RNY.

Figura 11: Análisis por RT-PCR cuantitativa de los potenciales ARNm que reconocen s-RNY en BMDM transfectados con siAgo2, los oligonucleótidos antisentido de 2'-OMe-ARN (AS) a s-RNYs, o control. Los BMDM se dejaron sin estimular (columna negro) o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h, y se aisló el ARN total y se analizó. Los datos se normalizaron por U2 snRNA y se presentan como media y SD (n = 6).

Figura 12: (A) ARN de doble cadena esperado como resultado de apareamiento de bases de ARNm de KFL2 con s-RNY1-3p. Los pares de bases AU y GC están representados por líneas continuas; los pares de bases GU de oscilación están representados por líneas de puntos. (B) La secuencia del sitio diana predicho de ARNm de KFL2 de las especies indicadas. La secuencia complementaria de s-RNY1-3p está encerrada en un cuadro negro. La conservación de nucleótidos a través de las especies se indica mediante asteriscos. (C) La actividad de luciferasa relativa de construcciones indicadoras que contienen dos sitios de unión (BS) a s-RNY-1-3p wt o mutante de la secuencia de ARNm de KFL2 en las células NIH-3T3 transfectadas con oligonucleótido antisentido de 2'-OMe-ARN a s-RNY1-3p o control. Las células se dejaron sin estimular o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h. Los datos se normalizaron usando la actividad de Renilla. Los datos se presentan como media y SD (n = 4). Prueba t de Student: ** P <0,01.

Figura 13: Datos apoptóticos mediante fluorocitometría para BMDM que sobreexpresan s-RNYs, transfectados con oligonucleótidos antisentido 2'-OMe-ARN a s-RNYs o control. Los BMDM se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h (A), taspigargina μ M (Tg) en combinación con 100 μ M de OxLDL durante 28 h (B), o se dejaron sin estimular (C). El porcentaje de células apoptóticas y necróticas se determinó mediante tinción con DAPI y la anexina V-Alexa568. Los datos se presentan como media y SD (n = 3).

Figura 14: (A) Análisis de RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en BMDM incubados con 0,25 mM de PA el tiempo indicado. Los datos se normalizaron por U2 snRNA. (B) Análisis de RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados del medio de BMDM. Las células se dejaron sin estimular o se incubaron con PA 0,25 mM durante 18 h. Los datos se normalizaron utilizando el cel-miR-39no mamífero sintético, que se añadió a las muestras antes de la extracción de ARN. Los datos se presentan como media y SD (n = 8).

Figura 15: Análisis de RT-PCR cuantitativa de transcripciones de NOS2A, IL-6, IL-12b, y IL-1b en BMDM que sobreexpresan s-RNY y transfectados con oligonucleótidos antisentido de 2'-OMe-ARN a s-RNYs o control. Los BMDM se dejaron sin estimular o se estimularon con 100 ng/ml LPS durante 12 h, y se aisló el ARN total y se analizó. Los datos se normalizaron por U2 snRNA y se presentan como media y SD (n = 4). Prueba t de Student: * p <0,05; ** P <0,01.

Figura 16: RT-PCR cuantitativa de los s-RNY indicados en el plasma sanguíneo de ratones *ApoE*^{-/-} (A) o *Ldlr*^{-/-} (B) o control. Los ratones fueron alimentados con la dieta de pienso o HCD, durante 12 semanas (ratones *ApoE*^{-/-} ratones) o 20 semanas (ratones *Ldlr*^{-/-}). Los datos se normalizaron usando cel-miR-39 y se presentan como media y SD (n = 8 para ratones *ApoE*^{-/-} y n = 5 para ratones *Ldlr*^{-/-}). Prueba t de Student: * P <0,05, ** P <0,01.

Figura 17: (A) Expresión diferente significativa de s-RNY1-5p circulante en el suero de pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD, n = 45) frente a control sano (CTR, n = 45). Datos derivados de RT-PCR cuantitativa, normalizados utilizando cel-miR-39, y presentados como la prueba t de Student con la media y la SD: *** P <0,001. (B) Curva característica operativa del receptor (ROC) para predecir la CAD. La curva ROC fue construida usando s-RNY1-5p basado en los datos de RT-PCR cuantitativa (n = 45). Se proporciona el área bajo la curva ROC se y se calcula el intervalo de confianza del 95% (0,90 a 0,99). La línea diagonal indica una prueba con un área bajo la curva ROC de 0,5.

Figura 18: Expresión diferente significativa de s-RNY4-5p circulante en el suero de pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD) versus control (CTR). (A) Datos derivados de RT-qPCR, normalizados mediante el uso de cel-miR-39 y se presentan como la media y la SD (CTR n = 19; CAD n = 30). (B) Área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC) para s-RNY4-5p basado en los datos de RT-PCR cuantitativa.

Figura 19: s-RNY se expresan en la sangre periférica de pacientes con enfermedad arterial coronaria. Un modelo para generación dependiente de lípidos aterogénicos de s-RNY que actúan sobre un subconjunto de ARNm que contienen secuencias complementarias semillas y ejercen efectos de señalización de la vía.

Figura 20: Diagramas de caja de s-RNY1_5P de acuerdo con el estado de la enfermedad de la arteria coronaria (CAD).

Figura 21: Gráficos de densidad normales de s-rny1_5p en bruto y transformado.

Figura 22: Curva característica operativa del receptor (ROC) para la predicción de CAD con s-RNY1-5p.

Figura 23: Curva ROC para la predicción de CAD con hipertensión, dislipidemia, diabetes, tabaquismo, duración de la escolarización, índice tobillo-brazo, ApoA1 y CRP.

Figura 24: Curvas ROC para la predicción de CAD. Comparación de modelo de factores de riesgo cardiovascular básico con modelo completo (+ s-RNY1_5P).

Figura 25: Razón de momios para s-RNY1_5P.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Material y procedimientos:

Animales y Dietas

Los animales se mantuvieron en una instalación de barrera libre de patógenos y se mantuvieron de acuerdo con el Institucional Animal care and Use Protocol de la Universidad de Niza Sophia Antipolis, de acuerdo con las regulaciones nacionales pertinentes relacionadas con el bienestar animal. Los siguientes animales fueron adquiridos de Charles River Laboratories (L'Arbresle, Francia): C57BL/6J, ApoE -/- (APOE-B6.129P2/J), y Ldlr-/- (B6.129S7-Ldlrtm1Her/J). Las fórmulas # TD02028 y TD96335 con altos niveles de colesterol (HCD) (Harlan Teklad) para ApoE -/- o Ldlr -/-, respectivamente, fueron adquiridos de Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Alemania). Los ratos macho ApoE -/- y LDLR -/- a las 8 semanas de edad fueron alimentados con HCD o dieta regular (dieta de pienso) durante 12 o 20 semanas, respectivamente. Se diseccionaron arcos aórticos, corazón y plasma sanguíneo.

Población de estudio y recopilación de datos

Los sujetos fueron seleccionados al azar de un gran estudio de casos y controles sobre la enfermedad de la arteria coronaria (CAD) referenciado como estudio GENES (Genetique et Environnement en Europe de Sud) como se describe previamente (Bouisset et al., 2012). En resumen, los pacientes varones de CAD que viven en la zona de Toulouse (suroeste de Francia) y con edades comprendidas entre los 45 y los 74 años, fueron reclutados de forma prospectiva desde 2001 a 2004, admitidos en el Departamento de Cardiología del Hospital de la Universidad de Toulouse, y sometidos a la evaluación y tratamiento de CAD estable. El CAD estable se definió por un historial de síndrome coronario agudo y de revascularización coronaria, isquemia de miocardio documentada, angina estable, o la presencia en el angiograma coronaria de una estenosis coronaria de > 50%. Durante el mismo período, los controles sanos de varones, de 45 años a 74, fueron seleccionados de la población en general utilizando las listas electorales. La estratificación por grupos de edades de 10 se utilizó para emparejar aproximadamente la distribución de edades de los controles con el de los casos. Todos los individuos fueron sometidos a un examen médico en el Departamento de Cardiología en el Hospital de la Universidad de Toulouse y completaron cuestionarios estandarizados que cubrían la edad, historial médico, variables socioeconómicas y de estilo de vida, tales como el nivel educativo, el tabaquismo y la actividad física. La actividad física se clasificó en cinco niveles, desde 1 a 4: ninguna actividad física (1), actividad física ligera durante 20 minutos una vez a la semana (2), actividad física moderada durante 20 min dos veces a la semana (3), actividad física intensa durante 20 min 3 veces a la semana o más (4). También se sometieron a un examen médico estandarizado con mediciones antropométricas y clínicas y proporcionaron muestras de sangre en ayunas. Las muestras de sangre se analizaron para determinar el colesterol sérico total, lipoproteína de alta densidad-colesterol (HDL-C), triglicéridos (TG), glucosa, γ -glutamilttransferasa (γ -GT) y proteína C-reactiva sensible (CRP) con reactivos enzimáticos en un analizador automático (Hitachi 912, Roche Diagnostics, Meylan, Francia). El LDL-colesterol (LDL-C) se calculó utilizando la fórmula de Friedewald, con VLDL-colesterol (VLDL-C) (g/L) = TG (g/L)/5, siempre que la concentración de TG fue inferior a 4 g/L (Genoux et al., 2011). Las lipoproteínas que contenían ApoB y ApoE (LPB:E) se ensayaron mediante un ensayo específico de inmuno-electrodifusión (Sebia, Francia). En el presente trabajo, 45 pacientes con CAD y 45 individuos de control emparejados por edad se extrajeron aleatoriamente para mediciones en suero de s-RNY.

En las tablas 3 y 4, los datos se presentan como porcentaje para las variables cualitativas o como la media con desviación estándar para las cuantitativas. Las variables cualitativas se compararon con la prueba de χ^2 (o prueba exacta de Fisher cuando sea necesario). Los valores medios de las variables cuantitativas se compararon con la prueba t de Student. Se utilizó Shapiro-Wilks para probar la normalidad de los residuos y la prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de las variables. Cuando los supuestos básicos de la prueba t de Student no eran satisfechos, los datos fueron transformados logarítmicamente o sometidos a una prueba de Wilcoxon Mann Whitney. Las asociaciones de s-RNY con características clínicas y marcadores biológicos se ensayaron usando correlaciones de rangos de Spearman. Los análisis fueron de dos colas y $p < 0,05$ se consideró significativo. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, IL, EE.UU.) y con el software estadístico STATA (versión 11.2, Stata Corporation, College Station, TX, EE.UU.). La prueba de ROC se calculó utilizando GraphPad Prism (versión 5.01, La Jolla, CA 92037, EE.UU.).

Declaración de Ética

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética local del hospital de Toulouse (CHU Toulouse/INSERM, presente 1-99-48, febrero de 2000) y la Comisión Nacional para el procesamiento de datos y libertades (N° 900165). El consentimiento informado por escrito se obtuvo de todos los participantes involucrados en el estudio. La recogida biológica se constituyó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki y registrados con el número CC-2008-403 en el Ministerio de Investigación y en la Agencia Regional de Salud.

Reactivos

LPS, LTA, Tg, STS, BSA, PA, ácido esteárico, ácido oleico, y ácido linoleico se adquirieron de Sigma (Saint-Quentin Fallavier, Francia). LDLox se adquirió de Clinisciences (Nanterre, Francia).

Macrófagos primarios

Se recogieron células de médula ósea de fémures y tibias de ratons macho C57BL/6J de diez semanas de edad mediante lavado con medio estéril, tal como se ha descrito anteriormente (T. Ruggiero, M. et al (2009) FASEB J 23: 2898-2908). Para diferenciar en macrófagos, las células de la médula ósea (10^6) se sembraron en placas de 10 cm en 7 ml de medio de BMDM (DMEM suplementado con 20% de suero bovino fetal bajo en endotoxina, 30% de medio acondicionado con células L929, 1% de l-glutamina, 1% Pen/Strep, 0,5% de piruvato Na, y 0,1% de β -mercaptoetanol), y se alimentó con 2,5 ml de medio fresco cada 2 días durante 7 días. Macrófagos primarios humanos se prepararon a partir de monocitos de sangre periférica obtenidos a partir de donantes sanos (Jacquel, A., et al. (2012). Blood 119, 4.527-4.531) de acuerdo con la legislación francesa en la investigación biomédica humana. Todos los participantes proporcionaron el consentimiento por escrito en el que constaba que habían recibido toda la información que necesitaban sobre el estudio y se acordó de conformidad con las normas nacionales apropiadas informados.

Transfección Celular e inmunotransferencia

Las células BMDMs y NIH-3T3 (ATCC) se transfectaron transitoriamente durante 48 h con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los siRNAs se transfectaron a la concentración final de 24 nM, mientras que los oligonucleótidos de 2'-OMe-ARN antisentido para s-RNYs (Eurogentec) se transfectaron a la concentración final de 100 nM. Cuando fue necesario, los lisados celulares se incubaron a temperatura ambiente con ARNasa A (10 mg/ml, Ambion) durante 30 min. Trescientos microgramos de proteína se inmunoprecipitaron con anticuerpos acoplados a Proteína A-Dynabeads (Invitrogen) durante 16 horas a 4°C con rotación. Los inmunoprecipitados se lavaron cuatro veces con tampón de lisis y se resuspendieron en tampón cargados con proteínas y SDS. Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE, electrotransferencia sobre membranas de PVDF, y se sondaron con anticuerpos diferentes tal como se indica.

Secuenciación de ARN pequeño

Diez microgramos de ARN totales se sometieron al procedimiento de preparación de ARN pequeño, y las bibliotecas se secuenciaron en cualquiera de las plataformas Illumina o Solid3. Para el análisis, la secuencia del adaptador 3' se eliminó usando FASTX, y las lecturas recortadas se alinearon con la base de datos del genoma y DeepBase53 utilizando Blat y Novoalign.

Hibridación in situ con fluorescencia e inmunofluorescencia

Se realizó hibridación in situ con fluorescencia acoplada con la inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente (Hu, P., et al. (2012). Nature structural & molecular biology 19, 1168-1175). Los BMDM fueron fijados en 10% formalina neutra y se hibridaron con la sonda LNA antisentido marcada con FAM. Los portaobjetos se incubaron después con un antisuero humano anti-GW182 para teñir P-cuerpos (Eystathiou, T., et al. (2003). Journal of Molecular Medicine (Berlin, Alemania) 81, 811-818). La sonda utilizada en este estudio fue adquirida de Exiqon (Dinamarca). Para inmunofluorescencia, se fijaron los senos aórtico de ratones ApoE^{-/-} en formalina al 10% neutra, se penetraron con 20% de sacarosa en PBS, y se embebieron en compuesto OCT. Se tiñeron secciones en serie de 10 μ M del seno aórtico con Mac3 de rata y anticuerpos monoclonales hnRNP A1 de ratón. Los portaobjetos se cubrieron en medio de montaje Vectashield con DAPI (Invitrogen). Los resultados se analizaron en un microscopio Leica DM5500B con una cámara HAMAMATSU ORGA-ER. La secuencia de la sonda de LNA se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para análisis RT-PCR, clonación y transferencia Northern

	Cebador directo	Cebador inverso
s-RNY1-5p de ratón y humano (RT)		5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA TTG AG -3' (SEQ ID NO: 36)
s-RNY3-5p de ratón (RT)		5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA ACA CC -3' (SEQ ID NO: 37)
s-RNY3-5p humano (RT)		5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GTT GT -3' (SEQ ID NO: 38)
s-RNY4-5p humano (RT)		5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GTT CT -3' (SEQ ID NO: 39)
cebador universal de s-RNY (pPCR)		5'-GTGCAGGGTCCGAGGT -3' (SEQ ID NO: 40)
s-RNY1-5p de ratón/humano (qPCR)	5'-TGGTCCGAAGTAGTGAGT -3' (SEQ ID NO: 41)	
s-RNY3-5p de ratón (qPCR)	5'-TTGGTCCGAGAGTAGTGGT -3' (SEQ ID NO: 42)	
s-RNY3-5p humano (qPCR)	(qPCR) TCCGAGTGCAGTGGTGTTA -3' (SEQ ID NO: 43)	
s-RNY4-5p humano (qPCR)	GGTCCGATGGTAGTGGTTAT -3' (SEQ ID NO: 44)	
s-RNY1-3p BS wt de ARNm de KLF2 (clonación)	5'- AAG GCG CAT CTG CGT ACA CAC ACA GGT GAG AAG CCT AAG GCG CAT CTG CGT ACA CAC ACA GGT GAG AAG CCT -3' (SEQ ID NO: 45)	
s-RNY 1-3p BS mutante de ARNm de KLF2	5'- AAG GCG CAT CTG CGT ACA CAC ACA GAG TGA GGA CCT AAG GCG CAT CTG CGT ACA CAC ACA GAG TGA GGA CCT -3' (SEQ ID NO: 46)	
s-RNY1-5p de ratón y humano (transferencia Northern)		5'- ACTCACTACTCTCGGACCA -3' (SEQ ID NO: 47)
s-RNY1-3p de ratón y humano (transferencia Northern)		5'-AGTCAAGTGCAGTAGTGAG -3' (SEQ ID NO: 48)
Bucle de RNY1 de ratón (transferencia Northern)		5'- TTCAATCTGTAACACTGACTG -3' (SEQ ID NO: 49)
s-RNY3-5p de ratón (transferencia Northern)		5'-ACCACTACTCTCGGACCAA -3' (SEQ ID NO: 50)
s-RNY3-5p humano (transferencia Northern)		5'-CTGGTCAAGTGAAGCAGTG -3' (SEQ ID NO: 51)
s-RNY4-5p humano (transferencia Northern)		5'-CCCACTACCATCGGACCAG -3' (SEQ ID NO: 52)
snRNA U6 (transferencia Northern)		5'-CGT TCC AAT TTT AGT ATA TGT GCT GCC GAA GCG AGC AC-3' (SEQ ID NO: 53)

Análisis de microarrays

Para el análisis del perfil de ARNm, se recogieron BMDM de 4 C57BL/6J machos y transfectaron con siRNAs contra el bucle terminal del RNY y control. 48 h después de la transfección, se aisló ARN total utilizando el kit RNAeasy (Qiagen). Las muestras de ARN se marcaron con colorante Cy3 utilizando el kit QuickAmp de entrada bajo de ARN (Agilent) según lo recomendado por el proveedor. 400 ng de la sonda de ARNc marcada se hibridaron en microarrays Agilent 8x60K de alta densidad SurePrint G3 gen de ratón GE 8x60K Agilent. La normalización de datos de microarrays se realizó con el paquete Limma disponible de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) utilizando los procedimientos de cuantiles. Se calcularon los promedios de proporciones de tratados con siRNY versus control. Se seleccionaron genes expresados diferencialmente en base a al menos una modulación de 1,2 veces el cambio entre BMDM que sobreexpresan s-RNY y control, y una prueba t de Student estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Ensayo de apoptosis

La apoptosis fue ensayada en BMDM por tinción con anexina V conjugada con Alexa 488 y Dapi como se ha descrito previamente (Jacquel, A., et al, 2012. Blood 119 (19): 4527 hasta 4531). El número de células positivas de anexina V y Dapi se contó y se expresó como un porcentaje del número total de células a partir de pocillos duplicados.

Ensayo indicador de luciferasa

Las células NIH-3T3 (80% de confluencia en placas de 96 pocillos) fueron transfectadas con Lipofectamine 2000® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo de indicador de luciferasa se realizó como se ha descrito previamente (Repetto, E., et al. (2012). PLoS Genetics 8, e1002823).

ARN en Procesamiento in vitro y reticulación en UV

ARN marcados con ^{32}P fueron sintetizados y utilizados como sustratos para cualquiera de los ensayos de procesamiento in vitro o experimentos de reticulación en UV como se ha descrito previamente (Trabucchi, M., et al (2009). Naturaleza 459, 1010-1014).

Inmunoprecipitación de ARN

La inmunoprecipitación de ARN se realizó como se ha descrito previamente (Trabucchi, M., et al (2009). Nature 459, 1010-1014) con modificaciones menores. Brevemente, los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos acoplados a Proteína A-Dynabeads (Invitrogen) a 4°C durante la noche. El ARN total se preparó utilizando Trizol (Invitrogen) y se analizó por RT-PCR cuantitativa. Las secuencias de cebadores se detallan en la Tabla 1.

Transferencia Northern

Se aisló el ARN total de células usando Trizol (Invitrogen), se separó en geles de poliacrilamida-urea al 10% y se sometió a electrotransferencia sobre membranas Hybond N+. Las membranas se hibridaron durante la noche con oligonucleótidos antisentido de ADN radiomarcado a s-RNYs en solución ExpressHyb (Clontech). Después de la hibridación, las membranas se lavaron tres veces con 2X SSC y SDS al 0,05%, dos veces con 0,1X SSC y SDS al 0,1%, se expusieron durante la noche a las pantallas de imagen, y se analizaron usando un Storm 860 PhosphorImager. Se hibridó la misma transferencia (tras extracción en SDS al 0,1% en ebullición) con tres sondas distintas, incluyendo U6 snRNA de control (Tabla 1).

Análisis de la expresión de ARNm y s-RNY

La expresión del ARN por RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo mediante el uso de procedimientos estándar. Brevemente, para el ARNm, el ARN total fue aislado de las células usando Trizol y se sintetizó ADNc con un hexonucleótido aleatorio usando SuperScript III (Invitrogen). Para la detección de s-RNY por RT-PCR cuantitativa se utilizó un procedimiento cuantitativo RT-PCR tallo-bucle de acuerdo con Chen et al. (Chen, C., et al. (2005). Nucleic Acid Research 33, e179). Brevemente, el ARN total fue aislado a partir de células, tejidos, o inmunoprecipitación utilizando Trizol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La extracción de RNA a partir del medio extracelular, plasma sanguíneo, y el suero se realizó como se ha descrito previamente (Turchinovich, A., et al (2011). Nucleic Acid Research 39, 7.223-7.233). Brevemente, se añadieron 1,2 ml de Trizol LS a 0,4 ml de plasma sanguíneo, suero o medio. A continuación (i) 5 pg de miARN-39 sintético de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39) se añadieron como un control de la eficiencia de purificación; (ii) se añadieron 1,2 µl de glucógeno (10 mg/ml) para mejorar la eficiencia de la unión de la columna de ARN. La purificación del ARN total extraído se realizó con columnas miRNeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ARN se eluyó en 30 µl de agua libre de RNasa. Se sintetizó ADNc usando un oligonucleótido largo de horquilla. Este procedimiento permite la detección de los s-RNY derivados de solamente el extremo 5' del precursor mediante análisis de RT-PCR cuantitativa, a saber, la s-RNY1-5p y s-RNY3-5p de ratón y s-RNY1-5p, s-RNY3-5p, y s-RNY4-5p de humano. Las

RT-PCR cuantitativas utilizando SYBR Green y TaqMan (Invitrogen) para cel-miR-39 se realizaron en un sistema StepOne (Applied Biosystem). Las secuencias de cebadores se detallan en la Tabla 1.

Proteínas recombinantes y anticuerpos para transferencia Western

Ago2 recombinante y hnRNP A1 se adquirieron de Sino Biological Inc. y Clinisciences, respectivamente, mientras que KSRP recombinante fue un regalo del Dr. R. Gherzi. Los anticuerpos monoclonales anti-hnRNP A1 de ratón (4B10), anti-c-Myc de ratón (9E10), anti-actina de cabra (I-19), y I κ B α (H-4) fueron adquiridos de SantaCruz. Los anticuerpos anti-La/SSB y anti-Ro60 (TROVE2) de conejo fueron adquiridos de GmbH. El anticuerpo anti-Ago2 fue adquirido de Wako Chemicals, mientras que anticuerpos anti-NOS2A y anti-KLF2 de conejo fueron de Millipore. El anticuerpo anti-KSRP fue un regalo del Dr. R. Gherzi. Los anticuerpos monoclonales anti-p53 de ratón (1C12), de anti-caspasa-3 escindida de conejo (Asp175), anti-caspasa 3 de conejo (8G10), anti-P-p38 de conejo (9211), anti-p38 de conejo (9212), anti-P-JNK de ratón (9255), y anti-P-JNK de conejo (9252) fueron adquiridos de Cell Signaling. Anti-GW182 humano fue un regalo del Dr. MJ Fritzler. El anticuerpo anti-Mac3 de ratón de rata (M3/84) fue de BD Pharmingen. La inmunofluorescencia se reveló mediante el uso de anticuerpos secundarios fluorescentes: anticuerpo anti-IgG de rata (H + L) conjugado con Alexa Fluor 488 (Cell Signaling) para el anti-Mac3 de ratón, anticuerpo anti-IgG de ratón (H + L) conjugado con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) para anti-hnRNP A1, y anticuerpo anti-IgG humano (H + L) conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen) para GW182.

Cribado de siRNA candidato

siRNAs SmartPool para el cribado se adquirieron de Thermo Scientific (Illkirch, Francia). Los BMDM se sembraron en placas de 24 pocillos y cada siRNA SmartPool siRNA se transfectó singularmente en tres pocillos. 48 horas desde la transfección, las células se dejaron sin tratar o se estimularon con 0,25 mM de PA durante 18 h, y se aisló el ARN total y se analizó por RT-PCR cuantitativa. El experimento se repitió 4 veces y se analizó estadísticamente utilizando la prueba t de Student.

El cribado incluyó enzimas implicadas en biogénesis de ARN pequeños, tales como Dicer, Drosha, DDX-5, Ago1, 2, 3 y 4, Piwil1, 2 y 4, y Elac1 (también conocido como tRNasa Z 1), así como componentes de la proteína de unión a ARN de las maquinarias de procesamiento de ARN, tales como DGCR8, TRBP-2, hnRNP A1, IIf3 (también conocido como NF90), Xpo5, KSRP, Lin28, Zc3h12a (también conocido como MCPIP1), Ews, p53, y Fus-TLS. Además, los genes implicados en la estabilidad del ARN pequeño fueron eliminados, tales como Zcchc11 (también conocido como TUTase 4), Zcchc6 (también conocido como TUTase 7), Xrn2, Exosc2, y RNASEL.

siRNA y oligonucleótidos de ARN modificados

siRNA contra p53 y Ro60 del ratón fueron adquiridos de Ambion. siRNAs personalizados u oligonucleótidos de ARN modificados fueron sintetizados por Eurogentec:

- Ago2 de ratón 5'- GUUGUAUUGUUUAGCGAUU -3' (SEQ ID NO: 22)
- hnRNP A1 de ratón 5'- GCACUAGCCAUCUCUUGCUUC -3' (SEQ ID NO: 23)
- La/SSB de ratón 5'- UUCCUUUAAAUCUCCACC -3' (SEQ ID NO: 25)
- Dicer de ratón 5'UUCAGCUCGAUGGAUUGGUG 3' (SEQ ID NO: 55)
- siRNA de ratón contra bucle terminal de RNY1 5'- CAGUCAGUUACAGAUUGAA -3' (SEQ ID NO: 56)
- si-RNA de ratón contra bucle terminal de RNY3 5 'CAACCAGUUACAGAUUUCU - 3' (SEQ ID NO: 57)
- 2'-OMe-ARN antisentido de ratón a s-RNY1-5p 5 'UUGAGAUAACUCACUACCUUCGGACCAGCC-3' (SEQ ID NO: 26)
- 2'-OMe-ARN antisentido de ratón a s-RNY1- 3p 5 'AAGACUAGUCAAGUGCAGUAGUGAGAAG -3' (SEQ ID NO: 27)
- 2'-OMe-ARN antisentido de ratón a s-RNY3-5p 5' UAAACACCACUACUCUCGGACCAACC -3' (SEQ ID NO: 28).

EJEMPLO 2: Estímulos pro-apoptóticos y aterogénicos inducen la expresión de ARN pequeños derivados de RNY en macrófagos

Se ha realizado una secuenciación de ARN pequeños de alto rendimiento en macrófagos primarios estimulados con cualquiera de estaurosporina (STS) o la extracción de tratamiento con factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Mediante el mapeo de los datos de secuenciación a bases de datos de ARN pequeños, incluyendo miRNAs, piRNAs, snoRNAs, riRNAs, y tRNAs utilizando el programa Novoalign (Figura 1A), se demostró que los macrófagos apoptóticos expresaron altamente ARN pequeños derivados de RNY (Figura 1B). ARN pequeños derivados de 3 RNY fueron encontrados en ratón y 6 en humanos variando en longitud de ~ 24 a ~34 nt que se sitúan al final y las regiones tallo de los RNY (Figuras 1B, 2A y 2B). Estos ARN pequeños se hará referencia en lo sucesivo como s-RNYs, siendo el s-RNY1-5p de ratón previamente clasificada como piRNA (piRNABank, <http://piRNABank.ibab.ac.in/>) y el s-RNY5-3p humano como miRNA (Meiri, E., et al (2010) Nucleic Acids Research 38, 6234 a 6246; Schotte, D. (2009) Leukemia 23, 313-322). Los genes de RNY cuentan cuatro copias en humanos (RNY1, 3, 4, y 5) y dos en el genoma de ratón (RNY 1 y 3), y su secuencia está bien conservada en vertebrados. El análisis de transferencia Northern confirmó que la expresión de s-RNYs (s-RNY1-5p, s-RNY1-3p, s-RNY3-5p y s-RNY4-5p) se indujo en los macrófagos primarios humanos tras el tratamiento con STS o extracción de M-CSF (datos

no mostrados).

Utilizando el procedimiento de RT-qPCR tallo-bucle descrito previamente (Mestdagh, P. et al (2008) Nucleic Acid Research 36, E143), se ha investigado la expresión de los s-RNY derivado del extremo 5' de RNYs en macrófagos tratados con el estímulo pro-apoptótico de ácido lipoteicoico (LTA) de las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* en combinación con factor de estrés un retículo endoplásmico (ER), tales como taspigargina (Tg). El estrés de ER hace los macrófagos susceptibles a la apoptosis en la cara de otros estímulos pro-apoptóticos. El tratamiento con LTA/taspigargina induce la expresión de s-RNYs en macrófagos derivados de médula (BMDMs) (Figura 3A), lo que sugiere un mecanismo general de la inducción s-RNY en la eliminación de macrófagos.

Un número de lípidos y lipoproteínas asociadas con enfermedades ateroscleróticas conspiran con el estrés ER para causar apoptosis de los macrófagos y la progresión de las lesiones ateroscleróticas. Para determinar si s-RNYs se inducen en macrófagos estimulados con estímulos atero-relevante, BMDMs han sido tratados con LDLox, solo o en presencia de taspigargina. Mientras que dosis bajas de OxLDL o thapsigargin solo no tuvo ningún efecto, un mayor nivel de OxLDL o ambos reactivos juntos sinérgicamente indujeron s-RNY expresión (análisis de RT-PCR para la s-RNY1-5p y s-RNY3-5p (véase la Figura 3B) y Northern El análisis de transferencia de s-RNY1-3p (datos no mostrados)). Se observaron resultados similares cuando BMDMs ER-tensado se incubaron con acetilada-LDL (acLDL) (Figura 3C). Los diferentes tipos de ácidos grasos se han probado a continuación, para determinar si también pueden desatar inducción s-RNYs en los macrófagos, y si es así, si este efecto se amplificó por factor de estrés ER. Como se muestra en la Figura 4A, los ácidos grasos insaturados, tales como ácido oleico y ácido linoleico no indujeron la expresión s-RNY cuando se administran solos o en combinación con taspigargina. Sin embargo, cuando los ácidos grasos saturados, tales como ácido palmítico (PA) y esteárico, se les dio solo se indujo la expresión s-RNY, y este efecto se incrementó notablemente en el contexto de análisis thapsigargin inducida por estrés ER (RT-PCR para s-RNY1-5p y s-RNY3-5p (ver Figuras 4A) y análisis de transferencia Northern para s-RNY1-3p y s-RNY1-5p (datos no mostrados)). Por otra parte, para probar si las s-RNYs son inducidos en modelos animales para la aterosclerosis, ApoE^{-/-}, LDLR^{-/-}, y los ratones de control se han comparado. Ratones ApoE^{-/-} y LDLR^{-/-} fueron alimentados ya sea con dieta de pienso o una dieta aterogénica que contiene 1,3% o 1,25% de colesterol, respectivamente. Como se muestra en las figuras 4B y 4C, RT-PCR cuantitativa a partir de arcos aórticos microdisecionados reveló que el s-RNYs fueron regulados por incremento significativamente en ratones ApoE^{-/-} y LDLR^{-/-} en comparación con el control, y que dieta alta en colesterol (HCD) aumentó significativamente sus niveles de expresión. Por lo tanto, estos resultados indican fuertemente que se induce la expresión de s-RNY en macrófagos expuestos a diversos tipos de estímulos apoptóticos, incluyendo aquellos que son relevantes para el desarrollo de la aterosclerosis. Por otra parte, s-RNYs se expresan en aortas de los modelos de ratón para la aterosclerosis, elevando la posibilidad de que puedan desempeñar un papel en la regulación del desarrollo de la lesión.

EJEMPLO 3: Procesamiento dependiente de Ago2 y hnRNP A1 de RNY en los macrófagos cargados de lípidos

En consonancia con la observación de que la inducción de la expresión s-RNY (por retirada M-CSF o adición de OxLDL en combinación con Tg, o PA en BMDM; o adición de STS en macrófagos primarios humanos cultivados) siempre va acompañada de una reducción de RNY (transferencia Northern análisis realizados para s-RNY1-3p/RNY1, s-RNY1-5p/RNY1, s-RNY3-5p/RNY3, y s-RNY4-5p/RNY4; datos no mostrados), una regulación positiva de procesamiento de RNYs tiene ha encontrado in vitro utilizando extractos de células totales procedentes de PA tratados con BMDMs en comparación con el control no estimulado (análisis realizados para RNY1/s-RNY1-3p y s-RNY1-5p, y RNY3/s-RNY3-5p; datos no mostrados), en general lo que sugiere que la expresión de s-RNY se modula a nivel post-transcripcional. Debido RNYs forman una estructura secundaria de horquilla bastante similar a la de los genes miARN precursores (Figura 2B), una participación de las pequeñas componentes de maquinaria de procesamiento de ARN en s-RNY maduración se ha planteado la hipótesis. Para validar esta hipótesis, una pantalla de siRNA candidato ha realizado en BMDMs tratados con PA utilizando siRNAs inteligente piscina para derribar ARNasa y proteínas de unión a ARN implicados en la pequeña biogénesis de ARN, así como Ro60 y La/SSB como proteínas de unión a ARN asociados a las RNYs y formando el llamado ribonucleoprotein Ro (RNP) complejo (Figura 5). Entre los ácidos grasos saturados, PA es de lejos el más potente promotor de células espumosas de macrófagos y la apoptosis en la aterosclerosis. Como se muestra en la Figura 6, el agotamiento de La/SSB, Ro60, p53, Ago2, y hnRNP A1 disminuyó significativamente la inducción de la expresión s-RNY, en comparación con GAPDH y no dirigidos controles siRNA, evaluada por RT-PCR cuantitativa de BMDMs estimulado con PA. En todos estos casos, la expresión de s-RNY se redujo estadísticamente por más de la mitad. Sorprendentemente, se ha observado un aumento significativo de los niveles de expresión s-RNY eliminando Dicer. El análisis de transferencia Northern de BMDMs tratados con PA transfectadas con diferentes siRNAs de los utilizados en la pantalla de siRNA, confirmó que los niveles de s-RNYs se redujeron en un 70-90% a la caída de Ago2, hnRNP A1, Ro60, La/SSB, y p53, mientras que aumentó en Dicer desmontables (datos no mostrados). Es importante destacar que, se ha observado que al Ago2 o hnRNP A1 caída en BMDMs tratados con PA la disminución de la inducción nivel s-RNY fue acompañado por un aumento de los RNYs comparación con el control (análisis de transferencia Northern realiza para s-RNY1-3p, s-RNY1-5p, y s-RNY3-5p; datos no mostrados), lo que sugiere que tanto Ago2 y hnRNP A1 pueden controlar directamente la maduración de s-RNYs en los macrófagos cargados de lípidos. Por el contrario, desmontables de Ro60 y La/SSB disminuyó ambos s-RNYs y RNYs (datos no mostrados), lo que sugiere que estas dos proteínas pueden estabilizar RNYs y/o s-RNYs, como se propuso anteriormente. En apoyo a un papel directo de Ago2 y

hnRNP A1 en la regulación de procesamiento RNY, ambos RNYS pero no Gapdh (control negativo) se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra Ago2 o hnRNP A1 en BMDMs tratados con PA mientras que los anticuerpos anti-La/SSB y anti-Ro60 hizo RNYS inmunoprecipitate de ambas células estimuladas y no estimuladas (Figura 7). Sin embargo, no se inmunoprecipitan con un anticuerpo anti-p53. En conjunto, estos resultados indican claramente que tanto Ago2 y hnRNP A1 pueden controlar directamente el procesamiento RNYS en los macrófagos cargados de lípidos.

Entre las proteínas que se encuentran en la pantalla de siRNA, solamente Ago2 es una enzima. Ago2 tiene una actividad endorribonucleasa de ARN de doble cadena, es el componente catalítico de la RISC y está implicado en el procesamiento de miR-451. Ago2 se asocia con diferentes clases de pequeños ARN no codificantes, incluyendo miRNAs y siRNAs. Para establecer si Ago2 interactúa directamente con RNYS, proteína recombinante y sintético radiomarcado-RNYS (RNY1, RNY3) se han utilizado en ensayos de UV-reticulación, lo que indica una interacción directa Ago2-RNYS, mientras que el ARN TNF-ARE, utilizado como control negativo, no reticular (datos no mostrados). Estos datos demuestran la carga directa de los RNYS en Ago2 y plantearon la posibilidad de que Ago2 podría catalizar directamente la maduración de s-RNYS. Para comprobar esta hipótesis un ensayo de procesamiento in vitro se ha realizado utilizando RNYS desnudos y los Ago2 recombinante. El ensayo de Procesamiento con RNY1 y RNY3 muestra que Ago2 recombinante puede escindir ambos RNYS pero fue incapaz de generar la forma madura final, como se especula teniendo en cuenta la estructura secundaria predicha de RNYS (datos no mostrados y la Figura 2B). Sin embargo, este experimento solo no puede excluir la aparición de diferentes sitios de escisión in vivo debido a un complejo de proteínas asociado con Ago2, como era de esperar de las propiedades bioquímicas bien establecidos de Ago2. De hecho, el agotamiento de Ago2 en extractos BMDM detuvo la actividad de procesamiento de RNY mientras que la adición de la Ago2 recombinante era suficiente para rescatar el bloqueo y para generar la maduración completa de s-RNYS, como se ha demostrado para RNY3 (datos no mostrados).

Curiosamente, se ha informado recientemente de que ambas proteínas asociadas RNY, La/SSB y Ro60, son componentes integrales del complejo Ago2. En particular, los informes previos demostraron que La/SSB es ambos implicados en el procesamiento y facturación de RISC miARN mediante la promoción de la liberación de ARNm escindido. La coimmunoprecipitation experimentos en células NIH-3T3 revelaron que Ago2 interactuó con La/SSB tanto en las células untreated- y tratados con PA, mientras que con Ro60 solamente tras el tratamiento PA (datos no mostrados), indicando que Ago2 se asocia al complejo Ro RNP en lípidos Las células cargadas. Además, los anticuerpos contra Ago2, La/SSB, o Ro60 inmunoprecipitada s-RNYS de BMDMs estimuladas-PA (Figuras 8A y 8B), lo que indica la formación de un complejo de proteínas que contiene s-RNYS. En conclusión, estos datos demostraron fuertemente una maduración s-RNY que procede con una escisión Ago2 mediada.

A continuación, se ha explorado la posibilidad de que la proteína de unión a ARN de una cadena hnRNP A1 favorezca el procesamiento dependiente de Ago2 de RNY en macrófagos tratados con PA. hnRNP A1 es una proteína lanzadera de núcleo-citoplasma con funciones en muchos aspectos del metabolismo del ARN. Recientemente se ha descrito que hnRNP A1 está implicada en el procesamiento de miRNA mediante la unión específica a la estructura de bucle terminal de una sola cadena de precursores de miRNA seleccionados para modular finamente la biogénesis. En particular, se une a los precursores de miRNA para inducir un cambio en la estructura secundaria creando un sitio de escisión más favorable para Drosha. Los datos revelan que hnRNP A1 coimmunoprecipitó con Ro60 (datos no mostrados) y que el anticuerpo anti-hnRNP A1 inmunoprecipitó ambos RNY en BMDM estimulados con PA (Figura 7). Para establecer si hnRNP A1 interactúa directamente con los RNY, se han utilizado proteína recombinante y RNY transcrito in vitro en ensayos de reticulación con UV, lo que indicó una interacción directa hnRNP A1-RNY (RNY1 y RNY3; datos no mostrados) mientras que la proteína de unión a ARN KSRP, usada como control negativo, no se reticuló a RNY1 o RNY3 (datos no mostrados). El pri-let7-a, que se utilizó como control positivo, se reticuló a KSRP (datos no mostrados). Curiosamente, tanto RNY1 como RNY3 comparten algunas similitudes con la secuencia de unión de hnRNP A1 al bucle de terminal de los precursores de miR-18a (Figura 2), lo que indica que, como para los precursores de miARN, la unión de hnRNP A1 a RNY puede crear un sitio de escisión más favorable. De hecho, la presencia de hnRNP A1 promueve la escisión de Ago2 (datos no mostrados). Además, debido a que la eliminación de hnRNP A1 en BMDM tratados con PA, abolió la interacción de Ago2 con RNY1 y RNY3 (Figura 9A), se concluyó que hnRNP A1 favorece la asociación de Ago2 a RNYS en macrófagos cargados de lípidos. Por lo tanto, estos datos indican que hnRNP A1 es un regulador clave de procesamiento de RNY en macrófagos cargados de lípidos basados en su unión por afinidad a RNY. Tras la unión, hnRNP A1 podría optimizar el posicionamiento/reclutamiento de Ago2 a través de una interacción proteína-proteína. De hecho, en BMDM estimulados con PA, se ha demostrado una independencia de RNasa de la interacción entre Ago2 y hnRNP A1 (datos no mostrados). En apoyo a esta conclusión, los niveles citoplasmáticos de hnRNP A1 aumentaron drásticamente durante el tratamiento con PA de BMDM (datos no mostrados) y en los macrófagos Mac3-positivos en seno aórtico de ratones *ApoE^{-/-}* (datos no presentados). La localización citoplásmica de hnRNP A1 promovería la interacción a Ago2 y, a continuación, el procesamiento de RNY. En general, estos resultados indican que en los macrófagos cargados de lípidos el procesamiento de RNY está mediado por el complejo Ago2/hnRNP A1.

EJEMPLO 4: Regulación después de la transcripción de los ARNm diana por s-RNY

Dado que el s-RNYS están asociados con Ago2 (Figura 8B), la posibilidad de que puedan ejercer un control post-

transcripcional de la expresión génica comparable a la de miRNAs ha sido explorado, para apuntar mRNAs por reconocimiento de secuencias complementarias. Se ha determinado primero si s-RNYs localizar a los órganos de procesamiento (P-cuerpos), que sirven como sitios para la degradación del ARN mediada por ARN pequeños, tales como miRNAs, piRNAs, y riRNAs. Una hibridación fluorescente in situ se ha realizado seguido de inmunotinción (inmuno-FISH) usando una sonda de LNA conjugado FAM a s-RNY1-5p junto con la tinción de inmunofluorescencia de GW182, como marcador para los P-cuerpos. A pesar de que la sonda de LNA se usa aquí puede reconocer tanto RNY1 y s-RNY1-5p, un cambio en el patrón de tinción-LNA se ha notado en BMDMs al PA estímulo. En BMDMs sin tratar la señal RNY1 se difundió en todo el citoplasma, mientras que en BMDMs tratados con PA el/señal de s-RNY1-5p RNY1 era un patrón de tinción dot citoplásmica similar a la de GW182 (datos no mostrados). Notablemente, la señal de RNY1/s-RNY1-5p parcialmente colocalized con GW182 en BMDM tratado-PA (datos no mostrados). Lo más importante, el análisis de ARN de inmunoprecipitación demostraron que GW182 interactúa con s-RNYs en BMDMs tratado-PA (Figura 9B). Por lo tanto, estos datos indican que el s-RNYs localizar a los P-cuerpos en los macrófagos cargados de lípidos.

Para determinar la existencia de objetivos directos de la s-RNYs, experimentos de microarrays se realizaron de BMDMs sobreexpresan s-RNYs y control. Debido siRNA contra el bucle terminal del RNY1 o RNY3 genera s-RNYs asociados a Ro60 imitando la inducción de la transformación que se producen en los macrófagos cargados de lípidos y macrófagos apoptóticos (demostrado para s-RNY1-3p, S-RNY1-5p, y s -RNY3-5p; datos no mostrados), esta estrategia se ha usado en lugar de sobreexpresar ectópicos imitan s-RNYs. Este enfoque sería evitar los efectos fuera de objetivo debido a la sobreexpresión de la ectópicos s-RNYs. Se esperaba directos ARNm diana s-RNY ser enriquecido entre los ARNm que se sobreexpresa dowregulated en BMDMs s-RNYs comparación con el control.

Las 57 mRNAs estadísticamente downregulated de al menos 1,2 veces el cambio en BMDMs sobreexpresados-s-RNYs se analizaron para la presencia de posibles sitios de unión para s-RNYs utilizando Sylamer programa bioinformático (van Dongen, S., et al (2008) Nature Methods 5, 1023-1025). Debido miRNAs utilizan una secuencia de semillas de 6-8 nt en su extremo 5' para dirigirse tanto a la región 3' no traducida (3UTR) y la región codificante (CDS) de los ARNm, también se ha buscado durante al menos 7 nt de secuencia complementaria entre la secuencia de final s-RNYs 5' y ambos 3UTR y CDS de los genes regulados negativamente. Como era de esperar se observó un enriquecimiento significativo de los objetivos de s-RNYs en los mRNAs downregulated, alrededor del 56% (32 mRNAs) (Figuras 10A y 10B). En consecuencia, los genes regulados por s-RNYs serían afectados en los macrófagos tratados con PA transfectadas por los inhibidores de siAgo2 o s-RNYs. De hecho, la expresión de al menos 20/32 mRNAs (aproximadamente 62%) fueron Ago2 y s-RNYs dependiente, tal como se evaluó por RT-PCR cuantitativa en BMDMs tratados con PA transfectadas con siAgo2, 2'-OMe-ARN antisentido oligonucleótidos para s -RNYs, o de control (Figura 11, y datos no mostrados). Estos datos indican que el perfil de expresión de ARNm alterado de BMDMs expresando s-RNYs exhibe una firma que podría estar mediado por un objetivo directo de mRNA por s-RNYs.

Curiosamente, en la lista de los posibles ARNm que reconocen s-RNY, algunos genes han sido claramente demostrado ser importante en la regulación de la patogénesis de la aterosclerosis, la supervivencia celular y la respuesta anti-inflamatoria Fos, factor de Krüppel-como 2 (KLF2), Zfyve28, romboidal familia-1 (Rhbdf1), Fgfr1, lisil oxidasa (LOX) y NR4A1 (también conocido como Nur77). En particular, KLF2 es un factor de transcripción que tiene un anti-apoptóticos y un papel anti-inflamatorio en los macrófagos. KLF2 es downregulated en las lesiones ateroscleróticas de ratones ApoE ^{-/-} y LDLR ^{-/-} en comparación con ratones control y que llevan el doble knockout para ApoE y KLF2 desarrollan lesiones más graves y más rápido ateroscleróticas comparación con el control, lo que indica un papel protector de este gen. Los experimentos de transferencia Western confirmó que la regulación a la baja de la expresión KLF2 en BMDMs tratado-PA fue de hecho rescatado por la caída de Ago2 o de s-RNYs (datos no mostrados), indicando un papel importante jugado por s-RNYs en la regulación de la expresión de este gen. De acuerdo con las predicciones bioinformáticas, hay un único sitio de unión s-RNY1-3p en KLF2 mRNA (Figura 12A). Secuencia de conservación través de los vertebrados era más fuerte en el segmento que muestra complementaria a la región semilla de s-RNY1-3p (Figura 12B). Para evaluar si KLF2 mRNA está dirigido directamente por s-RNY1-3p, un constructo indicador se ha hecho que contiene 2 copias de la de tipo salvaje (wt) secuencia de KLF2 que tiene el sitio de unión para s-RNY1-3p, y el mutante clonado aguas abajo de un CDS de luciferasa. Es importante destacar que, el tratamiento PA de las células NIH-3T3 reprimió la actividad de luciferasa del constructo informador que contiene la secuencia en peso que fue rescatado por la caída de s-RNY1-3p (Figura 12C). En contraste, la construcción informadora de mutante no se vio afectada. En conjunto, estos datos indican que la expresión s-RNY afecta a la modulación de la expresión génica en macrófagos cargados de lípidos mediante la regulación directamente a nivel post-transcripcional un subconjunto crítico de mRNAs de la patogénesis de desarrollo de la aterosclerosis, como se ha demostrado para KLF2.

EJEMPLO 5: s-RNYs regulan la apoptosis y la respuesta inflamatoria en los macrófagos cargados de lípidos

De acuerdo con informes anteriores (Scull, CM, y Tabas, I. (2011) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 31, 2792-2797; Seimon, TA et al (2010) Cell Metabolism 12, 467-482.), las figuras 13A y 13B muestran una activación de la apoptosis en los macrófagos tratados con estímulos pro-aterogénicas, tales como PA o Tg en combinación con LDLox. Por lo tanto, se han evaluado los efectos de la s-RNYs en BMDMs apoptosis mediante

citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 13A, inducción de la s-RNYs maduración mediante el uso de siRNA contra el bucle terminal del RNYs provoca una regulación al alza de la apoptosis mediada por el tratamiento PA, que es rescatado por co-transfección de los oligonucleótidos de 2'-OMe-ARN antisentido (SEC ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28) a s-RNYs. Por otra parte, se observa una regulación a la baja de la apoptosis cuando la expresión s-RNY endógeno es derribado en BMDMs tratados con PA o LDLox (Figuras 13A y 13B). En particular, mediante la promoción de s-RNY maduración se induce la apoptosis en BMDMs no tratados, que también es rescatado por co-transfección de los oligonucleótidos antisentido de 2'-OMe-ARN a s-RNYs (Figura 13C). Además, 2'-OMe-ARN oligonucleótido antisentido a s-RNYs inhibe la activación de la caspasa-3 en BMDMs tratados con PA (datos no mostrados), mientras que s-RNYs sobreexpresión es capaz de activar en BMDMs no estimuladas (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados indican que los estímulos inducidos por s-RNYs aterogénicas son un componente intrínseco de la maquinaria de regulación de la apoptosis en los macrófagos cargados de lípidos.

Dado que el tratamiento PA promueve tanto la apoptosis y la respuesta inflamatoria en los macrófagos mediante la regulación de las vías de señalización receptores de tipo Toll aguas abajo de activación (TLR), incluyendo la quinasa c-Jun NH2-terminal (JNK), NF- κ B y p38, se ha planteado la hipótesis de que s-RNYs puede regular el modo de PA de la acción en los macrófagos por última instancia, la modulación de estas vías de señalización. Los experimentos de tiempo revelaron que la activación de p38 reforzada con PA, que depende de la fosforilación de p38, empezó a las 9 h mientras que la activación de NF- κ B, que depende de la degradación de I κ B α , empezó después de 9 h de tratamiento (datos no mostrados). Como se informó anteriormente, el tratamiento ácidos grasos libres de BMDMs no mejoró significativamente la activación de JNK después de la fosforilación (datos no mostrados). Curiosamente, la expresión de s-RNY fue inducida por 9 h de tratamiento PA en BMDMs (Figura 14A), sugiriendo una correlación de temporización entre la inducción s-RNYs y activación de señalización celular, y un posible papel de la s-RNYs en la regulación de ellos. De hecho, los inventores han demostrado que NF-kappa B y la activación p-38 están ambos reducidos en s-RNYs caída en BMDMs tratados con PA (datos no mostrados), indicando que el s-RNYs promueven la activación de ambas vías de señalización. En consonancia con esta conclusión, s-RNYs sobreexpresión en BMDMs aumentó fuertemente la expresión inducida-PA de genes NF-kappa B-objetivo, como se demostró para el óxido nítrico sintasa 2 (NOS2A) (datos no mostrados). Por otra parte, el efecto de inducir s-RNY maduración en la regulación de la expresión de citoquinas de defunción y óxido nítrico activados por vía de NF- κ B ha sido probado en BMDMs tratados con el lipopolisacárido activador de macrófagos general (LPS). Como se muestra en la Figura 15, s-RNYs mejorado una regulación positiva significativa de los ARNm que codifican para NOS2A, interleucina (IL) -6, IL-12b, y IL-1b. Por lo tanto estos datos indican que el s-RNYs activan p38 y NF-kappa B vías para promover en última instancia, la muerte celular y la respuesta pro-inflamatoria en los macrófagos.

EJEMPLO 6: s-RNYs son regulados por incremento en la sangre de modelos de ratón para la aterosclerosis y en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria

Recientemente, se han encontrado cantidades significativas de miRNA en los fluidos corporales extracelulares, incluyendo sangre, orina, saliva y semen. Algunos miRNA circulantes en la sangre se han revelado con éxito como biomarcadores para varios trastornos humanos, tales como muchos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y lesiones cerebrales y hepáticas. Para evaluar si s-RNY puede ser considerado como nuevos biomarcadores para enfermedades derivadas de aterosclerosis, se ha determinado primero la presencia de s-RNY en el medio extracelular. Para ello, se aisló ARN del medio de BMDM tratado con PA y se midieron los niveles de expresión de s-RNY mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 14B). El tratamiento con PA dio lugar a un enriquecimiento de ~ 100 veces de s-RNY en el medio extracelular en comparación con el control. Como los miRNA, los s-RNYs también son sorprendentemente estables en medio de cultivo celular. De hecho, la transferencia Northern de una combinación de medio y residuos de BMDM tratados con STS en diferentes puntos temporales reveló que los s-RNY fueron significativamente estables en el espacio extracelular (análisis de transferencia Northern que muestra la estabilidad de s-RNY1-5p en BMDM estimulados con 1 μ M de estaurosporina (STS) durante 72 horas; datos no mostrados). Este resultado puede indicar que la estabilidad de S-RNY es causada probablemente por su asociación con complejo de proteínas, microvesículas, exosomas, cuerpos apoptóticos, o lipoproteínas, tal como se ha demostrado recientemente para miRNA extracelulares. De acuerdo con informes anteriores, los resultados de transferencia Northern muestran que las especies no-miARN, tales como U6 snRNA, son extremadamente inestables en el medio extracelular (datos no mostrados).

Para probar si los s-RNY están significativamente presentes en la sangre de modelos animales para la aterosclerosis, se han comparado los niveles de expresión de s-RNY en el plasma sanguíneo de ratones *ApoE*^{-/-}, *Ldlr*^{-/-} y de control. Los animales fueron alimentados con dieta de pienso o HCD. Tal como se muestra en la Figura 16, la RT-PCR cuantitativa de plasma de sangre reveló que los s-RNY se regularon por incremento significativamente en ratones *ApoE*^{-/-} y *LDLR*^{-/-} en comparación con el control, y aún más cuando los ratones fueron alimentados con HCD.

Por lo tanto, debido a estos datos, se puede prever lógicamente que los s-RNY se pueden encontrar en cantidades significativas en los fluidos corporales humanos de pacientes con enfermedades relacionadas con la aterosclerosis. Para validar esta hipótesis, la expresión de los s-RNY se midió en 45 pacientes varones con enfermedad coronaria estable (CAD) y 45 sujetos varones normolipémicos sanos emparejados por la edad, en el contexto de un estudio de casos y controles (Bouisset F. et al. (2012) The American journal of cardiology 110, 197-

202). Las variables metabólicas y clínicas de los individuos con CAD y de control se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Características clínicas y biológicas de la población de estudio

	Casos (n = 45)	Controles (n = 45)	P
Edad (años)	59,6 (± 8,2)	59,2 (± 9,3)	0,84
Cintura (cm)	97,0 (± 10,4)	97,0 (± 13,1)	0,86
IMC (kg/m ²)	26,8 (± 4,0)	27,8 (± 5,4)	0,29
Triglicéridos (g/L) ^a	1,59 (± 0,74)	1,21 (± 0,73)	0,02
Colesterol total (g/L)	2,16 (± 0,41)	2,20 (± 0,40)	0,70
LDL-C (g/L)	1,39 (± 0,40)	1,41 (± 0,34)	0,82
HDL-C (g/L)	0,48 (± 0,15)	0,55 (± 0,13)	0,003
apoB (g/L)	1,12 (± 0,24)	1,06 (± 0,21)	0,20
apoA-I (g/L)	1,24 (± 0,25)	1,51 (± 0,24)	0,001
LpB:E (mg/L)	85,6 (± 44,8)	45,3 (± 45,6)	0,001
γ-GT (IU/L)	53,3 (± 34,1)	40,0 (± 32,0)	0,06
CRP ^b (mg/L)	5,8 (± 3,8)	2,2 (± 2,8)	0,003
Actividad física ^c	1,9 (± 0,8)	2,3 (± 0,9)	0,03
s-RNY1-5p^d	2,09 (± 0,79)	0,39 (± 0,57)	0,001

Los datos se expresan en media (± SD) o %; γ-GT: γ-glutamilttransferasa; CRP: proteína C reactiva; IMC: índice de masa corporal.
^a datos transformados con log; ^b media geométrica; ^c nivel de actividad física 1 a 4; ^d valor de la raíz cuadrada.

5 Entre los marcadores metabólicos, el colesterol total o LDL-colesterol (LDL-C) no fueron significativamente diferentes entre las dos cohortes, probablemente reflejando los efectos de los fármacos reductores de lípidos en pacientes de CAD. Sin embargo, los pacientes con CAD mostraron niveles más altos de lípidos pro-aterogénicos, tales como triglicéridos y lipoproteínas que contienen ApoB y ApoE (LPB:E), aumento de la CRP, disminución de los marcadores de lipoproteínas de alta densidad (HDL) ateroprotectoras, tales como los niveles de HDL-colesterol (HDL-C) y apoA-I. El índice de masa corporal (IMC) y la circunferencia de la cintura no fueron significativamente diferentes entre los casos y los controles, pero la actividad física fue menor en los casos y se encontró el 84,4% de los fumadores actuales o anteriores en los casos en contra de 55,6% en los individuos de control. En conjunto, estas características clínicas y biológicas reflejan un aumento de la prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares clásicos en pacientes con CAD. Se ha investigado una desregulación de la expresión de s-RNY en el suero de pacientes con CAD en comparación con los controles sanos. Los datos muestran una regulación por aumento significativa de la expresión de s-RNY1-5p en pacientes con CAD (p <0,001, Tabla 2 y la Figura 17A). s-RNY4-5p también se detectó en el suero humano y se encontró que estaba regulado por aumento en pacientes con CAD en suero en comparación con individuos de control (p <0,001, Tabla 3 y Figura 18A), mientras que s-RNY3-5p no se detectó en pacientes de CAD y control. Es importante destacar que se investigó la correlación entre los niveles de s-RNY1-5p y parámetros metabólicos individuales y marcadores de riesgo cardiovascular (Tabla 4).

Tabla 3: Características clínicas y biológicas de la población de estudio (s-RNY4-5p)

	Casos (n = 30)	Controles (n = 19)	P
Edad (años)	59,2 (± 7,7)	59,1 (± 8,6)	0,98
Cintura (cm)	98,0 (± 11,8)	101,0 (± 15,1)	0,52
IMC (kg/m ²)	27,4 (± 4,7)	29,5 (± 6,8)	0,25
Triglicéridos (g/L) ^a	1,56 (± 0,76)	1,56 (± 0,93)	0,97
Colesterol total (g/L)	2,15 (± 0,38)	2,35 (± 0,47)	0,10
LDL-C (g/L)	1,37 (± 0,35)	1,52 (± 0,42)	0,20
HDL-C (g/L)	0,46 (± 0,17)	0,52 (± 0,12)	0,14
apoB (g/L)	1,14 (± 0,25)	1,08 (± 0,26)	0,49
apoA-I (g/L)	1,23 (± 0,28)	1,55 (± 0,26)	0,001
LpB:E (mg/L)	73,2 (± 43,7)	45,9 (± 58,6)	0,07
γ-GT (IU/L)	55,9 (± 39,5)	45,7 (± 40,2)	0,49
CRP ^b (mg/L)	6,9 (± 3,7)	2,6 (± 4,6)	0,006
Actividad física ^c	1,9 (± 0,8)	2,1 (± 0,9)	0,34
s-RNY4-5p^d	4,43 (± 1,00)	2,75 (± 0,99)	0,001

Los datos se expresan en media (± SD) o %; γ-GT: γ-glutamilttransferasa; CRP: proteína C reactiva; IMC: índice de masa corporal.
^a datos transformados con log; ^b media geométrica; ^c nivel de actividad física 1 a 4; ^d valor de la raíz cuadrada.

Tabla 4. Coeficientes de correlación de rango de Spearman entre s-RNYs y algunos parámetros metabólicos y factores de riesgo cardiovasculares en la población de estudio

	s-RNY1-5p [#] (n = 90)	p	s-RNY4-5p [#] (n = 49)	p
Edad (años)	0,01	0,91	-0,22	0,13
Cintura (cm)	-0,02	0,83	-0,08	0,60
IMC (kg/m ²)	-0,10	0,35	-0,14	0,34
Triglicéridos (g/L) ^a	0,24	0,02	0,33	0,03
Colesterol total (g/L)	-0,07	0,48	-0,06	0,69
LDL-C (g/L)	-0,07	0,55	-0,03	0,84
HDL-C (g/L)	-0,37	0,001	-0,27	0,06
apoB (g/L)	0,17	0,11	0,19	0,19
apoA-I (g/L)	-0,56	0,001	-0,39	0,006
LpB:E (mg/L)	0,36	0,001	0,52	0,001
γ-GT (IU/L)	0,28	0,009	0,34	0,02
CRP ^b (mg/L)	0,43	0,001	0,47	0,001
Actividad física ^c	-0,21	0,05	-0,34	0,02

Correlación de rangos de Spearman; γ-GT: γ-glutamilttransferasa; CRP: proteína C reactiva; IMC: índice de masa corporal.
^anivel de actividad física 1 a 4

- 5 s-RNY1-5p se correlacionó positivamente con los lípidos pro-aterogénicos (triglicéridos y LPB:E) y negativamente con marcadores de HDL (HDL-C y apoA-I). Los factores ambientales, tales como la actividad física y una condición inflamatoria, tal como se documenta por una PCR elevada, muestran una correlación positiva con RNY1-5p (Tabla 4). Se encontraron las mismas correlaciones para s-RNY4-5p (Tabla 4). En general, estos datos indican una fuerte correlación entre los s-RNYs y el riesgo de CAD, tal como fue atestiguado por la puntuación alta del área bajo las curvas ROC (Figura 17B y 18B), que apoya la hipótesis de que la medición de s-RNY1-5p y s-RNY4-5p podría mejorar la predicción del riesgo de CAD.
- 10 La regulación por incremento de ARN pequeños derivados de RNY (en particular, s-RNY1-5p) en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria fue confirmada en una cohorte mayor de pacientes (n = 263) (véase la Tabla 5 y las Figuras 20-25).

Tabla 5: Características demográficas, clínicas y biológicas de los pacientes y controles

	Caso		Control		prueba t o CHI2 p
	media	SD	media	SD	
	n = 263		n = 514		
s-RNY1-5p	10,42	12,33	1,32	1,67	0,001**
(RNY1-5p) ^{1/5}	1,49	0,28	0,94	0,25	0,001
(RNY1-5p) ^{1/6}	1,39	0,22	0,95	0,22	0,001
(RNY1-5p) ^{1/7}	1,33	0,18	0,95	0,19	0,001
Cuartiles RNY1-5p (%)					0,001
Q1: <0,474	0,4		37,9		
Q2: 0,474-1,618	5,3		34,6		
Q3: 1,619-4,701	28,5		23,4		
Q4: > 4,701	65,8		4,1		
Colesterol total (g/L)	2,02	0,38	2,24	0,38	0,001
Colesterol HDL (g/L)	0,43	0,12	0,55	0,13	0,001
Colesterol LDL (g/L)	1,25	0,34	1,45	0,32	0,001
Triglicéridos en suero (g/L)	1,68	0,89	1,21	0,77	0,001*
Apolipoproteína A1 (g/L)	1,23	0,22	1,50	0,24	0,001
Apolipoproteína B (g/L)	1,04	0,22	1,08	0,22	0,03
ApoC3 (mg/L)	33,8	12,9	30,8	12,7	0,002
ApoE (mg/L)	99,4	56,0	71,5	46,5	0,001*
LpBC3 (mg/L)	16,4	10,6	14,1	10,5	0,006
LpBE (mg/L)	76,4	56,7	48,6	46,1	0,001*
Lp(a) (g/L)	0,47	0,44	0,30	0,37	0,001*
IF1 (mg/L)	0,43	0,14	0,52	0,15	0,001
Gamma glutamil	62,8	68,6	45,2	56,8	0,001**

ES 2 724 549 T3

transferasa (IU/L)					
Proteína reactiva C de alta sensibilidad (mg/L)	17,2	29,7	3,1	5,1	0,001**
Glucosa en ayunas (mmol/l)	5,93	2,01	5,43	1,06	0,19*
Insulina en suero (IU/L)	15,9	19,5	10,0	8,1	0,001**
HOMA-IR	4,2	4,9	2,6	2,8	0,001**
Adiponectina (µg/ml)	5,6	4,3	7,0	4,4	0,001
Cintura (cm)	99,3	10,7	95,3	9,9	0,001
Relación cintura: cadera	0,99	0,04	0,96	0,05	0,001
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27,5	4,0	26,9	3,6	0,04
Presión arterial sistólica (mm Hg)	137,0	20,2	137,4	16,5	0,82**
Presión arterial diastólica (mm Hg)	83,5	11,2	82,7	7,9	0,55**
Frecuencia cardíaca en reposo (latidos/min)***	63,7	11,5	62,8	9,2	0,79**
Grasa corporal (% impedancia bioeléctrica)	28,2	5,4	26,2	5,1	0,001
Edad (años)	60,3	8,0	59,0	8,3	0,04
Escolarización (número de años en el colegio)	9,6	3,0	13,1	4,3	0,001**
Consumo de tabaco actual (número de cigarrillos)	3,4	10,1	2,3	7,0	0,22**
Número de consumo de tabaco (paquetes por año)	41,5	37,9	17,2	21,3	0,001**
Puntuación de actividad física	1,86	0,6	2,23	0,82	0,001**
Consumo de alcohol (g/día)	28,8	28,5	23,8	24,1	0,09**
	n = 263		n = 514		
Vino	25,8	26,4	20,4	21,8	0,02**
Escolarización (número de años en el colegio) %					0,001
< 9	42,2		17,5		
9-10	32,7		9,0		
> 10	25,1		73,5		
Tratamiento para la hipertensión (%)	44,1		19,6		0,001
Tratamiento para la diabetes (%)	23,2		5,2		0,001
Tratamiento para la	63,5		23,3		0,001

dislipidemia (%)					
Tabaquismo (%)					0,001
actual	18,3		14,		
anteriormente	65,4		50,4		
nunca	16,3		35,0		
Índice tobillo-brazo $\leq 0,9$ (%)	33,6		1,6		0,001
Actividad física (%)					0,001
no	27,4		18,5		
media	61,6		45,9		
alta	11,0		35,6		
Consumo de alcohol (%)					0,03
no	17,1		12,4		
> 40g/día	54,4		64,3		
≥ 40 g/día	28,5		23,3		
Síndrome metabólico (NCEP ATP-III %)	48,5		17,7		0,001
*análisis realizado en datos transformados con log					
**Prueba de Kruskal-Wallis					

5 El nivel de expresión de estos ARN pequeños también se comprobó en 514 individuos sanos y se encontró que la mayor expresión de s-RNY1-5p está asociada con altos niveles de CRP, cLDL, ApoB y menores niveles de ApoA. 24 pacientes infectados por las bacterias, por lo tanto, que tenían una alta CRP, pero no atherosclerostis, muestran niveles intermedios de expresión de s-RNY1-5p.

Tomados en conjunto, los niveles más altos de s-RNY1-5p están asociados específicamente a pacientes con aterosclerosis.

10 Las figuras 22-24 muestran respectivamente la curva ROC para la predicción de CAD basada en (i) s-RNY1-5p, (ii) factores de riesgo cardiovascular básicos (hipertensión, dislipidemia, diabetes, tabaquismo, duración escolar, índice tobillo-brazo, ApoA1 y CRP), o (iii) s-RNY1-5p combinado con factores de riesgo cardiovascular básicos,

15 Una curva ROC es una representación gráfica de la sensibilidad (o tasa de verdaderos positivos) frente a la tasa de falsos positivos (es decir, [1 - especificidad], siendo la especificidad la tasa de verdaderos negativos) de una prueba basada en el marcador. Un espacio ROC se define por la sensibilidad y (1-especificidad) como ejes x e y, respectivamente. El mejor procedimiento de predicción posible produciría un punto en la esquina superior izquierda o coordinada (0,1) del espacio ROC, representando una sensibilidad del 100% (no hay falsos negativos) y 100% de especificidad (no hay falsos positivos). Una suposición completamente al azar daría un punto a lo largo de una línea diagonal (la llamada línea de no discriminación) desde la esquina de la parte inferior izquierda a la esquina de la parte superior derecha. La diagonal divide el espacio ROC. Los puntos por encima de la diagonal representan buenos resultados de clasificación (mejor que al azar), los puntos por debajo de la línea, malos resultados (peor que al azar). Se puede calcular el área bajo la curva (AUC) de una curva ROC. Cuanto mayor sea el AUC, mayor es la precisión diagnóstica del marcador de diagnóstico.

25 Para el análisis combinado de los marcadores, se calcula un nuevo marcador virtual Z basándose en una combinación lineal de los niveles de los marcadores individuales. Z se calcula de la siguiente manera: $Z = \sum a_i \times [\text{Marcador}_i]$, donde a_i son coeficientes calculados y $[\text{Marcador}_i]$ son niveles individuales de marcador (opcionalmente en unidades normalizadas). Los valores de los coeficientes a_i se determinan con el fin de maximizar el área bajo la curva (AUC) de la curva ROC para la combinación de marcadores seleccionados. La determinación de los valores de los coeficientes se puede lograr fácilmente usando, por ejemplo, el programa mROC o cualquier otro programa de aplicación de un algoritmo para la maximización de la AUC de ROC que puede utilizarse para ROC multivariante).

35 Los resultados mostrados en la Figura 24 indican que S-RNY1-5p mejora la precisión de diagnóstico de CAD cuando se combina con hecho de riesgo cardiovascular básico.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III UNIVERSITE DE NICE SOFIA ANTIPOLIS

<120> ARN pequeños derivados de RNY como biomarcadores para trastornos relacionados con la aterosclerosis

ES 2 724 549 T3

<130> BET14P2177

5 <150> EP13306439.4
<151> 18/10/2013

<160> 57

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 113
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <400> 1

ggctgggtccg aaggtagtga gttatctcaa ttgattgttc acagtcagtt acagatcgaa 60

20 ctctctgttc tactctttcc ccccttctca ctactgcact tgactagtct ttt 113

<210> 2
<211> 102
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens
<400> 2

30

ggctgggtccg agtgcagtgg tgtttacaac taattgatca caaccagtta cagatttctt 60

35 tgttccttct ccactcccac tgcttcactt gactagcctt tt 102

<210> 3
<211> 96
<212> ADN
40 <213> Homo sapiens
<400> 3

ggctgggtccg atggtagtgg gttatcagaa cttattaaca ttagtgtcac taaagttggt 60

45 atacaacccc ccactgctaa atttgactgg cttttt 96

<210> 4
<211> 84
<212> ADN
50 <213> Homo sapiens
<400> 4

agttgggtccg agtgttgtgg gttattgtta agttgattta acattgtctc cccccacaac 60

55 cgcgcttgac tagcttgctg tttt 84

<210> 5
<211> 111
<212> ADN
60 <213> Mus musculus
<400> 5

ggctgggtccg aaggtagtga gttatctcaa ttgattgttc acagtcagtt acagattgaa 60

65 ctctctgttc acactttccc cccttctcac tactgcactt gactagtctt t 111

ES 2 724 549 T3

<210> 6
 <211> 101
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus
 <400> 6
 gggttggtccg agagtagtgg tgtttacaac taattgatca caaccagtta cagatttctt 60
 10 tgttccttct ccgctcccac tgcttcaactt gaccagcctt t 101

 <210> 7
 <211> 31
 15 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 gccugguccg aagguaguga guuaucaaa u 31
 20 <210> 8
 <211> 28
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 25 cuucucacua cugcacuuga cuagucuu 28

 <210> 9
 <211> 31
 <212> ARN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 gccugguccg agugcagugg uguuuacaac u 31

 <210> 10
 <211> 28
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 35 acucccacug CUU cacuuga cuagccuu 28
 40 <210> 11
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 11
 gccgguccga ugguaguggg uuaucagaac u 31

 <210> 12
 <211> 28
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 50 acccccacac gcuaaaauug acuggcuu 28

 <210> 13
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 55 cccccacaac cgcgcuugac uagcuu 26
 60 <210> 14
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> Mus musculus
 65 <400> 14

ggcugguccg aagguaguga guuaucaaa u 31

<210> 15

<211> 28

5 <212> ARN

<213> Mus musculus

<400> 15

cuucucacua cugcacuuga cuagucuu 28

10 <210> 16

<211> 24

<212> ARN

<213> Mus musculus

<400> 16

15 gguugguccg agaguagugg uguu 24

<210> 17

<211> 28

<212> ARN

20 <213> Mus musculus

<400> 17

cuucucacua cugcacuuga cuagucuu 28

<210> 18

25 <211> 859

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 724 549 T3

Met	Tyr	Ser	Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	
1				5					10					15		
5																
Pro	Ile	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Asp	Phe	Gly	
			20					25					30			
10																
Thr	Ser	Gly	Arg	Thr	Ile	Lys	Leu	Gln	Ala	Asn	Phe	Phe	Glu	Met	Asp	
		35					40					45				
15																
Ile	Pro	Lys	Ile	Asp	Ile	Tyr	His	Tyr	Glu	Leu	Asp	Ile	Lys	Pro	Glu	
	50					55					60					
20																
Lys	Cys	Pro	Arg	Arg	Val	Asn	Arg	Glu	Ile	Val	Glu	His	Met	Val	Gln	
65					70					75					80	
25																
His	Phe	Lys	Thr	Gln	Ile	Phe	Gly	Asp	Arg	Lys	Pro	Val	Phe	Asp	Gly	
				85					90					95		
30																
Arg	Lys	Asn	Leu	Tyr	Thr	Ala	Met	Pro	Leu	Pro	Ile	Gly	Arg	Asp	Lys	
			100					105					110			
35																
Val	Glu	Leu	Glu	Val	Thr	Leu	Pro	Gly	Glu	Gly	Lys	Asp	Arg	Ile	Phe	
		115					120					125				
40																
Lys	Val	Ser	Ile	Lys	Trp	Val	Ser	Cys	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	Leu	His	
	130					135					140					
45																
Asp	Ala	Leu	Ser	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Thr	Ile	Gln	
145					150					155					160	
50																
Ala	Leu	Asp	Val	Val	Met	Arg	His	Leu	Pro	Ser	Met	Arg	Tyr	Thr	Pro	
				165					170					175		
55																
Val	Gly	Arg	Ser	Phe	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu	Gly	Cys	Ser	Asn	Pro	Leu	
			180					185					190			
60																
Gly	Gly	Gly	Arg	Glu	Val	Trp	Phe	Gly	Phe	His	Gln	Ser	Val	Arg	Pro	
		195					200					205				
65																
Ser	Leu	Trp	Lys	Met	Met	Leu	Asn	Ile	Asp	Val	Ser	Ala	Thr	Ala	Phe	
	210					215					220					
70																
Tyr	Lys	Ala	Gln	Pro	Val	Ile	Glu	Phe	Val	Cys	Glu	Val	Leu	Asp	Phe	
225					230					235					240	
75																
Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Thr	Asp	Ser	Gln	Arg	Val	

ES 2 724 549 T3

				245					250					255		
5	Lys	Phe	Thr	Lys 260	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu 265	Lys	Val	Glu	Ile	Thr	His	Cys
10	Gly	Gln	Met 275	Lys	Arg	Lys	Tyr	Arg	Val	Cys	Asn	Val	Thr	Arg	Arg	Pro
15	Ala	Ser 290	His	Gln	Thr	Phe	Pro 295	Leu	Gln	Gln	Glu	Ser 300	Gly	Gln	Thr	Val
20	Glu	Cys	Thr	Val	Ala	Gln 310	Tyr	Phe	Lys	Asp	Arg 315	His	Lys	Leu	Val	Leu 320
25	Arg	Tyr	Pro	His	Leu 325	Pro	Cys	Leu	Gln	Val	Gly	Gln	Glu	Gln	Lys	His 335
30	Thr	Tyr	Leu	Pro 340	Leu	Glu	Val	Cys	Asn 345	Ile	Val	Ala	Gly	Gln	Arg	Cys
35	Ile	Lys	Lys 355	Leu	Thr	Asp	Asn	Gln	Thr	Ser	Thr	Met	Ile	Arg	Ala	Thr
40	Ala	Arg 370	Ser	Ala	Pro	Asp	Arg 375	Gln	Glu	Glu	Ile	Ser	Lys	Leu	Met	Arg
45	Ser	Ala	Ser	Phe	Asn	Thr 390	Asp	Pro	Tyr	Val	Arg 395	Glu	Phe	Gly	Ile	Met 400
50	Val	Lys	Asp	Glu	Met 405	Thr	Asp	Val	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Gln	Pro	Pro 415
55	Ser	Ile	Leu	Tyr 420	Gly	Gly	Arg	Asn	Lys 425	Ala	Ile	Ala	Thr	Pro	Val	Gln 430
60	Gly	Val	Trp 435	Asp	Met	Arg	Asn	Lys 440	Gln	Phe	His	Thr	Gly	Ile	Glu	Ile
65	Lys	Val	Trp	Ala	Ile	Ala	Cys 455	Phe	Ala	Pro	Gln	Arg	Gln	Cys	Thr	Glu 460
70	Val	His	Leu	Lys	Ser	Phe 470	Thr	Glu	Gln	Leu	Arg 475	Lys	Ile	Ser	Arg	Asp 480
75	Ala	Gly	Met	Pro	Ile 485	Gln	Gly	Gln	Pro	Cys	Phe	Cys	Lys	Tyr	Ala	Gln 495

ES 2 724 549 T3

Gly Ala Asp Ser Val Glu Pro Met Phe Arg His Leu Lys Asn Thr Tyr
 500 505 510
 5
 Ala Gly Leu Gln Leu Val Val Val Ile Leu Pro Gly Lys Thr Pro Val
 515 520 525
 10
 Tyr Ala Glu Val Lys Arg Val Gly Asp Thr Val Leu Gly Met Ala Thr
 530 535 540
 15
 Gln Cys Val Gln Met Lys Asn Val Gln Arg Thr Thr Pro Gln Thr Leu
 545 550 555 560
 20
 Ser Asn Leu Cys Leu Lys Ile Asn Val Lys Leu Gly Gly Val Asn Asn
 565 570 575
 25
 Ile Leu Leu Pro Gln Gly Arg Pro Pro Val Phe Gln Gln Pro Val Ile
 580 585 590
 30
 Phe Leu Gly Ala Asp Val Thr His Pro Pro Ala Gly Asp Gly Lys Lys
 595 600 605
 35
 Pro Ser Ile Ala Ala Val Val Gly Ser Met Asp Ala His Pro Asn Arg
 610 615 620
 40
 Tyr Cys Ala Thr Val Arg Val Gln Gln His Arg Gln Glu Ile Ile Gln
 625 630 635 640
 45
 Asp Leu Ala Ala Met Val Arg Glu Leu Leu Ile Gln Phe Tyr Lys Ser
 645 650 655
 50
 Thr Arg Phe Lys Pro Thr Arg Ile Ile Phe Tyr Arg Asp Gly Val Ser
 660 665 670
 55
 Glu Gly Gln Phe Gln Gln Val Leu His His Glu Leu Leu Ala Ile Arg
 675 680 685
 60
 Glu Ala Cys Ile Lys Leu Glu Lys Asp Tyr Gln Pro Gly Ile Thr Phe
 690 695 700
 65
 Ile Val Val Gln Lys Arg His His Thr Arg Leu Phe Cys Thr Asp Lys
 705 710 715 720
 70
 Asn Glu Arg Val Gly Lys Ser Gly Asn Ile Pro Ala Gly Thr Thr Val
 725 730 735
 75
 Asp Thr Lys Ile Thr His Pro Thr Glu Phe Asp Phe Tyr Leu Cys Ser
 740 745 750

ES 2 724 549 T3

His Ala Gly Ile Gln Gly Thr Ser Arg Pro Ser His Tyr His Val Leu
 755 760 765
 5
 Trp Asp Asp Asn Arg Phe Ser Ser Asp Glu Leu Gln Ile Leu Thr Tyr
 770 775 780
 10
 Gln Leu Cys His Thr Tyr Val Arg Cys Thr Arg Ser Val Ser Ile Pro
 785 790 795 800
 15
 Ala Pro Ala Tyr Tyr Ala His Leu Val Ala Phe Arg Ala Arg Tyr His
 805 810 815
 20
 Leu Val Asp Lys Glu His Asp Ser Ala Glu Gly Ser His Thr Ser Gly
 820 825 830
 25
 Gln Ser Asn Gly Arg Asp His Gln Ala Leu Ala Lys Ala Val Gln Val
 835 840 845
 30
 His Gln Asp Thr Leu Arg Thr Met Tyr Phe Ala
 850 855
 35
 <210> 19
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 40
 Met Ser Lys Ser Glu Ser Pro Lys Glu Pro Glu Gln Leu Arg Lys Leu
 1 5 10 15
 45
 Phe Ile Gly Gly Leu Ser Phe Glu Thr Thr Asp Glu Ser Leu Arg Ser
 20 25 30
 50
 His Phe Glu Gln Trp Gly Thr Leu Thr Asp Cys Val Val Met Arg Asp
 35 40 45
 55
 Pro Asn Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Tyr Ala Thr
 50 55 60
 60
 Val Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Asn Ala Arg Pro His Lys Val Asp
 65 70 75 80
 65
 Gly Arg Val Val Glu Pro Lys Arg Ala Val Ser Arg Glu Asp Ser Gln
 85 90 95
 Arg Pro Gly Ala His Leu Thr Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Ile
 100 105 110

ES 2 724 549 T3

Lys Glu Asp Thr Glu Glu His His Leu Arg Asp Tyr Phe Glu Gln Tyr
 115 120 125
 5
 Gly Lys Ile Glu Val Ile Glu Ile Met Thr Asp Arg Gly Ser Gly Lys
 130 135 140
 10
 Lys Arg Gly Phe Ala Phe Val Thr Phe Asp Asp His Asp Ser Val Asp
 145 150 155 160
 15
 Lys Ile Val Ile Gln Lys Tyr His Thr Val Asn Gly His Asn Cys Glu
 165 170 175
 20
 Val Arg Lys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Met Ala Ser Ala Ser Ser Ser
 180 185 190
 25
 Gln Arg Gly Arg Ser Gly Ser Gly Asn Phe Gly Gly Gly Arg Gly Gly
 195 200 205
 30
 Gly Phe Gly Gly Asn Asp Asn Phe Gly Arg Gly Gly Asn Phe Ser Gly
 210 215 220
 35
 Arg Gly Gly Phe Gly Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 40
 Gly Asp Gly Tyr Asn Gly Phe Gly Asn Asp Gly Ser Asn Phe Gly Gly
 245 250 255
 45
 Gly Gly Ser Tyr Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Asn Gln Ser Ser Asn
 260 265 270
 50
 Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly Arg Ser Ser Gly Pro
 275 280 285
 55
 Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro Arg Asn Gln Gly Gly
 290 295 300
 60
 Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Gly Arg Arg Phe
 305 310 315 320
 65

ES 2 724 549 T3

<210> 20
<211> 538
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20

10 **Met Glu Glu Ser Val Asn Gln Met Gln Pro Leu Asn Glu Lys Gln Ile**
1 5 10 15

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 724 549 T3

Ala Asn Ser Gln Asp Gly Tyr Val Trp Gln Val Thr Asp Met Asn Arg
 20 25 30

5
 Leu His Arg Phe Leu Cys Phe Gly Ser Glu Gly Gly Thr Tyr Tyr Ile
 35 40 45

10
 Lys Glu Gln Lys Leu Gly Leu Glu Asn Ala Glu Ala Leu Ile Arg Leu
 50 55 60

15
 Ile Glu Asp Gly Arg Gly Cys Glu Val Ile Gln Glu Ile Lys Ser Phe
 65 70 75 80

20
 Ser Gln Glu Gly Arg Thr Thr Lys Gln Glu Pro Met Leu Phe Ala Leu
 85 90 95

25
 Ala Ile Cys Ser Gln Cys Ser Asp Ile Ser Thr Lys Gln Ala Ala Phe
 100 105 110

30
 Lys Ala Val Ser Glu Val Cys Arg Ile Pro Thr His Leu Phe Thr Phe
 115 120 125

35
 Ile Gln Phe Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Met Lys Cys Gly Met Trp
 130 135 140

40
 Gly Arg Ala Leu Arg Lys Ala Ile Ala Asp Trp Tyr Asn Glu Lys Gly
 145 150 155 160

45
 Gly Met Ala Leu Ala Leu Ala Val Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly
 165 170 175

50
 Trp Ser His Lys Asp Leu Leu Arg Leu Ser His Leu Lys Pro Ser Ser
 180 185 190

55
 Glu Gly Leu Ala Ile Val Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Gly Trp Lys Glu
 195 200 205

60
 Val His Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys
 210 215 220

65
 Leu Leu Lys Tyr Leu Glu Ala Val Glu Lys Val Lys Arg Thr Arg Asp
 225 230 235 240

60
 Glu Leu Glu Val Ile His Leu Ile Glu Glu His Arg Leu Val Arg Glu
 245 250 255

65
 His Leu Leu Thr Asn His Leu Lys Ser Lys Glu Val Trp Lys Ala Leu
 260 265 270

ES 2 724 549 T3

Leu Gln Glu Met Pro Leu Thr Ala Leu Leu Arg Asn Leu Gly Lys Met
 275 280 285
 5
 Thr Ala Asn Ser Val Leu Glu Pro Gly Asn Ser Glu Val Ser Leu Val
 290 295 300
 10
 Cys Glu Lys Leu Cys Asn Glu Lys Leu Leu Lys Lys Ala Arg Ile His
 305 310 315 320
 15
 Pro Phe His Ile Leu Ile Ala Leu Glu Thr Tyr Lys Thr Gly His Gly
 325 330 335
 20
 Leu Arg Gly Lys Leu Lys Trp Arg Pro Asp Glu Glu Ile Leu Lys Ala
 340 345 350
 25
 Leu Asp Ala Ala Phe Tyr Lys Thr Phe Lys Thr Val Glu Pro Thr Gly
 355 360 365
 30
 Lys Arg Phe Leu Leu Ala Val Asp Val Ser Ala Ser Met Asn Gln Arg
 370 375 380
 35
 Val Leu Gly Ser Ile Leu Asn Ala Ser Thr Val Ala Ala Ala Met Cys
 385 390 395 400
 40
 Met Val Val Thr Arg Thr Glu Lys Asp Ser Tyr Val Val Ala Phe Ser
 405 410 415
 45
 Asp Glu Met Val Pro Cys Pro Val Thr Thr Asp Met Thr Leu Gln Gln
 420 425 430
 50
 Val Leu Met Ala Met Ser Gln Ile Pro Ala Gly Gly Thr Asp Cys Ser
 435 440 445
 55
 Leu Pro Met Ile Trp Ala Gln Lys Thr Asn Thr Pro Ala Asp Val Phe
 450 455 460
 60
 Ile Val Phe Thr Asp Asn Glu Thr Phe Ala Gly Gly Val His Pro Ala
 465 470 475 480
 65
 Ile Ala Leu Arg Glu Tyr Arg Lys Lys Met Asp Ile Pro Ala Lys Leu
 485 490 495
 Ile Val Cys Gly Met Thr Ser Asn Gly Phe Thr Ile Ala Asp Pro Asp
 500 505 510
 Asp Arg Gly Met Leu Asp Met Cys Gly Phe Asp Thr Gly Ala Leu Asp

515

520

525

5

Val Ile Arg Asn Phe Thr Leu Asp Met Ile
530 535

10

<210> 21
<211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 21

Met Ala Glu Asn Gly Asp Asn Glu Lys Met Ala Ala Leu Glu Ala Lys
1 5 10 15

Ile Cys His Gln Ile Glu Tyr Tyr Phe Gly Asp Phe Asn Leu Pro Arg
20 20 25 30

Asp Lys Phe Leu Lys Glu Gln Ile Lys Leu Asp Glu Gly Trp Val Pro
25 35 40 45

Leu Glu Ile Met Ile Lys Phe Asn Arg Leu Asn Arg Leu Thr Thr Asp
30 50 55 60

Phe Asn Val Ile Val Glu Ala Leu Ser Lys Ser Lys Ala Glu Leu Met
35 65 70 75 80

Glu Ile Ser Glu Asp Lys Thr Lys Ile Arg Arg Ser Pro Ser Lys Pro
40 85 90 95

Leu Pro Glu Val Thr Asp Glu Tyr Lys Asn Asp Val Lys Asn Arg Ser
45 100 105 110

Val Tyr Ile Lys Gly Phe Pro Thr Asp Ala Thr Leu Asp Asp Ile Lys
50 115 120 125

Glu Trp Leu Glu Asp Lys Gly Gln Val Leu Asn Ile Gln Met Arg Arg
55 130 135 140

Thr Leu His Lys Ala Phe Lys Gly Ser Ile Phe Val Val Phe Asp Ser
60 145 150 155 160

Ile Glu Ser Ala Lys Lys Phe Val Glu Thr Pro Gly Gln Lys Tyr Lys
65 165 170 175

Glu Thr Asp Leu Leu Ile Leu Phe Lys Asp Asp Tyr Phe Ala Lys Lys
70 180 185 190

Asn Glu Glu Arg Lys Gln Asn Lys Val Glu Ala Lys Leu Arg Ala Lys
75

ES 2 724 549 T3

	195					200					205					
5	Gln	Glu	Gln	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala	Glu	Met	Lys
		210					215					220				
10	Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Gly	Cys	Leu	Leu	Lys	Phe	Ser	Gly	Asp	Leu
	225					230					235					240
15	Asp	Asp	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Phe	Ser	Asn	His
					245					250					255	
20	Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Ile	Asp	Phe	Val	Arg	Gly	Ala	Lys	Glu	Gly	Ile
				260					265					270		
25	Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Glu	Ala	Leu	Gly	Lys	Ala	Lys	Asp
			275					280					285			
30	Ala	Asn	Asn	Gly	Asn	Leu	Gln	Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Val	Thr	Trp	Glu
		290					295					300				
35	Val	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Ile	Ile	Glu
	305					310					315					320
40	Asp	Gln	Gln	Glu	Ser	Leu	Asn	Lys	Trp	Lys	Ser	Lys	Gly	Arg	Arg	Phe
					325					330					335	
45	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Asn	Lys	Ala	Ala	Gln	Pro	Gly	Ser	Gly	Lys
				340					345					350		
50	Gly	Lys	Val	Gln	Phe	Gln	Gly	Lys	Lys	Thr	Lys	Phe	Ala	Ser	Asp	Asp
			355					360					365			
55	Glu	His	Asp	Glu	His	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Thr	Gly	Pro	Val	Lys	Arg
		370					375					380				
60	Ala	Arg	Glu	Glu	Thr	Asp	Lys	Glu	Glu	Pro	Ala	Ser	Lys	Gln	Gln	Lys
	385					390					395					400
65	Thr	Glu	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp	Gln								
					405											

<210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> siRNA
 <400> 22
 guuguauugu uuagcgauu 19

10 <210> 23
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

15 <223> siRNA
 <400> 23
 gcacuagcca ucucuugcuu c 21

20 <210> 24
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

25 <223> siRNA
 <400> 24
 uuauucaua gccguuaaa 19

30 <210> 25
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

35 <223> siRNA
 <400> 25
 uuccuuuaaa ucuuccacc 19

40 <210> 26
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

45 <223> siRNA
 <400> 26
 uugagauaac ucacuaccuu cggaccagcc 30

50 <210> 27
 <211> 28
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

55 <223> siRNA
 <400> 27
 aagacuaguc aagugcagua gugagaag 28

60 <210> 28
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

65 <223> siRNA
 <400> 28
 uaaacaccac uacucugga ccaacc 26

<210> 29
 <211> 380
 <212> PRT

ES 2 724 549 T3

<213> Homo sapiens
<400> 29

5 Met Met Phe Ser Gly Phe Asn Ala Asp Tyr Glu Ala Ser Ser Ser Arg
1 5 10 15

10 Cys Ser Ser Ala Ser Pro Ala Gly Asp Ser Leu Ser Tyr Tyr His Ser
20 25 30

15 Pro Ala Asp Ser Phe Ser Ser Met Gly Ser Pro Val Asn Ala Gln Asp
35 40 45

20 Phe Cys Thr Asp Leu Ala Val Ser Ser Ala Asn Phe Ile Pro Thr Val
50 55 60

25 Thr Ala Ile Ser Thr Ser Pro Asp Leu Gln Trp Leu Val Gln Pro Ala
65 70 75 80

30 Leu Val Ser Ser Val Ala Pro Ser Gln Thr Arg Ala Pro His Pro Phe
85 90 95

35 Gly Val Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Tyr Ser Arg Ala Gly Val Val
100 105 110

40 Lys Thr Met Thr Gly Gly Arg Ala Gln Ser Ile Gly Arg Arg Gly Lys
115 120 125

45 Val Glu Gln Leu Ser Pro Glu Glu Glu Glu Lys Arg Arg Ile Arg Arg
130 135 140

50 Glu Arg Asn Lys Met Ala Ala Ala Lys Cys Arg Asn Arg Arg Arg Glu
145 150 155 160

55 Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Glu Lys
165 170 175

60

65

ES 2 724 549 T3

Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys
 180 185 190
 5
 Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His Arg Pro Ala Cys Lys Ile Pro Asp
 195 200 205
 10
 Asp Leu Gly Phe Pro Glu Glu Met Ser Val Ala Ser Leu Asp Leu Thr
 210 215 220
 15
 Gly Gly Leu Pro Glu Val Ala Thr Pro Glu Ser Glu Glu Ala Phe Thr
 225 230 235 240
 20
 Leu Pro Leu Leu Asn Asp Pro Glu Pro Lys Pro Ser Val Glu Pro Val
 245 250 255
 25
 Lys Ser Ile Ser Ser Met Glu Leu Lys Thr Glu Pro Phe Asp Asp Phe
 260 265 270
 30
 Leu Phe Pro Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ser Glu Thr Ala Arg Ser
 275 280 285
 35
 Val Pro Asp Met Asp Leu Ser Gly Ser Phe Tyr Ala Ala Asp Trp Glu
 290 295 300
 40
 Pro Leu His Ser Gly Ser Leu Gly Met Gly Pro Met Ala Thr Glu Leu
 305 310 315 320
 45
 Glu Pro Leu Cys Thr Pro Val Val Thr Cys Thr Pro Ser Cys Thr Ala
 325 330 335
 50
 Tyr Thr Ser Ser Phe Val Phe Thr Tyr Pro Glu Ala Asp Ser Phe Pro
 340 345 350
 55
 Ser Cys Ala Ala Ala His Arg Lys Gly Ser Ser Ser Asn Glu Pro Ser
 355 360 365
 60
 Ser Asp Ser Leu Ser Ser Pro Thr Leu Leu Ala Leu
 370 375 380
 65

ES 2 724 549 T3

<210> 30
<211> 355
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30

5

Met Ala Leu Ser Glu Pro Ile Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser
1 5 10 15

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 724 549 T3

Pro Cys Arg Glu Arg Gly Leu Gln Glu Arg Trp Pro Arg Ala Glu Pro
 20 25 30
 5
 Glu Ser Gly Gly Thr Asp Asp Asp Leu Asn Ser Val Leu Asp Phe Ile
 35 40 45
 10
 Leu Ser Met Gly Leu Asp Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ala Pro Glu Pro
 50 55 60
 15
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Phe Tyr Tyr Pro Glu Pro Gly Ala
 65 70 75 80
 20
 Pro Pro Pro Tyr Ser Ala Pro Ala Gly Gly Leu Val Ser Glu Leu Leu
 85 90 95
 25
 Arg Pro Glu Leu Asp Ala Pro Leu Gly Pro Ala Leu His Gly Arg Phe
 100 105 110
 30
 Leu Leu Ala Pro Pro Gly Arg Leu Val Lys Ala Glu Pro Pro Glu Ala
 115 120 125
 35
 Asp Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Cys Ala Pro Gly Leu Thr Arg Gly Pro
 130 135 140
 40
 Arg Gly Leu Lys Arg Glu Gly Ala Pro Gly Pro Ala Ala Ser Cys Met
 145 150 155 160
 45
 Arg Gly Pro Gly Gly Arg Pro Pro Pro Pro Pro Asp Thr Pro Pro Leu
 165 170 175
 50
 Ser Pro Asp Gly Pro Ala Arg Leu Pro Ala Pro Gly Pro Arg Ala Ser
 180 185 190
 55
 Phe Pro Pro Pro Phe Gly Gly Pro Gly Phe Gly Ala Pro Gly Pro Gly
 195 200 205
 60
 Leu His Tyr Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ala Phe Gly Leu Phe Asp Asp
 210 215 220
 65
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Leu Ala Pro Pro Ala Ala Arg
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Thr Pro Pro Ala Ser Pro Leu Glu Leu Leu Glu Ala Lys
 245 250 255
 Pro Lys Arg Gly Arg Arg Ser Trp Pro Arg Lys Arg Thr Ala Thr His
 260 265 270

ES 2 724 549 T3

5 Thr Cys Ser Tyr Ala Gly Cys Gly Lys Thr Tyr Thr Lys Ser Ser His
275 280 285

10 Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr His Cys
290 295 300

15 Asn Trp Asp Gly Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr
305 310 315 320

20 Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly His Arg Pro Phe Gln Cys His Leu
325 330 335

25 Cys Asp Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ala Leu His Met Lys
340 345 350

30 Arg His Met
355

<210> 31
<211> 887
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31

40 Met Met Asn Arg Phe Arg Lys Trp Leu Tyr Lys Pro Lys Arg Ser Asp
1 5 10 15

Pro Gln Leu Leu Ala Arg Phe Tyr Tyr Ala Asp Glu Glu Leu Asn Gln
20 25 30

45 Val Ala Ala Glu Leu Asp Ser Leu Asp Gly Arg Lys Asp Pro Gln Arg
35 40 45

50 Cys Thr Leu Leu Val Ser Gln Phe Arg Ser Cys Gln Asp Asn Val Leu
50 55 60

Asn Ile Ile Asn Gln Ile Met Asp Glu Cys Ile Pro Gln Asp Arg Ala
65 70 75 80

55 Pro Arg Asp Phe Cys Val Lys Phe Pro Glu Glu Ile Arg His Asp Asn
85 90 95

60 Leu Ala Gly Gln Leu Trp Phe Gly Ala Glu Cys Leu Ala Ala Gly Ser
100 105 110

Ile Ile Met Asn Arg Glu Leu Glu Ser Met Ala Met Arg Pro Leu Ala
115 120 125

65

ES 2 724 549 T3

Lys Glu Leu Thr Arg Ser Leu Glu Asp Val Arg Gly Ala Leu Arg Asp
 130 135 140
 5
 Gln Ala Leu Arg Asp Leu Asn Thr Tyr Thr Glu Lys Met Arg Glu Ala
 145 150 155 160
 10
 Leu Arg His Phe Asp Val Leu Phe Ala Glu Phe Glu Leu Ser Tyr Val
 165 170 175
 15
 Ser Ala Met Val Pro Val Lys Ser Pro Arg Glu Tyr Tyr Val Gln Gln
 180 185 190
 20
 Glu Val Ile Val Leu Phe Cys Glu Thr Val Glu Arg Ala Leu Asp Phe
 195 200 205
 25
 Gly Tyr Leu Thr Gln Asp Met Ile Asp Asp Tyr Glu Pro Ala Leu Met
 210 215 220
 30
 Phe Ser Ile Pro Arg Leu Ala Ile Val Cys Gly Leu Val Val Tyr Ala
 225 230 235 240
 35
 Asp Gly Pro Leu Asn Leu Asp Arg Lys Val Glu Asp Met Ser Glu Leu
 245 250 255
 40
 Phe Arg Pro Phe His Thr Leu Leu Arg Lys Ile Arg Asp Leu Leu Gln
 260 265 270
 45
 Thr Leu Thr Glu Glu Glu Leu His Thr Leu Glu Arg Asn Leu Cys Ile
 275 280 285
 50
 Ser Gln Asp Val Glu Phe Pro Ile Arg Ala Asp Val Gln Gly Pro Ala
 290 295 300
 55
 Ala Leu Ala Pro Ala Leu Ser Ala Pro Leu Pro Pro Glu Gly Pro Leu
 305 310 315 320
 60
 Ser Ala Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ala Glu Leu Ala Cys Ser Met Gln
 325 330 335
 65
 Tyr Asp Asp Gln Glu Leu Glu Gln Leu Ser Arg Met Val His Arg Ala
 340 345 350
 Gly Asp Glu Met Ser Ser Leu Leu Ser Pro Pro Ile Ala Cys Gln Ser
 355 360 365
 Pro Ala His Arg Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Gly Glu Ala Ser

ES 2 724 549 T3

	370					375										380
5	Pro 385	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu 390	Arg	Ser	Gly	Ser	Asp 395	Glu	Glu	Glu	Arg	Val 400
10	Phe	Phe	Met	Asp	Asp 405	Val	Glu	Gly	Thr	Ala 410	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Pro 415
15	Glu	Ser	Pro	Ala 420	Gly	Pro	Phe	Gly	Trp 425	Ala	Gly	Ser	Thr	Trp 430	Ala	Asp
20	Pro	Gln	Glu	Lys	Gly	Gln	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	Ser 445
25	Leu	Pro 450	Ala	Ser	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp 455	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Leu	Glu 460
30	Ala 465	Glu	Gly	Thr	Asp	Gly 470	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly 475	Thr	Ser	Ser	Cys	Ser 480
35	Cys	Leu	Asp	Ser	Arg 485	Leu	His	Leu	Asp	Gly 490	Trp	Glu	Val	Gly	Ala	Asp 495
40	Asp	Ala	Glu	Thr	Ala	Glu	Met	Ile	Ala 505	His	Arg	Thr	Gly	Gly	Met	Lys 510
45	Leu	Ser	Ala 515	Thr	Val	Ile	Phe	Asn 520	Pro	Lys	Ser	Pro	Thr 525	Ser	Leu	Asp
50	Ser	Ala 530	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Ala	Ala	Ser	Glu	Pro	Val	Ala	Glu	Gly 540
55	Met 545	Asp	Gly	Gly	Pro	His 550	Lys	Leu	Ser	Thr	Gly 555	Ala	Thr	Asn	Cys	Leu 560
60	Leu	His	Ser	Cys	Val 565	Cys	Cys	Gly	Ser	Cys 570	Gly	Asp	Ser	Arg	Glu	Asp 575
65	Val	Val	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Lys	Cys 585	Ser	Pro	Gly	Gly	Val	Ile	Gly 590
70	Ala	Ser	Tyr 595	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Lys 600	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Pro	Glu 605
75	Arg	Gln 610	Glu	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Glu	Asp	Ala	Ser	Asn	Gly	Arg 620

ES 2 724 549 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Glu Pro Lys Ala Pro Thr Ser Asp Lys Cys Leu Pro His Thr Ser Gly
 625 630 635 640

Ser Gln Val Asp Thr Ala Ser Gly Leu Gln Gly Glu Ala Gly Val Ala
 645 650 655

Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ala Arg Glu Leu His Ala Gly Ser Pro Pro
 660 665 670

Ala His Glu Ala Pro Gln Ala Leu Ser Gly Ser Ser Ser Ser Thr Ala
 675 680 685

Gly Ser Cys Ser Ser Asp Lys Met Gly Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala
 690 695 700

Thr His Ala Ala Pro Gln Ala Thr Arg Glu Lys Ile Arg Ser Arg Phe
 705 710 715 720

His Gly Ser His Asp Leu Ile His Arg Leu Phe Val Cys Ile Ser Gly
 725 730 735

Val Ala Asp Gln Leu Gln Thr Asn Tyr Ala Ser Asp Leu Arg Ser Ile
 740 745 750

Leu Lys Thr Leu Phe Glu Val Met Ala Thr Lys Pro Glu Thr Asp Asp
 755 760 765

Lys Glu Lys Leu Arg Lys Val Thr Gln Thr Leu Arg Ser Ala Ala Leu
 770 775 780

Glu Asp Cys Ala Leu Cys Gln Glu Thr Leu Ser Ser Ser Glu Leu Ala
 785 790 795 800

Ala Lys Thr Arg Asp Gly Asp Phe Glu Asp Pro Pro Glu Trp Val Pro
 805 810 815

Asp Glu Ala Cys Gly Phe Cys Thr Ala Cys Lys Ala Pro Phe Thr Val
 820 825 830

Ile Arg Arg Lys His His Cys Arg Ser Cys Gly Lys Ile Phe Cys Ser
 835 840 845

Arg Cys Ser Ser His Ser Ala Pro Leu Pro Arg Tyr Gly Gln Val Lys
 850 855 860

Pro Val Arg Val Cys Thr His Cys Tyr Met Phe His Val Thr Pro Phe
 865 870 875 880

Tyr Ser Asp Lys Ala Gly Leu
885

5 <210> 32
<211> 855
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

10 Met Ser Glu Ala Arg Arg Asp Ser Thr Ser Ser Leu Gln Arg Lys Lys
1 5 10 15

15 Pro Pro Trp Leu Lys Leu Asp Ile Pro Ser Ala Val Pro Leu Thr Ala
20 20 25 30

20 Glu Glu Pro Ser Phe Leu Gln Pro Leu Arg Arg Gln Ala Phe Leu Arg
35 40 45

25 Ser Val Ser Met Pro Ala Glu Thr Ala His Ile Ser Ser Pro His His
50 55 60

30 Glu Leu Arg Arg Pro Val Leu Gln Arg Gln Thr Ser Ile Thr Gln Thr
65 70 75 80

Ile Arg Arg Gly Thr Ala Asp Trp Phe Gly Val Ser Lys Asp Ser Asp
85 90 95

35 Ser Thr Gln Lys Trp Gln Arg Lys Ser Ile Arg His Cys Ser Gln Arg
100 105 110

40 Tyr Gly Lys Leu Lys Pro Gln Val Leu Arg Glu Leu Asp Leu Pro Ser
115 120 125

45 Gln Asp Asn Val Ser Leu Thr Ser Thr Glu Thr Pro Pro Pro Leu Tyr
130 135 140

50 Val Gly Pro Cys Gln Leu Gly Met Gln Lys Ile Ile Asp Pro Leu Ala
145 150 155 160

55 Arg Gly Arg Ala Phe Arg Val Ala Asp Asp Thr Ala Glu Gly Leu Ser
165 170 175

60 Ala Pro His Thr Pro Val Thr Pro Gly Ala Ala Ser Leu Cys Ser Phe
180 185 190

Ser Ser Ser Arg Ser Gly Phe His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Lys Arg
195 200 205

65

ES 2 724 549 T3

Glu Ser Val Ala Lys Met Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ala Leu Met Lys
 210 215 220
 5
 Gly Arg Ser Val Arg Asp Gly Thr Phe Arg Arg Ala Gln Arg Arg Ser
 225 230 235 240
 10
 Phe Thr Pro Ala Ser Phe Leu Glu Glu Asp Thr Thr Asp Phe Pro Asp
 245 250 255
 15
 Glu Leu Asp Thr Ser Phe Phe Ala Arg Glu Gly Ile Leu His Glu Glu
 260 265 270
 20
 Leu Ser Thr Tyr Pro Asp Glu Val Phe Glu Ser Pro Ser Glu Ala Ala
 275 280 285
 25
 Leu Lys Asp Trp Glu Lys Ala Pro Glu Gln Ala Asp Leu Thr Gly Gly
 290 295 300
 30
 Ala Leu Asp Arg Ser Glu Leu Glu Arg Ser His Leu Met Leu Pro Leu
 305 310 315 320
 35
 Glu Arg Gly Trp Arg Lys Gln Lys Glu Gly Ala Ala Ala Pro Gln Pro
 325 330 335
 40
 Lys Val Arg Leu Arg Gln Glu Val Val Ser Thr Ala Gly Pro Arg Arg
 340 345 350
 45
 Gly Gln Arg Ile Ala Val Pro Val Arg Lys Leu Phe Ala Arg Glu Lys
 355 360 365
 50
 Arg Pro Tyr Gly Leu Gly Met Val Gly Arg Leu Thr Asn Arg Thr Tyr
 370 375 380
 55
 Arg Lys Arg Ile Asp Ser Phe Val Lys Arg Gln Ile Glu Asp Met Asp
 385 390 395 400
 60
 Asp His Arg Pro Phe Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Ser Leu
 405 410 415
 65
 Val Thr Ile Leu Ala Val Cys Ile Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe
 420 425 430
 Ser Gln His Glu Thr Val Asp Ser Val Leu Arg Asn Arg Gly Val Tyr
 435 440 445
 Glu Asn Val Lys Tyr Val Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly Pro Ser
 450 455 460

ES 2 724 549 T3

Ser Glu Ala Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Met Arg
 465 470 475 480
 5
 Gln Asp Pro Gln Val His Ser Phe Ile Arg Ser Ala Arg Glu Arg Glu
 485 490 495
 10
 Lys His Ser Ala Cys Cys Val Arg Asn Asp Arg Ser Gly Cys Val Gln
 500 505 510
 15
 Thr Ser Glu Glu Glu Cys Ser Ser Thr Leu Ala Val Trp Val Lys Trp
 515 520 525
 20
 Pro Ile His Pro Ser Ala Pro Glu Leu Ala Gly His Lys Arg Gln Phe
 530 535 540
 25
 Gly Ser Val Cys His Gln Asp Pro Arg Val Cys Asp Glu Pro Ser Ser
 545 550 555 560
 30
 Glu Asp Pro His Glu Trp Pro Glu Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys
 565 570 575
 35
 Thr Lys Asn Ser Ala Gly Asn His Thr Asn His Pro His Met Asp Cys
 580 585 590
 40
 Val Ile Thr Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Arg Cys Glu
 595 600 605
 45
 Ile Thr Ser Arg Glu Tyr Cys Asp Phe Met Arg Gly Tyr Phe His Glu
 610 615 620
 50
 Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Met Asp Asp Val Cys Gly
 625 630 635 640
 55
 Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Leu
 645 650 655
 60
 Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Leu His Cys Leu Val Ser
 660 665 670
 65
 Ile Cys Phe Gln Met Thr Val Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly
 675 680 685
 70
 Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Tyr Leu Leu Ser Gly Val Thr Gly Asn
 690 695 700
 75
 Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala

ES 2 724 549 T3

	705				710					715					720	
5	Gly	Ser	Gln	Phe	Gly 725	Ile	Leu	Ala	Cys	Leu 730	Phe	Val	Glu	Leu	Phe 735	Gln
10	Ser	Trp	Gln	Ile 740	Leu	Ala	Arg	Pro	Trp 745	Arg	Ala	Phe	Phe	Lys 750	Leu	Leu
15	Ala	Val	Val 755	Leu	Phe	Leu	Phe	Thr 760	Phe	Gly	Leu	Leu	Pro 765	Trp	Ile	Asp
20	Asn 770	Phe	Ala	His	Ile	Ser	Gly 775	Phe	Ile	Ser	Gly	Leu 780	Phe	Leu	Ser	Phe
25	Ala 785	Phe	Leu	Pro	Tyr	Ile 790	Ser	Phe	Gly	Lys	Phe 795	Asp	Leu	Tyr	Arg	Lys 800
30	Arg	Cys	Gln	Ile	Ile 805	Ile	Phe	Gln	Val	Val 810	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala 815
35	Gly	Leu	Val	Val 820	Leu	Phe	Tyr	Val	Tyr 825	Pro	Val	Arg	Cys	Glu 830	Trp	Cys
40	Glu	Phe	Leu	Thr	Cys	Ile	Pro	Phe 840	Thr	Asp	Lys	Phe	Cys 845	Glu	Lys	Tyr
45	Glu 850	Leu	Asp	Ala	Gln	Leu	His 855									

50
 <210> 33
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 33

60

65

ES 2 724 549 T3

5 Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

10 Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
20 25 30

15 Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
35 40 45

20 Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
50 55 60

25 Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 724 549 T3

	65					70										75															80		
5	Ile	Thr	Gly	Glu	Glu	Val	Glu	Val	Gln	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Asp	Ser																	
					85					90					95																		
10	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Val	Thr	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr																	
				100					105					110																			
15	Tyr	Phe	Ser	Val	Asn	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Asp																	
			115					120					125																				
20	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys	Glu	Thr	Asp	Asn	Thr																	
	130						135					140																					
25	Lys	Pro	Asn	Arg	Met	Pro	Val	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Ser	Pro	Glu	Lys																	
	145					150					155																						
30	Met	Glu	Lys	Lys	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Lys	Phe																	
					165					170						175																	
35	Lys	Cys	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Leu	Arg	Trp	Leu	Lys																	
				180					185					190																			
40	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Pro	Asp	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val																	
			195					200					205																				
45	Arg	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ser	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp																	
		210					215					220																					
50	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Ile	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn																	
	225					230					235					240																	
55	His	Thr	Tyr	Gln	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile																	
					245					250						255																	
60	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Lys	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Asn																	
				260					265					270																			
65	Val	Glu	Phe	Met	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Pro	Gln	Pro	His	Ile	Gln																	
			275					280				285																					
70	Trp	Leu	Lys	His	Ile	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Ile	Gly	Pro	Asp	Asn																	
		290					295					300																					
75	Leu	Pro	Tyr	Val	Gln	Ile	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Asp																	
	305					310					315					320																	

ES 2 724 549 T3

Lys Glu Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala
 325 330 335
 5
 Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His
 340 345 350
 10
 Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val
 355 360 365
 15
 Met Thr Ser Pro Leu Tyr Leu Glu Ile Ile Ile Tyr Cys Thr Gly Ala
 370 375 380
 20
 Phe Leu Ile Ser Cys Met Val Gly Ser Val Ile Val Tyr Lys Met Lys
 385 390 395 400
 25
 Ser Gly Thr Lys Lys Ser Asp Phe His Ser Gln Met Ala Val His Lys
 405 410 415
 30
 Leu Ala Lys Ser Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Asp
 420 425 430
 35
 Ser Ser Ala Ser Met Asn Ser Gly Val Leu Leu Val Arg Pro Ser Arg
 435 440 445
 40
 Leu Ser Ser Ser Gly Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu
 450 455 460
 45
 Leu Pro Glu Asp Pro Arg Trp Glu Leu Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu
 465 470 475 480
 50
 Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu
 485 490 495
 55
 Ala Ile Gly Leu Asp Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala
 500 505 510
 60
 Val Lys Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu
 515 520 525
 65
 Ile Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile
 530 535 540
 70
 Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile
 545 550 555 560
 75
 Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala Arg
 565 570 575

ES 2 724 549 T3

Arg Pro Pro Gly Leu Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro Glu
 580 585 590
 5
 Glu Gln Leu Ser Ser Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala
 595 600 605
 10
 Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
 610 615 620
 15
 Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala
 625 630 635 640
 20
 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys
 645 650 655
 25
 Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu
 660 665 670
 30
 Phe Asp Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
 675 680 685
 35
 Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val
 690 695 700
 40
 Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp
 705 710 715 720
 45
 Lys Pro Ser Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys
 725 730 735
 50
 Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu
 740 745 750
 55
 Asp Leu Asp Arg Ile Val Ala Leu Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu Asp
 755 760 765
 60
 Leu Ser Met Pro Leu Asp Gln Tyr Ser Pro Ser Phe Pro Asp Thr Arg
 770 775 780
 65
 Ser Ser Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His Glu Pro
 785 790 795 800
 70
 Leu Pro Glu Glu Pro Cys Leu Pro Arg His Pro Ala Gln Leu Ala Asn
 805 810 815
 75
 Gly Gly Leu Lys Arg Arg
 820

ES 2 724 549 T3

<210> 34
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Ho mo sapiens
 <400> 34

5

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys
 1 5 10 15

10

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro
 20 25 30

15

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp
 35 40 45

20

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr
 50 55 60

25

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala
 65 70 75 80

30

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp
 85 90 95

35

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val
 100 105 110

40

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly
 115 120 125

45

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn
 130 135 140

50

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro
 145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys
 165 170 175

55

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg
 180 185 190

60

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe
 195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala
 210 215 220

65

ES 2 724 549 T3

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala
 225 230 235 240

5

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp
 245 250 255

10

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln
 260 265 270

15

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp
 275 280 285

20

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr
 290 295 300

25

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys
 305 310 315 320

30

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg
 325 330 335

35

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr
 340 345 350

40

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp
 355 360 365

45

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr
 370 375 380

50

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile
 385 390 395 400

55

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro
 405 410 415

60

Tyr

65

ES 2 724 549 T3

<210> 35
<211> 598
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 35

10 **Met Pro Cys Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly**
1 5 10 15

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 724 549 T3

Pro Arg Asp His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys
 20 25 30
 5
 Pro Thr Met Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr
 35 40 45
 10
 Ala Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe
 50 55 60
 15
 Asp Thr Phe Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser
 65 70 75 80
 20
 Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ala Thr Ser Pro
 85 90 95
 25
 Ala Ser Ala Ser Phe Lys Phe Glu Asp Phe Gln Val Tyr Gly Cys Tyr
 100 105 110
 30
 Pro Gly Pro Leu Ser Gly Pro Val Asp Glu Ala Leu Ser Ser Ser Gly
 115 120 125
 35
 Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Pro Cys Ser Ala Pro Ser Pro Ser Thr Pro
 130 135 140
 40
 Ser Phe Gln Pro Pro Gln Leu Ser Pro Trp Asp Gly Ser Phe Gly His
 145 150 155 160
 45
 Phe Ser Pro Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln
 165 170 175
 50
 Leu Pro Lys Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe
 180 185 190
 55
 Ser Pro Pro Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys
 195 200 205
 60
 Leu Phe Pro Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr
 210 215 220
 65
 Ser Met Pro Thr Ala Phe Pro Gly Leu Ala Pro Thr Ser Pro His Leu
 225 230 235 240
 Glu Gly Ser Gly Ile Leu Asp Thr Pro Val Thr Ser Thr Lys Ala Arg
 245 250 255
 Ser Gly Ala Pro Gly Gly Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp

ES 2 724 549 T3

			260					265					270			
5	Asn	Ala	Ser	Cys	Gln	His	Tyr	Gly	Val	Arg	Thr	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys
			275					280					285			
10	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Thr	Val	Gln	Lys	Asn	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Leu
		290					295					300				
15	Ala	Asn	Lys	Asp	Cys	Pro	Val	Asp	Lys	Arg	Arg	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln
	305					310					315					320
20	Phe	Cys	Arg	Phe	Gln	Lys	Cys	Leu	Ala	Val	Gly	Met	Val	Lys	Glu	Val
					325					330					335	
25	Val	Arg	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Lys
			340						345					350		
30	Pro	Lys	Gln	Pro	Pro	Asp	Ala	Ser	Pro	Ala	Asn	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu
			355					360					365			
35	Val	Arg	Ala	His	Leu	Asp	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Ala	Lys	Leu	Asp	Tyr
		370					375					380				
40	Ser	Lys	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Leu	Pro	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Asp	Ala
	385					390					395					400
45	Gly	Asp	Val	Gln	Gln	Phe	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	Val
					405					410					415	
50	Ile	Arg	Lys	Trp	Ala	Glu	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro
				420					425					430		
55	Ala	Asp	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Ser	Ala	Phe	Leu	Glu	Leu	Phe	Ile
			435					440					445			
60	Leu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Arg	Ser	Lys	Pro	Gly	Glu	Gly	Lys	Leu	Ile	Phe
		450					455					460				
65	Cys	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Cys	Ala	Arg	Gly	Phe	Gly
	465					470					475					480
70	Asp	Trp	Ile	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	His	Ser	Leu
					485					490					495	
75	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Ala	Phe	Ala	Cys	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Ile
			500						505					510		

ES 2 724 549 T3

Thr Asp Arg His Gly Leu Gln Glu Pro Arg Arg Val Glu Glu Leu Gln
 515 520 525
 5

Asn Arg Ile Ala Ser Cys Leu Lys Glu His Val Ala Ala Val Ala Gly
 530 535 540
 10

Glu Pro Gln Pro Ala Ser Cys Leu Ser Arg Leu Leu Gly Lys Leu Pro
 545 550 555 560
 15

Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu
 565 570 575
 20

Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Pro Ile Ile Asp Lys Ile Phe
 580 585 590
 25

Met Asp Thr Leu Pro Phe
 595
 30

<210> 36
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 36
 40 gtcgtatcca gtcagggtc cgaggtattc gcaactggata cgacattgag 50

<210> 37
 <211> 50
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 37
 50 gtcgtatcca gtcagggtc cgaggtattc gcaactggata cgacaacacc 50

<210> 38
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 38
 gtcgtatcca gtcagggtc cgaggtattc gcaactggata cgacagttgt 50

<210> 39
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 65 <223> cebador
 <400> 39

ES 2 724 549 T3

gtcgtatcca gtcagggtc cgaggtattc gactggata cgacagttct 50

5 <210> 40
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 40
 10 gtcagggtc cgaggt 16

15 <210> 41
 <211 > 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 41
 20 tgggccgaag gtagtgagt 19

25 <210> 42
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 < 400> 42
 ttgtccgag agtagtggt 19

30 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador
 <400> 43
 tccgagtga gtggtgtta 20

40 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 45 <400> 44
 ggtccgatgg tagtgggta t 21

50 <210 > 45
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 45

55 **aaggcgcattc tgcgtacaca cacaggtgag aagcctaagg cgcattctgcg tacacacaca 60**

ggtgagaagc ct 72

60 <210> 46
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador

ES 2 724 549 T3

<400> 46

5 aaggcgcattc tgcgtacaca cacagagtga ggacctagg cgcattctgcg tacacacaca 60
gagtgaggac ct 72

10 <210> 47
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
15 <400> 47
actcactacc ttggacca 19

20 <210> 48
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
25 <400> 48
agtcaagtc agtagtgag 19

30 <210> 49
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
35 <400> 49
ttcaatctgt aactgactg 19

40 <210> 50
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
45 <400> 50
tcggaccaa accactactc 19

50 <210> 51
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223 > cebador
55 <400> 51
ctggccaagt gaagcagtg 19

60 <210> 52
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
65 <400> 52
cccactacca tcggaccag 19

<2 10> 53
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 724 549 T3

<220>
<223> Cebador
<400> 53
cgttccaatt ttagtatatg tgctgccgaa gcgagcac 38
5

<210> 54
<211> 32
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
10 < 220>
<223> siRNA
<400> 54
aguucugaua acccacuacc aucggaccag cc 32

15 <210> 55
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> siRNA
<400> 55
uucagcucga uggauauggu g 21

25 <210> 56
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> siRNA
<400> 56
cagucaguua cagauugaa 19

35 <210> 57
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223 > siRNA
<400> 57
40 caaccaguua cagauuucu 19

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento in vitro de diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis en un individuo, que comprende las etapas de:
 - a) determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador que consiste en un ARN Y pequeño (s-RNY) en una muestra biológica de dicho individuo,
 - b) comparar el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador con un valor de referencia,
 - c) deducir de dicha comparación si el individuo ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un biomarcador se selecciona del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9), s-RNY3-3p (SEQ ID NO: 10), s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11), s-RNY4-3p (SEQ ID NO: 12) y s-RNY5-3p (SEQ ID NO: 13) o variantes de los mismos.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho al menos un biomarcador es s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7) y/o s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11) y la muestra biológica es sangre entera, plasma o muestra de suero.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho trastorno relacionado con la aterosclerosis es la enfermedad de la arteria coronaria.
5. Procedimiento de cribado para un compuesto adecuado para el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto un compuesto candidato con un s-RNY o un RNY,
 - b) identificar como compuesto adecuado para el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que inhibe la maduración de dicho RNY en s-RNY o que inhibe la actividad de dicho s-RNY.
6. Inhibidor de un s-RNY para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.
7. Inhibidor de un s-RNY para su uso, según la reivindicación 6, en el que dicho s-RNY se selecciona del grupo que consiste en s-RNY1-5p (SEQ ID NO: 7), s-RNY1-3p (SEQ ID NO: 8), s-RNY3-5p (SEQ ID NO: 9) y s-RNY4-5p (SEQ ID NO: 11).
8. Inhibidor de un s-RNY para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que dicho inhibidor de un s-RNY inhibe al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en Ago2, complejo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP), Ro60 y La/SSB.
9. Inhibidor de un s-RNY para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho inhibidor interactúa específicamente con al menos un ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (hRNY1), SEQ ID NO: 2 (hRNY3), SEQ ID NO: 3 (hRNY4) y SEQ ID NO: 4 (hRNY5).
10. Inhibidor de un s-RNY para su uso, según la reivindicación 9, en el que dicho inhibidor es un ácido nucleico que hibrida específicamente con al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 (s-RNY1-5p), SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p), SEQ ID NO: 8 (s-RNY1-3p) y SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p).
11. Fármaco contra la aterosclerosis para su uso para tratar un trastorno relacionado con la aterosclerosis en un individuo, en el que dicho uso comprende diagnosticar o pronosticar el individuo con un trastorno relacionado con la aterosclerosis mediante la medición del nivel de expresión de al menos un biomarcador que consiste en un ARN Y pequeño (s-RNY) en una muestra biológica de dicho individuo.
12. Ácido nucleico aislado que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p).
13. Pareja de cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o la SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p).
14. Uso de un ácido nucleico que se hibrida específicamente a una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO: 9 (s-RNY3-5p) o SEQ ID NO: 11 (s-RNY4-5p) como sonda para el diagnóstico o pronóstico de un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

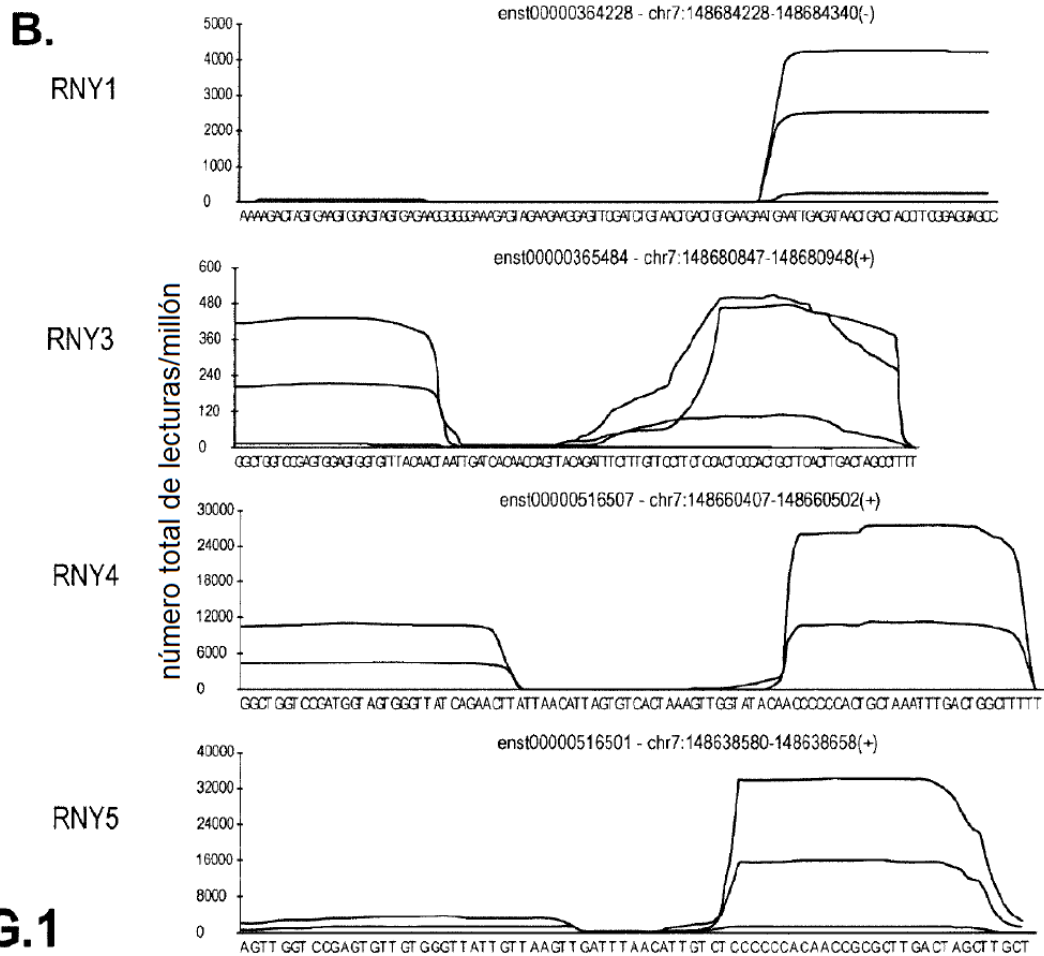
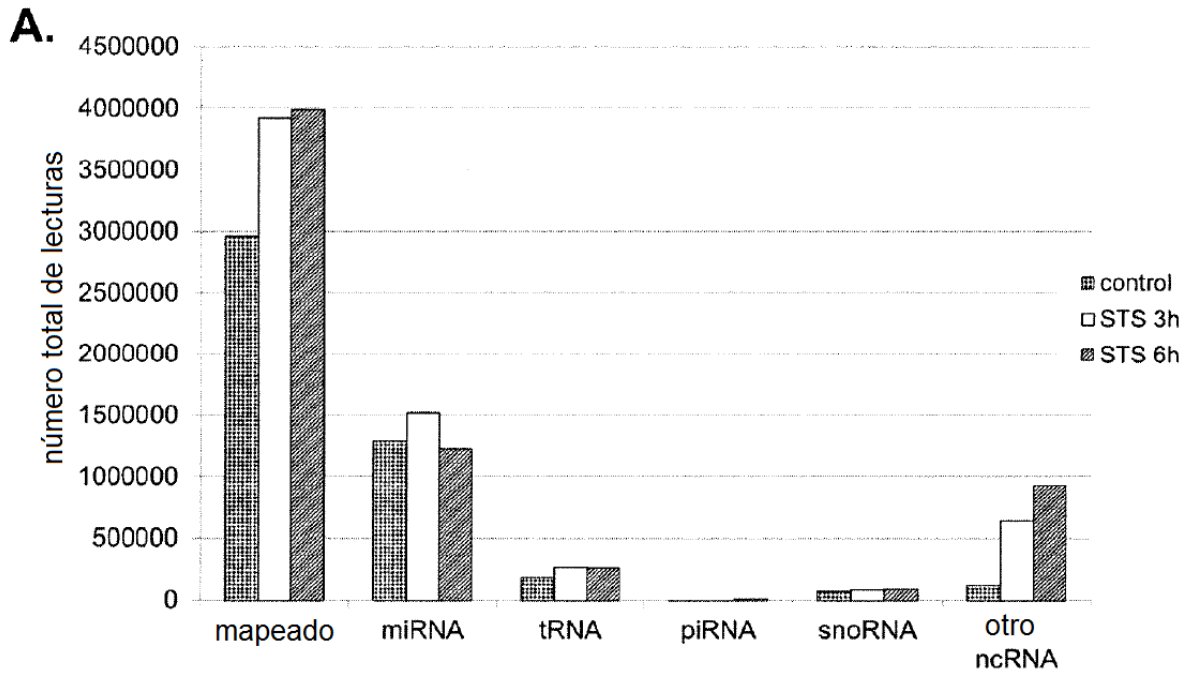
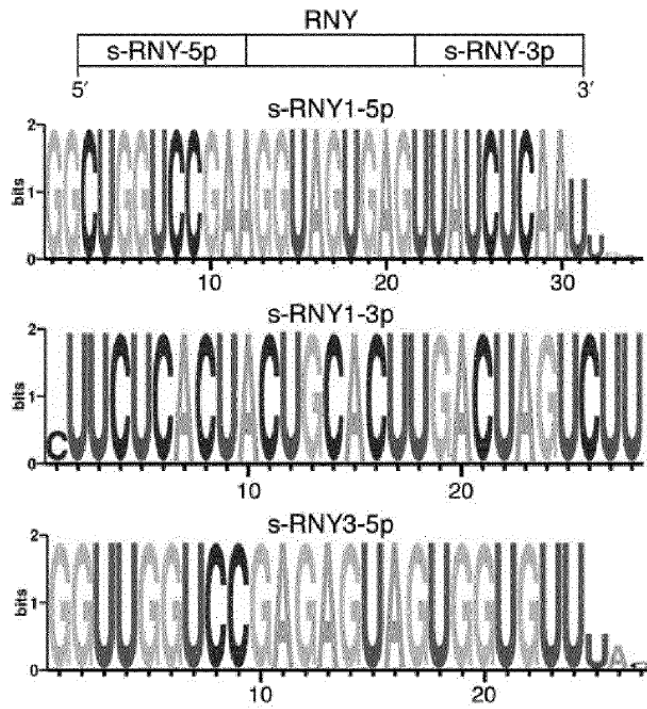


FIG.1

A.



B.

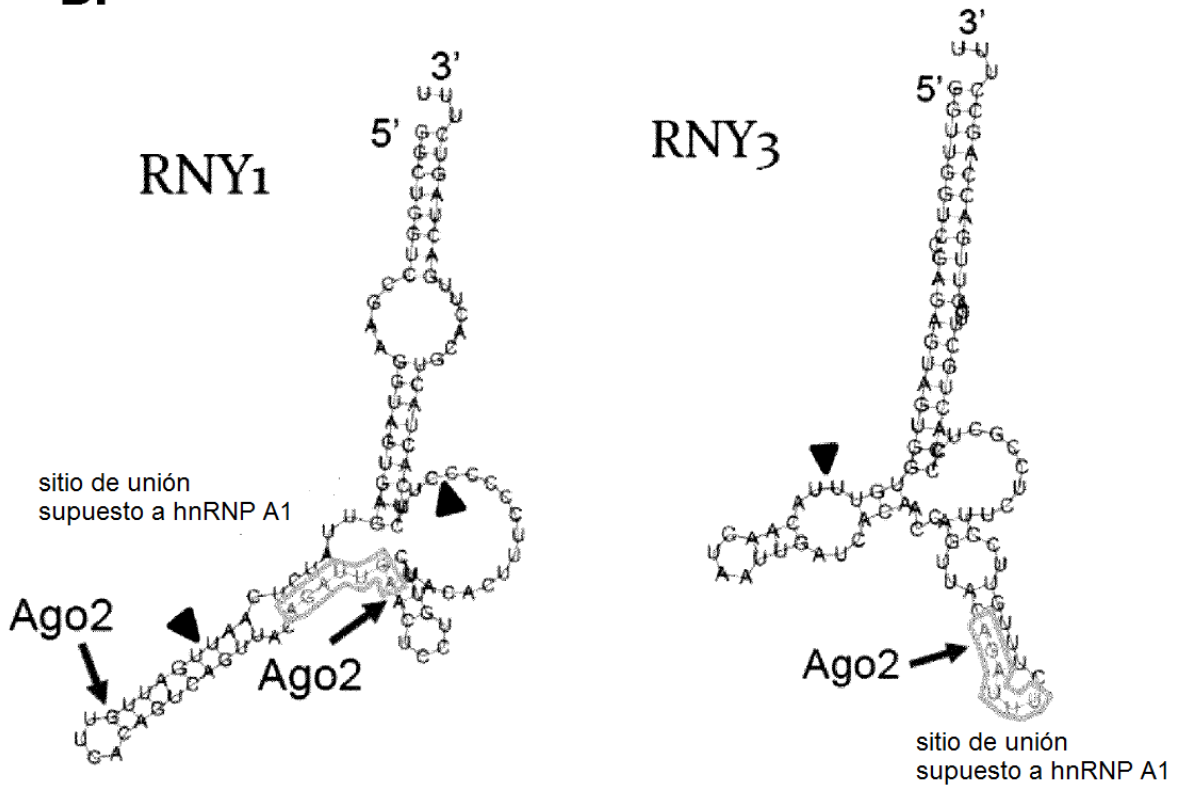
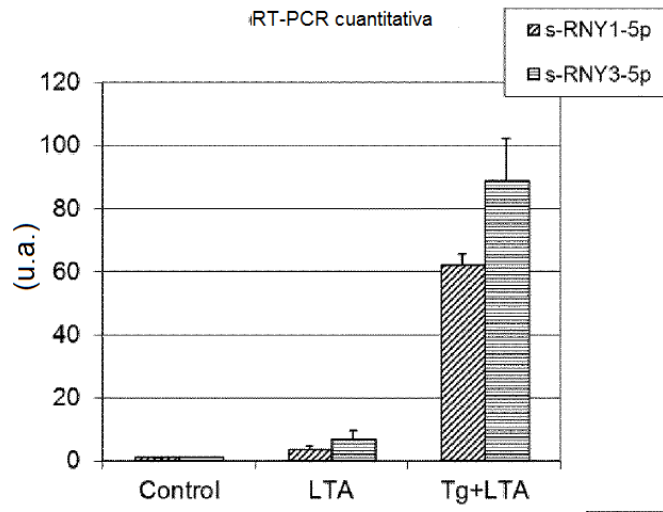
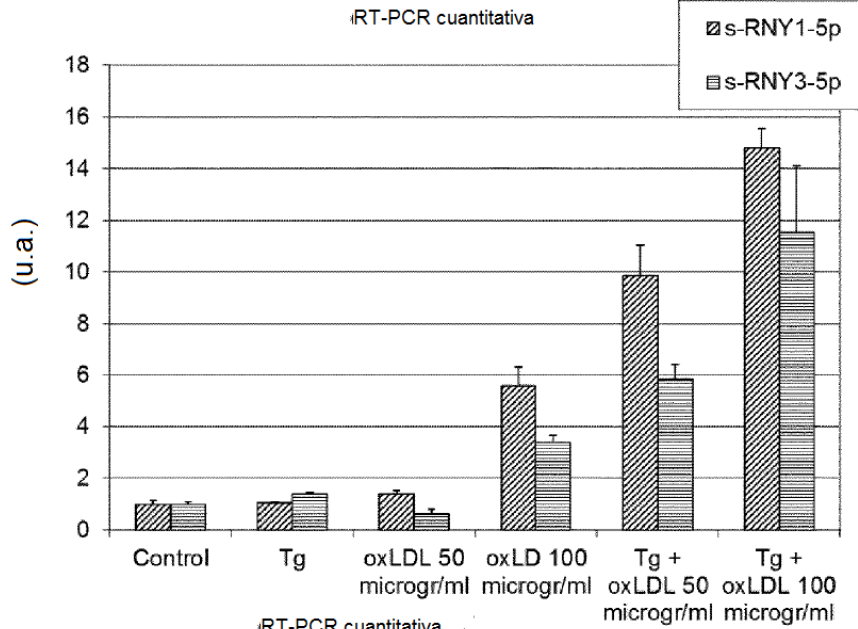


FIG.2

A.



B.



C.

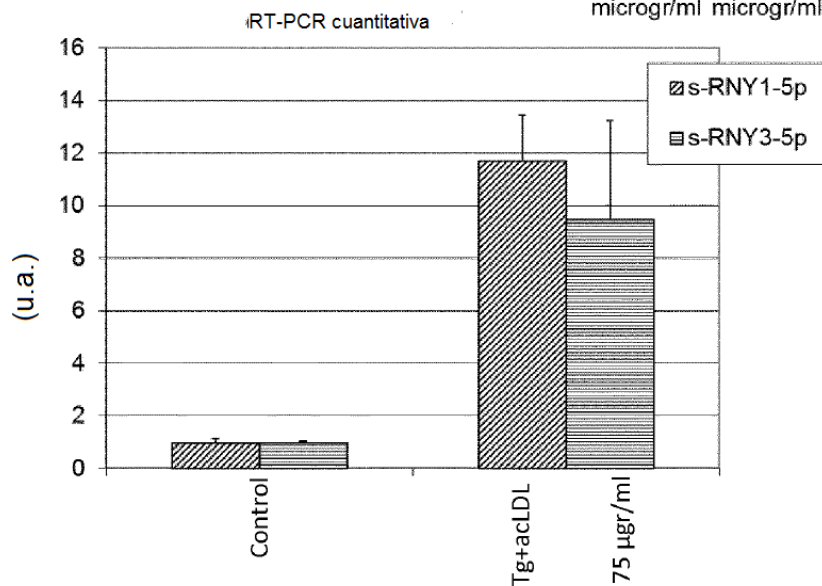
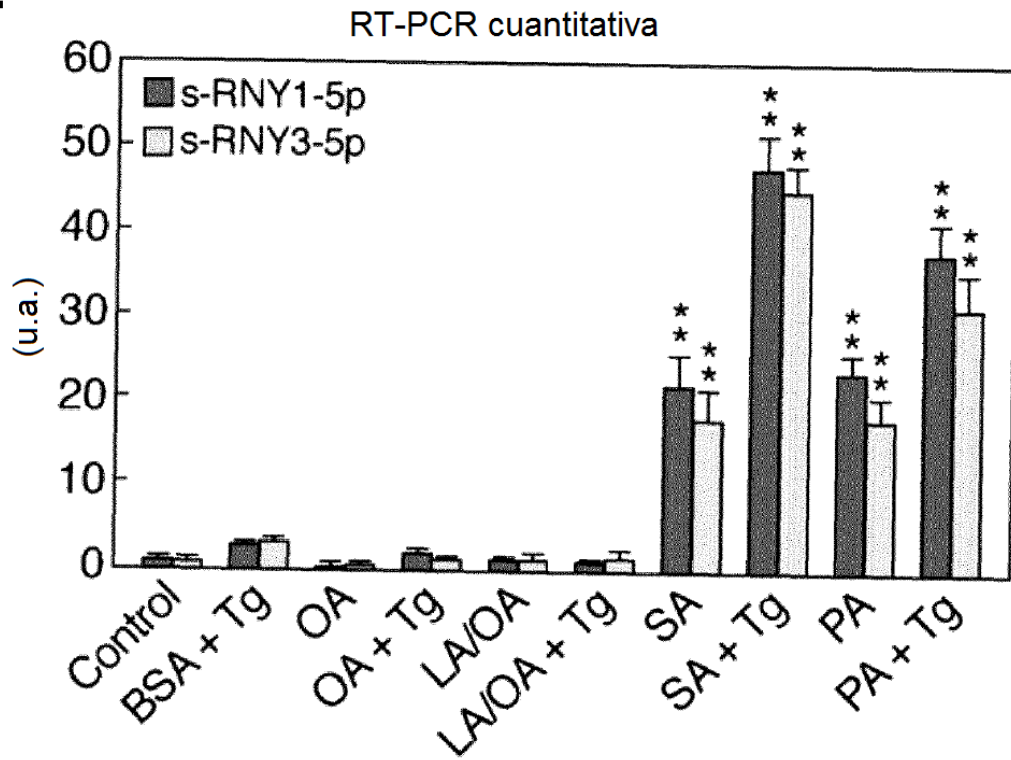
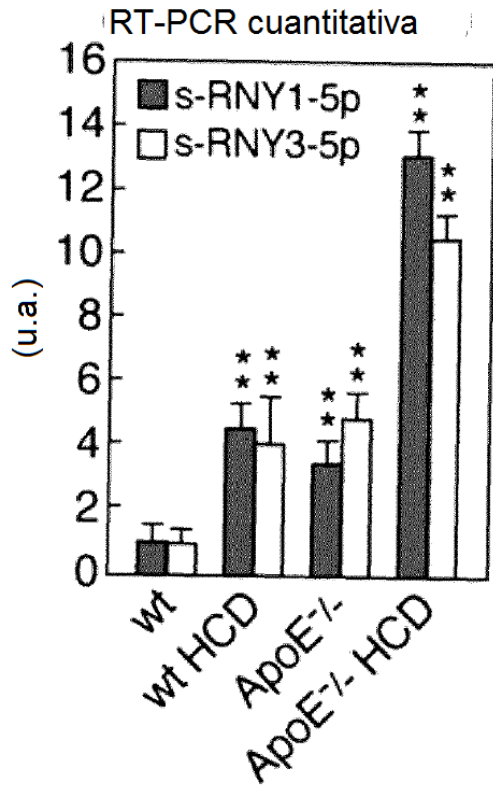


FIG.3

A.



B.



C.

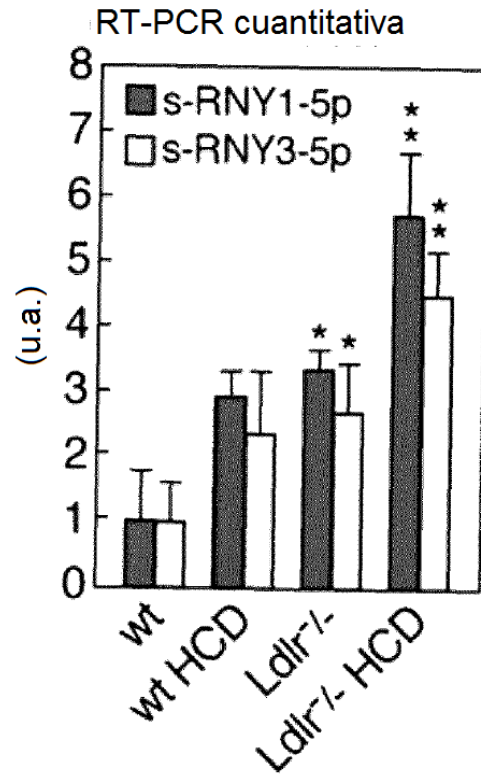


FIG.4

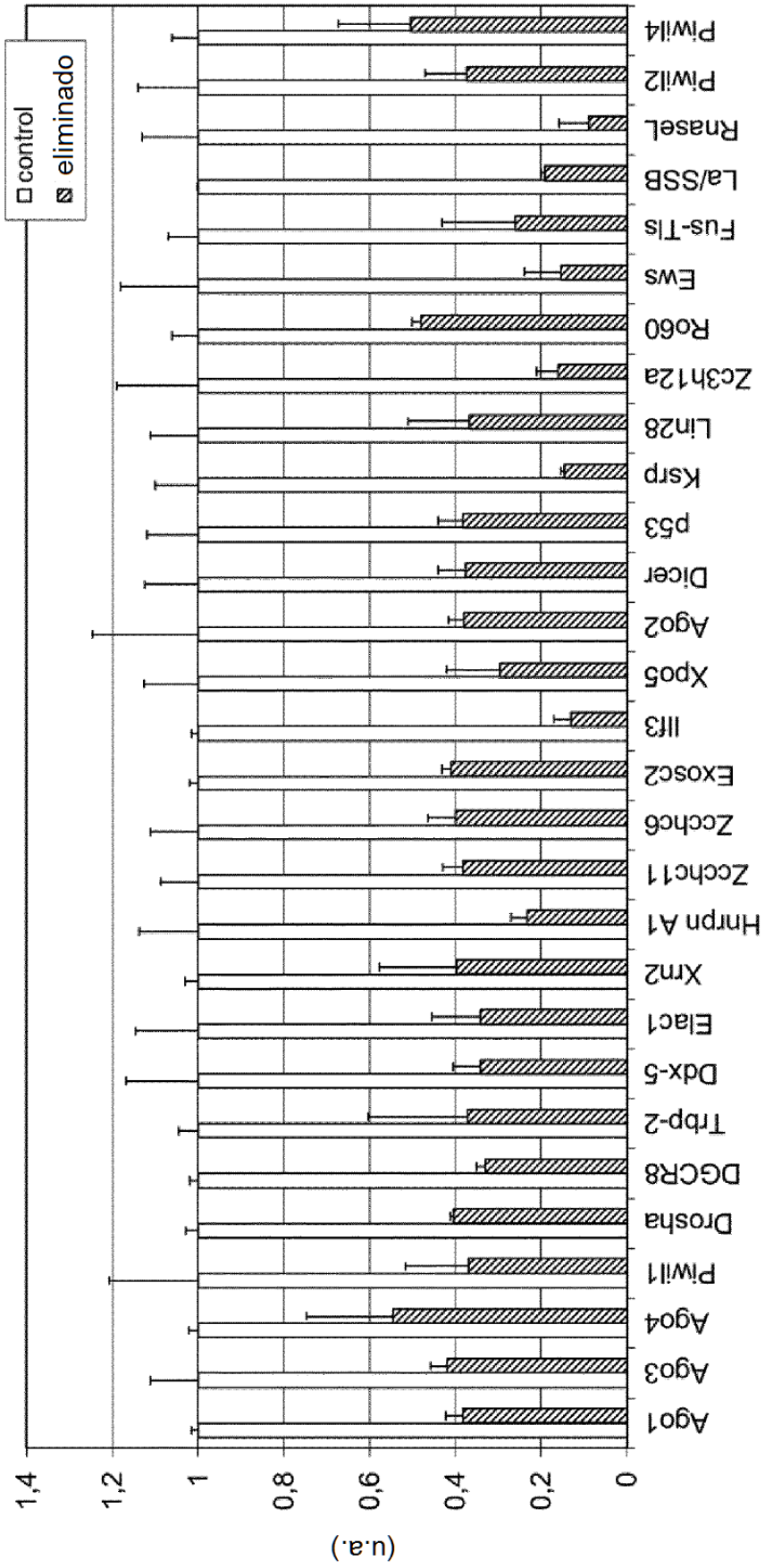


FIG.5

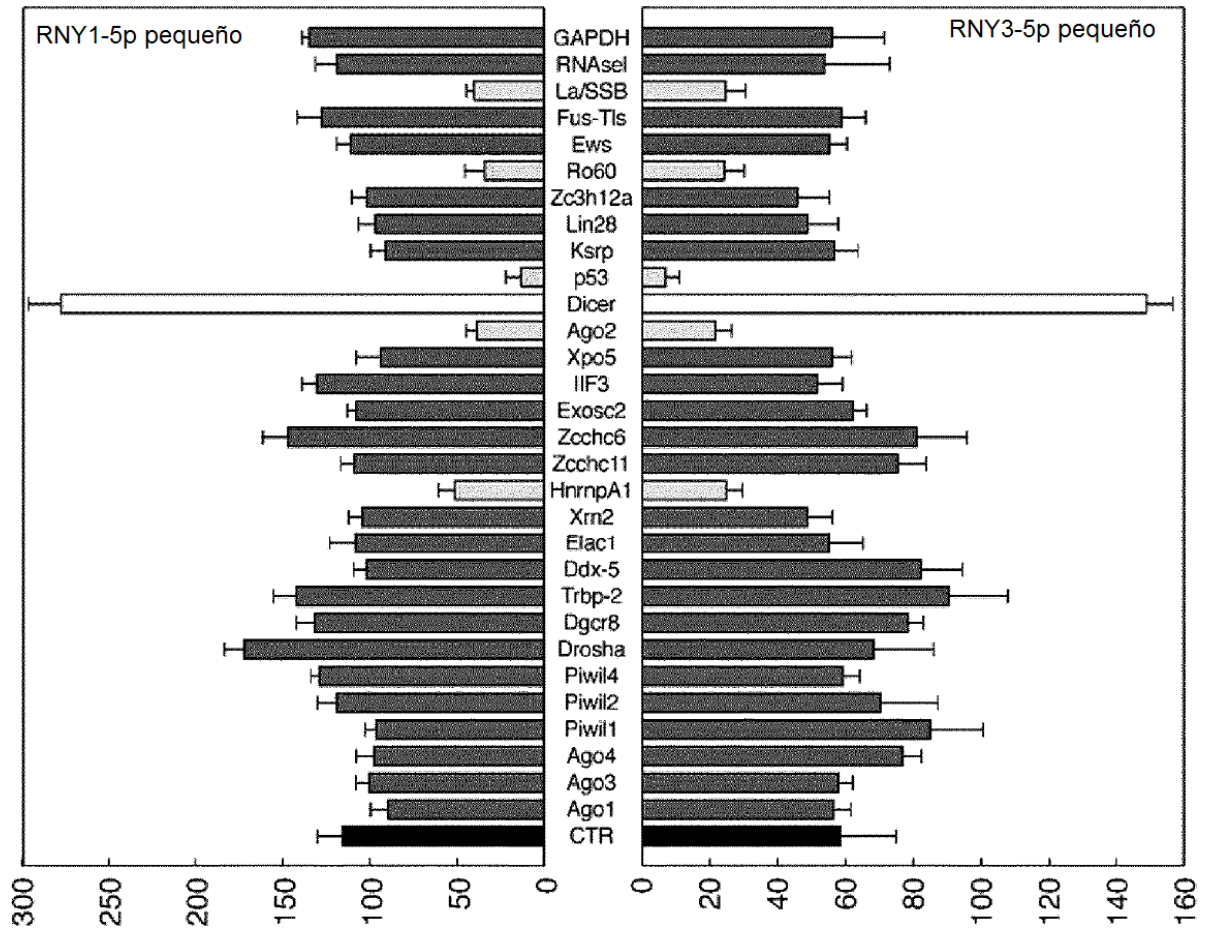


FIG.6

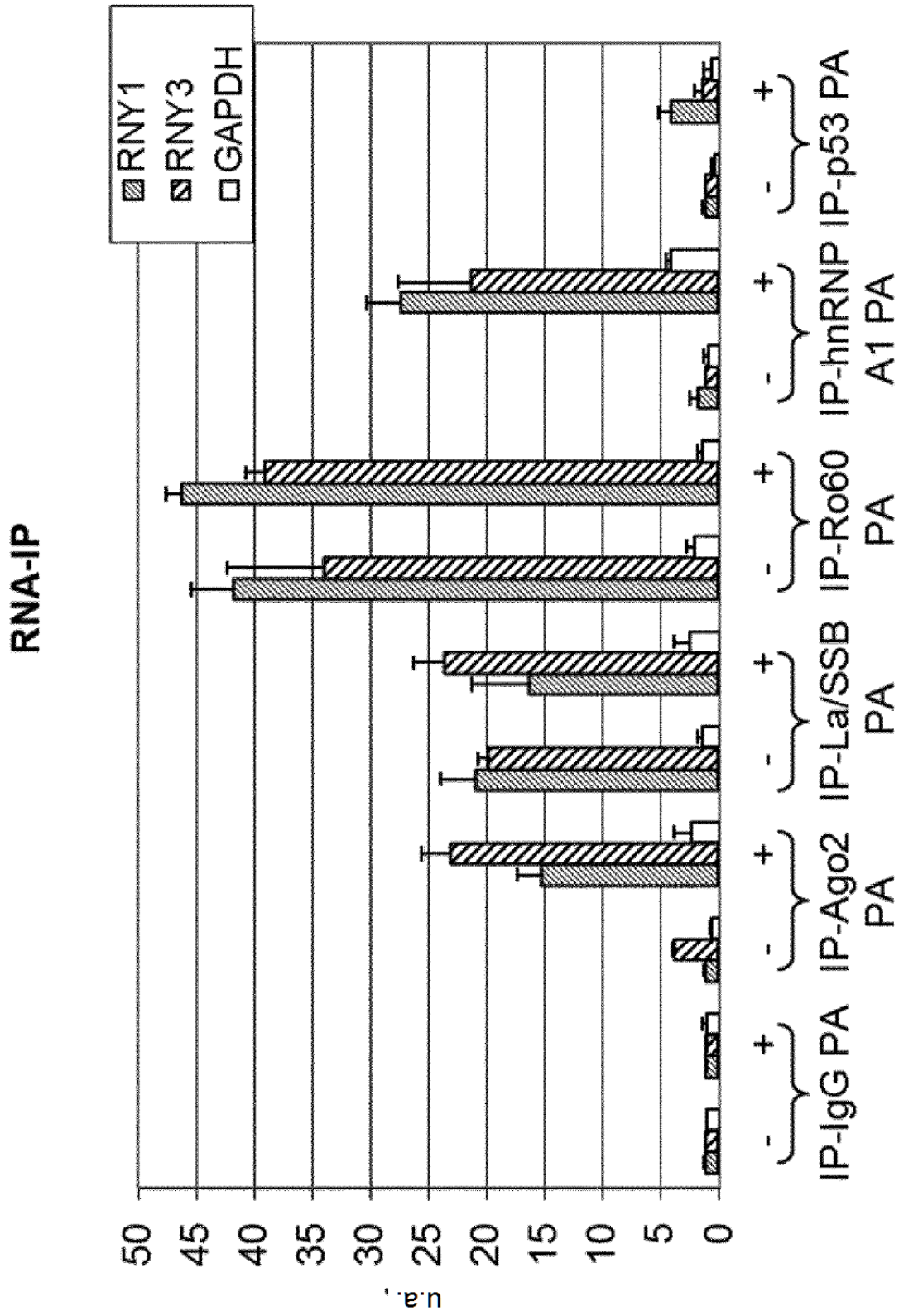
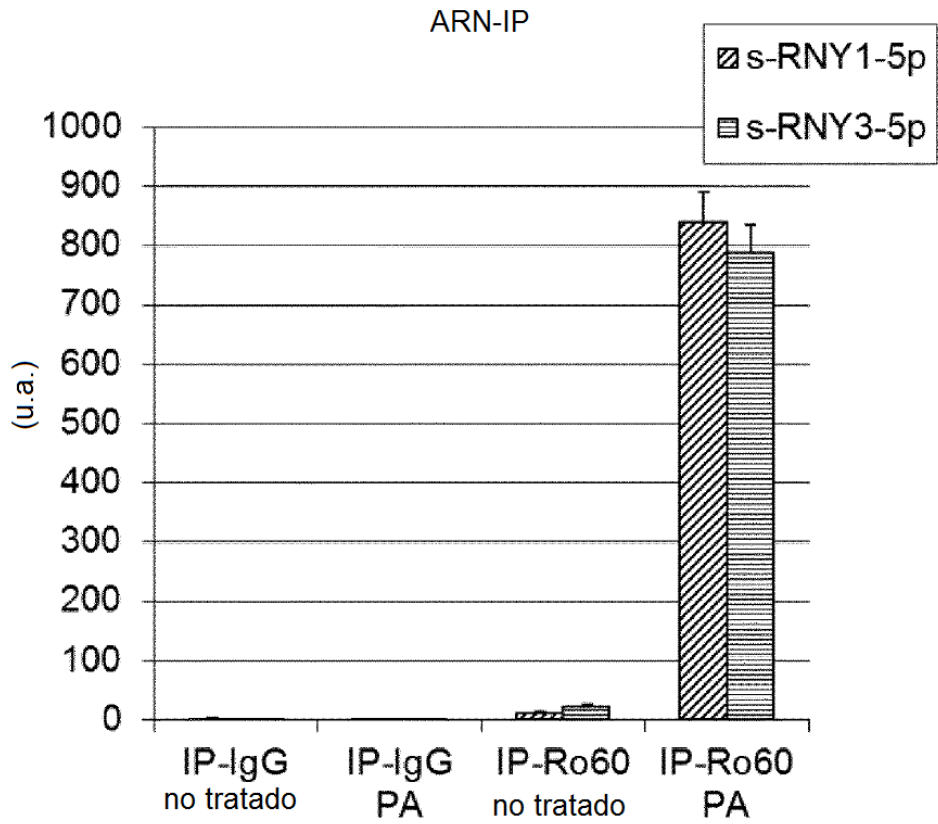


FIG.7

A.



B.

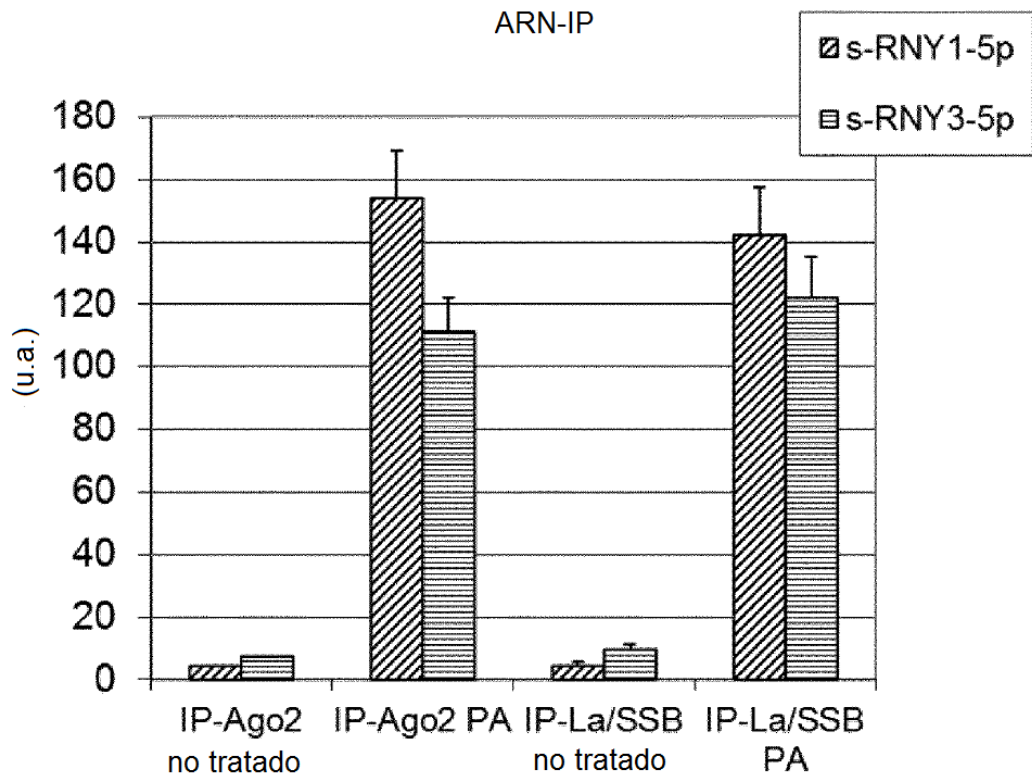
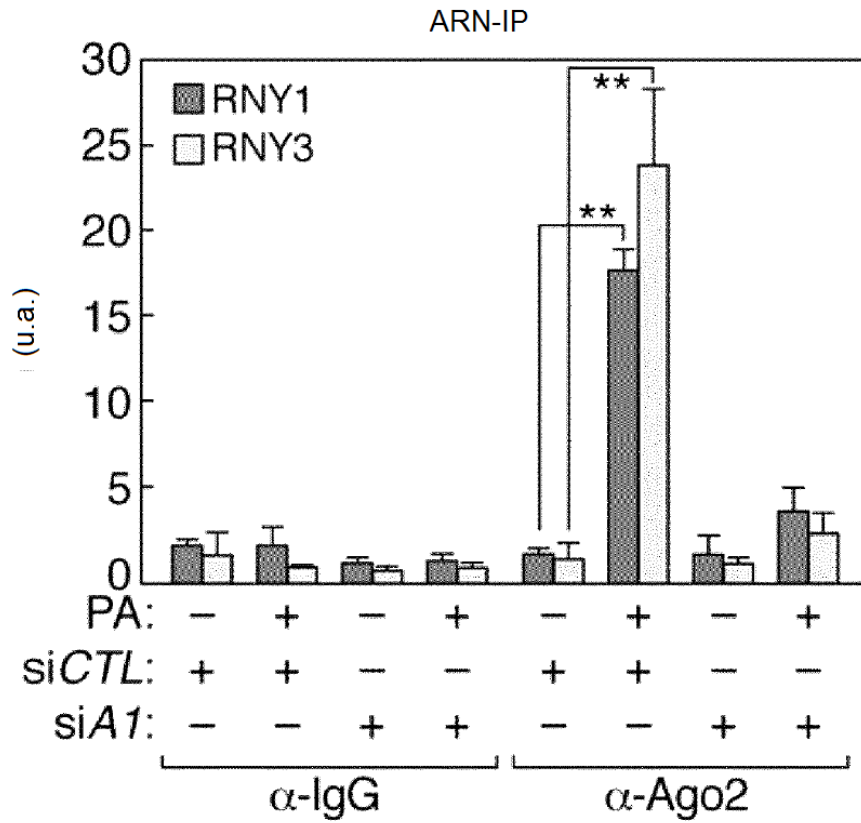


FIG.8

A.



B.

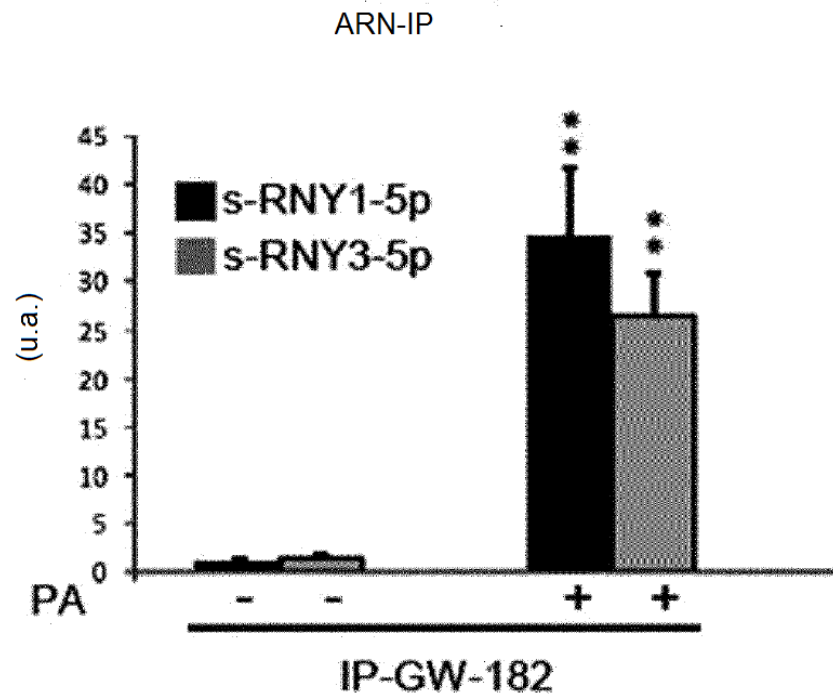


FIG.9

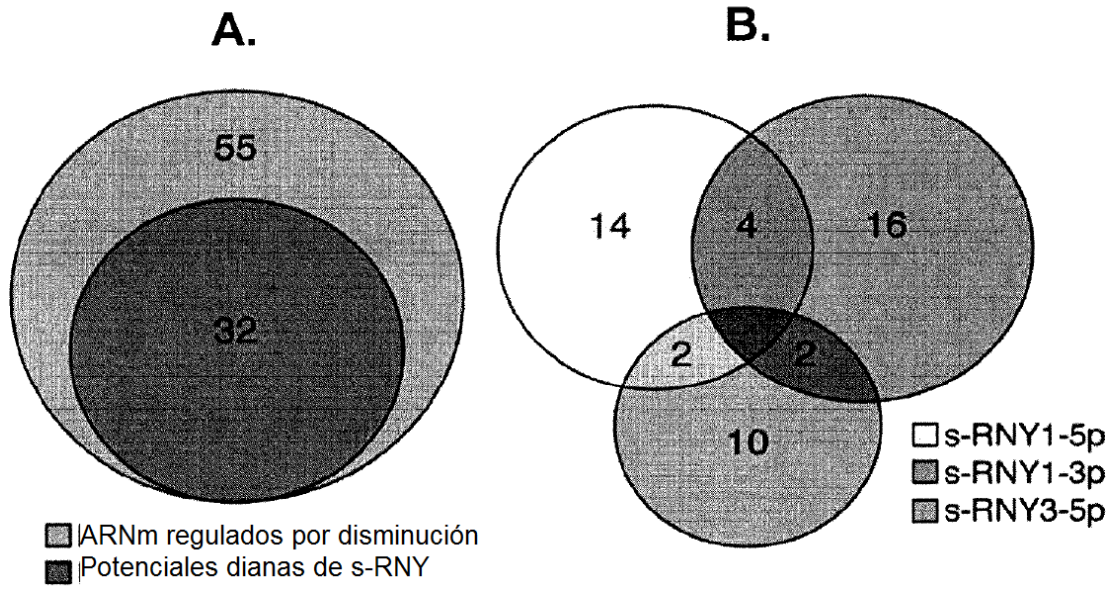


FIG.10

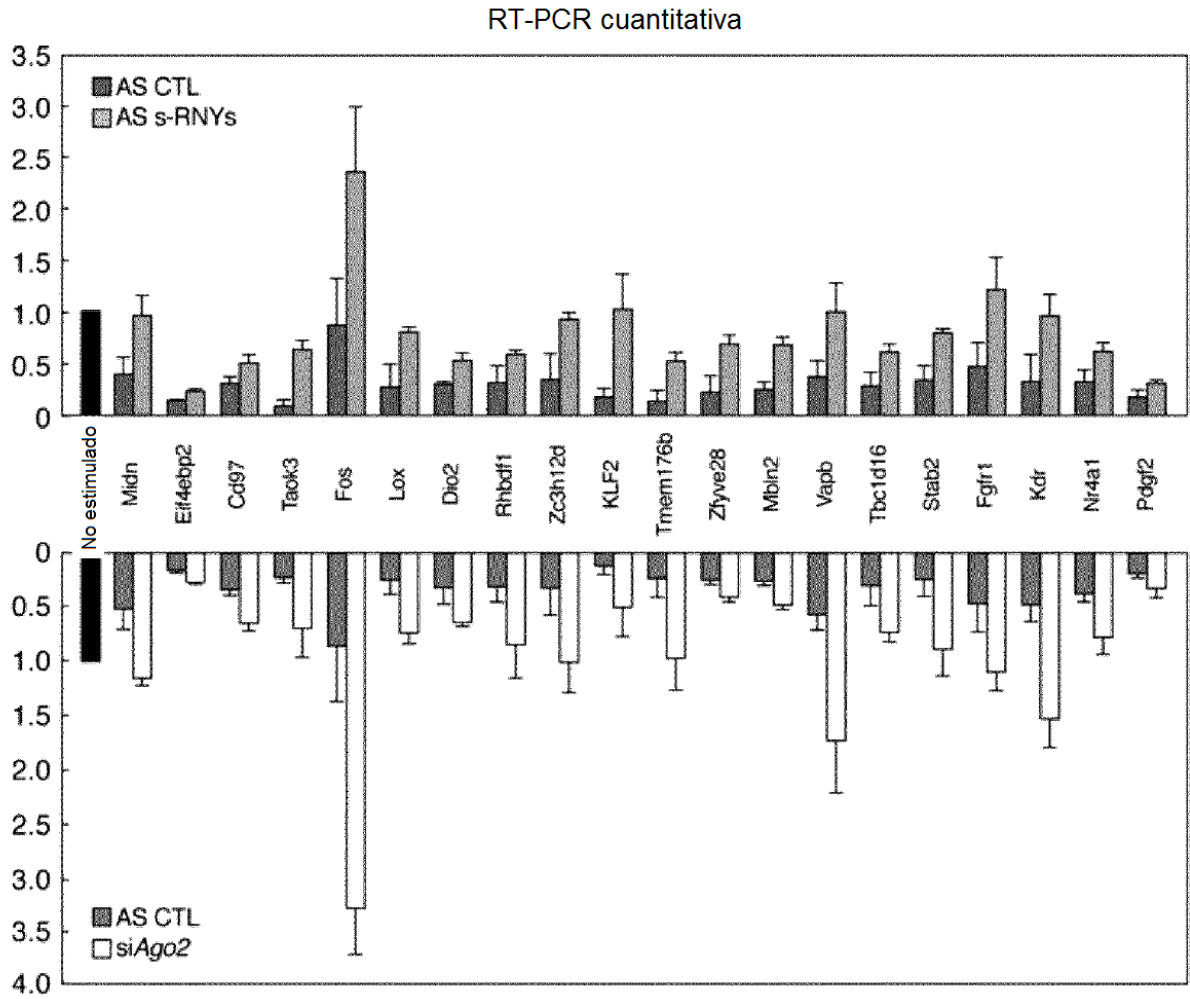
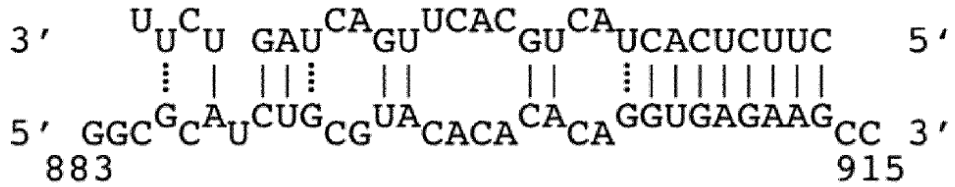


FIG.11

A.

s-RNY1-3p + |ARNm de KLF2



B.

Ratón	AAGGCGCAUCUGCGUACACACACAGGGUGAGAAGCCUU
Rata	AAGGCGCAUCUGAGGACGCACACAGGGUGAGAAGCCUU
Xenopus	AAAGCCCAUCUCAGAACCCACACAGGGUGAGAAGCCUU
Humano	GCUUACUCUCGCCCCUCCUGCAGGGUGAGAAGCCCU
	** * ***** *

C.

Actividad de luciferasa

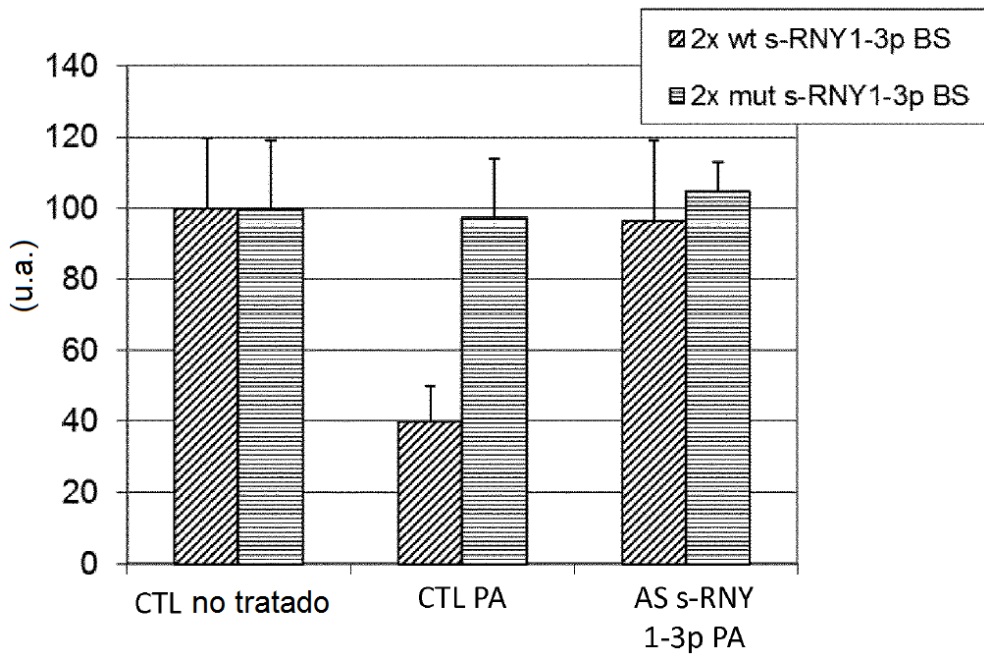
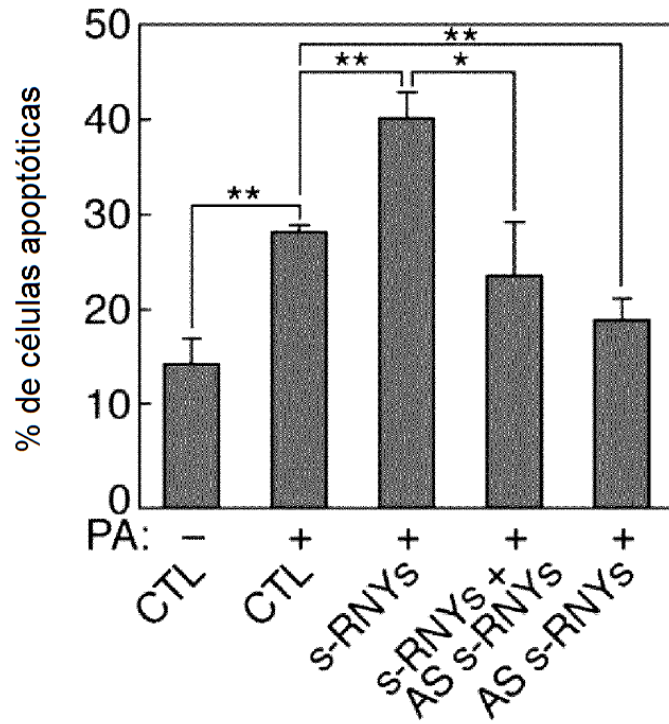


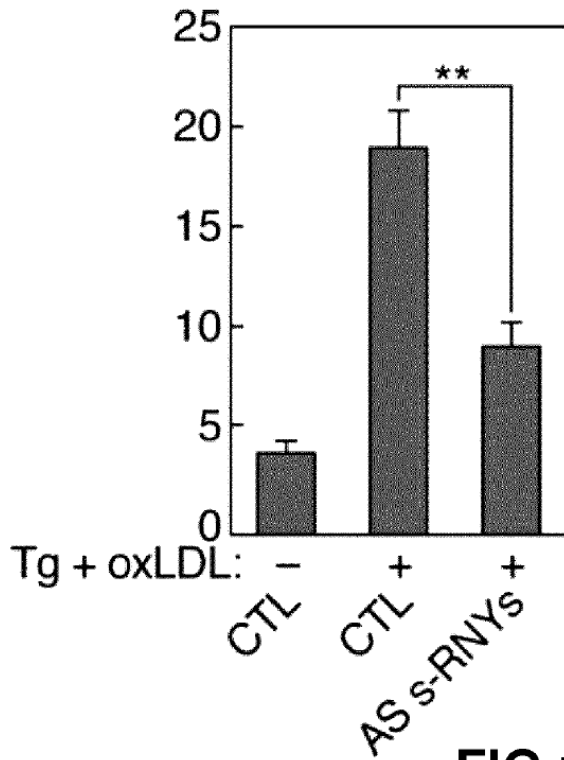
FIG.12

A.



B.

Citometría de flujo



C.

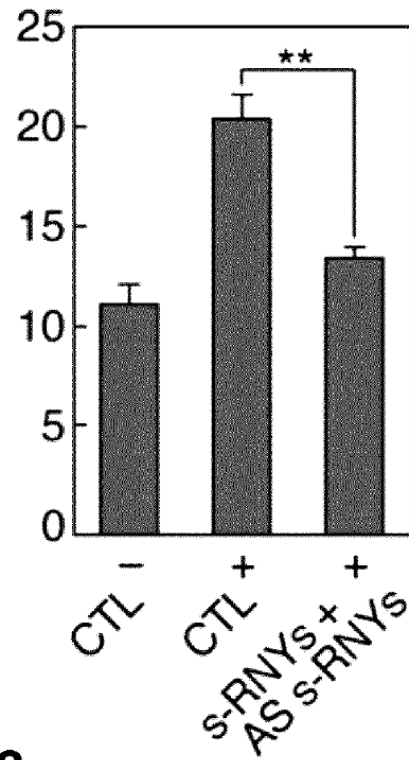


FIG.13

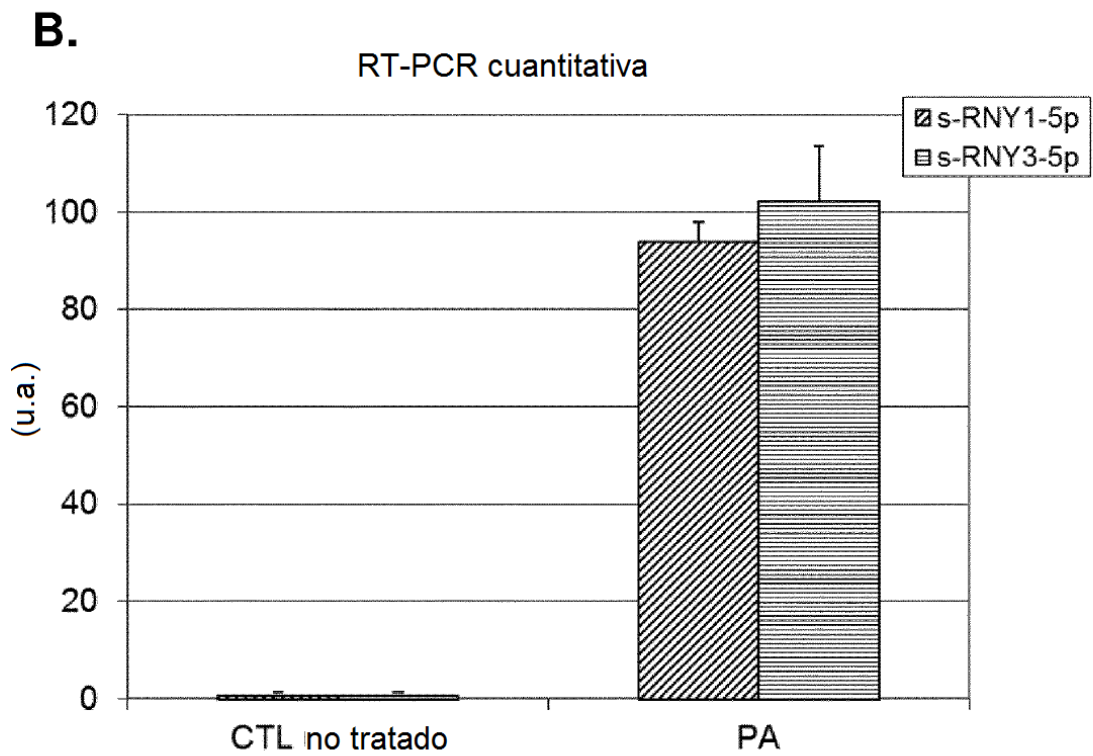
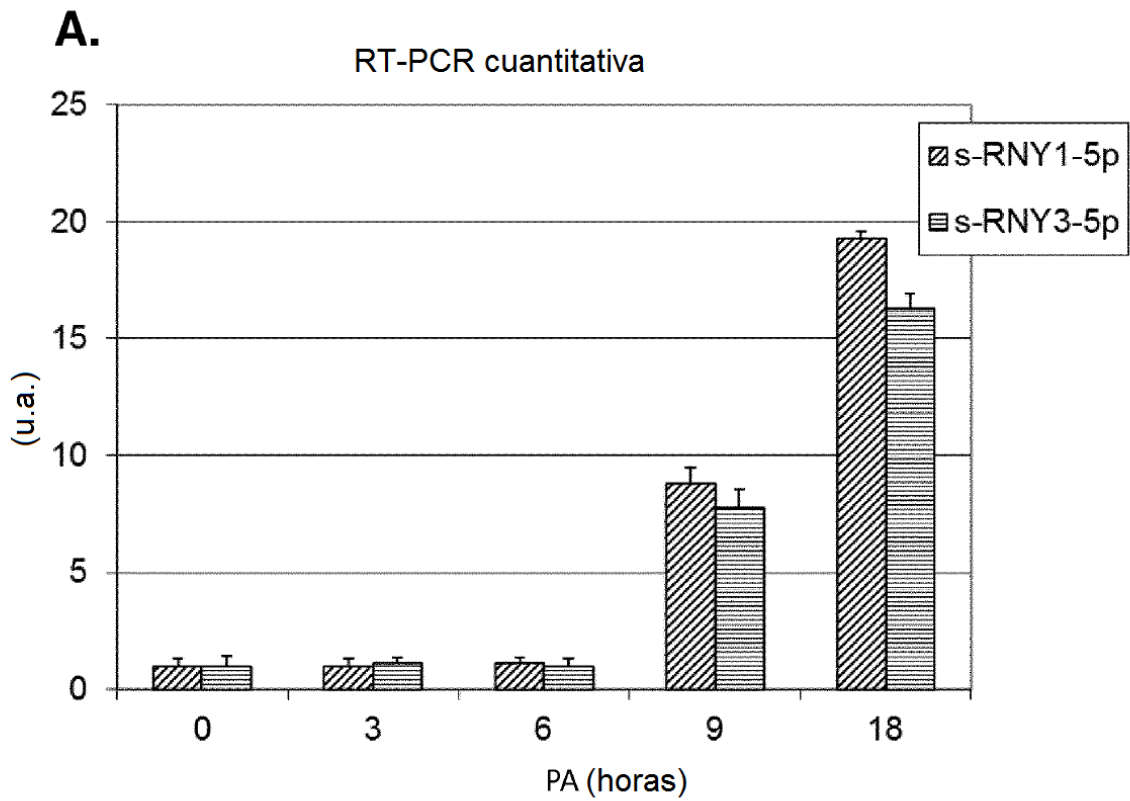


FIG.14

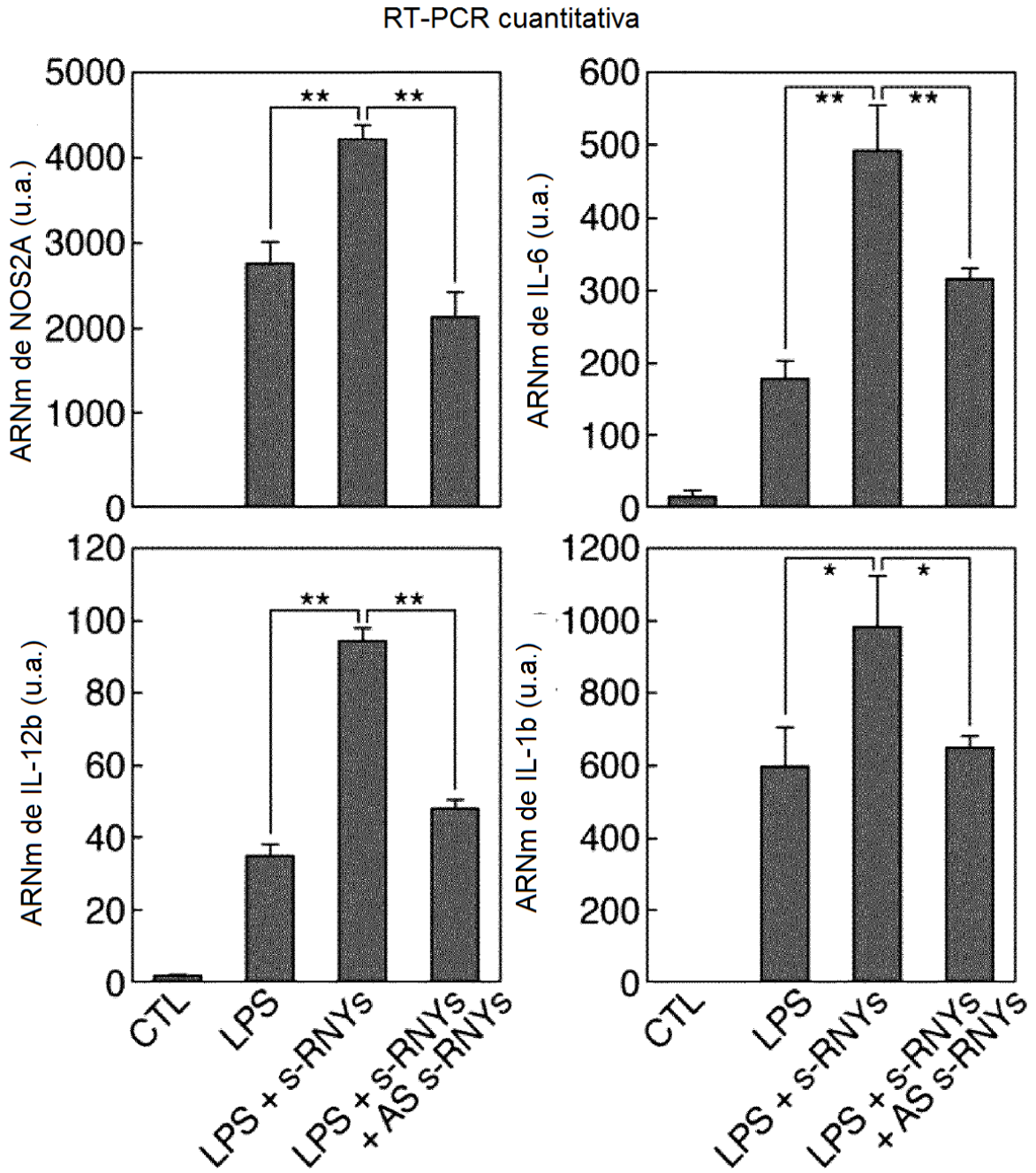


FIG.15

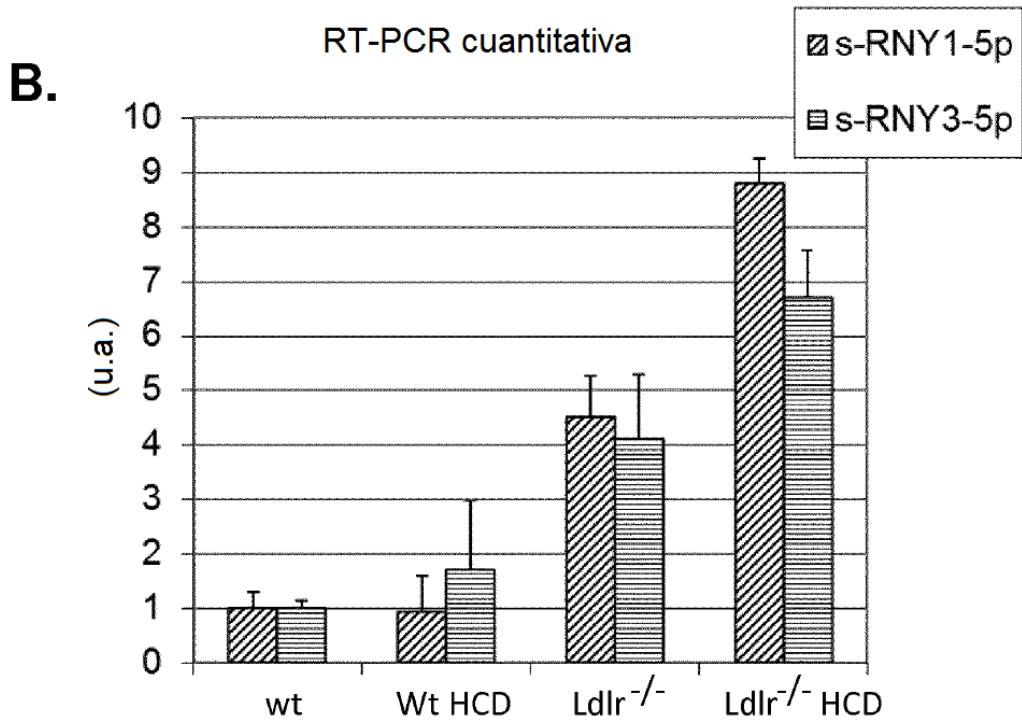
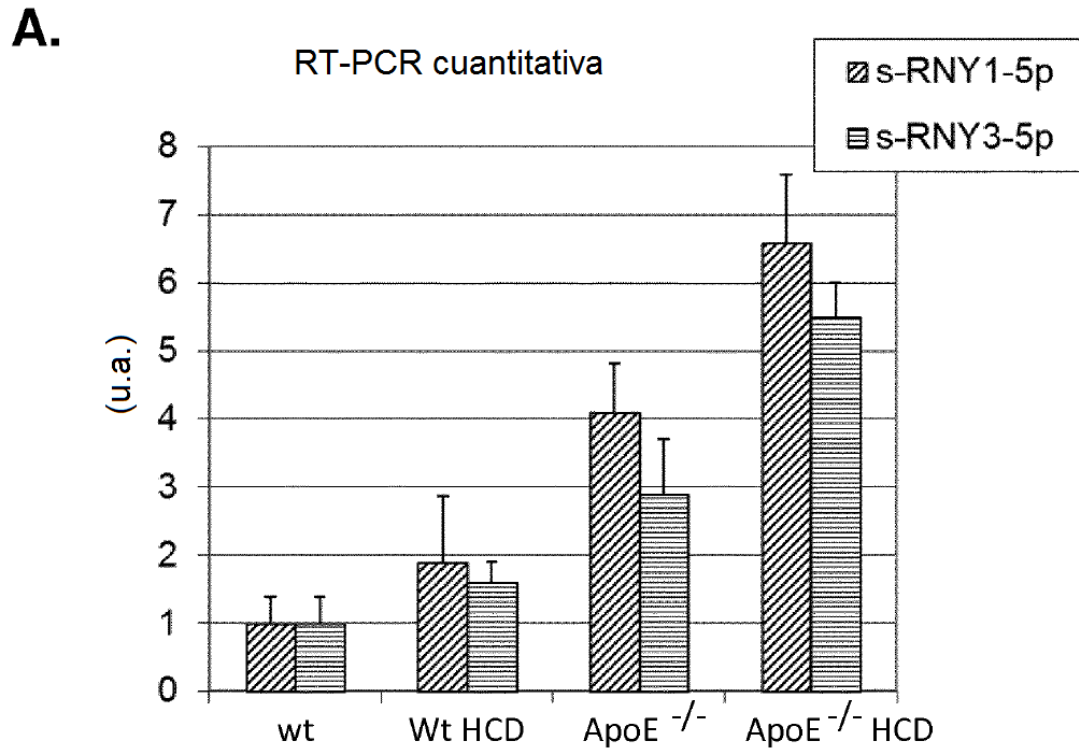
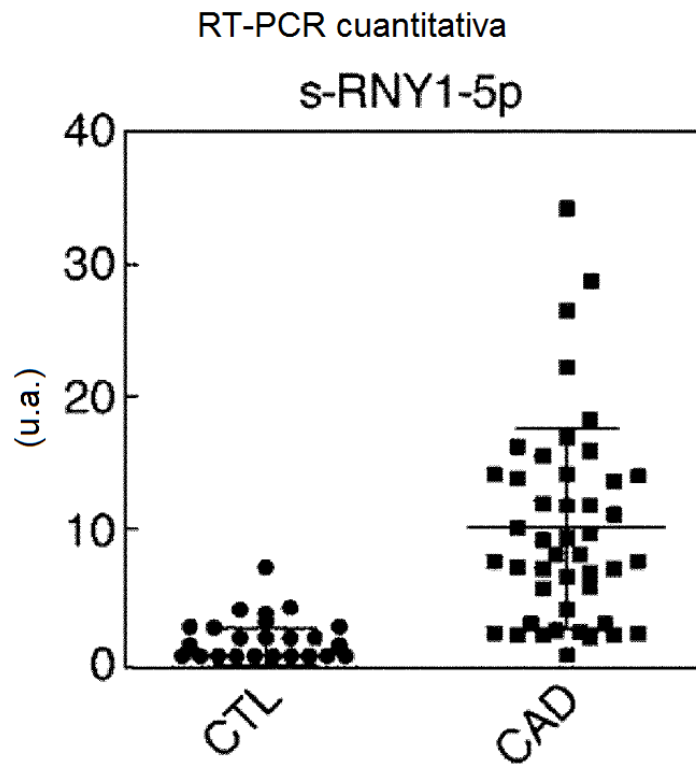


FIG.16

A.



B.

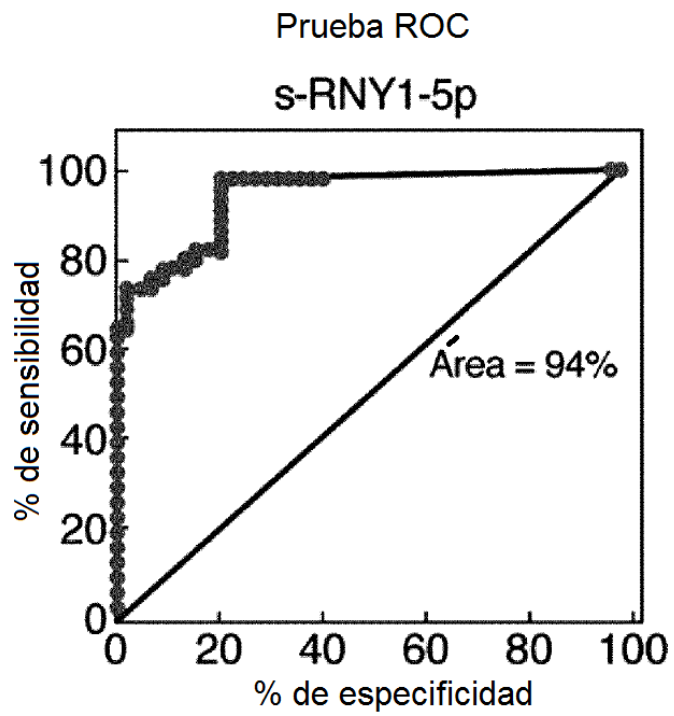


FIG.17

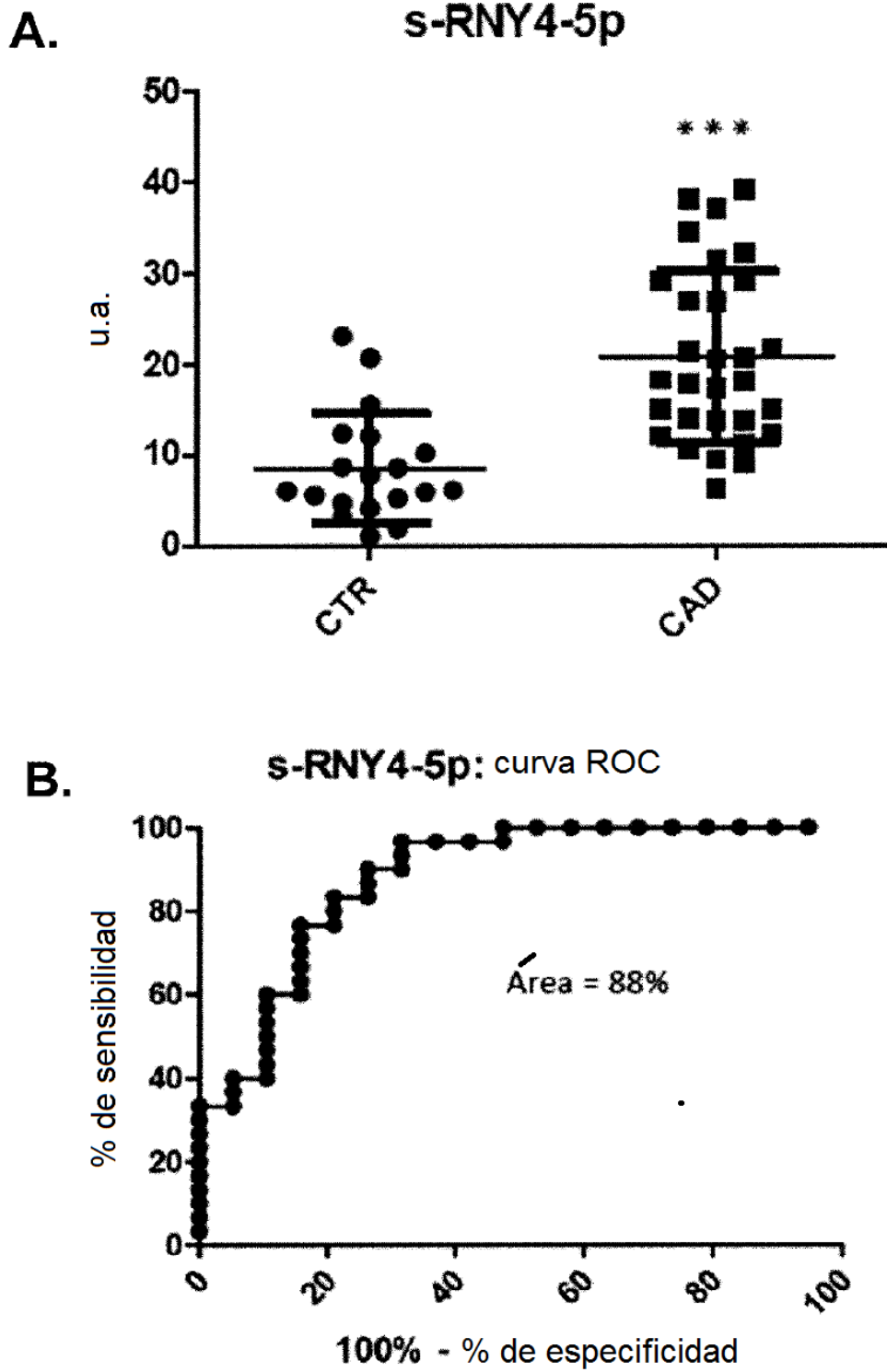


FIG.18

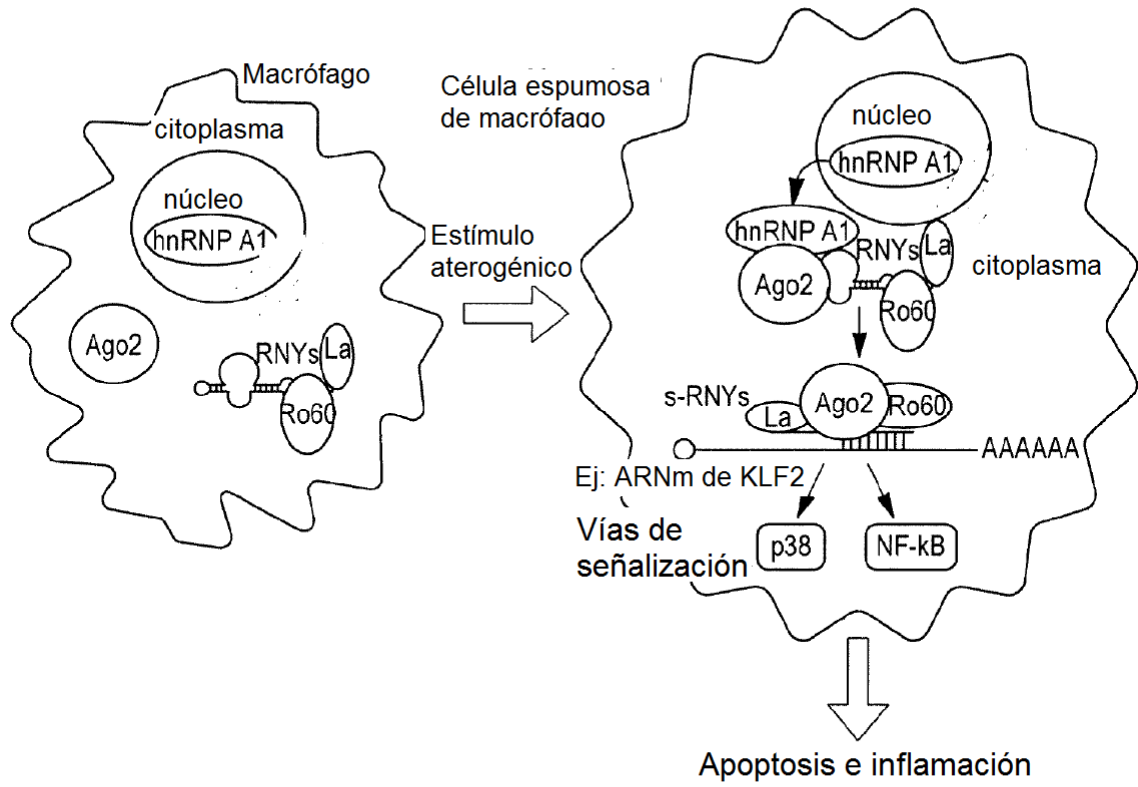


FIG. 19

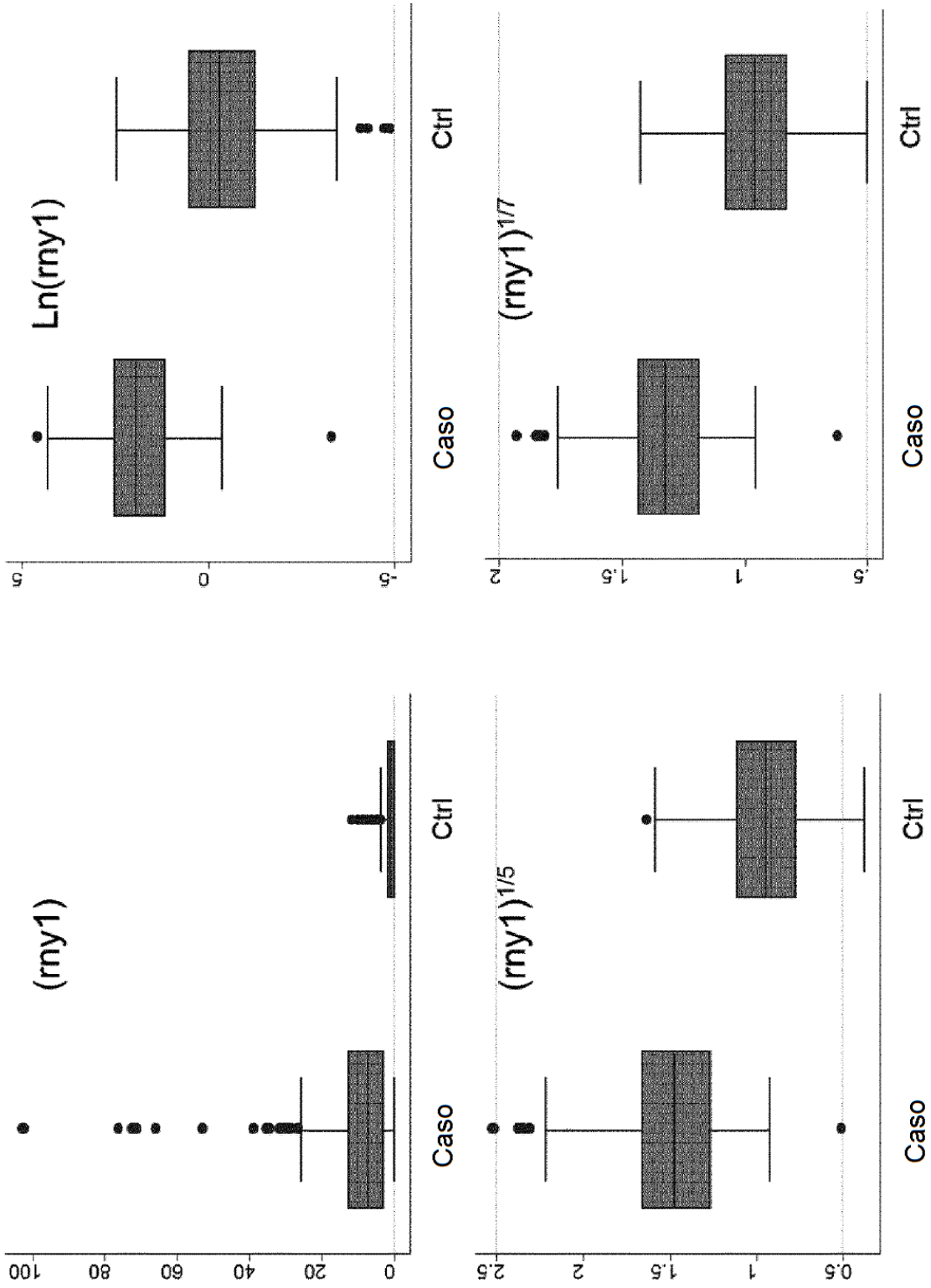


FIG.20

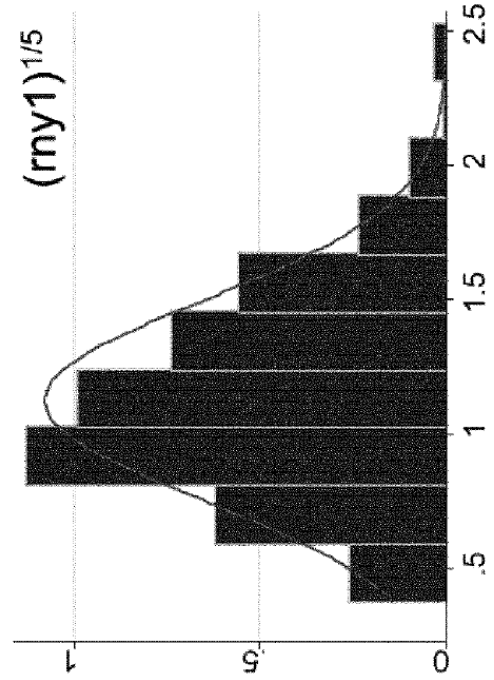
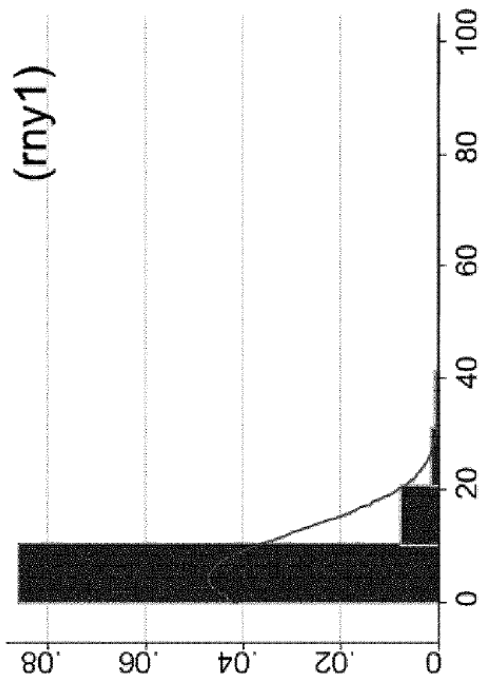
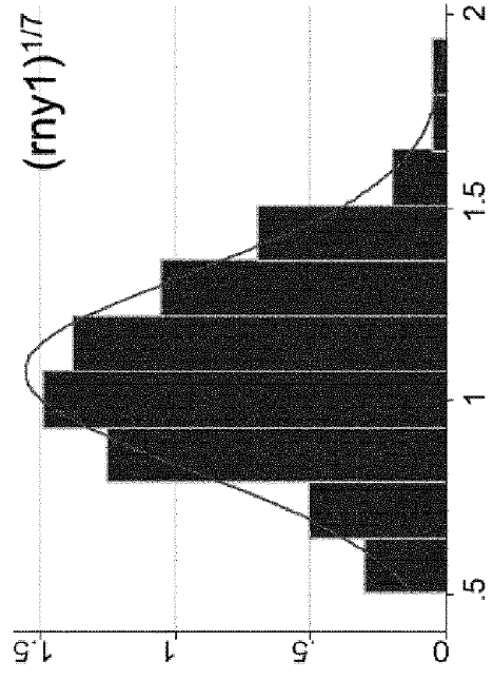
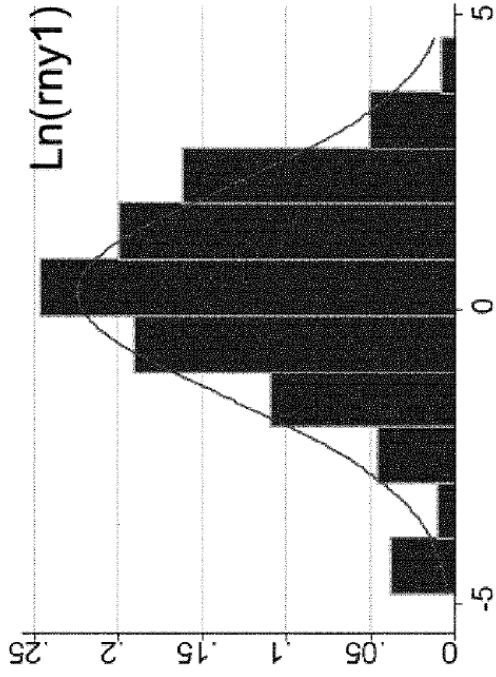


FIG.21

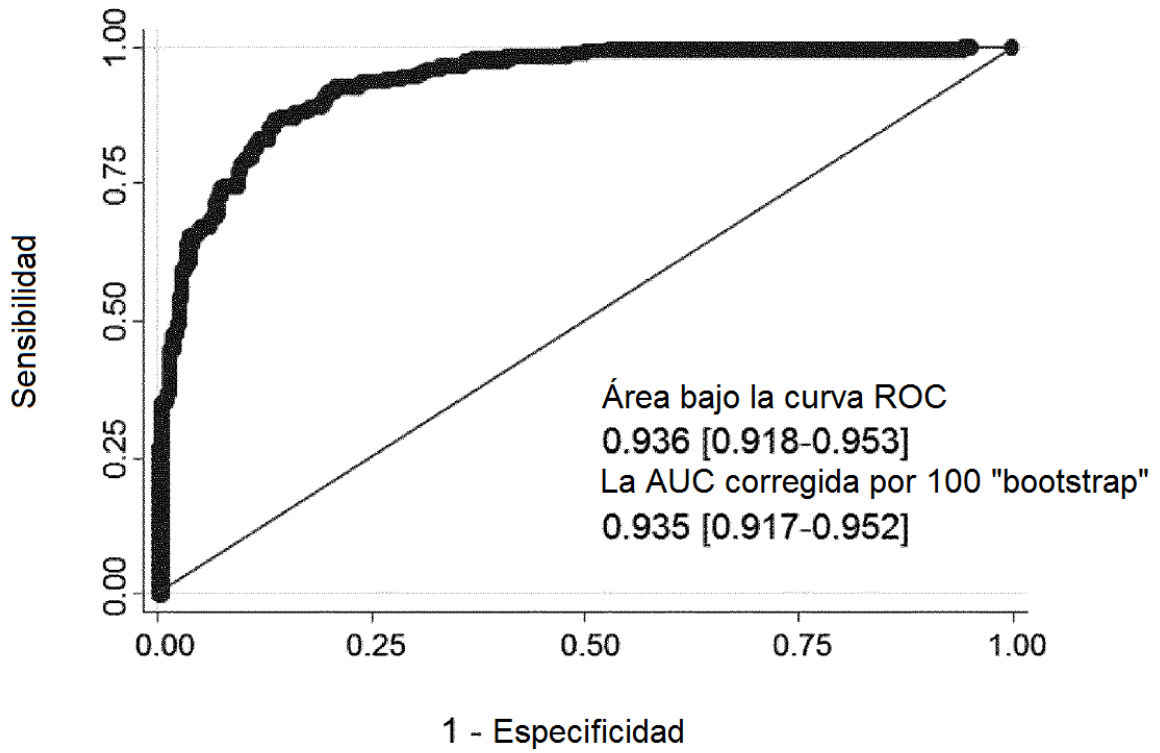


FIG.22

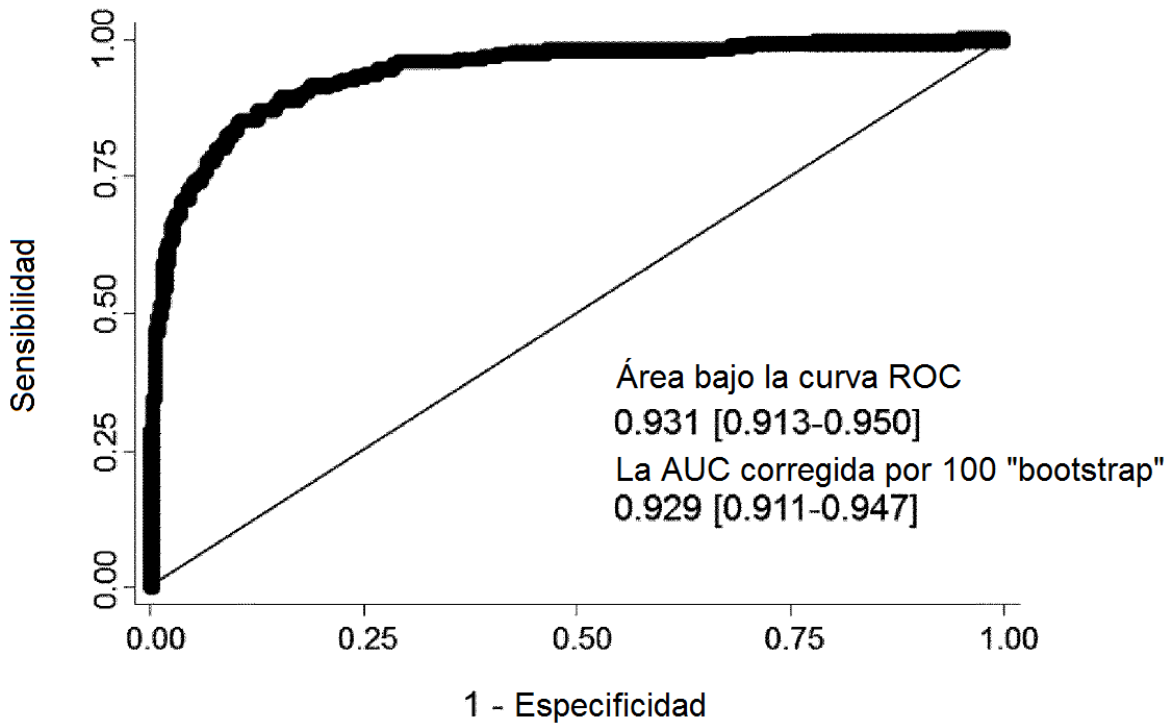


FIG.23

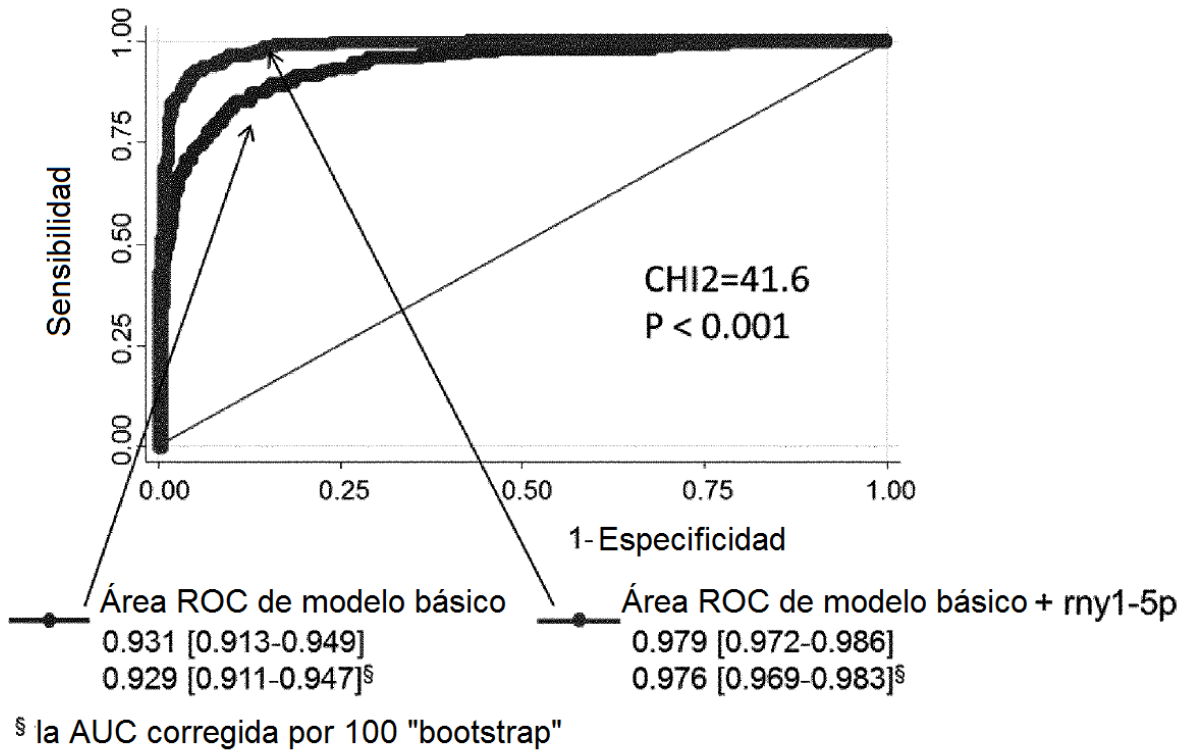


FIG.24

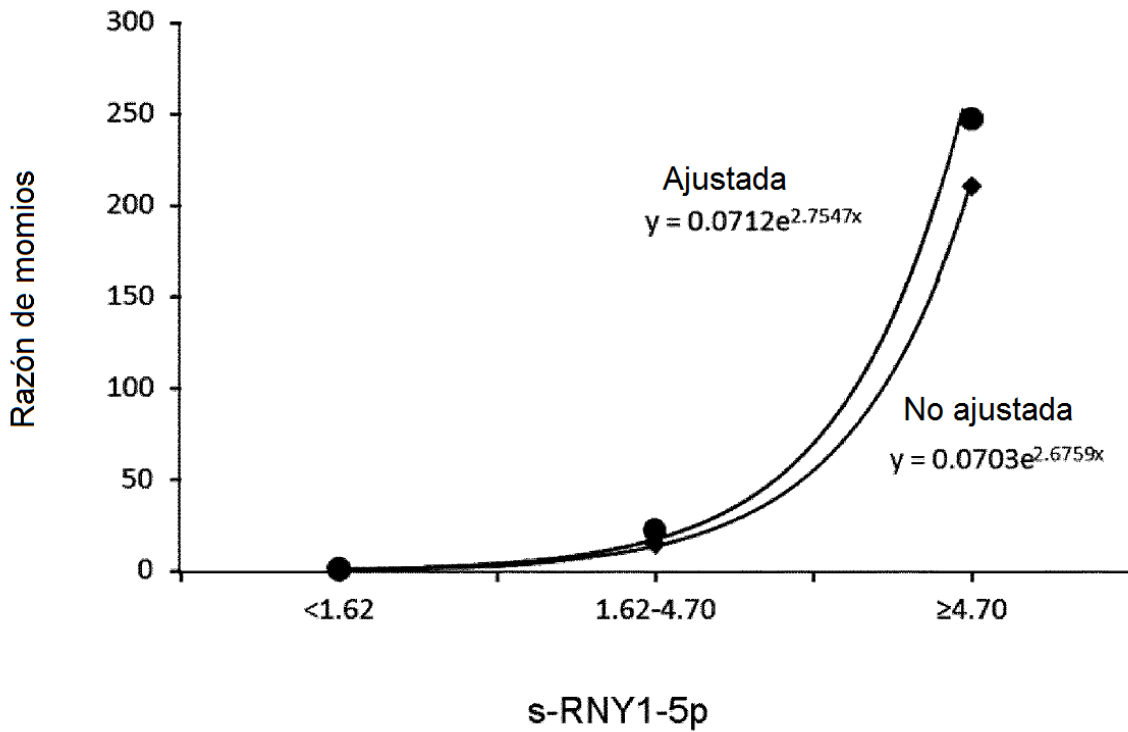


FIG.25