

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 309**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2013 PCT/EP2013/059753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2013 E 13721970 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2847332**

54 Título: **Productos de ARN y sus usos**

30 Prioridad:

10.05.2012 US 201261645285 P

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**IFOM FONDAZIONE ISTITUTO FIRCI DI
ONCOLOGIA MOLECOLARE (100.0%)
Via Adamello 16
20139 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**D'ADDA DI FAGAGNA, FABRIZIO;
FRANCIA, SOFIA;
MICHELINI, FLAVIA y
ROSSIELLO, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 754 309 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

Productos de ARN y sus usos.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a ARN pequeños (DDRNA, "DNA Damage Response RNAs", ARN de respuesta a daños en el ADN), a sus inhibidores, a inhibidores de las enzimas que los producen y a su uso para modular la respuesta de una célula frente a un acontecimiento de daños en el ADN. La invención se refiere además a un método para detectar la presencia o cuantificar los daños en el ADN.

Técnica anterior

10 La respuesta de daños en el ADN ("DNA damage response", DDR) es un conjunto coordinado de acontecimientos que aparece inmediatamente después de la generación de una lesión en la doble hélice del ADN. La detección de discontinuidades en el ADN mediante factores especializados inicia una cascada de señalización que, surgiendo del sitio de los daños en el ADN, amplifica la señal y alcanza al espacio nuclear completo y la célula entera¹. El inicio de la cascada de señalización de la DDR establece un bucle autoalimentador local que conduce a la acumulación focal de factores de la DDR corriente arriba en forma de focos de DDR citológicamente detectables en los sitios dañados.

15 De modo específico, la detección de una rotura en la doble hebra del ADN ("double-strand break", DSB) desencadena la actividad de la proteína quinasa ATM que, entre otros factores, fosforila la variante de histona H2AX (γ H2AX) en el sitio del daño al ADN. Esta modificación recluta mediadores de la DDR, tales como MDC1 y 53BP1, que refuerzan la actividad de ATM. La activación de la DDR puede desencadenarse mediante agentes que dañan el ADN exógenos, tales como radiaciones ionizantes y agentes quimioterapéuticos (que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a bleomicina) y mediante acontecimientos fisiológicos endógenos, tales como la recombinación meiótica, la recombinación de V(D)J en las inmunoglobulinas y loci de receptores de células T, acortamiento de los telómeros y especies de oxígeno reactivas, así como acontecimiento patológicos, tales como la activación de oncogenes, la integración vírica en el genoma, la replicación vírica y la infección bacteriana^{1,82}. La disfunción de los telómeros y la activación de oncogenes pueden generar un DDR sostenida que conduce a una detención permanente del ciclo celular, conocida como senescencia celular². En fechas recientes, también se ha demostrado que las bacterias generan daños persistentes en el ADN y senescencia celular en mamíferos⁸². Varias patologías asociadas con funciones alteradas de los telómeros se han indicado como "telomeropatías"⁸⁵.

30 En fechas recientes se ha apreciado que los genomas de mamíferos son transcritos de modo generalizado, y que la amplia mayoría de las secuencias del ADN pueden encontrarse en transcritos primarios, a menudo solapantes, la mayoría de los cuales no están asociados aparentemente a funciones codificadoras³. Estos ARN no codificadores (ARNnc) pueden permanecer asociados con la cromatina, y algunos se agregan en estructuras subnucleares, tales como motas y paramotas⁴. Se ha demostrado que un número insospechadamente alto de estos transcritos de ARNnc se han conservado evolutivamente entre especies relacionadas^{5,6} y desempeñan una diversidad de funciones celulares importantes regulando la localización y la actividad de proteínas y/o proporcionando soporte estructural a estructuras celulares y subcelulares⁷ y controlando funciones modificadoras de la cromatina^{4,8} y de tipo potenciador⁹. Estas actividades pueden ejercerse a pesar de los niveles muy bajos calculados de expresión, de pocas moléculas por célula, para algunas de estas moléculas de ARN^{10,11,12,13}. Algunos ARNnc pueden ser procesados por ribonucleasas de la vía de la interferencia por ARN (ARNi), produciendo productos de ARN bicatenario cortos que participan en diversas funciones celulares. La vía del ARNi es una maquinaria conservada,

40 cuyos componentes se cree que han evolucionado para conservar la integridad del genoma frente a los ataques de virus y elementos genéticos móviles¹⁴. Implica diferentes tipos de moléculas de ARN bicatenario corto, que incluyen los ARN de interferencia pequeños (ARNip), microARN, ARN de interferencia pequeños asociados a repeticiones (ARNipar), ARN de interacción con Piwi (ARNip)¹⁵ y ARN de interacción con QDE-2 (ARNiq) en *Neurospora crassa*¹⁶. Habitualmente se cree que solo la maduración de microARN depende de ambas endonucleasas DROSHA y DICER, dos enzimas ARNasa de tipo III que procesan estructuras de horquilla para generar microARN bicatenarios¹⁷. En mamíferos, los microARN modulan la expresión génica normalmente debido a su capacidad para regular la estabilidad y la traducción del ARNm, y se han implicado en varios procesos, tales como la determinación del destino celular, la transformación, la proliferación y la muerte celular¹⁸. Los ARNip y ARNi se han implicado en el mantenimiento de la estabilidad del genoma¹⁶, y se ha demostrado que una familia de microARN (miR-34) actúa corriente abajo de p53¹⁹. En la actualidad, se desconoce si algún ARN desempeña un papel directo en el control de la activación de la DDR en sitios de daños en el ADN.

55 El documento US2006105384 se centra en una técnica para detectar y diagnosticar trastornos de enfermedad, así como condiciones de salud debidas a la exposición a condiciones ambientales mediante la detección y la identificación de marcadores de daños en el ADN o ARN. Esta técnica se basa en la medición de los niveles libres de productos de escisión de nucleótidos que surgen de los daños en el ADN o ARN. Los DDRNA de la presente invención no son productos de escisión de nucleótidos.

El documento JP2009171895 se refiere a un método para analizar la función de un ARN no codificador (ARNnc) que existe en un núcleo mediante la destrucción del ARNnc introduciendo una oligomolécula antisentido que contiene sustancialmente la misma secuencia que una secuencia complementaria con una región monocatenaria en la

estructura secundaria del ARNnc diana en un núcleo celular, y destruyendo la molécula de ARN.

El documento WO2012/013821 se refiere al campo del cáncer, en particular cánceres en los que la función supresora de tumor de p53 se ha perdido o está alterada. En la presente se demuestra que Dicer es un compañero letal sintético de p53, lo cual permite la localización selectiva y destrucción de células del cáncer. Los efectos de Dicer sobre la supervivencia de células de cáncer son mediados a través de la agrupación miR17-92, y la inhibición de miembros de esta agrupación de miARN es una estrategia de tratamiento atractiva en el cáncer. Más en concreto, estos descubrimientos son importantes en el campo del retinoblastoma.

El documento WO2011/157294 se refiere a composiciones que comprenden un inhibidor de un polinucleótido, y dicho polinucleótido que va a ser inhibido es capaz de disminuir o suprimir la expresión de Dicer, o de uno de sus derivados biológicamente activos, para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, metástasis, insuficiencia cardíaca, remodelación cardíaca, cardiomiopatía dilatada, enfermedades autoinmunitarias, o enfermedades o trastornos relacionados con estos. Además, la presente invención también se refiere a métodos para tratar o prevenir el cáncer, metástasis, insuficiencia cardíaca, remodelación cardíaca, cardiomiopatía dilatada, enfermedades autoinmunitarias, o enfermedades o trastornos relacionados con estos. No se mencionan los DDRNA ni el impacto de la modulación de Dicer sobre acontecimientos relaciones con daños en el ADN y la modulación de la DDR.

El documento WO2009/102225 se refiere a composiciones y métodos para el diagnóstico, la investigación y la terapia del cáncer que incluyen, pero no se limitan a marcadores del cáncer. En particular, esta invención se refiere a ARNnc como marcadores de diagnóstico y dianas clínicas para el cáncer de próstata, pulmón, mama y pancreático.

El documento US2012289581 se refiere a ARN no codificadores largos (ARNncl) y se describen métodos para usarlos con objetivos de diagnóstico y terapéuticos para el tratamiento del cáncer, la terapia de células madre o la medicina regenerativa. En particular, la invención se refiere a ARNncl que desempeñan papeles en la regulación de genes implicados en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de células. Estos ARNncl pueden usarse como biomarcadores para controlar la proliferación y la diferenciación de células durante el avance del cáncer o la regeneración de tejidos. Uno de los ARNncl identificados, denominado as PANDA (un ARNnc asociado a P21, activado por daños en el ADN), inhibe la expresión de genes apoptóticos que normalmente son activados por el factor de transcripción NF- κ B. Los inhibidores de PANDA sensibilizan a las células cancerosas frente a la quimioterapia, y pueden usarse en combinación con agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer.

Limmer K. *et al.* (2013) usan un ensayo de fuerza molecular ("Molecular Force Assay", MFA) para medir la actividad de Dicer. Como sistema modelo, emplearon una secuencia de ARN que forma un sitio de unión a aptámeros para la paromomicina, un aminoglicósido de 615 daltons. Demostraron que la actividad de Dicer es modulada como una función de la concentración y del tiempo de incubación: la adición de paromomicina conduce a una disminución en la actividad de Dicer según la cantidad de ligando. Se descubrió que la constante de disociación medida de la paromomicina con su aptámero se ajustaba bien a los valores de la bibliografía. El formato en paralelo del MFA permite una búsqueda y análisis a gran escala de ligandos para cualquier secuencia de ARN.

Wei *et al.* (2012) indican la existencia, en plantas y en una línea de células de cáncer humanas, de ARN pequeños, denominados "diRNAs" ("double-strand break interacting RNAs", ARN de interacción con rotura en la doble hebra, ARNid) que se generan próximos a sitios de DSB del ADN⁸¹. Los autores demuestran que la inactivación genética de ARN endonucleasas similares a Dicer produce un defecto específico en la reparación del ARN mediante recombinación homóloga. Los autores observan alguna correlación entre la acumulación de ARNid y la reparación del DNA mediante recombinación homóloga, y proponen que los ARNid controlan la reparación del ADN. Sin embargo, los datos mostrados en el artículo de Wei *et al.* no apoyan esta hipótesis. De hecho, no existen pruebas de que el ARNid desempeñe un papel biológicamente activo en el proceso de reparación del ADN. Los datos de la técnica anterior en Wei *et al.* no son contrarios a que los ARNid sean generados después de la degradación de un transcrito de ARN que abarca el sitio de DSB.

Además, en el artículo de Wei *et al.* no se demuestra que el efecto propuesto de la inactivación de genes similares a Dicer y la reparación del ADN no es indirecto, quizá mediado por mecanismos de interferencia por ARN canónicos. Aunque los autores demuestran que la abundancia de pocos factores de reparación del ADN no se ve afectada, no se demuestra que otros factores de reparación del ADN, no ensayados por los autores, no se vean afectados y no sean la diana de los mecanismos de la interferencia por ARN y, por tanto, potencialmente tendrían un impacto indirecto sobre la reparación del ADN.

Por último, no siempre se mantiene la correlación y, al menos en plantas, los autores muestran casos en los que los ARNid han disminuido (figura 3a, mutantes RDR2 y RDR6) y la reparación del ADN no se altera (figura 3b).

Los DDRNA de la presente invención se han caracterizado para funciones diferenciadas: los DDRNA controlan la señalización de la DDR, mientras que no se demuestra que los ARNid de Wei *et al.* desempeñen un papel en la señalización de la DDR, ya que Wei *et al.* no presenta pruebas de una activación alterada de la DDR, según se detecta mediante la formación de focos de DDR nucleares o de la activación de proteínas de DDR, por ejemplo, mediante fosforilación, o de funciones alteradas de punto de control de daños en el ADN o modulación de la

senescencia celular. Así, no se demuestra un solapamiento entre sus funciones.

Bu *et al.* (Oncology Reports, 21:13-17, 2009) describen el uso de ARNip para la inactivación de Dicer y el aumento de la sensibilidad de células de cáncer de mama a un agente que daña el ADN. Darzynkiewicz *et al.* (Eur. J. of Pharmacol., 625:143-150, 2009) describen estrategias para sensibilizar células de cáncer frente a los daños en el ADN mediante transporte dirigido. Francia *et al.* (Nature, 488:231-235, 2012) indican productos de ARN de DICER y DROSHA específicos de sitio que controlan la respuesta de daños en el ADN.

En células de *Drosophila* cultivadas, Michalik *et al.*⁷⁹ demostraron que la transfección de un plásmido linealizado conduce a la generación de ARN cortos (21 nt) con la secuencia de los extremos del ADN del plásmido. Los ARN pequeños en este sistema son producidos por medio de la transcripción activa de genes del plásmido en la vecindad de la rotura. La función que ellos propusieron fue la represión del gen marcador codificado por el plásmido. La inactivación de algunos de los factores implicados en la vía de la interferencia por ARN alivia la represión observada. Este efecto se ha interpretado como una actividad de interferencia por ARN de los ARN cortos que actúan como endo-ARNip. Este estudio no ofrece una relación causal entre la producción de ARN cortos y la activación de la DDR o la reparación del ADN. Este conjunto de observaciones apoya la idea de que se producen ARN pequeños en los extremos del ADN en células cultivadas de *Drosophila*, pero no proporciona una función para esta nueva molécula de ARN en la vía de respuesta a daños en el ADN.

Sumario de la invención

DICER (Gen ID: 23405; Símbolo oficial: DICER1; Nombre: dicer 1, ribonucleasa de tipo III [*Homo sapiens*]; Otros nombres: DCR1, Dicer, HERN, KIAA0928, MNG1; Otras denominaciones: Dicer1, homólogo de Dcr-1; similar a K12H4.8; dicer 1, endonucleasa específica de RNA25 bicatenaria; endorribonucleasa Dicer; helicasa MOI; helicasa con motivo de ARNasa; helicasa-moi; Cromosoma: 14; Localización: 14q32.13, Anotación: cromosoma 14, NC_000014.8 (95552565..95623759, complemento), MIM: 606241, versión del NCBI del 4 de mayo de 2012), y DROSHA (Gen ID: 29102; Símbolo oficial: DROSHA; Nombre: drosha, ribonucleasa de tipo III [*Homo sapiens*]; Otros nombres: ETOH2, HSA242976, RANSE3L, 30 RN3, RNASE3L, RNASEN; Otras denominaciones: ARNasa III; drosha, endorribonucleasa específica de RNA bicatenaria; ARNasa III nuclear Drosha; p241; proteína Drosha; proteína putativa p241 que interacciona con el factor de transcripción Sp1; ribonucleasa III putativa; ribonucleasa 3; ribonucleasa III, nuclear; ribonucleasa de tipo III, nuclear; Cromosoma: 5; Localización: 5p13.3, Anotación: cromosoma 5, NC_000005.9 (31400601..31532282, complemento), MIM: 608828, versión del NCBI del 4 de mayo de 2012) son ribonucleasas fundamentales implicadas en la interferencia por ARN (ARNi). Se cree que los componentes del ARNi han evolucionado para conservar la estabilidad del genoma frente a los ataques de virus y elementos genéticos móviles. Los productos de ARN generados por DICER y DROSHA están implicados en la congregación de la cromatina en *Schizosaccharomyces pombe*, el silenciamiento de genes y el cáncer. La respuesta de daños en el ADN ("DNA damage response", DDR) es una vía de señalización que detiene la proliferación de células sometidas a acontecimientos genotóxicos para conservar la estabilidad del genoma. Hasta la fecha, no se ha demostrado que las vías de señalización de DDR y ARNi interaccionen directamente. En la presente, los autores demuestran que células senescentes inducidas por oncogenes, es decir, células que portan daños en el ADN inducidos por oncogenes y la consiguiente activación de la DDR, requieren de DICER y DROSHA para mantener la activación de la DDR y la detención del ciclo celular. DICER y DROSHA también son necesarias para activar la DDR tras un daño exógeno al ADN, y las funciones de punto de control de DDR dependen de la actividad ribonucleasa de DICER. DICER es necesaria para la activación de DDR inducida por irradiación *in vivo* en el pez cebra. En un sistema celular *in vitro*, la estabilidad de los focos de DDR es sensible a un tratamiento con ARNasa A, y son necesarios los productos de ARN pequeño dependientes de DICER y DROSHA para restablecer los focos de DDR en células tratadas con ARNasa A. El estudio de la activación de DDR en una rotura bicatenaria del ADN dentro de un locus integrado exógeno exclusivo y detectable revela que la formación de un foco de DDR requiere de moléculas de ARN específicas de locus. Los autores proporcionan pruebas, a través de la secuenciación del ARN, de que se originan ARN cortos o pequeños, que los autores denominan DDRNA, en el locus y estos portan la secuencia del locus dañado. Cuando se sintetizan de modo químico o se generan *in vitro* mediante ruptura con DICER de los transcritos que abarcan el locus, los DDRNA estimulan la activación de la DDR en el sitio de los daños al ADN en células tratadas con ARNasa A, también en ausencia de otros ARN de mamífero. Conjuntamente, los resultados de los autores revelan un papel directo no previsto de ARN cortos o pequeños (DDRNA) en el control de la activación de la DDR en sitios de daños en el ADN.

Los DDRNA actúan de modo diferente a los microARN y los mecanismos de ARNi canónicos porque:

- Los DDRNA actúan sin la necesidad de ningún otro ARN celular (véanse los resultados obtenidos con ARN extraído de gel y ARN sintéticos en los experimentos con células tratadas con ARNasa A).
- Los DDRNA pueden tener una secuencia (repeticiones LAC o TET) que no presenta correspondencia con transcritos celulares endógenos y aún siguen siendo biológicamente activos.
- Los DDRNA pueden actuar con rapidez (en minutos) a temperatura ambiente en células inhibidas para la transcripción y la traducción (véanse los resultados obtenidos en los experimentos con células tratadas con ARNasa A).

- La inactivación de las proteínas de GW (efectores de miARN canónicos) no afecta a los focos de DDR.

Por tanto, un objeto de la presente invención es un método *in vitro* para inhibir la respuesta de daños en el ADN en una célula de mamífero dañada en al menos un locus genómico de secuencia específica, en el que los daños en el ADN se producen en los telómeros y/o son provocados por una ADN endonucleasa específica de secuencia, en el que el método comprende inhibir la función y/o alterar la producción de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción, en el que la inhibición de la función de los DDRNA y/o la alteración en su producción se realiza por medio de un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia que se une específicamente a dichos ARN pequeños (DDRNA).

Preferiblemente, el método comprende además la etapa de exponer dicha célula a un tratamiento de daños en el ADN. Preferiblemente, el tratamiento de daños en el ADN pertenece al grupo de: radioterapia, quimioterapia, por ejemplo, tratamiento con hidroxiurea o tratamiento con bleomicina, un tratamiento que altera la reparación del ADN o cualquier tratamiento genotóxico. También preferiblemente, la radioterapia es cualquier radiación ionizante.

Otro objeto de la invención es un método *in vitro* para sensibilizar una célula de mamífero frente a los daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica, en el que los daños en el ADN se producen en los telómeros y/o son provocados por una ADN endonucleasa específica de secuencia, en el que el método comprende:

a) inhibir la función y/o alterar la producción de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción, en el que la inhibición de la función de los DDRNA y/o la alteración en su producción se realiza por medio de un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia que se une específicamente a dichos ARN pequeños (DDRNA);

b) exponer dicha célula a una cantidad eficaz del tratamiento de daños en el ADN,

en el que la etapa a) y la etapa b) se realizan en cualquier orden.

Preferiblemente, el tratamiento de daños en el ADN es una radioterapia

En una realización preferida, la célula de mamífero es dañada por un acontecimiento genotóxico, preferiblemente el acontecimiento genotóxico pertenece al grupo de: transformación de células, senescencia celular, activación de oncogenes, estrés de replicación del ADN, especies de oxígeno reactivas, radiación ionizante, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo bleomicina, o acortamiento de los telómeros, telómeros dañados, telómeros disfuncionales, integración vírica en el genoma, infección vírica, o infección bacteriana.

Preferiblemente, el oligonucleótido inhibidor específico de secuencia es una molécula de LNA, un oligonucleótido modificado con 2'-O-metilo o un oligonucleótido modificado con fosforotioato.

También preferiblemente, la célula de mamífero es una célula humana, preferiblemente la célula es una célula precancerosa, una célula de cáncer, una célula senescente o una célula infectada por un virus, preferiblemente la célula senescente presenta telómeros críticamente cortos y/o dañados y/o disfuncionales.

Otro objeto de la invención es un inhibidor de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado tras dañar el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica en una célula, en el que dichos daños del ADN se producen en los telómeros y/o están provocados por una ADN endonucleasa específica de secuencia, en el que dicho transcrito de ARN se sintetiza usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción, en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia que se une específicamente a dichos ARN pequeños (DDRNA), para su uso como un medicamento.

Preferiblemente, el inhibidor es para su uso en el tratamiento de un trastorno inducido por el locus genómico dañado de secuencia específica, preferiblemente el trastorno es cáncer y/o envejecimiento y/o una infección vírica, preferiblemente el envejecimiento está asociado con telómeros críticamente cortos y/o dañados y/o disfuncionales.

Preferiblemente, el inhibidor que se va a usar es una molécula de LNA, un oligonucleótido modificado con 2'-O-metilo o un oligonucleótido modificado con fosforotioato.

También preferiblemente, el oligonucleótido inhibe la respuesta de daños en el ADN en la célula en el locus genómico de secuencia específica dañado.

Más preferiblemente, el inhibidor sensibiliza la célula frente al efecto de un tratamiento para dañar el ADN, y dicho uso comprende además la etapa de exponer dicha célula a una cantidad eficaz del tratamiento para dañar el ADN.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el inhibidor para su uso según se definió anteriormente.

Otro objeto de la invención es un método para detectar la presencia de daños en el ADN en un locus genómico de secuencia específica en una célula, que comprende las etapas de:

- 5 a) detectar la presencia de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en dicha célula;
- b) comparar el resultado con una célula control con un locus genómico de ADN sin dañar.

Otro objeto de la invención es un método para identificar la localización genómica de daños en el ADN en un locus genómico de secuencia específica en una célula, que comprende las etapas de:

- 10 a) aislar y/o purificar ARN pequeños (DDRNA) a partir de una muestra, y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en dicha célula;
- b) secuenciar dichos ARN pequeños (DDRNA) aislados y/o purificados.

15 Otro objeto de la invención es un método para cuantificar los daños en el ADN en un locus genómico específico en una célula, o un método *in vitro* para el diagnóstico y/o la prognosis de un trastorno asociado con y/o inducido por la generación de daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica, o un método *in vitro* para controlar la eficacia de una terapia dirigida a un trastorno asociado con y/o inducido por la generación de daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica en un sujeto, que comprende las etapas de:

- 20 a) medir la cantidad de una secuencia que comprende ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en dicha célula;
- b) comparar el resultado con un control apropiado.

Preferiblemente, el trastorno asociado con y/o inducido por la generación de daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica se selecciona del grupo que consiste en: cáncer, envejecimiento, infección vírica, y preferiblemente el envejecimiento se asocia con telómeros críticamente cortos y/o dañados y/o disfuncionales.

25 Otro objeto de la invención es un método para seleccionar un agente capaz de inhibir ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en una célula, que comprende la etapa de medir la cantidad de una secuencia que comprende dichos ARN pequeños tras la exposición de la célula a dicho agente, y comparar con un control apropiado.

30 En una realización preferida de todo lo anterior, la célula es una célula de mamífero, preferiblemente, una célula humana.

35 La composición farmacéutica comprende vehículos, diluyentes y/o excipientes. La composición puede administrarse por vía parenteral, oral, intravenosa, intranasal, intramuscular o cualquier vía adecuada. La composición farmacéutica puede administrarse en cualquier cantidad eficaz para suscitar el efecto terapéutico deseado. La composición puede tomar cualquier forma: disolución, comprimido, ungüento, etc.

40 En la presente invención, los DDRNA son ARN pequeños, con el potencial de formar parejas bicatenarias, que son generados mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN de secuencia específica sintetizado tras la transcripción de un locus de ADN dañado. Los DDRNA son ARN pequeños con una longitud de entre 10 y 50 nucleótidos, por ejemplo, con una longitud de entre 17 y 32 nucleótidos, por ejemplo, con una longitud de entre 20 y 25 nucleótidos, por ejemplo, con una longitud de entre 22 y 23 nucleótidos.

Dichos DDRNA actúan favoreciendo la acumulación específica de secuencia de factores de DDR en sitios específicos de daños en el ADN y estimulan la señalización de la DDR (que comprende, concretamente, pero no se limita a acontecimientos de fosforilación de proteínas).

45 Un telómero críticamente corto es un telómero capaz de acoplarse con la maquinaria de la DDR debido a su tamaño corto crítico. Un telómero dañado es un telómero que porta una lesión en el ADN capaz de acoplarse con la maquinaria de la DDR. Un telómero disfuncional que es un telómero que, debido a su estructura alterada de proteína y/o ácido nucleico, se acopla con la maquinaria de la DDR.

50 En la presente invención, un estrés oncogénico puede ser un estrés genotóxico (que comprende, concretamente, pero no se limita a lesiones en el ADN, avance de horquillas de replicación del ADN alterado) debido a la activación, amplificación, ganancia de mutaciones de función, aumento en los niveles y actividad de oncogenes. Una célula que porta daños en el ADN es una célula cuyos daños en el ADN no han sido inducidos de modo exógeno (concretamente una célula que comprende, pero no se limita a un telómero críticamente corto y un telómero dañado, estrés oncogénico, daños oxidativos en el ADN).

El envejecimiento está asociado con daños en el ADN telomérico y activación de la DDR^{2,84}.

Los tratamientos genotóxicos que se emplean habitualmente en la terapia del cáncer son tratamientos asociados con la generación de daños en el ADN (que comprenden, concretamente, pero no se limitan a radioterapia y quimioterapia).

5 Una radioterapia es una terapia basada en la exposición a radiación ionizante.

Una dosis eficaz de radiación ionizante es una dosis de radiación ionizante capaz de generar el resultado deseado. Los expertos en la técnica que emplean las técnicas de modo rutinario saben cómo determinar dicha dosis.

Una célula senescente es una célula que conserva una activación de DDR persistente (habitualmente tras un estrés oncogénico y/o acortamiento de telómeros/daños en el ADN).

10 La presencia de daños en el ADN se detecta por medio de la presencia de dichos ARN cortos (DDRNA); en ausencia de dichos DDRNA, se concluye que las células no presentan daños en el ADN.

En los ensayos cualitativos, una célula control puede ser una célula no dañada o una célula sana. El análisis puede realizarse mediante una PCR-transcriptasa inversa cuantitativa, hibridación de transferencia Northern, secuenciación de siguiente generación (Illumina, etc.), tecnología de torrente de iones o cualquier otro medio disponible, apropiado y conocido por los expertos en la técnica. Puede realizarse en una célula o en la sangre u otros fluidos biológicos. También puede realizarse en lisados de tejidos.

15

La cantidad de dichos ARN cortos (DDRNA) es proporcional a los daños en el ADN, y una cantidad mayor de dichos ARN indica una mayor cantidad de daños en el ADN.

20 En los ensayos cuantitativos, el control puede ser una célula no dañada o una célula sana. El análisis puede realizarse mediante qRT-PCR, hibridación de transferencia Northern, secuenciación de siguiente generación (Illumina, etc.), tecnología de torrente de iones o cualquier otro medio disponible, apropiado y conocido por los expertos en la técnica. Puede realizarse en una célula o en la sangre u otros fluidos biológicos. También puede realizarse en lisados de tejidos.

En la presente invención, "inhibir DICER y/o DROSHA" significa:

25 1. inhibir la actividad enzimática (nucleasa y/o helicasa) de DICER y/o DROSHA por medio de un compuesto de molécula pequeña y/o;

2. inhibir la síntesis de DICER y/o DROSHA por medio de la interferencia por ARN y/o;

3. desestabilizar las proteínas DICER y/o DROSHA dirigiendo diversos medios de cofactores de proteínas que se unen y son necesarios para las actividades de DICER y/o DROSHA y/o;

30 4. inhibir la actividad de DICER y/o DROSHA por medio de la expresión de alelos de DICER y/o DROSHA con funciones dominantes negativas y/o;

5. inhibir DICER y/o DROSHA dirigiéndose a los loci genómicos responsables de su síntesis.

35 Un inhibidor de DICER y/o DROSHA es capaz de presentar al menos una de las anteriores actividades. En la presente invención, "ARN pequeños inhibidores, y dichos ARN pequeños son generados mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado tras la transcripción del locus de ADN dañado" significa:

evitar las funciones de los DDRNA y/o alterar la producción de DDRNA por medio del uso de un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia capaz de unirse con avidéz y específicamente a los DDRNA. Estos oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a ácidos nucleicos bloqueados ("locked nucleic acids", LNA), oligonucleótidos modificados con fosforotioato, oligonucleótidos modificados con 2'-O-metoxietilo, oligonucleótidos modificados con 2'-O-metilo, metilfosfonatos, oligonucleótidos de morfolino, oligonucleótidos gámpmeros de LNA-ADN-LNA, gámpmero de ARN-ADN DE 2'-O-metilo quimérico, fosforoamidato N3'-P5', ácido 2'-fluoro-arabinonucleico, fosforoamidato morfolino, ácido ciclohexen-nucleico, triciclo-ADN, ácido nucleico de péptido, ácido nucleico desbloqueado, ácido hexitolnucleico, oligonucleótidos de boranofosfato, oligonucleótidos de fosforamidato y/u oligonucleótidos expresados por genes codificados por plásmidos trasladados por diferentes medios (que comprenden, pero no se limitan a transfección de plásmidos, infección vírica).

40

45

Un inhibidor de DICER y/o DROSHA es un agente o una molécula capaz de mostrar al menos una función inhibidora de DICER y/o DROSHA, según se describió anteriormente (inhibiendo la actividad enzimática de DICER y/o DROSHA, inhibiendo la síntesis de DICER y/o DROSHA, desestabilizando las proteínas de DICER y/o DROSHA, inhibiendo la actividad de DICER y/o DROSHA por medio de la expresión de alelos de DICER y/o DROSHA con funciones dominantes negativas y/o dirigiéndose a los loci genómicos responsables de la síntesis de DICER y/o DROSHA).

50

Un inhibidor de DDRNA es un agente o una molécula capaz de mostrar al menos una función inhibidora de DICER y/o DROSHA, según se describió anteriormente (evitando su síntesis, evitando su localización adecuada en la célula para evitar su procesamiento y/o funciones, evitando su acumulación, evitando sus funciones, evitando que actúen como debieran y/o evitando cualquier modificación de los DDRNA). La invención a continuación se describirá por medio de ejemplos no limitantes que remiten a las siguientes figuras.

Figura 1: La inactivación de DICER o DROSHA altera la estabilidad y la formación de los focos de DDR en OIS y en células irradiadas. a. La inactivación de DICER y DROSHA por agrupamientos de ARNip en células OIS altera el mantenimiento de focos de DDR, según se detecta mediante inmunotinción de 53BP1, pATM, pS/TQ, γ H2AX. b. Los histogramas muestran la cuantificación del porcentaje de células positivas a 53BP1, pATM, pS/TQ y γ H2AX o H3K9me3, un marcador de la formación de SAHF. c. La inactivación de DICER y DROSHA por agrupamientos de ARNip en fibroblastos humanos WI38 altera la congregación de focos de pATM, pS/TQ, MDC1, pero no de γ H2AX. Las células se irradiaron (10 Gy) y se fijaron 7 h después. d. Los histogramas muestran el porcentaje de células WI38 positivas para focos de pATM, pS/TQ, MDC1 y γ H2AX. e. La formación de focos de pATM, pS/TQ y MDC1, pero no de γ H2AX, se altera en células *DICER^{exón5}*-hipomórficas. Las células se irradiaron (2 Gy) y se fijaron 2 h después. f. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de DDR. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,001$).

Figura 2: Las células con DICER inactivada presentan una alteración en el punto de control de G1/S y G2/M. a. La inactivación de DICER, DROSHA o 53BP1 por agrupamientos de ARNip en WI38 altera el punto de control de G1/S inducido por irradiación. Se emplea siGFP como control. Las células se irradiaron (10 Gy) y se marcaron con BrdU durante 7 horas antes de la fijación. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a BrdU en células no irradiadas (-) e irradiadas (+). b. Las células *DICER^{exón5}*-hipomórficas presentan una alteración en el punto de control de G1/S. Las células se irradiaron (2 Gy) y se marcaron con BrdU durante 2 horas antes de la fijación. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a BrdU en células no irradiadas (-) e irradiadas (+). La expresión de ADNc de DICER-marcador de tipo salvaje restablece el punto de control de G1/S, mientras que los ADNc de los mutantes de endonucleasa DICER DICER44ab-marcador y DICER110ab-marcador no lo hacen. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n = 3$). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,01$). c. Las células con DICER inactivada presentan una alteración en el punto de control de G2/M. Perfiles de FACS de células HEK293 transfectadas con ARNhc (ARN de horquilla corta) contra DICER y p53 a las 12, 24 y 36 horas después de la irradiación (5 Gy). Se emplea shGFP como control. d. La tabla muestra el porcentaje de células en la fase G1, S y G2 del ciclo celular en diferentes momentos después de IR.

Figura 3: La irradiación induce la acumulación nuclear de pATM y γ H2AX en el control, pero no en embriones de pez cebra inyectados con Dicer1-morfolino. a. Las imágenes ilustran la localización de las secciones desde la cabeza de larvas de pez cebra de 3 días posteriores a la fertilización (dpf) WT (no inyectadas) e inyectadas con Dicer1-morfolino teñidas para pATM y γ H2AX antes y después de la irradiación (12 Gy). Las secciones se tiñeron con DAPI (azul) y anticuerpo γ H2AX o pATM (verde). b. Análisis de inmunotransferencia de la acumulación de pATM y γ H2AX en extractos procedentes de embriones de tipo salvaje no irradiados e irradiados o de embriones inyectados con Dicer1-morfolino. Se usó histona H3 y ATM total como control de carga. c. Dibujo esquemática del procedimiento de trasplante. Las células trasplantadas Dicer1-morfolino positivas a GFP, integradas en diversas localizaciones en el hospedante, muestran señales de γ H2AX reducidas después de IR. d. Dibujo esquemática del procedimiento de trasplante inverso: células control procedentes de embriones inyectados con ARNm que codifica GFP se trasplantaron en embriones inyectados con Dicer1-morfolino. Las células que expresan Dicer1 muestran señales de γ H2AX, mientras que las células circundantes inyectadas con Dicer1-morfolino no las muestran.

Figura 4: Los focos de DDR inducidos por irradiación son sensibles a un tratamiento con ARNasa A y son restablecidas por productos de ARN cortos y DICER. a. Células HeLa irradiadas (2 Gy) se trataron con PBS (-) o ARNasa A (+) y se sondaron para focos de 53BP1, pATM, pS/TQ, MDC1 y γ H2AX. Los focos de 53BP1, pATM, pS/TQ y MDC1, pero no de γ H2AX, se redujeron mucho tras el tratamiento con ARNasa. b. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de DDR. c. La adición de ARN purificado de gel con un intervalo de tamaño de 20-35 nt permite la reformación de focos de DDR en células tratadas con ARNasa A. Los ARN se separaron según su tamaño mediante una electroforesis en gel de acrilamida y se extrajeron del gel. Se emplearon 100, 50 o 20 ng del ARN total extraído del gel y 50 ng de ARN extraído de cada fracción del gel (>100 nt, 35-100 nt y 20-35 nt) para la reconstitución del ARN después del tratamiento con ARNasa en células HeLa. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n = 2$). Las diferencias son estadísticamente significativas (*valor de $p < 0,01$). d. Focos de 53BP1, pS/TQ y pATM inducidos por irradiación son restablecidos en células tratadas con ARNasa A cuando se incuban con ARN de células RKO de tipo salvaje (WT RNA), pero no con ARN de células RKO *DICER^{exón5}*-hipomórficas (*DICER^{exón5}* ARN). Se empleó ARNt como control. Los focos de γ H2AX no se vieron afectados. e. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de DDR. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 4$). Las diferencias son estadísticamente significativas (*valor de $p < 0,001$).

Figura 5: La formación de focos de DDR específicos de sitio es sensible a la ARNasa A y puede restablecerse con ARN específico de locus de una manera dependiente del complejo de MRE11-RAD50-NBS1. a. Células de ratón NIH2/4 que presentan DSB inducida por I-Sce I junto a una matriz de Lac-operador (matriz de LacO) muestran un

foco de 53BP1 (verde) y γ H2AX (magenta) que se colocan con el foco de Cherry-Lac (rojo). El foco de 53BP1, pero no de γ H2AX, es sensible a la ARNasa A y es restablecido mediante una incubación con ARN total. b. Los histogramas muestran el porcentaje de células en las que se colocan los focos de 53BP1 y Cherry-Lac. La adición de 50, 200, 800 ng de ARN purificado a partir de NIH2/4 rescata la formación de focos de 53BP1 de una manera dependiente de la dosis. c. La incubación de células tratadas con ARNasa A con ARN purificado a partir de NIH2/4 que expresan I-Sce I restablece el foco de 53BP1 en el sitio de corte inducido por I-Sce I, mientras que el ARN procedente de células progenitoras NIH3T3 que expresan I-Sce I no lo hace. d, e. Se usó ARN procedente de células NIH2/4, o de un progenitor, en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A para ensayar la reformación de focos de 53BP1 o pATM en presencia del inhibidor de MRN mirina. Las células se pretrataron con 100 μ M de mirina durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de ARN, y la mirina se mantuvo a la misma concentración durante la incubación con ARN. La reformación de focos de 53BP1 y pATM fue inhibida por la presencia de mirina. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de DDR. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (*valor de $p < 0,05$).

15 Figura 6: Los ARN específicos de locus sintetizados de modo químico y los productos de ARN de DICER generados *in vitro* estimulan la formación de focos de DDR en el sitio del daño al ADN en células tratadas con ARNasa A.

a. Un agrupamiento de oligonucleótidos sintetizados de modo químico se ensayó para restablecer la formación de focos de DDR en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A. Mezcladas con una cantidad constante de ARN procedente de células progenitoras (800 ng), se usó una amplia gama de concentraciones (1 ng/ μ l-1 fg/ μ l, etapas de dilución en diez veces) de ARN específico de locus o control (GFP). Los ARN sintéticos específicos de locus (hasta una concentración de 100 fg/ μ l), pero no los controles, permiten la activación de DDR específica de sitio. b. Se ensayaron ARN cortos generados mediante el procesamiento con DICER recombinante de ARN generado *in vitro* mediante la transcripción de un fragmento de ADN que porta la porción central del locus integrado, o un control con una longitud similar, para restablecer la formación de focos de DDR en el sitio del daño al ADN en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A. Los ARN se ensayaron a la concentración de 1 ng/ μ l mezclados con 800 ng de ARN procedente de células progenitoras. Los productos de ARN de DICER específicos de locus, pero no los controles, permiten la activación de DDR específica de sitio. c. La fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus disminuye en muestras con inactivación de DICER y DROSHA en condiciones sin corte y con corte. En las muestras con inactivación de DICER, la disminución es estadísticamente significativa (en las muestras sin corte, $p = 4,8e-7$, y en las muestras con corte, $p = 0,029$). La fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus aumenta en el tipo salvaje tras el corte ($p = 0,02$). Se calculó la significancia estadística ajustando un modelo binomial negativo a los datos de recuento de ARN corto y realizando un ensayo de proporción de probabilidad, manteniendo fija la fracción de ARN de 22-23 nt frente a ARN totales en el locus en todas las condiciones bajo la hipótesis nula y permitiendo que variase entre condiciones bajo la hipótesis alternativa.

Figura 7: La inactivación de DICER o DROSHA en células OIS permite escapar de la senescencia y el avance del ciclo celular. a. La inactivación de DICER y DROSHA por agrupamientos de ARNip en células OIS se evaluó mediante QRT-PCR. La inactivación de ATM por un agrupamiento de ARNip se evaluó mediante inmunofluorescencia. b. La inactivación de DICER o DROSHA en células OIS por ARNip aumenta las tasas de incorporación de BrdU. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a BrdU. Se emplea siGFP como control. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,001$). c y f. Las células OIS con inactivación de DICER, DROSHA y DDR mediante una transfección con agrupamientos de ARNip reexpresan MCM2, un marcador del ADN cromosómico, y pH3, un marcador de la entrada en mitosis. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,001$). d y g. La inactivación de DICER y DROSHA fue evaluada mediante QRT-PCR. e. La inactivación de 53BP1 se evaluó mediante inmunofluorescencia.

Figura 8: Diferentes concentraciones y ARNip individuales contra DICER o DROSHA en células OIS permiten escapar de la senescencia de una manera reproducible. a-c. Diferentes concentraciones (diferencia en 10 veces) de agrupamientos de ARNip contra DICER o DROSHA en células OIS permiten escapar de la senescencia. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$). La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR. d, e. Se desarrollaron agrupamientos de ARNip contra DICER o DROSHA en células OIS, y los ARNip se ensayaron de modo individual y estos permitieron escapar de la senescencia de una manera reproducible. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$). La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 9: La inactivación de DICER o DROSHA en células OIS no altera el mantenimiento de SAHF y no disminuye los niveles de proteínas de DDR, pero altera su activación a través de un intervalo de concentraciones de ARNip. a. DICER o DROSHA fueron inactivadas mediante una transfección con un agrupamiento de ARNip en células OIS. Las células se tiñeron para el marcador H3K9me3 SAHF y para 53BP1. Se emplearon células transfectadas con siGFP como control. La inactivación de DICER o DROSHA afecta a los focos de 53BP1 sin alterar la estabilidad de SAHF. b. Análisis de inmunotransferencia de H3K9me3 en células OIS con DICER o DROSHA inactivadas. Se

emplea H3 total como control de carga. c. Análisis de inmunotransferencia de 53BP1, ATM y H2AX en células OIS con DICER o DROSHA inactivadas. Se emplearon células transfectadas con siGFP como control. Se usa la vinculina como control de carga. d-f. Diferentes concentraciones (diferencia en 10 veces) de agrupamientos de ARNip contra DICER o DROSHA en células OIS alteran la detección de focos de DDR. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$). La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 10: La inactivación de DICER o DROSHA, pero no de GW182, en células OIS altera la formación de focos de DDR. a. DICER, DROSHA o GW182/TNRC6A fueron inactivadas por medio del agrupamiento de ARNip en células OIS. Las células con DICER, DROSHA o GW182/TNRC6A inactivadas se tiñeron para los marcadores de una DDR activada 53BP1, pATM y pS/TQ. La inactivación de GW182/TNRC6A no produjo un efecto detectable sobre la DDR. Las diferencias para DICER y DROSHA, pero no para GW182, fueron estadísticamente significativas (valor de $p < 0,005$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). b. La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 11: La inactivación simultánea de TNRC6A/GW182, TNRC6B y TNC6C en células OIS no afecta a la formación de focos de DDR, mientras que la inactivación de DROSHA sí la afecta. a. Células OIS inactivadas por ARNip individuales para DROSHA o TNRC6A, B y C simultáneamente (con dos conjuntos diferentes de ARNip: agrupamiento n.º 1 y n.º 2) se tiñeron para los marcadores de una DDR activada 53BP1, pATM y pS/TQ. La inactivación simultánea de TNRC6A, B y C con cualquiera de los agrupamientos n.º 1 y n.º 2 de ARNip no produce un efecto detectable sobre la DDR. Las diferencias para DROSHA, pero no para TNRC6A, B y C, son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). b. La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 12: La inactivación de DICER o DROSHA en HNF altera la formación de focos de DDR inducida por IR. a, b. Se evaluó la eficacia de la inactivación de DICER o DROSHA en fibroblastos humanos WI38 mediante inmunotinción (a) y QRT-PCR (b), respectivamente. c. Análisis de inmunotransferencia de los niveles de expresión de proteínas de ATM, 53BP1 y H2AX en WI38 con DICER o DROSHA inactivadas. Se emplearon células transfectadas con siGFP como control. Se usa la vinculina como control de carga. d-g. Se desenrollaron agrupamientos de ARNip contra DICER o DROSHA, y los ARNip se usaron de modo individual. Todos reducen la formación de focos de DDR (de 53BP1, pATM y pS/TQ, pero no de γ H2AX). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,005$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 13: La formación de focos de 53BP1 se retrasa tras la inactivación de DICER o DROSHA, y la formación alterada de focos de DDR es rescatada por DICER de tipo salvaje, pero no mutante. a. La formación de focos de 53BP1 se altera 10 minutos después de IR (10 Gy) en células WI38 con DICER o DROSHA inactivadas mediante agrupamientos de ARNip. Los histogramas muestran el porcentaje de células WI38 positivas a focos de 53BP1. Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$). b-d. La expresión de DICER de tipo salvaje resistente a ARNip, pero no de un alelo mutante que carece de actividad endonucleasa, rescata el defecto de formación de focos de DDR en células con DICER inactivada. Se estudió la formación de focos de 53BP1 10 minutos después de IR (10 Gy), pATM y MDC1 1 hora después. Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,001$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n = 3$). La inactivación de DICER endógena por ARNip 3'UTR se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 14: La inactivación de DICER o DROSHA, pero no de GW182, en HNF altera la formación de focos de DDR. a-b. Se inactivaron DICER, DROSHA o GW182/TNRC6A en células Wi38 por medio de agrupamientos de ARNip, las células se irradiaron (2 Gy) y se tiñeron para 53BP1 10 minutos después, y para los marcadores de una DDR activada γ H2AX, pATM y pS/TQ 1 hora después de IR. La inactivación de GW182/TNRC6A no produjo un efecto detectable sobre la DDR. Las diferencias para DICER y DROSHA, pero no para GW182, fueron estadísticamente significativas (valor de $p < 0,001$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). c. La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 15: La inactivación de DICER y la inactivación simultánea de TNRC6 A, B y C en células HeLa está asociada con niveles similares del ARNm detector RFP-miR126 cotransfectado, pero los focos de DDR son alterados solo en las células con DICER inactivada. a. Se cotransfectaron células HeLa con ARNm detector RFP-miR126 y ARNip contra DICER o TNRC6A, B y C en un agrupamiento. Las células se irradiaron (2 Gy) y se tiñeron para 53BP1 10 minutos después. b. La inactivación de DICER y proteínas similares a GW182 provocó la sobreexpresión del indicador de RFP sensible a miR126, pero solo la inactivación de DICER tuvo un efecto detectable sobre la DDR. Las diferencias para DICER, pero no para TNRC6 A, B y C, son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). c. La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR.

Figura 16: Los factores de DDR se expresan, pero la formación de focos de 53BP1 se retrasa en células RKO *DICER^{exón5}*-hipomórficas. Análisis de inmunotransferencia de ATM, MDC1, 53BP1 y H2AX en células RKO de tipo salvaje ("wild-type", WT) y *DICER^{exón5}*-hipomórficas. Se usaron vinculina y tubulina como controles de carga. b. Las células RKO *DICER^{exón5}*-hipomórficas irradiadas presentan una formación de focos de 53BP1 retrasada. Las

imágenes muestran focos de 53BP1 a los 10, 30 y 90 minutos después de IR (2 Gy) en células RKO de tipo salvaje (WT) y *DICER^{exón5}*-hipomórficas. c. Los histogramas muestran el porcentaje de células RKO positivas para focos de 53BP1. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$).

- 5 Figura 17: La formación alterada de focos de DDR en células *DICER^{exón5}*-hipomórficas es rescatada por DICER de tipo salvaje, pero no mutante. a. La expresión de DICER de tipo salvaje, pero no de un alelo mutante que carece de actividad endonucleasa, restablece el defecto de formación de focos de DDR en células RKO *DICER^{exón5}*-hipomórficas. Se estudió la formación de focos de 53BP1 10 minutos después de IR (2 Gy), pATM y pS/TQ 1 hora después. b. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para los focos de DDR indicados. Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,001$). Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n ≥ 3).

- 15 Figura 18: La activación de ATM mediante autofosforilación está alterada en células con DICER y DROSHA inactivadas. a. La activación de ATM tras IR (10 Gy) está alterada en fibroblastos humanos WI38 con DICER y DROSHA inactivadas, según se detecta mediante un análisis de inmunotransferencia para pATM. Se emplean células transfectadas con siGFP como control positivo para la activación de ATM. El ATM total no se ve afectado, tal como se muestra mediante la vinculina. La inactivación de DICER se evaluó mediante un análisis de inmunotransferencia. b. La inactivación de DROSHA en células WI38 se evaluó mediante QRT-PCR. c. La activación de ATM está alterada en células RKO *DICER^{exón5}*-hipomórficas irradiadas (2 Gy). Se usaron el ATM total y la vinculina como controles de carga.

- 20 Figura 19: La inactivación de DICER o DROSHA altera el punto de control de G1/S. La inactivación de DICER, DROSHA y 53BP1 por agrupamientos de ARNip en células WI38 se controló mediante QRT-PCR (a), inmunotransferencia (b) e inmunofluorescencia (c), respectivamente. d, e. Los agrupamientos de ARNip contra DICER o DROSHA usados en células WI38 se desarrollaron, y los ARNip se usaron de modo individual y estos alteraron la activación del punto de control de G1/S de una manera reproducible. El histograma muestra el porcentaje de células positivas a BrdU antes (barra negra) y después de IR (barra gris) tras la normalización sobre el porcentaje de células positivas a BrdU antes de IR para cada línea celular. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). La inactivación se evaluó mediante QRT-PCR. f. Células MRC-5 con DICER inactivada presentan una alteración en el punto de control de G1/S después de IR (10 Gy). Se usa siGFP como control. g. La eficacia de la inactivación de DICER y 53BP1 en MRC-5 se controló mediante inmunofluorescencia. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$).

- 25 Figura 20: Pérdida de la activación del punto de control de G1/S y G2/M en células con DICER inactivada. a. La transfección de ADNc de DICER-marcador en células HCT116 *DICER^{exón5}*-hipomórficas restablece un punto de control de G1/S competente después de IR (2 Gy). Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a BrdU. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,01$). b. El análisis de inmunotransferencia contra marcador-epitopo muestra la expresión de mutantes de DICER (DICER-marcador, DICER110ab-marcador y DICER44ab-marcador) en células RKO. c. La inactivación de DICER por ARNhp en células HEK293 se controló mediante QRT-PCR. d. Las células HEK293 con DICER inactivada presentan una alteración en el punto de control de G2/M, según se detecta mediante inmunotinción con pH3 de células mitóticas en células no irradiadas y 24 h después de IR (5 Gy). Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a pH3 en células control y con DICER inactivada. Las barras de error indican la d.e. (desviación estándar). (n = 3). Las diferencias son estadísticamente significativas mediante el ensayo de la t de Student (valor de $p < 0,05$). e. Las células con DICER inactivada presentan una alteración en el punto de control de G2/M que puede ser restaurado tras la transfección de DICER resistente a ARNip. La tabla muestra el porcentaje de células en la fase G1, S y G2 del ciclo celular en diferentes momentos después de IR. f. Perfiles de FACS de células HEK293 transfectadas con las combinaciones indicadas de ARNip y vectores (EV significa vector vacío, "empty vector"), 36 horas después de IR (5 Gy). g. La inactivación de DICER endógena (En DICER) y la sobreexpresión de DICER exógena (Exo DICER) se evaluaron mediante QRT-PCR.

- 30 Figura 21: Embriones de pez cebra inyectados con Dicer1-morfolino infrarregulan la expresión de miARN. a. Larvas de 72 horas posteriores a la fertilización (hpf) inyectadas con ARNm del detector de proteína fluorescente roja ("Red Fluorescent Protein", RFP) miR126 (1 larva a la izquierda) o ARNm del detector de RFP miR126 junto con Dicer1-morfolino (3 larvas a la derecha). Nótese los defectos en la mandíbula, el ojo pequeño y la reabsorción retrasada de la yema que indican retrasos en el desarrollo en embriones inyectados con Dicer1-morfolino. Los mismos embriones visualizados mediante epifluorescencia muestran un aumento en la expresión de RFP en embriones inyectados con Dicer1-morfolino. b. Especificidad del detector miR126. Los paneles superiores muestran los niveles de expresión del ARNm del detector de RFP miR126 y ARNm de GFP en los embriones control no inyectados. El panel inferior muestra los efectos de una inyección de Dicer1-morfolino sobre la expresión del detector de RFP miR126 (aumento en la ausencia de miR126 maduro) y GFP (sin cambios). c. Se analizó la expresión de miARN en embriones de 48 y 72 horas posteriores a la fertilización inyectados o no inyectados con Dicer1-morfolino mediante PCR a tiempo real. Los datos se expresan como nivel de expresión relativo de embriones inyectados con Dicer1-morfolino comparados con los embriones control no inyectados, y son el promedio de dos agrupamientos independientes de embriones realizados por duplicado. d. Tabla de valores de C_T brutos.

Figura 22: Un tratamiento con ARNasa A degrada ambos ARNm y microARN, y no altera los niveles de proteínas de DDR, aunque compromete su activación. a. Análisis de QRT PCR de ARNm de β -actina y miR-21 en células tratadas con ARNasa A y con simulación. Las barras de error indican la d.e. (desviación estándar). (n = 3). Las diferencias son estadísticamente significativas mediante el ensayo de la t de Student (valor de $p < 0,05$). b. Análisis de QRT PCR de ARNm de 53BP1 y ATM en células tratadas con ARNasa A. Las barras de error indican la d.e. (desviación estándar). (n = 3). Las diferencias son estadísticamente significativas mediante el ensayo de la t de Student (valor de $p < 0,05$). c. El tratamiento con ARNasa A no afecta a la estabilidad de las proteínas de DDR (ATM, 53BP1, MDC1). Se usa lamina A/C como control de carga. d. La ARNasa A afecta a 53BP1 y MDC1 pero no a γ H2AX en el mismo foco. Se trataron células HeLa irradiadas con PBS o ARNasa A. Los focos de 53BP1 (verde) y los focos de MDC1 (rojo) se ven afectados por el tratamiento con ARNasa A, mientras que los focos de γ H2AX (magenta) en la misma célula no se ven afectados.

Figura 23: La α -amanitina inhibe la reformación de focos de DDR espontáneos tras un tratamiento con ARNasa A. a. Los focos de 53BP1 inducidos por radiación (2 Gy) son sensibles a α -amanitina. Se irradiaron células HeLa y se incubaron con PBS (-) o ARNasa A (+). Después las células se incubaron con el inhibidor de ARNasa A RNaseOUT, con o sin α -amanitina durante 10 o 45 minutos. La incubación con α -amanitina evita la reformación de focos de 53BP1. b. El histograma muestra el porcentaje de células positivas para focos de 53BP1. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,01$).

Figura 24: Los focos de DDR inducidos por Ppo I son sensibles a la ARNasa A y se reforman tras la adición de ARN. Se transfectaron células HeLa con la forma activa de Ppo I, una enzima de restricción, se trataron con ARNasa A y se incubaron con ARNt como control o con su propio ARN. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para los marcadores de DDR indicados. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,005$).

Figura 25: Los ARN cortos estimulan la reformación de focos de DDR en el sitio del daño al ADN. a. Enriquecimiento relativo de ARN de miR-21 comparado con la cantidad de ARNm de β -actina evaluado mediante QRT-PCR en ARN total y en fracciones enriquecidas con ARN corto. b. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de 53BP1, pATM y pS/TQ en células HeLa irradiadas, tratadas con ARNasa A, y células incubadas con 200 ng de ARN total o un volumen proporcional de una fracción enriquecida en ARN corto (<200 nt). Se usó ARNt (200 ng) como control. c. Los focos de 53BP1 (verde) y pATM (rojo) inducidos por irradiación se restablecieron en las células tratadas con ARNasa A mediante una incubación con ARN total y con fracción enriquecida en ARN corto. Se empleó ARNt como control.

Figura 26: Los focos de DDR inducidos por radiación son restablecidos en células tratadas con ARNasa A mediante una incubación con ARN extraídos del gel en el intervalo de 20-35 nt. a. Las células irradiadas fueron tratadas con ARNasa A y se incubaron con cantidades equivalentes (50 ng) de ARN extraído del gel de poli(acrilamida) según se muestra en la figura 4 c. Las imágenes muestran la tinción de 53BP1 en células incubadas con los ARN indicados. b. Análisis de QRT PCR de of RNU19 (200 nt), RNU44 (61 nt) y mir-21 (22 nt) en las fracciones de ARN indicadas extraídas del gel. Las barras de error indican la d.e. (desviación estándar). (n = 3). Las diferencias son estadísticamente significativas mediante el ensayo de la t de Student (valor de $p < 0,005$).

Figura 27: El ARN extraído de células *DICER^{exón5}*-hipomórficas transfectadas con DICER de tipo salvaje, pero no con DICER mutante, permite la reformación de focos de DDR en células tratadas con ARNasa A. a. Se trataron células irradiadas con ARNasa A y se incubaron con ARN extraído de las células indicadas. El ARN procedente de células de tipo salvaje o células *DICER^{exón5}*-hipomórficas transfectadas con DICER de tipo salvaje permite la reformación de focos de 53BP1, mientras que el ARN procedente de células *DICER^{exón5}*-hipomórficas no transfectadas o de las mismas células transfectadas con DICER mutante no lo permite. b. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para los marcadores de DDR indicados. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias (*) son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,005$).

Figura 28: Los productos de ARN de DICER y DROSHA son necesarios para la reformación de focos de DDR. a. El ARN extraído de las líneas celulares HCT116 y DLD-1 de tipo salvaje, pero no el extraído de las líneas celulares HCT116 and DLD-1 *DICER^{exón5}*-hipomórficas, rescata los focos de 53BP1. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de 53BP1. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) (n = 3). Las diferencias son estadísticamente significativas (valor de $p < 0,01$). b. El ARN extraído de células HEK293 transfectadas con shDICER (o GFP como control) no restablece los focos de 53BP1 inducidos por radiación en células HeLa tratadas con ARNasa A. Se empleó ARNt como control negativo. c. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de 53BP1. d. La inmunotinción muestra la eficacia de la inactivación de DICER. e. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de 53BP1, pATM y pS/TQ en células HeLa irradiadas después de un tratamiento con ARNasa A y una incubación con ARN purificado a partir de células transfectadas con siGFP y siDROSHA. Se empleó ARNt como control.

Figura 29: Implicación del complejo de MRN en la reformación de focos de DDR tras un tratamiento con ARNasa A. a. El reclutamiento del complejo de MRN hacia DSB inducida por I-Sce I es sensible al tratamiento con ARNasa A. Los focos de 53BP1, pATM y MRE11, pero no de γ H2AX, se pierden en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A. Los

5 histogramas muestran el porcentaje de células en las que se colocan los focos de 53BP1, pATM, MRE11 o γ H2AX con el foco de Cherry-Lac. b. La mirina altera la activación del pATM en la DSB inducida por I-Sce I. El histograma muestra el porcentaje de células en las que el foco de pATM se coloca con el foco de Cherry-Lac. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) ($n \geq 3$). Las diferencias son estadísticamente significativas (*valor de $p < 0,05$).

10 Figura 30: Identificación de moléculas específicas de locus biológicamente activas. Los ARN específicos de locus sintetizados de modo químico y los productos de ARN de DICER generados *in vitro* estimulan la formación de focos de DDR en el sitio del daño al ADN en células tratadas con ARNasa A. a. Se purificó un ARN nuclear más corto que 200 nt y se analizó con el kit de ARN pequeño Bioanalyser (Agilent). b. Se preparó un banco de ARN corto y se extrajo de un gel de poliacrilamida al 6% (indicado con una flecha en 100 pb). c. Se comprobó la integridad del banco preparado usando el kit de alta sensibilidad de ADN de Agilent. d. Distribución de la longitud de los marcadores en el banco. e. Distribución de la longitud de los marcadores en el cartografiado del banco en el locus integrado exógeno que combina marcadores de muestras con corte y sin corte. f. Se ensayó un agrupamiento de oligonucleótidos sintetizados de modo químico que cartografían el locus exógeno para el restablecimiento de la formación de focos de DDR en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A. Mezcladas con una cantidad constante de ARNt, se usó una amplia gama de concentraciones (0,1 ng/ μ l, 0,1 pg/ μ l y 1 fg/ μ l) de ARN específicos de locus o control (GFP). g. El procesamiento de DICER se evaluó ensayando productos de ARN de DICER en un gel de agarosa al 3%. h. Se ensayaron ARN cortos rotos mediante el procesamiento con DICER recombinante de ARN generado *in vitro* tras la transcripción de un fragmento de ADN que porta la porción central del locus integrado, o un control con una longitud similar, para restablecer la formación de focos de DDR en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A. Los ARN se ensayaron a la concentración de 1 ng/ μ l mezclados con 800 ng de ARNt. Los productos de ARN de DICER específicos de locus, pero no los controles, permiten la activación de DDR específica de sitio en el sitio del daño al ADN. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a focos de DDR.

25 Figura 31: Perfil del banco y distribución de la longitud de las muestras secuenciadas seleccionadas. a. Perfil de Bioanalyser de ARN <200 nt procedentes de una muestra cortada de tipo salvaje. b. Se prepararon bancos de ARN corto a partir de 40 ng de ARN procedente de cada muestra y se ensayaron en un gel de PAGE al 6%. La flecha muestra la banda de interés del banco de 100 pb. c. Perfil del banco cortado de tipo salvaje. Los bancos extraídos del gel se ensayaron en el kit de alta sensibilidad Bioanalyser. La secuenciación se realizó en Hi seq, versión 3. d-i. Distribución de la longitud de los marcadores de cada banco.

30 Figura 32: La inactivación de Dicer y Drosha infrarregula los miARN. a. La inactivación de Dicer y Drosha por ARNhp en muestras sin corte y con corte se evaluó mediante QRT-PCR. b. Las lecturas del cartografiado del miARN de la emisión 18 de la base de datos miRBase se normalizaron al número de lecturas de las siembras en cada banco. Los miARN normalizados en muestras con Dicer y Drosha inactivadas se compararon con muestras de tipo salvaje antes y después del corte (según estaban marcadas). Se calculó la significancia estadística usando el ensayo de rangos con signo de Wilcoxon. Los autores descubrieron que los miARN se expresaron a un nivel significativamente menor en la muestra con Dicer y Drosha inactivadas, comparado con la muestra de tipo salvaje, en condiciones con corte y sin corte (Dicer inactivada sin corte frente a tipo salvaje sin corte, $p = 1,544e-263$; Drosha inactivada sin corte frente a tipo salvaje sin corte, $p = 3,843e-279$; Dicer inactivada con corte frente a tipo salvaje con corte, $p = 8,911e-84$; Drosha inactivada con corte frente a tipo salvaje con corte, $p = 1,172e-275$).

40 Figura 33: Características de los ARN cortos que surgen del locus. a. Longitud de los marcadores que surgen del locus antes y después del corte. El eje de ordenadas muestra el número de marcadores procedentes del locus, y el eje de abscisas muestra las longitudes de los marcadores en nucleótidos. La mayoría de los ARN cortos en las muestras de tipo salvaje antes y después del corte están en el intervalo de tamaño de 22-23 nt. Entre las muestras inactivadas, la inactivación de Dicer muestra una distribución más amplia de la longitud de los marcadores. b. El porcentaje de 22-23 nt del locus es significativamente diferente de la misma proporción de loci genómicos que no son miARN. Las fracciones de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en los loci genómicos que no son miARN con al menos 50 lecturas se muestran en histogramas, y el eje vertical muestra su frecuencia. En cada muestra, la línea vertical indica la proporción de ARN de 22-23 nt al total en el locus. El valor de p se calculó sumando el área (indicada en rojo) a la derecha de esta línea. Los autores descubrieron que la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus es significativamente mayor que la fracción de marcadores de 22-23 nt en los loci genómicos que no son miARN en condiciones sin corte ($p = 0,049$) y con corte ($p = 0,022$).

55 Figura 34: La transfección de oligonucleótidos inhibidores específicos de secuencia (concretamente, LNA) altera la DDR en el locus en células cortadas. El esquema (a) muestra el locus TET-I-SceI-LAC, los DDRNA generados tras el corte (línea gris), y los LNA usados (línea punteada negra). Las células se cotransfectaron con vectores que expresan la endonucleasa de restricción I-Sce I y Cherry-Lac, junto con diferentes conjuntos (como se indica en la leyenda de la figura) de LNA (200 pM) con el potencial para asociarse con los DDRNA que surgen del locus tras la ruptura inducida por I-SceI o un LNA control con una secuencia de telómero equivalente. Las células se puntuaron 24 h tras la transfección para los marcadores de DDR en la matriz Lac. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para los marcadores de DDR analizados: γ H2AX (b) no se ve afectado, mientras que la acumulación de 53BP1 (c) en el locus se reduce significativamente en todos los conjuntos de LNA transfectados. Se puntuaron aproximadamente 100 células de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) Se calculó la significancia estadística usando el ensayo de la chi-cuadrado comparado

con el LNA control (muestra 2). * valor de $p < 0,05$, ** valor de $p < 0,01$, *** valor de $p < 0,005$.

Figura 35: La activación de DDR (mantenimiento del foco de 53BP1) en telómeros no bloqueados depende del ARN. Se trataron MEF TRF2^{flox/flox} (Lazzerini Denchi y de Lange, Nature, 2007) con 4-hidroxitamoxifeno para inducir la inactivación de TRF2 mediada por cre y generar telómeros no bloqueados. Cuarenta y ocho horas después, las células se permeabilizaron y se trataron con ARNasa A o BSA, como control. (a) Las imágenes representativas muestran que los focos de γ H2AX son estables, mientras que los focos de 53BP1 se descongreden tras el tratamiento con ARNasa A. (b) Cuantificación de los focos de γ H2AX y 53BP1 en células tratadas con ARNasa A y BSA. Para las cuantificaciones mostradas, se puntuaron aproximadamente 150 células procedentes de dos experimentos independientes. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) *** valor de $p < 0,001$.

Figura 36: La transfección de oligonucleótidos inhibidores específicos de secuencia (concretamente, LNA) suprime la DDR y evita la reducción de BrdU tras el desbloqueo de los telómeros. Se cultivó la línea celular de fibrosarcoma T19 (van Steensel, Cell, 1998) en ausencia de doxiciclina para inducir la expresión de un alelo dominante negativo de TRF2 condensado al marcador. Las células inducidas se visualizaron mediante inmunotinción de marcador (Flag). Las células inducidas (Flag+) y no inducidas (Flag-) fueron transfectadas con moléculas de LNA (200 nM) que se corresponden con la secuencia telomérica sentido (LNA 6) y antisentido (LNA 5) y con una secuencia no relacionada (LNA 3, Cntrl) en el día 13 desde la inducción. (a) Las células positivas a focos de 53BP1 se puntuaron en los momentos indicados después de la transfección. LNA 5 y 6 provocan una disminución en las células positivas a DDR, en diferente grado, comparado con el LNA control en células inducidas, mientras que no se observó ninguna diferencia en células no inducidas. Para las cuantificaciones mostradas, se puntuaron aproximadamente 30-100 células para cada momento (b, c). Las células inducidas se incubaron con BrdU durante 16 horas y se puntuaron para la incorporación de BrdU 3 días después de la transfección de LNA. Las células Flag+ transfectadas con LNA 5 y 6 mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células positivas a BrdU, comparado con el LNA Cntrl (b), mientras que no se observó ninguna diferencia en células Flag- (c). Para las cuantificaciones mostradas, se puntuaron aproximadamente 150 células procedentes de tres (b) o dos (c) experimentos independientes. Las barras de error indican el e.e.p. (error estándar del promedio) * valor de $p < 0,05$, *** valor de $p < 0,001$.

Descripción detallada de la invención

Métodos

Células cultivadas.

Se cultivaron células BJ de transferencia temprana, WI38 y MRC-5 (The American Type Culture Collection, ATCC) bajo condiciones de cultivo de tejidos convencionales (37° C, 5% de CO₂) en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, Na piruvato al 1%. Se cultivaron las líneas celulares HeLa, Phoenix ecotrófica y HEK293T bajo condiciones de cultivo de tejidos convencionales (37° C, 5% de CO₂) en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%. Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de colon RKO, HCT 116 y DLD1²⁵ en medio de Mc'Coy 5A + suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%. Se cultivaron NIH2/4³⁵ en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina al 1%, gentamicina (40 μ g/ml), e higromicina (400 μ g/ml).

Se generaron células BJ senescentes que sobreexpresan H-RasV12 como se indica en ²⁰. Se realizaron ensayos de incorporación de BrdU al menos una semana después de que los cultivos hubieran entrado completamente en el estado senescente, según se determina por el cese de la proliferación, la activación de DDR, la formación de SAHF y la expresión de β -galactosidasa asociada con la senescencia. Se indujo una radiación ionizante ("ionizing radiation", IR) mediante un tubo generador de rayos X de alto voltaje (Faxitron X-Ray Corporation). En general, las células cultivadas se expusieron a 2 Grays para el ensayo de formación de focos. Los autores usaron 5 Grays para los ensayos de punto de control de G2/M, y 10 Grays para los ensayos de punto de control de G1/S.

Se transfectaron vectores que expresan Cherry-Lac y la endonucleasa de restricción I-Sce I mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en una proporción de 3:1. Dieciséis horas después de la transfección, aproximadamente 70% de las células puntuaron de forma positiva para los marcadores de DDR en la matriz Lac. Para la generación de células NIH2/4 con Dicer y Drosha inactivadas, estas se infectaron con partículas lentivíricas que portan vectores pLKO.1, shDicer o shDrosha. Después de 48 horas, las células se superinfectaron con un adenovector vacío ("Adeno Empty Vector") o Adeno I-Sce I [Anglana *et al.*, Nucl. Ac. Res., 1999]. Los núcleos se aislaron el día después de la infección adenovírica.

La expresión transitoria de endonucleasas ER-I-Ppol en células HeLa se realizó mediante transfección con Lipofectamine 2000 y, 16 horas después, se añadió tamoxifeno (0,1 μ M) al medio de cultivo para inducir la activación de la endonucleasa. Cuatro horas después, las células se fijaron para la inmunotinción o se usaron para la extracción de ARN. Se emplearon células transfectadas con Cherry-Lac (simulación) con control en estos experimentos.

Células cultivadas y transfección de LNA (para los experimentos en la figura 34).

Se cultivaron células NIH2/4 en DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina al 1%, gentamicina (40 mg/ml), e higromicina (400 mg/ml). Los vectores que expresan Cherry-Lac y la endonucleasa de restricción I-Sce I se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en una proporción de 3:1. En primer lugar, los LNA se hirvieron a 90 °C durante 5 minutos y se enfriaron rápidamente a 4 °C durante 5 minutos y después se añadieron en diferentes combinaciones a la mezcla de transfección de Cherry-Lac y I-Sce I a la concentración final de 200 pM. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se puntuaron para los marcadores de DDR en una matriz Lac.

Células cultivadas (para los experimentos en las figuras 35-36).

Se cultivaron células de fibrosarcoma T19 (van Steensel, Cell, 1998) en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina al 1% y doxiciclina (100 ng/ml). Para la inducción, las células se cultivaron sin doxiciclina durante al menos 7-8 días. Se cultivaron MEF CRE-ER TRF2^{lox/lox} (Lazzerini Denchi y de Lange, Nature, 2007) en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina al 1%. Para la inducción, las células se cultivaron en presencia de 4-hidroxitamoxifeno (600 nM) durante 48 horas. Para la incorporación de BrdU, las células se marcaron con bromodesoxiuridina 10 µg/ml (BrdU, Sigma) durante 16 horas y se evaluó la incorporación mediante inmunofluorescencia después de la desnaturalización del ADN.

Anticuerpos.

Anti-γH2AX de ratón, anti-H3K9 me3, anti-PH3 policlonal de conejo (Upstate Biotechnology); anti-pS/TQ (Cell Signaling Technology); anti-H2AX, anti-H3 y anti-DICER (13D6) (Abcam); anti-53BP1 policlonal de conejo (Novus Biological) y anti-53BP1 monoclonal de ratón (un obsequio de Thanos Halazonetis); anti-MRE11 (un obsequio de S. Jackson); anti pH3, anti-BrdU (Becton Dickinson); anti-MCM2 policlonal de conejo (un obsequio de Marine Melixetian); anti-MRE11 policlonal de conejo generado contra MRE11 recombinante; anti-pATM (Rockland); anti-ATM monoclonal de ratón y anti-MDC1 (SIGMA); anticuerpos monoclonales antivinculina (clon hVIN-1), anti-β-tubulina (clon AA2) y anti-Flag M2 (SIGMA).

Inmunofluorescencia indirecta.

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos poli-D-lisinados (se usó poli-D-lisina a una concentración final de 50 µg/ml) y se cultivaron (15-20×10³ células/cubreobjetos) un día antes de la tinción. La tinción de DDR y BrdU se realizó como en ²⁰. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% o metanol:acetona 1:1. Las células de ratón NIH2/4 se fijaron en paraformaldehído al 4% como en ³⁵. Se adquirieron imágenes usando un microscopio Olympus Biosystems BX71 de campo amplio y los programas informáticos analysIS o MetaMorph (Soft Imaging System GmbH). Se realizaron análisis de inmunofluorescencia comparativos en paralelo con parámetros de adquisición idénticos; se seleccionaron al menos 100 células para cada antígeno. Las células con más de dos focos de 2 DDR se puntuaron como positivas. Las cuantificaciones de la intensidad de los focos se realizaron usando el programa informático Cell Profiler 2.0. Se obtuvieron secciones confocales con un microscopio láser confocal Leica TCS SP2 AOBs mediante barrido secuencial.

Inmunofluorescencia (para los experimentos en las figuras 35-36).

Las células se fijaron con una disolución de metanol/acetona 1:1 durante 2 minutos a temperatura ambiente, o paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las células se tiñeron con anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados durante 40 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1 µg/ml).

Plásmidos.

Los plásmidos Flag-DICER, Flag-DICER44ab y Flag-DICER110ab fueron un amable obsequio de R. Shiekhhattar. El vector que expresa DICERhc pLKO.1 fue un amable obsequio de W.C. Hahn. La secuencia de horquilla corta para DICER es: CCG GCC ACA CAT CTT CAA GAC TTA ACT CGA GTT AAG TCT TGA AGA TGT GTG GTT TTT G (SEQ ID NO:1). El vector pRETROSUPER shp53 es como en ²⁰. La secuencia de horquilla corta para p53 es: AGT AGA TTA CCA CTG GAG TCT T (SEQ ID NO:2). Los vectores que expresan el Cherry-represor de Lac y la endonucleasa de restricción I-Sce I fueron amables obsequios de E. Soutoglou³⁵. El vector que expresa la endonucleasa de restricción ER-I-Ppo I fue un amable obsequio de Michael Kastan³³. El ARNhc contra los vectores que expresan Dicer y Drosha de ratón fue un amable obsequio de W.C. Hahn. ARNhc para Dicer de ratón: CCG GGC CTC ACT TGA CCT GAA GTA TCT CGA GAT ACT TCA GGTCAA GTG AGG CTT TTT (SEQ ID NO:3). ARNhc para Drosha de ratón: CCG GCC TGG AAT ATG TCC ACA CTT TCT CGA GAA AGT GTG GAC ATA TTC CAG GTT TTT G (SEQ ID NO:4).

ARNip.

Las secuencias de ARNip de DHARMACON siGENOME SMARTpool siRNA para 53BP1, ATM, DICER, DROSHA humanas fueron:

53BP1:

GAG AGC AGA UGA UCC UUU A (SEQ ID NO:5);
 GGA CAA GUC UCU CAG CUA U (SEQ ID NO:6);
 GAU AUC AGC UUA GAC AAU U (SEQ ID NO:7);
 GGA CAG AAC CCG CAG AUU U (SEQ ID NO:8).

5 ATM:

GAA UGU UGC UUU CUG AAU U (SEQ ID NO:9);
 AGA CAG AAU UCC CAA AUA A (SEQ ID NO:10);
 UAU AUC ACC UGU UUG UUA G (SEQ ID NO:11);
 AGG AGG AGC UUG GGC CUU U (SEQ ID NO:12).

10 DICER:

UAA AGU AGC UGG AAU GAU G (SEQ ID NO:13);
 GGA AGA GGC UGA CUA UGA A (SEQ ID NO:14);
 GAA UAU CGA UCC UAU GUU C (SEQ ID NO:15);
 GAU CCU AUG UUC AAU CUA A (SEQ ID NO:16).

15 DROSHA:

CAA CAU AGA CUA CAC GAU U (SEQ ID NO:17);
 CCA ACU CCC UCG AGG AUU A (SEQ ID NO:18);
 GGC CAA CUG UUA UAG AAU A (SEQ ID NO:19);
 GAG UAG GCU UCG UGA CUU A (SEQ ID NO:20).

20 Las secuencias de ARNip de DHARMACON siGENOME para TNRC6A, B y C humanas fueron:

GW182/TNRC6A:

GAA AUG CUC UGG UCC GCU A (SEQ ID NO:21);
 GCC UAA AUA UUG GUG AUU A (SEQ ID NO:22).

TNRC6B:

25 GCA CUG CCC UGA UCC GAU A (SEQ ID NO:23);
 GGA AUU AAG UCG UCG UCA U (SEQ ID NO:24).

TNRC6C:

CUA UUA ACC UCG CCA AUU A (SEQ ID NO:25);
 GGU AAG UCC UCC AUU GAU G (SEQ ID NO:26).

30 ARNip contra DICER humana 3' UTR:

CCG UGA AAG UUU AAC GUU U (SEQ ID NO:27).

ARNip contra GFP:

AAC ACU UGU CAC UAC UUU CUC (SEQ ID NO:28).

ARNip contra luciferasa:

35 CAU UCU AUC CUC UAG AGG AUG dTdT (SEQ ID NO:29);
 dTdT GUA AGA UAG GAG AUC UCC UAC (SEQ ID NO:30).

Los ARNip se transfectaron mediante Oligofectamine (Invitrogen) a una concentración final de 200 nM en células

OIS y de 100 nM en HNF. En el experimento de titulación de ARNip, se transfectaron células OIS en paralelo con oligos de ARNip 20 nM y 200 nM. Para la transfección de ARNip con oligos de ARNip desenrollados, los autores usaron 50 nM para los agrupamientos sin modificar y 12,5 nM para ARNip desenrollados.

PCR cuantitativa a tiempo real (RT-QPCR).

- 5 Se aisló el ARN total de los cultivos de células usando el kit TRIzol (Invitrogen) o RNAeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante, y se trató con ADNasa antes de la transcripción inversa. Para el aislamiento del microARN, los autores usaron el kit de aislamiento de miARN *mirVana*[™] (Ambion). El ADNc se generó usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). El ADNc se usó como molde en ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems) para la evaluación de los niveles de ARNm de DICER (ID del ensayo: Hs00998580_m1) y DROSHA (ID del ensayo: Hs01095030_m1). Se emplearon ensayos de microARN TaqMan® (Applied Biosystems) para la evaluación de los niveles de expresión de miR-21 y rnu44 y rnu19 maduras (ID del ensayo: 000397, 001094 y 001003). Se usó 18S o β -actina como gen de control para la normalización. Se evaluó el enriquecimiento en miR21 y rnu44 en la fracción enriquecida en ARN pequeño como la proporción entre ciclos de PCR (ct) para miR-21 o rnu44, y para el ARNm de β -actina después de la normalización en la misma proporción en la fracción de ARN total. Las reacciones de PCR cuantitativas a tiempo real se realizaron en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems ABI Prism 7900HT o en un sistema de detección de secuencias Roche LightCycler 480. Las reacciones se prepararon usando la mezcla de reacción SyBR Green de Roche. Se usó la proteína ribosómica P0 (RPP0) como gen de control humano y de ratón para la normalización.

Las secuencias de cebadores para la PCR cuantitativa a tiempo real fueron:

20 RPP0:

TTCATTGTGGGAGCAGAC (SEQ ID NO:31) (directo),

CAGCAGTTTCTCCAGAGC (SEQ ID NO:32) (inverso);

DICER endógena humana:

AGCAACACAGAGATCTCAAACATT (SEQ ID NO:33) (directo),

25 GCAAAGCAGGGCTTTTCAT (SEQ ID NO:34) (inverso);

DICER sobreexpresada y endógena humana:

TGTTCCAGGAAGACCAGGTT (SEQ ID NO:35) (directo),

ACTATCCCTCAAACACTCTGGAA (SEQ ID NO:36) (inverso);

DROSHA humana:

30 GGCCCGAGAGCCTTTTATAG (SEQ ID NO:37) (directo),

TGCACACGTCTAACTCTTCCAC (SEQ ID NO:38) (inverso);

GW182 humana:

CAGCCAGTCAGAAAGCAGTG (SEQ ID NO:39) (directo),

TGTGAGTCCAGGATCTGCTACTT (SEQ ID NO:40) (inverso);

35 Dicer de ratón:

GCAAGGAATGGACTCTGAGC (SEQ ID NO:41) (directo),

GGGGACTTCGATATCCTCTTC (SEQ ID NO:42) (inverso);

Drosha de ratón:

CGTCTCTAGAAAGGTCCTACAAGAA mouse (directo),

40 GGCTCAGGAGCAACTGGTAA (SEQ ID NO:44) (inverso).

Tratamiento con ARNasa y experimentos de complementación de ARN.

- Se cultivaron células sobre cubreobjetos poli-D-lisinados y se irradiaron con 2 Gy de IR. Una hora después, células HeLa fueron permeabilizadas con Tween 20 al 2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, mientras que células NIH2/4 transfectadas con I-Sce I fueron permeabilizadas con Tween 20 al 0,5% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. El tratamiento con ARNasa A se realizó en 1 ml de ribonucleasa A 1 mg/ml

- procedente de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo: R5503) en PBS durante 25 minutos a temperatura ambiente. Después de la digestión con ARNasa A, las muestras se lavaron con PBS, se trataron con 80 unidades de un inhibidor de ARNasa (RNaseOUT, Invitrogen, 40 unidades/µl) y 2 µg/ml de α-amanitina (SIGMA) durante 15 minutos en un volumen total de 70 µl. Para los experimentos con mirina, en ese momento se incubaron células NIH2/4 también con mirina 100 µM (SIGMA) o DMSO durante 15 minutos. Después, las células tratadas con ARNasa A se incubaron con ARN total, pequeño o extraído de gel, o la misma cantidad de ARNt, durante 15 minutos más a temperatura ambiente. Si se emplea mirina, las células NIH2/4 se incuban con ARN total en presencia de mirina 100 µM o DMSO durante 25 minutos a temperatura ambiente. Luego las células se fijaron con paraformaldehído al 4% o metanol:acetona 1:1.
- 5
- 10 En los experimentos de complementación con oligonucleótidos de ARN sintéticos, se eligieron ocho oligonucleótidos de ARN con el potencial de formar cuatro parejas de entre las secuencias obtenidas mediante secuenciación profunda que cartografía el locus integrado en células NIH2/4. Se generaron oligonucleótidos de ARN sintéticos mediante SIGMA con una modificación de monofosfato en el extremo 5'. Cartografiado de las secuencias de diferentes regiones del locus integrado: dos parejas cartografían una secuencia exclusiva que flanquea el sitio de restricción I-Sce I (Oligo 1+Oligo 2 y Oligos 3+Oligo 4), otra el operador Lac (Oligo 5+Oligo 6) y otra las secuencias repetitivas del represor Tet (Oligo 7+Oligo 8). Se usaron dos oligonucleótidos de ARN apareados con las secuencias de GFP como control negativo (Oligo GFP 1+Oligo GFP 2). Las secuencias se indican a continuación.
- 15

Secuencias de DDRNA

- Oligo 1: 5'-AUA ACA AUU UGU GGA AUU CGG CGC-3' (SEQ ID NO:45),
- 20 oligo 2: 5'-CGA AUU CCA CAA AUU GUU AUC C-3' (SEQ ID NO:46),
- oligo 3: 5'-AUU UGU GGA AUU CGG CGC CUC UAG AGU CGA GG-3' (SEQ ID NO:47),
- oligo 4: 5'-CCU CGA CUC UAG AGG CG-3' (SEQ ID NO:48),
- oligo 5: 5'-AGC GGA UAA CAA UUU GUG GCC ACA UGU GGA-3' (SEQ ID NO:49),
- oligo 6: 5'-UGU GGC CAC AAA UUG UU-3' (SEQ ID NO:50),
- 25 oligo 7: 5'-ACU CCC UAU CAG UGA UAG AGA AAA GUG AAA GU-3' (SEQ ID NO:51),
- oligo 8: 5'-CUU UCA CUU UUC UCU AUC ACU GAU AGG GAG UG-3' (SEQ ID NO:52),
- GFP 1: 5'-GUU CAG CGU GUC CGG CGA GUU-3' (SEQ ID NO:53),
- GFP 2: 5'-CUC GCC GGA CAC GCU GAA CUU-3' (SEQ ID NO:54).

- 30 Los ARN se resuspendieron en KCl 60 mM, HEPES 6 mM, pH 7,5, MgCl₂ 0,2 mM, a la concentración madre de 12,5 µM, se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y se asociaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Los productos de ARN de DICER se generaron como sigue. Un fragmento de ADN de 550 pb que porta la porción central del locus genómico estudiado (tres repeticiones de Lac, el sitio I-Sce I y dos repeticiones de Tet) se flanqueó con promotores de T7 en ambos extremos y se usó como molde para la transcripción *in vitro* con el kit de transcripción TurboScript T7 (AMSBIO). El ARN largo de 500 nt obtenido se purificó y se incubó con enzima DICER recombinante humana (AMSBIO) para generar ARN de 22-23 nt. Los productos de ARN se purificaron, se cuantificaron y se comprobaron en un gel de poliacrilamida o de agarosa. Como control se siguió el mismo procedimiento con una construcción de 700 pb que contenía la secuencia de ADN de RFP. Se emplearon cantidades iguales de productos de DICER generados de esta manera en un experimento de complementación en células NIH2/4 tras un tratamiento con ARNasa.
- 35

- 40 Tratamiento con ARNasa A (para los experimentos en la figura 35).

- Se indujeron MEF CRE-ER TRF2^{flox/flox} (Lazzerini Denchi y de Lange, Nature, 2007) para provocar la inactivación de TRF2 y el desbloqueo de los telómeros. Cuarenta y ocho horas después, las células se permeabilizaron con Tween 20 al 0,6% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. El tratamiento con ARNasa A se realizó en 1 ml de ribonucleasa A 1 mg/ml procedente de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo: R5503) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 45

Transfección de LNA (para los experimentos en la figura 36).

En primer lugar, los LNA se hirvieron a 90 °C durante 5 minutos, se enfriaron a 4 °C durante 5 minutos y se transfectaron con Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) a la concentración final de 200 nM.

Preparación de ARN pequeño.

- 50 Se aisló el ARN total de células usando TRIzol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para generar una

fracción enriquecida en ARN pequeño y una fracción exenta de ARN pequeño, los autores usaron el kit de aislamiento de microARN *mirVana*[™] (Ambion) según las instrucciones del fabricante. El kit de aislamiento de microARN *mirVana* emplea una extracción orgánica, seguida de la inmovilización del ARN sobre filtros de fibra de vidrio (fibras de sílice) para purificar el ARN total o el ARN enriquecido en especies pequeñas. Para la extracción del ARN total se añade etanol a las muestras y se hacen pasar a través de un cartucho de filtro que contiene un filtro de fibra de vidrio, que inmoviliza el ARN. El filtro después se lava unas cuantas veces y, por último, el ARN se eluye con una disolución de baja fuerza iónica. Para aislar el ARN que está muy enriquecido en especies pequeñas de ARN, se añade etanol hasta que en las muestras se alcanza etanol al 25%. Cuando esta mezcla de etanol/lisado se hace pasar a través de un filtro de fibra de vidrio, los ARN grandes son inmovilizados, y las especies pequeñas de ARN se recogen en el filtrado. La concentración de etanol del filtrado entonces aumenta hasta 55% y se hace pasar a través de un segundo filtro de fibra de vidrio, en el que los ARN pequeños son inmovilizados. Este ARN se lava unas cuantas veces y se eluye en una disolución de baja fuerza iónica. Usando esta estrategia que consiste en dos filtraciones secuenciales con diferentes concentraciones de etanol, puede obtenerse una fracción de ARN muy enriquecida en especies de ARN ≤ 200 nt^{25,66}.

15 Extracción del ARN del gel.

Las muestras de ARN total se desnaturalizaron con calor, se cargaron y se resolvieron en un gel de acrilamida desnaturalizante el 15% [1× TBE, urea 7 M, acrilamida al 15% (acrilo:bis-acrilo 29:1)]. El gel se ensayó durante 1 hora a 180 V y se tiñó en una disolución GelRed. El gel se cortó según el marcador de peso molecular, se trasladó a un tubo limpio de 2 ml, se trituró y el ARN se eluyó en 2 ml de acetato de amonio 0,5 M, EDTA 0,1 M en agua sin ARNasa, agitando durante la noche a 4 °C. Después los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a la velocidad máxima, se recuperó la fase acuosa, el ARN se precipitó y se resuspendió en agua sin ARNasa.

Ensayo de punto de control de G1/S.

Se irradiaron células WI38, BJ y MRC-5 con 10 Gy y, 1 hora después, se incubaron con BrdU durante 7 h; se irradiaron células HCT 116 y RKO con 2 Gy y se incubaron con BrdU durante 2 h. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se sondaron para la inmunotinción de BrdU. Se analizaron al menos 100 células por condición.

Ensayo de punto de control de G2/M.

Se irradiaron células HEK 293 transfectadas con fosfato de calcio con 5 Gy y se dejó que respondieran a daños en el ARN inducidos por IR en un incubador de cultivo celular durante 12, 24 o 36 horas. Después, en estos tres momentos tras la irradiación, junto con células no irradiadas, se recolectaron 1×10^6 células para el análisis de clasificación de células activado por fluorescencia ("Fluorescence Activated Cell Sorting", FACS), se fijaron en etanol al 75% en PBS, durante 30 minutos sobre hielo. Después, las células se trataron durante 12 horas con 40 µg/ml de ARNasa A y se incubaron durante al menos 1 h con yoduro de propidio (PI). Los perfiles de FACS se obtuvieron mediante el análisis de al menos 5×10^5 células. En los experimentos de complementación, se transfectaron HEK 293 usando Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) y, 48 horas después, se irradiaron con 5 Gy. Luego las células se trataron como se explicó anteriormente.

Inmunotransferencia.

Las células se lisaron en tampón de muestras y se resolvieron 50-100 µg del lisado de células completas mediante SDS-PAGE, se trasladaron a nitrocelulosa y se sondaron como en ²⁰.

Para el análisis de proteínas de inmunotinción del pez cebra, 72 horas posteriores a la fertilización (hpf), se retiraron las yemas de las larvas en disolución de Ringer Krebs que contenía EDTA 1 mM, PMSF 3 mM e inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidores de proteasas completo de Roche). Después los embriones se homogeneizaron con una mano de mortero en tampón de muestras de SDS que contenía EDTA 1 mM, se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 min. Se midió la concentración de proteínas con el método de BCA (Pierce) y se cargaron las proteínas (50 µg-900 µg) en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% (para γ H2AX y H3) y SDS-poliacrilamida al 6% (para pATM y ATM), se trasladaron a una membrana de nitrocelulosa, y se incubaron con anti- γ H2AX (1:2000, un obsequio de J. Amatruda⁶⁷), H3 (1:10000, Abcam), pATM (1:1000, Rockland), ATM (1:1000, Sigma). Las bandas inmunorreactivas se detectaron con IgG antirratón o anticonejo conjugada con peroxidasa de rábano y un kit de detección de ECL (Pierce, Springfield, Ill., EE. UU.). La carga de proteínas se normalizó a cantidades iguales de H3 y ATM total.

Inyección de embriones de pez cebra, trasplante de células y tinción.

Embriones de pez cebra en el estadio de 1-2 células fueron inyectados con un oligonucleótido de morfolino contra Dicer1²⁹ diluido en tampón Danieau. El oligonucleótido de morfolino se inyectó a una concentración de 5 ng/nl y un volumen de 2 nl/embrión. Para evaluar la eficacia del morfolino que bloquea la maduración de microARN, los autores coinyectaron el morfolino con un ARNm sintetizado *in vitro* que codifica la proteína fluorescente roja (RFP) y que porta 3 sitios de unión para miR126 en el 3' UTR²⁸. Los oligonucleótidos que portan los sitios de unión para miR126 usados para la construcción del detector de pCS2:RFPmiR126 fueron:

5' GCATTATTACTCACGGTACGAATAAGGCATTATTACTCACGGT ACGAATAAGGCATTATTACTCACGGTACGA
3' (SEQ ID NO:55), y

5' CGTAATAATGAGTGCCATGCTTATTCCGTAATAATGAGTGCCA TGCTTATTCCGTAATAATGAGTGCCATGCT
3' (SEQ ID NO:56).

5 La construcción se verificó mediante secuenciación y se usó para sintetizar ARNm *in vitro* usando el kit mMessage (Ambion). El ARN mensajero que codifica el detector de RFPmiR126 se inyectó por sí solo o en combinación con Dicer1-morfolino a una concentración de 10 pg/nl. Dicer-morfolino se inyectó a una concentración de 5 ng/nl y un volumen de 2 nl/embrión. Para los experimentos de trasplante de células, los autores inyectaron embriones donantes con una mezcla de Dicer1-morfolino y ARNm que codifica GFP (5 pg/nl). Se trasplantaron aproximadamente 20 células procedentes de embriones donantes en estadio de cúpula (5 hpf) a un hospedante no inyectado en el mismo estadio. Las larvas trasplantadas con éxito (que muestran células GFP+) se irradiaron como se describe a continuación. Se transcribieron de modo inverso miARN maduros para producir 6 ADNc diferentes para el ensayo de microARN TaqMan® (30 ng de ARNm total para cada reacción; Applied Biosystems). Se realizaron por duplicado reacciones de PCR a tiempo real con la química de reactivos de TaqMan en un sistema de PCR a tiempo real rápido ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems). Se midió el nivel de expresión de miARN usando C_T (ciclo umbral). Se generó el cambio en número de veces usando la ecuación 2^{-C_T} .

20 Para la inmunofluorescencia en larvas de pez cebra: se irradiaron larvas de 72 hpf con 12 Gy, se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de equilibrar en sacarosa al 10 y 15% en PBS, las larvas se congelaron en compuesto OCT sobre cubreobjetos sobre hielo seco. Se cortaron secciones con un criostato con un espesor nominal de 14 μ m y se recolectaron sobre portaobjetos Superfrost (BDH). Los antisueros usados fueron γ H2AX de pez cebra —un amable obsequio de J. Amatruda⁶⁷— y pATM (Rockland). La fluorescencia de GFP en los embriones trasplantados fue claramente visible en los embriones fijados. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal (Leica SP2) y una lente de inmersión en aceite 63 \times .

Secuenciación del ARN.

25 Se purificó el ARN nuclear más corto que 200 nt usando el kit de aislamiento de microARN *mirVana*TM. Se comprobó la calidad del ARN con un chip de ARN pequeño (Agilent) antes de la preparación del banco (figura suplementaria 23a). Para la secuenciación con Illumina Hi Seq Version3, se añadió ARN de siembra a cada muestra de ARN con una proporción de ARN:siembra de 10.000:1 antes de la preparación del banco, y se prepararon los bancos para Illumina GA IIX sin siembra. Se usó un protocolo de preparación de bancos de ARN corto mejorado para preparar los bancos⁶⁸. Brevemente, se acoplaron adaptadores 3' adenilados a los extremos 3' de ARN cortos 3'-OH usando una enzima ARN ligasa truncada, seguida del acoplamiento del adaptador 5' a los extremos 5'-monofosfato usando una enzima ARN ligasa, asegurando el acoplamiento específico de ARN cortos no degradados. Se preparó ADNc usando un cebador específico del adaptador 3' en presencia de un eliminador de Dimer y se amplificó con 12-15 ciclos de PCR empleando un cebador directo especial que se dirige al adaptador 5' que contiene una secuencia adicional para la secuenciación y un cebador inverso que se dirige al adaptador 3'. El banco de ADNc amplificado se ensayó en un gel de poliacrilamida al 6% y se extrajo la banda de 100 pb que contenía los ADNc de hasta 33 nt usando protocolos de extracción convencionales. Los bancos se secuenciaron después de comprobar la calidad en un chip de alta sensibilidad de ADN (Agilent). Se realizó la secuenciación de código de barras múltiple con Illumina GA-IIX (lecturas de extremos individuales de 35 pb) e Illumina Hi seq versión 3 (lecturas de extremos individuales de 40 51 pb). Las secuencias de todos los DDRNA identificados en este estudio estarán disponibles para su descarga libre en el momento de la publicación en SRA ("short read archive").

Análisis estadísticos.

45 Los resultados se muestran como promedio más/menos error estándar (e.e.p.). El valor de p se calculó mediante el ensayo de la chi-cuadrado. Los resultados de QRT-PCR se muestran como promedios más/menos desviación estándar (d.e.) por triplicado, y el valor de p se calculó mediante el ensayo de la t de Student como se indica. * indica el valor de $p < 0,05$.

Los resultados en las figuras 34b y c se muestran como promedios más error estándar (e.e.p.). El valor de p se calculó mediante el ensayo de la chi-cuadrado. * indica el valor de $p < 0,05$, ** indica el valor de $p < 0,01$, *** indica el valor de $p < 0,005$.

50 Los resultados en las figuras 35-36 se muestran como promedios más error estándar del promedio (e.e.p.). El valor de p se calculó mediante el ensayo de la chi-cuadrado. * indica el valor de $p < 0,05$, *** indica el valor de $p < 0,001$.

Análisis estadístico de los datos de secuenciación de ARN cortos.

Se calculó la significancia estadística de la infrarregulación de miARN normalizados en muestras con Dicer y Drosha inactivadas usando el ensayo de rangos con signo de Wilcoxon.

55 La diferencias en la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus entre el tipo salvaje, la inactivación de Dicer y la inactivación de Drosha antes y después del corte se calcularon ajustando un modelo

binomial negativo a los datos de recuento de ARNc y realizando un ensayo de proporción de probabilidad, manteniendo fija la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus en todas las condiciones bajo la hipótesis nula y permitiendo que variase entre condiciones bajo la hipótesis alternativa.

Secuencias de LNA (para los experimentos en las figuras 34 y 36).

- 5 LNA 1: TTATCCGCTCACAAATCCACAT (SEQ ID NO:57)
 LNA 2: ATGTGGAATTGTGAGCGGATAA (SEQ ID NO:58)
 LNA 3 (Cntrl en la figura 36): ACTGATAGGGAGTGGTAAACT (SEQ ID NO:59)
 LNA 4: AGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGT (SEQ ID NO:60)
 LNA 5 (control en la figura 34): CCCTAACCCCTAACCC (SEQ ID NO:61)
 10 LNA 6: GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID NO:62)

Ejemplos

La inactivación de DICER y DROSHA inhibe la DDR y permite que células senescentes vuelvan a entrar en el ciclo celular.

15 La senescencia inducida por oncogenes ("oncogene-induced senescence", OIS) es un estado no proliferativo caracterizado por una DDR sostenida^{20,21} (provocada por un alto nivel de daños en el ADN endógenos) y focos heterocromáticos asociados a la senescencia ("senescence-associated heterochromatic foci", SAHF)²². Puesto que se ha implicado a la maquinaria del ARNi en la formación de la heterocromatina²³, los autores investigaron si la inactivación de componentes de la maquinaria del ARNi puede tener un impacto sobre el escape de la senescencia inducida en fibroblastos humanos por la transducción de H-RasV12 (mencionadas en la presente como células OIS).
 20 Por tanto, los autores suprimieron la expresión de DICER o DROSHA en células OIS usando un agrupamiento de ARN de interferencia pequeños (ARNip) y controlaron el avance del ciclo celular hacia la fase S con marcaje de BrdU. Los autores observaron que la inactivación de DICER o DROSHA, así como la inactivación de ATM usada como control positivo para el escape de la senescencia²⁰ (figura 1a) produjo una fracción mayor de células positivas a BrdU (figura 7b), la reexpresión de marcadores de la replicación de ADN cromosómico (figuras 7c-e) y la entrada en mitosis (figura 7f-g). Estos resultados pueden reproducirse a través de un intervalo de concentraciones de ARNip (figuras 8a-c) y con cuatro oligonucleótidos de ARNip individuales (figuras 8d, e). Sin embargo, quizá de modo inesperado, en las células con DICER o DROSHA inactivadas, los autores no pudieron detectar una alteración palpable en la formación de la heterocromatina y la acumulación de componentes de SAHF, según se detecta mediante tinción con DAPI y mediante inmunotinción e inmunotransferencia para la forma trimetilada de la histona H3 (H3K9me3) (figuras 9a, b).
 25
 30

Puesto que la DDR desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la detención proliferativa en células OIS^{20,21}, los autores estudiaron si la inactivación de DICER o DROSHA tenía un impacto sobre el mantenimiento de focos de DDR. Para ello, los autores tiñeron células para marcadores de una DDR activa, tales como la forma autofosforilada de ATM (pATM), sustratos fosforilados de ATM y ATR (pS/TQ), 53BP1 y γ H2AX. Los autores observaron que la inactivación de DICER o DROSHA reduce significativamente el número de células positivas a focos de 53BP1, pATM y pS/TQ (figuras 1a, b y 9a) aunque no se reducen los niveles de proteínas de 53BP1, ATM o H2AX (figura 9c). Los autores también observaron que el porcentaje de células positivas a γ H2AX no mostró una variación significativa, aunque la intensidad de los focos de γ H2AX en general se redujo (figuras 1a y b). Estos efectos pueden observarse a través de un intervalo de concentraciones de ARNip (figuras 9d-f). De manera importante, la inactivación de GW182/TNRC6A, el principal componente de la maquinaria del ARNi implicada en el control traduccional del ARNm, no tiene un impacto sobre la detección de focos de DDR (figura 10), ni la inactivación simultánea de las tres proteínas similares a GW182, TNRC6A, B y C con dos agrupamientos independientes de ARNip (figura 11). Por tanto, la inactivación de DICER o DROSHA altera la señalización de DDR y supera la detención proliferativa inducida por DDR de células OIS.
 35
 40

45 La inactivación de DICER o DROSHA altera la formación de focos de DDR inducida por radiación ionizante.

Después, los autores se preguntaron si la implicación de DICER y DROSHA en la activación de la DDR es específica para las condiciones de senescencia o si la inactivación de DICER o DROSHA también tiene un impacto sobre la activación de DDR inducida por radiación ionizante ("ionizing radiation", IR) en células no senescentes en proliferación. Por tanto, los autores inactivaron DICER o DROSHA de modo transitorio mediante un agrupamiento de ARNip en fibroblastos normales humanos (HNF—WI38; figuras 12a y b), los expusieron a IR y, unas pocas horas después, los autores los tiñeron para marcadores de una DDR activada. Los autores observaron que, a pesar de no presentar niveles reducidos de expresión de proteínas (figura 12c), la formación de focos de pATM, pS/TQ, MDC1, pero no de γ H2AX, se altera en HNF con DICER o DROSHA inactivadas (figuras 1c y d). Estas observaciones pueden reproducirse usando cuatro ARNip individuales (figuras 12d-g) y en una línea celular HNF diferente (BJ, los datos no se muestran). Bajo estas condiciones (HNF con DICER o DROSHA inactivadas analizados 7 horas tras IR),
 50
 55

los autores no observaron la notable alteración de los focos de 53BP1 previamente observada en células OIS. Sin embargo, un análisis realizado en momentos anteriores (10 min después de IR) mostró una reducción significativa de la formación de focos de 53BP1 en HNF con DICER o DROSHA inactivadas (figura 13a), lo cual sugiere que la inactivación de DICER o DROSHA retrasa la formación de focos de 53BP1.

5 Para excluir los efectos en no dianas, los autores expresaron una forma resistente a ARNi de DICER en células HeLa con DICER inactivada. Los autores observaron que la reexpresión de DICER de tipo salvaje, pero no de un alelo mutante (DICER44ab) que previamente había demostrado abolir la actividad ARN endonucleasa²⁴, permite la formación de focos de DDR en un grado similar a las células de tipo salvaje, confirmando así la dependencia de DICER de los efectos observados (figuras 7b-d). Por último, los efectos observados son independientes del control traduccional de ARNm, y una inactivación de GW182 no produce un impacto significativo en la formación de focos de DDR (figuras 14a-c), lo cual resulta coherente con los resultados en células OIS (figura 10). Como control adicional, la inactivación simultánea de TNRC6A, B y C o DICER en células HeLa que expresan un ARNm indicador que codifica la proteína fluorescente roja (RFP) que porta tres sitios de unión para miR-126, utilizado como detector para la represión traduccional dependiente de microARN, mostró que la inactivación de tanto las proteínas similares a GW como de DICER producen una sobreexpresión de RFP comparable, debido a la abolición de la represión traduccional de RFP dependiente de miR-126 (figuras 15a, b y d); no obstante, solo la inactivación de DICER afecta a la estabilidad de los focos de DDR (figura 15c).

20 Para confirmar aún más la implicación de DICER en la activación de la DDR, los autores usaron una línea de células de cáncer de colon (RKO) que porta una delección genética homocigótica del exón 5 en el gen *DICER* y, por tanto, expresa un alelo hipomórfico de *DICER* (*DICER*^{exón5}); esta línea celular es defectuosa en la maduración de microARN²⁵. En células *DICER*^{exón5}-hipomórficas, el nivel de expresión de las proteínas de ATM, MDC1, 53BP1 o H2AX no se reduce (figura 16a). Sin embargo, aunque en células de tipo salvaje (WT) IR induce focos de pATM, pS/TQ, MDC1 y γ H2AX, en células *DICER*^{exón5}-hipomórficas, la formación de focos de DDR se altera (figuras 1e y f). En experimentos a lo largo del tiempo, los autores observaron que la formación de focos de 53BP1 se retrasa en células *DICER*^{exón5}-hipomórficas (figuras 16b y c). También en este sistema, los autores observaron que los focos de γ H2AX solo se ven ligeramente afectados (figuras 1e y f). Los defectos observados en las células *DICER*^{exón5}-hipomórficas pueden revertirse mediante la reintroducción de DICER de tipo salvaje, pero no de un alelo mutante de endonucleasa de DICER (DICER44ab) (figura 17). Se alcanzaron conclusiones similares en otra línea celular (HCT 116) que porta la misma delección en *DICER* (los datos no se muestran).

30 Después, los autores determinaron si la ausencia de focos de DDR observada en células con DICER o DROSHA inactivadas es debida a un defecto en la activación real de DDR o la congregación de focos de DDR. Así, los autores realizaron un conjunto de análisis de inmunotransferencia en HNF con DICER o DROSHA intervenidas y líneas celulares *DICER*^{exón5}-hipomórficas. Los análisis de los autores revelaron que la autofosforilación de ATM inducida por IR está alterada en fibroblastos con DICER o DROSHA inactivadas (figuras 18a y b) y en células RKO *DICER*^{exón5}-hipomórficas irradiadas, comparado con las células de tipo salvaje (figura 18c). Esto indica que DICER y DROSHA controlan la activación ATM y no solo su acumulación en focos. Combinados, estos resultados revelan que la inactivación de DICER o DROSHA altera la activación de DDR inducida por fuentes exógenas de daños en el ADN de una manera independiente de los represores traduccionales de ARNi canónicos (proteínas similares a GW).

La inactivación de DICER o DROSHA altera los puntos de control de daños del ADN de G1/S y G2/M.

40 Los daños en el ADN suscitan la traducción de señales de DDR que conducen a una detención del ciclo celular dependiente de punto de control en dos etapas de transición críticas: el punto de control de G1/S y el punto de control de G2/M¹. Los autores determinaron si una activación alterada de DDR en células con DICER o DROSHA inactivadas produce un impacto sobre los puntos de control de G1/S y G2/M. Para ensayar la detención dependiente del punto de control de G1/S, las células se irradiaron y se marcaron mediante pulsos con BrdU. Los autores observaron que los HNF con DICER y DROSHA inactivadas (WI38; figuras 19a y b) presentan una detención alterada de la fase G1/S inducida por radiación, comparado con células control (figura 2a), y que el grado de deficiencia del punto de control es comparable al de las células con 53BP1 intervenida, usadas como control positivo²⁶ (figuras 2a y 19c). La alteración del punto de control de G1/S se confirmó con cuatro oligonucleótidos de ARNi individuales (figuras 19d, e) y en dos líneas celulares HNF más (MRC-5 y BJ) en conjuntos distintos de experimentos (figuras 19f, g; los datos no se muestran). En coherencia con los resultados en HNF, las células *DICER*^{exón5}-hipomórficas procedentes de dos líneas celulares distintas (RKO y HCT116; figuras 2b y 20a, respectivamente) también muestran una detención de la transición G1/S alterada. Para confirmar la dependencia del punto de control de DICER en estas líneas celulares, los autores reexpresaron ADNc de DICER de tipo salvaje en células *DICER*^{exón5}-hipomórficas. En efecto, la expresión de ADNc de DICER restableció el punto de control de G1/S en ambas líneas celulares *DICER*^{exón5}-hipomórficas (figuras 2b y 20a). Después, los autores se preguntaron si la actividad RNA endonucleasa de DICER es necesaria para la activación del punto de control inducida por daños en el ADN. Con este objetivo, los autores complementaron células *DICER*^{exón5}-hipomórficas con dos mutantes de DICER diferenciados que portan la sustitución de aminoácido Asp44 a Ala44 (DICER44ab) o Glu110 a Ala110 (DICER110ab), conocidas por abolir la actividad ARN endonucleasa de DICER²⁴. Mientras que la expresión de DICER de tipo salvaje rescató el defecto de punto de control de G1/S de células *DICER*^{exón5}-hipomórficas, ambos mutantes de DICER no lo hicieron (figura 2b), a pesar de los niveles similares de expresión de DICER (figura 20b). Los autores concluyen que la actividad procesadora del ARN de DICER es necesaria para implementar el punto de

control de G1/S.

Los autores también determinaron si DICER es necesaria para detener el avance del ciclo celular en el límite del G2/M tras daños en el ADN. Así, los autores suprimieron DICER, o p53 como control positivo, en células HEK293, y los autores ensayaron la activación del punto de control de G2/M controlando el perfil de avance del ciclo celular a lo largo del tiempo mediante clasificación de células activada por fluorescencia ("Fluorescence-Activated Cell Sorting", FACS). Tal como se esperaba, las células transfectadas con el vector vacío ("empty-vector", EV) irradiadas se acumulan progresivamente en la fase G2 del ciclo celular, como consecuencia de la implementación del punto de control. De manera diferente, las células con DICER inactivada, así como con p53 inactivada, no se detuvieron tras los daños en el ADN y atravesaron la transición de G2/M (figuras 2 c y d). Este resultado fue confirmado también controlando el porcentaje de células mitóticas en células control y con DICER inactivada tras IR, basándose en la fosforilación de la histona H3 (pH3) (figuras 20c y d)²⁷. Además, el defecto en la activación del punto de control de G2/M en células con DICER inactivada puede rescatarse mediante la expresión de una construcción que expresa DICER resistente a ARNip (figuras 20e-g).

Estos resultados indican que las células con DICER inactivada son defectuosas en la activación de ambos puntos de control de G1/S y G2/M, y que la actividad procesadora del ARN de DICER es necesaria para implementar el punto de control después de daños en el ADN.

La inactivación de DICER en el pez cebra altera la activación de DDR *in vivo*.

Para estudiar si DICER es necesaria para la activación de DDR tras una irradiación en un organismo vivo, los autores ensayaron el impacto de la inactivación de DICER en larvas de *Danio rerio* (pez cebra) como sistema modelo. Se inyectaron embriones de pez cebra con oligonucleótidos de morfolino contra Dicer1. Se evaluó la eficacia de la inactivación de Dicer1 mediante la capacidad del oligonucleótido de morfolino para bloquear la maduración de microARN y, por tanto, impedir la supresión del indicador coinyectado RFP-miR-126²⁸. Además, los autores investigaron los niveles de seis microARN maduros diferentes usando QPCR para confirmar la inactivación de Dicer1. Las larvas que surgen de embriones inyectados con oligonucleótidos de morfolino contra Dicer1 muestran una expresión de RFP sobrerregulada y los defectos en el desarrollo que previamente se han indicado para larvas con Dicer1 inactivada²⁹ (figuras 21a, b), junto con niveles reducidos de microARN (figuras 21c, d). Las larvas irradiadas se tiñeron con anticuerpos contra pATM y γ H2AX. Las larvas no irradiadas no mostraron tinción o mostraron una tinción débil (figura 3). La irradiación induce una fuerte activación de pATM y γ H2AX en todas las células a través de secciones de cabezas de larvas de tipo salvaje. De modo diferente, las larvas inyectadas con Dicer1-morfolino irradiadas mostraron una notable alteración en la señal de pATM y γ H2AX (figura 3a). El impacto observado sobre γ H2AX sugiere una dependencia mayor de γ H2AX de Dicer1 en el pez cebra *in vivo*, comparado con células de mamífero cultivadas. Un análisis de inmunotransferencia de extractos de proteínas procedentes de larvas de tipo salvaje e inyectadas con Dicer1-morfolino tratadas en paralelo mostró que la alteración en la acumulación de pATM y γ H2AX está presente en todo el animal (figura 3b). La respuesta diferente a la irradiación de células con actividad Dicer1 reducida debido a una inyección de morfolino frente a células con Dicer1 competente se confirmó también en experimentos de trasplante de células recíprocos. Brevemente, células procedentes de embriones inyectados con Dicer1-morfolino y ARNm que codifica GFP fueron trasplantadas en estado de blástula a embriones no inyectados control. Las larvas quiméricas se irradiaron a los 3 días posteriores a la fertilización (dpf) y se tiñeron con anticuerpos contra γ H2AX (figura 3c). En el experimento recíproco, células control procedentes de embriones inyectados con ARNm que codifica GFP se trasplantaron en embriones inyectados con Dicer1-morfolino. Las larvas quiméricas se irradiaron como se indicó anteriormente y se tiñeron con anticuerpos contra γ H2AX. En ambos casos, las células con actividad Dicer1 reducida mostraron señales de γ H2AX reducidas, comparado con sus células vecinas con Dicer1 competente (figura 3c). Los autores concluyeron que Dicer1 es necesaria para la activación de DDR *in vivo* en larvas de pez cebra vivas.

En un sistema de células *in vitro*, los focos de DDR son sensibles a la ARNasa A, y los productos de ARN de DICER y DROSHA permiten la reformación de focos de DDR.

Los autores después buscaron un sistema experimental adecuado para el estudio de la contribución directa potencial de los productos de ARN de DICER y DROSHA en la activación de la DDR. Se ha demostrado previamente que las células de mamífero pueden aguantar una permeabilización de la membrana transitoria y un tratamiento con ARNasa. Esta estrategia permite el estudio de la contribución del ARN a la estructura de la heterocromatina y la asociación de proteínas con la cromatina^{30,31}. Por tanto, los autores utilizaron esta técnica para estudiar la contribución del ARN a la activación de la DDR. Células humanas (HeLa) expuestas a IR se permeabilizaron con un detergente suave y se trataron con la ARNasa A, una ARN nucleasa de amplia especificidad. Este tratamiento conduce a la degradación de ARN mensajeros y miARN, incluyendo los ARNm de los genes de DDR (figuras 22a, b), sin afectar significativamente a los niveles de proteínas de DDR (figura 22c). Células irradiadas tratadas con ARNasa A y no tratadas se tiñeron para los marcadores de la activación de la DDR. Los autores observaron que la degradación del ARN altera en gran medida la formación de focos de 53BP1, pATM, pS/TQ y MDC1 (figuras 4a y b). Este resultado es coherente con la sensibilidad indicada de 53BP1-GFP a un tratamiento con ribonucleasa³¹. De modo similar a las observaciones de los autores en células con DICER y DROSHA inactivadas, la acumulación de γ H2AX solo se ve ligeramente afectada por la ARNasa A (figuras 4a y b). Como cabe destacar, unas señales de γ H2AX no alteradas indican que el tratamiento con ARNasa A no altera en

gran medida la estructura de la cromatina ni la integridad nuclear. De forma intrigante, la tinción triple de 53BP1, MDC1 y γ H2AX demuestra que la ARNasa A reduce la acumulación de 53BP1 y MDC1 en focos de γ H2AX individuales, que se mantienen (figura 22d), lo cual sugiere que las moléculas de ARN actúan para favorecer la formación de focos MDC1 y 53BP1 tras la fosforilación de H2AX.

5 Los autores también advirtieron que cuando la ARNasa A es inactivada por un inhibidor de ARNasa A (RNaseOUT, un inhibidor de proteína pequeña), los focos de DDR reaparecen progresivamente en minutos. Además, los autores también observaron que la reformación de los focos puede evitarse mediante el inhibidor específico de ARN polimerasa II α -amanitina (figura 23a, b). Esto sugiere que la formación de focos de DDR depende de los productos de ARN de la ARN polimerasa II.

10 Después, los autores determinaron si los focos de DDR que se pierden después del tratamiento con ARNasa A pueden reformarse tras la adición de ARN purificado a las células tratadas con ARNasa A. Así, se lavaron células tratadas con ARNasa A irradiadas, se incubaron con RNaseOUT y α -amanitina, y se incubaron con ARN total purificado de HeLa. De modo sorprendente, los autores observaron que la adición de ARN total, pero no del ARNt usado con control, restablece con fuerza la acumulación focal de todos los factores de DDR ensayados (figura 4d, e)
15 dentro de un tiempo relativamente corto (15 minutos) a temperatura ambiente.

Puesto que IR puede inducir diferentes tipos de lesiones en el ADN, los autores expresaron la endonucleasa específica de sitio PpoI^{32,33} que genera varias DSB genómicas. También en este sistema, los autores pueden demostrar que las señales de 53BP1, pATM y pS/TQ se congregan en focos de DDR que son sensibles a un
20 tratamiento con ARNasa A y que su reformación puede inducirse mediante la adición de ARN extraído de las mismas células (figura 24). Se alcanzaron conclusiones similares cuando se emplea una forma inducible de la enzima de restricción AsiSI³⁴ (los datos no se muestran).

Después, los autores intentaron caracterizar la especie de ARN implicada en la reformación de focos de DDR mediante la incubación de células tratadas con ARNasa A con diferentes poblaciones de ARN. Para calibrar la longitud de las moléculas de ARN implicadas en la reformación de focos de DDR, los autores enriquecieron el ARN
25 total de HeLa en ARN cortos mediante una cromatografía (<200 nt; figura 25a), y los autores usaron volúmenes proporcionales de ARN total y corto para restablecer focos de DDR en células tratadas con ARNasa A. Los autores observaron que la fracción enriquecida en ARN cortos fue suficiente para restablecer los focos de pATM, pS/TQ y 53BP1, lo cual indica que esta fracción contiene las moléculas de ARN activas (figuras 25b, c). Para lograr una mejor separación por tamaño del ARN, los autores resolvieron el ARN total en un gel de poliacrilamida y recuperaron
30 ARN de diferente longitud: mayores que 100 nt, entre 100 nt y 35 nt, y entre 35 nt y 20 nt (figuras 4c y 26). Usando cantidades iguales de ARN de cada fracción, los autores observaron que solo los ARN en el intervalo de tamaño de 20-35 nt son activos para restablecer la formación de focos de DDR (figura 4c). Así, dos estrategias de separación diferentes indican que los componentes de ARN necesarios para la congregación de focos de DDR son cortos y están en el intervalo de tamaño de los productos de ARN generados por DICER y DROSHA.

35 Puesto que los autores observaron que la inactivación de DICER y DROSHA afecta a la formación de focos de DDR en células y organismos vivos, los autores razonaron que, en efecto, sus productos de ARN pequeño pueden ser responsables del restablecimiento de los focos de DDR en este sistema de células *in vitro*. Así, los autores investigaron si los productos de ARN de DICER contribuyen directamente a la formación de focos de DDR. Para ello, los autores extrajeron el ARN total de células de tipo salvaje y *DICER^{exón5}*-hipomórficas, y los autores usaron estas
40 dos preparaciones de ARN para restablecer focos de DDR en células irradiadas tratadas con ARNasa A. Se espera que las preparaciones de ARN total procedente de las dos líneas celulares tengan la misma composición, aparte de la población de productos de ARN de DICER²⁵. De modo sorprendente, aunque el ARN extraído de las células de tipo salvaje sí restablece los focos de pATM, pS/TQ o 53BP1, el ARN extraído de células *DICER^{exón5}*-hipomórficas no lo hace (figuras 4d, e). De manera importante, el ARN procedente de células *DICER^{exón5}*-hipomórficas
45 transfectadas con un vector que expresa DICER de tipo salvaje, pero no DICER mutante, permite la reformación de focos de DDR (figura 27). Estos resultados pueden reproducirse de modo cuantitativo usando preparaciones de ARN procedente de dos líneas celulares más (HCT116 y DLD1) que portan la misma mutación de DICER hipomórfica²⁵ (figura 28a) y mediante el uso de ARN extraído de células con DICER inactivada de modo transitorio (figuras 28b-d). Para determinar si también el ARN purificado de células con DROSHA inactivada es incapaz de restablecer focos de
50 DDR, los autores inactivaron DROSHA, y GFP como control, por medio de ARNip en células HeLa, purificaron el ARN y usaron estas preparaciones de ARN para intentar restablecer focos de DDR. Los experimentos de los autores revelaron que el ARN total procedente de células control siGFP restablece los focos de DDR, mientras que el ARN purificado de células con DROSHA inactivada no lo hace (figura 28e).

55 De modo global, estas observaciones son coherentes con un modelo en el que las moléculas de ARN pequeño generadas por DICER y DROSHA son necesarias para formar focos de DDR inducida por IR. Un mecanismo concebible consiste en que los productos de ARN pequeño procedentes de la actividad de DICER y DROSHA suprimen la traducción de un inhibidor de DDR hipotético. Sin embargo, la observación de que, después de un tratamiento con ARNasa A (que degrada ARNm y microARN) (figuras 22a, b) y un tratamiento con α -amanitina (que inhibe la transcripción), los ARN cortos de 20-35 nt purificados de gel estimulan la reformación de focos de DDR,
60 indica en gran medida que los productos de ARN de DICER y DROSHA controlan la DDR directa e independientemente de las dianas de ARNm potenciales y la modulación traduccional. Además, el inhibidor de la

traducción ciclohexamida no produce ningún impacto sobre la formación de focos de DDR en este sistema (los datos no se muestran). Estas conclusiones son coherentes con la observación de que la inactivación de DICER o DROSHA, pero no de proteínas similares a GW implicadas en la inhibición traduccional, tiene un impacto sobre la activación de DDR en células vivas.

5 La formación de focos de DDR en un sitio genómico dañado concreto requiere ARN específicos de sitio dañado.

Las radiaciones ionizantes inducen la formación de lesiones en el ADN que tienen una naturaleza heterogénea y una localización aleatoria. Para reducir esta diversidad, los autores estudiaron una única DSB en un locus genómico exclusivo, definido y que puede trazarse. Por tanto, los autores aprovecharon que las células de ratón NIH2/4 portan una copia integrada del sitio de restricción I-Sce I flanqueado por una matriz de sitios de unión al represor de Lac (Lac) y repeticiones Tet³⁵. En este sistema, la expresión de la enzima de restricción I-Sce I, junto con la proteína fluorescente Cherry-represor de Lac (Cherry-Lac) permite la visualización en el núcleo de la DSB específica de sitio generada por la nucleasa. En efecto, la coexpresión de I-Sce I y Cherry-represor de Lac en células NIH2/4 induce un foco de 53BP1 y γ H2AX que se solapa con una señal de Cherry-Lac focal (figura 5a). Los autores observaron que, también en este sistema, un tratamiento con ARNasa A provoca la desaparición del foco de 53BP1 de la DSB inducida por I-Sce I (figuras 5a y b) y que la α -amanitina evita la reformación del foco de 53BP1 en el mismo sitio (los datos no se muestran). Después, los autores determinaron si la readición del ARN total, después de un tratamiento con ARNasa A, restablece el foco de DDR en la lesión del ADN inducida por I-Sce I. Así, se incubaron células NIH2/4 tratadas con ARNasa A con cantidades crecientes de ARN total extraído de células tratadas en paralelo. Cuando se añade ARN a las muestras tratadas con ARNasa A, las células NIH2/4 readquieren un foco de 53BP1 brillante que se colocaliza con el Cherry-represor de Lac de una manera dependiente de la cantidad de ARN usada (figuras 5a y b). Por tanto, el mismo foco de DDR generado en una DSB concreta puede descongregarse y reorganizarse de una manera dependiente del ADN.

De modo colectivo, los resultados descritos hasta este punto demuestran que los productos de ARN corto de DICER y DROSHA controlan la formación de focos de DDR. Sin embargo, como tales, no permiten discriminar si los ARN se generan en *cis* usando el locus genómico dañado como molde, o en *trans* a partir de un locus diferenciado. Para discriminar entre estas dos posibilidades, los autores aprovecharon el hecho de que la DSB inducida por I-Sce I se genera dentro de una secuencia exógena, que no está presente en la línea celular de origen. Por tanto, los autores transfetaron I-Sce I y el Cherry-represor de Lac en células NIH2/4 y en la línea celular de origen NIH3T3, y los autores usaron ARN extraído de estas líneas celulares para intentar restablecer la formación del foco de 53BP1 en células NIH2/4 tratadas con ARNasa A que han sufrido la DSB inducida por I-Sce I: se espera que las dos preparaciones de ARN se diferencien solo en la presencia potencial de transcritos de ARN generados a partir de la construcción integrada exógena que porta las repeticiones Lac y Tet y el sitio I-Sce I. De manera emocionante, la congregación del foco de 53BP1 en la DSB inducida por I-Sce I, según es marcada por Cherry-represor de Lac, fue recuperada de modo eficaz solo por medio de la adición de ARN purificado a partir de células NIH2/4 y no por el ARN extraído de la línea celular de origen NIH3T3 (figura 5c). Este resultado indica que la formación de focos de DDR requiere un componente de ARN que surge del locus genómico dañado.

El complejo de MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) es un detector de daños en el ADN clave y un cofactor necesario del regulador de DDR apical ATM¹. Además, la formación del foco de MRE11 tras la inducción con I-Sce I es sensible a un tratamiento con ARNasa A (figura 29a). Para sondear los mecanismos moleculares de acción de los ARN en los sitios de daños en el ADN, los autores usaron mirina, un inhibidor de molécula pequeña específico de MRN³⁶ que, tal como se espera, evita la activación de ATM también después de la inducción con I-Sce I (figura 29b). Por tanto, los autores determinaron si los ARN implicados en la modulación de DDR se acoplan a MRN. Los autores observaron que, en presencia de mirina, el ARN de NIH2/4 es incapaz de inducir la reformación de focos de 53BP1 o pATM (figuras 5d y e). Este resultado demuestra que los ARN en los sitios de daños en el ADN modulan la DDR de una manera dependiente de MRN.

Para detectar ARN cortos potenciales que surgen del locus integrado, los autores aislaron ARN nuclear procedente de células NIH 3T3 de origen transfetadas con I-Sce I (simulación), células NIH 2/4 transfetadas con Cherry-represor de Lac (sin corte) y células NIH 2/4 transfetadas con I-Sce I (con corte) y después seleccionando para su longitud (<200 nt); este procedimiento enriquece en ARN activos en la reformación de focos de DDR en 40 veces (los datos no se muestran). Los bancos preparados a partir de estas muestras se secuenciaron mediante Illumina GAII-X para obtener lecturas de ADNc de 15-32 pb (figuras 30a-d). Su análisis reveló que surgen transcritos desde el locus exógeno que están ausentes en las células NIH 3T3 de origen, que tienen una distribución de la longitud de los marcadores cartografiados con un máximo en aproximadamente 22 nt, la longitud de los miARN canónicos (figura 29e). Así, incluso un locus integrado exógeno que carece de elementos reguladores transcripcionales de mamífero es transcrito y genera transcritos de ARN corto.

Para determinar si los ARN cortos identificados en el locus dañado son biológicamente activos en la activación de la DDR, los autores sintetizaron de modo químico cuatro parejas potenciales de ARN cortos, según se identifican en el locus genómico cortado mediante secuenciación de ARN corto como se describió anteriormente, y los autores las utilizaron para intentar la reformación de focos de DDR en células tratadas con ARNasa A que portan una DSB en el locus. Mediante su ensayo a través de un gran intervalo de concentraciones, los autores pudieron demostrar que la adición de estos ARN, pero no de cantidades iguales de los controles, estimula la activación de DDR específica de

sitio en el sitio dañado (figura 6a). Estos ADN cortos sintetizados de modo químico son biológicamente activos cuando se añaden a las células junto con el ARN total procedente de las células de origen (células que no portan el locus endógeno integrado; figura 6a) o con ARNt de levadura (figura 30f), por tanto, en ausencia de cualquier ARN de mamífero adicional.

5 Además, para demostrar la actividad biológica de productos de ARN de DICER generados localmente, los autores clonaron el locus y un ADN control no relacionado en un plásmido para permitir su transcripción *in vitro* por la polimerasa de T7, y los autores procesaron los ARN resultantes con proteína de DICER recombinante *in vitro*. Los ARN cortos resultantes (figura 30g) se purificaron y se ensayaron en células tratadas con ARNasa A. Los autores observaron también que estos ARN generados por DICER específicos de locus, pero no cantidades iguales de ARN control, permiten la reformación de focos de DDR cuando se mezclan con ARN procedente de las células de origen (figura 6b) y cuando se mezclan con ARNt de levadura (figura 30h). Así, los productos de ARN de DICER generados *in vitro* estimulan la reformación de focos de DDR en el sitio de daños en el ADN de una manera específica de secuencia.

10 De modo global, estos resultados indican que los ARN cortos con la secuencia del locus dañado desempeñan un papel directo en la activación de la DDR en el sitio dañado.

15 Para investigar más a fondo la naturaleza de los ARN generados en el locus, los autores realizaron experimentos de secuenciación más profundos de ARN nucleares <200 nt procedentes de muestras de NIH 2/4 de tipo salvaje antes y después del corte usando Illumina Hi seq versión 3 (figura 31). Para estudiar la biogénesis de estos ARN, los autores también secuenciaron ARN nucleares <200 nt procedentes de células NIH 2/4 tras la inactivación de Dicer o Droscha (WT sin corte, Dicer KD sin corte, Droscha KD sin corte, WT con corte, Dicer KD con corte, Droscha KD con corte) (figura 32a). Para facilitar la normalización, cada preparación de ARN se sembró con una "siembra" de ARN corto antes de la preparación del banco. Las lecturas se cartografiaron en miRBase 18 y, después de la normalización de la siembra, se demostró que se redujeron significativamente después de la inactivación de Dicer o Droscha en las muestras sin corte y con corte, cuando se compara con las muestras de tipo salvaje sin corte y con corte, respectivamente (figura 32b). Esto valida la eficacia funcional de las inactivaciones realizadas.

20 Mediante el análisis del locus, los autores descubrieron que, en las muestras de tipo salvaje, la gran mayoría de los ARN procedentes del locus se encontraban en el intervalo de tamaño de 22-23 nt (45,2% en WT sin corte, y 67,6% en el tipo salvaje con corte, figuras 6c y 33a). El ajuste de un modelo binomial negativo a los datos de recuento de secuencia y la aplicación del ensayo de proporción de probabilidad demostró que este aumento en la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en la muestra de tipo salvaje con corte es estadísticamente significativo con respecto a la muestra sin corte ($p = 0,020$) (figura 6c). Además, los autores descubrieron que la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus disminuye tras la inactivación de Dicer, en condiciones sin corte ($p = 4,8e-7$) y con corte ($p = 0,029$), lo cual sugiere que los ARN de 22-23 nt en el locus en efecto dependen de Dicer (figura 6c). La fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales en el locus también disminuyó tras la inactivación de Droscha.

30 Para excluir también que la mayoría de los marcadores que surgen del locus son productos de una degradación aleatoria, los autores compararon la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN totales en el locus con la misma fracción en loci genómicos que no son de miARN; en estos loci, es muy probable que cualquier ARN de 22-23 nt presente sea el producto de la degradación aleatoria o de un procesamiento enzimático independiente de Dicer/Droscha. Los autores descubrieron que la fracción de ARN de 22-23 nt frente a los ARN cortos totales es significativamente mayor que la fracción que se encuentra en los loci genómicos que no son miARN antes del corte ($p = 0,049$) y después del corte ($p = 0,022$, figura 33b).

35 Por último, los autores observaron que la distribución de los nucleótidos en el extremo 5' y 3' de las secuencias de ARN procedentes del locus es significativamente diferente de la distribución de nucleótidos del trasfondo genómico ($p = 0,012$ en el extremo 5', y $0,008$ en el extremo 3'), así como de la distribución de nucleótidos del trasfondo en el locus ($p = 0,014$ en el extremo 5', y $1,2e-6$ en el extremo 3'). De modo específico, 82,9% de las secuencias comienzan con una A/U, y 48,6% de las secuencias terminan con una G (figura 6d).

40 Mediante estos análisis, los autores concluyen por tanto que los ARN de 22-23 nt son la mayoría de las especies de ARN detectadas en el locus, que dependen de Dicer y, hasta cierto grado, de Droscha, y que su proporción aumenta tras los daños en el ADN. La poca probabilidad de que sean productos de la degradación aleatoria también se ve indicada por su abundancia diferencial, comparado con el resto de loci que no son miARN y el sesgo de bases 5' y 3' observado.

Los oligonucleótidos inhibidores específicos de secuencia (LNA) reducen la activación de DDR en un locus genético específico.

55 Los autores previamente han demostrado que los DDRNA identificados mediante secuenciación profunda son biológicamente activos y tiene un papel causal en la reformación de focos de DDR específica de secuencia en el sitio dañado, tras la eliminación de todos los ARN celulares mediante un tratamiento con ARNasa A (figura 6a; figura 30f).

Después los autores intentaron determinar si las funciones de DDRNA pueden ser inactivadas en células vivas mediante ácidos nucleicos bloqueados específicos de secuencia ("Locked Nucleic Acids", LNA, oligonucleótidos de ADN modificados que se unen con avidéz e inactivan especies de ARN complementarias) (Jepsen *et al.*, Oligonucleotides, 2004; Machlin *et al.*, Curr. Gene Ther., 2012).

- 5 Así, los autores obtuvieron 4 moléculas de LNA sintetizadas (Exiqon) con su secuencia totalmente complementaria con los DDRNA individuales que previamente habían demostrado ser biológicamente activos y ser capaces de restablecer la señalización de DDR y la formación de focos en células tratadas con ARNasa A (figura 6a; figura 30f). Dada la estructura de secuencia de ADN repetitiva del locus, es probable que se también se asocien a otros DDRNA generados en el locus (figura 34a).
- 10 Células que portan el locus integrado se cotransfectaron con vectores que expresan Cherry-Lac y la endonucleasa de restricción I-Sce I y sin LNA (muestra 1), LNA control que porta una secuencia no relacionada que no es parte del locus (muestra 2) o diferentes conjuntos de LNA (muestras 3-7) (figura 34b). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se fijaron y se tiñeron para marcadores de DDR. Los autores analizaron las muestras con un microscopio confocal, y las células que mostraron una señal de DDR en el locus se puntuaron como positivas. Tal como se muestra en la figura 34b, la porción de células que muestra un foco de γ H2AX específico que se colocaliza con la señal de Cherry-Lac no se vio significativamente afectada por la transfección de ningún LNA. Esto resulta coherente con los datos de los autores que demuestran que cualquier alteración de la biogénesis de los DDRNA o la eliminación de los ARN mediante un tratamiento con ARNasa A no produce un impacto significativo sobre γ H2AX (figura 1; figura 4a,b,d,e; figura 5a). De manera diferente, la acumulación de 53BP1 en el locus, un marcador de la DDR activada, se reduce significativamente tras la transfección de LNA con la secuencia que se corresponde con los DDRNA (muestras 3-6), comparado con el LNA control (muestra 2) o el mismo LNA inactivado (muestra 7; figura 34c). Los LNA fueron inactivados asociándolos entre sí *in vitro* antes de la transfección, haciendo así que no puedan unirse e interferir con la acción de otros ácidos nucleicos complementarios. La disminución en la acumulación de 53BP1 se observó, en diferentes grados, con los cuatro conjuntos de LNA ensayados (muestras 3-6). En resumen, estos resultados demuestran que los LNA específicos de secuencia pueden inactivar específicamente las funciones biológicas conocidas de los DDRNA.

Oligonucleótidos inhibidores específicos de secuencia (concretamente, LNA) con una secuencia telomérica reducen la activación de DDR en telómeros disfuncionales.

- 30 Los autores demostraron previamente que los ARN cortos con la secuencia de un locus dañado (denominados DDRNA) son necesarios para la activación y el mantenimiento de la DDR específicamente en ese locus, tras radiaciones ionizantes o ruptura con endonucleasas (figuras 4,5). Sin embargo, nada se sabe del papel de los DDRNA en los telómeros. Los telómeros son el final de los cromosomas lineales y están protegidos por un complejo de proteínas denominado shelterina (de Lange, Genes Dev., 2005). La retirada de esta protección provoca el desbloqueo de los telómeros, y así los telómeros son reconocidos como DSB del ADN. Esto puede conducir a la activación de la DDR, la senescencia celular, fusiones cromosómicas e inestabilidad del genoma (Sfeir y de Lange, Science, 2012).

- 40 Para investigar el papel de los DDRNA en telómeros disfuncionales, los autores usaron fibroblastos embrionarios de ratón ("mouse embryonic fibroblasts", MEF) CRE-ER TRF2^{flox/flox} (Lazzerini Denchi y de Lange, Nature, 2007). Se cultivaron células en presencia de 4-hidroxitamoxifeno para inducir la localización de la cre recombinasa en el núcleo, generando así una línea celular con TRF2 inactivado (TRF2^{-/-}). TRF2 es uno de los componentes de la shelterina y su retirada induce una fuerte activación de DDR en los telómeros (Lazzerini Denchi y de Lange, Nature, 2007). Para ensayar el papel de los DDRNA en los telómeros, se trataron MEF TRF2^{-/-} con ARNasa A o BSA como control. En coherencia con los resultados previos de los autores, se observó que los focos de γ H2AX resisten, mientras que los focos de 53BP1 son sensibles al tratamiento con ARNasa A (figuras 35a-b). Esto sugiere que, al igual que todas las demás lesiones de DSB, también en los telómeros no bloqueados, se generan DDRNA con una secuencia telomérica y estos son necesarios para la activación de la cascada de DDR.

- 50 Las células pueden acumular telómeros dañados durante el envejecimiento debido al acortamiento telomérico (Harley, Nature, 1990; Herbig, Mol. Cell., 2004; d'Adda di Fagagna, Nature, 2003) o a daños en el ADN endógenos o exógenos que se producen en los telómeros. Los daños en el ADN se acumulan y la señalización de DDR persiste en los telómeros puesto que no pueden repararse (Fumagalli, Nat. Cell. Biol., 2012). En ambos casos, esta activación de la DDR persistente en los telómeros conduce a la senescencia celular. Si los DDRNA son necesarios para la DDR en los telómeros dañados, la inhibición de su acción puede suprimir la activación de DDR y potencialmente prevenir o revertir el fenotipo de senescencia. Para ensayar esta hipótesis, los autores usaron una línea celular humana, las células de fibrosarcoma T19, que expresan un alelo dominante negativo (DN) inducible de TRF2 marcado con marcador (Flag) (van Steensel, Cell, 1998). La expresión de este alelo se induce cultivando células en ausencia de doxiciclina. Después de 7-8 días de expresión de DN TRF2, los telómeros son disfuncionales, y las células muestran una fuerte activación de DDR en los telómeros (los datos no se muestran; van Steensel, Cell, 1998). Las células inducidas, en las que se expresa Flag-DN TRF2, son positivas a la inmunotinción de Flag (Flag+). En el día 13 desde la inducción, los autores transfectaron células T19 con moléculas de LNA con secuencias complementarias a cualquiera de las hebras de las repeticiones de ADN teloméricas (LNA 5 y 6) o una secuencia no relacionada como control (LNA 3, Cntrl). Los autores observaron que, con el tiempo, en células Flag+,

ambos LNA transfectados individualmente con secuencias teloméricas disminuyen el porcentaje de células positivas a 53BP1, en un grado diferente, mientras que el LNA control no produce ningún efecto (figura 36a). De manera importante, en células no dañadas no inducidas (Flag-), las moléculas de LNA no inducen ningún daño en el ADN, excluyendo que pueden ser genotóxicas *per se*. Además, los autores controlaron el paso a través de la fase S del ciclo celular, observando la incorporación de BrdU en células T19 inducidas, tres días después de la transfección de LNA. Los autores observaron que las células Flag+, transfectadas con LNA teloméricos, proliferan significativamente más que las células control (figura 36b), lo cual sugiere que los LNA, mediante la inactivación de la DDR en los telómeros, pueden estimular la reentrada en el ciclo celular de células que, en otro caso, activarían un punto de control de daños en el ADN y reducirían la incorporación de BrdU. Por contraste, no existe una diferencia significativa en células Flag- (figura 36c).

En este caso, los autores demuestran que diferentes fuentes de daños en el ADN, que incluyen el estrés oncogénico, la radiación ionizante y las endonucleasas Ppol o I-Sce I, se acoplan a la DDR de una manera dependiente de los productos de ARN de DICER y DROSHA. Estos ARN que regulan la DDR (DDRNA) controlan la formación y el mantenimiento de focos de DDR, la implementación de puntos de control y la senescencia celular. Esto se produce en células humanas cultivadas y en células de ratón, y en diferentes tipos de células en embriones de pez cebra vivos.

La activación de oncogenes puede activar la DDR, y la senescencia celular inducida por DDR actúa como mecanismo supresor de tumor^{2,37}. La inactivación de DICER potencia el desarrollo de tumores en un modelo de ratón inducido por K-Ras de cáncer de pulmón^{38,39}, y la inactivación de diversos componentes de los complejos de DICER y DROSHA estimula la transformación de células y la tumorigénesis³⁸. En fechas más recientes, se han descrito mutaciones de DICER y TARBP2, un cofactor de DICER que afecta a su estabilidad, en carcinomas humanos^{40,41}. Sin embargo, se ha indicado que microARN individuales estimulan y reducen la proliferación celular regulando la estabilidad y la traducción de ARNm que codifican proteínas con diferentes papeles en la proliferación celular¹⁸: por tanto, en la actualidad no está claro cómo la inactivación del aparato de ARNi favorece la tumorigénesis. A la luz de los nuevos descubrimientos de los inventores que apuntan al papel de los DDRNA en el control de la DDR, un mecanismo supresor de tumor conocido³⁷, resulta tentador sugerir que, además de sus funciones bien caracterizadas en la modulación de la expresión de genes, los productos de ARN de DICER y DROSHA pueden reprimir la proliferación de células cancerosas sosteniendo la activación de la DDR, y esto genera la presión selectiva para la inactivación de factores implicados en su biogénesis.

Los autores también indican que, en un sistema celular *in vitro*, los focos de DDR se pierden en células irradiadas después de un tratamiento con ARNasa A, y que los DDRNA específicos de sitio, incluso si se generan mediante síntesis química o tras la ruptura *in vitro* por DICER recombinante, son necesarios para restablecerlos. Esto sugiere que los DDRNA se generan localmente y favorecen la congregación de factores de DDR en la forma de focos de DDR detectables en el sitio de los daños en el ADN. En efecto, la secuenciación del ARN confirmó la presencia de ARN cortos que surgen del locus exógeno integrado, que son inducidos tras el corte. La comparación con los ARN cortos generados en otros loci genómicos que no son miARN indica que son diferentes de los productos de la degradación del ARN, y su sesgo de nucleótidos en el extremo 5' y en el extremo 3' indica que estos ARN se procesan en sitios precursores de ARN preferentes.

Aunque en la actualidad aún no ha aclarado totalmente la forma en los DDRNA actúa para controlar la activación de la DDR, la observación de que actúan de una manera dependiente del complejo de MRN los coloca corriente arriba de la cascada de señalización de DDR canónica.

Aunque son nuevos y no previstos, los resultados de los autores son coherentes con las pruebas que están surgiendo que apoyan el papel de las moléculas del ARN en la DDR. En efecto, un mapa de epistasis generado en levaduras de fisión ha demostrado recientemente que los componentes de DDR muestran interacciones genéticas con la maquinaria del ARNi⁵⁶, y se han identificado componentes del complejo de DROSHA grande en un ensayo de selección de fosfoproteoma dependiente de ATM⁵⁷. En *Drosophila*, la integridad del ADN repetido depende de la vía del ARNi⁵⁸. En *Saccharomyces cerevisiae* y en *Oxytricha trifallax*, el ARN orquesta la recombinación, y el ARN puede actuar como molde para acontecimientos de reparación del ADN en *S. cerevisiae*^{59,60,61}. También resulta intrigante observar que, al igual que varios factores de DDR que son inactivados en una fase temprana de la apoptosis para evitar la activación de DDR⁶², también DICER es roto específicamente por caspasas durante la apoptosis⁶³. En fechas recientes, se ha demostrado que ATM modula directamente la biogénesis de los productos de ARN de DICER y DROSHA mediante la fosforilación de KSRP⁶⁴.

Por último, merece advertirse que las nuevas funciones descritas en la presente de los componentes de la maquinaria del ARNi en la modulación de la respuesta a los daños en el ADN son coherentes con su papel bien establecido y conservado evolutivamente de preservar la integridad del genoma frente a invasores víricos, transposones y retroelementos⁶⁵.

Referencias bibliográficas

1. Jackson, S. P. y Bartek, J., *Nature*, 461, 1071-1078 (2009).

2. d'Adda di Fagagna, F., *Nat. Rev. Cancer.*, 8, 512-522 (2008).
3. Clark, M. B. *et al.*, *PLoS biology*, 9, e1000625; análisis e1001102, doi:10.1371/journal.pbio.1000625 (2011).
4. Wilusz, J. E., Sunwoo, H. y Spector, D. L., *Genes Dev.*, 23, 1494-1504 (2009).
5. Guttman, M. *et al.*, *Nature*, 458, 223-227 (2009).
6. Drinnenberg, I. A. *et al.*, *Science*, 326, 544-550 (2009).
7. Clemson, C. M. *et al.*, *Mol. Cell.*, 33, 717-726 (2009).
8. Wutz, A., *Bioessays*, 25, 434-442 (2003).
9. Orom, U. A. *et al.*, *Cell*, 143, 46-58 (2010).
10. Wang, X. *et al.*, *Nature*, 454, 126-130 (2008).
11. Zhao, J., *et al.*, *Science*, 322, 750-756 (2008).
12. Calabrese, J. M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18097-18102 (2007).
13. Sun, B. K., Deaton, A. M. y Lee, J. T., *Mol. Cell.*, 21, 617-628 (2006).
14. Berezikov, E., *Nature reviews, Genetics*, 12, 846-860 (2011).
15. Farazi, T. A., Juranek, S. A. y Tuschl, T., *Development*, 135, 1201-1214 (2008).
16. Lee, H. C. *et al.*, *Nature*, 459, 274-277 (2009).
17. Kim, V. N., Han, J. y Siomi, M. C., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 10, 126-139 (2009).
18. Esquela-Kerscher, A. y Slack, F. J., *Nat. Rev. Cancer*, 6, 259-269 (2006).
19. He, L., He, X., Lowe, S. W. y Hannon, G. J., *Nat. Rev. Cancer*, 7, 819-822 (2007).
20. Di Micco, R. *et al.*, *Nature*, 444, 638-642 (2006).
21. Bartkova, J. *et al.*, *Nature*, 444, 633-637 (2006).
22. Narita, M. *et al.*, *Cell*, 113, 703-716 (2003).
23. White, S. A. y Allshire, R. C., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 320, 157-183 (2008).
24. Zhang, H., *et al.*, *Cell*, 118, 57-68 (2004).
25. Cummins, J. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 3687-3692 (2006).
26. Cescutti, R., *et al.*, *Embo J.*, 29, 3723-3732 (2010).
27. Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A. y Allis, C. D., *Cell*, 97, 99-109 (1999).
28. Nicoli, S. *et al.*, *Nature*, 464, 1196-1200 (2010).
29. Wienholds, E., *et al.*, *Nat. Genet.*, 35, 217-218 (2003).
30. Maison, C. *et al.*, *Nat. Genet.*, 30, 329-334 (2002).
31. Pryde, F. *et al.*, *J. Cell. Sci.*, 118, 2043-2055 (2005).
32. Flick, K. E., *et al.*, *Nature*, 394, 96-101 (1998).
33. Berkovich, E., *Nat. Cell. Biol.*, 9, 683-690 (2007).
34. Iacovoni, J. S. *et al.*, *Embo J.*, 29, 1446-1457 (2010).
35. Soutoglou, E. *et al.*, *Nat. Cell. Biol.*, 9, 675-682 (2007).
36. Dupre, A. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 4, 119-125 (2008).
37. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. y Bartek, J., *Science*, 319, 1352-1355 (2008).
38. Kumar, M. S., *et al.*, *Nat. Genet.*, 39, 673-677 (2007).

39. Kumar, M. S. *et al.*, *Genes Dev.*, 23, 2700-4 (2009).
40. Hill, D. A. *et al.*, *Science*, 325, 965 (2009).
41. Melo, S. A. *et al.*, *Nat. Genet.*, 41, 365-370 (2009).
42. Mudhasani, R. *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 181, 1055-1063 (2008).
- 5 43. Tang, K. F. *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 182, 233-239 (2008).
44. Kumar, M. S. *et al.*, *Genes Dev.*, 23, 2700-2704 (2009).
50. Muchardt, C. *et al.*, *EMBO Rep.*, 3, 975-981 (2002).
51. Eskeland, R., Eberharter, A. e Imhof, A., *Mol. Cell. Biol.*, 27, 453-465 (2007).
52. Ayoub, N., *et al.*, *Nature*, 453, 682-686 (2008).
- 10 53. Murga, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 178, 1101-1108 (2007).
54. Bakkenist, C. J. y Kastan, M. B., *Nature*, 421, 499-506 (2003).
55. Goodarzi, A. A. *et al.*, *Mol. Cell.*, 31, 167-177 (2008).
56. Roguev, A. *et al.*, *Science*, 322, 405-410 (2008).
57. Bensimon, A. *et al.*, *Sci. Signal.*, 3, rs3 (2010).
- 15 58. Peng, J. C. y Karpen, G. H., *Nat. Cell. Biol.*, 9, 25-35 (2007).
59. Derr, L. K. y Strathern, J. N., *Nature*, 361, 170-173 (1993).
60. Nowacki, M. *et al.*, *Nature*, 451, 153-158 (2008).
61. Storici, F., *et al.*, *Nature*, 447, 338-341 (2007).
62. Smith, G. C., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6076-6084 (1999).
- 20 63. Ghodgaonkar, M. M. *et al.*, *Cell Death Differ.*, 16, 858-868 (2009).
64. Zhang, X., Wan, G., Berger, F. G., He, X. y Lu, X., *Mol. Cell.*, 41, 371-383 (2011).
65. Hannon, G. J., RNA interference, *Nature*, 418, 244-251 (2002).
66. Duchaine, T. F. *et al.*, *Cell*, 124, 343-354 (2006).
67. Sidi, S. *et al.*, *Cell*, 133, 864-877 (2008).
- 25 68. Kawano, M. *et al.*, *Biotechniques*, 49, 751-755 (2010).
69. Jepsen J. S., Sorensen M. D., y Wengel J. (2004), *Oligonucleotides*, 14(2):130-46.
- 70- Machlin E. S., Sarnow P., y Sagan S. M. (2012), *Curr. Gene. Ther.*, 12(4):301-6.
71. Lazzerini Denchi, E. y de Lange T. (2007), *Nature*, 448, 1068-1071.
72. van Steensel B., Smogorzewska A. y de Lange T. (1998), *Cell*, 92 (3), 401-413.
- 30 73. de Lange T (2005), *Gen. Dev.*, 19 (18), 2100-2110.
74. Sfeir A. *et al.* (2009), *Cell*, 138 (1), 90-103.
75. Harley C. B., Futcher A. B. y Greider C. W. (1990), *Nature*, 345, 458-460.
76. Herbig U., *et al.* (2004), *Mol. Cell.*, 14, 501-513.
77. d'Adda di Fagagna F *et al.* (2003), *Nature*, 426, 194-198.
- 35 78. Fumagalli, M. *et al.* (2012), *Nat. Cell. Biol.*, 14, 355-365.
79. Michalik, K. M. *et al.* (2012), *Nucleic Acid Res.*, 40:9596-603.
80. Limmer K., Aschenbrenner D., Gaub H. E. (2013), *Nucleic Acids Res.*, 41(6):e69.

81. Wei *et al.* (2012), *Cell*, 149(1):101-12.
 82. Blazkova H. *et al.* (2010), *J. Cell. Mol. Med.*, enero de 2010, 14(1-2):357-67.
 83. Anglana M. *et al.* (1999), *Nucleic Acids Res.*, 1 de noviembre de 1999, 27(21):4276-81.
 84. Serrano M. *et al.* (2007), *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, septiembre, 8(9):715-22.
 5 85. Calado R. T. *et al.* (2009), *N. Engl. J. Med.*, 361:2353-2365.

Listado de secuencias

- <110> Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare-IFOM
 d'Adda di Fagagna, Fabrizio
 Michelini, Flavia
 10 Rossiello, Francesca
 Francia, Sofía
- <120> PRODUCTOS DE ARN Y USOS DE LOS MISMOS
- 15 <130> PCT 120246
- <150> US61/645285
 <151> 2012-05-10
- 20 <160> 62
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 25 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 30 <223> sintético
 <400> 1
 ccggccacac atctcaaga cctaactcga gttaagtctt gaagatgtgt ggTTTTG 58
- <210> 2
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 40 <223> sintético
 <400> 2
 agtagattac cactggagtc tt 22
- <210> 3
 45 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 50 <223> sintético
 <400> 3
 ccgggcctca cttgacctga agtatctcga gatacttcag gtcaagtgag gctTTTT 57
- <210> 4
 55 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 60 <223> sintético

ES 2 754 309 T3

<400> 4
ccggcctgga atatgtccac actttctcga gaaagtgtgg acatattcca ggtttttg 58

5 <210> 5
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintético
<400> 5
gagagcagau gaucuuua 19

15 <210> 6
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sintético
<400> 6
ggacaagucu cucagcuau 19

25 <210> 7
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> sintético
<400> 7
gauaucagcu uagacaau 19

35 <210> 8
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> sintético
<400> 8
ggacagaacc cgcagauuu 19

45 <210> 9
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> sintético
<400> 9
gaauguugcu uucugaau 19

55 <210> 10
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> sintético
<400> 10
agacagaau cccaaaua 19

65 <210> 11
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 5 <400> 11
 uauaucaccu guuuguuag 19
 <210> 12
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 15 <400> 12
 aggaggagcu ugggccuuu 19
 <210> 13
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 25 <400> 13
 uaaaguagcu ggaaugaug 19
 <210> 14
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 35 <400> 14
 ggaagaggcu gacuaugaa 19
 <210> 15
 <211> 19
 40 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 45 <400> 15
 gaauaucgau ccuauguuc 19
 <210> 16
 <211> 19
 50 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 55 <400> 16
 gauccuaugu ucaaucuaa 19
 <210> 17
 <211> 19
 60 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 65 <400> 17
 caacauagac uacacgauu 19

<210> 18
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 <400> 18
 10 ccaacucccu cgaggauua 19

 <210> 19
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 <400> 19
 20 ggccaacugu uauagaua 19

 <210> 20
 <211> 19
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 <400> 20
 30 gaguaggcuu cgugacuua 19

 <210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 <400> 21
 40 gaaaugcucu gguccgcuua 19

 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 <400> 22
 50 gccuaauau uggugauua 19

 <210> 23
 <211> 19
 <212> ARN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 <400> 23
 60 gcacugcccu gauccgaua 19

 <210> 24
 <211> 19
 <212> ARN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético
<400> 24
ggauuaagu cgucgucau 19
5
<210> 25
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> sintético
<400> 25
cuauuaaccu cgccaauua 19
15
<210> 26
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> sintético
<400> 26
gguaaguccu ccuugaug 19
25
<210> 27
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
30
<220>
<223> sintético
<400> 27
ccgugaaagu uuaacguuu 19
35
<210> 28
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
40
<220>
<223> sintético
<400> 28
aacacuuguc acuacuuucu c 21
45
<210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> sintético
<400> 29
caucuaucc ucuagaggau gtt 23
55
<210> 30
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60
<220>
<223> sintético
<400> 30
ttguaagaua ggagaucucc uac 23
65
<210> 31

- <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> sintético
 <400> 31
 ttcatgtgg gagcagac 18
- 10 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> sintético
 <400> 32
 cagcagtttc tccagagc 18
- 20 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> sintético
 <400> 33
 agcaacacag agatctcaaa catt 24
- 30 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> sintético
 <400> 34
 gcaaagcagg gctttcat 19
- 40 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> sintético
 <400> 35
 tgtccagga agaccaggtt 20
- 50 <210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
 <223> sintético
 <400> 36
 actatccctc aaacactctg gaa 23
- 60 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
 <223> sintético

<400> 37
 ggcccgagag cctttatag 20

5 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético
 <400> 38
 tgcacagtc taactctcc ac 22

15 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintético
 <400> 39
 cagccagtca gaaagcagtg 20

25 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintético
 <400> 40
 tgtgagtcca ggatctgcta ctt 23

35 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> sintético
 <400> 41
 gcaaggaatg gactctgagc 20

45 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> sintético
 <400> 42
 ggggacttcg atactctct c 21

55 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintético
 <400> 43
 cgtctctaga aaggtcttac aagaa 25

65 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 5 <400> 44
 ggctcaggag caactggtaa 20
 <210> 45
 <211> 24
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 15 <400> 45
 auaacaauuu guggaauucg gcgc 24
 <210> 46
 <211> 22
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 25 <400> 46
 cgaaauccac aaauuguuau cc 22
 <210> 47
 <211> 32
 30 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 35 <400> 47
 auuuguggaa uucggcgccu cuagagucga gg 32
 <210> 48
 <211> 17
 40 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 45 <400> 48
 ccucgacucu agaggcg 17
 <210> 49
 <211> 30
 50 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 55 <400> 49
 agcggauaac aaauuguggc cacaugugga 30
 <210> 50
 <211> 17
 60 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 65 <400> 50
 uguggccaca aaauuguu 17

ES 2 754 309 T3

<210> 51
 <211> 32
 <212> ARN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 51
 10 acucccuauc agugauagag aaaagugaaa gu 32

<210> 52
 <211> 32
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 52
 20 cuuucacuuu ucucuaucac ugauaggag ug 32

<210> 53
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 53
 30 guucagcgug uccggcgagu u 21

<210> 54
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 54
 40 cucgccggac acgcugaacu u 21

<210> 55
 <211> 73
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 55
 gcattattac tcacggtagc aataaggcat tattactcac ggtacgaata aggcattatt 60

50 actcacggtg cga 73

<210> 56
 <211> 73
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 56
 cgtaataatg agtgccatgc ttattccgta ataatgagtg ccatgcttat tccgtaataa 60

60 tgagtgccat gct 73

<210> 57

<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> sintético
<400> 57
ttatccgctc acaattccac a las 22

10 <210> 58
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> sintético
<400> 58
atgtggaatt gtagcgat aa 22

20 <210> 59
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> sintético
<400> 59
actgataggg agtggtaaac t 21

30 <210> 60
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> sintético
<400> 60
agagaaaagt gaaagtcgag t 21

40 <210> 61
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> sintético
<400> 61
ccctaaccct aaccctaacc c 21

50 <210> 62
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> sintético
<400> 62
gggttaggt taggtagg g 21

60

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para inhibir la respuesta de daños en el ADN en una célula de mamífero dañada en al menos un locus genómico de secuencia específica, en el que los daños en el ADN se producen en los telómeros y/o son provocados por una ADN endonucleasa específica de secuencia, en el que el método comprende inhibir la función y/o alterar la producción de ARN pequeños (DDRNA), dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción, en el que la inhibición de la función de los DDRNA y/o la alteración en su producción se realiza por medio de un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia que se une específicamente a dichos ARN pequeños (DDRNA).
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de exponer dicha célula a un tratamiento de daños en el ADN.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el tratamiento de daños en el ADN pertenece al grupo de: radioterapia, quimioterapia, por ejemplo, tratamiento con hidroxurea o tratamiento con bleomicina, un tratamiento que altera la reparación del ADN o cualquier tratamiento genotóxico.
4. Un método *in vitro* para sensibilizar una célula de mamífero frente a los daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica, en el que los daños en el ADN se producen en los telómeros y/o son provocados por una ADN endonucleasa específica de secuencia, en el que el método comprende:
- a) inhibir la función y/o alterar la producción de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción, en el que la inhibición de la función de los DDRNA y/o la alteración en su producción se realiza por medio de un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia que se une específicamente a dichos ARN pequeños (DDRNA);
- b) exponer dicha célula a una cantidad eficaz del tratamiento de daños en el ADN,
- en el que la etapa a) y la etapa b) se realizan en cualquier orden.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el tratamiento de daños en el ADN es una radioterapia.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la célula de mamífero es dañada por un acontecimiento genotóxico, preferiblemente el acontecimiento genotóxico pertenece al grupo de transformación de células, senescencia celular, activación de oncogenes, estrés de replicación del ADN, especies de oxígeno reactivas, radiación ionizante, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo bleomicina, o acortamiento de los telómeros, telómeros dañados, telómeros disfuncionales, integración vírica en el genoma, infección vírica, o infección bacteriana.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el oligonucleótido inhibidor de secuencia específica es una molécula de LNA, un oligonucleótido modificado con 2'-O-metilo o un oligonucleótido modificado con fosforotioato.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la célula de mamífero es una célula humana, preferiblemente la célula es una célula precancerosa, una célula de cáncer, una célula senescente o una célula infectada por un virus, preferiblemente la célula senescente presenta telómeros críticamente cortos y/o dañados y/o disfuncionales.
9. Un inhibidor de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado tras dañar el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica en una célula, en el que dichos daños del ADN se producen en los telómeros y/o están provocados por una ADN endonucleasa específica de secuencia, en el que dicho transcrito de ARN se sintetiza usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción, en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido inhibidor específico de secuencia que se une específicamente a dichos ARN pequeños (DDRNA), para su uso como un medicamento.
10. El inhibidor para su uso según la reivindicación 9 para el tratamiento de un trastorno inducido por el locus genómico dañado de secuencia específica, preferiblemente el trastorno es cáncer y/o envejecimiento y/o una infección vírica, preferiblemente el envejecimiento está asociado con telómeros críticamente cortos y/o dañados y/o disfuncionales.
11. El inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 que es una molécula de LNA, un oligonucleótido modificado con 2'-O-metilo o un oligonucleótido modificado con fosforotioato.
12. El inhibidor para su uso según la reivindicación 9, en el que el oligonucleótido inhibe la respuesta de daños en el ADN en la célula en el locus genómico de secuencia específica dañado.

13. El inhibidor para su uso según la reivindicación 9, en el que el inhibidor sensibiliza la célula frente al efecto de un tratamiento para dañar el ADN, y dicho uso comprende además la etapa de exponer dicha célula a una cantidad eficaz del tratamiento para dañar el ADN.
- 5 14. Una composición farmacéutica que comprende el inhibidor según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, para su uso como un medicamento.
- 15.- Un método para detectar la presencia de daños en el ADN en un locus genómico de secuencia específica en una célula, que comprende las etapas de:
- 10 a) detectar la presencia de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en dicha célula;
- b) comparar el resultado con una célula control con un locus genómico de ADN sin dañar.
16. Un método para identificar la localización genómica de daños en el ADN en un locus genómico de secuencia específica en una célula, que comprende las etapas de:
- 15 a) aislar y/o purificar ARN pequeños (DDRNA) a partir de una muestra, y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en dicha célula;
- b) secuenciar dichos ARN pequeños (DDRNA) aislados y/o purificados.
17. Un método *in vivo* para cuantificar los daños en el ADN en un locus genómico específico en una célula, o un método *in vitro* para el diagnóstico y/o la prognosis de un trastorno asociado con y/o inducido por la generación de daños en el ADN en al menos un locus genómico específico de secuencia, o un método *in vitro* para controlar la eficacia de una terapia dirigida a un trastorno asociado con y/o inducido por la generación de daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica en un sujeto, que comprende las etapas de:
- 20 a) medir la cantidad de ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en dicha célula;
- 25 b) comparar el resultado con un control apropiado.
18. El método según la reivindicación 17, en el que el trastorno asociado con y/o inducido por la generación de daños en el ADN en al menos un locus genómico de secuencia específica se selecciona del grupo que consiste en: cáncer, envejecimiento, infección vírica, preferiblemente el envejecimiento se asocia con telómeros críticamente cortos y/o dañados y/o disfuncionales.
- 30 19. Un método para seleccionar un agente capaz de inhibir ARN pequeños (DDRNA), y dichos ARN pequeños son generados en cis mediante el procesamiento con DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN sintetizado usando el locus genómico dañado específico como molde para la transcripción en una célula, que comprende la etapa de medir la cantidad de dichos ARN pequeños tras la exposición de la célula a dicho agente, y comparar con un control apropiado.
- 35

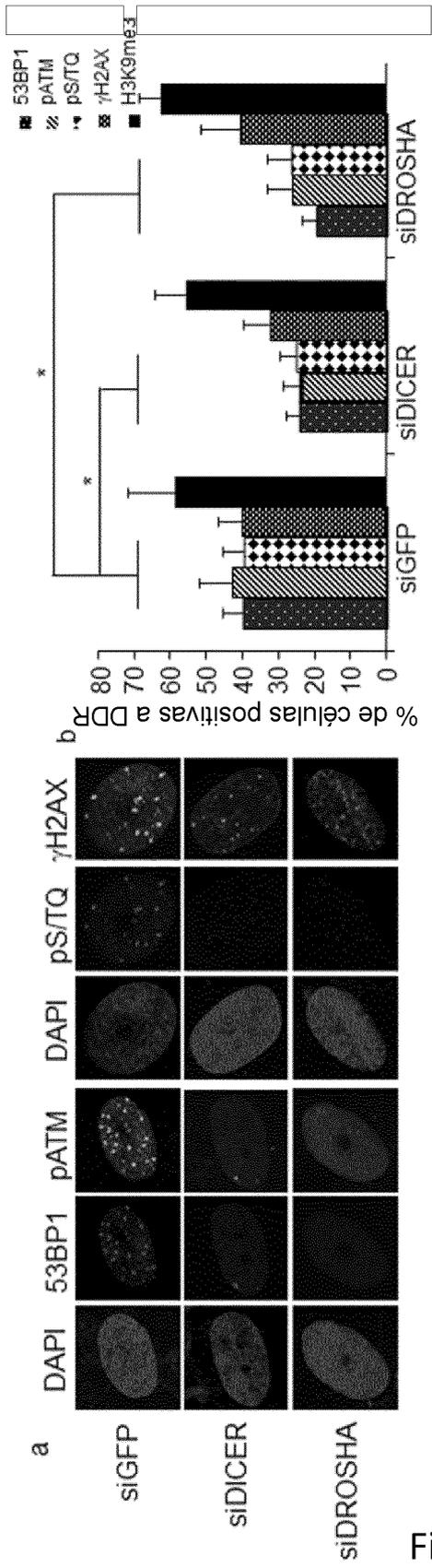
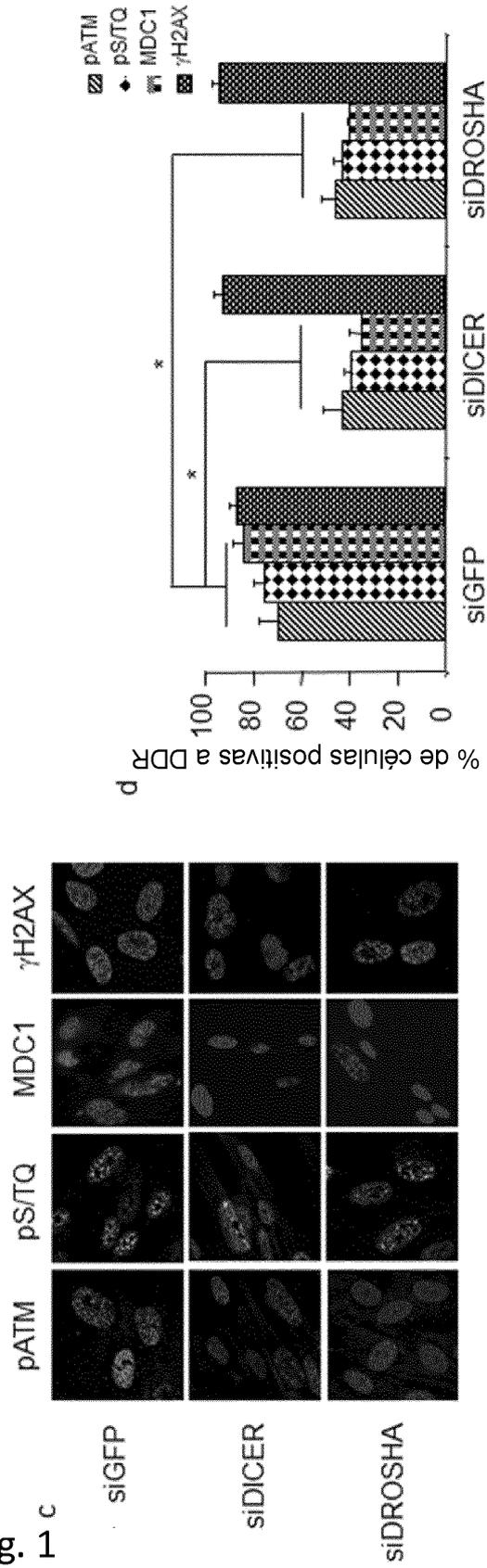


Fig. 1 c



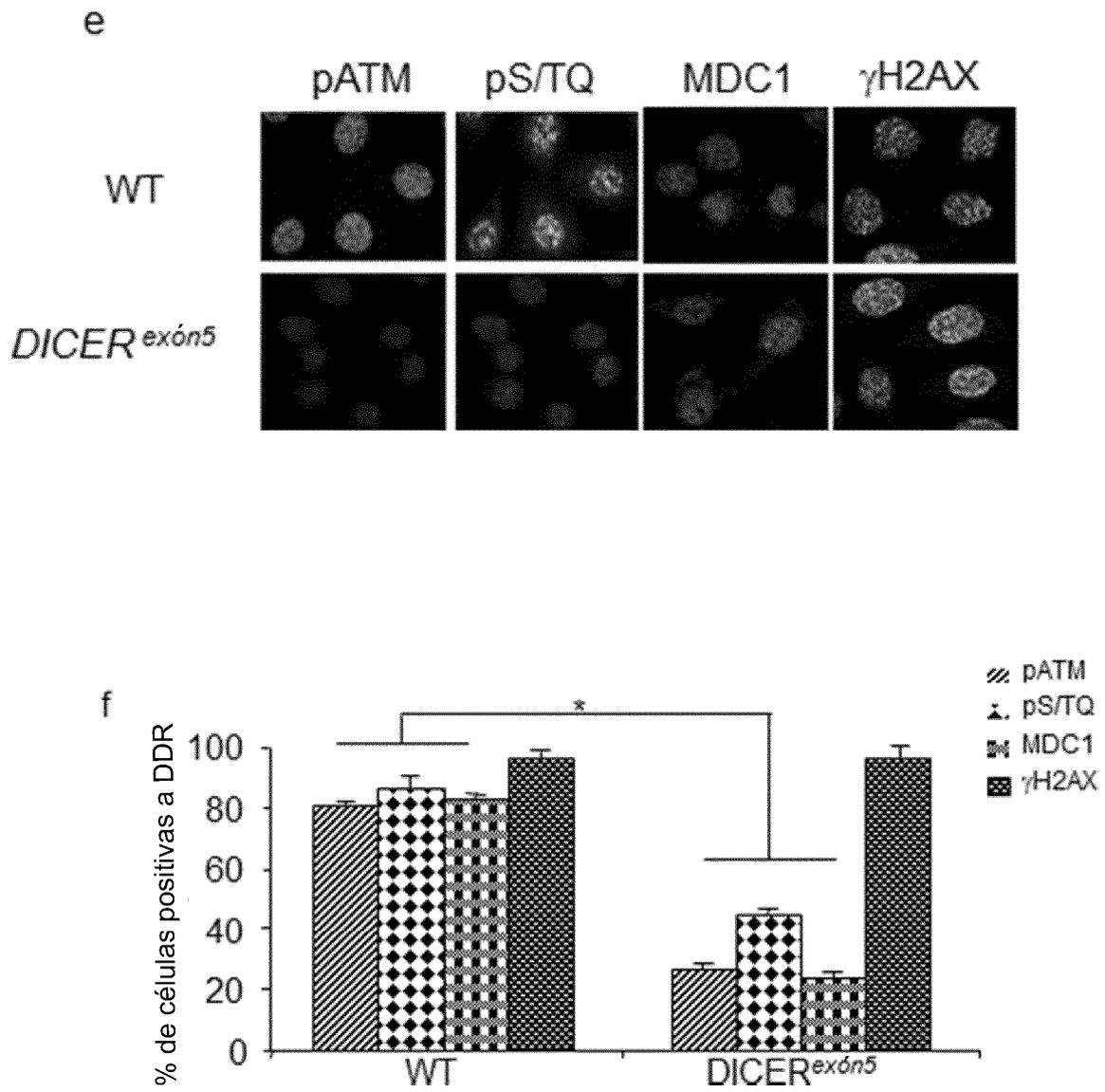


Fig. 1

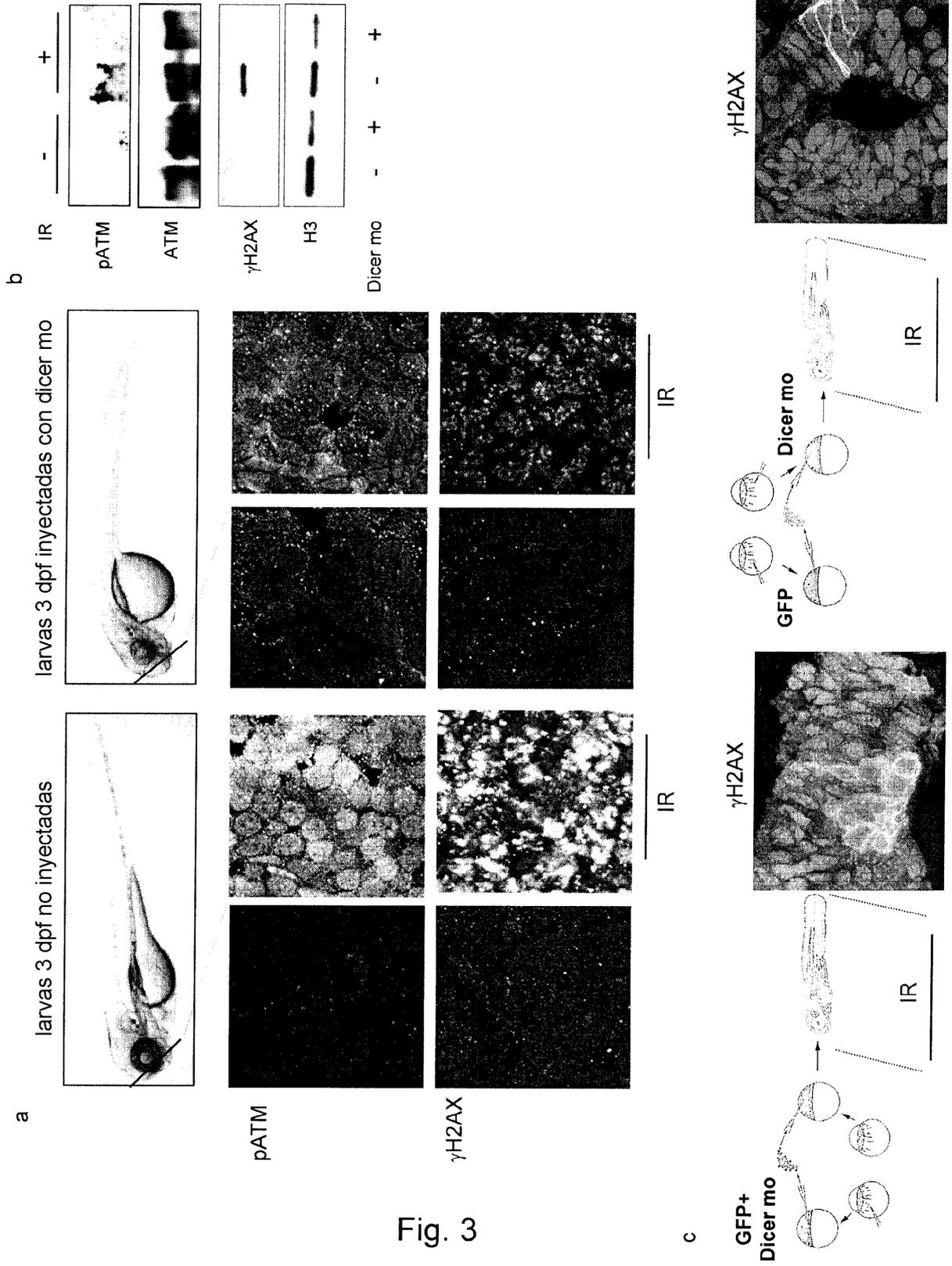


Fig. 3

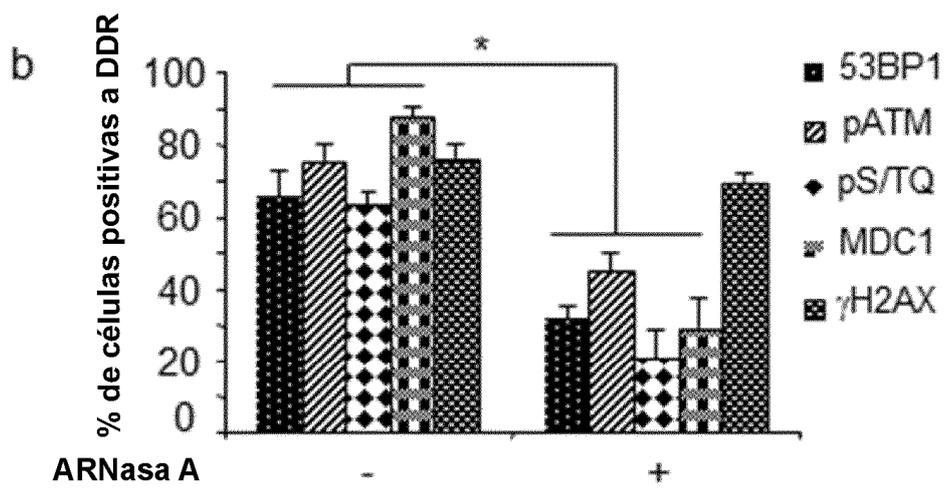
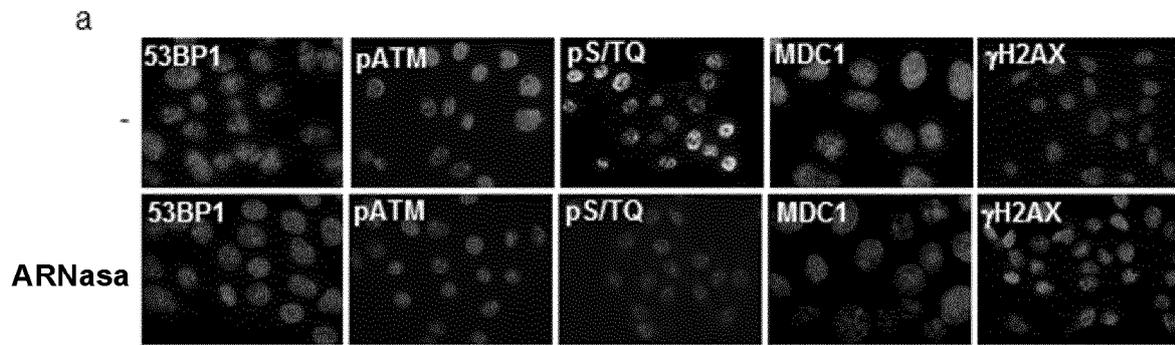


Fig. 4

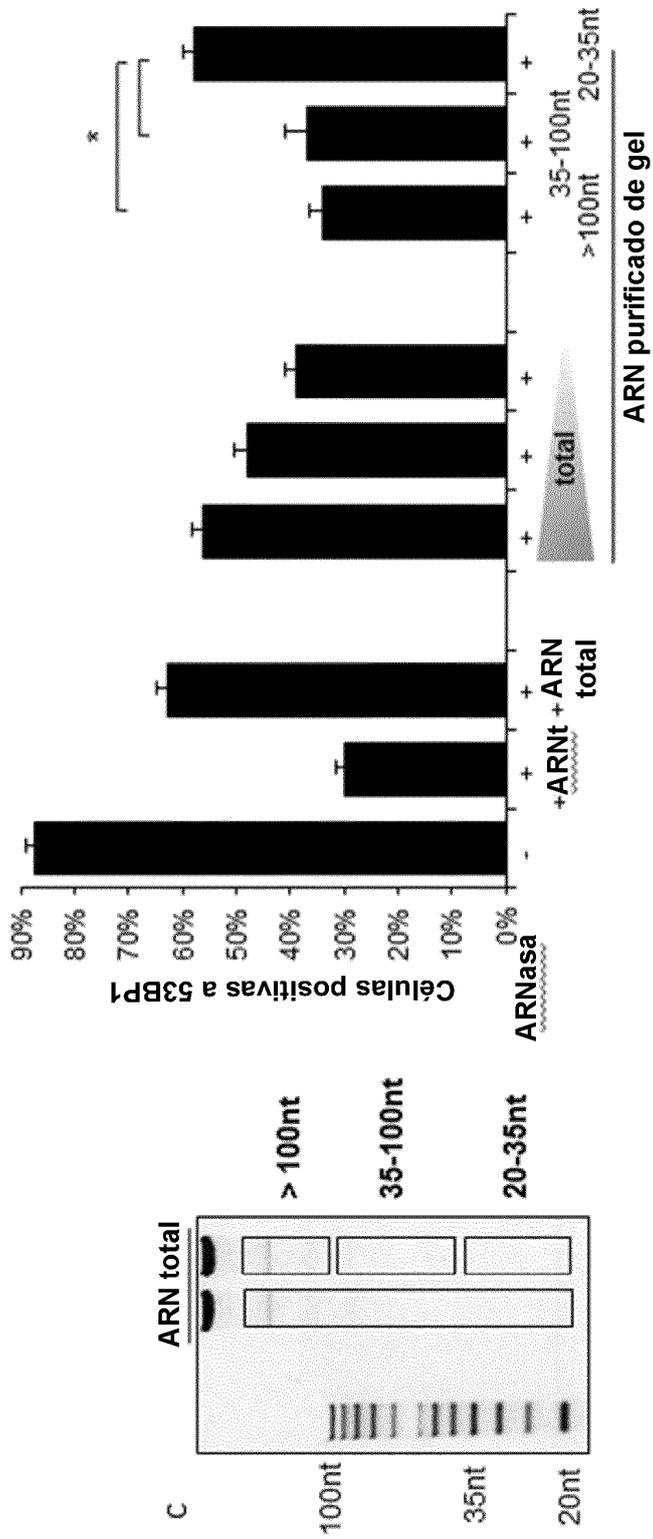


Fig. 4

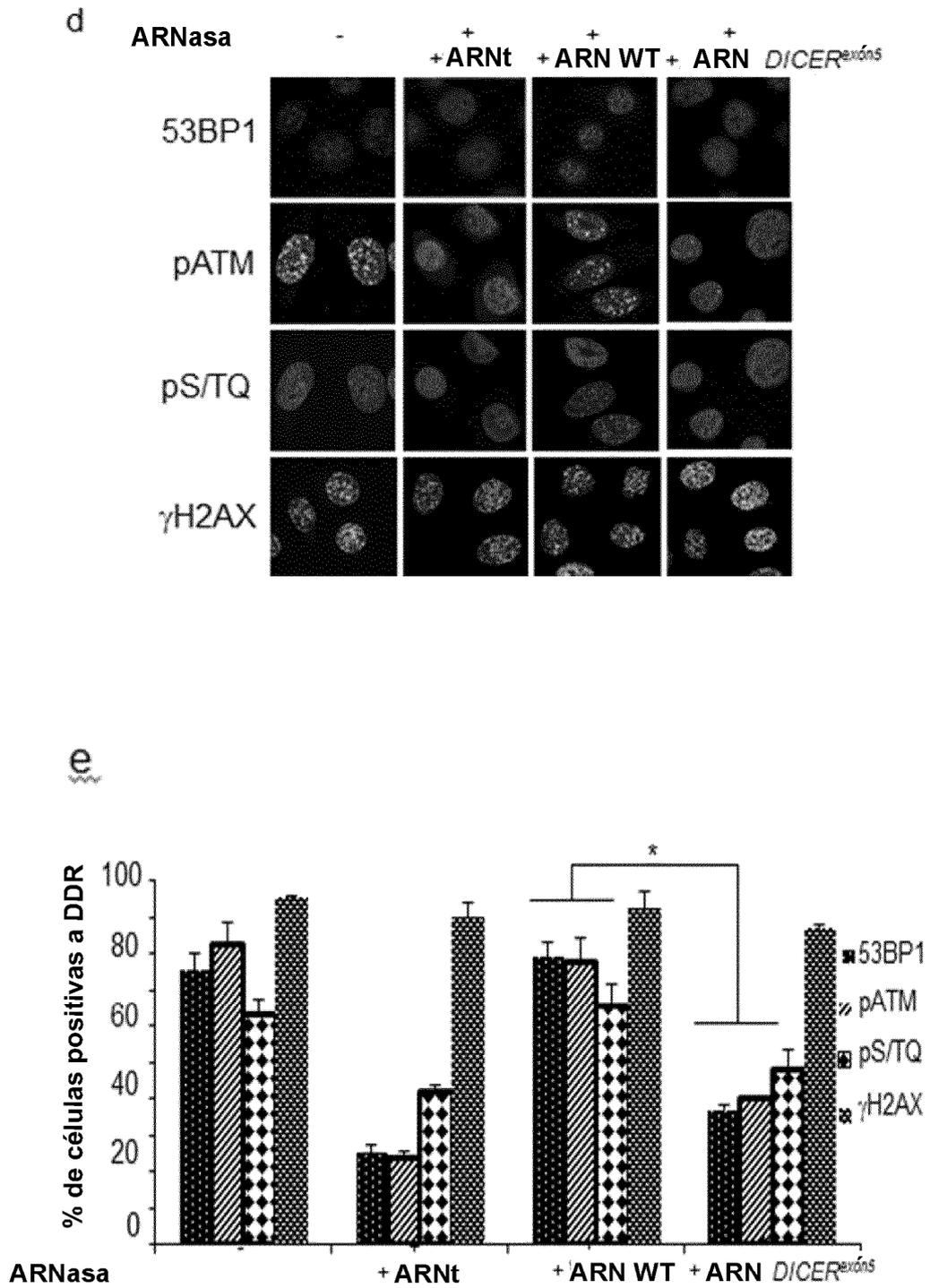


Fig. 4

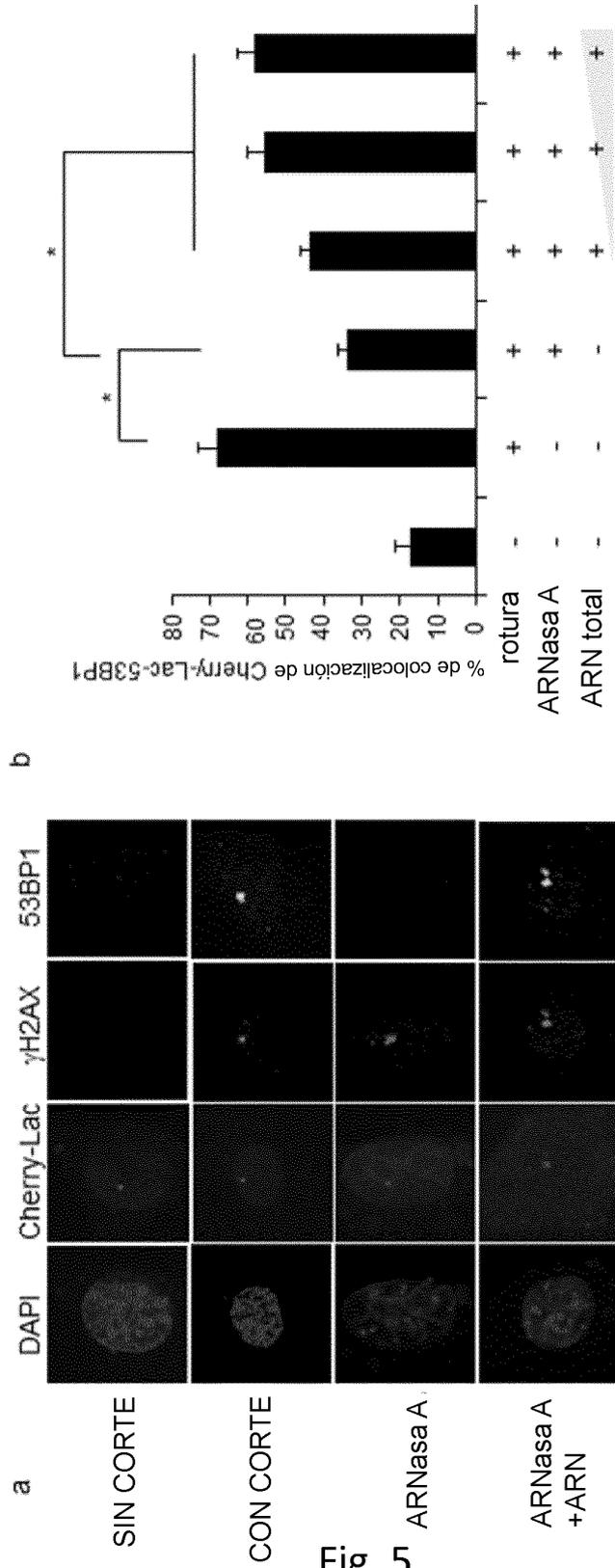


Fig. 5

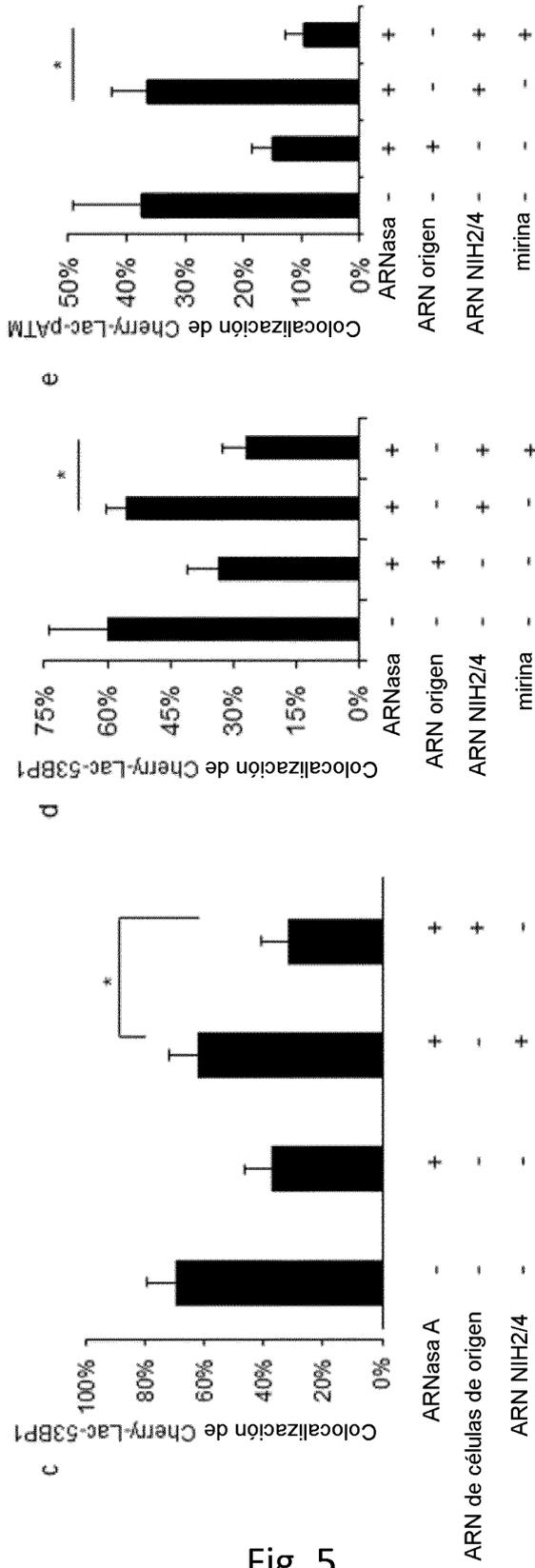


Fig. 5

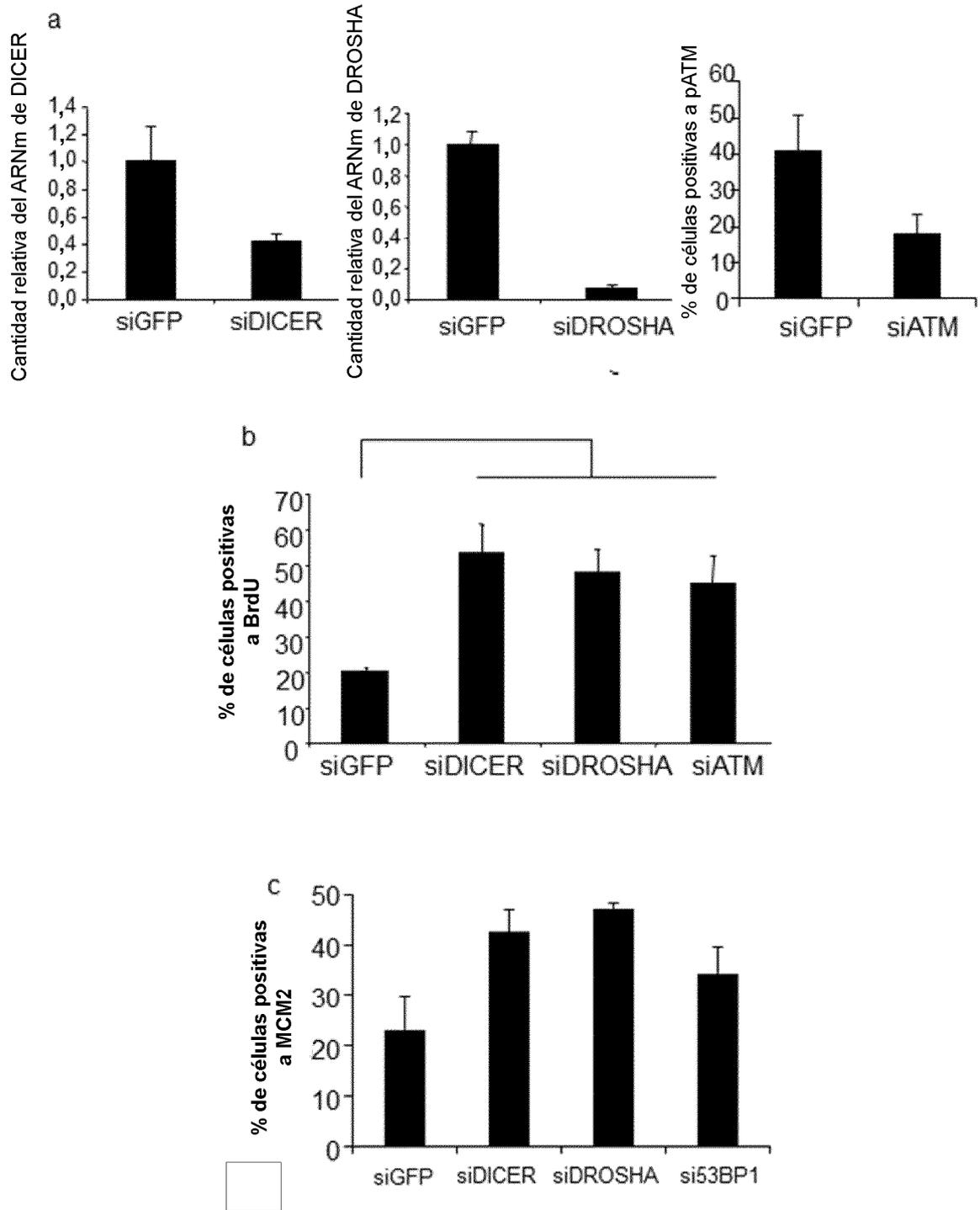


Fig. 7

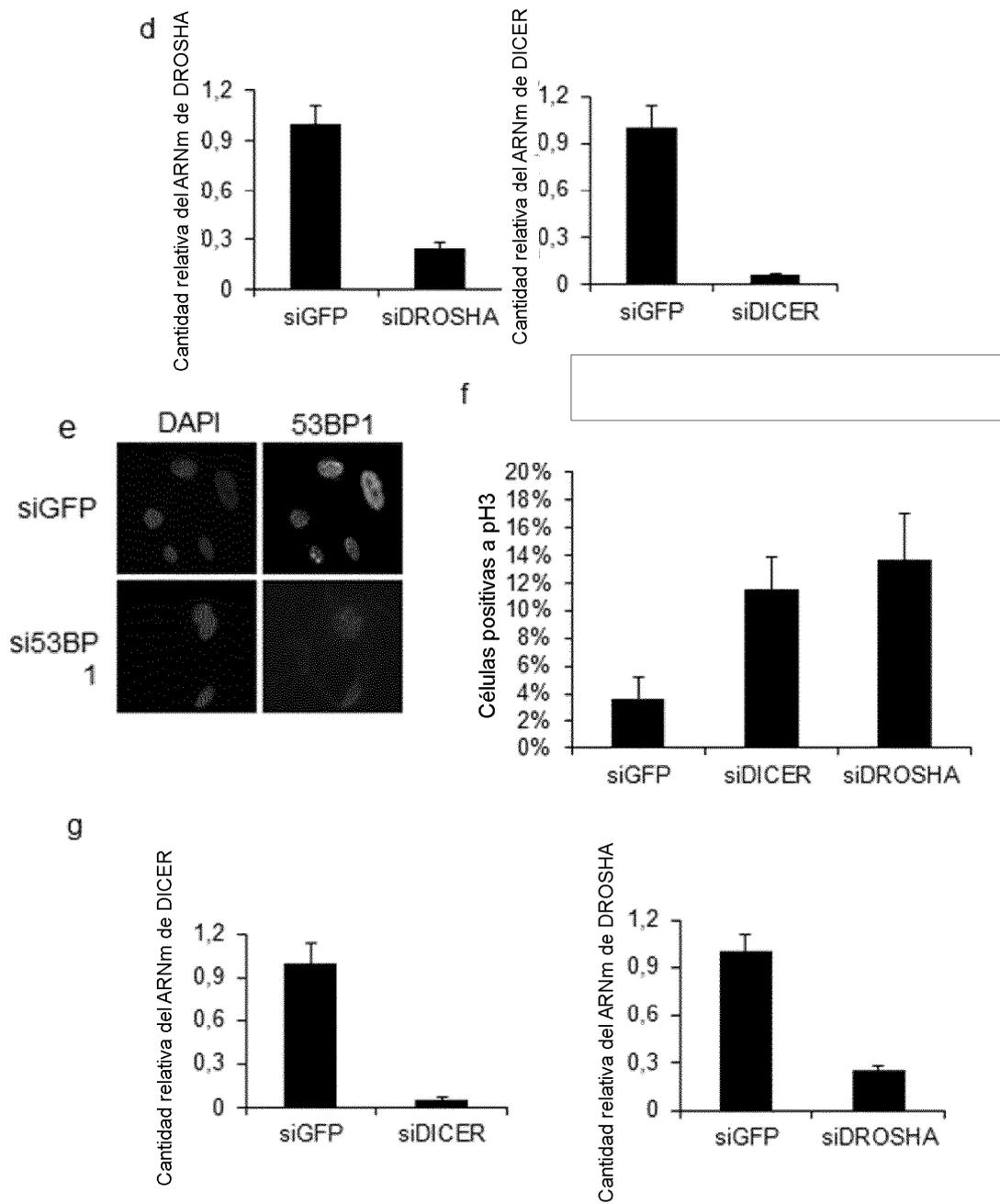


Fig. 7

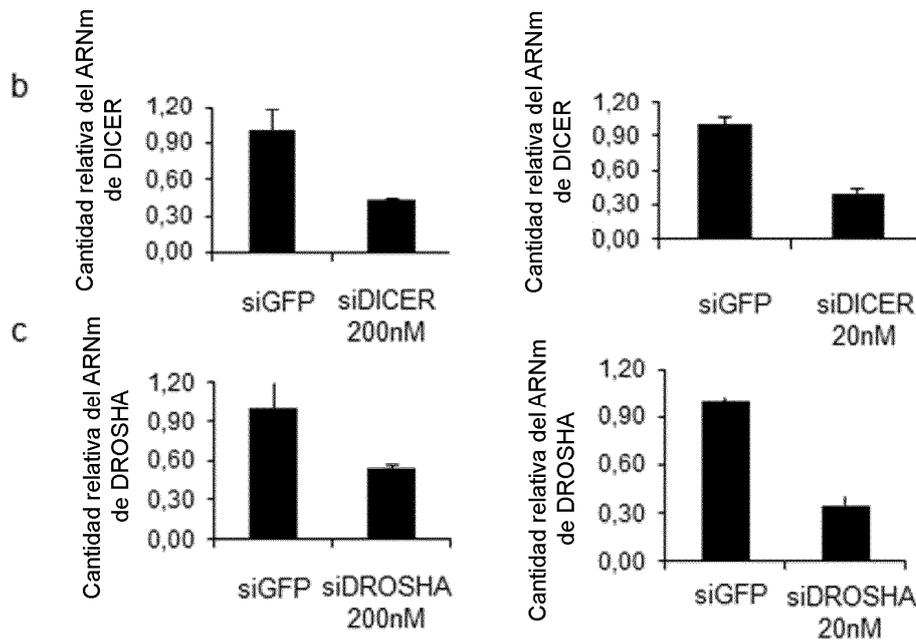
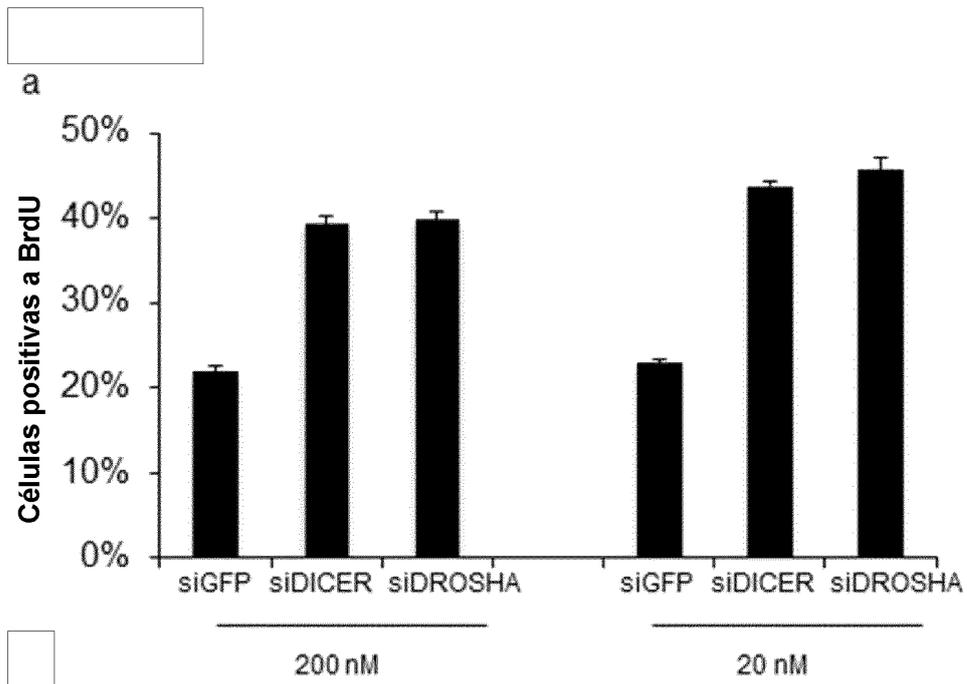


Fig. 8

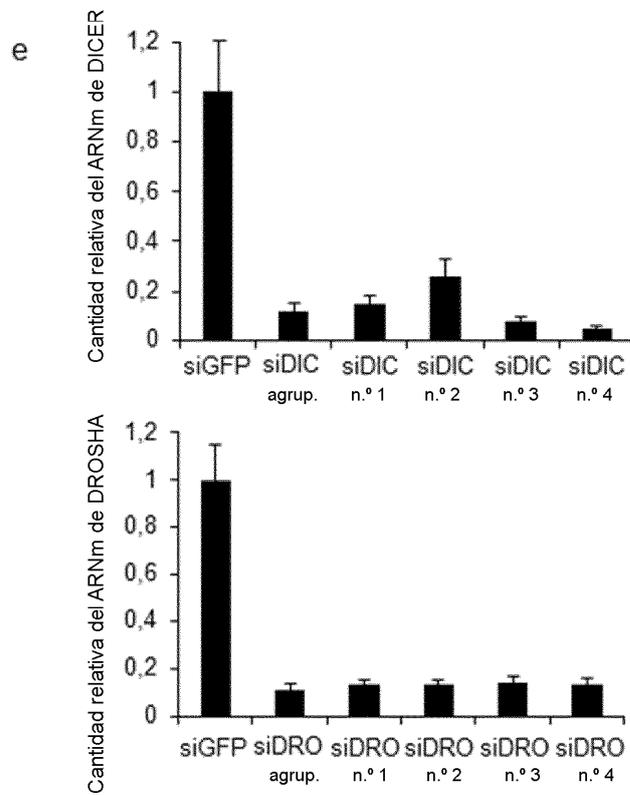
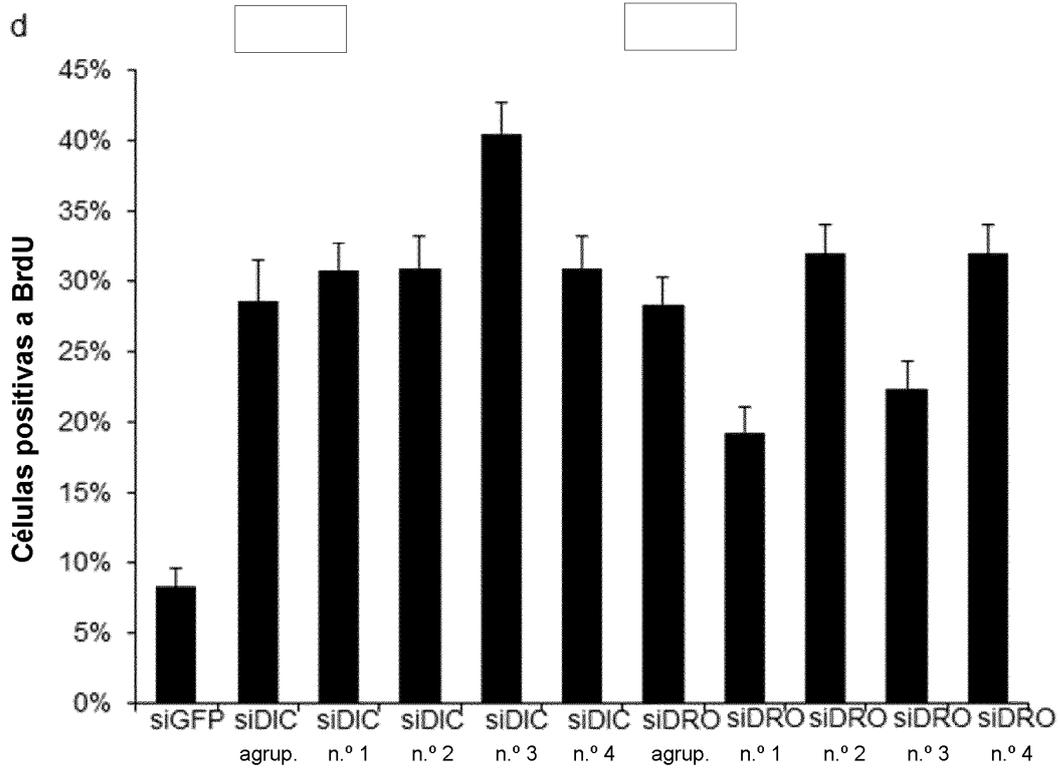


Fig. 8

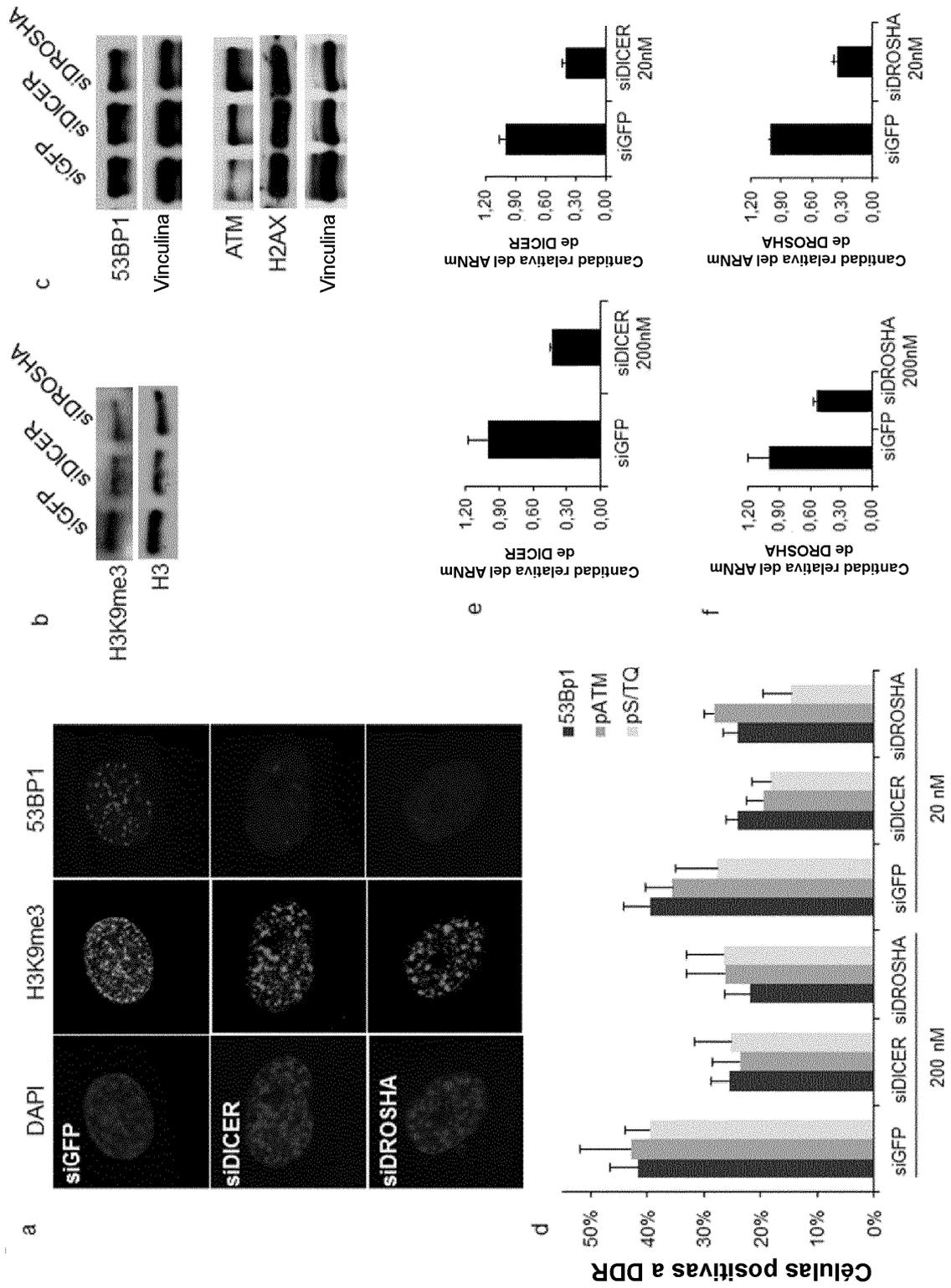


Fig. 9

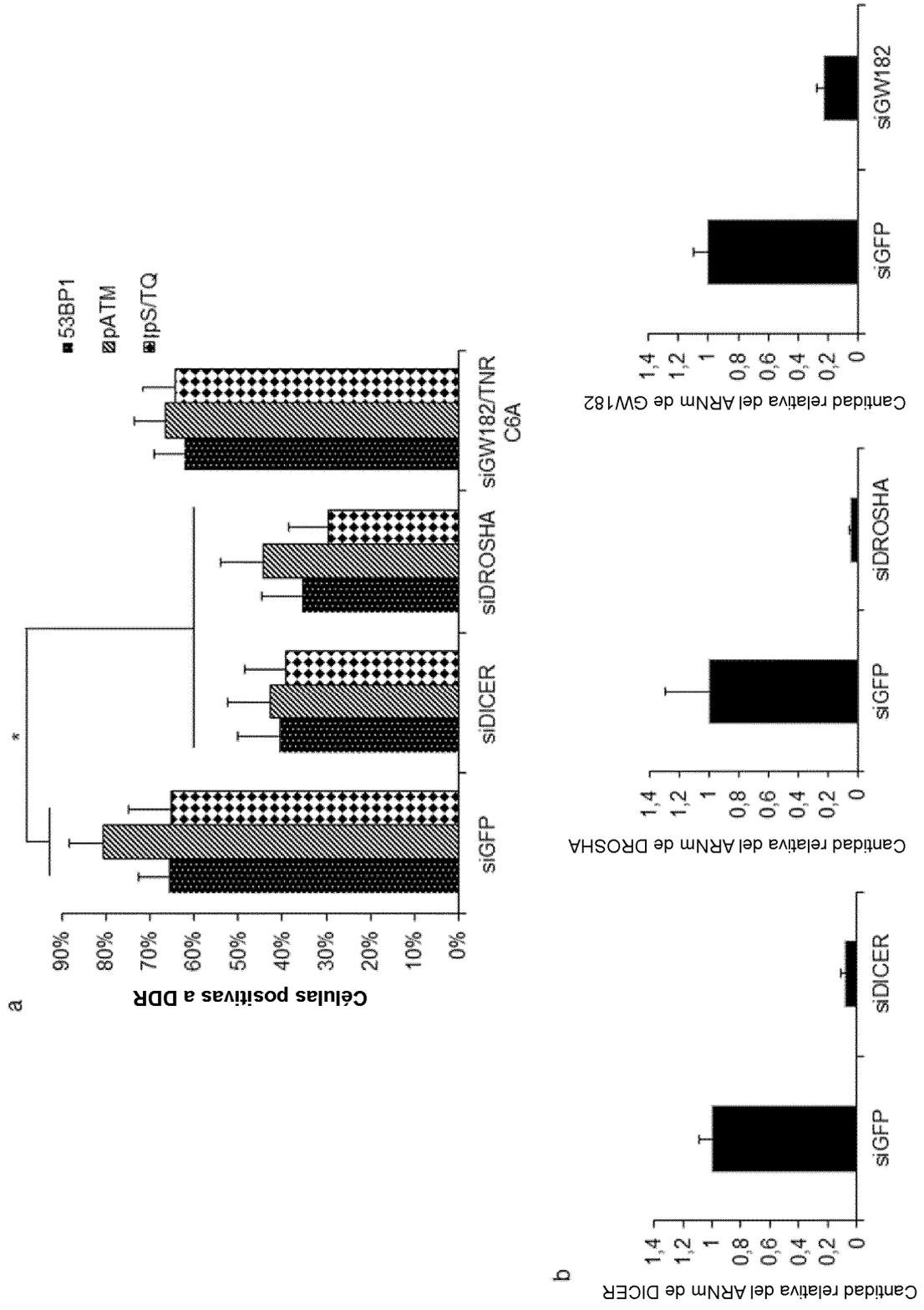


Fig. 10

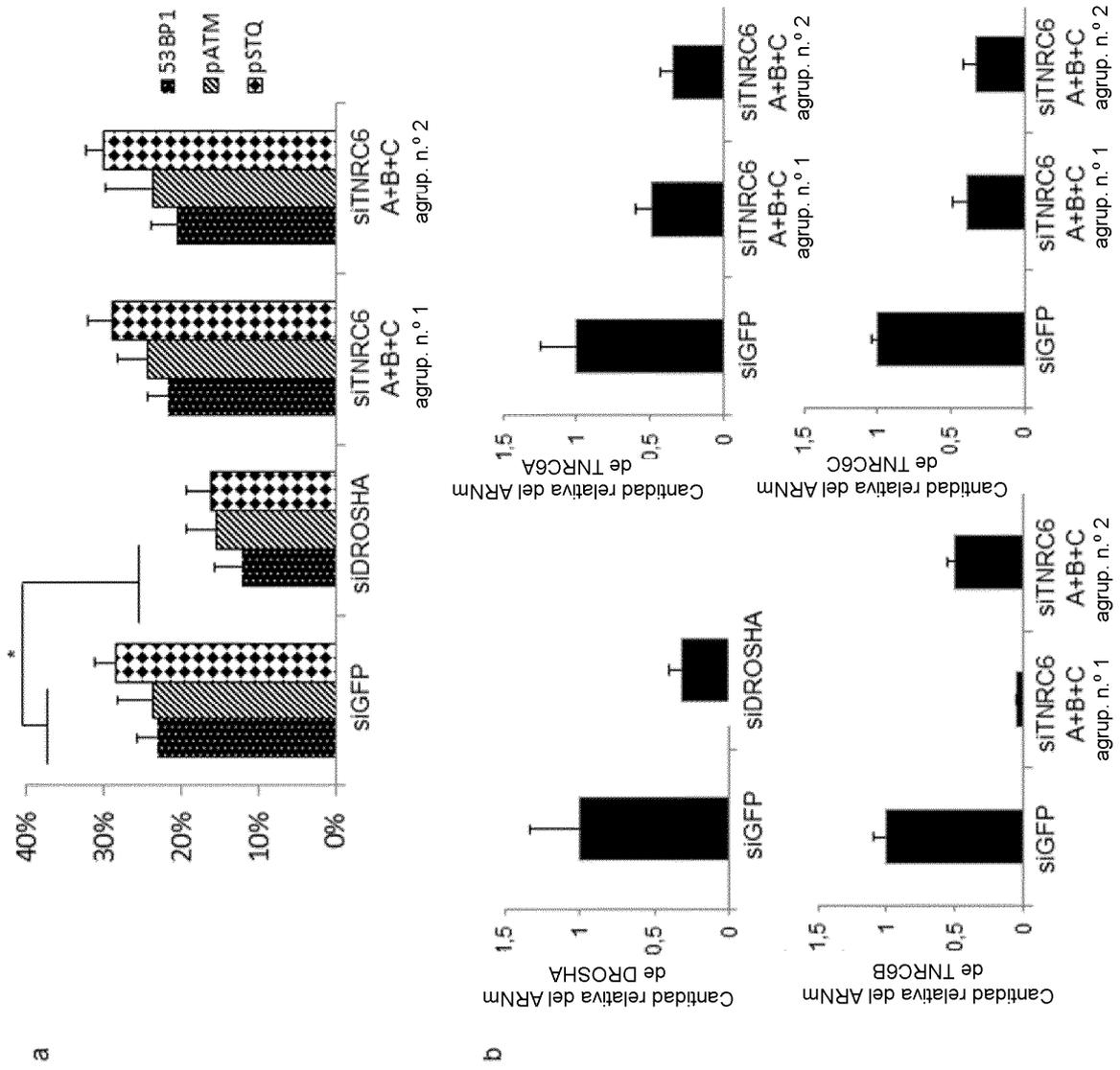
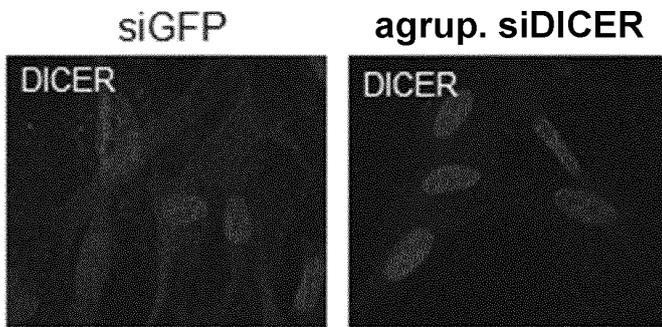
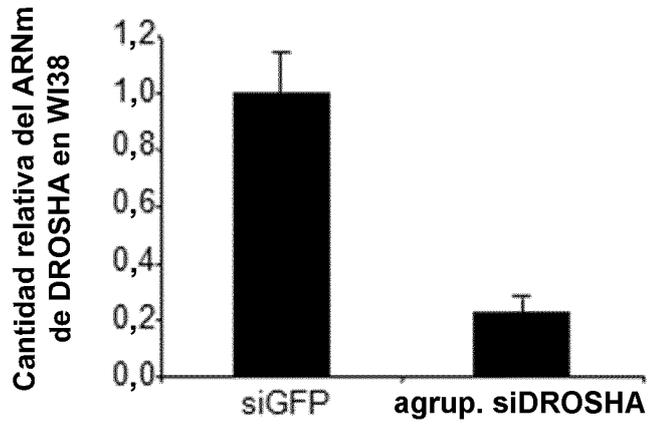


Fig. 11

a



b



c

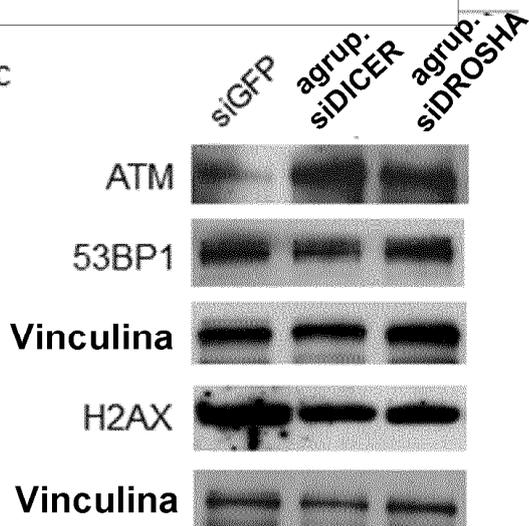


Fig. 12

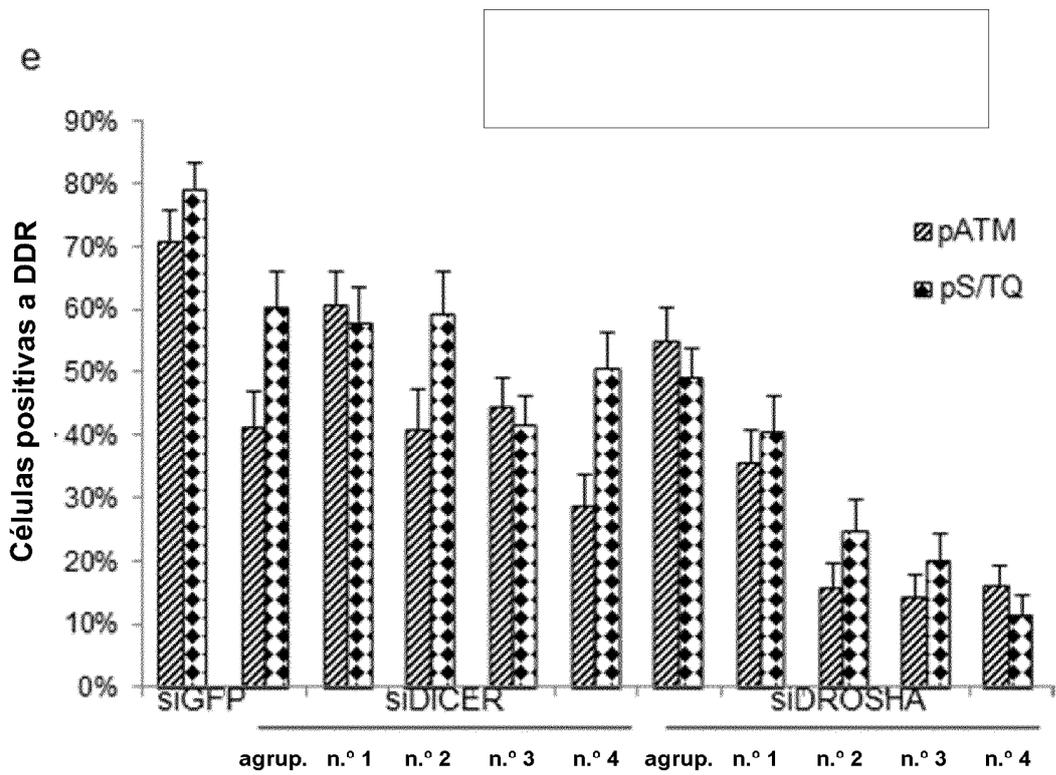
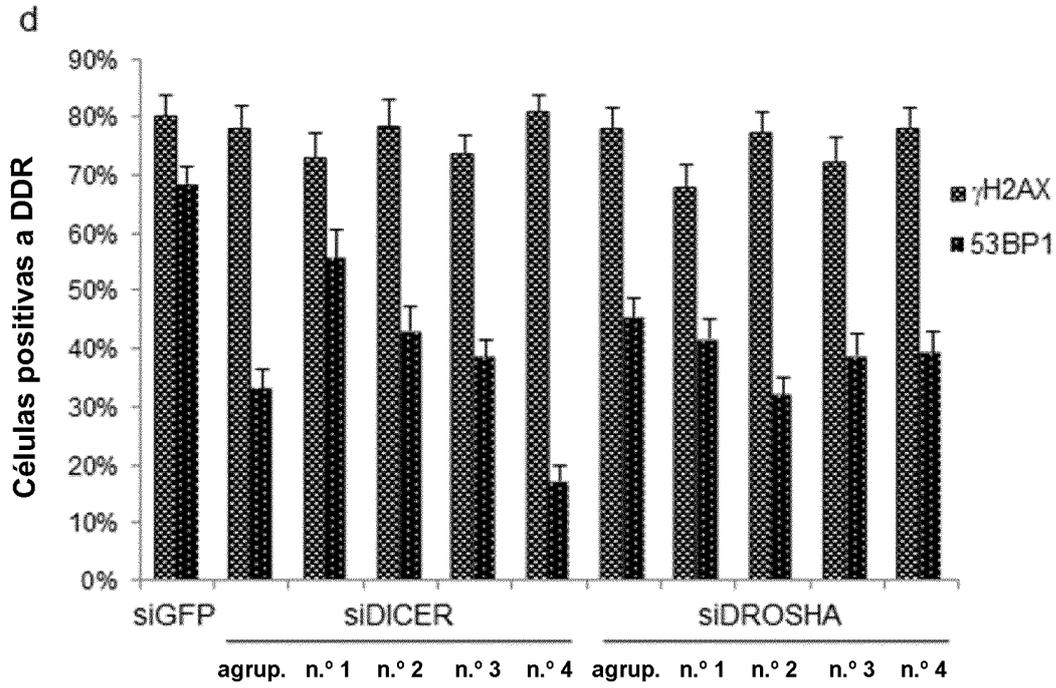


Fig. 12

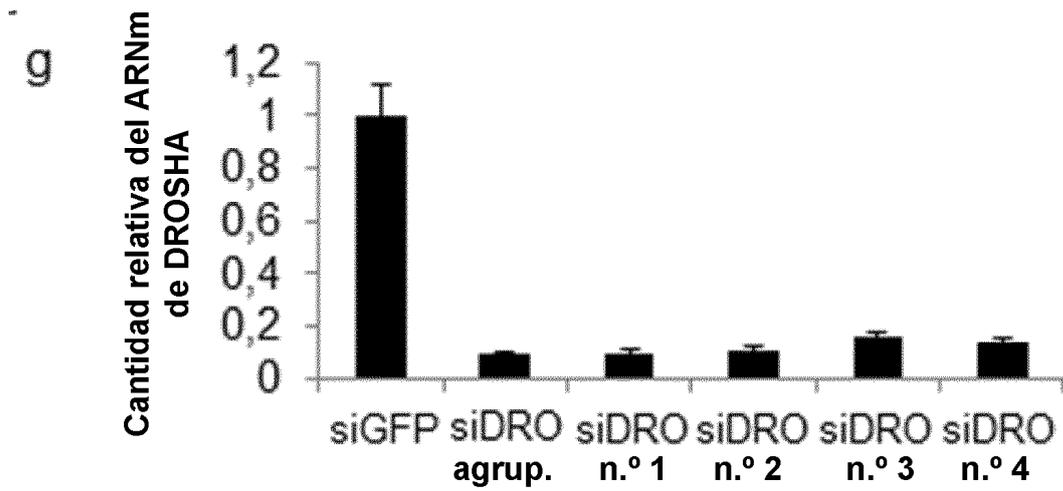
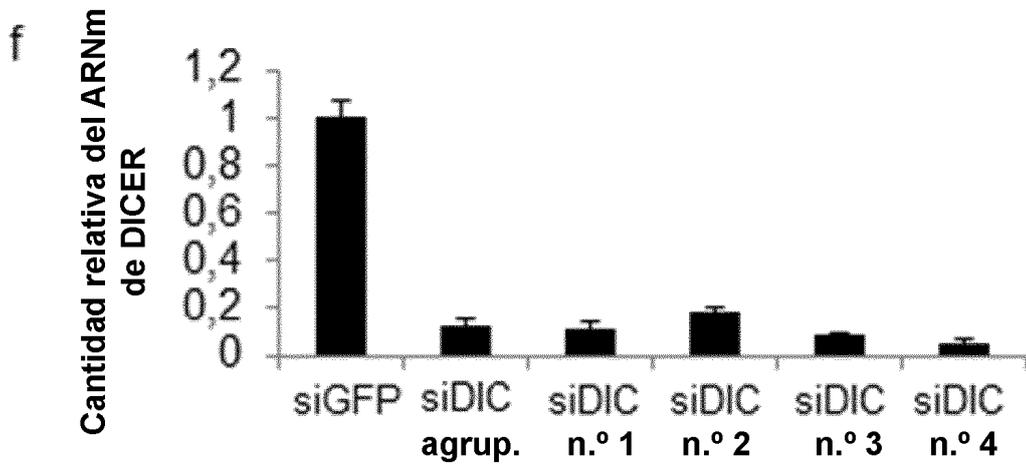


Fig. 12

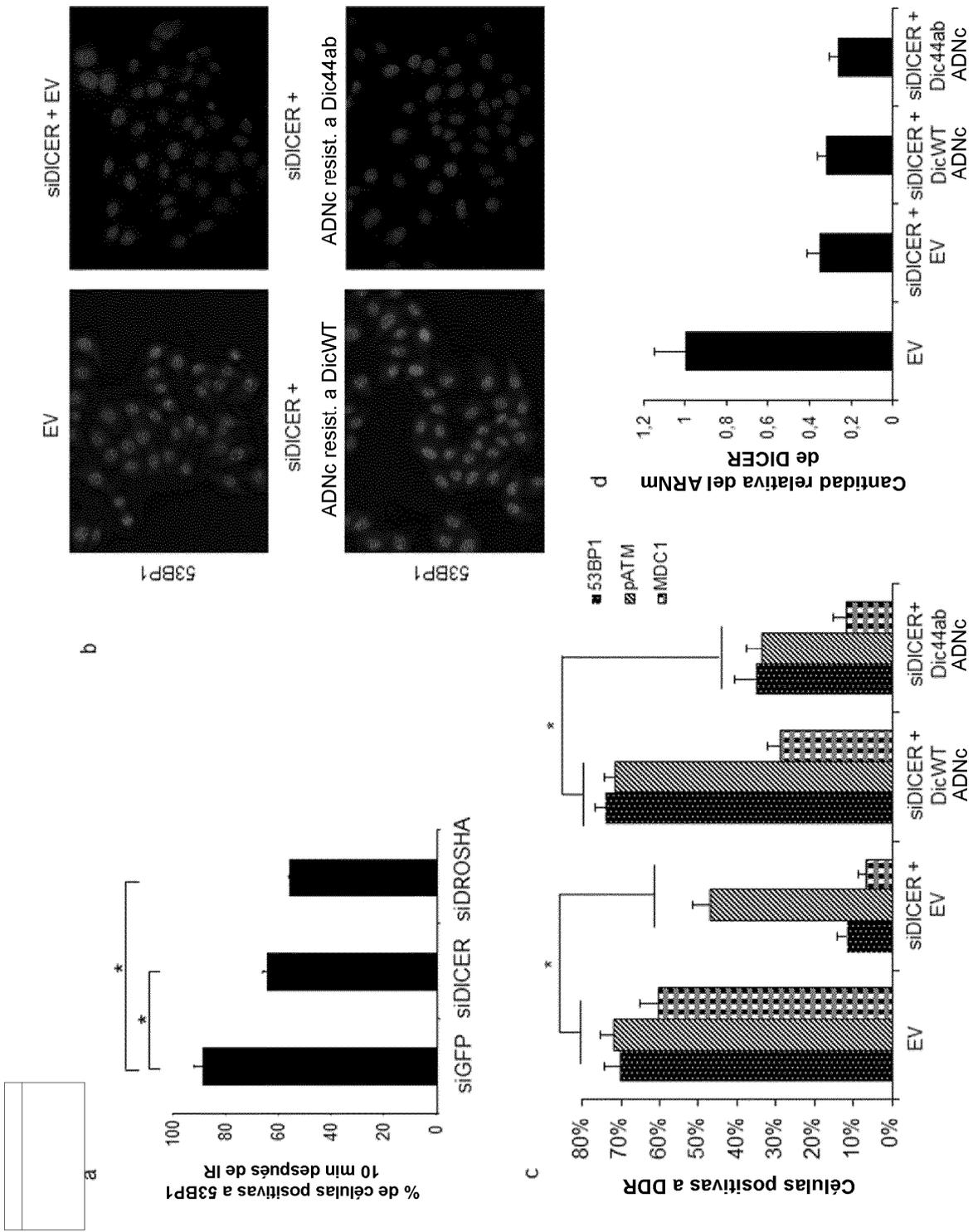


Fig. 13

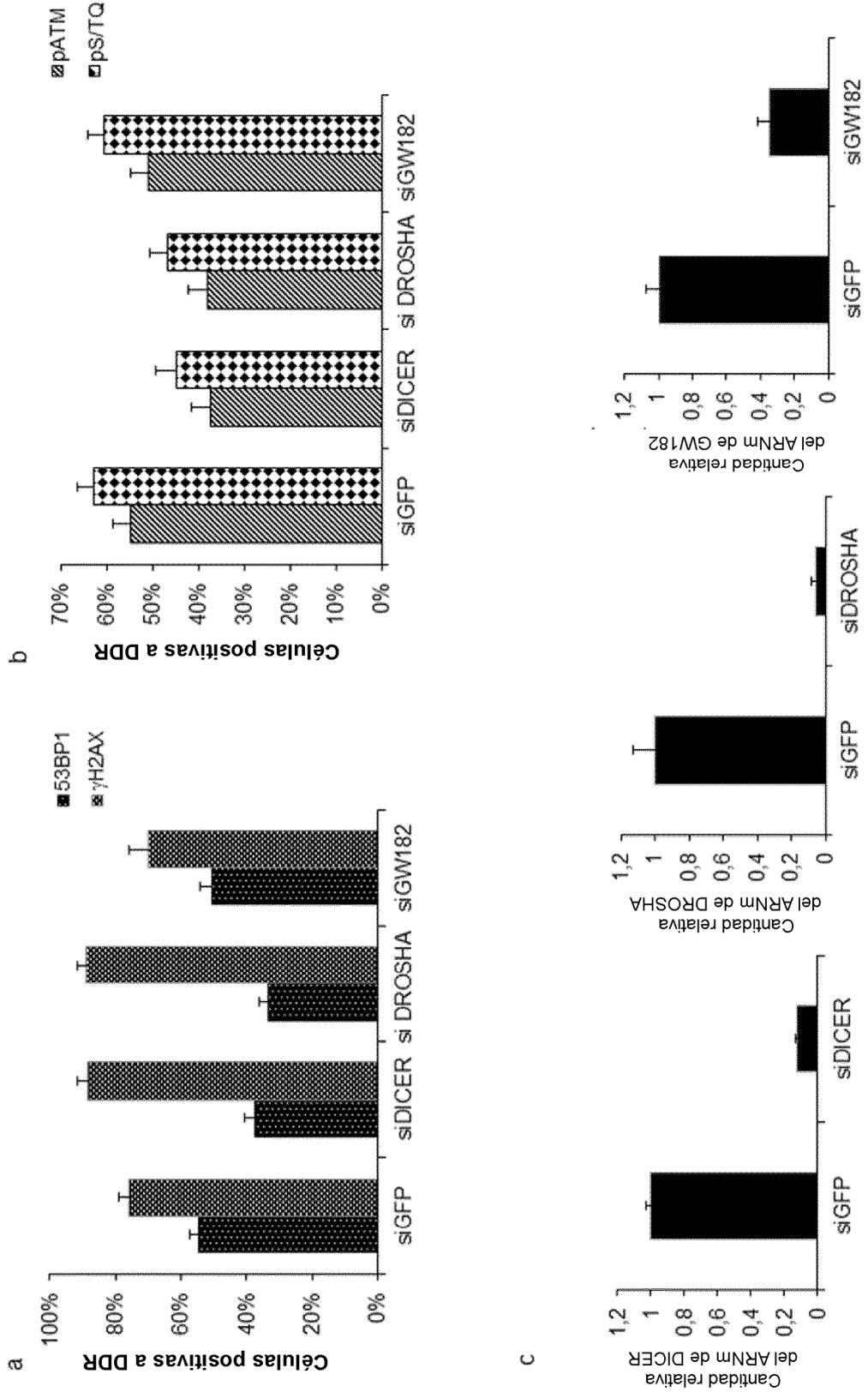


Fig. 14

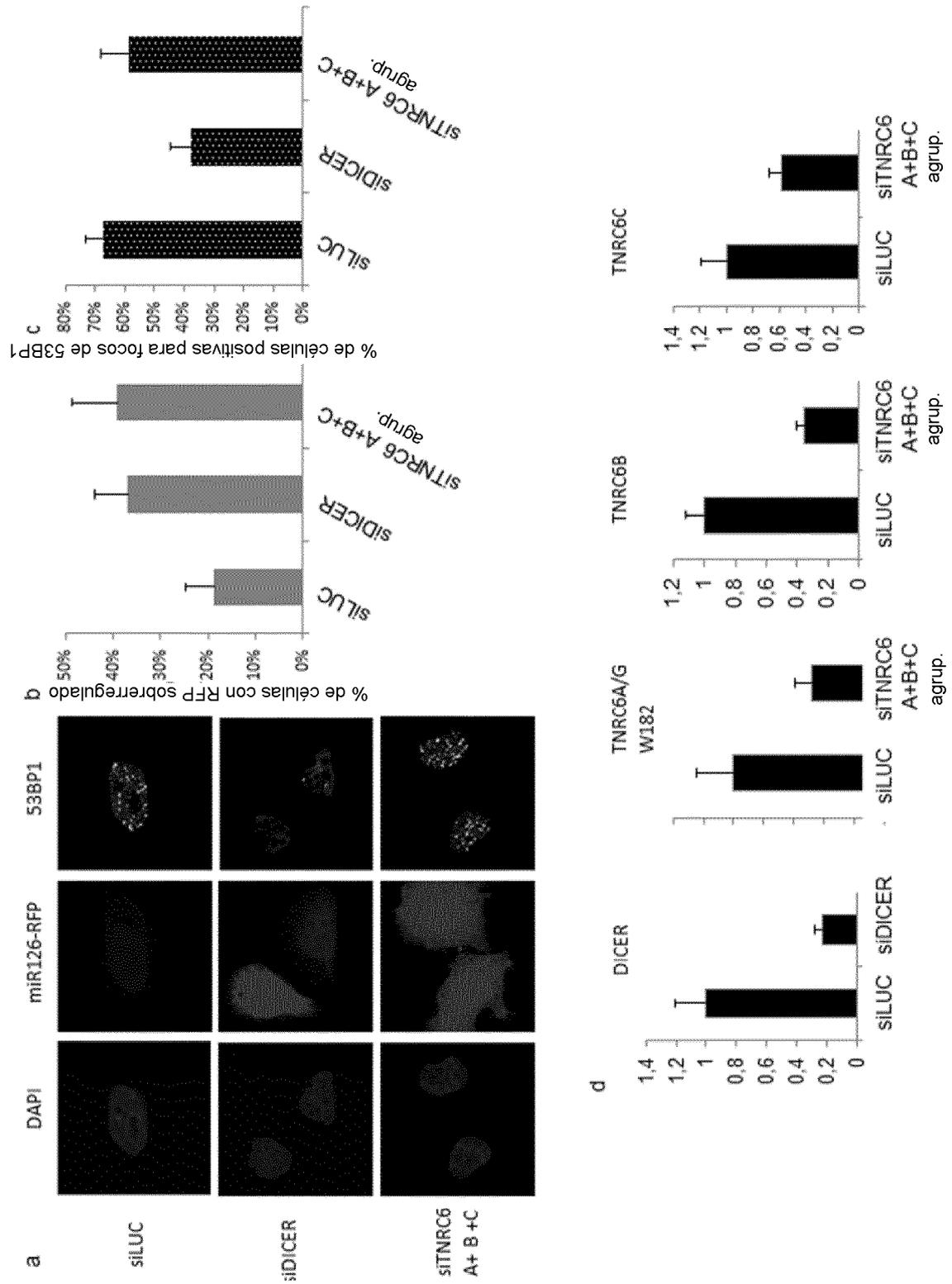


Fig. 15

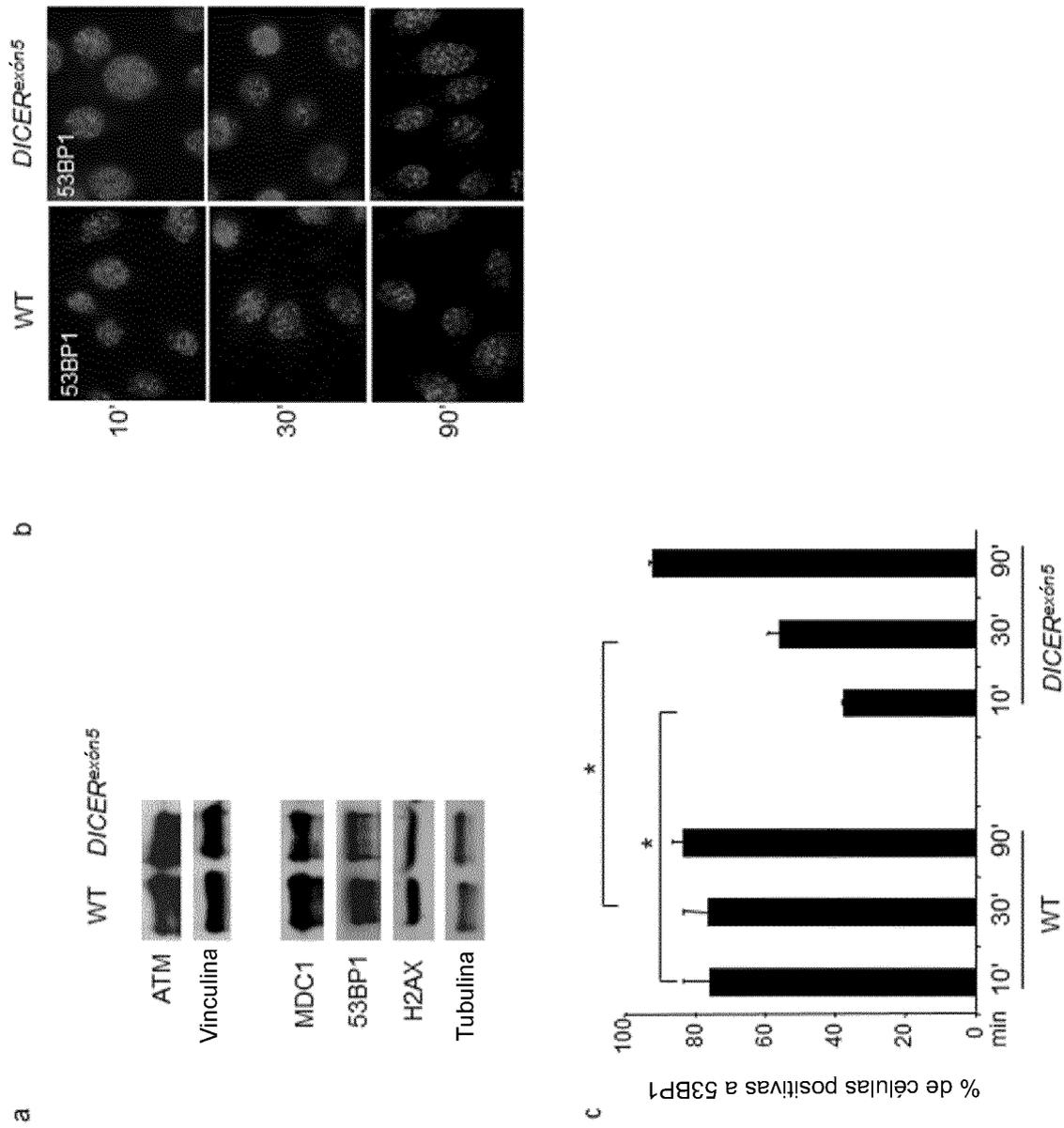


Fig. 16

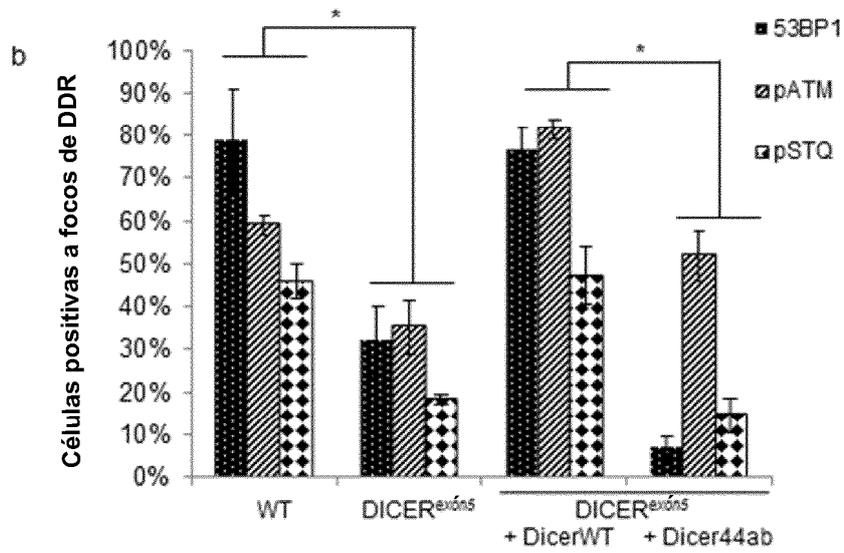
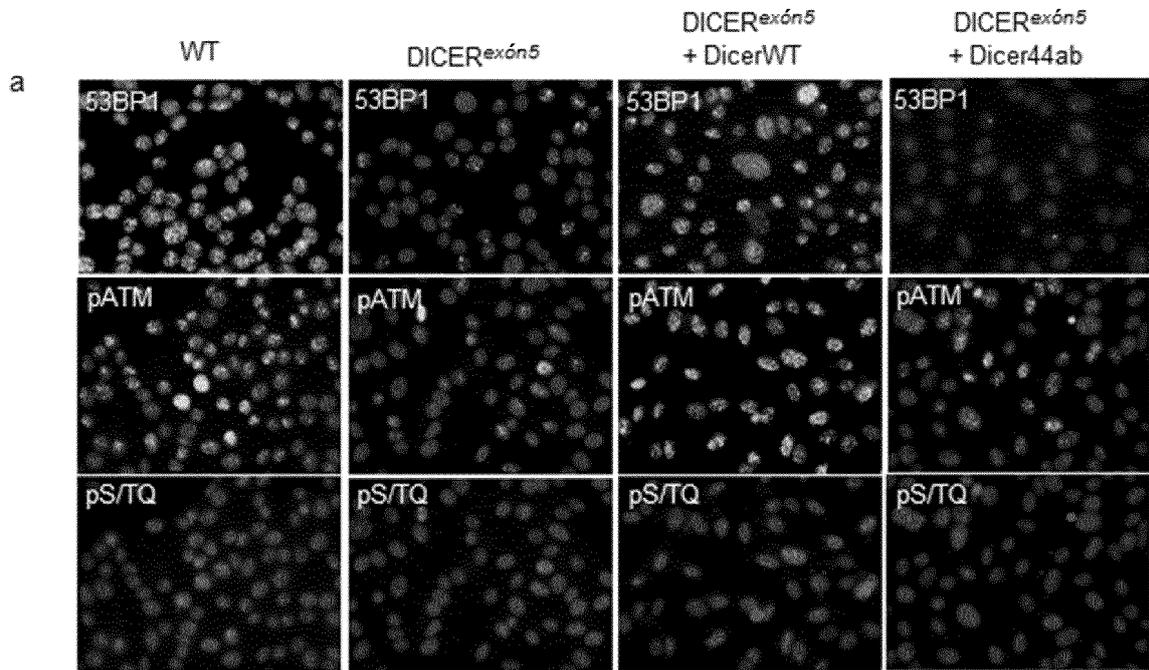


Fig. 17

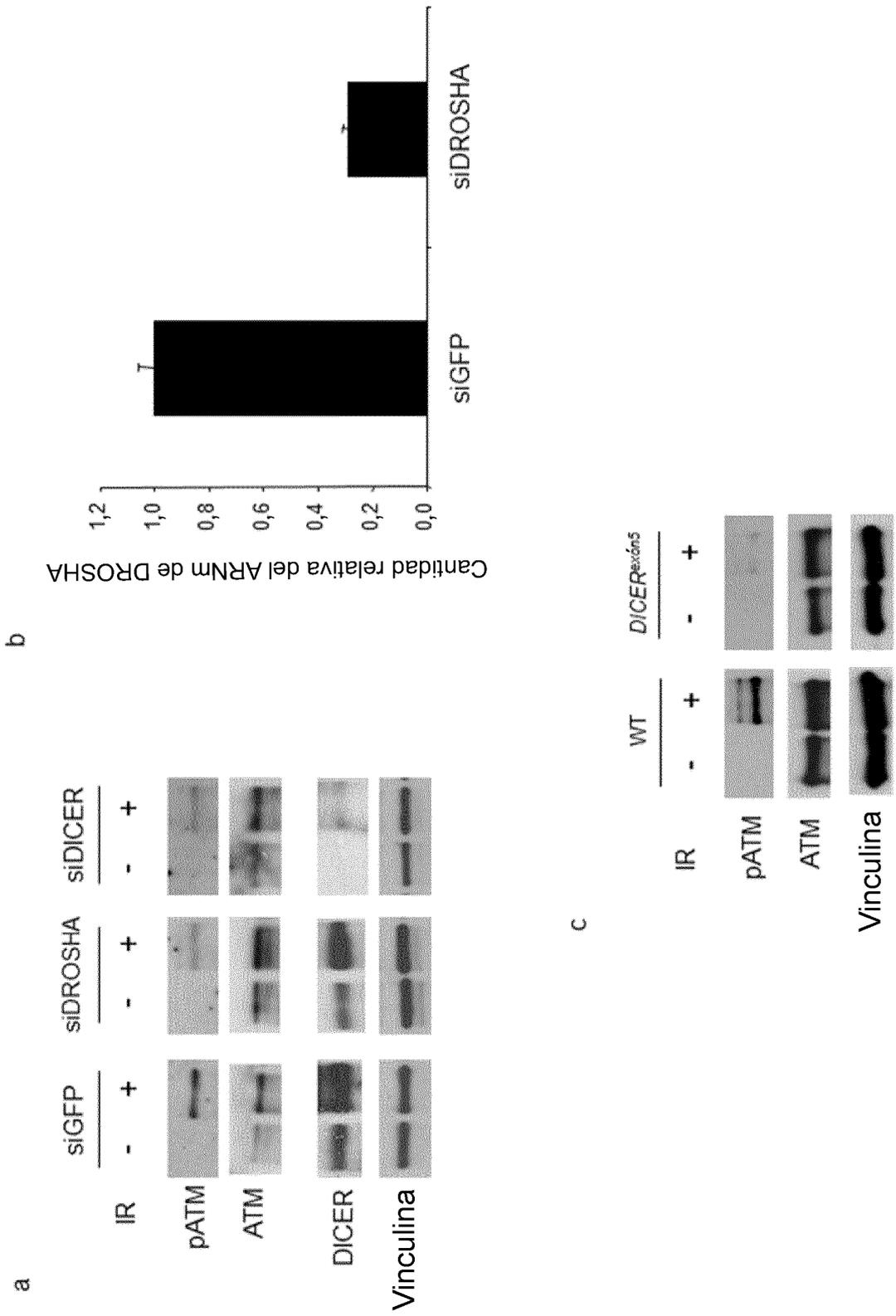


Fig. 18

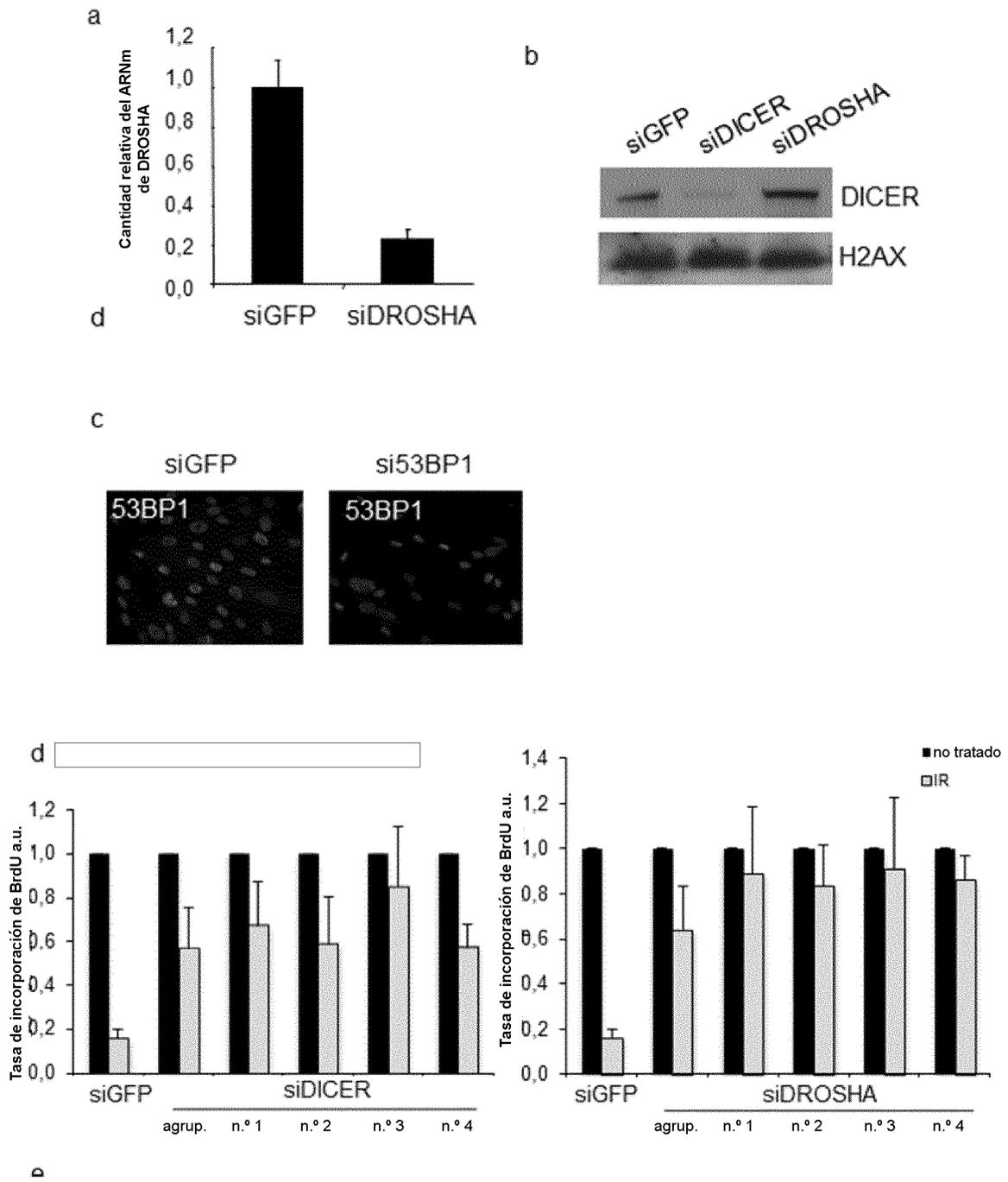


Fig. 19

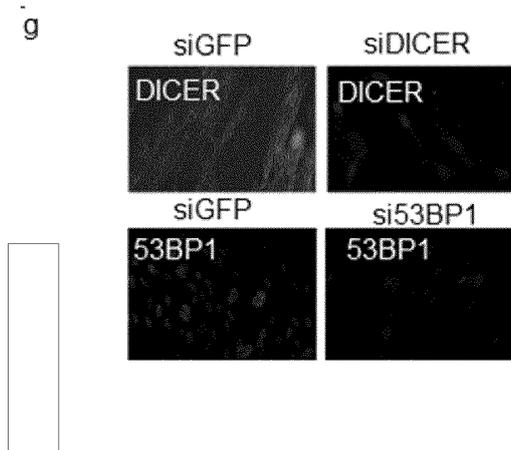
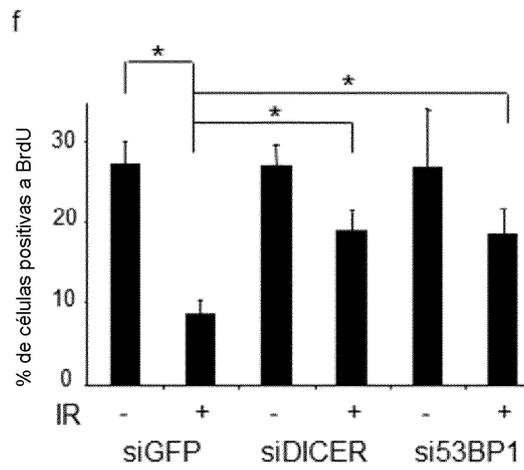
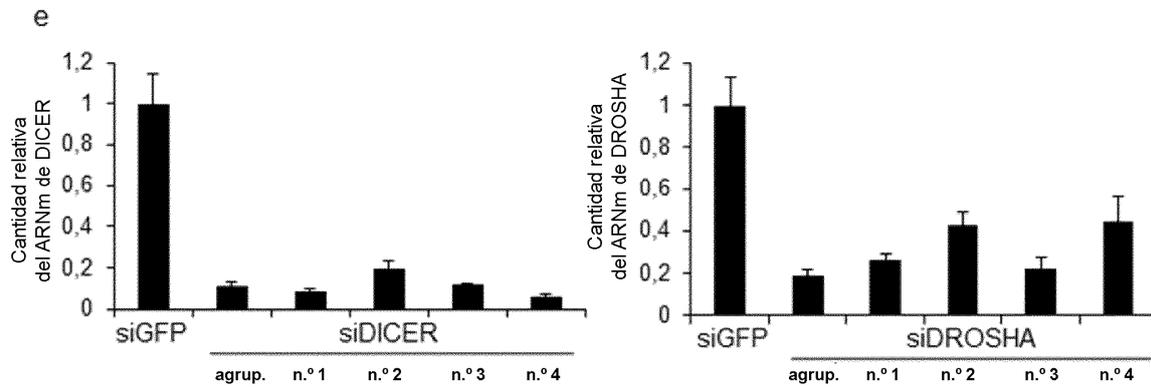


Fig. 19

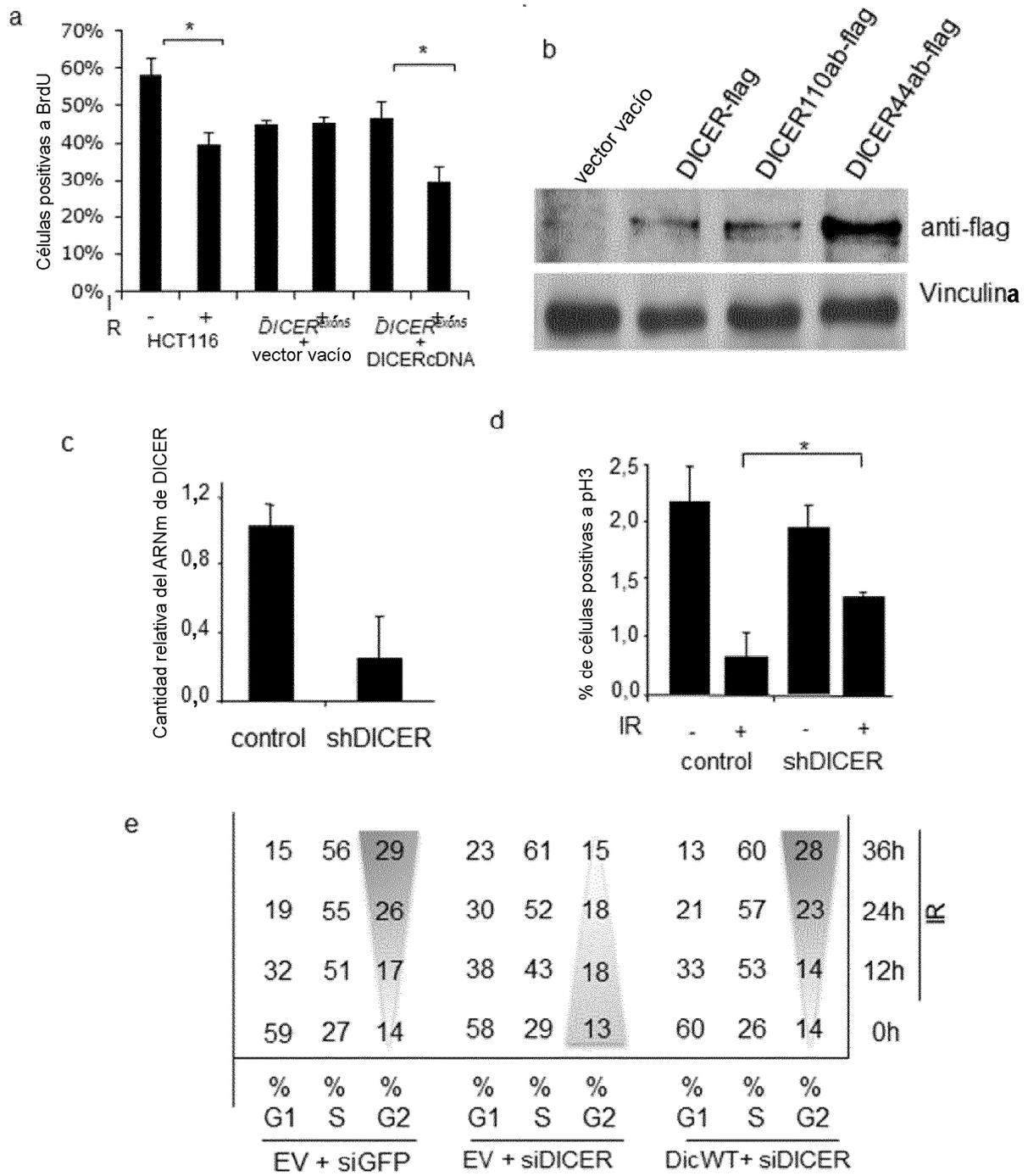


Fig. 20

f

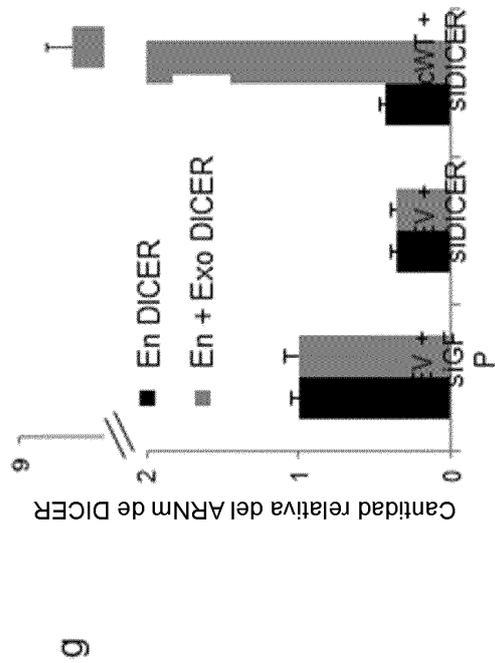
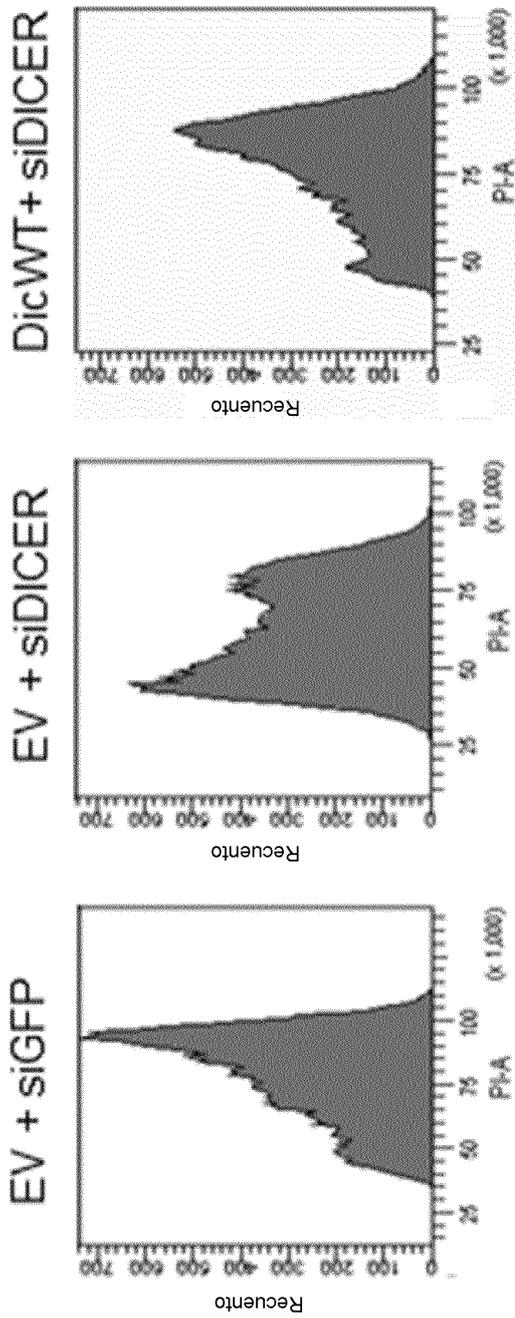


Fig. 20

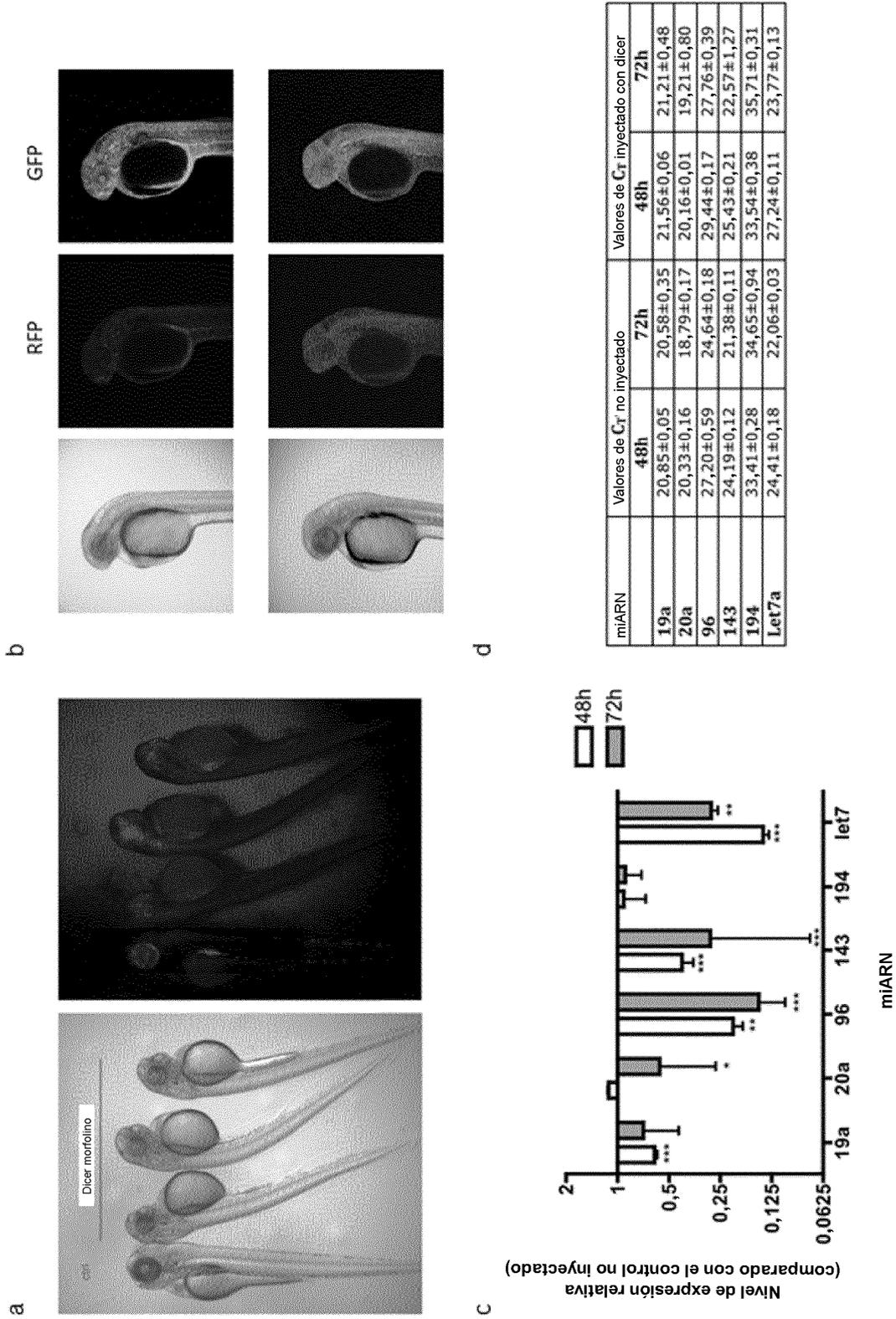


Fig. 21

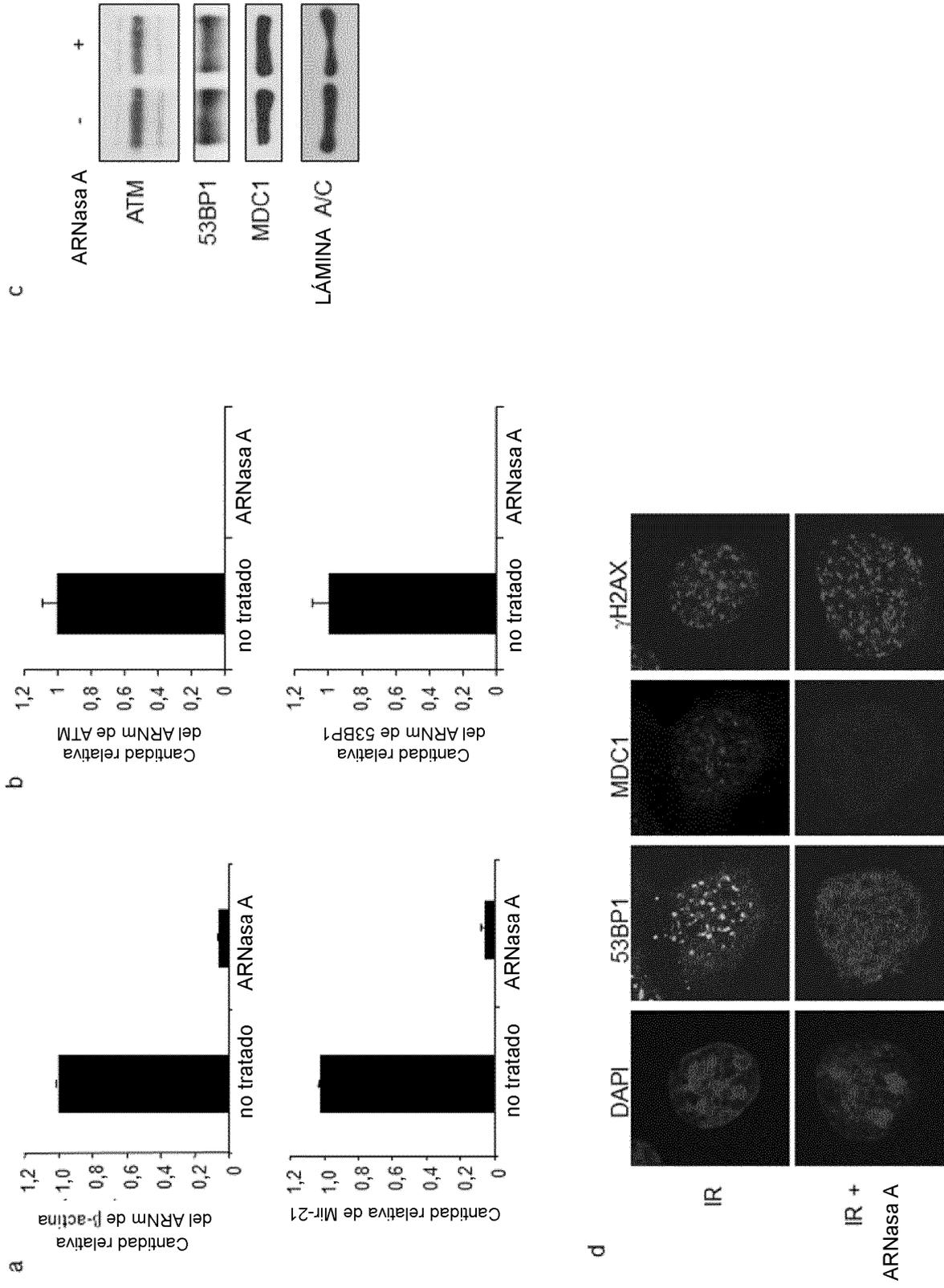


Fig. 22

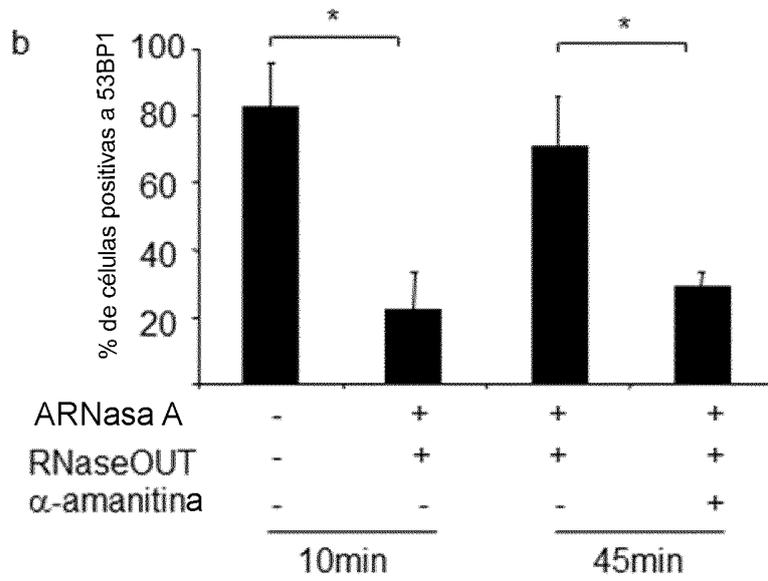
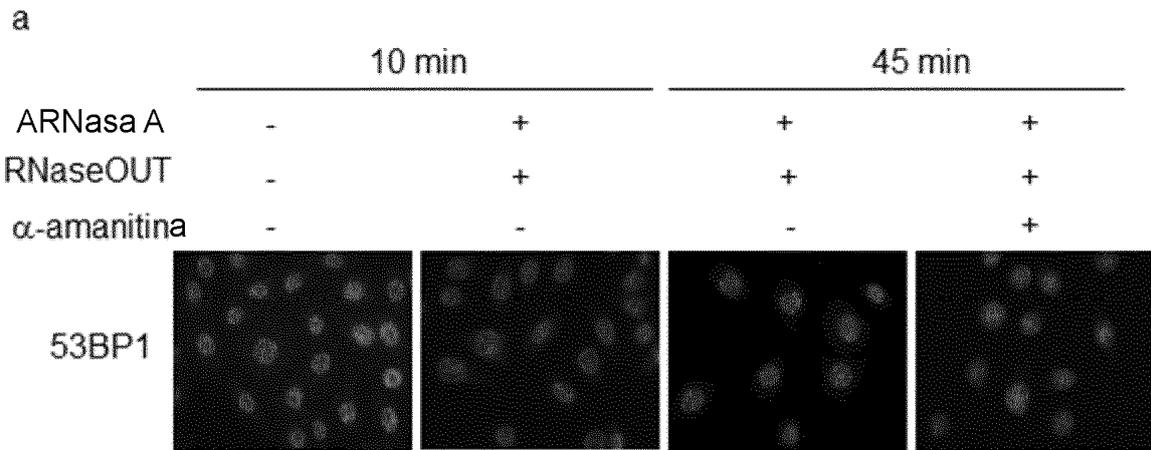


Fig. 23

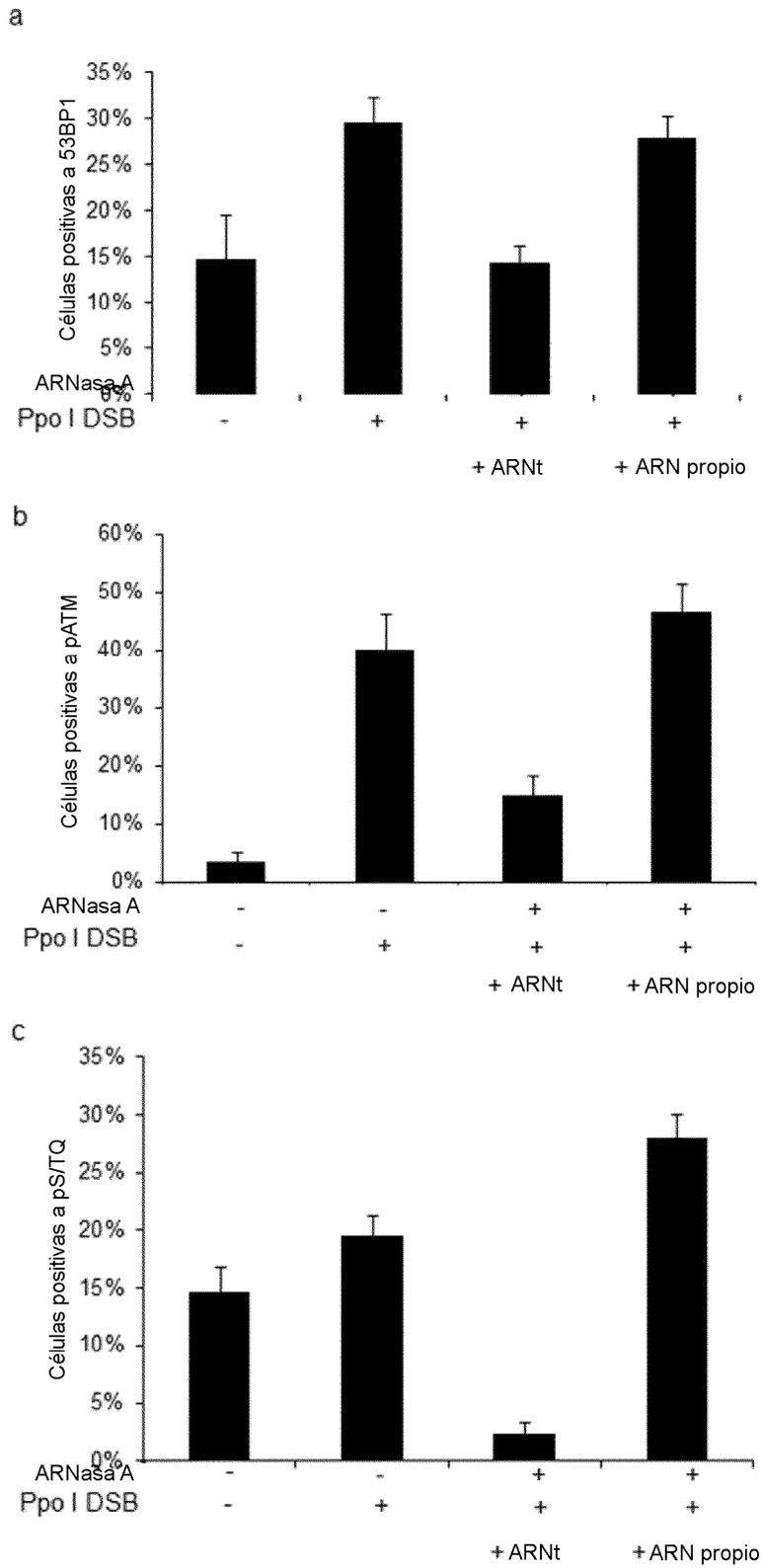


Fig. 24

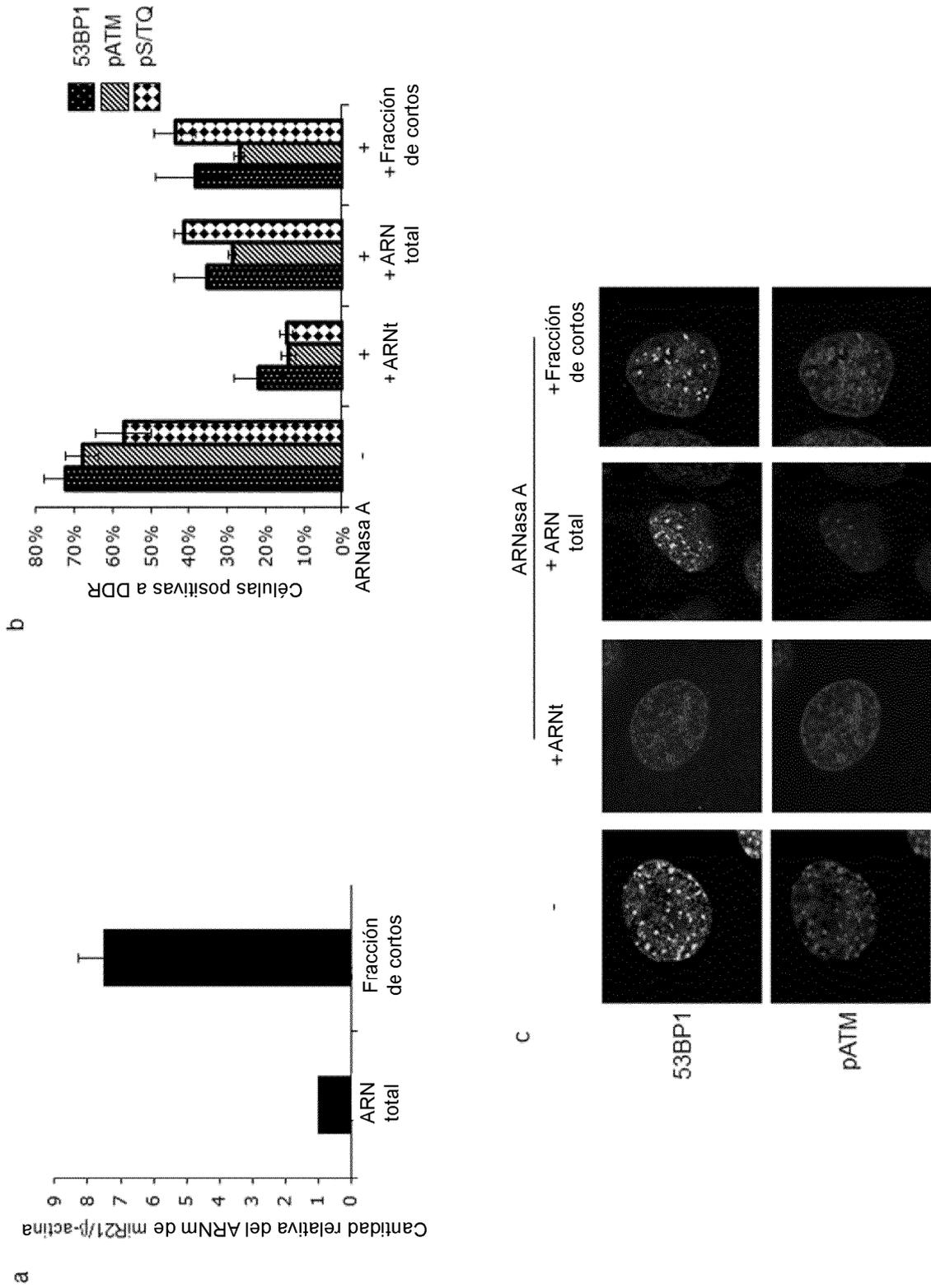


Fig. 25

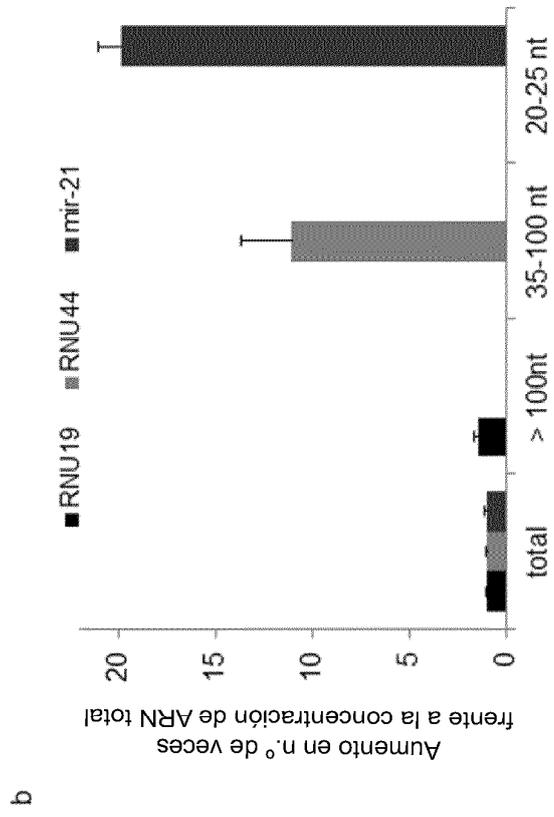
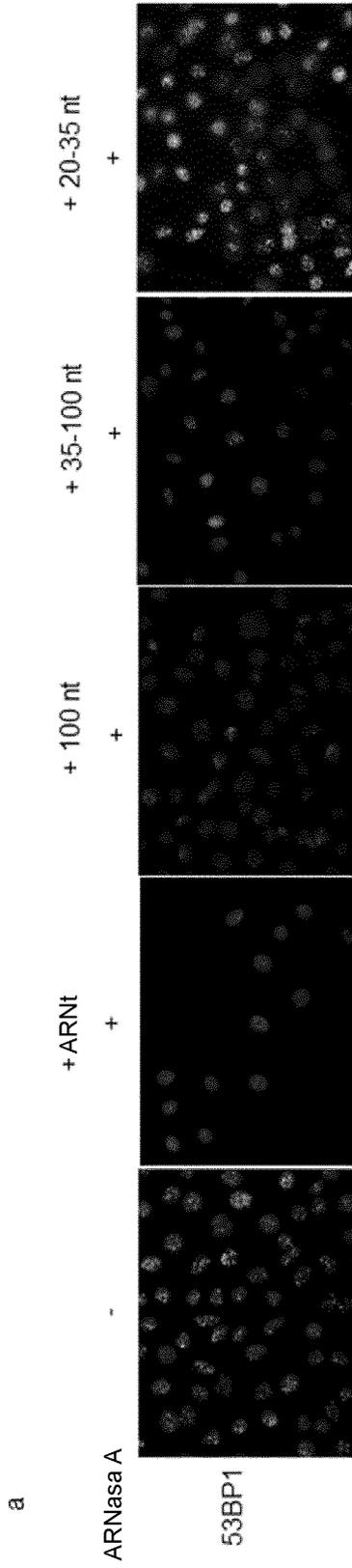


Fig. 26

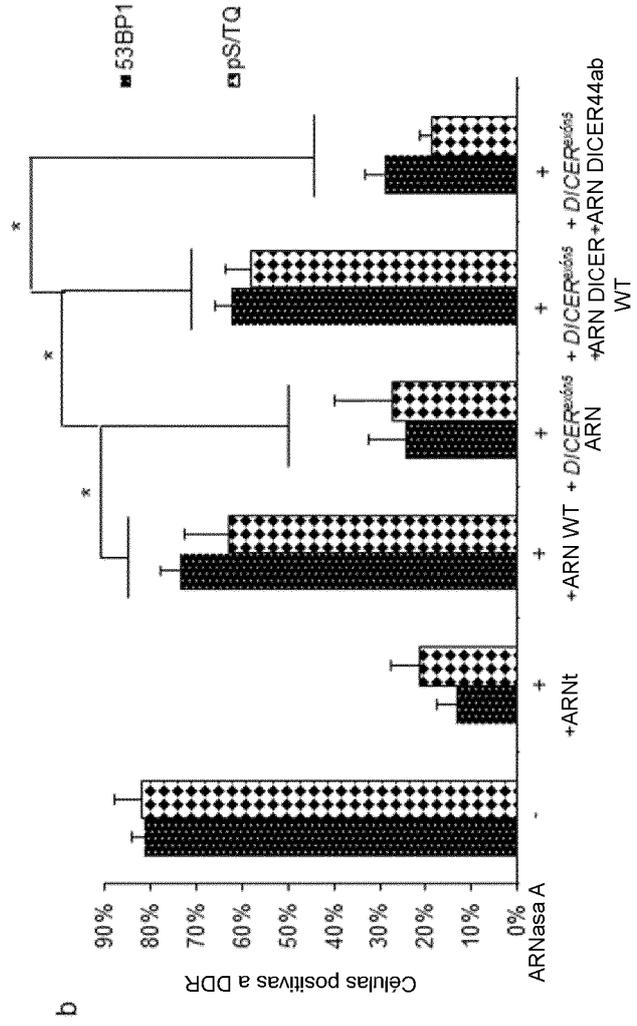
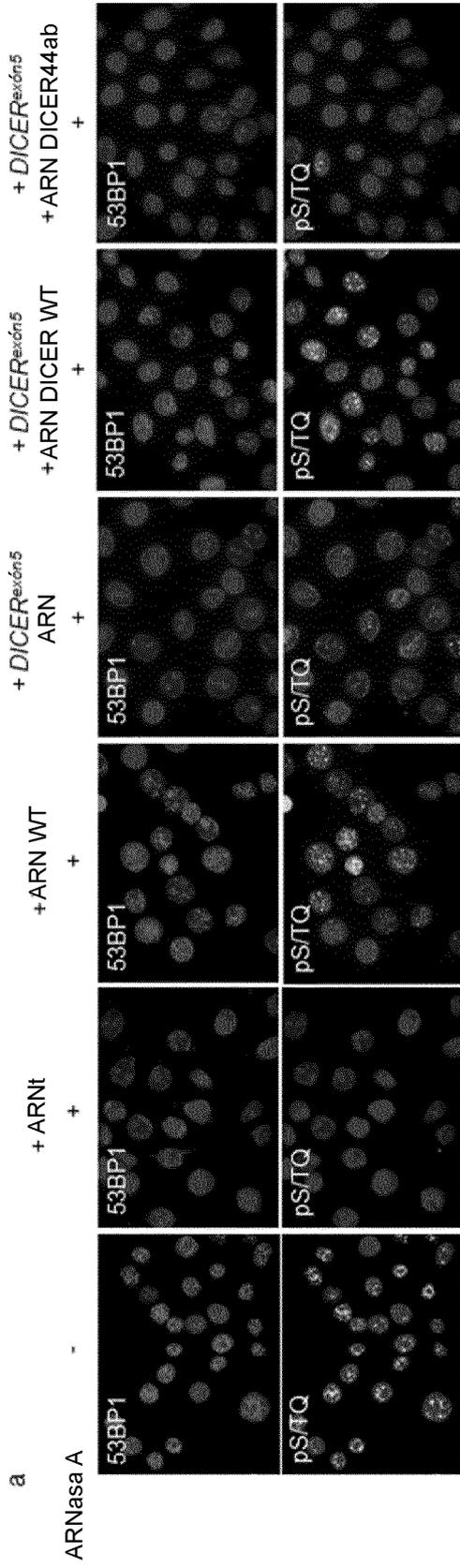


Fig. 27

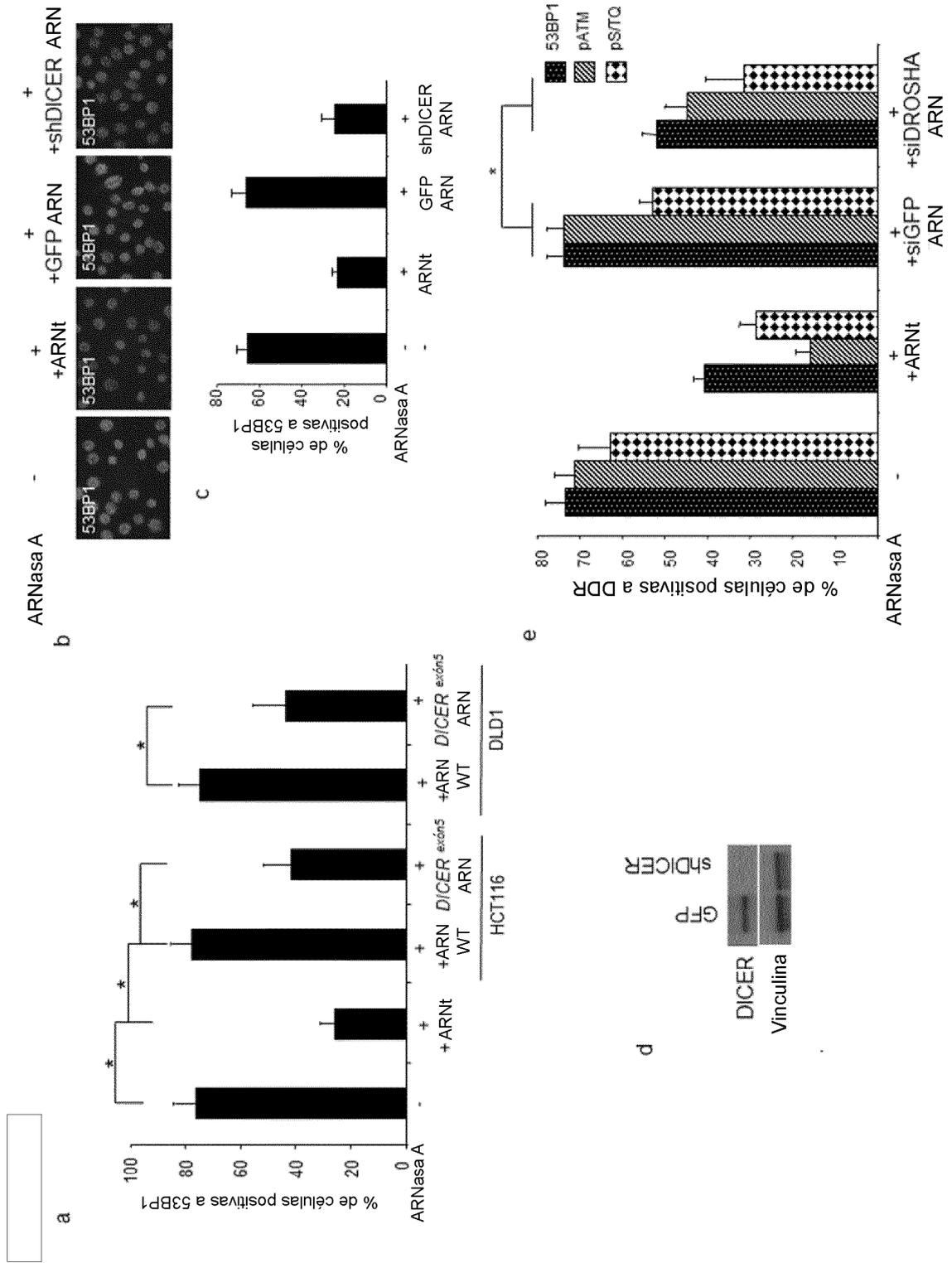


Fig. 28

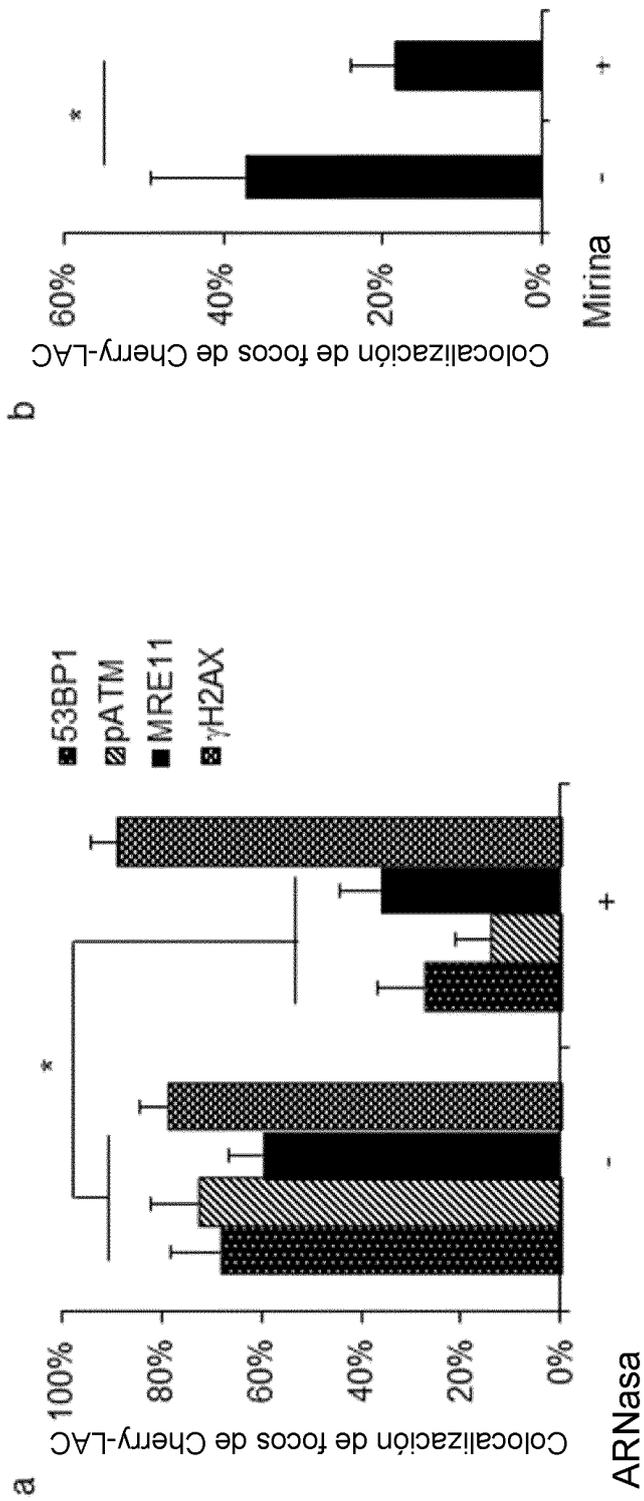


Fig. 29

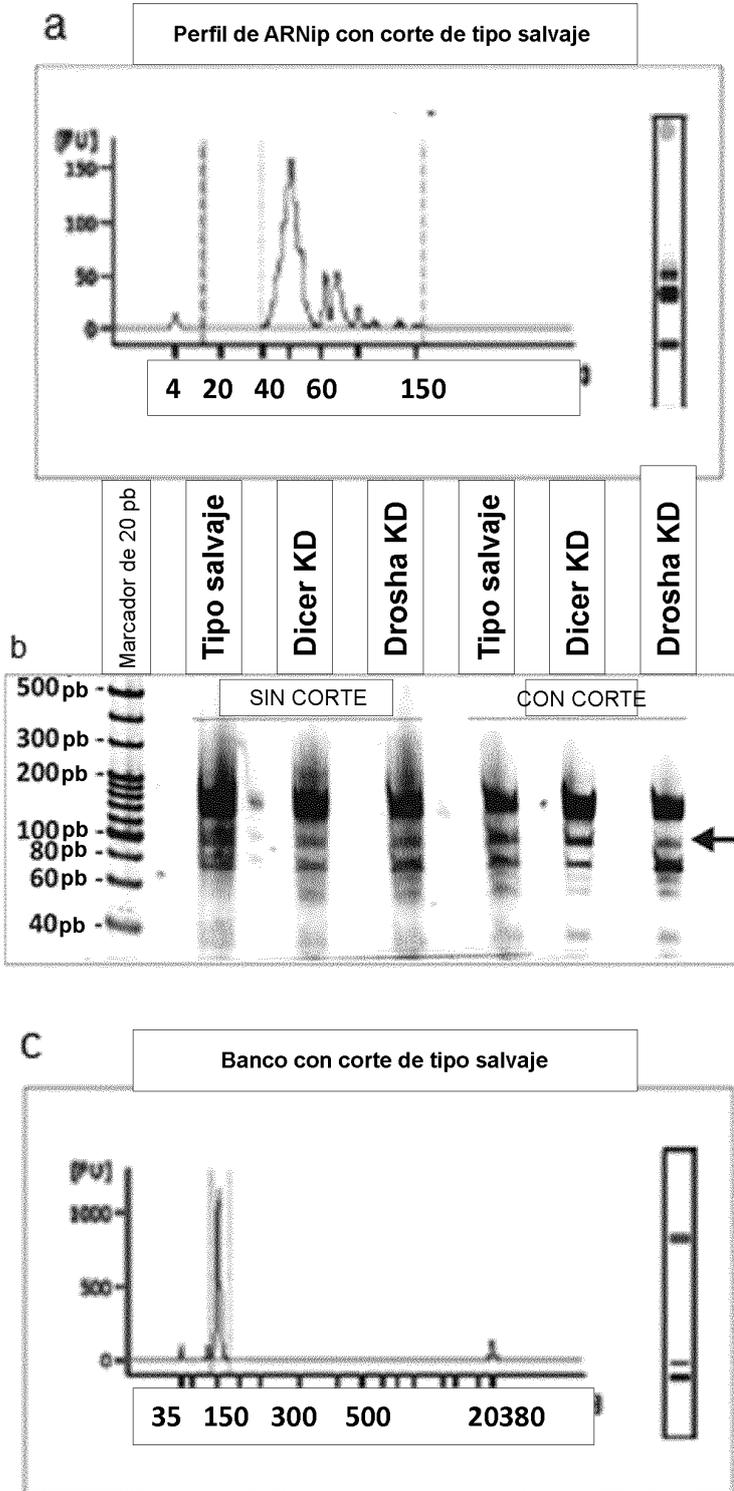
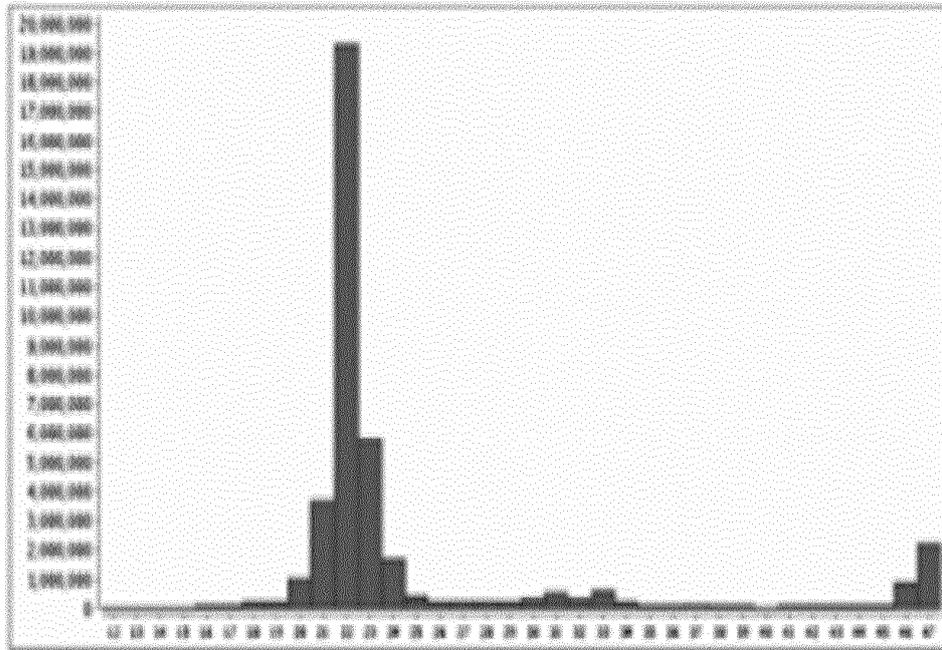


Fig. 31

d

Distribución de la longitud de marcadores en tipo salvaje sin corte



g

Distribución de la longitud de marcadores en tipo salvaje con corte

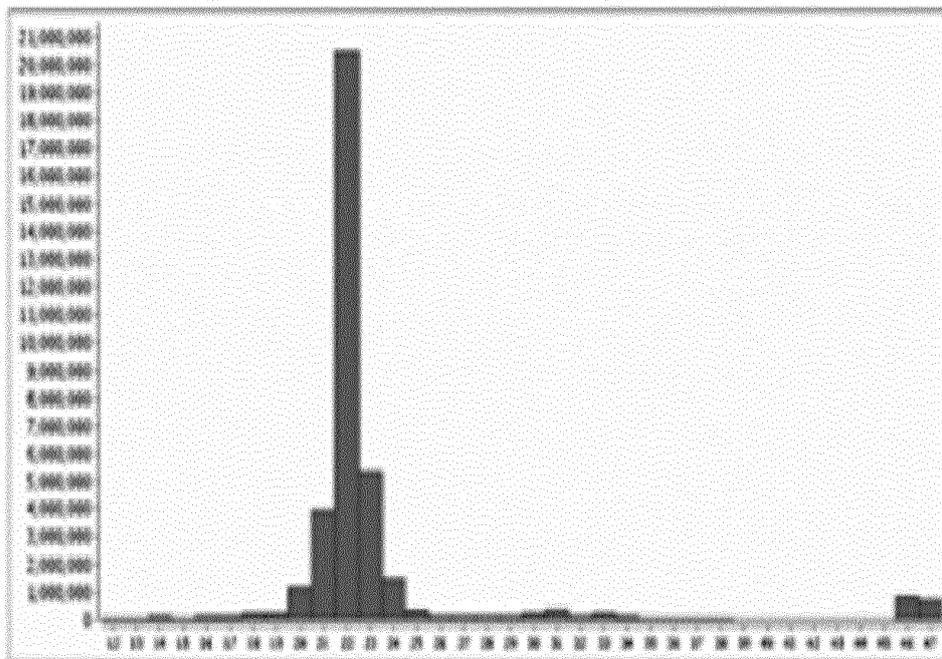
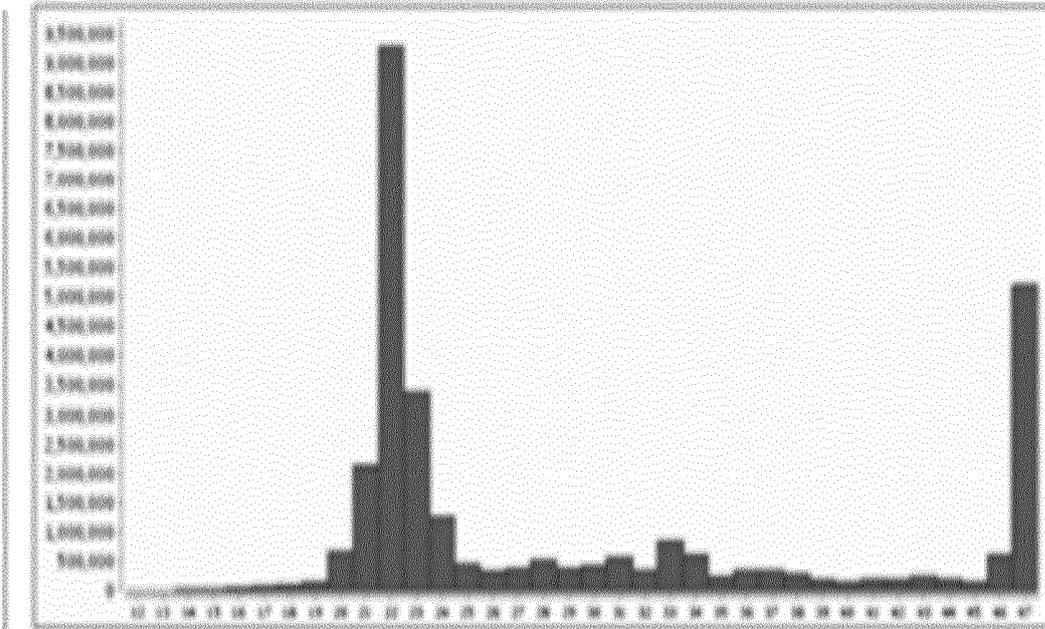


Fig. 31

e

Distribución de la longitud de marcadores en Dicer KD sin corte



h

Distribución de la longitud de marcadores en Dicer KD con corte

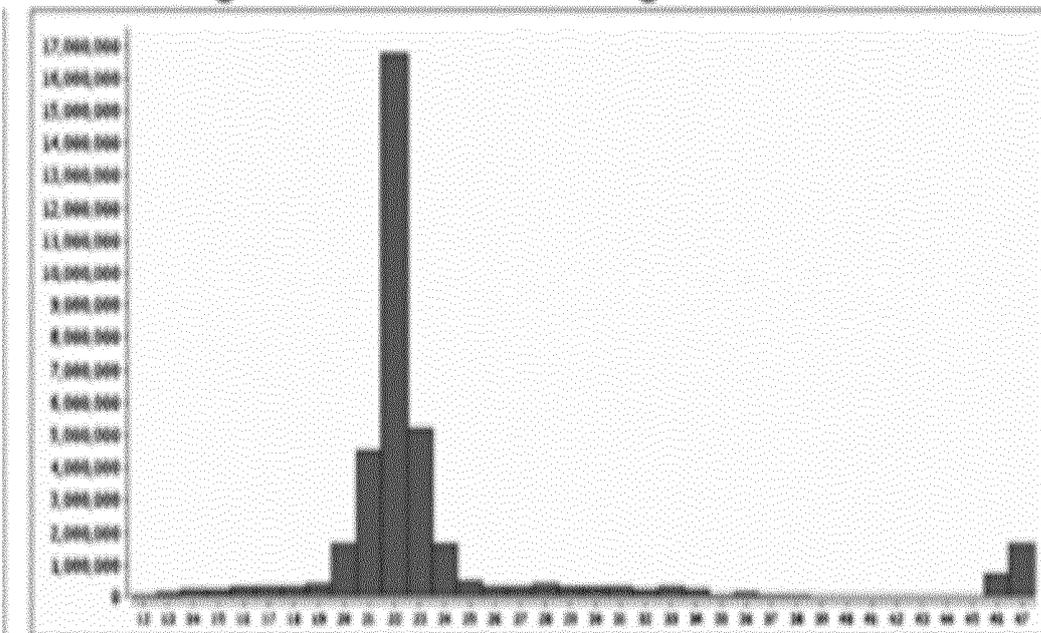
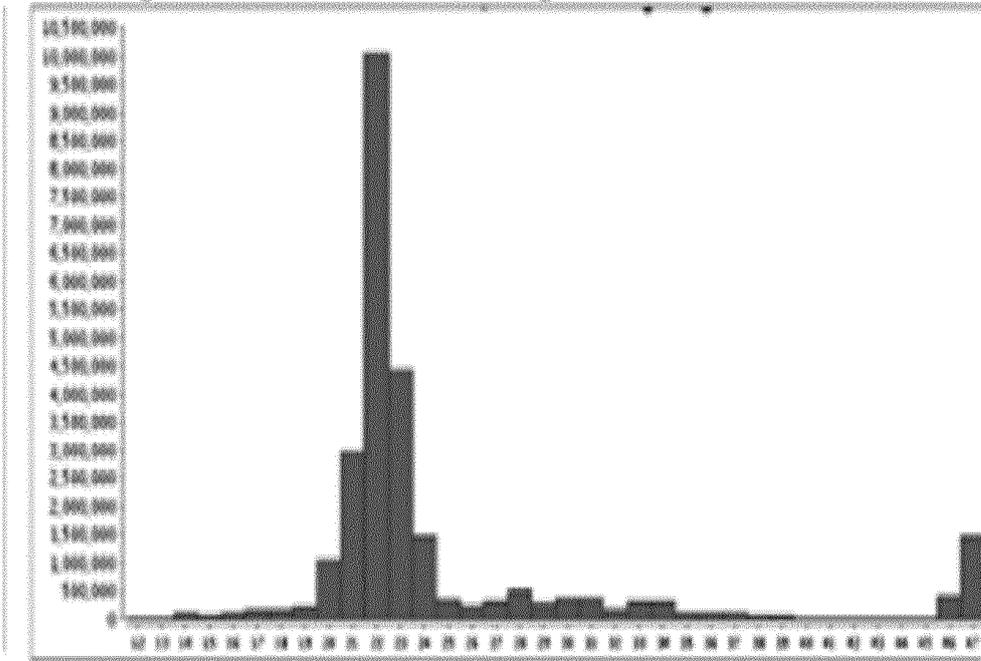


Fig. 31

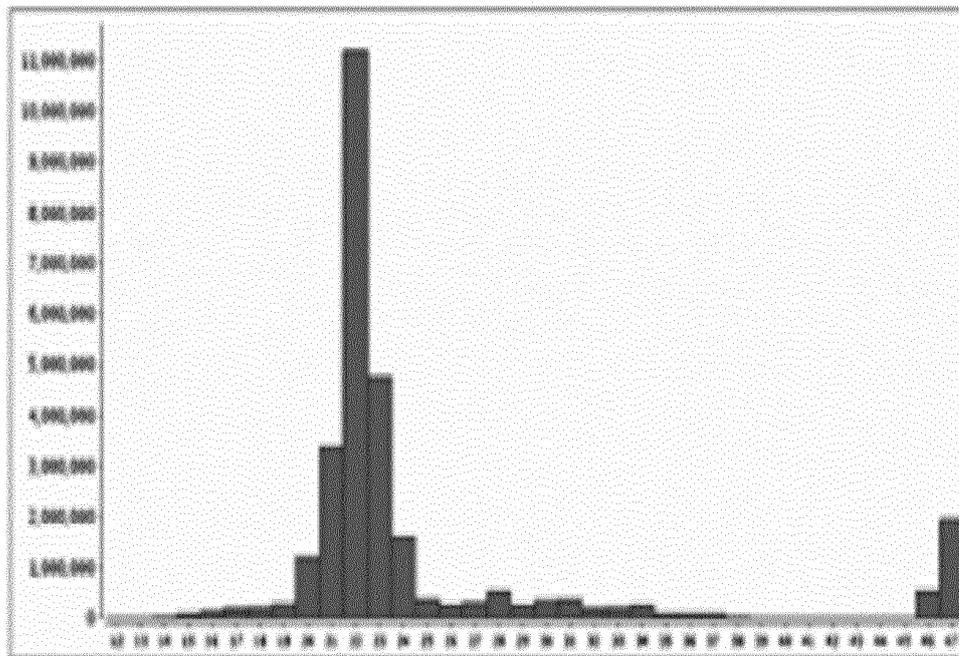
f

Distribución de la longitud de marcadores en Drosha KD sin corte



i

Distribución de la longitud de marcadores en Drosha KD sin corte



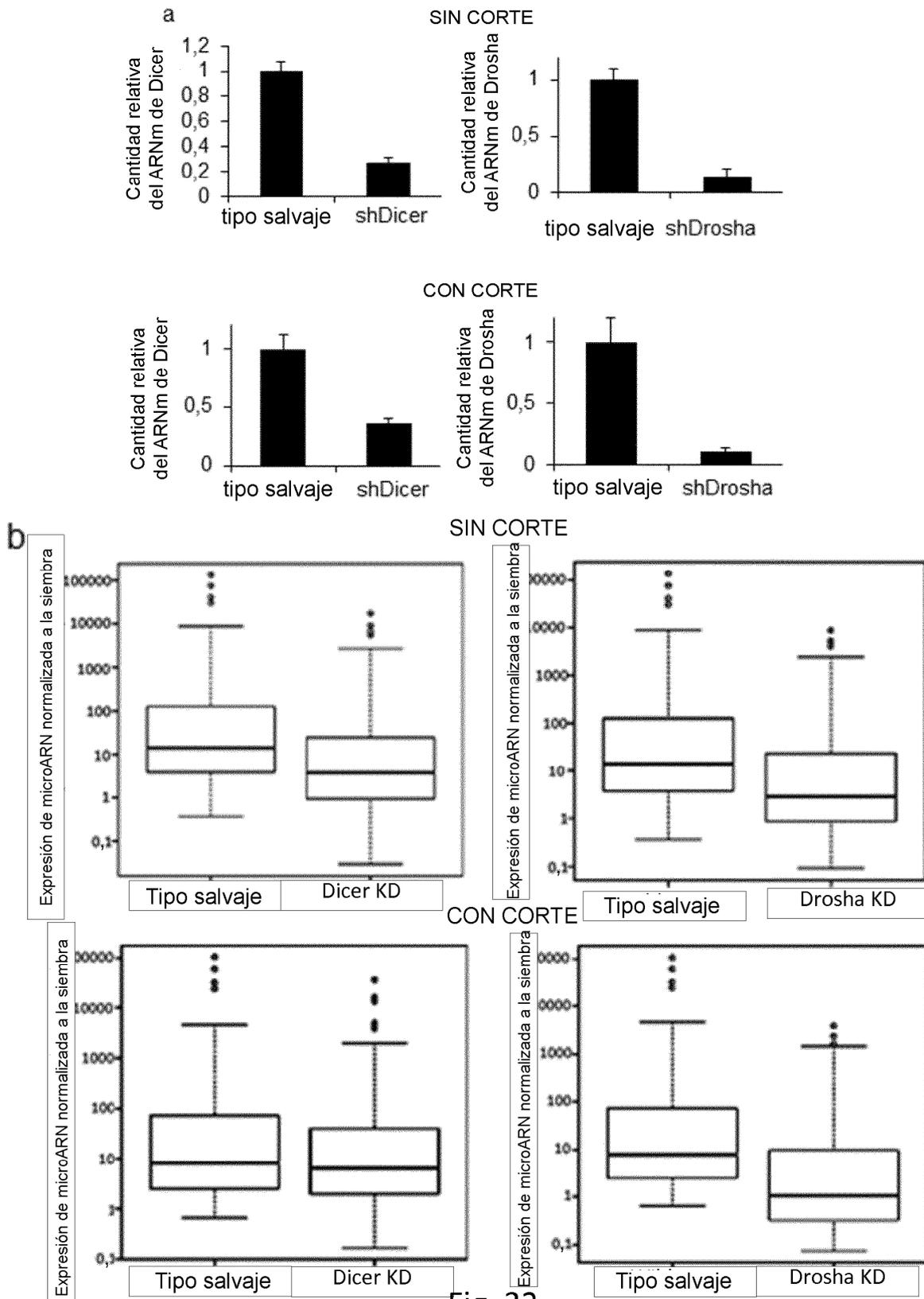


Fig. 32

a

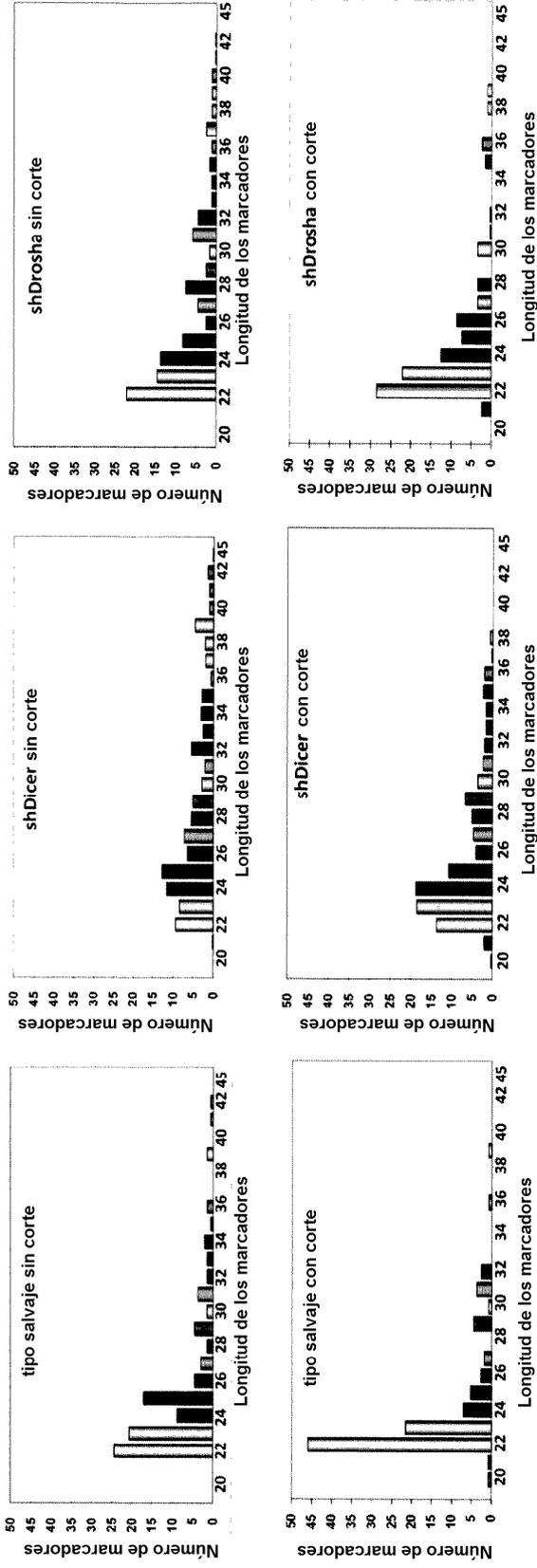
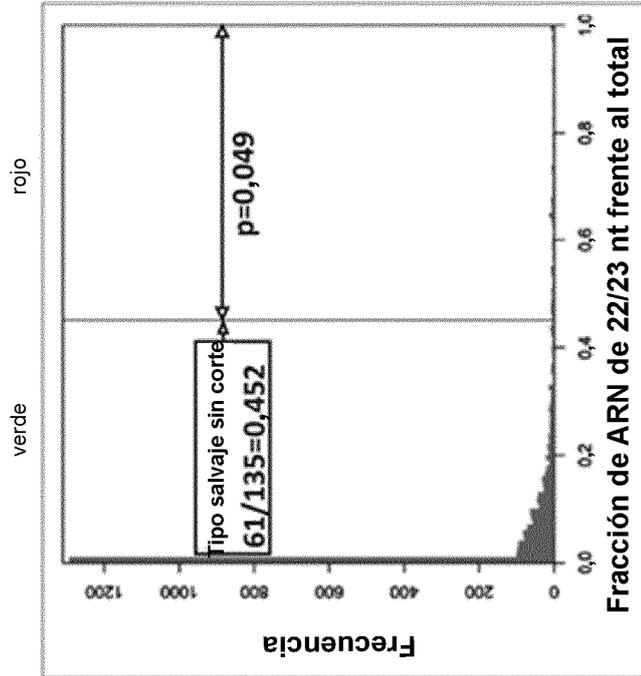
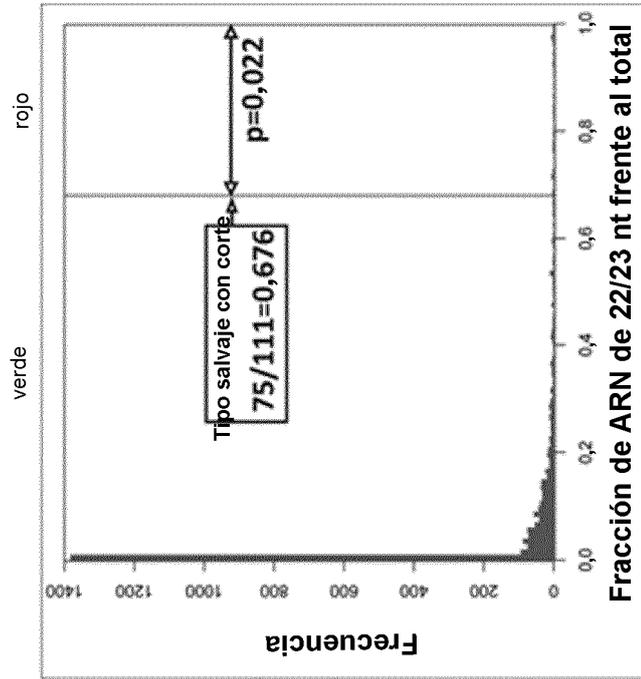


Fig. 33



b

Fig. 33

a

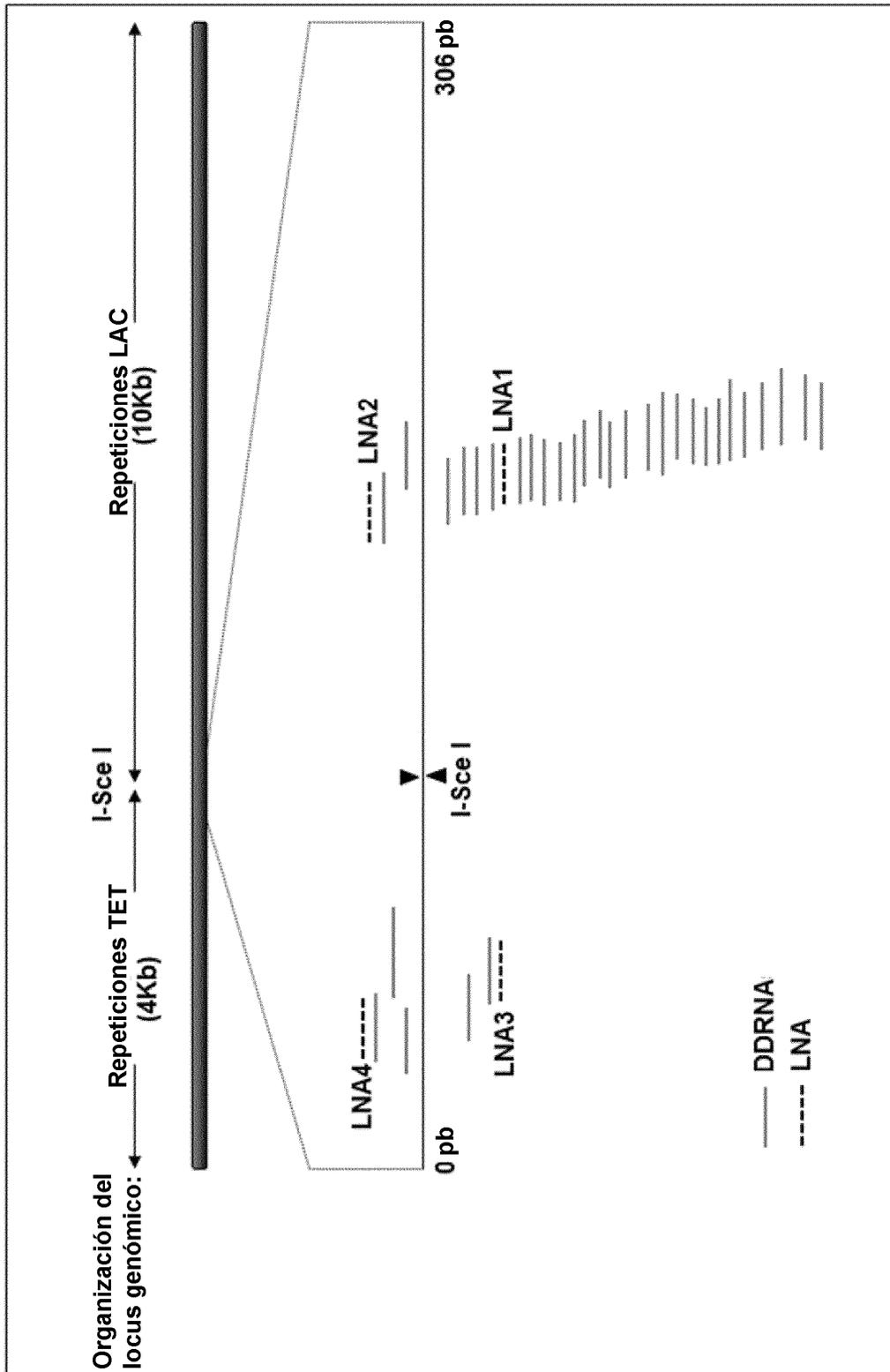


Fig. 34

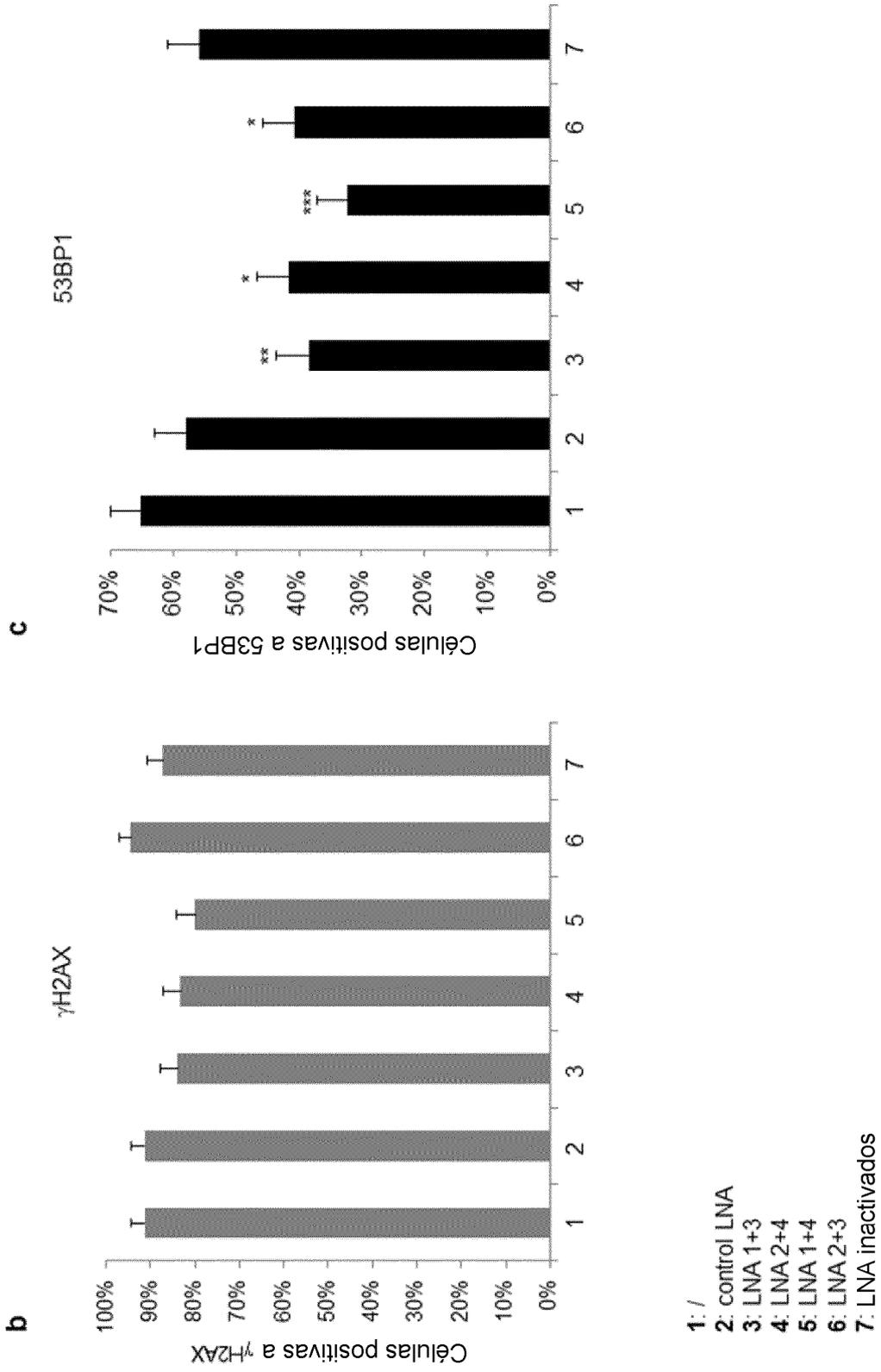


Fig. 34

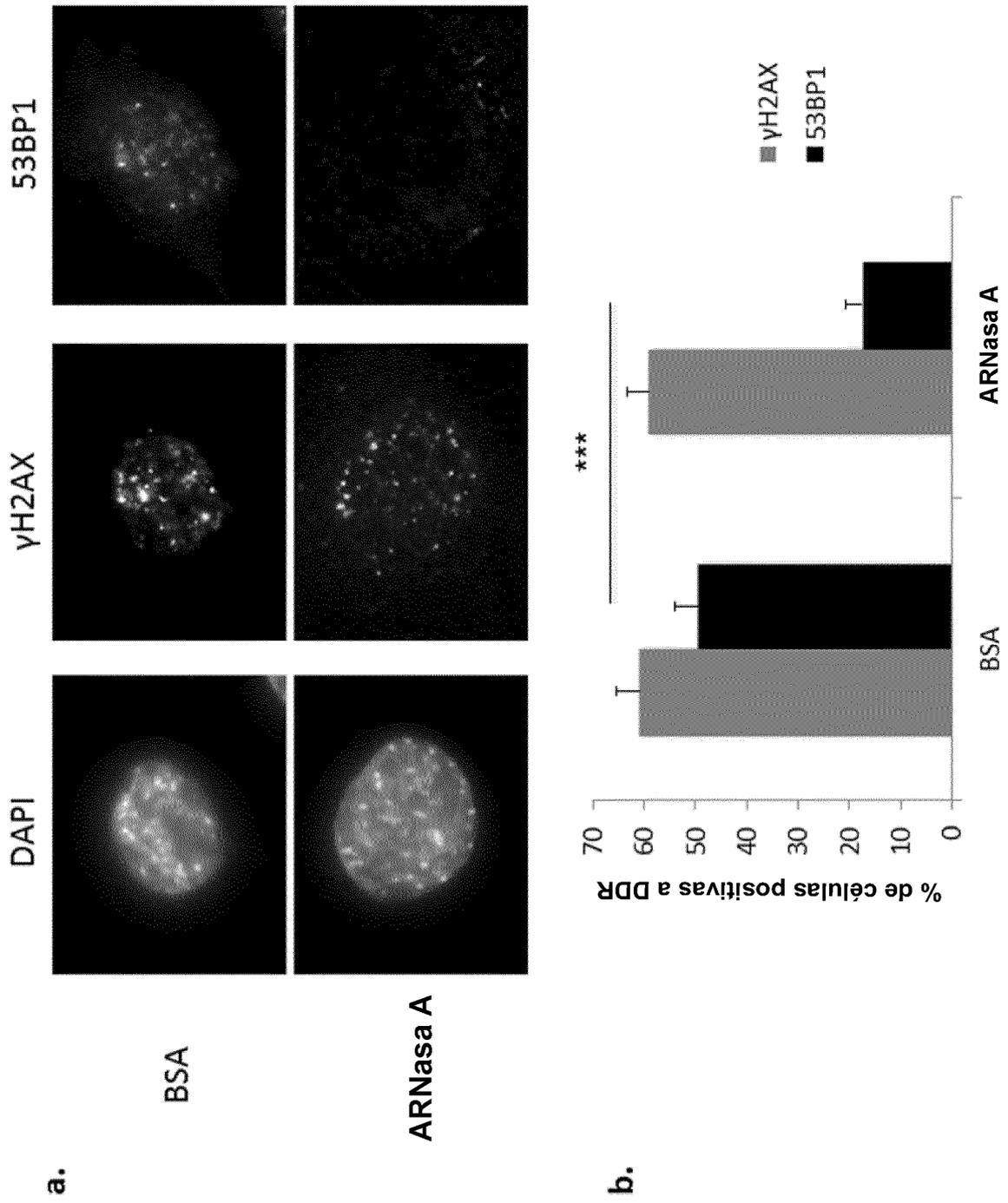


Fig. 35

