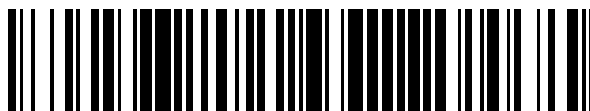


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 957**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2001 E 14176605 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2813582**

54 Título: **Moléculas pequeñas de ARN que median en la interferencia de ARN**

30 Prioridad:

**01.12.2000 EP 00126325
30.03.2001 US 279661 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.09.2017

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(50.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE y
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR
MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TUSCHL, THOMAS;
ELBASHIR, SAYDA;
LENDECKEL, WINFRIED;
WILM, MATTHIAS y
LÜHRMANN, REINHARD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 632 957 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

Moléculas pequeñas de ARN que median en la interferencia de ARN

La presente invención se refiere a la secuencia y las características estructurales de moléculas de ARN de doble hebra (ds) requeridas para mediar en la interferencia de ARN específica para una diana.

El término "interferencia de ARN" (iARN) se acuñó después del descubrimiento de la inyección de ARNs en el nematodo *C. elegans* conduce a una inactivación específica de genes altamente homólogos en secuencia con el ARNs aportado (Fire y cols., 1998). La iARN también se observó posteriormente en insectos, ranas (Oelgeschläger y cols., 2000) y otros animales incluyendo ratones (Svoboda y cols., 2000; Wianny y Zemicka-Goetz, 2000) y es probable que también exista en el ser humano. La iARN está muy relacionada con el mecanismo de inactivación génica postranscripcional (PTGS) de cosupresión en plantas y represión en hongos (Catalanotto y cols., 2000; Cogoni y Macino, 1999; Dalmay y cols., 2000; Ketting y Plasterk, 2000; Mourrain y cols., 2000; Smardon y cols., 2000) y algunos componentes de la maquinaria de la iARN también son necesarios para la inactivación postranscripcional mediante cosupresión (Catalanotto y cols., 2000; Dernburg y cols., 2000; Ketting y Plasterk, 2000). El asunto también se ha revisado recientemente (Bass, 2000; Boshier y Labouesse, 2000; Fire, 1999; Plasterk y Ketting, 2000; Sharp, 1999; Sijen y Kooter, 2000), véase además toda la edición de *Plant Molecular Biology*, vol. 43, edición 2/3, (2000).

En las plantas, además de PTGS, los transgenes introducidos también pueden conducir a inactivación génica transcripcional a través de metilación de ADN dirigida por ARN de citosinas (véanse las referencias del Wassenegger, 2000). Dianas genómicas tan cortas como 30 pb se metilan en plantas de un modo dirigido por ARN (Pelissier, 2000). La metilación de ADN también está presente en mamíferos.

La función natural de la iARN y la cosupresión parece ser la protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles tales como retrotransposones y virus que producen ARN o ARNs aberrantes en la célula hospedadora cuando se hacen activos (Jensen y cols., 1999; Ketting y cols., 1999; Ratcliff y cols., 1999; Tabara y cols., 1999). La degradación específica de ARNm evitar la replicación de transposones y virus aunque algunos virus son capaces de vencer o evitar este proceso al expresar proteínas que suprimen PTGS (Lucy y cols., 2000; Voinnet y cols., 2000).

El ARNs desencadena la degradación específica de ARN homólogos solo dentro de la región de identidad con el ARNs (Zamore y cols., 2000). El ARNs es procesado hasta fragmentos de ARN de 21-23 nt y los sitios de escisión del ARN diana están separados regularmente 21-23 nt. Por lo tanto, se ha sugerido que los fragmentos de 21-23 nt son los ARN guía para el reconocimiento de la diana (Zamore y cols., 2000). Estos ARN cortos también se detectaron en extractos preparados a partir de células de *D. melanogaster* que se transfectaron con ARNs antes de la lisis celular (Hammond y cols., 2000), sin embargo, las fracciones que desplegaban actividad de nucleasa específica de la secuencia también contenían una fracción grande de ARNs residual. El papel de los fragmentos de 21-23 nt en la escisión de ARNm guía está apoyado adicionalmente por la observación de que los fragmentos de 21-23 nt aislados de ARNs procesado son capaces, hasta algún grado, de mediar en la degradación específica de ARNm (Zamore y cols., 2000). Moléculas de ARN de tamaño similar también se acumulan en tejido vegetal que exhibe PTGS (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Bass (Cell 2000, 101 (3):235-238) revisa el mecanismo implicado en la iARN y postula posibles mecanismos implicados en la iARN.

En la presente, se usa el sistema in vitro de *Drosophila* establecido (Tuschl y cols., 1999; Zamore y cols., 2000) para explorar adicionalmente el mecanismo de iARN. Se demuestra que los ARN cortos de 21 y 22 nt, cuando se someten a apareamiento de bases con extremos salientes 3', actúan como los ARN guía para la degradación de ARNm específica para la secuencia. Los ARNs cortos de 30 pb son incapaces de mediar en la iARN en este sistema debido a que ya no son procesados hasta ARN de 21 y 22 nt. Por otra parte, se definieron los sitios de escisión de ARN diana con relación a ARN interferentes cortos (ARNsi) de 21 y 22 nt y se proporciona una evidencia de que la dirección del procesamiento de ARNs determina si un ARN diana de sentido o antisentido puede ser escindido por el complejo de endonucleasa siRNP producido. Además, los ARNsi también pueden ser herramientas importantes para la modulación transcripcional, p. ej. la inactivación de genes de mamífero al guiar la metilación de ADN.

Experimentos adicionales en sistemas de cultivo celular in vivo humanos (células HeLa) muestran que las moléculas de ARN de doble hebra que tienen una longitud preferiblemente de 19-25 nucleótidos tienen actividad de iARN. Así, en contraste con los resultados de *Drosophila*, también las moléculas de ARN de doble hebra de 24 y 25 nt de longitud son eficaces para la iARN.

El objetivo subyacente a la presente invención es proporcionar nuevos agentes capaces de mediar en la interferencia de ARN específica para una diana, teniendo dichos agentes una eficacia y una seguridad mejoradas en comparación con agentes de la técnica anterior.

La solución de este problema se proporciona mediante una molécula de ARN de doble hebra aislada, en donde cada hebra de ARN tiene una longitud de 19-23 nucleótidos, en donde dicha molécula de ARN es capaz de mediar en la interferencia de ARN específica para una diana. Una hebra tiene un saliente 3' de 1-3 nucleótidos, preferiblemente 2 nucleótidos. La otra hebra es de extremo romo.

La molécula de ARN es preferiblemente una molécula de ARN sintética que está sustancialmente libre de contaminantes que se presentan en extractos celulares, p. ej. de embriones de *Drosophila*. Además, la molécula de ARN preferiblemente está sustancialmente libre de cualesquiera contaminantes no específicos para una diana, particularmente moléculas de ARN no específicas para una diana, p. ej. de contaminantes que se presentan en extractos celulares.

Además, la divulgación se refiere al uso de moléculas de ARN de doble hebra aisladas, en las que cada hebra de ARN tiene una longitud de 19-25 nucleótidos, para mediar en modificaciones de ácidos nucleicos no específicas para una diana, particularmente iARN, en células de mamífero, particularmente en células humanas.

Sorprendentemente, se encontró que las moléculas de ARN de doble hebra cortas sintéticas, particularmente con extremos 3' salientes, son mediadores específicos para una secuencia de iARN y median en la escisión eficaz de ARN diana, en donde el sitio de escisión está situado en el centro de la región abarcada por el ARN corto de guía.

Preferiblemente, cada hebra de la molécula de ARN tiene una longitud de 20-22 nucleótidos (o 20-25 nucleótidos en células de mamífero), en donde la longitud de cada hebra puede ser igual o diferente. Preferiblemente, la longitud del saliente 3' alcanza de 1-3 nucleótidos, en donde la longitud del saliente puede ser igual o diferente para cada hebra. Las hebras de ARN tienen preferiblemente grupos hidroxilo 3'. El extremo 5' comprende preferiblemente un grupo fosfato, difosfato, trifosfato o hidroxilo. Los ARNs más eficaces están compuestos por dos hebras de 21 que están apareadas de modo que estén presentes salientes 3' de 1-3, particularmente 2 nt, en ambos extremos del ARNs.

La reacción de escisión de ARN diana guiada por ARNs es altamente específico para una secuencia. Sin embargo, no todas las posiciones de un ARNs contribuyen igualmente al reconocimiento de la diana. Los desemparejamientos en el centro del dúplex de ARNs son los más críticos y suprimen esencialmente la escisión del ARN diana. En contraste, el nucleótido 3' de la hebra de ARNs (p. ej. la posición 21), que es complementaria al ARN diana de una sola hebra, no contribuye a la especificidad del reconocimiento de la diana. Además, la secuencia del saliente 3' de dos 2 nt desapareado de la hebra de ARNs con la misma polaridad que el ARN diana no es crítica para la escisión del ARN diana ya que solamente la hebra de ARNs antisentido guía el reconocimiento de la diana. Así, a partir de los nucleótidos salientes de una sola hebra, solo la penúltima posición del ARNs antisentido (p. ej. la posición 20) necesita emparejarse al ARNm de sentido elegido como diana.

Sorprendentemente, las moléculas de ARN de doble hebra de la presente invención exhiben una alta estabilidad in vivo en suero o en medio de crecimiento para cultivos celulares. A fin de potenciar más la estabilidad, los salientes 3' se pueden estabilizar contra la degradación, p. ej. se pueden seleccionar de modo que consistan en nucleótidos de purina, particularmente nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, p. ej. la sustitución de salientes 3' de 2 nt de uridina por 2'-desoxitimidina es tolerada y no afecta a la eficacia de la interferencia de ARN. La ausencia de un hidroxilo 2' potencia significativamente la resistencia a nucleasa del saliente en medio de cultivo tisular.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, la molécula de ARN puede contener al menos un análogo nucleotídico modificado. Los análogos nucleotídicos pueden estar situados en posiciones en las que la actividad específica para una diana, p. ej. la actividad mediadora de iARN, no se ve sustancialmente afectada, p. ej. en una región en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ARN de doble hebra. Particularmente, los salientes se pueden estabilizar al incorporar análogos nucleotídicos modificados.

Análogos nucleotídicos preferidos se seleccionan de ribonucleótidos modificados en el azúcar o el esqueleto. Sin embargo, se debe apuntar que también son adecuados ribonucleótidos modificados en la nucleobase, es decir ribonucleótidos, que contienen una nucleobase no presente en la naturaleza en lugar de una nucleobase presente en la naturaleza tal como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, p. ej. 5-(2-amino)propiluridina, 5-bromouridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, p. ej. 8-bromoguanosina; desazanucleótidos, p. ej. 7-desaza-adenosina; nucleótidos alquilados en O y N, p. ej. N6-metiladenosina. En ribonucleótidos modificados en el azúcar preferidos, el grupo 2' OH se reemplaza por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es alquilo C₁-C₆, alquenoilo o alquínilo y halo es F, Cl, Br o I.

En ribonucleótidos modificados en el esqueleto preferidos, el grupo fosfoéster que conecta con ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo modificado, p. ej. de un grupo fosfotioato. Se debe apuntar que las modificaciones anteriores se pueden combinar.

La secuencia de la molécula de ARN de doble hebra de la presente invención tiene que tener una identidad suficiente con una molécula diana de ácido nucleico a fin de mediar en la iARN específica para una diana. Preferiblemente, la secuencia tiene una identidad de al menos 70% con la molécula diana deseada en la porción de doble hebra de la molécula de ARN. Más preferiblemente, la identidad es al menos 85% y lo más preferiblemente 100% en la porción de doble hebra de la molécula de ARN. La identidad de una molécula de ARN de doble hebra con una molécula diana de ácido nucleico predeterminada, p. ej. una molécula diana de ARNm, se puede determinar como sigue:

$$I = \frac{n}{L} \times 100$$

en donde I es la identidad en porcentaje, n es el número de nucleótidos idénticos en la porción de doble hebra del ARNs y la diana y L es la longitud del saliente de secuencias de la porción de doble hebra del ARNs y la diana.

Alternativamente, la identidad de la molécula de ARN de doble hebra con la secuencia diana también se puede definir incluyendo el saliente 3', particularmente un saliente que tiene una longitud de 1-3 nucleótidos. En este caso, la identidad de secuencia es preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70% y lo más preferiblemente al menos 85% con la secuencia diana. Por ejemplo, los nucleótidos desde el saliente 3' y hasta 2 nucleótidos desde el extremo 5' y/o 3' de la doble hebra se pueden modificar sin una pérdida de actividad significativa.

La molécula de ARN de doble hebra de la invención se puede preparar mediante un método que comprende las etapas:

(a) sintetizar dos hebras de ARN que tienen cada una una longitud de 19-23 nucleótidos, en donde dichas hebras de ARN son capaces de formar una molécula de ARN de doble hebra, en donde una hebra tiene un saliente 3' de 1-3 nucleótidos y una hebra es de extremo romo.

(b) combinar las hebras de ARN sintetizadas bajo condiciones en las que se forma una molécula de ARN de doble hebra, que es capaz de mediar en la interferencia de ARN específica para una diana.

Se conocen en la técnica métodos para sintetizar moléculas de ARN. En este contexto, se refiere particularmente a métodos de síntesis química como los descritos en Verma y Eckstein (1998).

Los ARN de una sola hebra también se pueden preparar mediante la transcripción enzimática a partir de plantillas de ADN sintéticas o a partir de plásmidos de ADN aislados de bacterias recombinantes. Típicamente, se usan ARN polimerasas fágicas tales como ARN polimerasa de T7, T3 o SP6 (Milligan y Uhlenbeck (1989)).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método in vitro para mediar en la interferencia de ARN específica para una diana en una célula, que comprende las etapas:

(a) poner en contacto la célula con la molécula de ARN de doble hebra de la invención bajo condiciones en las que se pueda producir interferencia de ARN específica para una diana y

(b) mediar en una interferencia de ARN específica para una diana efectuada por el ARN de doble hebra hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia sustancialmente correspondiente al ARN de doble hebra.

Preferiblemente, la etapa de contacto (a) comprende introducir la molécula de ARN de doble hebra en una célula diana, p. ej. una célula diana aislada, p. ej. en cultivo celular, un microorganismo unicelular o una célula diana o una pluralidad de células diana. Más preferiblemente, la etapa de introducción comprende un aporte mediado por portador, p. ej. por portadores liposómicos o por inyección.

El método de la invención se puede usar para determinar la función de un gen en una célula o un organismo o incluso para modular la función de un gen en una célula o un organismo, siendo capaz de mediar en la interferencia de ARN. Preferiblemente, la célula es una célula o una línea celular eucariótica, p. ej. una célula vegetal o una célula animal, tal como una célula de mamífero, p. ej. una célula embrionaria, un citoblasto pluripotente, una célula tumoral, p. ej. una célula de teratocarcinoma o una célula infectada con virus. El organismo es preferiblemente un organismo eucariótico, p. ej. una planta o un animal, tal como un mamífero, particularmente un ser humano.

El gen diana al que se dirige la molécula de ARN de la invención puede estar asociado con una afección patológica. Por ejemplo, el gen puede ser un gen asociado a patógenos, p. ej. un gen viral, un gen asociado a tumores o un gen asociado a enfermedades autoinmunitarias. El gen diana también puede ser un gen heterólogo expresado en una célula recombinante o un organismo genéticamente alterado. Al determinar o modular, particularmente inhibir, la

función de este gen, se pueden obtener una información valiosa y beneficios terapéuticos en el campo agrícola o en el campo de la medicina o la medicina veterinaria.

El ARNs se administra habitualmente como una composición farmacéutica. La administración se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, en los que un ácido nucleico se introduce en una célula diana deseada in vitro o in vivo. Técnicas de transferencia génica comúnmente usadas incluyen fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación y microinyección y métodos virales (Graham, F.L. y van der Eb, A.J. (1973) *Virology* 52, 456; McCutchan, J.H. y Pagano, J.S. (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351; Chu, G. y cols (1987), *Nucl. Acids Res.* 15, 1311; Fraley, R. y cols. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10431; Capecchi, M.R. (1980), *Cell* 22, 479). Una adición reciente a este conjunto de técnicas para la introducción de ADN en células es el uso de liposomas catiónicos (Felgner, P.L. y cols. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 7413). Formulaciones lipídicas catiónicas disponibles comercialmente son, p. ej., Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin2000 (Life Technologies).

Así, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene como un agente activo al menos una molécula de ARN de doble hebra como la descrita anteriormente y un portador farmacéutico. La composición se puede usar para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en medicina humana o en medicina veterinaria.

Para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas, la composición puede estar en la forma de una solución, p. ej. una solución inyectable, una crema, una pomada, un comprimido, una suspensión o similares. La composición se puede administrar de cualquier modo adecuado, p. ej. mediante inyección, mediante aplicación oral, tópica, nasal, rectal, etc. El portador puede ser cualquier portador farmacéutico adecuado. Preferiblemente, se usa un portador que sea capaz de incrementar la eficacia de las moléculas de ARN para entrar en las células diana. Ejemplos adecuados de estos portadores son liposomas, particularmente liposomas catiónicos. Un método de administración más preferido es la inyección.

Una aplicación preferida adicional del método de iARN es un análisis funcional de células eucarióticas, u organismos eucarióticos no humanos, preferiblemente células u organismos mamíferos y lo más preferiblemente células humanas, p. ej. líneas celulares tales como HeLa o 293 o roedores, p. ej. ratas y ratones. Mediante transfección con moléculas de ARN de doble hebra adecuadas que son homólogas a un gen diana predeterminado o moléculas de ADN que codifican una molécula de ARN de doble hebra adecuada, se puede obtener un fenotipo de desactivación específico en una célula diana, p. ej. en un cultivo celular o en un organismo diana. Sorprendentemente, se encontró que la presencia de moléculas de ARN de doble hebra cortas no da como resultado una respuesta de interferones desde la célula hospedadora o el organismo hospedador.

Así, se divulga en la presente además una célula eucariótica o un organismo eucariótico no humano que exhibe un fenotipo de desactivación específico para un gen diana que comprende una expresión al menos parcialmente deficiente de al menos un gen diana endógeno en donde dicha célula u organismo es transfectado con al menos una molécula de ARN de doble hebra capaz de inhibir la expresión de al menos un gen diana endógeno o con un ADN que codifica al menos una molécula de ARN de doble hebra capaz de inhibir la expresión de al menos un gen diana endógeno. Se debe apuntar que la presente divulgación permite la desactivación específica para la diana de varios genes endógenos diferentes debido a la especificidad de iARN.

Fenotipos de desactivación específicos de un gen de células u organismos no humanos, particularmente de células humanas o mamíferos no humanos se pueden usar en procedimientos analíticos, p. ej. en el análisis funcional y/o fenotípico de procesos fisiológicos complejos tales como el análisis de perfiles de expresión génica y/o proteomas. Por ejemplo, se pueden preparar los fenotipos de desactivación de genes humanos en células cultivadas que se supone que son reguladores de procesos de empalme alternativos. Entre estos genes están particularmente los miembros de la familia de factores de empalme SR, p. ej. ASF/SF2, SC35, SRp20, SRp40 o SRp55. Además, se puede analizar el efecto de proteínas SR sobre los perfiles de ARNm de genes alternativamente sometidos a empalme predeterminados tales como CD44. Preferiblemente, el análisis se lleva a cabo mediante métodos de alto rendimiento usando chips basados en oligonucleótidos.

Usando tecnología de desactivación basadas en iARN, la expresión de un gen diana endógeno se puede inhibir en una célula diana o un organismo diana. El gen endógeno se puede complementar mediante un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una variante o forma mutada de la proteína diana, p. ej. un gen o un ADNc, que opcionalmente se puede fusionar a una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un péptido o polipéptido detectable, p. ej. un marcador de afinidad, particularmente un marcador de afinidad múltiple. Las variantes o formas mutadas del gen diana difieren del gen diana endógeno en que codifican un producto génico que difiere del producto génico endógeno a nivel de los aminoácidos por sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos individuales o múltiples. Las variantes o las formas mutadas pueden tener la misma actividad biológica que el gen diana endógeno. Por otra parte, el gen diana variante o mutado también puede tener una actividad biológica, que difiere de la actividad biológica del gen diana endógeno, p. ej. una actividad parcialmente eliminada, una actividad completamente eliminada, una actividad potenciada, etc.

La complementación se puede efectuar al coexpresar el polipéptido codificado por el ácido nucleico exógeno, p. ej. una proteína de fusión que comprende la proteína diana y el marcador de afinidad y la molécula de ARN de doble

hebra para desactivar el gen endógeno en la célula diana. Esta coexpresión se puede efectuar al usar un vector de expresión adecuado que expresa tanto el polipéptido codificado por el ácido nucleico exógeno, p. ej. la proteína diana modificada con marcador, como la molécula de ARN de doble hebra o alternativamente al usar una combinación de vectores de expresión. Las proteínas y los complejos proteínicos que se sintetizan de novo en la célula diana contendrán el producto génico exógeno, p. ej. la proteína de fusión modificada. A fin de evitar la supresión de la expresión del producto génico endógeno por la molécula de dúplex de iARN, la secuencia nucleotídica que codifica el ácido nucleico exógeno se puede alterar a nivel del ADN (con o sin provocar mutaciones a nivel de los aminoácidos) en la parte de la secuencia que es homóloga a la molécula de ARN de doble hebra. Alternativamente, el gen diana endógeno puede estar complementado por las correspondientes secuencias nucleotídicas de otras especies, p. ej. de ratón.

Aplicaciones preferidas para la célula o el organismo de la divulgación son el análisis de perfiles de expresión génica y/o proteomas. En una realización especialmente preferida, se lleva a cabo un análisis de una forma variante o mutante de una o varias proteínas diana, en donde dichas formas variantes o mutantes se reintroducen en la célula o el organismo mediante un ácido nucleico diana exógeno según se describe anteriormente. La combinación de la desactivación de un gen endógeno y el rescate al usar una diana exógena mutada, p. ej. parcialmente eliminada, tiene ventajas en comparación con el uso de una célula desactivada. Además, este método es particularmente adecuado para identificar dominios funcionales de la proteína diana. En una realización preferida adicional, se lleva a cabo una comparación, p. ej. de perfiles de expresión génica y/o proteomas y/o características fenotípicas de al menos dos células u organismos. Estos organismos se seleccionan de:

- (i) una célula de control o un organismo de control sin inhibición del gen diana,
- (ii) una célula o un organismo con inhibición del gen diana y
- (iii) una célula o un organismo con inhibición del gen diana más complementación del gen diana por un ácido nucleico diana exógeno.

El método y la célula de la invención también son adecuados en un procedimiento para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos, p. ej. identificar nuevos agente farmacológicos de una colección de sustancias de prueba y/o caracterizar mecanismos de acción y/o efectos secundarios de agente farmacológicos conocidos.

Así, también se divulga un sistema para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos que actúan sobre al menos una proteína diana, que comprende:

- (a) una célula eucariótica o un organismo eucariótico no humano capaz de expresar al menos un gen diana endógeno que codifica dicha proteína diana,
- (b) al menos una molécula de ARN de doble hebra capaz de inhibir la expresión de dicho al menos un gen diana endógeno, y
- (c) una sustancia de prueba o una colección de sustancias de prueba en donde se han de identificar y/o caracterizar las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de prueba o dicha colección.

Además, el sistema que se describe anteriormente comprende preferiblemente:

- (d) al menos un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una forma variante o mutada de la proteína diana en donde dicho ácido nucleico diana exógeno difiere del gen diana endógeno a nivel del ácido nucleico de modo que la expresión del ácido nucleico diana exógeno sea sustancialmente menos inhibida por la molécula de ARN de doble hebra que la expresión del gen diana endógeno.

Por otra parte, el método de complementación por desactivación de ARN se puede usar con propósitos preparativos, p. ej. para la purificación por afinidad de proteínas o complejos proteínicos a partir de células eucarióticas, particularmente células de mamífero y más particularmente células humanas. En esta realización de la divulgación, el ácido nucleico diana exógeno codifica preferiblemente una proteína diana que está fusionada a un marcador de afinidad.

El método preparativo se puede emplear para la purificación de complejos proteínicos de alto peso molecular que preferiblemente tienen una masa de ≥ 150 kD y más preferiblemente de ≥ 500 kD y que opcionalmente pueden contener ácidos nucleicos tales como ARN. Ejemplos específicos son el complejo proteínico heterotr trímero que consiste en las proteínas de 20 kD, 60 kD y 90 kD de la partícula U4/U6 snRNP, el factor de empalme SF3b procedente de la 17S U2 snRNP que consiste en 5 proteínas que tienen pesos moleculares de 14, 49, 120, 145 y

155 kD y la partícula 25S U4/U6/U5 tri-snRNP que contiene las moléculas de ARN sn U4, U5 y U6 y aproximadamente 30 proteínas, que tiene un peso molecular de aproximadamente 1,7 MD.

Este método es adecuado para el análisis de proteomas funcionales en células de mamífero, particularmente células humanas.

Además, la presente invención se explica con más detalle en las siguientes figuras y ejemplos.

Leyendas de las figuras

Figura 1: ARN de doble hebra tan corto como 38 pb puede mediar en la iARN.

(A) Representación gráfica de ARNs usados para dirigirse a ARNm de Pp-luc. Se prepararon tres series de ARNs de extremos romos que cubrían un intervalo de 29 a 504 pb. La posición del primer nucleótido de la hebra de sentido del ARNs se indica con relación al codón de inicio de ARNm de Pp-luc (p1). (B) Ensayo de interferencia de ARN (Tuschl y cols., 1999). Las relaciones de actividad de Pp-luc diana a Rr-luc de control se normalizaron hasta un control de tampón (barra negra). Se preincubaron ARNs (5 nM) en lisado de *Drosophila* durante 15 min a 25°C antes de la adición de ARNm de Pp-luc y Rr-luc con caperuza de 7-metil-guanosina (-50 pM). La incubación se continuó durante otra hora y a continuación se analizó mediante el ensayo de luciferasa doble (Promega). Los datos son el promedio de al menos cuatro experimentos independientes $\pm$ desviación estándar.

Figura 2: Un ARNs de 29 pb ya no se procesa hasta fragmentos de 21-23 nt.

Transcurso del tiempo de la formación de 21-23 meros a partir del procesamiento de ARNs marcados con ^{32}P internamente (5 nM) en el lisado de *Drosophila*. Se indican la longitud y la fuente del ARNs. Un marcador del tamaño de ARN (M) se ha cargado en el carril izquierdo y se indican los tamaños de los fragmentos. Las bandas dobles en el tiempo cero se deben a ARNs desnaturalizado incompletamente.

Figura 3: Los ARNs cortos escinden la diana de ARNm una sola vez.

(A) Electroforesis en gel desnaturalizantes de los productos de escisión 5' estables producidos mediante la incubación de 1 h de ARN de sentido o antisentido 10 nM marcado con ^{32}P en la caperuza con ARNs 10 nM de la serie p133 en lisado de *Drosophila*. Se generaron marcadores de longitud mediante digestión parcial con nucleasa T1 e hidrólisis alcalina parcial (OH) del ARN diana marcado en la caperuza. Las regiones elegidas como diana por los ARNs se indican como barras negras en ambos lados. Se muestra el espacio de 20-23 nt entre los sitios de escisión predominantes para el ARNs de 111 pb de largo. La flecha horizontal indica escisión inespecífica no debida a iARN. (B) Posición de los sitios de escisión en ARN diana de sentido y antisentido. Las secuencias de los ARN diana de sentido de 177 nt y antisentido de 180 nt con caperuza se representan en orientación antiparalela de modo que las secuencia complementaria sean opuestas entre sí. La región elegida como diana por los diferentes ARNs se indican mediante barras de diferentes colores situadas entre las secuencia diana de sentido y antisentido. Los sitios de escisión se indican mediante círculos: círculo grande para escisión intensa, círculo pequeño para escisión débil. El grupo fosfato radiomarcado por ^{32}P se señala mediante un asterisco.

Figura 4: Fragmentos de ARN de 21 y 22 nt se generan mediante un mecanismo similar a RNasa III.

(A) Secuencias de ARN de 21 nt después del procesamiento de ARNs. Los fragmentos de ARN de 21 nt generados por el procesamiento de ARNs se clonaron y secuenciaron direccionalmente. Los oligorribonucleótidos que se originan a partir de la hebra de sentido del ARNs se indican como líneas azules, los que se originan a partir de la hebra antisentido como líneas rojas. Se usan barras gruesas si estaba presente la misma secuencia en múltiples clones, indicando la frecuencia el número de la derecha. Los sitios de escisión de ARN diana mediados por el ARNs están indicados como círculos naranjas, círculo grande para escisión intensa, círculo pequeño para escisión débil (véase la Figura 3B). Los círculos en la parte superior de la hebra de sentido indicaban sitios de escisión dentro de la diana de sentido y los círculos en la parte inferior del ARNs indican un sitio de escisión en la diana antisentido. Se identificaron hasta cinco nucleótidos adicionales en fragmentos de 21 nt derivados de los extremos 3' del ARNs. Estos nucleótidos son combinaciones aleatorias de residuos predominantemente de C, G o A y se añadieron lo más probablemente de un modo desprovisto de plantilla durante la transcripción por T7 de las hebras constitutivas de ARNs. (B) Análisis bidimensional por TLC de la composición de nucleótidos de ARN de 21 nt. Los ARN de 21 nt se generaron mediante la incubación de ARNs de Pp-luc de 504 pb internamente radiomarcado en lisado de *Drosophila*, se purificaron en gel y a continuación se digirieron hasta mononucleótidos con la nucleasa P1 (fila superior) o la ribonucleasa T2 (fila inferior). El ARNs se radiomarcó internamente mediante transcripción en presencia de uno de los trifosfatos de nucleósido $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ indicados. La radiactividad se detectó mediante obtención de imágenes en placa de fósforo. Los 5'-monofosfatos de nucleósido, 3'-monofosfatos de

nucleósido, 5',3'-difosfatos de nucleósido y el fosfato inorgánico se indican como pN, Np, pNp y p_i, respectivamente. Los círculos negros indican puntos de absorción UV procedentes de nucleótidos portadores no radiactivos. Los 3',5'-bisfosfatos (círculos rojos) se identificaron mediante comigración con patrones radiomarcados preparados mediante la 5'-fosforilación de 3'-monofosfatos de nucleósido con polinucleótido cinasa de T4 y γ -³²P-ATP.

5 Figura 5: ARN de 21 y 22 nt sintético median en la escisión de ARN diana.

(A) Representación gráfica de ARNds de 52 pb de control y ARNds de 21 y 22 nt sintéticos. La hebra de sentido de ARN interferentes cortos (ARNsi) de 21 y 22 nt se muestra en azul, la hebra antisentido en rojo. Las secuencias de los ARNsi se derivaban de los fragmentos clonados de ARNds de 52 y 111 pb (Figura 4A), excepto para la hebra antisentido de 22 nt del dúplex 5. Los ARNsi en el dúplex 6 y 7 eran únicos para la reacción de procesamiento del
10 ARNds de 111 pb. Los dos nucleótidos salientes 3' indicados en verde están presentes en la secuencia de la hebra antisentido sintética de los dúplex 1 y 3. Ambas hebras de los ARNds de 52 pb de control se prepararon mediante transcripción in vitro y una fracción de transcritos puede contener adición de nucleótidos 3' sin plantilla. Los sitios de escisión de ARN diana dirigidos por los dúplex de ARNsi se indican como círculos naranjas (véase la leyenda de la Figura 4A) y se determinaron como se muestra en la Figura 5B. (B) Posición de los sitios de escisión en ARN diana de sentido y antisentido. Las secuencias de ARN diana son como se describen en la Figura 3B. Se incubaron ARNds de 52 pb de control (10 nM) o dúplex de ARN de 21 y 22 nt 1-7 (100 nM) con ARN diana durante 2,5 h a 25°C en lisado de *Drosophila*. Los productos de escisión 5' estables se resolvieron sobre el gel. Los sitios de escisión se indican en la Figura 5A. La región elegida como diana por el ARNds de 52 pb o las hebras de sentido (s) o antisentido (as) se indican por las barras negras en el lado del gel. Los sitios de escisión están todos situados
15 dentro de la región de identidad de los ARNds. Para la determinación precisa de los sitios de escisión de la hebra antisentido, se usó un porcentaje inferior de gel.

Figura 6: Los salientes 3' largos en ARNds cortos inhiben iARN.

(A) Representación gráfica de construcción de ARNds de 52 pb. Las extensiones 3' de la hebra de sentido y antisentido se indican en azul y rojo, respectivamente. Los sitios de escisión observados en los ARN diana se representan como círculo naranja análogamente a la Figura 4A y se determinaron como se muestra en la Figura 6B.
25 (B) Posición de los sitios de escisión en ARN diana de sentido y antisentido. Las secuencias de ARN diana son como se describen en la Figura 3B. Se incubó ARNds (10 nM) con ARN diana durante 2,5 h a 25°C en lisado de *Drosophila*. Los productos de escisión 5' estables se resolvieron sobre el gel. Los sitios de escisión principales se indican con una flecha horizontal y también se representan en la Figura 6A. La región elegida como diana por el
30 ARNds de 52 pb se representa como una barra negra a ambos lados del gel.

Figura 7: Modelo propuesto para iARN.

Se predice que la iARN comienza con el procesamiento de ARNds (hebra de sentido en negro, hebra antisentido en rojo) hasta ARN interferentes cortos (ARNsi) predominantemente de 21 y 22 nt. Los nucleótidos 3' salientes cortos, si están presentes en el ARNds, pueden ser beneficiosos para el procesamiento de ARNds cortos. Las proteínas que procesan ARNds, que siguen sin caracterizarse, se representan como óvalos verdes y azules, y se ensamblan en el ARNds de modo asimétrico. En el presente modelo, esto se ilustra mediante la unión de una proteína o dominio proteínico azul hipotético con la hebra de ARNsi en la dirección 3' a 5' mientras que la proteína o el dominio proteínico verde hipotético siempre está unido a la hebra de ARNsi opuesta. Estas proteínas o un subgrupo permanecen asociados con el dúplex de ARNsi y conservan su orientación según se determina por la dirección de la
35 reacción de procesamiento de ARNds. Solamente la secuencia de ARNsi asociada con la proteína azul es capaz de guiar la escisión del ARN diana. El complejo con endonucleasa se denomina un complejo ribonucleoproteínico interferente pequeño o siRNP. Se supone en la presente que la endonucleasa que escinde el ARNds también puede escindir el ARN diana, probablemente al desplazar temporalmente la hebra de ARNsi pasiva no usada para el reconocimiento de la diana. A continuación, el ARN diana se escinde en el centro de la región reconocida por el
40 ARNsi de guía de secuencia complementaria.

Figura 8: Construcciones indicadoras y dúplex de ARNsi.

(a) Se ilustran las regiones de genes indicadores de luciferasa de luciérnaga (Pp-luc) y pensamiento de mar (Rr-luc) procedentes de los plásmidos pGL2-Control, pGL3-Control y pRL-TK (Promega). Se indican elementos reguladores de SV40, el promotor de timidina cinasa de HSV y dos intrones (líneas). La secuencia de luciferasa GL3 es 95% idéntico a GL2, pero RL es completamente ajena a ambos. La expresión de luciferasa pGL2 es aprox. 10 veces inferior que la de pGL3 en células de mamífero transfectadas. La región elegida como diana por los dúplex de ARNsi está indicada como una barra negra por debajo de la región codificante de los genes de luciferasa. (b) Se muestran las secuencias de sentido (superior) y antisentido (inferior) de los dúplex del ARNsi que eligen como diana luciferasa GL2, GL3 y RL. Los dúplex de ARNsi de GL2 y GL3 difieren solamente en 3 sustituciones de nucleótidos simples (encerrado en gris). Como control no específico, se sintetizó un dúplex con la secuencia de GL2 invertida, invGL2. El
50
55

saliente 3' de 2 nt de 2'-desoxitimidina se indica como TT; uGL2 es similar a ARNsi de GL2 pero contiene salientes 3' de ribouridina.

Figura 9: Interferencia de ARN por dúplex de ARNsi.

Las relaciones de luciferasa diana-de control se normalizaron a un control de tampón (bu, barras negras); las barras grises indican relaciones de luciferasa GL2 o GL3 de *Photinus pyralis* (Pp-luc) a luciferasa RL de *Renilla reniformis* (Rr-luc) (eje izquierdo), mientras que las barras blancas indican relaciones de RL a GL2 o GL3 (eje derecho). Los paneles a, c, e, g e i describen experimentos realizados con la combinación de plásmidos pGL2-Control y señalizador pRL-TK, los paneles b, d, f, h y j con plásmidos pGL3-Control y señalizador pRL-TK. La línea celular usada para el experimento de interferencia se indica en la parte superior de cada gráfica. Las relaciones de Pp-luc/Rr-luc para el control de tampón (bu) variaban entre 0,5 y 10 para pGL2/pRL y entre 0,03 y 1 para pGL3/pRL, respectivamente, antes de la normalización y entre las diversas líneas celulares probadas. Los datos representados se promediaron a partir de tres experimentos independientes $\pm$ D.E.

Figura 10: Efectos de ARNsi de 21 nt, ARNds de 50 pb y 500 pb sobre la expresión de luciferasa en células HeLa.

La longitud exacta de los ARNds largos se indica debajo de las barras. Los paneles a, c y e describen experimentos realizados con los plásmidos pGL2-Control y señalizador pRL-TK, los paneles b, d y f con los plásmidos pGL3-Control y señalizador pRL-TK. Los datos se promediaron a partir de dos experimentos independientes $\pm$ D.E. (a), (b) Expresión absoluta de Pp-luc, representada en unidades de luminiscencia arbitrarias. (c), (d) expresión de Rr-luc, representada en unidades de luminiscencia arbitrarias. (e), (f) Relaciones de luciferasa diana a control normalizada. Las relaciones de actividad de luciferasa para dúplex de ARNsi se normalizaron hasta un control de tampón (bu, barras negras); las relaciones de luminiscencia para ARNds de 50 o 500 pb se normalizaron hasta las relaciones respectivas observadas para ARNds de 50 y 500 pb a partir de GFP humanizada (hG, barras negras). Se debe apuntar que las diferencias globales en las secuencias entre los ARNds de 49 y 484 pb que eligen como diana GL2 y GL3 no son suficientes para conferir especificidad entre las dianas GL2 y GL3 (identidad ininterrumpida de 43 nt en el segmento de 49 pb, la identidad ininterrumpida más larga de 239 nt en el segmento de 484 pb).

Figura 11: Variación del saliente 3' de dúplex de ARNsi de 21 nt.

(A) Esbozo de la estrategia experimental. Se representa el ARNm diana de sentido con caperuza y poliadenilado y se muestran las posiciones relativas de ARNsi de sentido y antisentido. Se prepararon ocho series de dúplex, según las ocho hebras antisentido diferentes. Las secuencias de ARNsi y el número de nucleótidos salientes se cambiaron en etapas de 1 nt. (B) Luminiscencia relativa normalizada de luciferasa diana (*Photinus pyralis*, Pp-luc) a luciferasa de control (*Renilla reniformis*, Rr-luc) en lisado de embriones de *D. melanogaster* en presencia de 5 nM de ARN de extremos romos. Las relaciones de luminiscencia determinadas en presencia de ARNds se normalizaron hasta la relación obtenida para un control de tampón (bu, barra negra). Relaciones normalizadas menores de 1 indican interferencia específica. (C-J) Relaciones de interferencia normalizadas para ocho series de dúplex de ARNsi de 21 nt. Las secuencias de dúplex de ARNsi se representan encima de los gráficos de barras. Cada panel muestra la relación de interferencia para un grupo de dúplex formados con un ARNsi de guía antisentido y 5 ARNsi de sentido diferentes. El número de nucleótidos salientes (saliente 3', números positivos; salientes 5', números negativos) está indicado en el eje x. Los puntos de datos se promediaron a partir de al menos 3 experimentos independientes, las barras de error representan desviaciones estándar.

Figura 12: Variación de la longitud de la hebra de sentido de dúplex de ARNsi.

(A) Representación gráfica del experimento. Las tres hebras antisentido de 21 nt se aparearon con ocho ARNsi de sentido. Los ARNsi se cambiaron de longitud en su extremo 3'. El saliente 3' del ARNsi antisentido era 1 nt (B), 2 nt (C) o 3 nt (D) mientras que el saliente del ARNsi de sentido se variaba para cada serie. Se indican las secuencias de los dúplex de ARNsi y las correspondientes relaciones de interferencia.

Figura 13: Variación de la longitud de dúplex de ARNsi con salientes 3' de 2 nt conservados.

(A) Representación gráfica del experimento. El dúplex de ARNsi de 21 nt es idéntico en secuencia al mostrado en la Figura 11 H o 12C. Los dúplex de ARNsi se extendieron hasta el lado 3' del ARNsi de sentido (B) o el lado 5' del ARNsi de sentido (C). Se indican las secuencias de los dúplex de ARNsi y las correspondientes relaciones de interferencia.

Figura 14: Sustitución de los grupos hidroxilo 2' de los residuos de ribosa de ARNsi.

Los grupos 2'-hidroxilo (OH) en las hebras de dúplex de ARNsi se reemplazaron por 2'-desoxi (d) o 2'-O-metilo (Me). Las sustituciones de 2'-desoxi de 2 nt y 4 nt en los extremos 3' se indican como 2 nt d y 4 nt d, respectivamente. Los residuos de uridina se reemplazaron por 2'-desoxitimidina.

5 Figura 15: Cartografía de la escisión de ARN diana de sentido y antisentido por dúplex de ARNsi de 21 nt con salientes 3' de 2 nt.

(A) Representación gráfica de ARN diana de sentido y antisentido y dúplex de ARNsi marcados en la caperuza (asterisco) de 32P. La posición de la escisión de los ARN diana de sentido y antisentido se indica mediante triángulos por encima y por debajo de los dúplex de ARNsi, respectivamente. (B) Cartografía de sitios de escisión de ARN diana. Después de 2 h de incubación de 10 nM de diana con 100 nM de dúplex de ARNsi en lisado de embriones de *D. melanogaster*, el sustrato marcado en la caperuza en 5' y los productos de escisión 5' se resolvieron sobre geles de secuenciación. Los marcadores de longitud se generaron mediante digestión parcial con RNasa (T1) e hidrólisis alcalina parcial (OH-) de los ARN diana. Las líneas en negrita a la izquierda de las imágenes indican la región cubierta por las hebras de ARNsi 1 y 5 de la misma orientación que la diana.

15 Figura 16: El extremo 5' de un ARNsi de guía define la posición de la escisión de ARN diana.

(A, B) Representación gráfica de la estrategia experimental. El ARNsi antisentido era el mismo en todos los dúplex de ARNsi, pero la hebra de sentido se variaba entre 18 y 25 nt al cambiar el extremo 3' (A) o de 18 a 23 nt al cambiar el extremo 5' (B). La posición de la escisión de ARN diana de sentido y antisentido está indicada por triángulos por encima y por debajo de los dúplex de ARNsi, respectivamente. (C, D) Análisis de la escisión de ARN diana usando ARN diana de sentido (panel superior) o antisentido (panel inferior) marcados en la caperuza. Solamente se muestran los productos de escisión 5' marcados en la caperuza. Se indican las secuencias de los dúplex de ARNsi, y la longitud de las hebras de ARNsi de sentido se marca en la parte superior del panel. El carril de control marcado con un guión en el panel (C) muestra ARN diana incubado en ausencia de ARNsi. Los marcadores eran como se describe en la Figura 15. Las flechas en (D), panel inferior, indican los sitios de escisión del ARN diana que difieren en 1 nt.

Figura 17: Variación de la secuencia del saliente 3' de dúplex de ARNsi.

El saliente 3' de 2 nt (NN, en gris) se cambió en secuencia y composición como se indica (T, 2'-desoxitimidina, dG, 2'-desoxiguanosina; asterisco, dúplex de ARNsi silvestre). Las relaciones de interferencia normalizadas se determinaron como se describe en la Figura 11. La secuencia silvestre es la misma que la representada en la Figura 14.

Figura 18: Especificidad de secuencia de reconocimiento de diana.

Se muestran las secuencias de los dúplex de ARNsi desparejados, los segmentos de secuencia modificados o los nucleótidos simples están realzados en gris. El dúplex de referencia (ref) y los dúplex de ARNsi 1 a 7 contienen salientes de 2 nt de 2'-desoxitimidina. La eficacia de desactivación del dúplex de referencia modificado con timidina era comparable con la secuencia silvestre (Figura 17). Las relaciones de interferencia normalizadas se determinaron como se describe en la Figura 11.

Figura 19: Variación de la longitud de dúplex de ARNsi con salientes 3' de 2 nt conservados.

Los dúplex de ARNsi se extendieron hacia el lado 3' del ARNsi de sentido (A) o el lado 5' del ARNsi de sentido (B). Se indican las secuencias de los dúplex de ARNsi y las relaciones de interferencia respectivas. Para células HeLa SS6, los dúplex de ARNsi (0,84 µg) que eligen como diana luciferasa GL2 se transfectaron junto con los plásmidos pGL2-Control y pRL-TK. Para comparación, se indican las actividades de iARN in vitro de los dúplex probados en lisado de *D. melanogaster*.

Ejemplos

Ejemplo 1

Interferencia de ARN mediada por ARN sintéticos pequeños

1.1. Procedimientos experimentales

5 1.1.1 iARN in vitro

Se realizaron preparaciones de iARN y lisado in vitro como se describe previamente (Tuschl y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Es crítico usar creatina cinasa (Roche) disuelta recientemente para la regeneración óptima de ATP. Los ensayos de traducción de iARN (Fig. 1) se realizaron con concentraciones de ARNs de 5 nM y un período de preincubación prolongado de 15 min a 25°C antes de la adición de ARNm indicadores de Pp-luc y Rr-luc transcritos in vitro, con caperuza y poliadenilados. La incubación se continuó durante 1 h y la cantidad relativa de proteína de Pp-luc y Rr-luc se analizó usando el ensayo de luciferasa doble (Promega) y un luminómetro Monolight 3010C (PharMingen).

1.1.2 Síntesis de ARN

Se usaron procedimientos estándar para la transcripción in vitro de ARN procedente de plantillas de PCR que soportan secuencias promotoras de T7 o SP6, véase, por ejemplo (Tuschl y cols., 1998). Se preparó ARN sintético usando fosforamiditas de ARN Expedite (Proligo). El oligonucleótido adaptador 3' se sintetizó usando dimetoxitritil-1,4-benzenodimetanol-succinil-aminopropil-CPG. Los oligorribonucleótidos se desprotegieron en 3 ml de amoníaco al 32%/etanol (3/1) durante 4 h a 55°C (ARN Expedite) o 16 h a 55°C (oligonucleótidos quiméricos de ADN/ARN adaptadores 3' y 5') y a continuación se desililaron y se purificaron en gel como se describe previamente (Tuschl y cols., 1993). Los transcritos de ARN para la preparación de ARNs que incluyen salientes 3' largos se generaron a partir de plantillas de PCR que contenía un promotor de T7 en dirección de sentido y un promotor SP6 en dirección antisentido. La plantilla de transcripción para ARN diana de sentido y antisentido se amplificó por PCR con GCGTAATACGACTCACTATAGAACAAATTGCTTTTACAG (subrayado, promotor de T7) como cebador 5' y ATTTAGGTGACACTATAGGCATAAAGAATTGAAGA (subrayado, promotor SP6) como cebador 3' y el plásmido Pp-luc linealizado (secuencia de pGEM-luc) (Tuschl y cols., 1999) como plantilla; el ARN de sentido transcrito con T7 tenía 177 nt de longitud y la secuencia Pp-luc entre las pos. 113-273 con relación al codón de inicio y seguido por 17 nt del complemento de la secuencia promotora SP6 en el extremo 3'. Los transcritos para la formación de ARNs de extremos romos se prepararon mediante la transcripción a partir de dos productos de PCR diferentes que solo contenían una única secuencia promotora.

La renaturalización de ARNs se llevó a cabo usando una extracción con fenol/cloroformo. Una concentración equimolar de ARN de sentido y antisentido (de 50 nM a 10 µM, dependiendo de la longitud y la cantidad disponible) en 0,3 M de NaOAc (pH 6) se incubó durante 30 s a 90°C y a continuación se extrajo a temperatura ambiente con un volumen igual de fenol/cloroformo, y seguido por una extracción con cloroformo para retirar el fenol residual. El ARNs resultante se precipitó mediante la adición de 2,5-3 volúmenes de etanol. La pella se disolvió en tampón de lisis (100 mM de KCl, 30 mM de HEPES-KOH, pH 7,4, 2 mM de Mg(OAc)₂) y la calidad del ARNs se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa estándar 1 x tampón de TAE. Los ARNs de 52 pb con los salientes 3' de 17 nt y 20 nt (Figura 6) se renaturalizaron al incubar durante 1 min a 95 °C, a continuación se enfriaron rápidamente hasta 70°C y seguido por enfriamiento lento hasta temperatura ambiente a lo largo de un período de 3 h (50 µl de reacción de renaturalización, 1 µM de concentración de hebra, 300 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5). A continuación, los ARNs se extrajeron con fenol/cloroformo, se precipitaron con etanol y se disolvieron en tampón de lisis.

La transcripción de ARN radiomarcado con ³²P internamente usada para la preparación de ARNs (Figuras 2 y 4) se realizó usando 1 mM de ATP, CTP, GTP, 0,1 o 0,2 mM de UTP y 0,2-0,3 µM de ³²P-UTP (3000 Ci/mmol), o la relación respectiva para trifosfatos de nucleósido radiomarcados distintos de UTP. El marcaje de la caperuza de los ARN diana se realizó como se describe previamente. Los ARN diana se purificaron en gel después del marcaje de la caperuza.

1.1.3 Cartografía de sitios de escisión

Se realizaron reacciones de iARN estándar al preincubar 10 nM de ARNs durante 15 min seguido por la adición de 10 nM de ARN diana marcado en la caperuza. La reacción se detuvo después de 2 h más (Figura 2A) o 2,5 h de incubación (Figura 5B y 6B) mediante tratamiento con proteinasa K (Tuschl y cols., 1999). A continuación, las muestras se analizaron sobre geles de secuenciación al 8 o 10%. Los dúplex de ARN sintéticos de 21 y 22 nt se usaron en una concentración final de 100 nM (Fig 5B).

1.1.4 Clonación de ARN de 21 nt

Los ARN de 21 nt se produjeron mediante la incubación de ARNds radiomarcado en lisado de *Drosophila* en ausencia de ARN diana (200 µl de reacción, 1 h de incubación, 50 nM de dsP111 o 100 nM de dsP52 o dsP39). La mezcla de reacción se trató posteriormente con proteinasa K (Tuschl y cols., 1999) y los productos de procesamiento de ARNds se separaron sobre un gel de poliacrilamida al 15% desnaturalizante. Una banda, que incluía un intervalo de tamaños de al menos 18 a 24 nt, se cortó, se eluyó en 0,3 M de NaCl durante la noche a 4°C y en tubos siliconizados. El ARN se recuperó mediante precipitación con etanol y se desfosforiló (30 µl de reacción, 30 min, 50°C, 10 U de fosfatasa alcalina, Roche). La reacción se detuvo mediante extracción con fenol/cloroformo y el ARN se precipitó con etanol. El oligonucleótido adaptador 3' (pUUUaaccgcatccttctcx: mayúsculas, ARN; minúsculas, ADN; p, fosfato; x, 4-hidroximetilbencilo) se ligó a continuación al ARN de 21 nt desfosforilado (20 µl de reacción, 30 min, 37°C, 5 µM de adaptador 3', 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM de MgCl₂, 0,2 mM de ATP, 0,1 mg/ml de BSA acetilada, 15% de DMSO, 25 U de RNA ligasa de T4, Amersham-Pharmacia) (Pan y Uhlenbeck, 1992). La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de mezcla de terminación de 8 M de urea/50 mM de EDTA y se cargó directamente sobre un gel al 15%. La ligación da más de 50%. El producto de ligación se recuperó del gel y se fosforiló en 5' (20 µl de reacción, 30 min, 37°C, 2 mM de ATP, 5 U de polinucleótido cinasa de T4, NEB). La reacción de fosforilación se detuvo mediante extracción con fenol/cloroformo y el ARN se recuperó mediante precipitación con etanol. A continuación, el adaptador 5' (tactaatagactcactAAA: mayúsculas, ARN; minúsculas, ADN) se ligó al producto de ligación fosforilado según se describe anteriormente. El nuevo producto de ligación se purificó en gel y se eluyó del gel de sílice en presencia de cebador de transcripción inversa (GACTAGCTG**GAATTC**AAGGATGCGGTAAA: negrita, sitio Eco RI) usado como portador. La transcripción inversa (15 µl de reacción, 30 min, 42°C, 150 U de transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) fue seguida por PCR usando como cebador 5' CAGCCAACG**GAATTC**ATACGACTCACTAAA (negrita, sitio Eco RI) y el cebador de RT 3'. El producto de PCR se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. A continuación, el producto de PCR se digirió con Eco RI (NEB) y se concatamerizó usando ADN ligasa de T4 (alta conc., NEB). Los concatámeros de un intervalo de tamaño de 200 a 800 pb se separaron sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se recuperaron del gel mediante una fusión estándar u un procedimiento de extracción con fenol, y se precipitaron con etanol. Los extremos desapareados se rellenaron mediante incubación con polimerasa de Taq bajo condiciones estándar durante 15 min a 72°C y el producto de ADN se ligó directamente en el vector pCR2.1-TOPO usando el estuche de clonación TOPO TA (Invitrogen). Las colonias se cribaron usando PCR y cebadores de secuenciación inversa M13-20 y M13. Los productos de PCR se sometieron directamente a secuenciación personalizada (Sequencing Laboratories Göttingen GmbH, Alemania). De media, se obtenían de cuatro a cinco secuencias 21meras por clon.

1.1.5 Análisis de 2D-TLC

La digestión con nucleasa P1 de ARNsi purificados en gel radiomarcados y 2D-TLC se llevó a cabo como se describe (Zamore y cols., 2000). La digestión con nucleasa T2 se realizó en reacciones de 10 µl durante 3 h a 50°C en 10 mM de acetato amónico (pH 4,5) usando 2 µg/µl de ARNt portador y 30 U de ribonucleasa T2 (Life Technologies). La migración de patrones no radiactivos se determinó mediante ensombrecimiento UV. La identidad de 3',5'-difosfatos de nucleósido se confirmó mediante la comigración de los productos de digestión de T2 con patrones preparados mediante fosforilación con ³²P en 5' de 3'-monofosfatos de nucleósido comerciales usando γ-32P-ATP y polinucleótido cinasa de T4 (datos no mostrados).

1.2 Resultados y análisis

1.2.1 Requisitos de longitud para el procesamiento de ARNds hasta fragmentos de ARN de 21 y 22 nt

El lisado preparado a partir de embriones sincitiales de *D. melanogaster* recapitula iARN in vitro proporcionando una nueva herramienta para el análisis bioquímico del mecanismo de iARN (Tuschl y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). El análisis in vitro e in vivo de los requisitos de longitud de ARNds para iARN ha revelado que los ARNds cortos (<150 bp) son menos eficaces que los ARNds más largos para degradar ARNm diana (Caplen y cols., 2000; Hammond y cols., 2000; Ngo y cols., 1998; Tuschl y cols., 1999). Las razones de la reducción en la eficacia de degradación de ARNm no se entienden. Por lo tanto, se examinó el requisito de longitud preciso de ARNds para la degradación de ARN diana bajo condiciones optimizadas de en el lisado de *Drosophila* (Zamore y cols., 2000). Se sintetizaron varias series de ARNds y se dirigieron contra ARN indicador de luciferasa de luciérnaga (Pp-luc). La supresión específica de la expresión de ARN diana se verificó mediante el ensayo de luciferasa doble (Tuschl y cols., 1999) (Figuras 1A and 1B). Se detectó la inhibición específica de la expresión de ARN diana para ARNds tan cortos como 38 pb, pero los ARNds de 29 a 36 pb no eran eficaces en este procedimiento. El efecto era independiente de la posición de la diana y el grado de inhibición de la expresión de ARNm de Pp-luc se correlacionaba con la longitud del ARNds, es decir, los ARNds largos eran más eficaces que los ARNds cortos.

Se ha sugerido que los fragmentos de ARN de 21-23 nt generados mediante el procesamiento de ARNds son los mediadores de la interferencia y la cosupresión de ARN (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammond y cols., 2000; Zamore y cols., 2000). Por lo tanto, se analizó la velocidad de formación de fragmentos de 21-23 para un subgrupo de ARNds que varían de tamaño entre 501 y 29 pb. La formación de fragmentos de 21-23 nt en lisado de *Drosophila* (Figura 2) era fácilmente detectable para ARNds de 39 a 501 pb de largo pero se retrasaba significativamente para el ARNds de 29 pb. Esta observación es coherente con un papel de los fragmentos de 21-23 nt en la escisión de ARNm de guía y proporciona una explicación de la falta de iARN por ARNds de 30 pb. Es probable que la dependencia con la longitud de la formación de 21-23 meros refleje un mecanismo de control biológicamente importante para prevenir la activación no deseada de iARN por estructuras con bases apareadas intramoleculares cortas de ARN celulares regulares.

1.2.2 El ARNds de 39 pb media en la escisión de ARN diana en un solo sitio

La adición de ARNds y ARN diana con caperuza en 5' al lisado de *Drosophila* da como resultado una degradación específica de una secuencia del ARN diana (Tuschl y cols., 1999). El ARNm diana solo se escinde dentro de la región de identidad con el ARNds y muchos de los sitios de escisión de la diana estaban separados por 21-23 nt (Zamore y cols., 2000). Así, se esperaba que un número de sitios de escisión para un ARNds dado correspondiera aproximadamente a la longitud del ARNds dividida por 21. Se cartografiaron los sitios de escisión de la diana en un ARN diana de sentido y antisentido que se radiomarcó en 5' en la caperuza (Zamore y cols., 2000) (Figuras 3A y 3B). Los productos de escisión 5' estables se separaron sobre un gel de secuenciación y la posición de escisión se determinó mediante la comparación con una RNasa T1 parcial y una escalera de hidrólisis alcalina procedente del ARN diana.

De acuerdo con la observación previa (Zamore y cols., 2000), todos los sitios de escisión del ARN diana se situaron dentro de la región de identidad con el ARNds. La diana de sentido o antisentido solo era escindida una vez por ARNds de 39 pb. Cada sitio de escisión estaba situado a 10 nt del extremo 5' de la región cubierta por el ARNds (Figura 3B). El ARNds de 52 pb, que comparte el mismo extremo 5' con el ARNds de 39 pb, produce el mismo sitio de escisión en la diana de sentido, situado a 10 nt del extremo 5' de la región de identidad con el ARNds, además de dos sitios de escisión más débiles 23 y 24 nt aguas abajo del primer sitio. La diana antisentido solo se escindía una vez, de nuevo a 10 nt desde el extremo 5' de la región cubierta por su respectivo ARNds. La cartografía de los sitios de escisión para los ARNds de 38 a 49 pb mostrada en la Figura 1 mostraba que el sitio de escisión primero y predominante siempre estaba situado de 7 a 10 nt agua debajo de la región cubierta por el ARNds (datos no mostrados). Esto sugiere que el punto de escisión de ARN diana está determinado por el extremo del ARNds y podría implicar que el procesamiento hasta 21-23 meros se iniciara desde los extremos del dúplex.

Los sitios de escisión en la diana de sentido y antisentido para el ARNds de 111 pb más largo eran mucho más frecuentes que lo anticipado y la mayoría de ellos aparecen en aglomerados separados por de 20 a 23 nt (Figuras 3A y 3B). Como para los ARNds más cortos, el primer sitio de escisión en la diana de sentido está a 10 nt desde el extremo 5' de la región abarcada por el ARNds, y el primer sitio de escisión en la diana antisentido está situado a 9 nt desde el extremo 5' de la región cubierta por el ARNds. No está claro qué provoca esta escisión desordenada, pero una posibilidad podría ser que los ARNds más largos pudieran no solo ser procesados desde los extremos sino también internamente, o haya algunos determinantes de la especificidad para el procesamiento de ARNds que todavía no se entienden. Algunas irregularidades para el espacio de 21-23 nt también se apuntaron previamente (Zamore y cols., 2000). Para entender mejor la base molecular del procesamiento de ARNds y el reconocimiento de ARN diana, se decidió analizar las secuencias de los fragmentos de 21-23 nt generados por el procesamiento de ARNds de 39, 52 y 111 pb en el lisado de *Drosophila*.

1.2.3 ARNds es procesado hasta ARN de 21 y 22 nt mediante un mecanismo similar a RNasa III

A fin de caracterizar los fragmentos de ARN de 21-23 nt, se examinaron los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ARN. La oxidación con peróxido de ARN de 21-23 nt purificados en gel seguida por β -eliminación indicaba la presencia de grupos hidroxilo 2' y 3' terminales. Los 21-23 meros también eran sensibles al tratamiento con fosfatasa alcalina, indicando la presencia de un grupo fosfato 5' terminal. La presencia de extremos fosfato 5' e hidroxilo 3' sugiere que el ARNds podría ser procesado por una actividad enzimática similar a RNasa III de *E. coli* (para las revisiones, véanse (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982)).

La clonación direccional de fragmentos de ARN de 21-23 nt se realizó mediante la ligación de un oligonucleótido adaptador 3' y 5' a los 21-23 meros purificados usando una ARN ligasa de T4. Los productos de ligación se transcribieron inversamente, se amplificaron por PCR, se concatamerizaron, se clonaron y se secuenciaron. Se secuenciaban más de 220 RNA cortos a partir de reacciones de procesamiento de ARNds de los ARNds de 39, 52 y 111 pb (Figura 4A). Se encontró la siguiente distribución de longitudes: 1% de 18 nt, 5% de 19 nt, 12% de 20 nt, 45% de 21 nt, 28% de 22 nt, 6% de 23 nt y 2% de 24 nt. El análisis de secuencia del nucleótido 5' terminal de los fragmentos procesados indicaba que los oligonucleótidos con una guanósina 5' estaban subrepresentados. Esta desviación era introducida lo más probablemente por ARN ligasa de T4 que discrimina frente a guanósina fosforilada

5' como oligonucleótido donante; no se observó una desviación de secuencia significativa en el extremo 3'. Muchos de los fragmentos de 21 nt derivados de los extremos 3' de la hebra de sentido o antisentido de los dúplex incluyen nucleótidos 3' que se derivan de la adición sin plantilla de nucleótidos durante la síntesis de ARN usando ARN polimerasa de T7. De forma interesante, también se clonó un número significativo de ARN de 21 nt de *Drosophila* endógenos, algunos de ellos a partir de retrotransposones de LTR y no de LTR (datos no mostrados). Esto es coherente con un posible papel de iARN en la desactivación de transposones.

Los ARN de 21 nt aparecen en grupos aglomerados (Figura 4A) que cubren todas las secuencias de ARNds. Aparentemente, la reacción de procesamiento corta el ARNds al dejar extremos 3' escalonados, otra característica de la escisión con RNasa III. Para el ARNds de 39 pb, se encontraron dos aglomerados de ARN de 21 nt procedentes de cada hebra constitutiva de ARNds incluyendo los extremos 3' salientes, sin embargo solo se detectaba un sitio de escisión en la diana de sentido y antisentido (Figuras 3A y 3B). Si los fragmentos de 21 nt estaban presentes como ARN de guía de una sola hebra en un complejo de media en la degradación de mRNA, se podía suponer que existen al menos dos sitios de escisión de la diana, pero este no era el caso. Esto sugiere que los ARN de 21 nt pueden estar presentes en forma de doble hebra en el complejo de endonucleasa pero que solo una de las hebras se puede usar para el reconocimiento y la escisión de ARN diana. El uso de solo una de las hebras de 21 nt para la escisión de la diana puede estar determinado simplemente por la orientación en la que el dúplex de 21 nt se une al complejo de nucleasa. Esta orientación está definida por la dirección en la que se procesaba el ARNds original.

Los aglomerados 21 meros para los ARNds de 52 pb y 111 pb están peor definidos en comparación con el ARNds de 39 pb. Los aglomerados se extienden sobre regiones de 25 a 30 nt que representan lo más probablemente varias subpoblaciones distintas de dúplex de 21 nt y por lo tanto que guían la escisión de la diana en varios sitios próximos. Estas regiones de escisión todavía están separadas predominantemente por intervalos de 20 a 23 nt. Las reglas que determinan cómo se puede procesar ARNds regular hasta fragmentos de 21 nt no se entienden todavía, pero previamente se observó que el espacio de aprox. 21-23 nt de los sitios de escisión se podía alterar por una marcha de uridinas (Zamore y cols., 2000). La especificidad de la escisión de ARNds por RNasa III de *E. coli* parece estar principalmente controlada por antideterminantes, es decir, excluyendo algunos pares de bases específicos en posiciones dadas con relación al sitio de escisión (Zhang y Nicholson, 1997).

Para probar si estaba presente una modificación con azúcar, base caperuza en fragmentos de ARN de 21 nt procesados, se incubó Pp-luc ARNds de 505 pb radiomarcado en lisado durante 1 h, se aislaron los productos de 21 nt, y se digirió con nucleasa P1 o T2 hasta mononucleótidos. A continuación, la mezcla de nucleótidos se analizó mediante cromatografía en capa fina bidimensional (Figura 4B). Ninguno de los cuatro ribonucleótidos naturales se modificaban según se indica por la digestión de P1 o T2. Previamente, se ha analizado la conversión de adenosina en inosina en los fragmentos de 21 nt (después de un período de incubación de 2 h) y se ha detectado un pequeño grado (<0,7%) de desaminación (Zamore y cols., 2000); la incubación más corta en lisado (1 h) reducía la fracción de inosina hasta niveles difícilmente detectables. La RNasa T2, que escinde 3' del enlace fosfodiéster, producía 3'-fosfato de nucleósido y 3',5'-difosfato de nucleósido, indicando de ese modo la presencia de un monofosfato 5'-terminal. Se detectaron los cuatro 3',5'-difosfatos de nucleósido y sugieren que el enlace internucleotídico se escindía con poca o ninguna especificidad para una secuencia. En resumen, los fragmentos de 21 nt no están modificados y se generaron a partir de ARNds de modo que estuvieran presentes 5'-monofosfatos y 3'-hidroxilos en el extremo 5'.

1.2.4 ARN de 21 y 22 nt sintéticos median en la escisión de ARN diana

El análisis de los productos de procesamiento de ARNds indicaba que los fragmentos de 21 nt se generan mediante una reacción con todas las características de una reacción de escisión con RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982). La RNasa III hace dos cortes escalonados en ambas hebras del ARNds, dejando un saliente 3' de aproximadamente 2 nt. Se sintetizaron químicamente RNA de 21 y 22 nt, idénticos en secuencia a algunos de los fragmentos de 21 nt clonados, y los probaron con respecto a su capacidad para mediar en la degradación de ARN diana (Figuras 5A y 5B). Los dúplex de ARN de 21 y 22 nt se incubaron a concentraciones de 100 nM en el lisado, a concentraciones 10 veces superiores que el ARNds de control de 52 pb. Bajo estas condiciones, la escisión de ARN diana es fácilmente detectable. Reducir la concentración de dúplex de 21 y 22 nt desde 100 hasta 10 nM todavía provoca la escisión de ARN diana. Sin embargo, incrementar la concentración del dúplex desde 100 nM hasta 1.000 nM no incrementaba adicionalmente la escisión de la diana, probablemente debido a un factor proteínico limitante dentro del lisado.

En contraste con ARNds de 29 o 30 pb que no mediaban en la iARN, los ARNds de 21 y 22 nt con extremos 3' salientes de 2 a 4 nt mediaban en la degradación eficaz de ARN diana (dúplex 1, 3, 4, 6, Figuras 5A y 5B). Los ARNds de 21 o 22 nt de extremos romos (dúplex 2, 5 y 7, Figuras 5A y 5B) se reducían en su capacidad para degradar la diana e indican que los extremos 3' salientes son críticos para la reconstitución del complejo de ARN-proteína nucleasa. Los salientes de una sola hebra se pueden requerir para la unión de alta afinidad del dúplex de

21 nt a los componentes proteínicos. Un fosfato 5' terminal, aunque presente después del procesamiento de ARNds, no se requería para mediar en la escisión de ARN diana y estaba ausente de los ARN sintéticos cortos.

Los dúplex de 21 y 22 nt sintéticos guiaban la escisión de dianas de sentido así como antisentido dentro de la región cubierta por el dúplex corto. Este es un resultado importante considerando que un ARNds de 39 pb, que forma dos pares de agregados de fragmentos de 21 nt (Fig. 2), escinde la diana de sentido o antisentido solamente una vez y no dos veces. Se interpreta este resultado al sugerir que solo una de las dos hebras presentes en el dúplex de 21 nt es capaz de guiar la escisión del ARN diana y que la orientación del dúplex de 21 nt en el complejo de nucleasa está determinada por la dirección inicial del procesamiento de ARNds. Sin embargo, la presentación de un dúplex de 21 nt ya perfectamente procesado al sistema in vitro no permite la formación del complejo de nucleasa específico para una secuencia activo con dos posibles orientaciones del dúplex de ARN simétrico. Esto da como resultado la escisión de la diana de sentido así como antisentido dentro de la región de identidad con el dúplex de ARN de 21 nt.

El sitio de escisión de la diana está situado 11 o 12 nt aguas abajo del primer nucleótido que es complementario a la secuencia de guía de 21 o 22, es decir el sitio de escisión está cerca del centro de la región cubierta por los ARN de 21 o 22 nt (Figuras 4A y 4B). Desplazar la hebra de sentido de un dúplex de 22 nt en dos nucleótidos (compárense los dúplex 1 y 3 en la Figura 5A) desplazaba el sitio de escisión solo de la diana antisentido en dos nucleótidos. Desplazar la hebra tanto de sentido como antisentido en dos nucleótidos cambiaba ambos sitios de escisión en dos nucleótidos (compárense los dúplex 1 y 4). Se predijo que era posible diseñar un par de ARN de 21 o 22 nt para escindir un ARN diana casi en cualquier posición dada.

La especificidad de la escisión de ARN diana guiada por ARN de 21 y 22 nt parecer exquisita en cuanto a que no se detectan sitios de escisión aberrantes (Figura 5B). Sin embargo, se debe apuntar que los nucleótidos presentes en el saliente 3' del dúplex de ARN de 21 y 22 nt puede contribuir menos al reconocimiento del sustrato que los nucleótidos cercanos al sitio de escisión. Esto se basa en la observación de que el nucleótido más 3' en el saliente 3' de los dúplex activos 1 o 3 (Figura 5A) no es complementario a la diana. Un análisis detallado de la especificidad de iARN se puede efectuar fácilmente ahora usando ARN de 21 y 22 nt simétricos.

Basándose en la evidencia de que los ARN de 21 y 22 nt sintéticos con extremos 3' salientes median en la interferencia de ARN, se propuso llamar a los ARN de 21 nt "ARN interferentes cortos" o ARNsi y al complejo ARN-proteína respectivo una "partícula ribonucleoproteínica interferente pequeña" o siRNP.

1.2.5 Los salientes 3' de 20 nt en ARNds cortos inhiben iARN

Se ha observado que los ARNds cortos de extremos romos parecen ser procesados desde los extremos del ARNds. Durante el presente estudio de la dependencia con la longitud de ARNds en iARN, también se han analizado ARNds con extremos 3' salientes de 17 a 20 nt y se encontró con sorpresa que eran menos potentes que ARNds de extremos romos. El efecto inhibitor de extremos 3' largos era particularmente pronunciado para ARNds hasta 100 pb pero era menos drástico para ARNds más largos. El efecto no se debía a la formación de ARNds imperfecto basándose en el análisis en gel natural (datos no mostrados). Se probó si el efecto inhibitor de extremos 3' salientes largos se podía usar como una herramienta para dirigir el procesamiento de ARNds solamente hacia uno de los dos extremos de un dúplex de ARN corto.

Se sintetizaron cuatro combinaciones del ARNds modélico de 52 pb, formación de extremos romos, extensión 3' solo en la hebra de sentido, extensión 3' solo en la hebra antisentido y extensión 3' doble en ambas hebras, y cartografía de los sitios de escisión de ARN diana después de la incubación en lisado (Figuras 6A y 6B). El sitio de escisión primero y predominante de la diana de sentido no se perdía cuando se extendía el extremo 3' de la hebra antisentido del dúplex, y viceversa, el sitio de escisión fuerte de la hebra antisentido no se perdía cuando se extendía el extremo 3' de la hebra de sentido del dúplex. Las extensiones 3' en ambas hebras hacían al ARNds de 52 pb virtualmente inactivo. Una explicación de la inactivación de ARNds por extensiones 3' de -20 nt podría ser la asociación de proteínas que se unen a ARN de una sola hebra que podría interferir con la asociación de uno de los factores de procesamiento de ARNds en este extremo. Este resultado también es coherente con el presente modelo en que solo una de las hebras del dúplex de ARNsi en el siRNP ensamblado es capaz de guiar la escisión de ARN diana. La orientación de la hebra que guía la escisión de ARN está definida por la dirección de la reacción de procesamiento de ARNds. Es probable que la presencia de extremos escalonados 3' pueda facilitar el ensamblaje del complejo de procesamiento. Un bloque en el extremo 3' de la hebra de sentido sólo permitirá el procesamiento de ARNds desde el extremo 3' opuesto de la hebra antisentido. Esto genera a su vez complejos de siRNP en los que solo la hebra antisentido del dúplex de ARNsi es capaz de guiar la escisión de ARN diana de sentido. Lo mismo es cierto para la situación inversa.

El efecto inhibitor menos pronunciado de las extensiones 3' largas en el caso de ARNds más largos (≥ 500 pb, datos no mostrados) sugiere que los ARNds largos también pueden contener señales de procesamiento de ARNds internas o se pueden procesar cooperativamente debido a la asociación de múltiples factores de escisión.

1.2.6 Un modelo para la escisión de ARNm dirigida por ARNds

Los nuevos datos bioquímicos actualizan el modelo para cómo el ARNds elige como diana ARNm para la destrucción (Figura 7). El ARN de doble hebra se procesa en primer lugar para acortar dúplex de ARN predominantemente de 21 y 22 nt de longitud y con extremos 3' escalonados de forma similar a una reacción similar a RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1982). Basándose en la longitud de 21-23 nt de los fragmentos de ARN procesados, se ha especulado que una actividad similar a RNasa III puede estar implicada en iARN (Bass, 2000). Esta hipótesis es apoyada además por la presencia de fosfatos 5' e hidroxilos 3' en los extremos de los ARNsi según se observa en productos de reacción de RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999). Se ha observado que la RNasa III bacteriana y los homólogos eucarióticos Rnt1p en *S. cerevisiae* y Pac1p en *S. pombe* funcionan en el procesamiento de ARN ribosómico así como ARNsn y ARNsno (véase, por ejemplo, Chanfreau y cols., 2000).

Poco se sabe acerca de la bioquímica de homólogos de RNasa III de plantas, animales o seres humanos. Se han identificado dos familias de enzimas RNasa III predominantemente por análisis de secuencias guiados por bases de datos o clonación de ADNc. La primera familia de RNasa III está representada por la proteína de *D. melanogaster* de 1.327 aminoácidos de largo drosha (Reg. AF116572). El extremo C está compuesto por dos RNasa III y un dominio de unión a ARNds y el extremo N es de función desconocida. También se encuentran homólogos cercanos en *C. elegans* (Reg. AF160248) y ser humano (Reg. AF189011) (Filippov y cols., 2000; Wu y cols., 2000). La RNasa III humana similar a drosha se clonó y caracterizó recientemente (Wu y cols., 2000). El gen se expresa ubicuamente en tejidos humanos y líneas celulares, y la proteína se localiza en el núcleo y el nucléolo de la célula. Basándose en resultados inferidos de estudios de inhibición antisentido, se sugirió un papel de esta proteína para el procesamiento de rRNA. La segunda clase está representada por el gen de *C. elegans* K12H4.8 (Reg. S44849) que codifica una proteína de 1.822 aminoácidos de largo. Esta proteína tiene un motivo de ARN helicasa N-terminal que está seguido por 2 dominios catalíticos de 2 RNasa III y un motivo que se une a ARNds, similar a la familia de RNasa III drosha. Hay homólogos cercanos en *S. pombe* (Reg. Q09884), *A. thaliana* (Reg. AF187317), *D. melanogaster* (Reg. AE003740) y ser humano (Reg. AB028449) (Filippov y cols., 2000; Jacobsen y cols., 1999; Matsuda y cols., 2000). Posiblemente, la RNasa III/helicasa K12H4.8 es el candidato probable para estar implicado en la iARN.

Los cribados genéticos en *C. elegans* identificaron rde-1 y rde-4 como esenciales para la activación de iARN sin un efecto sobre la movilización o cosupresión de transposones (Dernburg y cols., 2000; Grishok y cols., 2000; Ketting y Plasterk, 2000; Tabara y cols., 1999). Esto condujo a la hipótesis de que estos genes son importantes para el procesamiento de ARNds pero no están implicados en la degradación de la diana de ARNm. La función de ambos genes es todavía desconocida, el producto génico rde-1 es un miembro de una familia de proteínas similares a la proteína de conejo eIF2C (Tabara y cols., 1999), y la secuencia de rde-4 no se ha descrito todavía. La caracterización bioquímica futura de estas proteínas debe revelar su función molecular.

El procesamiento hasta los dúplex de ARNsi parece comenzar desde los extremos de ARNds de extremos romos o ARNds con salientes 3' cortos (1-5 nt), y avanza en etapas de aproximadamente 21-23 nt. Los extremos escalonados 3' largos (-20 nt) en ARNds cortos suprimen la iARN, posiblemente a través de la interacción con proteínas de unión a ARN de una sola hebra. La supresión de iARN por regiones de una sola hebra que flanquean ARNds corto y la falta de formación de ARNsi a partir de ARNds cortos de 30 pb pueden explicar por qué las regiones estructuradas encontradas frecuentemente en ARNm no conducen a la activación de iARN.

Sin querer limitarse por una teoría, se supone que las proteínas de procesamiento de ARNds o un subgrupo de estas permanecen asociadas con el dúplex de ARNsi después de la reacción de procesamiento. La orientación del dúplex de ARNsi con relación a estas proteínas determina cuál de las dos hebras complementarias funciona en el guiado de la degradación del ARN diana. Los dúplex de ARNsi químicamente sintetizados guían la escisión del ARN de sentido así como antisentido ya que son capaces de asociarse con los componentes proteínicos en cualquiera de las dos orientaciones posibles.

El hallazgo notable de que los dúplex de ARNsi de 21 y 22 nt sintéticos se pueden usar para la degradación eficaz de ARNm proporciona nuevas herramientas para la regulación específica para una secuencia de la expresión génica en estudios de genómica funcional así como bioquímicos. Los ARNsi pueden ser eficaces en sistemas mamíferos en los que no se pueden usar ARNds largos debido a la activación de la respuesta de PKR (Clemens, 1997). Como tales, los dúplex de ARNsi representan una nueva alternativa a la terapéutica de antisentido o ribozimas.

Ejemplo 2

Interferencia de ARN en cultivos tisulares humanos

2.1 Métodos

2.1.1 Preparación de ARN

5 Se sintetizaron químicamente ARN de 21 nt usando fosforamiditas de ARN Expedite y fosforamidita de timidina (Prologo, Alemania). Los oligonucleótidos sintéticos se desprotegieron y se purificaron en gel (Ejemplo 1), seguido por purificación en un cartucho Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, EE. UU. de A.) (Tuschl, 1993). Las secuencias de ARNsi que eligen como diana GL2 (Reg. X65324) y luciferasa GL3 (Reg. U47296) correspondían a las regiones codificantes 153-173 con relación al primer nucleótido del codón de inicio. Los ARNsi que eligen como diana RL (Reg. AF025846) correspondían a la región 119-129 después del codón de inicio. Los ARN más largos se transcribieron con ARN polimerasa a partir de productos de PCR, seguido por purificación en Sep-Pak. Los ARNds de GL2 o GL3 de 49 y 484 pb correspondían a la posición 113-161 y 113-596, respectivamente, con relación al inicio de la traducción; los ARNds de 50 y 501 pb correspondían a la posición 118-167 y 118-618, respectivamente. Las plantillas de PCR para la síntesis de ARNds que elige como diana GFP humanizada (hG) se amplificaron a partir de pAD3 (Kehlenbach, 1998), con lo que el ARNds de hG de 50 y 501 pb correspondían a la posición 118-167 y 118-618, respectivamente, con respecto al codón de inicio.

Para la renaturalización de ARNsi, 20 µM de hebras simples se incubaron en tampón de renaturalización (100 mM de acetato potásico, 30 mM de HEPES-KOH a pH 7,4, 2 mM de acetato magnésico) durante 1 min a 90°C seguido por 1 h a 37°C. La etapa de incubación a 37°C se prolongó durante la noche para los ARNds de 50 y 500 pb y estas reacciones de renaturalización se realizaron a concentraciones de hebra de 8,4 µM y 0,84 µM, respectivamente.

2.1.2 Cultivo celular

Se propagaron células S2 en medio de *Drosophila* de Schneider (Life Technologies) complementado con 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 25°C. Se hicieron crecer células 293, NIH/3T3, HeLa S3, COS-7 a 37°C en medio de Eagle modificado de Dulbecco complementado con 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se sometieron a pases regularmente para mantener el crecimiento exponencial. 24 h antes de la transfección a aprox. 80% de confluencia, las células de mamífero se tripsinizaron y se diluyeron 1:5 con medio reciente sin antibióticos ($1-3 \times 10^5$ células/ml) y se transfirieron a placas de 24 pocillos (500 µl/pocillo). Las células S2 no se tripsinizaron antes de la separación. La transfección se llevó a cabo con reactivo Lipofectamine 2000 (Life Technologies) según se describe por el fabricante para líneas celulares adherentes. Por pocillo, se aplicaron 1,0 µg de pGL2-Control (Promega) o pGL3-Control (Promega), 0,1 µg de pRL-TK (Promega) y 0,28 µg de dúplex de ARNsi o ARNds, formulados en liposomas; el volumen final era 600 µl por pocillo. Las células se incubaron 20 h después de la transfección y parecían sanas posteriormente. La expresión de luciferasa se verificó posteriormente con el ensayo de luciferasa doble (Promega). Las eficacias de transfección se determinaron mediante microscopía de fluorescencia para líneas celulares de mamífero después de la cotransfección de 1,1 µg de pAD3 que codifica hGFP y 0,28 µg de ARNsi de invGL2 inGL2 y eran 70-90%. Los plásmidos indicadores se amplificaron en XL-1 Blue (Stratagene) y se purificaron usando el Qiagen EndoFree Maxi Plasmid Kit.

2.2 Resultados y análisis

40 Para probar si los ARNsi también son capaces de mediar en iARN en cultivo tisular, se sintetizaron dúplex de ARNsi de 21 nt con salientes 3' de 2 nt simétricos dirigidos contra genes indicadores que codifican luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) y dos variantes de secuencia de luciferasas de luciérnaga (*Photinus pyralis*, GL2 y GL3) (Fig. 8a, b). Los dúplex de ARNsi se cotransfectaron con las combinaciones de plásmidos indicadores pGL2/pRL o pGL3/pRL en células S2 de Schneider de *D. melanogaster* o células de mamífero usando liposomas catiónicos. Las actividades de luciferasa se determinaron 20 h después de la transfección. En todas las líneas celulares probadas, se observó una reducción específica de la expresión de los genes indicadores en presencia de dúplex de ARNsi cognados (Fig. 9a-j). Notablemente, los niveles absolutos de expresión de luciferasa no se veían afectados por ARNsi no cognados, indicando la ausencia de efectos secundarios por dúplex de ARN de 21 nt (p. ej. Fig. 10a-d para células HeLa). En células S2 de *D. melanogaster* (Fig. 9a, b), la inhibición específica de luciferasas era completa. En células de mamífero, en las que los genes indicadores se expresaban de 50 a 100 veces más fuertemente, la supresión específica era menos completa (Fig. 9c-j). La expresión de GL2 se reducía de 3 a 12 veces, la expresión de GL3 de 9 a 25 veces y la expresión de RL de 1 a 3 veces, en respuesta a los ARNsi cognados. Para células 293, la elección como diana de luciferasa RL por ARNsi de RL era ineficaz, aunque las dianas GL2 y GL3 respondían específicamente (Fig. 9i, j). La falta de reducción de expresión de RL en células 293 se puede deber a su expresión de 5 a 20 veces superior en comparación con cualquier otra línea celular de

mamífero probada y/o a la accesibilidad limitada de la secuencia diana debido a la estructura secundaria del ARN o las proteínas asociadas. No obstante, la elección como diana específica de luciferasa GL2 y GL3 por los dúplex de ARNsi cognados indicaba que la iARN también está funcionando en células 293.

5 El saliente 3' de 2 nt en todos los dúplex de ARNsi, excepto para uGL2, estaba compuesto por (2'-desoxi)timidina. La sustitución de uridina por timidina en el saliente 3' era bien tolerada en el sistema in vitro de *D. melanogaster* y la secuencia del saliente no era crítica para el reconocimiento de la diana. Se eligió el saliente de timidina, debido a que se supone que potencia la resistencia a nucleasa de los ARNsi en el medio de cultivo celular y dentro de células transfectadas. En efecto, el ARNsi de GL2 modificado con timidina era ligeramente más potente que el ARNsi de uGL2 no modificado en todas las líneas celulares probadas (Fig. 9a, c, e, g, i). Es concebible que modificaciones adicionales de los nucleótidos salientes 3' puedan proporcionar beneficios adicionales al aporte y la estabilidad de dúplex de ARNsi.

15 En experimentos de cotransfección, se usaron 25 nM de dúplex de ARNsi con respecto al volumen final de medio de cultivo tisular (Fig. 9, 10). Incrementar la concentración de ARNsi hasta 100 nM no potenciaba los efectos de desactivación específicos, pero empezaba a afectar a las eficacias de transfección debido a una competición por la encapsulación liposómica entre ADN plasmídico y ARNsi (datos no mostrados). Disminuir la concentración de ARNsi hasta 1,5 nM no reducía el efecto de desactivación específico (datos no mostrados), aunque los ARNsi solo estuvieran ahora de 2 a 20 veces más concentrados de los plásmidos de ADN. Esto indica que los ARNsi son reactivos extraordinariamente potentes para mediar en la desactivación génica y que los ARNsi son eficaces a concentraciones que son varios órdenes de magnitud menores que las concentraciones aplicadas en experimentos de elección como diana de genes antisentido o de ribozimas convencionales.

25 A fin de verificar el efecto de ARNds más largos sobre células de mamífero, se prepararon ARNds de 50 y 500 pb cognados a los genes indicadores. Como control no específico, se usaron ARNds procedentes de GFP humanizada (hG) (Kehlenbach, 1998). Cuando los ARNds se cotransfectaban, en cantidades idénticas (no concentraciones) a los dúplex de ARNsi, la expresión del gen indicador se reducía fuertemente e inespecíficamente. Este efecto se ilustra para células HeLa como un ejemplo representativo (Fig. 10a-d). Las actividades absolutas de luciferasa se disminuyeron inespecíficamente de 10 a 20 veces mediante la cotransfección de ARNds de 50 pb y de 20 a 200 veces por ARNds de 500 pb, respectivamente. Se observaron efectos inespecíficos similares para células COS-7 y NIH/3T3. Para células 293, se observó una reducción inespecífica de 10 a 20 veces solamente para ARNds de 500 pb. La reducción inespecífica en la expresión del gen indicador por ARNds > 30 pb se esperaba como parte de la respuesta a interferones.

35 Sorprendentemente, a pesar de la fuerte disminución inespecífica en la expresión del gen indicador, se detectó reproduciblemente una desactivación adicional mediada por ARNds específica para una secuencia. Sin embargo, los efectos específicos de la desactivación solo eran evidentes cuando las actividades relativas del gen indicador se normalizaban hasta los controles de ARNds de hG (Fig. 10e, f). Además, se observó una reducción específica de 2 a 10 veces en respuesta a ARNds cognado, en las otras tres líneas celulares de mamífero probadas (datos no mostrados). Se presentaron previamente efectos de desactivación específicos con ARNds (356-1662 pb) en células CHO-K1, pero las cantidades de ARNds requeridas para detectar una reducción específica de 2 a 4 veces eran aproximadamente 20 veces superiores que en los presentes experimentos (Ui-Tei, 2000). Además, las células CHO-K1 parecían ser deficientes en la respuesta a interferones. En otro informe, se probaron células 293, NIH/3T3 y BHK-21 con respecto a iARN usando combinaciones de luciferasa/indicador lacZ y ARNds de LacZ de 829 pb o de GFP inespecífico de 717 pb (Caplen, 2000). El fallo para detectar iARN en este caso se puede deber al ensayo menos sensible de luciferasa/indicador lacZ y las diferencias de longitud de ARNds diana y de control. Tomados conjuntamente, los presente resultados indican que la iARN es activa en células de mamífero, pero que el efecto de desactivación es difícil de detectar, si el sistema de interferones es activado por ARNds > 30 bp.

50 En resumen, se ha demostrado por primera vez la desactivación génica mediada por ARNsi en células de mamífero. El uso de ARNsi cortos es muy prometedor para la inactivación de la función génica en el cultivo tisular humano y el desarrollo de una terapéutica específica de un gen.

Ejemplo 3

Inhibición específica de la expresión génica mediante interferencia de ARN

55 3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Preparación de ARN y ensayo de iARN

Los ensayos de síntesis química de ARN, renaturalización e iARN basado en luciferasa se realizaron como se describe en los Ejemplos 1 o 2 o en publicaciones previas (Tuschl y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Todos los dúplex de ARNsi se dirigieron contra luciferasa de luciérnaga, y la secuencia de ARN de luciferasa se derivó de

pGEM-luc (reg. GenBank. X65316) según se describe (Tuschl y cols., 1999). Los dúplex de ARNsi se incubaron en reacción de iARN/traducción de *D. melanogaster* durante 15 min antes de la adición de ARNm. Los ensayos de iARN basados en traducción se realizaron al menos por triplicado.

Para la cartografía de la escisión de ARN diana de sentido, se generó un transcrito de 177 nt, correspondiente a la secuencia de luciferasa de luciérnaga entre las posiciones 113-273 con relación al codón de inicio, seguido por el complemento de 17 nt de la secuencia promotora de SP6. Para la cartografía de la escisión de ARN antisentido, se produjo un transcrito de 166 nt a partir de una plantilla, que se amplificó a partir de la secuencia plasmídica mediante PCR usando el cebador 5' TAATACGACTCACTA-TAGAGCCCATATCGTTTCATA (promotor de T7 subrayado) y el cebador 3' AGAGGATGGAACCGCTGG. La secuencia diana corresponde al complemento de la secuencia de luciferasa de luciérnaga entre las posiciones 50-215 con relación al codón de inicio. Se realizó un marcaje con guanilil transferasa según se describe previamente (Zamore y cols., 2000). Para la cartografía de la escisión de ARN diana, se incubaron 100 nM de dúplex de ARNsi con de 5 a 10 nM de ARN diana en lisado de embriones de *D. melanogaster* bajo condiciones estándar (Zamore y cols., 2000) durante 2 h a 25°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 8 volúmenes de tampón de proteinasa K (200 mM de Tris-HCl pH 7,5, 25 mM de EDTA, 300 mM de NaCl, 2% p/v de dodecilsulfato sódico). Se añadió proteinasa (E.M. Merck, disuelta en agua) hasta una concentración final de 0,6 mg/ml. A continuación, las reacciones se incubaron durante 15 min a 65°C, se extrajeron con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol. Las muestras se situaron sobre geles de secuenciación al 6%. Se generaron patrones de longitud con digestión parcial con RNasa T1 e hidrólisis básica parcial de los ARN diana de sentido o antisentido marcados en la caperuza.

3.2 Resultados

3.2.1 Variación del saliente 3' en dúplex de ARNsi de 21 nt

Según se describe anteriormente, 2 o 3 nucleótidos desapareados en el extremo 3' de los dúplex de ARNsi eran más eficaces en la degradación del ARN diana que los respectivos dúplex de extremos romos. Para realizar un análisis más exhaustivo de la función de los nucleótidos terminales, se sintetizaron cinco ARNsi de 21 nt, cada uno presentado por un nucleótido con relación al ARN diana, y ocho ARNsi antisentido de 21 nt, cada uno desplazado un nucleótido con relación a la diana (Figura 11A). Al combinar los ARNsi de sentido y antisentido, se generaron ocho series de dúplex de ARNsi con extremos salientes sintéticos que cubrían un intervalo de saliente 3' de 7 nt a saliente 5' de 4 nt. La interferencia de los dúplex de ARNsi se midió usando el sistema de ensayo de luciferasa doble (Tuschl y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Los dúplex de ARNsi se dirigieron contra ARNm de luciferasa de luciérnaga, y se usó ARNm de luciferasa de pensamiento de mar como control interno. La relación de luminiscencia de la actividad de luciferasa diana a control se determinó en presencia de un dúplex de ARNsi y se normalizó a la relación observada en ausencia de ARNds. Para comparación, las relaciones de interferencia de ARNds largos (de 39 a 504 pb) se muestran en la Figura 11 B. Las relaciones de interferencia se determinaron a concentraciones de 5 nM para ARNds largos (Figura 11A) y a 100 nM para dúplex de ARNsi (Figura 11C-J). Se eligieron las concentraciones de 100 nM de ARNsi, debido a que el procesamiento completo de 5 nM de ARNds de 504 pb daría como resultado 120 nM de dúplex de ARNsi totales.

La capacidad de dúplex de ARNsi de 21 nt para mediar en la iARN depende del número de nucleótidos salientes o pares de bases formados. Los dúplex con de cuatro a seis nucleótidos salientes 3' eran incapaces de mediar en la iARN (Figura 11C-F), ya que eran dúplex con dos o más nucleótidos salientes 5' (Figura 11 G-J). Los dúplex con salientes 3' de 2 nt serán los más eficaces para mediar en la interferencia de ARN, aunque la eficacia de la desactivación también dependía de la secuencia, y se observaron interferencias de hasta 12 veces para diferentes dúplex de ARNsi con salientes 3' de 2 nt (compárese la Figura 11D-H). Los dúplex con extremos romos, saliente 5' de 1 nt o salientes 3' de 1 a 3 nt, eran a veces funcionales. El pequeño efecto de desactivación observado para el dúplex de ARNsi con saliente 3' de 7 nt (Figura 11C) se puede deber a un efecto antisentido del saliente 3' largo en vez de deberse a iARN. La comparación de la eficacia de iARN entre ARNds largos (Fig. 11 B) y los dúplex de ARNsi de 21 nt más eficaces (Fig. 11E, G, H) indica que un solo dúplex de ARNsi en una concentración de 100 nM puede ser tan eficaz con 5 nM de ARNds de 504 pb.

3.2.2 Variación de longitud del ARNsi de sentido apareado a un ARNsi antisentido de 21 nt invariante

A fin de investigar el efecto de la longitud del ARNsi sobre la iARN, se prepararon 3 series de dúplex de ARNsi, combinando tres hebras antisentido de 21 nt con ocho hebras de sentido de 18 a 25 nt. El saliente 3' del ARNsi antisentido se fijó hasta 1, 2 o 3 nt en cada serie de dúplex de ARNsi, mientras que el ARNsi de sentido se varió en su extremo 3' (Figura 12A). Independientemente de la longitud del ARNsi de sentido, se encontró que los dúplex con saliente 3' de 2 nt de ARNsi antisentido (Figura 12C) eran más activos que aquellos con saliente 3' de 1 o 3 nt (Figura 12B, D). En la primera serie, con un saliente 3' de 1 nt de ARNsi antisentido, los dúplex con ARNsi de sentido de 21 y 22 nt, que soportaban un saliente 3' de 1 y 2 nt de ARNsi de sentido, respectivamente, eran los más activos. Los dúplex con ARNsi de sentido de 19 a 25 nt también eran capaces de mediar en el ARN, pero hasta un grado menor. De forma similar, en la segunda serie, con un saliente de 2 nt del ARNsi antisentido, el dúplex de

ARNsi de 21 nt con saliente 3' de 2 nt era el más activo, y cualquier combinación con los ARNsi de sentido de 18 a 25 nt era activa hasta un grado significativo. En la última serie, con saliente 3' de ARNsi de 3 nt, solamente el dúplex con un ARNsi de sentido de 20 nt y el saliente 3' de sentido de 2 nt era capaz de reducir la expresión del ARN diana. Conjuntamente, estos resultados indican que la longitud del ARNsi así como la longitud del saliente 3' son importantes, y que los dúplex de ARNsi de 21 nt con saliente 3' de 2 nt son óptimos para la iARN.

3.2.3 Variación de la longitud de dúplex de ARNsi con un saliente 3' de 2 nt constante

A continuación, se examinó el efecto de cambiar simultáneamente la longitud de ambas hebras de ARNsi al mantener salientes 3' de 2 nt simétricos (Figura 13A). Se prepararon dos series de dúplex de ARNsi incluyendo el dúplex de ARNsi de 21 nt de la Figura 11 H como referencia. La longitud de los dúplex se varió entre 20 y 25 pb al extender el segmento de bases apareadas en el extremo 3' del ARNsi de sentido (Figura 13B) o en el extremo 3' del ARNsi antisentido (Figura 13C). Los dúplex de 20 a 23 pb provocaban una represión específica de la actividad de luciferasa diana, pero el dúplex de ARNsi de 21 nt era al menos 8 veces más eficaz que cualquiera de los otros dúplex. Los dúplex de ARNsi de 24 y 25 nt no daban como resultado una interferencia detectable. Los efectos específicos para una secuencia eran menores ya que las variaciones en ambos extremos del dúplex producían efectos similares.

3.2.4 Dúplex de ARNsi modificados con 2'-desoxi y 2'-O-metilo

Para determinar la importancia de los residuos de ribosa de ARNsi para la iARN, se examinaron dúplex con ARNsi de 21 nt y salientes 3' de 2 nt con hebras modificadas con 2'-desoxi o 2'-O-metilo (Figura 14). La sustitución de los salientes 3' de 2 nt por 2'-desoxinucleótidos no tenía efecto, e incluso reemplazar dos ribonucleótidos adicionales adyacentes a los salientes en la región apareada producía ARNsi significativamente activos. Así, 8 de 42 nt de un dúplex de ARNsi se reemplazaban por residuos de ADN sin pérdida de actividad. Sin embargo, la sustitución completa de una o ambas hebras de ARNsi por residuos 2'-desoxi suprimía la iARN, como lo hacía la sustitución por residuos 2'-O-metilo.

3.2.5 Definición de sitios de escisión del ARN diana

Las posiciones de escisión del ARN diana se determinaron previamente para dúplex de ARNsi de 22 nt y para un dúplex de 21 nt/22 nt. Se encontró que la posición de la escisión del ARN diana estaba situada en el centro de la región cubierta por el dúplex de ARNsi, 11 o 12 nt aguas abajo del primer nucleótido que era complementario a la secuencia de guía de ARNsi de 21 o 22 nt. Cinco dúplex de ARNsi de 21 nt distintos con saliente 3' de 2 nt (Figura 15A) se incubaron con ARN diana de sentido o antisentido marcado en la caperuza 5' en lisado de *D. melanogaster* (Tuschl y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Los productos de escisión 5' se resolvieron sobre geles de secuenciación (Figura 15B). La cantidad de ARN diana de sentido escindido se correlaciona con la eficacia de los dúplex de ARNsi determinada en el ensayo basado en traducción, y los dúplex de ARNsi 1, 2 y 4 (Figura 15B y 11 H, G, E) escinden el ARN diana más rápidamente que los dúplex 3 y 5 (Figura 15B y 11 F, D). Notablemente, la suma de radiactividad del producto de escisión 5' y el ARN diana de entrada no era constante a lo largo del tiempo, y los productos de escisión 5' no se acumulaban. Presumiblemente, los productos de escisión, una vez liberados del complejo ARNsi-endonucleasa, son rápidamente degradados debido a la falta de cualquier cola de poli(A) de la caperuza 5'.

Los sitios de escisión para ambos ARN de sentido y antisentido se situaron en el medio de la región abarcada por los dúplex de ARNsi. Los sitios de escisión para cada diana producidos por los 5 dúplex diferentes variaban en 1 nt según el desplazamiento de 1 nt de los dúplex a lo largo de las secuencias diana. Las dianas se escindieron precisamente 11 nt aguas debajo de la posición diana complementaria al nucleótido más 3' del ARNsi de guía complementario a la secuencia (Figura 15A, B).

A fin de determinar si el extremo 5' o el 3' del ARNsi de guía establece la regla para la escisión de ARN diana, se ideó la estrategia experimental esbozada en la Figura 16A y B. Un ARNsi antisentido de 21 nt, que se mantuvo invariante para este estudio, se apareó con ARNsi de sentido que estaban modificados en cualquiera de sus extremos 5' o 3'. La posición de la escisión del ARN diana antisentido se determinó como se describe anteriormente. Los cambios en el extremo 3' del ARNsi de sentido, verificados para el saliente 5' de 1 nt hasta el saliente 3' de 6 nt, no afectaban a la posición de escisión del ARN diana de sentido ni antisentido (Figura 16C). Los cambios en el extremo 5' del ARNsi de sentido no afectaban a la escisión del ARN diana de sentido (Figura 16D, panel superior), lo que se esperaba debido a que el ARNsi antisentido estaba inalterado. Sin embargo, la escisión del ARN diana antisentido se veía afectada y era fuertemente dependiente del extremo 5' del ARNsi de sentido (Figura 16D, panel inferior). La diana antisentido solo se escindía cuando el ARNsi de sentido tenía un tamaño de 20 o 21 nt, y la posición de escisión diferente en 1 nt, sugiriendo que el extremo 5' de ARNsi que reconoce la diana establece la regla para la escisión de ARN. La posición está situada entre el nucleótido 10 y 11 cuando se cuenta en dirección aguas arriba desde el nucleótido diana apareado al nucleótido más 5' del ARNsi de guía (véase además la Figura 15A).

3.2.6 Efectos en la secuencia y sustituciones 2'-desoxi en el saliente 3'

Se prefiere un saliente 3' de 2 nt para la función del ARNsi. Se deseaba saber si la secuencia de los nucleótidos salientes contribuye al reconocimiento de la diana o si solo es una característica requerida para la reconstitución del complejo de endonucleasa (RISC o siRNP). Se sintetizaron ARNsi de sentido y antisentido con salientes 3' de AA, CC, GG, UU y UG e incluían las modificaciones 2'-desoxi TdG y TT. Los ARNsi silvestres contenían AA en el saliente 3' de sentido y UG en el saliente 3' antisentido (AA/UG). Todos los dúplex de ARNsi eran funcionales en el ensayo de interferencia y reducían la expresión de la diana al menos 5 veces (Figura 17). Los dúplex de ARNsi más eficaces que reducían la expresión de la diana más de 10 veces eran del tipo de secuencia NN/UG, NN/UU, NN/TdG y NN/TT (N, cualquier nucleótido). Los dúplex de ARNsi con un saliente 3' de ARNsi antisentido de AA, CC o GG eran menos activos en un factor de 2 a 4 cuando se comparaban con la secuencia silvestre UG o la UU mutante. Esta reducción en la eficacia de iARN se debe probablemente a la contribución del penúltimo nucleótido 3' con respecto al reconocimiento de la diana específico de una secuencia, ya que el nucleótido 3' terminal se cambiaba de G a U sin efecto.

Los cambios en la secuencia del saliente 3' del ARNsi de sentido no revelaban efectos dependientes de la secuencia, lo que se esperaba debido a que el ARNsi de sentido no debe contribuir al reconocimiento del mRNA diana de sentido.

3.2.7 Especificidad de secuencia del reconocimiento de la diana

A fin de examinar la especificidad de secuencia del reconocimiento de la diana, se introdujeron cambios de secuencia en los segmentos apareados de dúplex de ARNsi y se determinó la eficacia de la desactivación. Los cambios en la secuencia se introdujeron al invertir segmentos cortos de 3 o 4 nt de longitud o como mutaciones puntuales (Figura 18). Los cambios de secuencia en una hebra de ARNsi se compensaron en la hebra de ARNsi complementaria para evitar perturbar la estructura del dúplex de ARNsi con bases apareadas. La secuencia de todos los salientes 3' de 2 nt era TT (T, 2'-desoxitimidina) para reducir los costes de síntesis. El dúplex de ARNsi de referencia TT/TT era comparable en iARN al dúplex de ARNsi silvestre AA/UG (Figura 17). La capacidad para mediar en la destrucción del ARNm indicador se cuantificó usando el ensayo de luminiscencia basado en la traducción. Los dúplex de ARNsi con segmentos de secuencia invertidos mostraban una capacidad drásticamente reducida para elegir como diana el indicador de luciferasa de luciérnaga (Figura 18). Los cambios de secuencia situados entre el extremo 3' y el medio del ARNsi antisentido suprimían completamente el reconocimiento del ARN diana, pero las mutaciones cerca del extremo 5' del ARNsi antisentido exhiben un pequeño grado de desactivación. La transversión del par de bases A/U situado directamente opuesto al sitio de escisión de ARN diana predicho, o un nucleótido alejado del sitio predicho, prevenía la escisión de ARN diana, indicando por lo tanto que una mutación simple dentro del centro de un dúplex de ARNsi discriminan entre dianas desemparejadas.

3.3 Análisis

Los ARNsi son reactivos valiosos para la inactivación de la expresión génica, no solo en células de insecto, sino también en células de mamífero, con un gran potencial de aplicación terapéutica. Se han analizado sistemáticamente los determinantes estructurales de dúplex de ARNsi requeridos para promover la degradación eficaz de ARN diana en lisado de embriones de *D. melanogaster*, proporcionando así reglas para el diseño de los dúplex de ARNsi más potentes. Un dúplex de ARNsi perfecto es capaz de desactivar la expresión génica con una eficacia comparable a un ARNd de 500 pb, dado que se usan cantidades comparable de ARN total.

3.4 Guía del usuario de ARNsi

Los dúplex de ARNsi eficazmente desactivadores están compuestos preferiblemente por ARNsi antisentido de 21 nt, y se deben seleccionar para formar una doble hélice de 19 pb con extremos salientes 3' de 2 nt. Las sustituciones 2'-desoxi de los ribonucleótidos salientes 3' de 2 nt no afectan a la iARN, pero ayudan a reducir los costes de la síntesis de ARN y pueden potenciar la resistencia a ARNasa de los dúplex de ARNsi. Sin embargo, las modificaciones 2'-desoxi o 2'-O-metilo más intensivas, reducen la capacidad de los ARNsi para mediar en la iARN, probablemente al interferir con la asociación de proteínas para el ensamblaje de ARNsiP.

El reconocimiento de la diana es un proceso muy específico de la secuencia, mediado por el ARNsi complementario a la diana. El nucleótido más 3' del ARNsi guía no contribuye a la especificidad de reconocimiento de la diana, mientras que el penúltimo nucleótido del saliente 3' afecta a la escisión del ARN diana, y un desemparejamiento reduce la iARN de 2 a 4 veces. El extremo 5' de un ARNsi guía también parece más permisivo para el reconocimiento de ARN diana desemparejado cuando se compara con el extremo 3'. Los nucleótidos en el centro del ARNsi, situados opuestos al sitio de escisión del ARN diana, son determinantes de especificidad importantes e incluso cambios de un solo nucleótido reducen la iARN hasta un nivel indetectable. Esto sugiere que los dúplex de

ARNsi pueden ser capaces de discriminar alelos mutantes o polimorfos en experimentos de elección como diana de genes, lo que se puede convertir en una característica importante para futuros desarrollos terapéuticos.

5 Se sugiere que los ARNsi de sentido y antisentido, cuando se asocian con los componentes proteínicos del complejo de endonucleasa o su complejo de compromiso, representan distintos papeles; la orientación relativa del dúplex de ARNsi en este complejo define qué hebra se puede usar para el reconocimiento de la diana. Los dúplex de ARNsi sintéticos tienen simetría de diadas con respecto a la estructura de doble hélice, pero no con respecto a la secuencia. La asociación de dúplex de ARNsi con las proteínas de iARN en el lisado de *D. melanogaster* conducirá a la formación de dos complejos asimétricos. En estos complejos hipotéticos, el ambiente quiral es distinto para
 10 ARNsi de sentido y antisentido, de ahí su función. La predicción obviamente no se aplica a secuencias de ARNsi palindrómicas, o a proteínas de iARN que se podrían asociar como homodímeros. Para minimizar los efectos de la secuencia, que pueden afectar a la relación de siRNP que eligen como diana sentido o antisentido, se sugiere el uso de secuencias de ARNsi con secuencias salientes 3' idénticas. Se recomendaba ajustar la secuencia del saliente del ARNsi de sentido a la del saliente 3' antisentido, debido a que el ARNsi de sentido no tiene una diana en
 15 experimentos de inactivación típicos. La asimetría en la reconstitución siRNP de escisión de sentido y antisentido podría ser (parcialmente) responsable de la variación en la eficacia de iARN observada para diversos dúplex de ARNsi de 21 nt con salientes 3' de 2 nt usado en este estudio (Figura 14).

20 Alternativamente, la secuencia nucleotídica en el sitio diana y/o la accesibilidad de la estructura del ARN diana puede ser responsable de la variación en la eficacia para estos dúplex de ARNsi.

REFERENCIAS

- Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238.
- Bosher, J. M. y Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* 2, E31-36.
- 5 Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A. y Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252, 95-105.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. y Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245.
- Chanfreau, G., Buckle, M. y Jacquier, A. (2000). Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3142-3147.
- 10 Clemens, M. J. (1997). PKR--a protein kinase regulated by double-strand RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 945-949.
- Cogoni, C. y Macino, G. (1999). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 657-662.
- 15 Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. y Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M. P. y Villeneuve, A. M. (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Dev.* 14, 1578-1583.
- 20 Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. In *The enzymes*, vol 15, part B, P. D. Boyer, ed. (Nueva York: Academic Press), pp. 485-499.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M. y Gill, S. S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.
- Fire, A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363.
- 25 Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. y Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Grishok, A., Tabara, H. y Mello, C. C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497.
- Hamilton, A. J. y Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- 30 Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. y Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Jacobsen, S. E., Running, M. P. y M., M. E. (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126, 5231-5243.
- 35 Jensen, S., Gassama, M. P. y Heidmann, T. (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat. Genet.* 21, 209-212.
- Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A. & Gerace, L. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J. Cell Biol.* 141, 863-874.
- Kennerdell, J. R. y Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.

- Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G. y Plasterk, R. H. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99, 133-141.
- 5 Ketting, R. F. y Plasterk, R. H. (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296-298.
- Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X. y Ding, S. W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672-1680.
- 10 Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S. y Hamaguchi, M. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim. Biophys. Acta* 31, 1-2.
- Milligan, J.F. y Uhlenbeck, O.C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51-62.
- 15 Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A. y Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. y Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14687-14692.
- Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371-390.
- 20 Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D. y De Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757-763.
- Pan, T. y Uhlenbeck, O. C. (1992). In vitro selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb2+. *Biochemistry* 31, 3887-3895.
- 25 Pelissier, T. y Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed methylation. *RNA* 6, 55-65.
- Plasterk, R. H. y Ketting, R. F. (2000). The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 562-567.
- Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A. y Baulcombe, D. C. (1999). Gene Silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1216.
- Robertson, H. D. (1990). *Escherichia coli* ribonuclease III. *Methods Enzymol.* 181, 189-202.
- 30 Robertson, H. D. (1982). *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell* 30, 669-672.
- Romaniuk, E., McLaughlin, L. W., Neilson, T. y Romaniuk, P. J. (1982). The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction. *Eur J Biochem* 125, 639-643.
- Sharp, P. A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes & Dev.* 13, 139-141.
- 35 Sijen, T. y Kooter, J. M. (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22, 520-531.
- Smardon, A., Spoerke, J., Stacey, S., Klein, M., Mackin, N. y Maine, E. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 10, 169-178.
- 40 Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. y Schultz, R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156.

- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. y Mello, C. C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.
- Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benseler, F. y Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658-11668.
- 5 Tuschl, T., Sharp, P. A. y Bartel, D. P. (1998). Selection in vitro of novel ribozymes from a partially randomized U2 and U6 snRNA library. *EMBO J.* 17, 2637-2650.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. y Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-strand RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191-3197.
- 10 Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y. & Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Letters* 479, 79-82.
- Verma, S. y Eckstein, F. (1999). Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 99-134.
- Voinnet, O., Lederer, C. y Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.
- 15 Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* 43, 203-220.
- Wianny, F. y Zemicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-strand RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.
- Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J. y Crooke, S. T. (2000). Human RNase III is a 160 kDa Protein Involved in Preribosomal RNA Processing. *J. Biol. Chem.* 275, 17.
- 20 Yang, D., Lu, H. y Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *drosophila* embryos. *Curr. Biol.*, 10, 1191-1200.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. y Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- 25 Zhang, K. y Nicholson, A. W. (1997). Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13437-13441.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL)

<120> Moléculas de ARN pequeñas que median en la interferencia de ARN

5 <130> 23801P EP-WO-5

<150> EP 10 179 952.6

< 151> 2010-09-27

<160> 128

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

< 211> 38

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

15 < 223> cebador 5' para PCR (plantilla para la transcripción in vitro)

<400> 1

gcgtaatacg actcactata gaacaattgc ttttacag

38

<210> 2

< 211> 35

20 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> cebador 3' para PCR (plantilla para la transcripción in vitro)

<400> 2

25 atttaggtga cactataggc ataaagaatt gaaga

35

<210> 3

< 211> 30

< 212> ADN

< 213> Artificial

	<220>	
	< 223> cebador de transcripción inversa	
	<400> 3	
	gactagctgg aattcaagga tgcggttaa	30
5	<210> 4	
	< 211> 30	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
10	< 223> cebador 5' para PCR después de la transcripción inversa	
	<400> 4	
	cagccaacgg aattcatagc actcactaaa	30
	<210> 5	
	< 211> 36	
15	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador 5' para PCR (cartografía de la escisión de ARN diana)	
	<400> 5	
20	taatacgact cactatagag cccatatcgt ttcata	36
	<210> 6	
	< 211> 18	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
25	<220>	
	< 223> cebador 3' para PCR (cartografía de la escisión de ARN diana)	
	<400> 6	
	agaggatgga accgctgg	18

<210> 7

< 211> 178

< 212> ARN

< 213> Drosophila melanogaster

5 <220>

< 221> base modificada

< 222> (1)..(1)

< 223> caperuza m7g

<220>

10 < 221> característica heterogénea

< 222> (1)..(178)

< 223> ARN diana de sentido con caperuza, Fig. 3B

<400> 7

ggaacaaauug cuuuuacaga ugcacauauc gaggugaaca ucacguacgc ggaauacuuc	60
gaaauguccg uucgguuggc agaagcuauug aaacgauaug ggcugaauac aaauacacaga	120
aucgucguau gcagugaaaa cucucuucua uucuuuauugc cuauaguguc accuaaaau	178

15 <210> 8

< 211> 181

< 212> ARN

< 213> Drosophila melanogaster

<220>

20 < 221> base modificada

< 222> (1)..(1)

< 223> caperuza m7g

<220>

< 221> característica heterogénea

25 < 222> (1)..(181)

< 223> ARN diana antisentido con caperuza, Fig. 3B

<400> 8

gggcuaaaag aaugaagag aguuuucacu gcuaacgacg auucugugau uuguauucag 60
 cccauaucgu uucauagcuu cugccaaccg aacggacauu ucgaaguauu ccgcguacgu 120
 gauguuaccc ucgauaugug caucuguaaa agcaauuguu cuauagugag ucguauuacg 180
 c 181

<210> 9

< 211> 39

< 212> ARN

5 < 213> Drosophila melanogaster

<220>

< 221> característica heterogénea

< 222> (1)..(39)

< 223> dsPp-luc p133 de sentido, Fig. 4A

10 <400> 9

gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg gaauacuuc 39

<210> 10

< 211> 39

< 212> ARN

15 < 213> Drosophila melanogaster

<220>

< 221> característica heterogénea

< 222> (1)..(39)

< 223> dsPp-luc p133 antisentido, Fig. 4A

20 <400> 10

gaaguauucc gcguacguga uguucaccuc gauaugugc 39

<210> 11

< 211> 52

< 212> ARN

25 < 213> Drosophila melanogaster

<220>

	< 221> característica heterogénea	
	< 222> (1)..(52)	
	< 223> dsPp-luc p133 de sentido, Fig. 4A	
	<400> 11	
5	gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg gaauacuucg aaauguccgu uc	52
	<210> 12	
	< 211> 52	
	< 212> ARN	
	< 213> Drosophila melanogaster	
10	<220>	
	< 221> característica heterogénea	
	< 222> (1)..(52)	
	< 223> dsPp-luc p133 antisentido, Fig. 4A	
	<400> 12	
15	gaacggacau uucgaaguau uccgcguacg ugauguuac cucgauaugu gc	52
	<210> 13	
	< 211> 111	
	< 212> ARN	
	< 213> Drosophila melanogaster	
20	<220>	
	< 221> característica heterogénea	
	< 222> (1)..(111)	
	< 223> dsPp-luc p133 de sentido, Fig. 4A	
	<400> 13	
	gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg gaauacuucg aaauguccgu ucgguuggca	60
25	gaagcuauga aacgauaugg gcugaauaca aaucacagaa ucgucguaug c	111
	<210> 14	
	< 211> 111	

< 212> ARN

< 213> Drosophila melanogaster

<220>

< 221> característica heterogénea

5 < 222> (1)..(111)

< 223> dsPp-luc p133 antisentido, Fig. 4A

<400> 14

gcauacgacg auucugugau uguauucag cccauaucgu uucauagcuu cugccaaccg 60

aacggacauu ucgaaguauu ccgcguacgu gauguuacc ucgauaugug c 111

<210> 15

10 < 211> 52

< 212> ARN

< 213> Artificial

<220>

< 223> ARNds de hebra de sentido, Fig. 5A

15 <400> 15

gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg gaauacuucg aaauguccgu uc 52

<210> 16

< 211> 54

< 212> ARN

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> ARNds de hebra antisentido, Fig. 5A

<400> 16

gaacggacauu uucgaaguau uccgcguacg ugauguuac cucgauaugu gcac 54

25 <210> 17

< 211> 21

< 212> ARN

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido uGL2, Fig. 8b	
	<400> 17	
5	cguacgcgga auacuucgau u	21
	<210> 18	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido uGL2, Fig. 8b	
	<400> 18	
	ucgaaguaau ccgcuacgu u	21
	<210> 19	
15	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido GL2, Fig. 8b	
20	<400> 19	
	cguacgcgga auacuucgat t	21
	<210> 20	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido GL2, Fig. 8b	
	<400> 20	

	ucgaaguauu ccgcguacgt t	21
	<210> 21	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido GL3, Fig. 8b	
	<400> 21	
	cuuacgcuga guacuucgat t	21
10	<210> 22	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido GL3, Fig. 8b	
	<400> 22	
	ucgaaguacu cagcguaagt t	21
	<210> 23	
	< 211> 21	
20	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido invGL2, Fig. 8b	
	<400> 23	
25	agcuucauaa ggcgcaugct t	21
	<210> 24	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido invGL2, Fig. 8b	
	<400> 24	
5	gcaugcgccu uaugaagcut t	21
	<210> 25	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido RL, Fig. 8b	
	<400> 25	
	aaacaugcag aaaaugcugt t	21
	<210> 26	
15	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido RL, Fig. 8b	
20	<400> 26	
	cagcauuuuc ugcauguuut t	21
	<210> 27	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 11C-J	
	<400> 27	

	aucacguacg cggaauacuu c	21
	<210> 28	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11C	
	<400> 28	
	guauuccgcg uacgugaugu u	21
10	<210> 29	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2., Fig. 11C-J	
	<400> 29	
	ucacguacgc ggaauacuuc g	21
	<210> 30	
	< 211> 21	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 11C-J	
	<400> 30	
25	cacguacgcg gaauacuucg a	21
	<210> 31	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 11C-J	
	<400> 31	
5	acguacgcgg aauacuucga a	21
	<210> 32	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5., Fig. 11C-J	
	<400> 32	
	cguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 33	
15	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11D	
20	<400> 33	
	aguauuccgc guacgugaug u	21
	<210> 34	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11E	
	<400> 34	

	aaguaauuccg cguacgugau g	21
	<210> 35	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11F	
	<400> 35	
	gaaguaauucc gcguacguga u	21
10	<210> 36	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11G	
	<400> 36	
	cgaaguaauuc cgcguacgug a	21
	<210> 37	
	< 211> 21	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11H	
	<400> 37	
25	ucgaaguauu ccgcguacgu g	21
	<210> 38	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11I	
	<400> 38	
5	uucgaaguau uccgcguacg u	21
	<210> 39	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-5., Fig. 11J	
	<400> 39	
	uuucgaagua uuccgcguac g	21
	<210> 40	
15	< 211> 18	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 12B-D	
20	<400> 40	
	cguacgcgga auacuucg	18
	<210> 41	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-8., Fig. 12B	
	<400> 41	

	uucgaaguau uccgcguacg u	21
	<210> 42	
	< 211> 19	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2., Fig. 12B-D	
	<400> 42	
	cguacgcgga auacuucga	19
10	<210> 43	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 12B-D	
	<400> 43	
	cguacgcgga auacuucgaa	20
	<210> 44	
	< 211> 21	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 12B-D	
	<400> 44	
25	cguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 45	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5., Fig. 12B-D	
	<400> 45	
5	cguacgcgga auacuucgaa au	22
	<210> 46	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 6., Fig. 12B-D	
	<400> 46	
	cguacgcgga auacuucgaa aug	23
	<210> 47	
15	< 211> 24	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 7., Fig. 12B-D	
20	<400> 47	
	cguacgcgga auacuucgaa augu	24
	<210> 48	
	< 211> 25	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 8., Fig. 12B-D	
	<400> 48	

	cguacgcgga auacuucgaa auguc	25
	<210> 49	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-8., Fig. 12C	
	<400> 49	
	ucgaaguauu ccgcuacgu g	21
10	<210> 50	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1.-8., Fig. 12D	
	<400> 50	
	cgaaguauuc ccgcuacgug a	21
	<210> 51	
	< 211> 20	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 13B	
	<400> 51	
25	cguacgcgga auacuucgaa	20
	<210> 52	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1., Fig. 13B	
	<400> 52	
5	cgaaguauuc cgcguacgug	20
	<210> 53	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2., Fig. 13B+C	
	<400> 53	
	cguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 54	
15	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 2., Fig. 13B+C	
20	<400> 54	
	ucgaaguauu ccgcuacgu g	21
	<210> 55	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 13B	
	<400> 55	

	cguacgcgga auacuucgaa au	22
	<210> 56	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 3., Fig. 13B	
	<400> 56	
	uucgaaguau uccgcguacg ug	22
10	<210> 57	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 13B	
	<400> 57	
	cguacgcgga auacuucgaa aug	23
	<210> 58	
	< 211> 23	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 4., Fig. 13B	
	<400> 58	
25	uuucgaagua uuccgcguac gug	23
	<210> 59	
	< 211> 24	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5., Fig. 13B	
	<400> 59	
5	cguacgcgga auacuucgaa augu	24
	<210> 60	
	< 211> 24	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 5., Fig. 13B	
	<400> 60	
	auuucgaagu auuccgcgua cgug	24
	<210> 61	
15	< 211> 25	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 6., Fig. 13B	
20	<400> 61	
	cguacgcgga auacuucgaa auguc	25
	<210> 62	
	< 211> 25	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 6., Fig. 13B	
	<400> 62	

	cauuucgaag uauuccgcgu acgug	25
	<210> 63	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 13C	
	<400> 63	
	guacgcggaa uacuucgaaa	20
10	<210> 64	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1., Fig. 13C	
	<400> 64	
	ucgaaguauu ccgcguacgu	20
	<210> 65	
	< 211> 22	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 13C	
	<400> 65	
25	acguacgcgg aauacuucga aa	22
	<210> 66	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 3., Fig. 13C	
	<400> 66	
5	ucgaaguauu ccgcguacgu ga	22
	<210> 67	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 13C	
	<400> 67	
	cacguacgcg gaauacuucg aaa	23
	<210> 68	
15	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 4., Fig. 13C	
20	<400> 68	
	ucgaaguauu ccgcguacgu gau	23
	<210> 69	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido, Fig. 14 y Fig. 15A, dúplex 1	
	<400> 69	

	cguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 70	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido, Fig. 14 & Fig. 15A, dúplex 1	
	<400> 70	
	ucgaaguaau ccgcguacgu g	21
10	<210> 71	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2, Fig. 15A	
	<400> 71	
	acguacgcgg aaacuucga a	21
	<210> 72	
	< 211> 21	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 2, Fig. 15A	
	<400> 72	
25	cgaaguauuc cgcuacgug a	21
	<210> 73	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3, Fig. 15A	
	<400> 73	
5	cacguacgcg gaauacuucg a	21
	<210> 74	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 3, Fig. 15A	
	<400> 74	
	gaaguauucc gcguacguga u	21
	<210> 75	
15	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4, Fig. 15A	
20	<400> 75	
	ucacguacgc ggaauacuuc g	21
	<210> 76	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 4, Fig. 15A	
	<400> 76	

	aaguaauuccg cguacgugau g	21
	<210> 77	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5, Fig. 15A	
	<400> 77	
	aucacguacg cggaauacuu c	21
10	<210> 78	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 5, Fig. 15A	
	<400> 78	
	aguaauuccgc guacgugaug u	21
	<210> 79	
	< 211> 18	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 16C	
	<400> 79	
25	cguacgcgga auacuucg	18
	<210> 80	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> hebra antisentido de todos los dúplex de ARNsi, Fig. 16C y D	
	<400> 80	
5	ucgaaguauu ccgcgguacgu g	21
	<210> 81	
	< 211> 19	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2., Fig. 16C	
	<400> 81	
	cguacgcgga auacuucga	19
	<210> 82	
15	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 16C	
20	<400> 82	
	cguacgcgga auacuucgaa	20
	<210> 83	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 16C y D	
	<400> 83	

	cguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 84	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5., Fig. 16C	
	<400> 84	
	cguacgcgga auacuucgaa au	22
10	<210> 85	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 6., Fig. 16C	
	<400> 85	
	cguacgcgga auacuucgaa aug	23
	<210> 86	
	< 211> 24	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 7., Fig. 16C	
	<400> 86	
25	cguacgcgga auacuucgaa augu	24
	<210> 87	
	< 211> 25	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 8., Fig. 16C	
	<400> 87	
5	cguacgcgga auacuucgaa auguc	25
	<210> 88	
	< 211> 18	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 16D	
	<400> 88	
	acgcggaaua cuucgaaa	18
	<210> 89	
15	< 211> 19	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2., Fig. 16D	
20	<400> 89	
	uacgcggaau acuucgaaa	19
	<210> 90	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 16D	
	<400> 90	

	guacgcggaa uacuucgaaa	20
	<210> 91	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5., Fig. 16D	
	<400> 91	
	acguacgcgg aaacuucga aa	22
10	<210> 92	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 6., Fig. 16D	
	<400> 92	
	cacguacgcg gaauacuucg aaa	23
	<210> 93	
	< 211> 21	
20	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido ref, Fig. 18	
	<400> 93	
25	cguacgcgga auacuucgat t	21
	<210> 94	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido ref, Fig. 18	
	<400> 94	
5	ucgaaguauu ccgcgucacgt t	21
	<210> 95	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1, Fig. 18	
	<400> 95	
	augccgcgga auacuucgat t	21
	<210> 96	
15	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1, Fig. 18	
20	<400> 96	
	ucgaaguauu ccgcggauc t	21
	<210> 97	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2, Fig. 18	
	<400> 97	

	cguagcgcgga auacuucgat t	21
	<210> 98	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 2, Fig. 18	
	<400> 98	
	ucgaaguauu cgcgcuacgt t	21
10	<210> 99	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3, Fig. 18	
	<400> 99	
	cguacgcgag uaacuucgat t	21
	<210> 100	
	< 211> 21	
20	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 3, Fig. 18	
	<400> 100	
25	ucgaaguac ucgcuacgt t	21
	<210> 101	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4, Fig. 18	
	<400> 101	
5	cguacgcgga auuucacgat t	21
	<210> 102	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 4, Fig. 18	
	<400> 102	
	ucgugaaaau ccgcguacgt t	21
	<210> 103	
15	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5, Fig. 18	
20	<400> 103	
	cguacgcgga auacuuagct t	21
	<210> 104	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 5, Fig. 18	
	<400> 104	

	gcuaaguauu ccgcguacgt t	21
	<210> 105	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 6, Fig. 18	
	<400> 105	
	cguacgcggu auacuucgat t	21
10	<210> 106	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 6, Fig. 18	
	<400> 106	
	ucgaaguaua ccgcguacgt t	21
	<210> 107	
	< 211> 21	
20	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 7, Fig. 18	
	<400> 107	
25	cguacgcgga uuacuucgat t	21
	<210> 108	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 7, Fig. 18	
	<400> 108	
5	ucgaaguaau ccgcuacgt t	21
	<210> 109	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 19A	
	<400> 109	
	cguacgcgga auacuucgaa	20
	<210> 110	
15	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1., Fig. 19A	
20	<400> 110	
	cgaaguaauuc cgcguacgug	20
	<210> 111	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 2., Fig. 19A & B	
	<400> 111	

	cguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 112	
	< 211> 21	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 2., Fig. 19A & B	
	<400> 112	
	ucgaaguauu ccgcuacgu g	21
10	<210> 113	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 19A	
	<400> 113	
	cguacgcgga auacuucgat t	21
	<210> 114	
	< 211> 21	
20	< 212> ADN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 3., Fig. 19A	
	<400> 114	
25	ucgaaguauu ccgcuacgt t	21
	<210> 115	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 19A	
	<400> 115	
5	cguacgcgga auacuucgaa au	22
	<210> 116	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 4., Fig. 19A	
	<400> 116	
	uucgaaguau uccgcguacg ug	22
	<210> 117	
15	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 5., Fig. 19A	
20	<400> 117	
	cguacgcgga auacuucgaa aug	23
	<210> 118	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 5., Fig. 19A	
	<400> 118	

	uuucgaagua uuuccgguac gug	23
	<210> 119	
	< 211> 24	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 6., Fig. 19A	
	<400> 119	
	cguacgcgga auacuucgaa augu	24
10	<210> 120	
	< 211> 24	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 6., Fig. 19A	
	<400> 120	
	auuucgaagu auuccgguac cgug	24
	<210> 121	
	< 211> 25	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 7., Fig. 19A	
	<400> 121	
25	cguacgcgga auacuucgaa auguc	25
	<210> 122	
	< 211> 25	
	< 212> ARN	

	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 7., Fig. 19A	
	<400> 122	
5	cauuucgaag uauuccgcu acgug	25
	<210> 123	
	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
10	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 1., Fig. 19B	
	<400> 123	
	guacgcggaa uacuucgaaa	20
	<210> 124	
15	< 211> 20	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 1., Fig. 19B	
20	<400> 124	
	ucgaaguauu ccgcuacgu	20
	<210> 125	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
25	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 3., Fig. 19B	
	<400> 125	

	acguacgcgg aaacuucga aa	22
	<210> 126	
	< 211> 22	
	< 212> ARN	
5	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 3., Fig. 19B	
	<400> 126	
	ucgaaguauu ccgcuacgu ga	22
10	<210> 127	
	< 211> 23	
	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
15	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra de sentido 4., Fig. 19B	
	<400> 127	
	cacguacgcg gaacuucg aaa	23
	<210> 128	
	< 211> 23	
20	< 212> ARN	
	< 213> Artificial	
	<220>	
	< 223> dúplex de ARNsi de la hebra antisentido 4., Fig. 19B	
	<400> 128	
25	ucgaaguauu ccgcuacgu gau	23

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ARN de doble hebra aislada, en la que cada hebra de ARN tiene una longitud de 19-23 nucleótidos, en donde una hebra tiene un saliente 3' de 1-3 nucleótidos y una hebra es de extremos romos, en donde dicha molécula de ARN es capaz de interferencia de ARN específica de una diana.
2. La molécula de ARN según la reivindicación 1, en la que el saliente 3' está estabilizado contra la degradación.
3. La molécula de ARN según la reivindicación 1 o 2, que contiene al menos un análogo nucleotídico modificado, particularmente seleccionado de ribonucleótidos modificados en el azúcar o en el esqueleto.
4. La molécula de ARN según la reivindicación 3, en la que el análogo nucleotídico es (i) un ribonucleótido modificado en el azúcar, en donde el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es alquilo C₁-C₆, alqueno o alquino y el halo es F, Cl, Br o I o (ii) un ribonucleótido modificado en el esqueleto que contiene un grupo fosfotioato.
5. La molécula de ARN según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos 70 por ciento con una molécula diana de ARNm predeterminada.
6. Un método para preparar una molécula de ARN de doble hebra según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende las etapas:
 - (a) sintetizar químicamente o enzimáticamente dos hebras de ARN que tienen una longitud de 19-23 nucleótidos, en donde dichas hebras de ARN son capaces de formar una molécula de ARN de doble hebra,
 - (b) combinar las hebras de ARN sintetizadas bajo condiciones en las que se forma una molécula de ARN de doble hebra, que es capaz de interferencia de ARN específica para una diana.
7. Un método in vitro para mediar en la interferencia de ARN específica para una diana en una célula, que comprende las etapas:
 - (a) poner en contacto dicha célula con la molécula de ARN de doble hebra según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 bajo condiciones en las que se pueda producir interferencia de ARN específica para una diana y
 - (b) mediar en una interferencia de ARN específica para una diana efectuada por el ARN de doble hebra hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia sustancialmente correspondiente al ARN de doble hebra.
8. El método según la reivindicación 7, en el que dicho contacto comprende introducir dicha molécula de ARN de doble hebra en una célula diana en la que se puede producir la interferencia de ARN específica para una diana, en donde la introducción comprende preferiblemente un aporte o una inyección mediados por portador.
9. Uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para (i) determinar la función de un gen en una célula, o (ii) para modular la función de un gen en una célula.
10. Composición farmacéutica que contiene como un agente activo al menos una molécula de ARN de doble hebra según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un portador farmacéutico.

FIGURA 1A

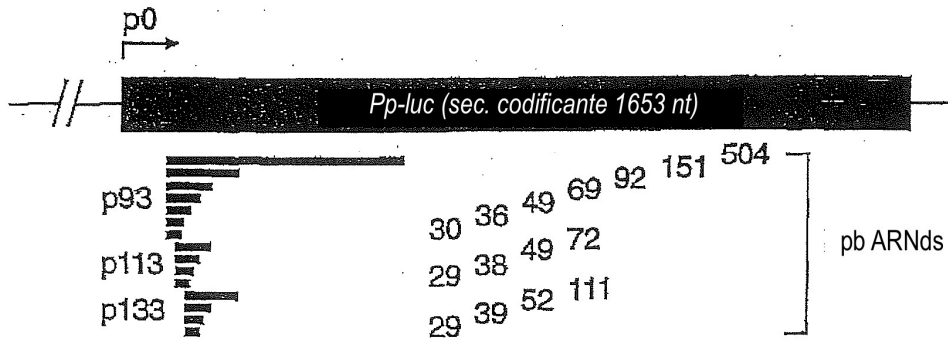


FIGURA 1B

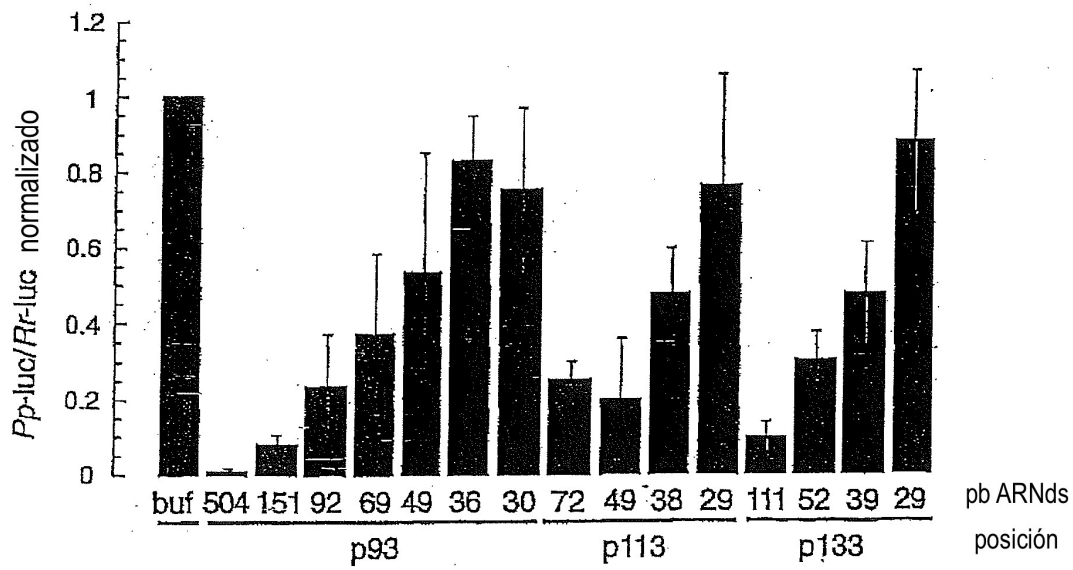


FIGURA 2

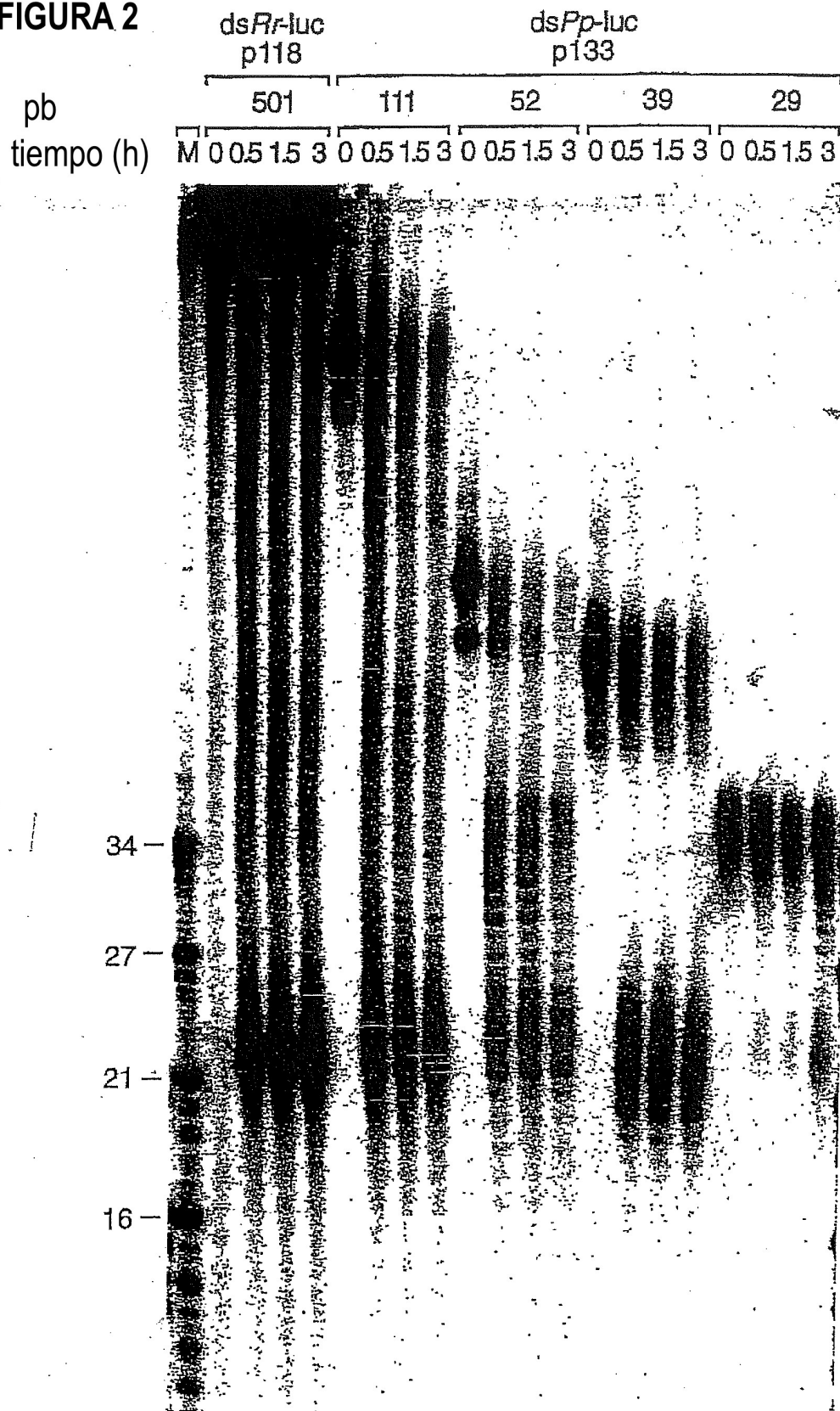


FIGURA 3A

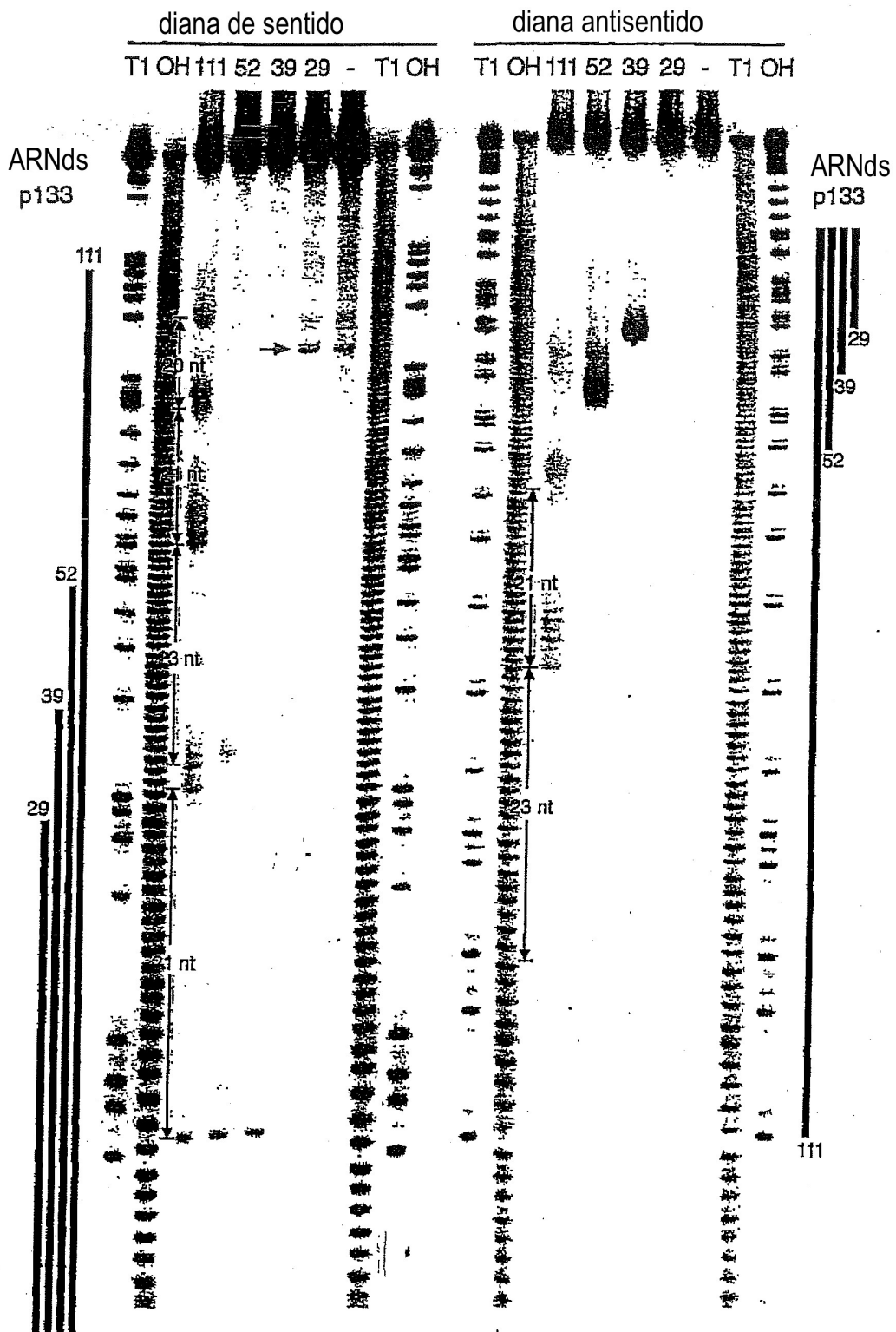
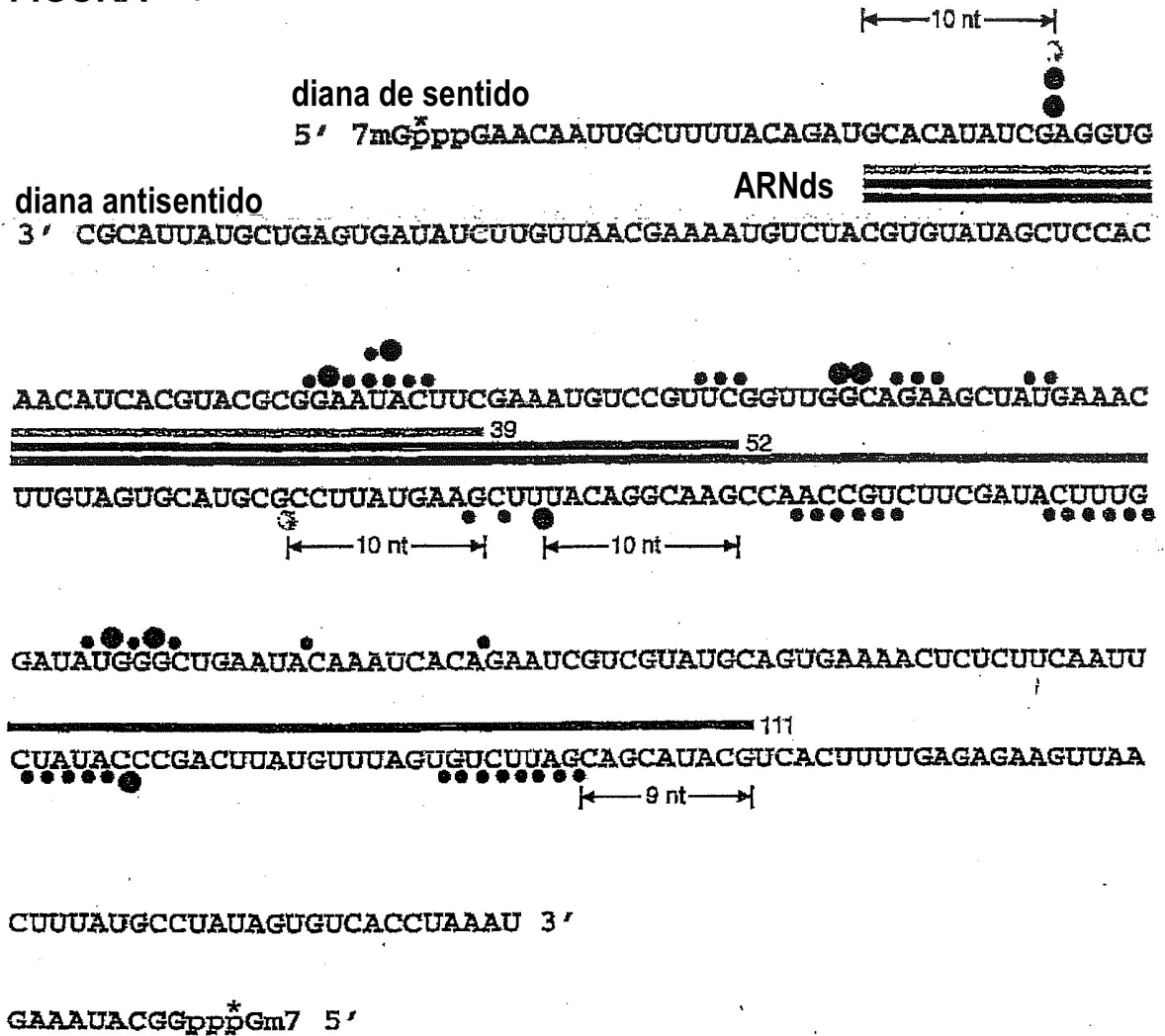


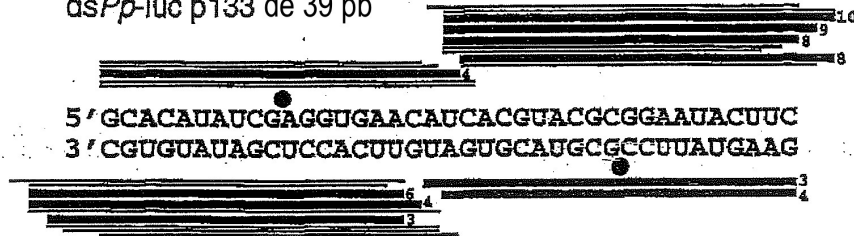
FIGURA 3B



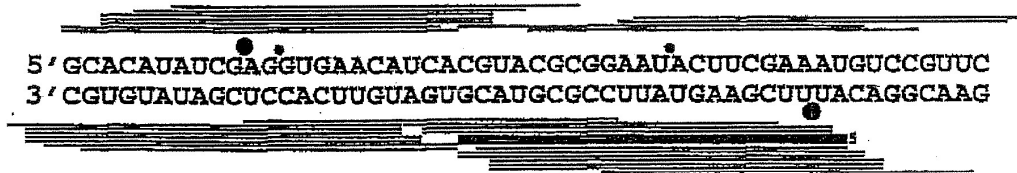
0/20

FIGURA 4A

dsPp-luc p133 de 39 pb



dsPp-luc p133 de 52 pb



dsPp-luc p133 de 111 pb

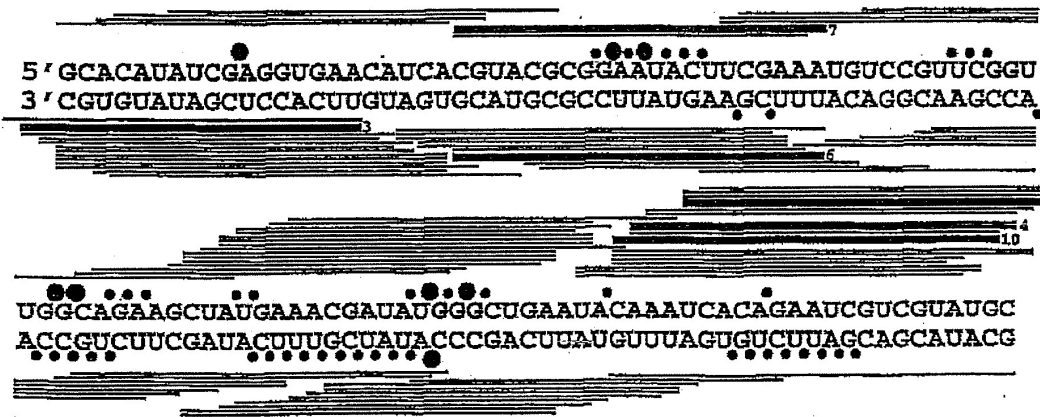


FIGURA 4B

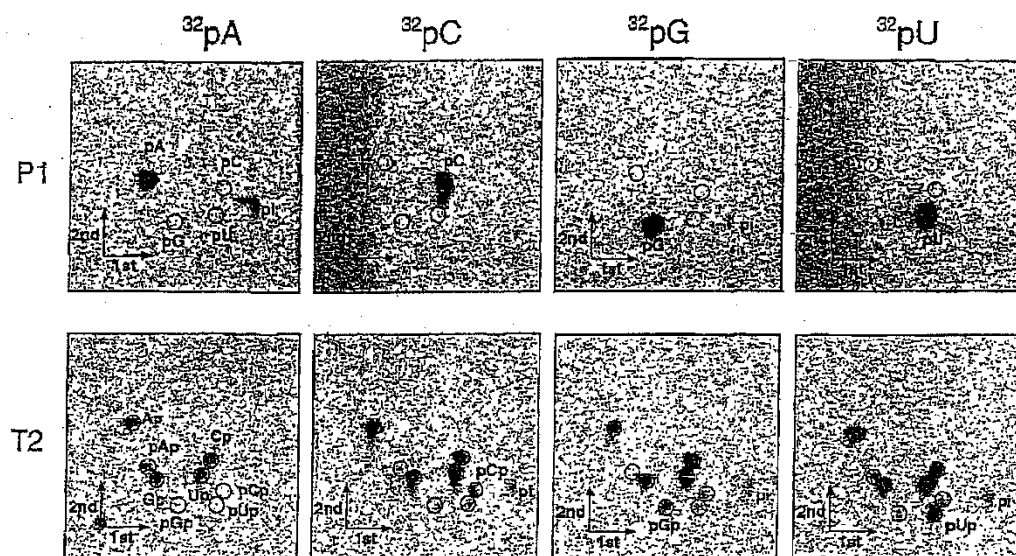


FIGURA 5A

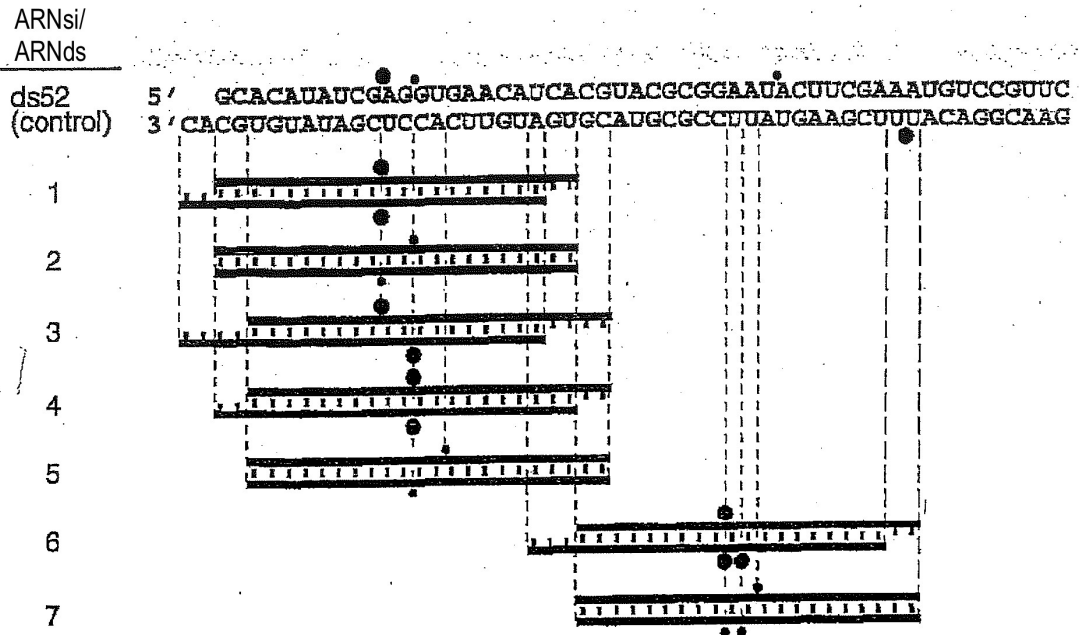


FIGURA 5B

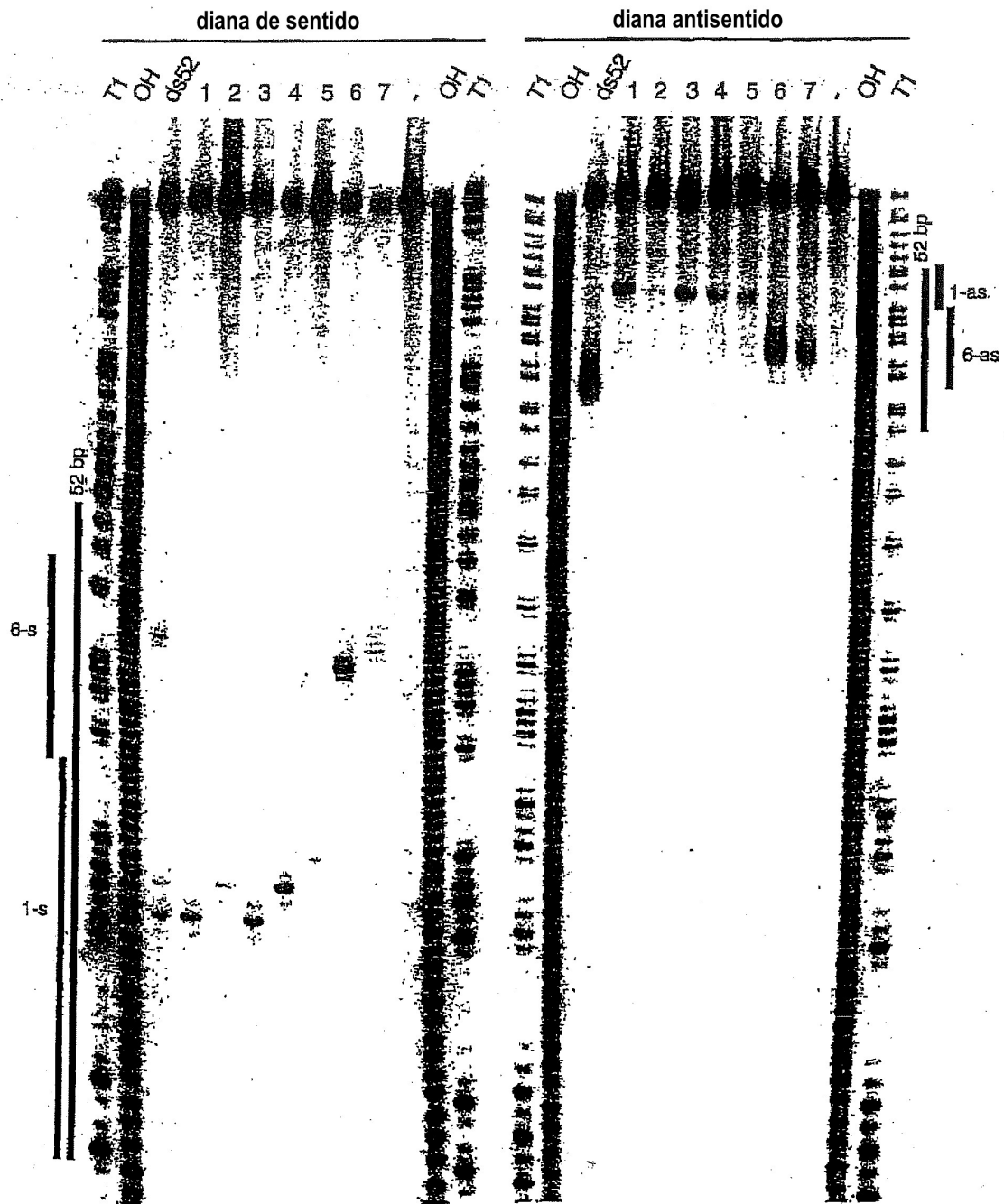


FIGURA 6A

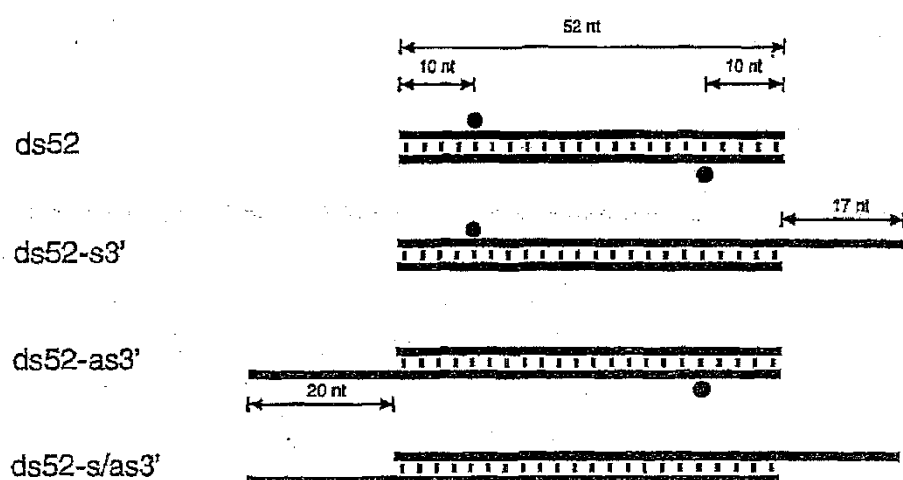
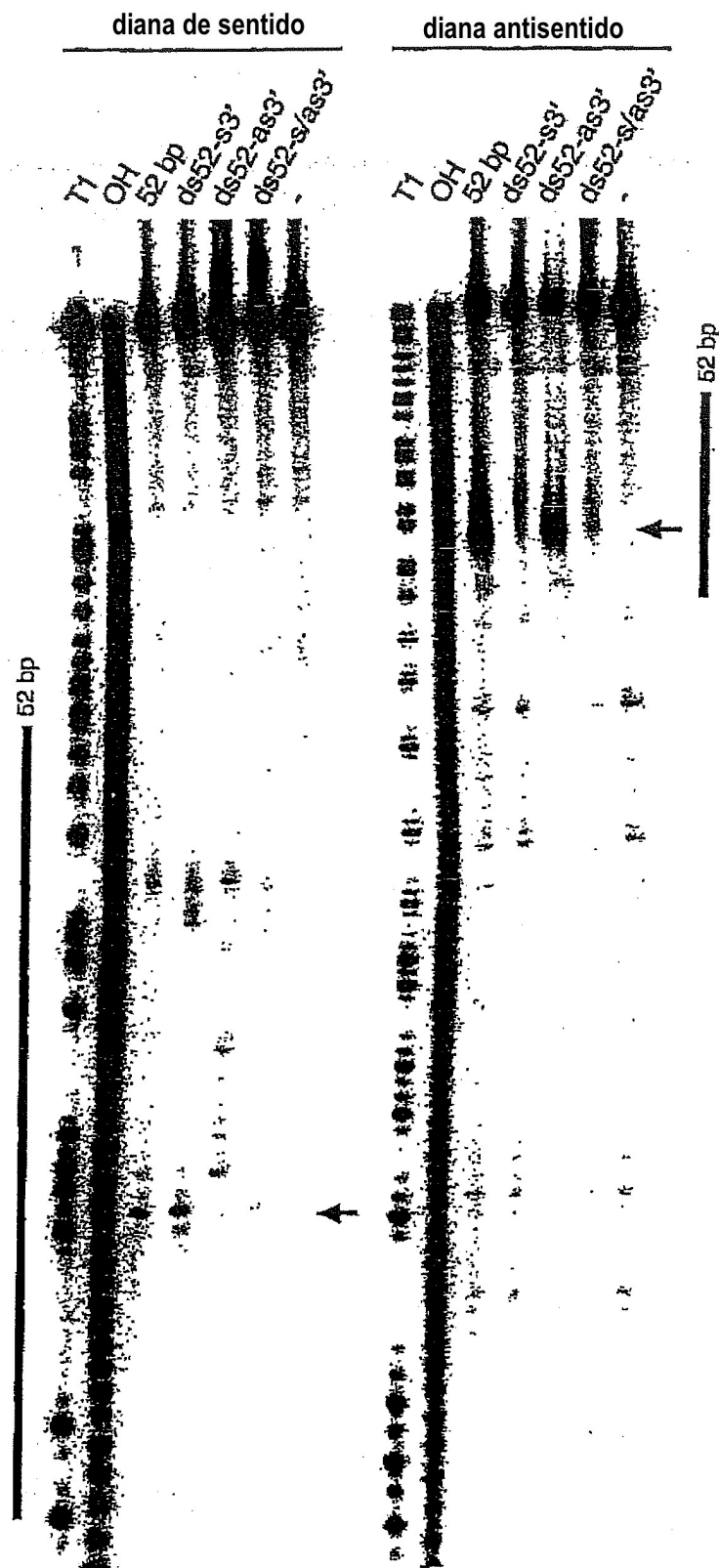


FIGURA 6B



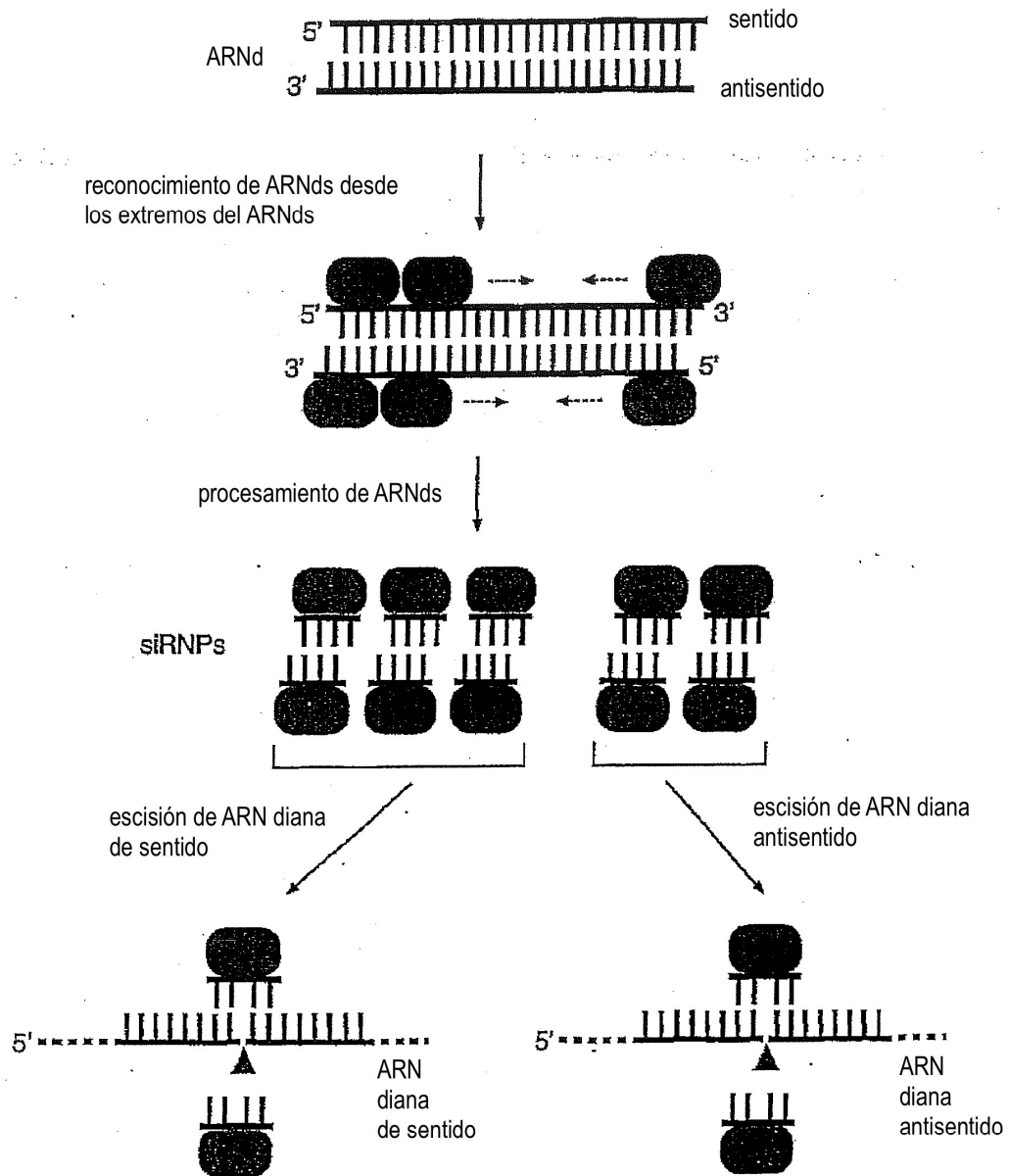
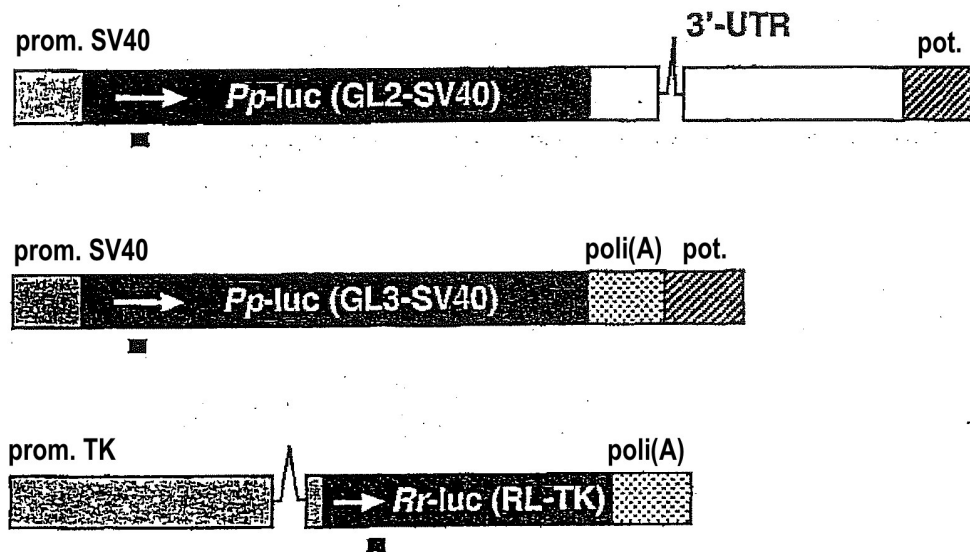


FIGURA 7

a



b

dúplex de
ARNsi

uGL2	5' CGUACGCGGAUACUUCGAUU UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL2	5' CGUACGCGGAUACUUCGATT TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL3	5' CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
invGL2	5' AGCUUCAUAAGGCGCAUGCTT TTUCGAAGUAUCCGCGUACG 5'
RL	5' AAACAUGCAGAAAUGCUGTT TTUUUGUACGUCUUUACGAC 5'

FIGURA 8

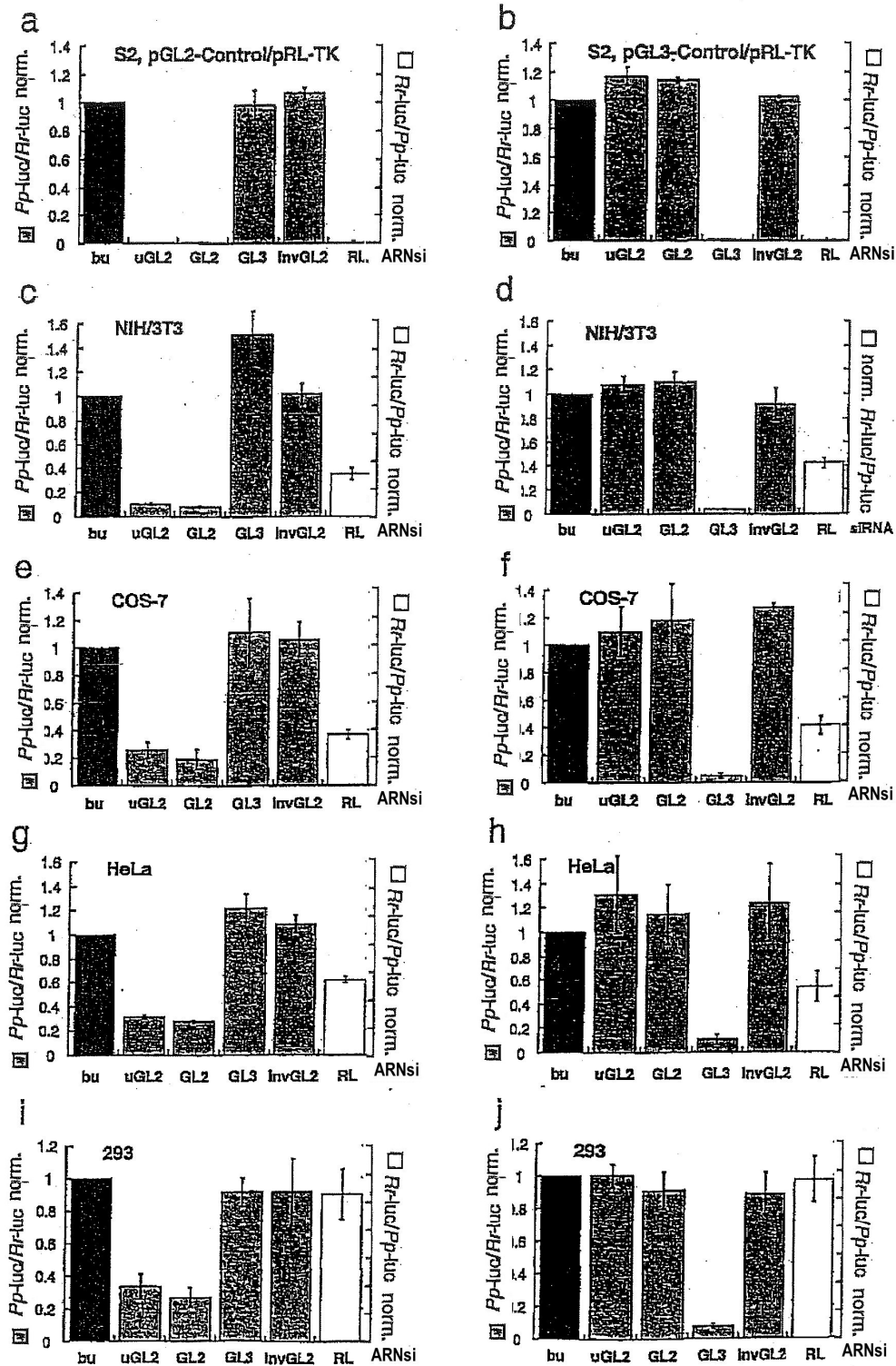


FIGURA 9

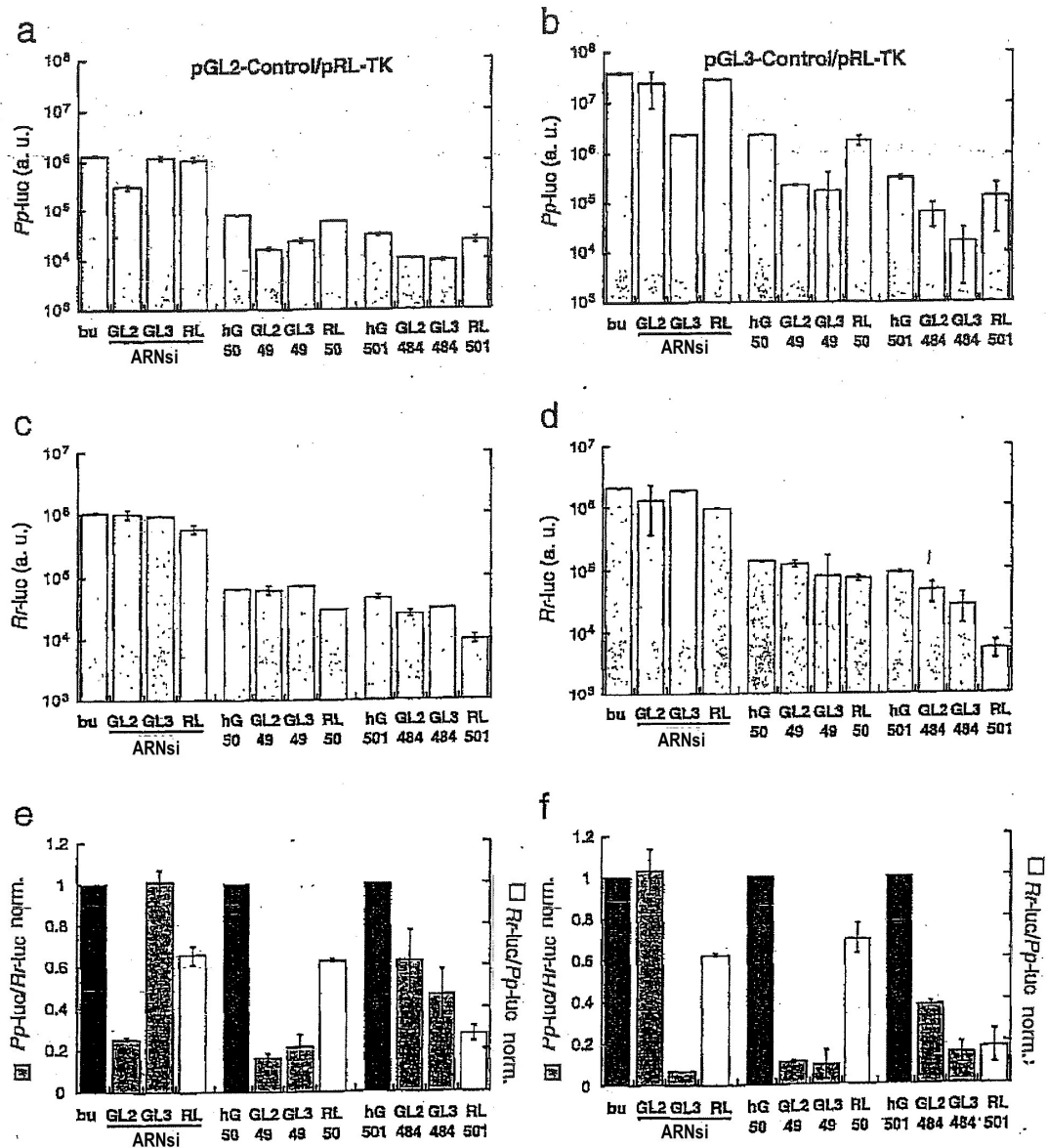


FIGURA 10

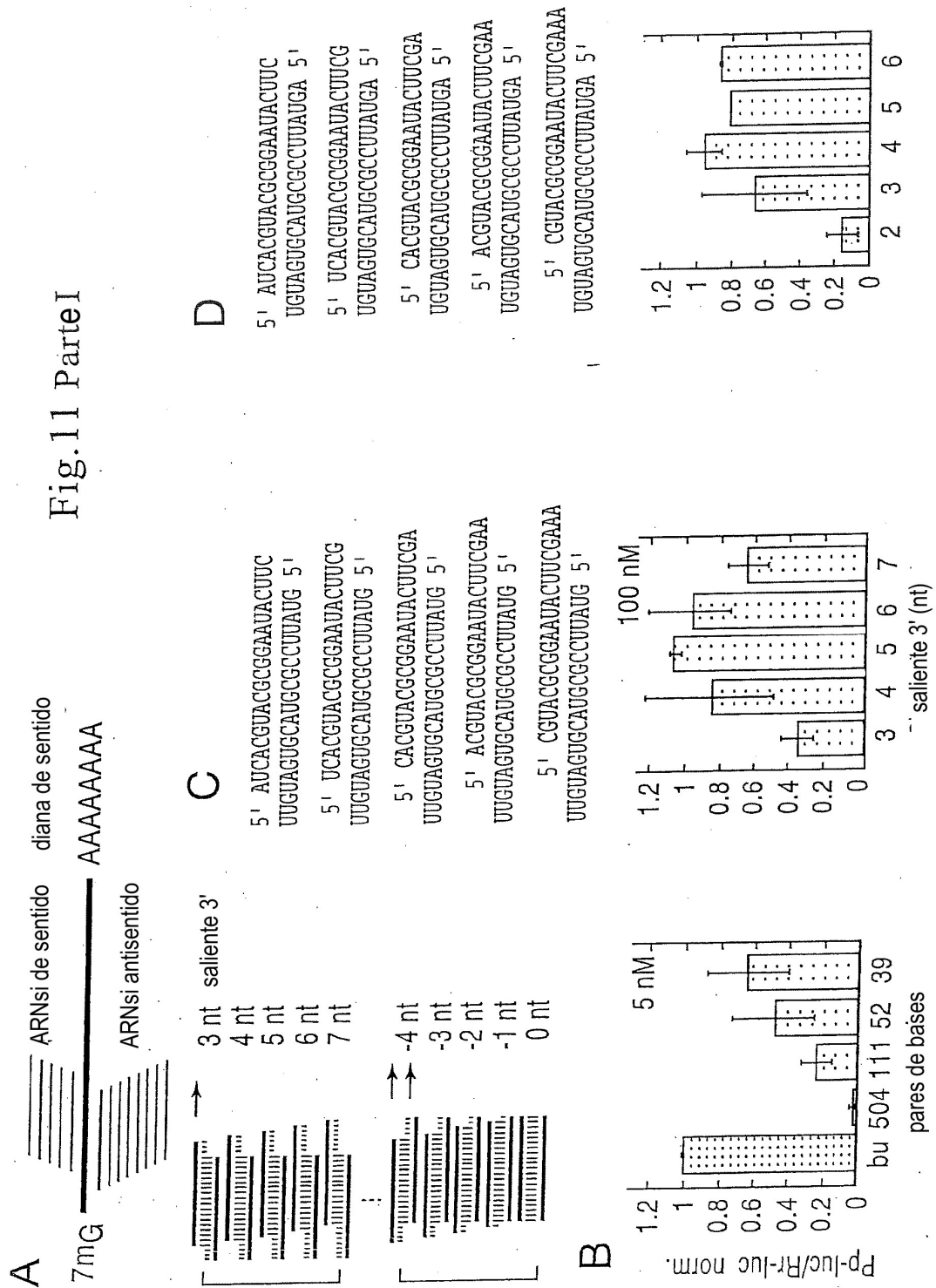


Fig.11 Parte II

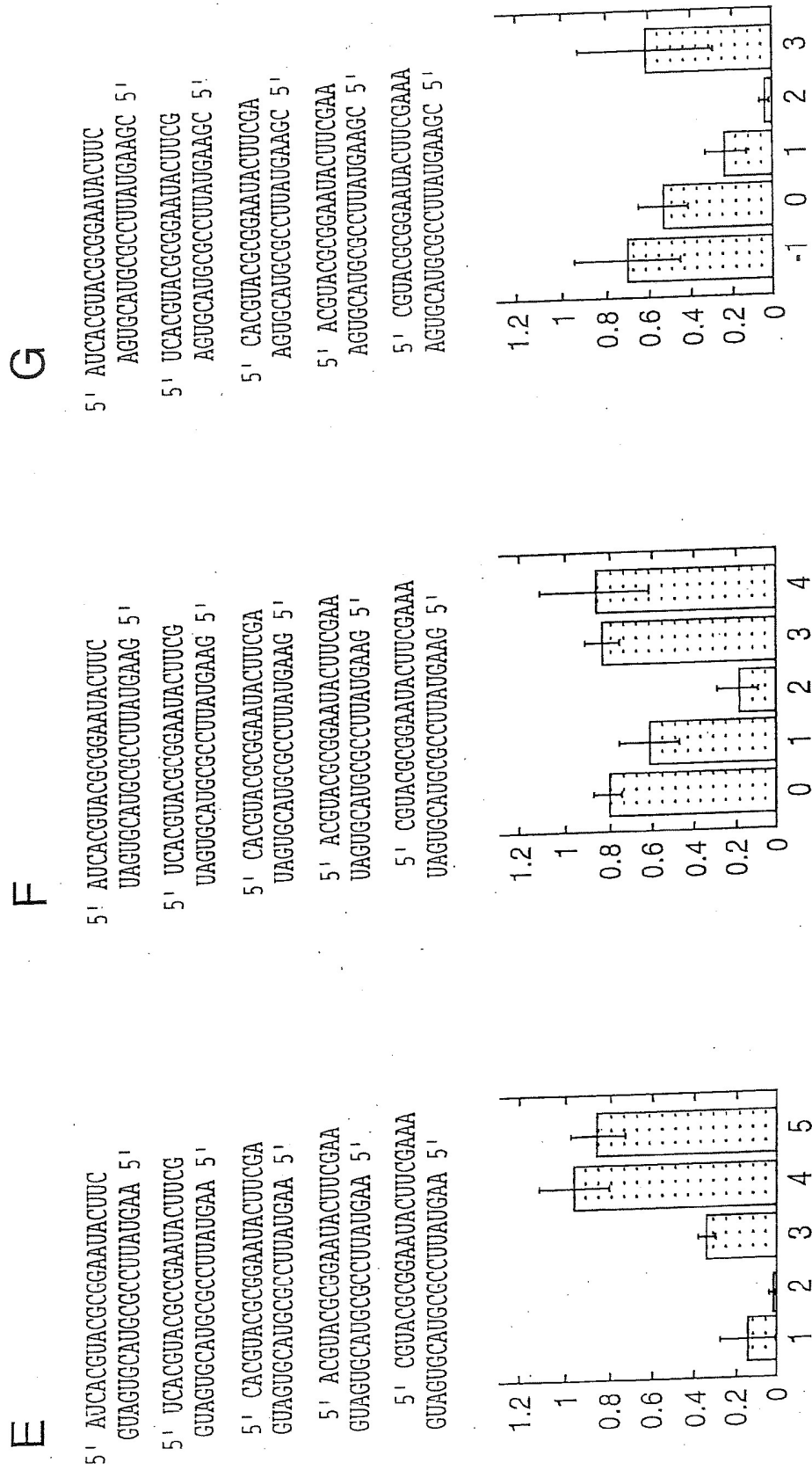
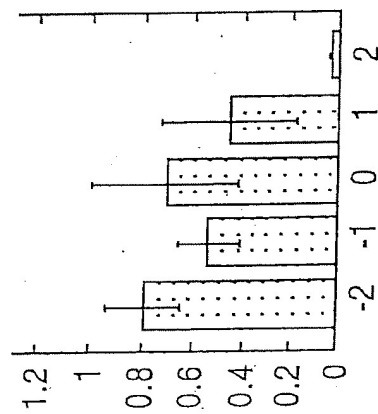


Fig.11 Parte III

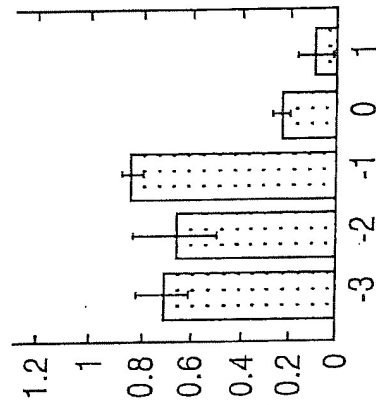
H

5' AUCACGUACGGGAAUACUUC
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' UCACGUACGGGAAUACUUCG
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' CACGUACGGGAAUACUUGA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' ACGUACGGGAAUACUUGAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' CGUACGGGAAUACUUGAAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'



I

5' AUCACGUACGGGAAUACUUC
UGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' UCACGUACGGGAAUACUUCG
UGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' CACGUACGGGAAUACUUGA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' ACGUACGGGAAUACUUGAA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'
5' CGUACGGGAAUACUUGAAA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'



J

5' AUCACGUACGGGAAUACUUC
GCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'
5' UCACGUACGGGAAUACUUCG
GCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'
5' CACGUACGGGAAUACUUGA
GCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'
5' ACGUACGGGAAUACUUGAA
GCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'
5' CGUACGGGAAUACUUGAAA
GCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

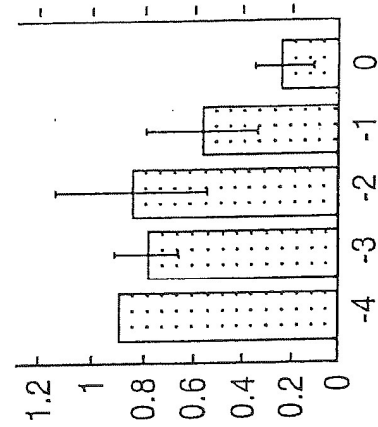
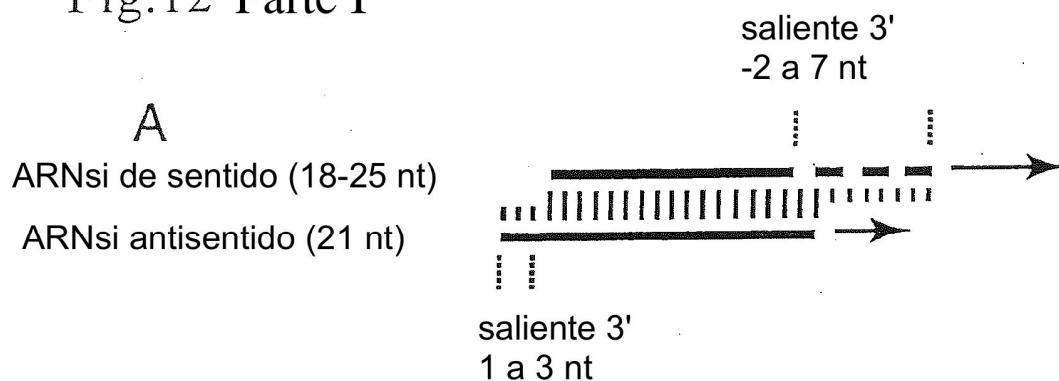


Fig.12 Parte I



B

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'

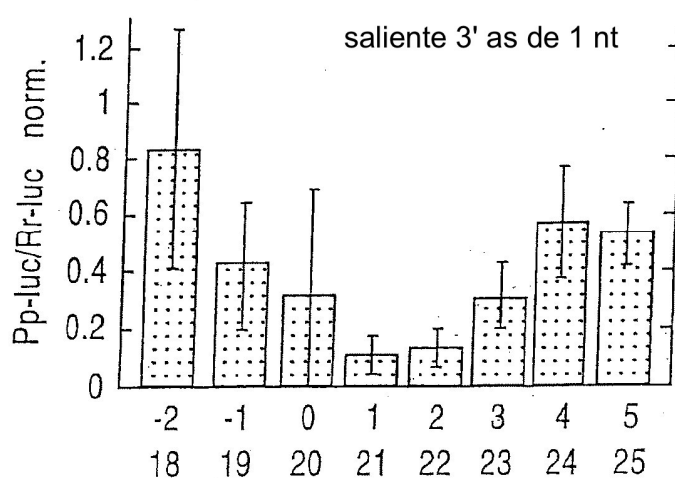


Fig.12 Parte II

C

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

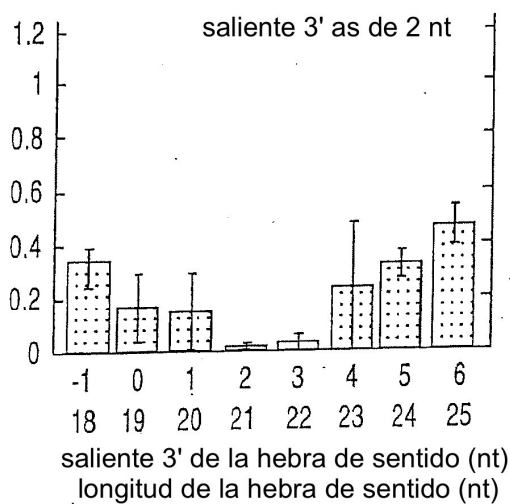
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'



D

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

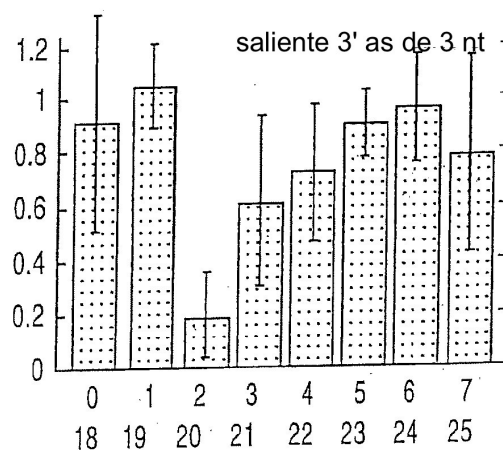


Fig.13

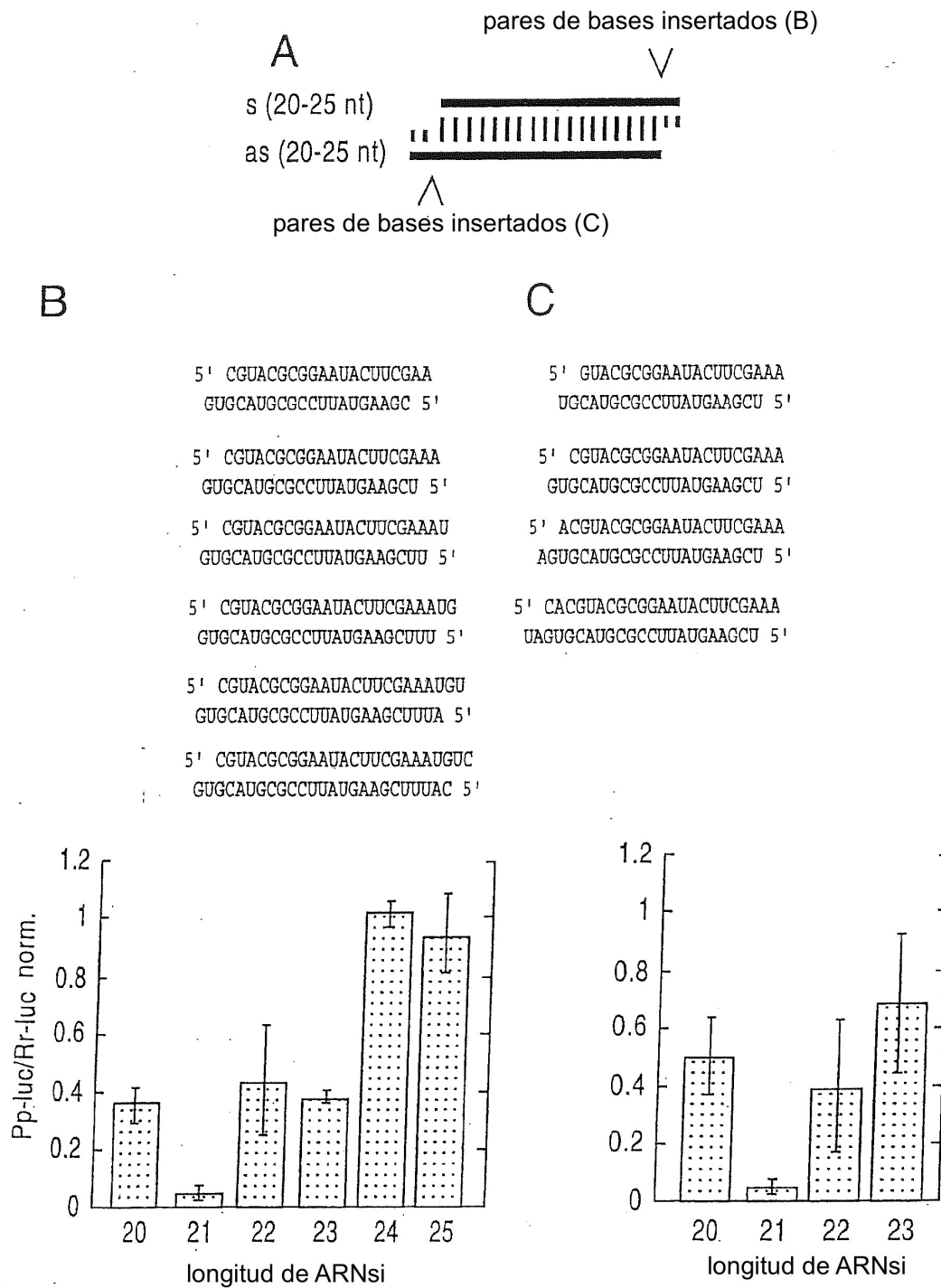


Fig. 14

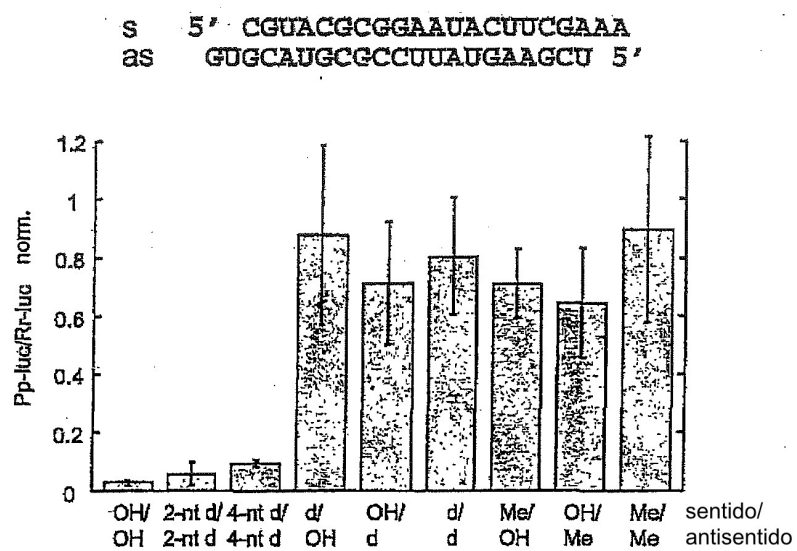


Fig.15

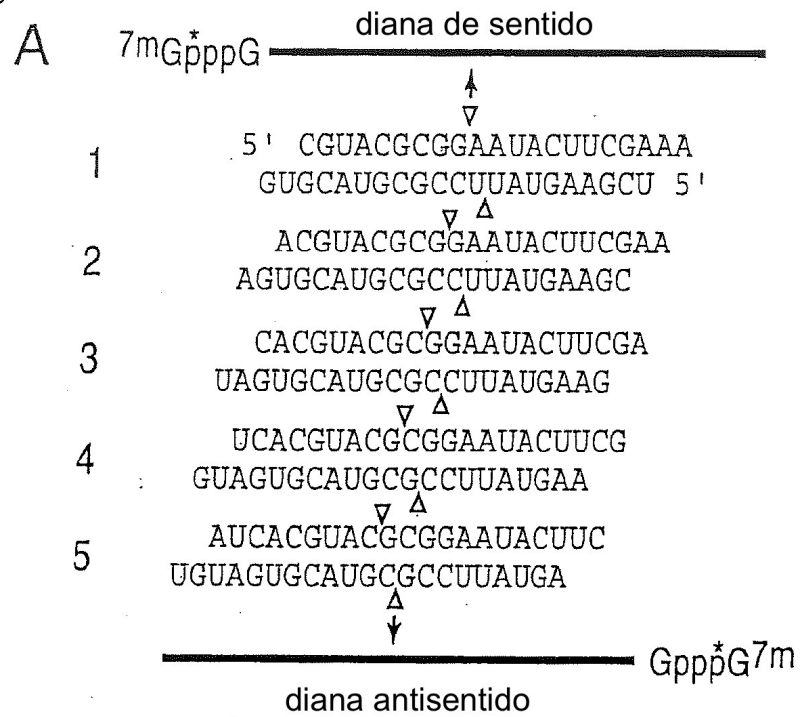


Fig.16

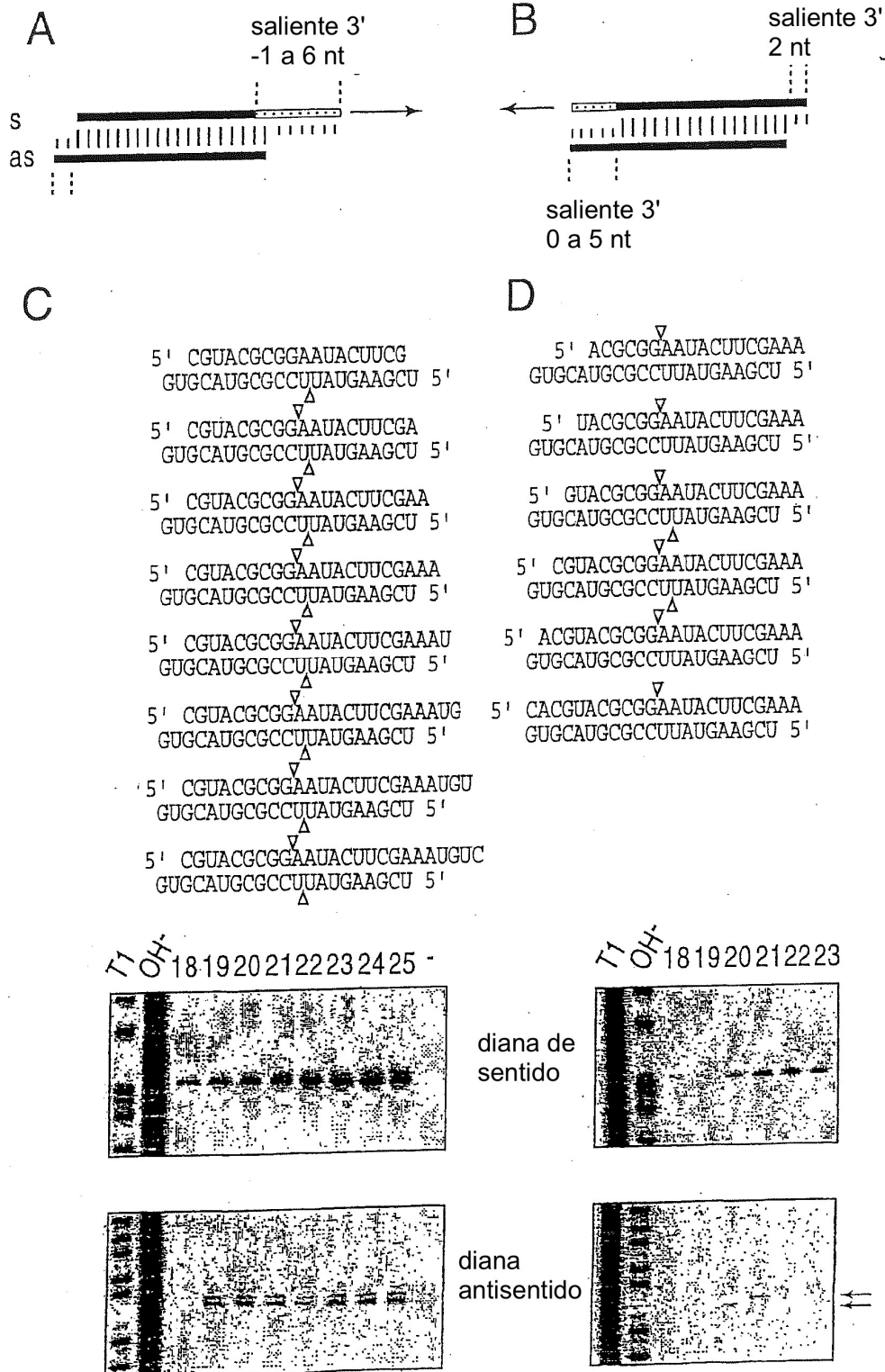


Fig. 17

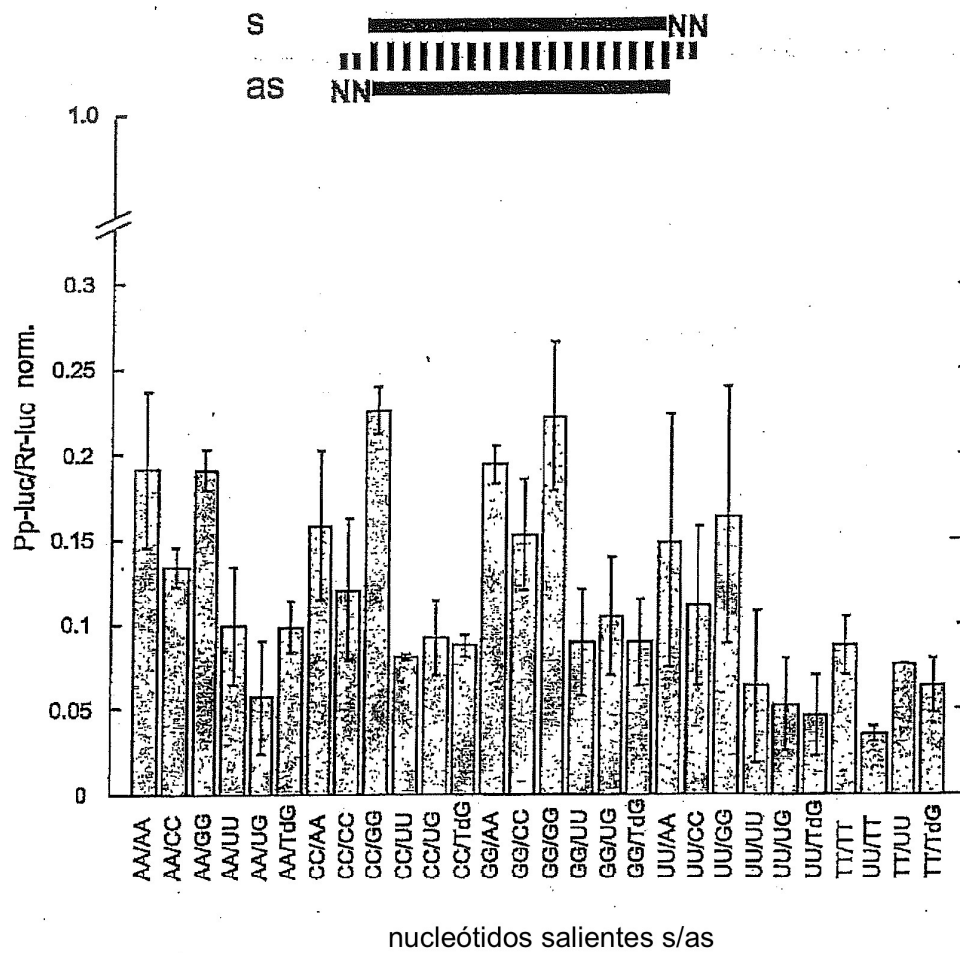


Fig.18

ref 5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

1 5' AUGCGCGGAAUACUUCGATT
TTUACGCGCCUUAUGAAGCU 5'

2 5' CGUAGCGCGAAUACUUCGATT
TTGCAUCGCGCUUAUGAAGCU 5'

3 5' CGUACGCGAGUAAUUCGATT
TTGCAUGCGCUCAUUGAAGCU 5'

4 5' CGUACGCGGAAUUCACGATT
TTGCAUGCGCCUUAAGUGCU 5'

5 5' CGUACGCGGAAUACUUAGCTT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAUCG 5'

6 5' CGUACGCGGUAAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCAUUAUGAAGCU 5'

7 5' CGUACGCGGAUUAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

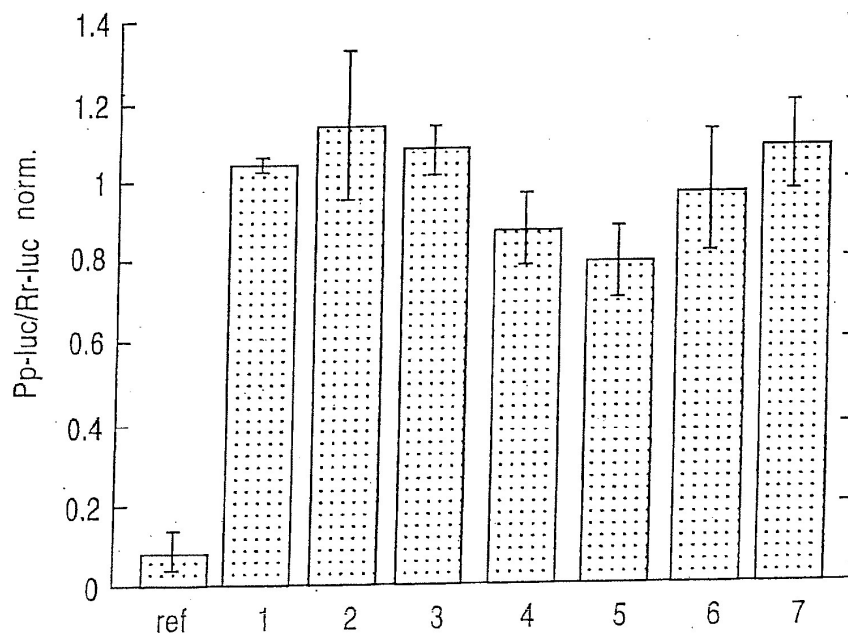


Figura 19

