



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 632**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00953352 .2**
(86) Fecha de presentación : **14.08.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1208211**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **29.05.2002**

(54) Título: **Procedimientos y métodos para modificar la expresión génica usando ARN no poliadenilado.**

(30) Prioridad: **13.08.1999 US 373720**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND
INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION
Limestone Avenue
Campbell, ACT 2601, AU**

(72) Inventor/es: **Wang, Ming-Bo y
Waterhouse, Peter**

(74) Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 296 632 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

Procedimientos y métodos para modificar la expresión génica usando ARN no poliadenilado.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en células vegetales proporcionando moléculas de ARN no poliadeniladas que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos específica diana homóloga con la cadena homosenido del ácido nucleico de interés, en el núcleo de las células vegetales. Las moléculas de ARN no poliadeniladas específicas diana se pueden proporcionar mediante la introducción de ADN quiméricos, que cuando son transcritos bajo el control del promotor convencional y las regiones de formación y poliadeniladas del extremo 3', producen moléculas de ARN en las que al menos la señal de poliadenilación se puede eliminar por la actividad autocatalítica de un ribozima autoeliminador de intrones comprendido dentro de las moléculas de ARN transcritas. También se proporcionan células vegetales que comprenden dichas moléculas de ARN o ADN quimérico que codifica tales moléculas de ARN, así como las plantas. Se proporcionan procedimientos y medios similares para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico mediante cosupresión en células eucariotas.

Antecedentes de la invención

El silenciamiento de genes postranscripcional (PTGS) o cosupresión, es un fenómeno común asociado con transgenes en las plantas transgénicas. El PTGS da como resultado la eliminación de una secuencia específica del ARN del transgén silenciado así como del ARN de genes endógenos homólogos o ARN vírico. Esto se caracteriza por niveles bajos de ARNm en estado de equilibrio manteniéndose tasas normales (normalmente altas) de transcripción nuclear de transgenes. Hay una serie de características comunes para el PTGS. El PTGS es:

- i) específico de la secuencia;
- ii) sistemáticamente transmisible;
- iii) a menudo asociado con la presencia de múltiples copias de transgenes o con el uso de promotores fuertes;
- iv) frecuentemente correlacionado con la presencia de estructuras de ADN repetitivas, incluyendo patrones de inserción de T-ADN repetido invertido;
- v) a menudo acompañado de nueva metilación de ADN en la región de transcripción, y
- vi) pueden ser restaurados por meiosis.

Se han propuesto una serie de modelos hipotéticos para explicar el PTGS (véase, por ejemplo Wassenegger and Pelissier, 1998). Típicamente, estos modelos sugieren la implicación de una enzima codificada huésped (ARN polimerasa dirigida por ARN (RdRP)) que se propone que usa ARN aberrantes como moldes para sintetizar moléculas de ARN copia pequeñas (ARNc). Estos ARNc se hibridarían entonces con los ARNm diana para formar estructuras dúplex, haciendo de ese modo al ARNm susceptible de degradación por endorribonucleasas. Aun más, no hay ninguna prueba directa de que la RdRP esté involucrada en el PTGS en plantas.

Una cuestión importante que surge de los modelos existentes es qué tipo de ARN es el ARN aberrante que sería usado como una molde por la RdRP y en el qué compartimiento celular funcionaría la RdRP.

Varias publicaciones han descrito la acumulación de ARN transgénico improductivo o no poliadenilado en vegetales que es silenciado después de la transcripción. (Lee y Col., 1997; van Eldik y Col. 1998; Covey y Col., 1997; van Houdt y Col., 1997; Metzlaiff y Col., 1997).

Los siguientes documentos describen los procedimientos y medios para regular o inhibir la expresión génica en una célula.

Los documentos US 5.190.131 y EP 0467349 A1 describen procedimientos y medios para regular o inhibir la expresión génica en una célula por la incorporación o asociación con el material genético de la célula, de una secuencia de ácido nucleico no nativa, que es transcrita para producir un ARNm que es complementario y capaz de unirse al ARNm producido por el material genético de esa célula.

El documento EP 0223399 A1 describe procedimientos para llevar a cabo cambios somáticos útiles en plantas causando la transcripción en las células de la planta de cadenas negativas de ARN, que son sustancialmente complementarias de una cadena de ARN diana. La cadena de ARN diana puede ser un transcrito de ARNm creado en la expresión génica, un ARN vírico u otro ARN presente en las células de la planta. La cadena negativa de ARN es complementaria de al menos una porción de la cadena de ARN diana para inhibir su actividad *in vivo*.

El documento EP 0240208 describe procedimientos para regular la expresión de genes codificados en genomas de células vegetales, logrado por la integración de un gen bajo el control transcripcional de un promotor que es funcional

en el huésped, y en el que la cadena de ADN transcrita es complementaria de la cadena de ADN que es transcrita a partir del gen o genes endógenos que se desean regular.

El Documento EP 0647715 A1 y las patentes americanas 5.034.323, 5.231.020 y la 5.283.184 describen procedimientos y medios para producir plantas que manifiesten rasgos fenotípicos deseados, mediante la selección de transgenotes que comprenden un segmento de ADN operativo unido a un promotor, donde los productos de la transcripción del segmento son sustancialmente homólogos a los transcritos correspondientes de genes endógenos, particularmente genes endógenos de la ruta biosintética de los flavonoides.

Waterhouse y col. 1998 describen que la resistencia vírica y el silenciamiento de genes en plantas se pueden inducir mediante la expresión simultánea del ARN homosenrido y antisentido. El ARN homosenrido y antisentido pueden estar situados en un transcrito que tiene autocomplementaridad.

Hamilton y col. 1998 describen que un transgén con ADN repetido, es decir, copias invertidas de su región 5' no traducida, produce con mucha frecuencia la supresión postranscripcional de la expresión de la ACC-oxidasa en el tomate.

El documento WO 98/53083 describe construcciones y procedimientos para aumentar la inhibición de un gen diana dentro de un organismo que implica insertar en el vector silenciador del gen una secuencia repetida invertida de todo o parte de una región polinucleótica dentro del vector.

El documento WO 95/34688 describe procedimientos para la inhibición citoplasmática de la expresión génica y proporciona construcciones genéticas para la expresión de ARN inhibidor en el citoplasma de células eucariotas. El ARN inhibidor puede ser un ARN antisentido o un cosupresor. Las construcciones genéticas son aptas para la replicación en el citoplasma de una célula eucariótica y comprenden una región promotora, la cual puede ser un promotor subgenómico de virus vegetal en combinación funcional con la región codificadora de ARN.

Los documentos WO95/15394 y US 5908779 describen un procedimiento y la construcción para la regulación de la expresión génica a través de la inhibición de ARN nuclear antisentido en células (de ratón). La construcción comprende un promotor, secuencias antisentido y un ribozima cis o trans que genera extremos 3' independientemente de la maquinaria de poliadenilación, y así inhibe el transporte de la molécula de ARN al citoplasma.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, comprendiendo el procedimiento la etapa de proporcionar al núcleo de esa planta ARN no poliadenilado que comprende una secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana, en particular produciendo ARN no poliadenilado por transcripción de un ADN quimérico comprendido dentro de la célula vegetal, comprendiendo el ADN quimérico un promotor expresable en plantas operativamente unido a una región de ADN específica diana que codifica este ARN y comprendiendo además una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', precedida de una región de ADN que codifica el ribozima autoeliminador de intrones.

La invención también proporciona un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, comprendiendo el procedimiento la etapa de introducir dentro del genoma nuclear de la célula vegetal, un ADN quimérico para generar una célula vegetal transgénica, comprendiendo el ADN quimérico las siguientes partes operativamente unidas:

- a) una región de promotor expresable en plantas, preferiblemente un promotor constitutivo o un promotor inducible o promotor específico de tejido;
- b) una región de ADN específica diana que codifica una secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana, que comprende una secuencia de nucleótido de 20 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir del ácido nucleico de interés;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones, preferiblemente un ribozima autoeliminador de intrones que comprende un ADNc copia de un ribozima autoeliminador de intrones del viroide del manchado solar del aguacate, viroide del mosaico latente del melocotonero, viroide del moteado clorótico del crisantemo, viroide asociado al debilitamiento del clavel, transcrito de satélite II de tritón, ARN VS de neurospora, ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada, ARN satélite del virus del mosaico arabis, ARN S1 satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria, ARN satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa, ARN satélite de las manchas anulares del tabaco, ARN satélite del virus del moteado del trébol subterráneo, ARN satélite del virus del moteado de *Solanum nodiflorum*, ARN satélite del virus del moteado aterciopelado del tabaco, ARN de tipo viroide circular pequeño de cerezo, particularmente una región de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 1, ID SEC N° 2 o una parte efectiva de ribozima de la misma: y

d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';

en el que dicho ADN quimérico cuando se transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, el cual cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de la poliadenilación.

Opcionalmente, una planta transgénica puede ser regenerada desde la célula vegetal transgénica. Preferiblemente, la región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones está localizada inmediatamente secuencia arriba de la región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3'.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una molécula de ADN quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, que comprende

- a) una región de promotor expresable en la planta, preferiblemente un promotor constitutivo o un promotor inducible o un promotor específico de tejido,
- b) una región de ADN diana específica que codifica a una secuencia de nucleótidos específica diana, que comprende una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir del ácido nucleico de interés;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima de autoeliminación de intrones, preferiblemente un ribozima autoeliminador de intrones que comprende un ADNc copia de un ribozima autoeliminador de intrones de un viroide del manchado solar del aguacate, viroide del mosaico latente del melocotonero, viroide del moteado clorótico del crisantemo, viroide asociado al debilitamiento del clavel, transcrito de satélite II de tritón, ARN VS de neurospora, ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada, ARN satélite del virus del mosaico arabis, ARN S1 satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria, ARN satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa, ARN satélite de las manchas anulares del tabaco, ARN satélite del virus del moteado del trébol subterráneo, ARN satélite del virus del moteado de *Solanum nodiflorum*, ARN satélite del virus del moteado aterciopelado del tabaco, ARN de tipo viroide circular pequeño de cerezo, particularmente una región de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 1, ID SEC N° 2 o una parte efectiva de ribozima de la misma: y

d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';

en el que dicho ADN quimérico cuando se transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica y un ribozima de autoeliminador de intrones, que cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación. Preferiblemente, la región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones está localizada inmediatamente secuencia arriba de la región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3'.

Es todavía otro objetivo de la invención proporcionar células vegetales y plantas que comprendan un ácido nucleico de interés el cual, normalmente, puede ser expresado fenotípicamente, que además comprende un ADN quimérico, preferiblemente integrado establemente dentro de un genoma nuclear, que comprende

- a) una región promotora expresable en la planta, preferiblemente un promotor constitutivo o un promotor inducible o un promotor específico de tejido,
- b) una región de ADN específica diana que codifica una secuencia de nucleótidos homosentido diana específica, que comprende 20 nucleótidos consecutivos que tienen una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir del ácido nucleico de interés;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones, preferiblemente un ribozima autoeliminador de intrones que comprende un ADNc copia de un ribozima autoeliminador de intrones de un viroide del manchado solar del aguacate, viroide del mosaico latente del melocotonero, viroide del moteado clorótico del crisantemo, viroide asociado al debilitamiento del clavel, transcrito de satélite II de tritón, ARN VS de neurospora, ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada, ARN satélite del virus del mosaico arabis, ARN S1 satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria, ARN satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa, ARN satélite de las manchas anulares del tabaco, ARN satélite del virus del moteado del trébol subterráneo, ARN satélite del virus del moteado de *Solanum nodiflorum*, ARN satélite del virus del moteado aterciopelado del tabaco, ARN de tipo viroide circular pequeño de cerezo, particularmente una región de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 1, ID SEC N° 2 o una parte efectiva de ribozima de la misma: y

d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';

en el que dicho ADN quimérico cuando se transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica y un ribozima autoeliminador de intrones, que cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.

La invención también proporciona un procedimiento para identificar un fenotipo asociado con la expresión de un ácido nucleico de interés en una célula vegetal, comprendiendo el procedimiento:

- 1) la selección dentro del ácido de interés de una secuencia diana de al menos 20 nucleótidos consecutivos;
- 2) la introducción de un ADN quimérico dentro del núcleo de una célula huésped vegetal apropiada comprendiendo el ácido nucleico de interés el ADN quimérico que comprende los siguientes fragmentos de ADN operativamente unidos:
 - a) una región promotora expresable en plantas;
 - b) una región de ADN específica diana que comprende una secuencia de 20 nucleótidos consecutivos que tienen una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicha secuencia diana; seguida por
 - c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones localizada inmediatamente secuencia arriba de
 - d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';
- 3) la observación del fenotipo mediante un procedimiento apropiado.

Otro objetivo más de la invención es proporcionar un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula eucariótica, comprendiendo el procedimiento la etapa de proporcionar al núcleo de dicha célula eucariota un ARN no poliadenilado, que comprende una secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés, en particular produciendo ARN no poliadenilado por transcripción de un ADN comprendido dentro de la célula eucariota, comprendiendo el ADN quimérico un promotor expresable en plantas operativamente unido a una región de ADN específica diana que codifica este ARN y que opcionalmente además comprende una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', precedida por una región de ADN que codifica el ribozima autoeliminador de intrones.

Otro objetivo más de la invención es proporcionar un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que normalmente puede ser expresado en una célula eucariótica, que comprende la etapa de introducir en el genoma nuclear de la célula eucariótica un ADN quimérico para generar una célula vegetal transgénica, que comprende las siguientes partes operativamente unidas:

- a) una región promotora funcional en la célula eucariota;
- b) una región de ADN específica diana que comprende una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones; y
- d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';

en el que dicho ADN quimérico cuando se transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, que cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.

La invención también proporciona una célula eucariótica que comprende un ácido nucleico de interés, que normalmente puede ser expresado fenotípicamente, que además comprende un ADN quimérico que comprende las siguientes partes operativamente unidas:

- a) una región promotora funcional en la célula eucariota;
- b) una región de ADN específica diana que comprende una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones; y

d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';

en el que dicho ADN quimérico cuando se transcribe en la célula eucariota, produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, el cual, cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación, así como organismos eucariotas no humanos que comprenden o consisten esencialmente en dichas células eucariotas.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática del gen quimérico GUS que contiene el ribozima (pMBW W267 y pMBW W259), la construcción de control (pMBW265) y el gen quimérico GUS usado para la supertransformación (pBPPGH). 35S-P: promotor CaMV 35S; GUS: región codificadora de β -glucoronidasa; SAT: ADNc copia del ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) en la orientación positiva de la cadena ($\rightarrow$) o en la orientación negativa de la cadena ($\leftarrow$); Ocs -T región del gen de octopina sintetasa de *Agrobacterium* implicada en la formación del extremo 3' y la poliadenilación; 3' Sat: ADNc copia del extremo 3' del ARN satélite de BYDV; 5' SAT: ADNc copia del extremo 5' del ARN satélite de BYDV; PP2-P: región promotora de 1,3 kb de un gen que codifica la proteína del floema de las cucurbitáceas PP2; Nos-T: región del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium* implicada en la formación y la poliadenilación del extremo 3'; C: sitio de escisión autocatalítico en la molécula de ARN transcrita del gen quimérico.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

Aunque el silenciamiento de genes, sea por ARN antisentido o por la cosupresión usando ARN homosentido, es un fenómeno observado habitualmente en la investigación de transgénicos, la generación intencionada de células eucariotas transgénicas y organismos transgénicos con genes silenciados, en particular células vegetales y plantas, todavía enfrenta una serie de problemas. En particular, la eficacia del silenciamiento del gen es todavía susceptible de mejorar, tanto en el número de líneas transgénicas que presentan el fenómeno, así como en el nivel de reducción de la transcripción y, por último, la expresión fenotípica de un ácido nucleico particular de interés en una línea transgénica particular.

Ya se han descrito una serie de procedimientos mejorados para el silenciamiento de genes, por ejemplo, el uso simultáneo en una célula de ARN antisentido dirigido al ácido nucleico de interés, preferiblemente co-ubicado, en una transcripción que muestra autocomplementaridad. Se describen nuevos procedimientos para aumentar la eficiencia del silenciamiento de genes, preferiblemente el silenciamiento de genes a través de la co-represión en una célula u organismo eucariota, preferiblemente célula vegetal o planta, y medios para ello, en las diferentes realizaciones proporcionadas por la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

La presente invención se basa en la observación inesperada de los inventores, de que el suministro o la introducción de ARN no poliadenilado específico diana, en particular un ARN específico diana que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica a la del ácido nucleico de interés en la orientación homosentido, en el núcleo de una célula de un organismo eucariota, en especial una célula vegetal, daba lugar a una reducción eficaz de la expresión del ácido nucleico de interés, tanto en el nivel de reducción, así como en el número de líneas transgénicas que presentan silenciamiento de genes. La comprensión del hipotético mecanismo a través del cual se supone que procede la silenciación del gen, en particular la PTGS, no permite predecir que entre todas las variables potencialmente implicadas en la iniciación y mantenimiento de la silenciación de genes, la selección de este parámetro, es decir proporcionar ARN no poliadenilado, habría sido suficiente para aumentar significativamente la eficacia del silenciamiento de genes, en particular el silenciamiento de genes a través de la co-represión.

En una realización de la invención, se proporciona un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, que comprende la etapa de proporcionar ARN no poliadenilado, que incluye una secuencia de nucleótidos específica diana en el núcleo de esta célula vegetal. De forma conveniente, el ARN no poliadenilado que incluye la secuencia de nucleótidos específica diana se puede producir por la transcripción de un ADN quimérico o gen quimérico comprendido dentro de la célula vegetal, preferiblemente incorporado, en particular establemente integrado en genoma nuclear de la célula vegetal. En una realización particularmente preferida, el ARN no poliadenilado presenta otras modificaciones más de las características del ARNm, tales como, pero no limitado a la presencia de una estructura de caperuza en el extremo 5'.

Como se usa en el presente documento, el término "expresión de un gen" se refiere al proceso en que una región de ADN que está operativamente unida a regiones reguladoras adecuadas, en particular a una región promotora, se transcribe en un ARN que es biológicamente activo, es decir, que puede interactuar con otro ácido nucleico, o que puede ser traducido en un polipéptido o proteína. Se dice que un gen codifica un ARN cuando el producto final de la expresión del gen es ARN biológicamente activo, tal como por ejemplo un RNA antisentido, un ribozima o un producto intermedio replicativo. Se dice que un gen codifica una proteína cuando el producto final de la expresión del gen es una proteína o polipéptido.

Un ácido nucleico de interés “puede ser expresado”, cuando dicho ácido nucleico, cuando se introduce en una célula huésped adecuada, en particular en una célula vegetal, puede ser transcrito (o replicado) para producir un ARN y/o traducido para dar un polipéptido o proteína en esa célula huésped.

El término “gen” significa cualquier fragmento de ADN que comprende una región de ADN (la “región de ADN transcrito”) que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) de una célula operativamente unida a regiones reguladoras adecuadas, por ejemplo, un promotor que se puede expresar en plantas. Un gen puede, pues, comprender varios fragmentos de ADN operativamente unidos tales como un promotor, una secuencia líder 5’, una región de codificación y una región 3’ que comprende un sitio de poliadenilación. Un gen vegetal endógeno de una especie particular de planta (gen vegetal endógeno) es un gen que se encuentra naturalmente en esa especie vegetal o que se puede ser introducir en esa especie vegetales mediante cruzamiento convencional. Un gen quimérico es cualquier gen que normalmente no se encuentra en una especie vegetal o, alternativamente, cualquier gen en el que el promotor no está asociado en la naturaleza con parte o la totalidad de la región de ADN transcrita o con al menos otra región reguladora del gen.

Como se usa aquí, “expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés” se refiere a cualquier rasgo cuantitativo asociado con la expresión molecular de un ácido nucleico en una célula huésped y puede así incluir la cantidad de moléculas de ARN transcritas o replicadas, la cantidad de moléculas de ARN modificadas post-transcripcionalmente, la cantidad de péptidos o proteínas traducidos, la actividad de dichos péptidos o proteínas.

Un “rasgo fenotípico” asociado con la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés se refiere a cualquier rasgo cuantitativo o cualitativo, incluyendo el rasgo mencionado, así como el efecto directo o indirecto mediado en la célula, o el organismo que contiene esa célula, por la presencia de las moléculas de ARN, péptido o proteína, o péptido o proteína modificados postranscripcionalmente. La mera presencia de una ácido nucleico de una célula huésped, no se considera una expresión fenotípica o un rasgo fenotípico de ese ácido nucleico que, aunque se pueda seguir cuantitativa o cualitativamente. Ejemplos de efectos directos o indirectos mediados en células u organismos son, por ejemplo, rasgos útiles en agricultura o la industria, tales como la resistencia a una plaga o enfermedad; mayor contenido de aceite o modificado, etc.

Como se usa en el presente documento, “la reducción de la expresión fenotípica” se refiere a la comparación de la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés en la célula eucariota, en presencia del ARN o los genes quiméricos de la invención, con la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés en ausencia del ARN o los genes quiméricos de la invención. La expresión fenotípica en presencia del ARN quimérico de la invención debe por lo tanto ser inferior que la expresión fenotípica en ausencia del mismo, preferiblemente ser solo un 25%, en particular solo un 10%, más particularmente solo un 5% de la expresión fenotípica en ausencia del ARN quimérico, en especial la expresión fenotípica debe ser inhibida por completo a todos los efectos prácticos por la presencia del ARN quimérico o el gen quimérico que codifican dicho ARN.

Una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico en el que el fenotipo es un rasgo cualitativo, significa que en presencia del ARN o genes quiméricos de la invención, el rasgo fenotípico cambia a otro estado discreto, en comparación con una situación en la que dicho ARN o gen están ausentes. Una reducción de la expresión fenotípica de una ácido nucleico puede así medirse, por ejemplo, como una reducción de la transcripción de (parte de) ese ácido nucleico, o una reducción de la traducción de (parte de) ese ácido nucleico o una reducción en el efecto de la presencia del o de los ARN transcritos o polipéptido(s) traducidos en la célula eucariota o el organismo, y finalmente conducirá a rasgos fenotípicos alterados.

Es evidente que la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, puede estar acompañada o correlacionarse con un aumento de un rasgo fenotípico.

Como se usa en el presente documento “un ácido nucleico de interés” o un “ácido nucleico diana” se refiere a cualquier molécula de ARN o secuencia de ADN particular que pueden estar presentes en una célula eucariota, en particular una célula vegetal.

Como se usa en el presente documento “ARN aberrante” se refiere a moléculas de polirribonucleótidos que tienen características diferentes de las moléculas de ARNm que se encuentran normalmente en esa célula. Las diferentes características incluyen, pero no se limitan a la ausencia o la eliminación de una estructura de caperuza 5’, la presencia de intrones persistentes, p. ej. intrones que se han modificado en sus sitios de eliminación de intrones para evitar así la eliminación de intrones, o la ausencia de la cola poliA que normalmente se encuentran asociada con el ARNm (“ARN no poliadenilado”).

La expresión “secuencia de nucleótidos específica diana” tal como se utiliza en este documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos (ya sea secuencia de nucleótidos de ADN o ARN según el contexto), que puede reducir la expresión de ese ácido nucleico diana de interés, por la silenciación del gen. Preferiblemente, solo se reduce la expresión de ese ácido nucleico o gen diana, o de los ácidos nucleicos o genes que comprenden una secuencia de nucleótidos esencialmente similar.

La secuencia de nucleótidos específica diana comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos “homosentido” del ácido nucleico o gen de interés. En otras palabras, una secuencia de nucleótidos

“homosentido” específica diana puede ser esencialmente similar a parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir del ácido nucleico o genes de interés, o a partes de los ácidos nucleicos o genes de interés que controlan la producción de dicha molécula de ARN transcrita o producida, cuando se lee en la misma dirección de 5' a 3' que la molécula de ARN transcrita o producida.

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos específica diana corresponde a parte de una región de ácido nucleico a partir de la cual se produce el ARN, en particular una región que es transcrita y traducida. Se prefiere en particular, que la secuencia diana corresponda a uno o varios exones consecutivos, más concretamente que se encuentre dentro de un solo exón de una región codificadora. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos específica diana puede corresponder también a regiones no traducidas de la molécula de ARN producida a partir del ácido nucleico o gen de interés.

Por otra parte, a la luz de una reciente publicación de Mette y col. (1999), se espera que la secuencia de nucleótido específica diana pueda corresponder también a las regiones que controlan la producción o la transcripción de ARN del nucleótido o gen de interés, tal como la región promotora.

La longitud de la secuencia de nucleótido específica diana homosentido puede variar de aproximadamente 20 nucleótidos (nt) hasta una longitud que equivale a la longitud (en nucleótidos) del ácido nucleico diana. Preferiblemente, la longitud total de la secuencia de nucleótidos homosentido es por lo menos 10 nt, preferiblemente 15 nt, en particular al menos aproximadamente 50 nt, más en particular al menos aproximadamente 100 nt, en especial al menos aproximadamente 150 nt, más especialmente al menos aproximadamente 200 nt, muy especialmente al menos aproximadamente 550 nt. Se espera que no haya límite superior a la longitud total de la secuencia de nucleótidos homosentido, distinto de la longitud total del ácido nucleico diana. Sin embargo, por razones prácticas (como por ejemplo, la estabilidad de los genes quiméricos) se espera que la longitud de la secuencia de nucleótidos homosentido no exceda 5000 nt, en particular, no debe exceder 2500 nt y podría limitarse a aproximadamente 1000 nt.

Se observará que cuanto más larga es la longitud total de la secuencia de nucleótidos homosentido, se hacen menos restrictivos los requisitos para la identidad de secuencia entre la secuencia de nucleótidos homosentido total y la secuencia correspondiente en el ácido nucleico o gen diana. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos homosentido total debería tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75% con la correspondiente secuencia diana, en particular, al menos aproximadamente 80%, más en particular al menos aproximadamente 85%, más particularmente aproximadamente 90%, en especial aproximadamente 95%, más especialmente aproximadamente 100%, muy especialmente debería ser idéntica a la parte correspondiente del ácido nucleico diana. Sin embargo, es preferible que la secuencia de nucleótidos homosentido incluya siempre una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos, en particular aproximadamente 20 nt, más particularmente aproximadamente 50 nt, especialmente aproximadamente 100 nt, muy especialmente aproximadamente 150 nt con una identidad de secuencia de 100% con la parte correspondiente del ácido nucleico diana. Preferiblemente, para calcular la identidad de secuencia y diseñar la secuencia homosentido correspondiente, deberían reducirse al mínimo el número de huecos, en particular para las secuencias homosentido más cortas.

Como se usa en el presente documento, la “identidad de secuencia” con respecto a secuencias de nucleótidos (ADN o ARN), se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en el más corta de las dos secuencias. El alineamiento de las dos secuencias de nucleótidos se realiza por el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por cada hueco de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de la secuencia, incluida el alineamiento de secuencias, como se ha descrito antes, puede realizarse convenientemente, por ejemplo, usando los programas de la Intelligenetics™ Suite (Intelligenetics Inc, CA). Las secuencias se indican como “esencialmente similares” cuando dicha secuencia tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, en particular al menos aproximadamente 80%, más en particular al menos aproximadamente 85%, muy en particular aproximadamente 90%, en especial aproximadamente 95%, más en especial aproximadamente 100%, muy especialmente son idénticas. Es evidente que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con las secuencias de ADN, la timina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN.

Se espera sin embargo, que la secuencia de nucleótidos específica diana pueda también incluir una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos “antisentido” del ácido nucleico o gen de interés. En otras palabras, una secuencia de nucleótidos antisentido específica diana puede ser esencialmente similar a la parte complementaria de una molécula de ARN transcrita o producida a partir del ácido nucleico o gen de interés o a las partes complementarias del ácido nucleico o gen de interés que controlan la producción de esa molécula de ARN transcrita o producida, cuando se lee en la misma dirección de 5' a 3' que la molécula de ARN transcrita o producida.

Los requisitos para las secuencias de nucleótidos específicas diana antisentido con respecto a la longitud, similitud etc., se espera que sean esencialmente similares a los de las secuencias de nucleótidos específicas diana homosentido especificadas en el presente documento.

Será evidente para el experto en la materia que la molécula de ARN no poliadenilada puede comprender más de una secuencia de nucleótidos específica diana y, en particular, que la molécula de ARN no poliadenilada puede comprender secuencias de nucleótidos específicas diana homosenido y antisentido, en la que las secuencias de nucleótidos homosenido y antisentido son esencialmente complementarias entre sí y pueden formar una estructura artificial de horquilla como describen Waterhouse y col., 1998, o en la solicitud PCT-PCT/IB99/00606.

También será evidente que la molécula de ARN no poliadenilado puede comprender uno o más elementos estabilizadores de ARN. Como se usa en el presente documento, “un elemento estabilizador de ARN” es una secuencia de nucleótidos que cuando se incluye en una molécula de ARN prolonga el tiempo de semivida media de la molécula de ARN, es decir, la protege de ser degradada. Los elementos estabilizadores de ARN preferidos incluyen secuencias tallo-bucle estables, como las secuencias tallo-bucle que se encuentran en el ARNm codificado por los genes de histonas en células de mamíferos, que están involucrados en conferir estabilidad al ARNm de la histona. Se incluye un ejemplo de este tipo de secuencia que codifica el tallo bucle de histonas en el ID SEC N° 7. Se pueden usar para los mismos efectos secuencias homólogas o secuencias equivalentes funcionales a la secuencia del ID SEC N° 7, derivadas de otros organismos, en particular de plantas.

La inclusión de ese elemento estabilizador de ARN en una molécula de ARN no poliadenilado o de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho elemento estabilizador de ARN en un gen quimérico que codifica la molécula de ARN no poliadenilada, puede potenciar además la eficiencia de la silenciación del gen del gen diana.

Como se ha indicado anteriormente, la introducción de ARN no poliadeniladas específico diana en el núcleo de una célula vegetal se puede lograr convenientemente por la transcripción de una ADN quimérico que codifica el ARN introducido en el núcleo, preferiblemente integrado establemente en el genoma nuclear de una célula vegetal.

En una realización preferida de la invención, el ARN no poliadenilado específico diana se puede producir en el núcleo de una célula vegetal por la transcripción de un ADN quimérico que codifica un primer ARN específico diana, que pueden ser procesado posteriormente por la acción de un ribozima también presente y, preferiblemente también codificado por un gen quimérico, en la célula vegetal para dar un segundo ARN no poliadenilado específico diana. Es evidente para el experto en la materia que el procesamiento del ARN no es necesario que sea posteriormente, pero puede ocurrir al mismo tiempo. En una realización particularmente preferida el ribozima es un ribozima autoeliminador de intrones que está comprendido dentro del transcrito de ARN específico diana generado.

Así, en una realización particularmente preferida de la invención, se proporciona un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, comprendiendo el procedimiento la etapa de introducir en el genoma nuclear de la célula vegetal un ADN quimérico para generar una célula vegetal transgénica, comprendiendo el ADN quimérico las siguientes partes unidas operativamente:

- a) una región promotora expresable en plantas;
- b) una región de ADN específica diana;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones; y
- d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', en la que el ADN quimérico cuando transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, que cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.

El procedimiento puede comprender además opcionalmente la etapa de regenerar una célula vegetal transgénica dentro de una planta transgénica.

Como se usa en el presente documento, “un ribozima” es una molécula de ARN catalítica que tiene la capacidad intrínseca de romper y formar enlaces covalentes en ácidos ribonucleicos en sitios específicos en ausencia de un cofactor diferente de un catión divalente.

Como se usa en el presente documento, un “ribozima de autoeliminación de intrones” o “un ribozima de autoescisión” es un ribozima capaz de autocatálisis en un sitio específico dentro de ese ribozima. Los ribozimas de autoeliminación de intrones preferidos son ribozimas autoeliminadores de intrones con una estructura llamada cabeza de martillo. Sin embargo, se espera que también se puedan usar para el mismo efecto los ribozimas de autoescisión con otra conformación tal como las estructuras de autoescisión de horquilla encontradas en la cadena negativa de productos intermedios de replicación, por ejemplo, el nepovirus.

Los ribozimas autoeliminadores de intrones particularmente preferidos son aquellos implicados en la replicación de ARN patógenos vegetales circulares pequeños, tales como, pero no se limitados a, el ribozima autoeliminador de intrones del viroide del manchado solar del aguacate, viroide del mosaico latente del melocotonero, viroide del moteado clorótico del crisantemo, viroide asociado al debilitamiento del clavel, transcrito de satélite II de tritón, ARN VS de neurospora, ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada, ARN satélite del virus del mosaico arabis, ARN S1 satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria, ARN satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa, ARN satélite de las manchas anulares del tabaco, ARN satélite del virus del moteado del trébol subterráneo, ARN satélite del virus del moteado de *Solanum nodiflorum*, ARN vSCMoV satélite del virus del moteado aterciopelado del tabaco, ARN cscRNA1 de tipo viroide circular pequeño de cerezo. La tabla 1 enumera diferentes variantes de ribozimas apropiados para la invención, así como una referencia de su secuencia de nucleótidos.

Las regiones de ADN que codifican ribozimas autoeliminadores de intrones pueden ser ADNc copias de parte de los ARN de patógenos vegetales mencionados que comprenden el ribozima, o pueden ser ADN sintético. También están comprendidas las variantes tales como los mutantes incluyendo sustituciones, supresiones o inserciones de nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos del ribozima en una forma en que la capacidad autocatalítica de los ribozimas no es sustancialmente alterada.

Preferiblemente, la región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones está localizada inmediatamente secuencia arriba de la región de ADN que codifica la señal de formación y poliadenilación del extremo 3'. Sin embargo, habiendo leído la memoria descriptiva, las personas expertas en la materia enseguida se darán cuenta de que la región de ADN que codifica al ribozima autoeliminador de intrones puede estar comprendida dentro del gen quimérico que codifica el ARN no poliadenilado en otras localizaciones, con la condición de que se pueda generar un segundo ARN suficientemente largo que comprenda una secuencia de nucleótidos diana específica en la que se ha eliminado el sitio de poliadenilación.

Está claro que cuando se incluye un elemento estabilizador de ARN (o la secuencia de ADN que codifica dicho elemento estabilizador de ARN), el elemento estabilizador de ARN debe además preferiblemente preceder inmediatamente a la región de ADN que codifica el ribozima autoeliminador de intrones. Sin embargo el elemento estabilizador de ARN se puede incluir en otros sitios, con la condición de que sea colocado en el ARN no poliadenilado tras el procesado por el ribozima.

TABLA 1

Diferentes ribozimas autoeliminadores de intrones

especie del ARN	Referencia			Acceso	cadena (+)	cadena (-)
Viroide del manchado solar del aguacate	Symons	1981	Nucleic Acids Res. 9 6527-6537	J02020	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-10	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31100	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
Viroide del manchado solar del aguacate, variante B-1	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31086	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
Viroide del manchado solar del aguacate, variante A-2	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31085	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
Viroide del manchado solar del aguacate, variante B-2	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31087	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-2	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31092	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo

ES 2 296 632 T3

	especie del ARN	Referencia			Acceso	cadena (+)	cadena (-)
5	Viroide del manchado solar del aguacate, variante B-3	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31088	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
10	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-3	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31093	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
15	Viroide del manchado solar del aguacate, variante B-4	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31089	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
20	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-4	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31094	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
25	Viroide del manchado solar del aguacate, variante B-5	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31090	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
30	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-5	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31095	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
35	Viroide del manchado solar del aguacate, variante B-6	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31091	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
40	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-6	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31098	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
45	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-7	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-358	M31097	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
50	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-8	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31098	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
55	Viroide del manchado solar del aguacate, variante C-9	Rakowski and Symons	1989	Virologia 173 352-356	M31099	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
60	Viroide del manchado solar del aguacate ASBVd-B	Semancik and Szychowski	1994	J. Gen Virol. 75 1543-1549	S74687	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
65	Viroide del manchado solar del aguacate ASBVd-V	Semancik and Szychowski	1994	J. Gen Viral. 75 1543-1549	S73881	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
	Viroide del mosaico latente del melocotonero PLMVd_1	Hernandez and Flores	1992	Proc. NaU. Acad. Sd. 89 3711-3715	M83545	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
	Viroide del mosaico latente del melocotonero PLMVd_2	Hernandez and Flores	1992	Proc. Natl. Acad. Sd. 89 3711-3715		Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
	Viroide del mosaico latente del melocotonero -	Schamloul et al.	1995	Acta Hort. 386 522-530		Cabeza de martillo	Cabeza de martillo

ES 2 296 632 T3

	especie del ARN	Referencia			Acceso	cadena (+)	cadena (-)
5	Italia						
	Viroide del mosaico latente del melocotonero cerezo - Canadá	Hadini et al.	1997	Plant Dis. 81, 154-158		Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
10	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds2	Ambros et al.	1998	J. Viral. 72 7397-7406	AJ005294	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
15	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds21	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005295	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
20	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds15	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005296	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
25	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds23	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005297	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
30	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds18	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005298	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
35	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds1	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005299	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
40	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds3	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005300	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
45	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds19	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005301	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
50	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds13	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005302	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
55	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds6	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005303	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante gds16	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005304	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante esc8	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005305	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
60	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante esc16	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005308	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
65	Viroide del mosaico latente del	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7408	AJ005307	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo

ES 2 296 632 T3

	melocotonero, variante esc5					
5	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variate esc12	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005308	Cabeza de martillo
10	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante esc10	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005309	Cabeza de martillo
15	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante esc 14	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005310	Cabeza de martillo
20	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls 4b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005311	Cabeza de martillo
25	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variantels 16b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005312	Cabeza de martillo
30	viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls17b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005313	Cabeza de martillo
35	viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls 18b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005314	Cabeza de martillo
40	viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls 11	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005315	Cabeza de martillo
45	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls19b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005316	Cabeza de martillo
50	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls 5b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005317	Cabeza de martillo
55	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls11b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005318	Cabeza de martillo
60	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls6b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005319	Cabeza de martillo
65	Viroide del mosaico latente del melocotonero, variante ls 14b	Ambros et al.	1998	J. Virol. 72 7397-7406	AJ005320	Cabeza de martillo
					AJ005321	Cabeza de martillo
					AJ005322	Cabeza de martillo

ES 2 296 632 T3

5	Viroide del moteado clorótico del crisantemo	Navarro and Flares	1997	Proc. Natl. Acad. Sci. 94 11262-11267	Y14700	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
10	ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada	Miller et al.	1991	Virology 183 711-720	M63666	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
15	ARN satélite del virus del mosaico arabis	Kaper et al.	1988	Biochem. Biophys. Res. Com. 154 318-325	M21212	Cabeza de martillo	horquilla
20	RNAS1 satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria	Rubino y col.	1990	J. Gen. Viral. 71 1897-1903	D00721	Cabeza de martillo	horquilla
25	ARN LTSV-N satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa	Keese y col.	1983	FEBSLett. 159 185-190	X01985	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
30	ARN LTSV-A satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa	Keese y col.	1983	FEBSLett. 159 185-190	X01984	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
35	RNA LTSV-C satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa	Abouhaidar and Pallwal	1988	J. Gen. Virology 69 2369-2373	D00341	Cabeza de martillo	Cabeza de martillo
40	ARN. 1 satélite del virus de las manchas anulares del tabaco	Buzayan et al.	1988	Virology 151, 186-199	M14879	Cabeza de martillo	horquilla
45	RNA.2 satélite del virus de las manchas anulares del tabaco	Buzayan y col.	1987	Virology 160, 95-99	M17439	Cabeza de martillo	horquilla
50	ARN.1 satélite del virus del moteado del trébol subterráneo	Davies y col.	1990	Virology 177, 216-224	M33001	Cabeza de martillo	
55	ARN.2 satélite del virus del moteado del trébol subterráneo	Davies y col.	1990	Virology 177, 216-224	M33000	Cabeza de martillo	
60	ARN del virus del moteado de Solanum nodiflorum	Haseloff and Symons	1982	Nucleic Acids Res. 10 3681-3691	J02388	Cabeza de martillo	
65	ARN.1 de tipo viroide circular del virus moteado aterciopelado del tabaco	Haseloff and Symons	1982	Nucleic Acids Res. 10 3881-3691		Cabeza de martillo	
	ARN.2 de tipo viroide circular del virus moteado aterciopelado del tabaco	Haseloff and Symons	1982	Nucleic Acids Res. 10 3681-3691	J02439	Cabeza de martillo	
	ARN de tipo viroide circular pequeño de cerezo	DI Serio y col.	1997	J. Viral. 71 6603-6610	Y12833	Cabeza de martillo mod.	Cabeza de martillo mod
	ARN -1 de tipo viroide pequeño del clavel	Hernández y col.	1992	Nucleic Acids Res. 20 6323-6329	X68034	Cabeza de martillo	
	ARN -2 de tipo viroide pequeño del clavel	Hernández y col.	1992	Nucleic Acids Res. 20 6323-6329		Cabeza de martillo	Cabeza de martillo

transcrito de satélite 2 de notophthalmus viridescens (tritón)	Epstein y col.	1986	J. Cell. Biol. 1031137- 1144	X04478	Cabeza de martillo	
ARN VS de Neurospora	Saville and Collins	1990	Cell 61 885- 696	M32974	ARN VS autoescisión	
ADN satélite de esquistosoma	Ferbeyre y col.	1998	Mol. Cell. Biol.	AF036739		

El uso de ribozimas en organismos transgénicos para generar moléculas de ARN con extremos 5' o 3' de interés ha sido documentado en el artículo de Rubio y col., 1999, que describe un espectro amplio de protección contra Tombusvirus obtenidos por ARN de interferencia defectuoso (DI) en plantas transgénicas. Para producir los ARN con extremos 5' y 3' auténticos idénticos a los ARN DI nativos, la secuencia de ARN DI transcrita de una caja de ADN se flanqueó con ribozimas. Las plantas transgénicas de *Nicotina benthamiana* estaban mejor protegidas que las plantas no transgénicas contra la infección por el virus del enanismo ramificado del tomate y tombusvirus relacionados. Los ARN DI interfieren drásticamente con la acumulación de virus a través de una competición efectiva con el virus original para los factores transactivadores requeridos para la replicación. Egli y Braus, 1994 describen el desacoplamiento de la escisión 3' y poliadenilación del ARNm por expresión de un ribozima de cabeza de martillo en levaduras. Eckner y col. 1991 describieron que estos transcritos de genes de ensayo que podían obtener un extremo 3' de histona madura por la actividad de escisión del ARN de un ribozima de actuación cis, sorteado de esta manera la maquinaria celular de procesamiento del extremo 3', tenían un transporte deficiente y se acumulaban en el compartimento nuclear. Sin embargo, estos documentos en la técnica no están relacionados con los procedimientos para inhibir la expresión fenotípica por silenciamiento de genes dependiente de homología, particularmente por PTGS.

Un ribozima autoeliminador de intrones particularmente preferido es el ribozima comprendido por el ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV), muy en particular el ARN satélite encontrado en aislados de BYDV del serotipo de RPV.

Se ha encontrado que la reducción de la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés usando un gen quimérico de acuerdo con la invención era más eficaz usando un ADNc copia del ribozima comprendido en la cadena negativa del ARN satélite de BYDV. Por lo tanto, los ribozimas que muestran una actividad autocatalítica parecida a la actividad autocatalítica del ribozima comprendido dentro de la cadena negativa del ARN satélite de BYDV, son especialmente apropiados para los procedimientos de la invención. La actividad autocatalítica de los ribozimas se puede comparar con la actividad autocatalítica de la cadena (-) del ARN satélite de BYDV describen Miller y col. 1991.

La región del ribozima dentro de la cadena (-) del ARN satélite de BYDV se ha identificado como la secuencia de nucleótidos del ID SEC N° 1 desde el nucleótido en la posición 194 hasta el nucleótido en la posición 236. La región del ribozima con la cadena (+) del ARN satélite de BYDV se ha identificado como la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 2 desde el nucleótido en la posición 1 hasta el nucleótido en la posición 89.

No es necesario decir que el gen quimérico puede comprender más de una región de ADN que codifica un ribozima. Estos ribozimas pueden estar agrupados, por ejemplo, pueden estar situados todos ellos en la región inmediatamente precedente de la región de ADN que codifica la señal de formación y poliadenilación del extremo 3'.

Sin embargo, se espera que más de una región de ADN que codifica un ribozima pueda estar comprendida dentro del gen quimérico, de una forma tal que tras autoescisión se genere más de una molécula de ARN no poliadenilado comprendiendo cada una de ellas una secuencia de nucleótidos específica diana. Dicho ADN quimérico podría, así, comprender:

- un promotor expresable en plantas
- una primera región de ADN específico diana
- una región de ADN que codifica un primer ribozima autoeliminador de intrones
- una segunda región de ADN específico diana
- una región de ADN que codifica un segundo ribozima autoeliminador de intrones
- una región de ADN que codifica la formación y señal de poliadenilación del extremo 3'.

El primer y segundo ribozima autoeliminador de intrones pueden ser idénticos, esencialmente similares o diferentes. Así mismo, la primera y segunda región de ADN específica diana que codifican el ARN con la secuencia de nucleótidos específica diana pueden ser idénticas, esencialmente similares o diferentes.

Por razones prácticas, se cree que el número de regiones de ADN que codifican un ribozima dentro de un solo gen quimérico no debe de exceder de cinco.

En la realización preferida, el ácido nucleico de interés, cuya expresión fenotípica se pretende reducir, es un gen incorporado en el genoma de una célula eucariota, particularmente una célula vegetal. Se puede apreciar que los medios y procedimientos de la invención se pueden usar para la reducción de la expresión fenotípica de un gen que pertenece al genoma de la célula de forma natural, (un gen endógeno), así como para la reducción de la expresión fenotípica de un gen que no pertenece al genoma de la célula de forma natural, sino que ha sido introducido en esa célula (un transgén). El transgén se puede introducir estable o transitoriamente, y se puede integrar en el genoma celular de la célula, o estar presente en un vector de replicación, tal como un vector vírico.

En otra realización preferida, el ácido nucleico de interés, cuya expresión fenotípica se pretende reducir, es un ácido nucleico vírico, particularmente una molécula de ARN vírico, capaz de infectar una célula eucariota, particularmente una célula vegetal. En este caso, el fenotipo que se va a reducir es la replicación del virus, y finalmente, los síntomas de la enfermedad causados por el virus infeccioso.

Para el propósito de la invención, la expresión "promotor expresable en plantas" significa un promotor que es capaz de conducir la transcripción en una célula vegetal. Esto incluye a cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal. Hay disponible una gran variedad de promotores expresables en plantas para dirigir la transcripción de los genes quiméricos de la invención. Estos incluyen, pero no están limitados a promotores fuertes tales como promotores CaMV35S (por ejemplo, Harpster y col., 1988). A la luz de la existencia de formas variantes del promotor CaMV35S, como es conocido para los expertos en la materia, el objetivo de la invención puede alcanzarse igualmente usando esos promotores CaMV35S alternativos y variantes. También está claro que se pueden usar otros promotores expresables en plantas, particularmente promotores constitutivos, tales como los promotores de la opina sintasa de los plásmidos Ti o Ri de *Agrobacterium*, en particular un promotor de la nopalina sintasa, o promotores de virus del trébol subterráneo, para obtener efectos similares. La invención también contempla los genes quiméricos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula, que están bajo el control de promotores específicos de la ARN polimerasa del bacteriófago de una subunidad, tales como un promotor específico T7 o T3, siempre que las células huésped también comprendan la correspondiente ARN polimerasa en una forma activa.

Otro objetivo de la invención, es proporcionar procedimientos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en células específicas, particularmente células vegetales específicas poniendo los genes quiméricos de la invención bajo el control de promotores específicos de tejido o de órgano. Tales promotores específicos de tejido u órgano son bien conocidos en la materia e incluyen pero no están limitados a promotores específicos de semilla (por ejemplo, documento WO89/03887), promotores específicos de primordios de órganos (An y col., 1996), promotores específicos de tallo (Keller y col., 1988), promotores específicos de hojas (Hudspeth y col., 1989), promotores específicos del mesófilo (tales como los promotores inducibles por luz de la rubisco), promotores específicos de raíz (Keller y col., 1989), promotores específicos de tubérculo (Keil y col., 1989), promotores específicos de tejido vascular (Peleman y col., 1989), promotores selectivos de estambre (Keil y col., 1989), promotores específicos de zona de dehiscencia (documento WO 97/13865) y similares.

En otra realización de la invención, la expresión de un gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana se puede controlar según se desee, por la aplicación de un inductor químico apropiado, por unión operativa de la región ADN transcrita de los genes quiméricos de la invención a un promotor cuya expresión es inducida por un compuesto químico, tal como el promotor de los genes descritos en la publicación de patente europea ("EP") 0332104, o el promotor del gen descrito en el documento WO 90/08826.

Estará claro para el experto en la materia, que se puede lograr el mismo efecto de reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula vegetal usando un ribozima trans-eliminador de intrones para eliminar al menos el sitio de poliadenilación desde el transcrito de ARN de un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas, una región de ADN diana específica y una región de ADN que codifica la terminación y señal de poliadenilación del extremo 3' para generar ARN no poliadenilado que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica.

Como se usa en el presente documento "un ribozima transeliminador de intrones" es una molécula de ARN capaz de catalizar la rotura o formación de un enlace covalente dentro de otra molécula de ARN en un sitio específico. El ribozima transeliminador de intrones debe elegirse o diseñarse de modo que reconozca un sitio específico que precede, preferiblemente que precede inmediatamente la señal de poliadenilación del transcrito de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica. Los procedimientos para diseñar dicho ribozima transeliminador de intrones con actividad de endorribonucleasa son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Haselhoff y Gerlach, 1988, WO 89/05852).

La región de ADN que codifica un ribozima transeliminador de intrones puede estar comprendida dentro del gen quimérico que codifica el ARN específico diana. Tras la transcripción del gen quimérico, se puede generar una molécula de ARN que comprende el ribozima transeliminador de intrones y la secuencia de nucleótidos diana específica, en el que el ribozima transeliminador de intrones es capaz de escindir un sitio específico que precede el sitio

de poliadenilación de otra molécula similar de ARN, para generar moléculas de ARN no poliadeniladas específicas diana.

El ribozima transeliminador de intrones también se puede proporcionar por la expresión de otro gen quimérico que codifica una molécula de ARN que comprende el ribozima transeliminador de intrones en la misma célula vegetal, de acuerdo con los procedimientos y medios disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, Vaish y col., 1998; Bramlage y Col., 1998).

Pueden existir procedimientos alternativos para proporcionar ARN no poliadenilado específico diana al núcleo de una célula vegetal. Estos procedimientos incluyen por ejemplo, la transcripción de un gen quimérico, integrado en el genoma nuclear de una célula vegetal que comprende una región de ADN específica diana, por una ARN polimerasa dependiente de ADN diferente de la ARN polimerasa II, tal que los transcritos de ARN son generados independientemente de la maquinaria de procesamiento normal del ARNm (incluyendo eliminación de intrones, rematado y poliadenilación). Esto se puede lograr, por ejemplo, por unión operativa de la región de ADN específica diana a una región promotora, reconocida por una subunidad individual de la ARN polimerasa de un bacteriófago, tal como pero no limitada a la polimerasa T7, y a una región de ADN que comprende un terminador para dicha polimerasa. En este caso, la célula vegetal debe estar provista de un gen quimérico que codifique la correspondiente ARN polimerasa. También se puede lograr proporcionar ARN específico diana no poliadenilado al núcleo de una célula vegetal, por ejemplo, por unión operativa de la región de ADN diana específica a una región promotora, reconocida por una ARN polimerasa I o III eucariota, y a una región de ADN que comprende un terminador para dicha polimerasa. Los medios y procedimientos para construir dichos genes quiméricos y células vegetales se describen con detalle en el documento WO 97/49814. Otra alternativa para proporcionar ARN diana específico no poliadenilado al núcleo de una célula vegetal puede incluir la transcripción de un gen quimérico que comprende una región de ADN diana específica operativamente unida a un promotor expresable en plantas y unida a una región de ADN que comprende la señal de formación del extremo 3' pero no la señal de poliadenilación.

Aunque no se pretende limitar la invención a un modo de acción específico, se espera que el desencadenante de los mecanismos de silenciamiento de genes dependientes de homología de la célula, particularmente los mecanismos de cosupresión, sea la acumulación de ARN diana específico dentro del núcleo de esa célula. El proporcionar ARN no poliadenilado al núcleo de la célula puede ser un mecanismo que causa la acumulación de un ARN diana específico en un núcleo de una célula, pero otras aberraciones tales como la ausencia de una estructura de caperuza o la presencia de intrones persistentes, etc. pueden constituir caminos alternativos para causar la acumulación de ARN diana específico en el núcleo de una célula.

Además, se espera que otras aberraciones en las moléculas de ARN específicas dianas además de la ausencia de cola de PoliA, incluyendo la ausencia de una estructura de caperuza o la presencia de intrones persistentes o la presencia de estructuras secundarias anormales, particularmente la presencia de estructuras de horquilla gigantes, puedan tener un efecto acumulativo en la inhibición del tránsito normal del ARN desde el núcleo al citoplasma y por lo tanto tener efecto acumulativo o sinérgico en la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés.

El ADN recombinante que comprende el gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en una célula vegetal huésped, puede ir acompañado por un gen quimérico marcador, en particular cuando se imagina la integración estable del transgén en el genoma de la célula hospedadora. El gen marcador quimérico puede comprender un ADN marcador que está operativamente unido en su extremo 5' a un promotor, que funciona en la célula huésped de interés, en particular un promotor expresable en plantas, preferiblemente un promotor constitutivo, tal como el promotor CaMV 35S, o un promotor inducible por luz, tal como el promotor del gen que codifica la pequeña subunidad de la rubisco; y operativamente unido en su extremo 3' a señales de transcripción de vegetales adecuadas de formación y poliadenilación del extremo 3'. Se espera que la elección del ADN marcador no sea crítica, y se puede usar cualquier ADN marcador apropiado. Por ejemplo, un ADN marcador puede codificar una proteína que proporciona un color distinguible a la célula vegetal transformada, tal como el gen A1 (Meyer y col., 1987), puede proporcionar resistencia a herbicida a la célula vegetal transformada con el gen *bar*, que codifica la resistencia a fosfotricina (documento EP 0.242.246) o puede proporcionar resistencia antibiótica a las células transformadas, tal como el gen *aac* (6'), que codifica la resistencia a la gentamicina (documento WO 94/001560).

Un ADN recombinante que comprende un gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un gen de interés, puede estar establemente incorporado en el genoma celular de una célula de una planta. La transferencia génica se puede llevar a cabo con un vector que es un plásmido Ti desarmado, que comprende un gen quimérico de la invención, y es llevado por *Agrobacterium*. Esta transformación se puede llevar a cabo usando los procedimientos descritos, por ejemplo, en el documento EP 0116718.

Alternativamente, se puede usar cualquier tipo de vector para transformar la célula vegetal, aplicando procedimientos tales como la transferencia directa de genes (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0233247), la transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0270356, WO 85/01856 y US4.684.611), la transformación mediada por virus de ARN vegetal (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0067553 y US 4.407.956), la transformación mediada por liposomas (como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.536.475) y los similares.

También son adecuados otros procedimientos, tales como el bombardeo con microproyectiles como describen Fromm y col., (1990) y Gordon-Kamm y Col., (1990). Las células de plantas monocotiledóneas, tales como la mayoría de los cereales, también se pueden transformar usando tejido embrionario compacto dañado o degradado por enzima capaz de formar callos embriogénicos compactos, o embriones inmaduros dañados o degradados como se describe en el documento WO92/09696. La célula vegetal transformada resultante se puede usar para regenerar una planta transformada de una manera convencional.

La célula vegetal transformada obtenida se puede usar en un esquema de reproducción convencional para producir mas plantas transformadas con las mismas características o para introducir el gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés de la invención en otras variedades de la misma planta o de especies vegetales relacionadas, o en plantas híbridas. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas contienen los genes quiméricos de la invención como un inserto genómico estable.

Los medios y procedimientos de la invención también se pueden usar para reducir la expresión génica por cosupresión en células eucariotas y organismos.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula eucariota, que comprende la etapa de proporcionar ARN no poliadenilado que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos del ácido de interés, al núcleo de una célula eucariota.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que normalmente puede ser expresado en una célula eucariota, que comprende la etapa de introducir dentro del genoma nuclear de la célula eucariota un ADN quimérico para generar una célula vegetal transgénica, comprendiendo el ADN las siguientes partes operativamente ligadas:

- a) una región de promotor funcional en la célula vegetal;
- b) una región de ADN diana específica que comprende la secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés;
- c) una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones; y
- d) una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', en la que el ADN quimérico cuando transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica y un ribozima autoeliminador de intrones, que cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos diana específica, en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.

Las diferentes realizaciones preferidas y definiciones descritas en conexión con la reducción de la expresión génica por silenciamiento de genes dependiente de homología en células vegetales y plantas, también se aplican cambiando lo que ha de cambiarse para los medios y procedimientos descritos para reducir la expresión génica por cosupresión en células y organismos eucariotas. Como se usa en el presente documento las "células eucariotas" comprenden células vegetales, células animales y células humanas, y células de levaduras y hongos así como cultivos de dichas células.

Otro objetivo de la invención es proporcionar células eucariotas, preferiblemente células vegetales y organismos (preferiblemente vegetales) que comprenden los genes quiméricos para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana descrito en la invención.

Los procedimientos y medios de la invención pueden así, usarse para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula u organismo eucariota, en particular una célula vegetal o planta, para obtener resistencia a la destrucción (documento WO 97/13865), para obtener modelos de flores de colores modificados (documentos EP 522880, US 5.231.020), para obtener plantas resistentes a los nematodos (documentos WO 92/21757, WO 93/10251, WO 94/17194), para retrasar la maduración de la fruta (documentos WO 91/16440, WO 91/05865, WO 91/16426, WO 92/17596, WO 93/07275, WO 92/04456, US 5.545.366), para obtener esterilidad masculina (documentos WO 94/29465, WO89/10396, WO 92/18625), para reducir la presencia de metabolitos no deseados (secundarios) en organismos, tales como glucosinolatos (documento WO97/16559) o el contenido clorofílico (documento EP 779 364) en plantas, para modificar el perfil de los metabolitos sintetizados en una célula u organismo eucariota por ingeniería metabólica, por ejemplo, por reducción de la expresión de genes particulares implicados en el metabolismo de carbohidratos (documentos WO 92/11375, WO 92/11376, US 5.365.016, WO 95/07355) o la biosíntesis de lípidos (documentos WO 94/18337, US 5.530.192) para retrasar la senectud (documento WO 95/07993), para alterar la lignificación en plantas (documentos 93/05159, WO 93/05160), para alterar la calidad de la fibra del algodón (documento US 5.597.718), para aumentar la resistencia a las magulladuras en patatas por reducción de la polifenoloxidasas (documento WO 94/03607), etc.

Los procedimientos de la invención conducirán a mejores resultados y/o mayores eficiencias cuando se comparen con los procedimientos usando secuencias de nucleótidos homosenrido o antisenido convencionales y se cree que pueden estar implicados otros mecanismos específicos de secuencia que regulan la expresión fenotípica de ácidos nucleicos diana y/o ser desencadenados por la presencia de moléculas de ARN bicatenarias descritas en esta memoria descriptiva.

Se ha descrito una aplicación particular para la reducción de la expresión fenotípica de un transgén en una célula vegetal, entre otros, por procedimientos de homosenrido o antisenido, para la restauración de la fertilidad masculina, obteniéndose esta última por introducción de un transgén que comprende un ADN de esterilidad masculina (documentos WO 94/09143, WO 91/02069). El ácido nucleico de interés es específicamente el ADN de la esterilidad masculina.

De nuevo, los procedimientos y productos descritos en esta invención se pueden aplicar a estos procedimientos para llegar a una restauración de la fertilidad masculina más eficiente.

Se apreciará que los procedimientos y medios descritos en la memoria descriptiva también se pueden aplicar en procedimientos de alta capacidad de procesamiento (HTS), para la identificación o confirmación de fenotipos asociados con la expresión de una secuencia de ácido nucleico con funciones por el momento no identificadas en una célula eucariota, particularmente una célula vegetal.

Dicho procedimiento comprende las etapas de:

1. seleccionar una secuencia diana dentro de la secuencia del ácido nucleico de interés con la función/fenotipo no identificada o no confirmado cuando se expresa. Preferiblemente, si el ácido nucleico tiene marcos de lectura abiertos putativos, la secuencia diana debe comprender al menos parte de uno de esos marcos de lectura abiertos. La longitud de la secuencia de nucleótidos diana puede variar de aproximadamente 20 nucleótidos hasta una longitud igual a la longitud (en nucleótidos) del ácido nucleico de interés con función no identificada.
2. introducir un ADN quimérico dentro del núcleo de una célula huésped apropiada, que comprende el ácido nucleico de interés, en el que el ADN quimérico comprende una región promotora apropiada para la expresión en la célula huésped, una región de ADN que codifica la secuencia de nucleótidos diana específica y una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones localizado inmediatamente secuencia arriba de la región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3'.
3. observar el fenotipo mediante un procedimiento apropiado. Dependiendo del fenotipo esperado, puede ser suficiente observar o medir el fenotipo en una sola célula, pero también puede ser necesario cultivar las células para obtener un nivel multicelular (organizado), o incluso regenerar un organismo transgénico, en particular una planta transgénica.

También está claro que los procedimientos y medios de la invención son adecuados para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico en todas las células vegetales de todas las plantas, sean plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, particularmente plantas cultivadas tales como pero no limitadas a arroz, trigo, avena, caña de azúcar, algodón, semillas de colza, soja, verduras (incluyendo achicoria, verduras brassica, lechuga, tomate), tabaco, patata, remolacha azucarera pero también plantas usadas en horticultura, floricultura o silvicultura. Los medios y los procedimientos de la invención serán particularmente apropiados para plantas que tienen genomas complejos, tales como plantas poliploides.

Se espera que las moléculas de ARN quimérico producidas por transcripción de genes quiméricos descritos en el presente documento, puedan extenderse sistemáticamente por una planta, y así se puede reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en células de un vástago no transgénico de una planta injertada en un cultivo madre transgénico que comprende los genes quiméricos de la invención (o viceversa), un procedimiento que puede ser importante en horticultura, viticultura o en la producción de fruta.

Los siguientes ejemplos describen la construcción de genes quiméricos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en una célula eucariota y el uso de dichos genes. Salvo que se exponga lo contrario en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar como describen Sambrook y col. (1989) "Molecular cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edición, Cold Spring Harbor laboratory Press, Nueva York, y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel y col. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", *Current Protocols*, USA. Los materiales estándar y procedimientos para el trabajo molecular de plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) de R.D.D. Croy, publicado junto con BIOS Scientific - Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications. Reino Unido.

A lo largo de la descripción y ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias:

ID SEC N° 1: ADNc copia de la cadena (-) del ARN satélite de BYDV RPV

ES 2 296 632 T3

ID SEC N° 2: ADNc copia de la cadena (+) del ARN satélite de BYDV RPV

ID SEC N° 3: oligonucleótido para amplificación por PCR (SatPR1)

5 ID SEC N° 4: oligonucleótido para amplificación por PCR (SatPR2)

ID SEC N° 5: oligonucleótido para amplificación por PCR (SatPR3)

10 ID SEC N° 6: oligonucleótido para amplificación por PCR (SatPR4)

ID SEC N° 7: secuencia de nucleótidos que codifica un tallo de histona de genes de histonas de mamíferos.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Procedimientos experimentales

20 1.1 Construcciones de ADN quimérico

Construcciones del gen GUS que contiene ribozima y un control de la construcción

25 Las secuencias de ribozimas usadas son las secuencias de autoescisión de cadena negativa o cadena positiva del ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) serotipo RPV, que se aisló en CSIRO Plant Industry (ID SEC N° 1 y 2; Miller y col., 1991).

30 Las dos construcciones GUS que contienen ribozima (pMBW259 y pMBW267) y una construcción GUS de control (pMBW265) se presentan esquemáticamente en la Figura 1. pMBW 259 contiene dos sitios de escisión de la cadena positiva, mientras que pMBW267 contiene el sitio de escisión de la cadena negativa.

35 Para hacer estas construcciones, se modificó una secuencia de genes de β -glucoronidasa (GUS) para contener un sitio NcoI alrededor del ATG de inicio de la traducción y se clonó en pART7 (Gleave, 1992) en los sitios XhoI/EcoRI, formando pMBW 258. La longitud total de la secuencia satélite de BYDV-RPV se amplificó por PCR usando los cebadores SatPR1 (ID SEC N° 3) y SatPR4 (ID SEC N° 6), se hizo digerir con BamHI y se clonó en pMBW 265 en el sitio BamHI, y la caja resultante 352-GUS- Sat-ocs se escindió y clonó en pART27 (Gleave, 1992), formando pMBW 265. La misma secuencia satélite de longitud completa se insertó en el sitio BamHI de pMBW 258 pero en la orientación antisentido, y el 35S-GUS-asSat-ocs resultante se clonó en pART 27 para dar lugar a pMBW 267.

40 Para hacer pMBW 259, las mitades 3' y 5' de las secuencias de ARN satélite se amplificaron por PCR usando las parejas de cebadores SatPR3 (ID SEC N° 5) y SatPR4 (ID SEC N° 6), y usando SatPR1 (ID SEC N° 3) y SatPR2 (ID SEC N° 4) respectivamente. La fusión de la secuencia de longitud total con las secuencias mitades 3' y 5' se hicieron mediante ligación entre los extremos EcoRV y HpaI de los tres fragmentos de la PCR. Esta fusión imita las formas multiméricas naturales del ARN satélite, y además mantiene la propiedad de escisión de la cadena positiva de las formas nativas. La secuencia de fusión se clonó en pGEM-3z (Promega) en los sitios SacI/PstI, escindidos con HindIII/EcoRI, de extremos romos, y se insertó en pART 7 en el sitio SmaI, en la cual después se clonó la secuencia GUS descrita antes en los sitios XhoI/EcoRI. El 3SS-GUS-Sat-ocs resultante se insertó en pART 27 en el sitio NotI, formando pMBW 259.

50 *La construcción GUS supertransformante*

55 El fragmento BamHI se escindió de Pig121 Hm (Hiei y col., 1994) y se clonó en pART 7. La secuencia GUS-nos entonces se escindió con AccI, de extremo romo, y se insertó en pBluescript en el sitio HincII. La región promotora de 1,3 kb del gen PP2 de la proteína de floema de cucurbitácea se escindió con NotI/HindIII de un clon lambda CPPI.3 y se clonó en el plásmido Bluescript anterior. El PP2-GUS-nos resultante se escindió con NotI/KpnI y se insertó en pWVec2 (Wang y Col., 1998), dando lugar a pBPPGH (Fig. 1).

1.2. Transformación de tabaco

60 *Nicotina tobaccum* W38 se transformó y regeneró en plantas enteras esencialmente como han descrito Ellis y col. 1987. Para las construcciones pMBW 259, pMBW 265 y pMBW 267, se incluyó kanamicina 50 mg/l en el medio para la selección del tejido transformado. Para la construcción pBPPGH se usó higromicina B 25 mg/l.

65

1.3. Ensayo GUS

La expresión del gen GUS se ensayó histoquímicamente o fluorométricamente de acuerdo con Jefferson y col. 1987.

Ejemplo 2

Expresión de GUS en tabaco transgénico transformado con un solo tipo de construcción de GUS

Las plantas transgénicas que contenían pMBW259 y pMBW267 mostraron niveles muy bajos de expresión de GUS, de acuerdo con la falta de tinción o de azul tenue, de GUS. Las plantas transformadas con pMBW265 mostraron más expresión de GUS que con pMBW259 y pMBW267, pero el nivel fue mucho menor que en las plantas transformadas con pBPPGH. Las mejores líneas de pMBW 265 expresaron 13,3% de la actividad de GUS por una línea media de pBPPGH.

Ejemplo 3

Expresión de GUS en líneas supertransformadas que contienen pBPPGH y una de las 3 construcciones del ejemplo 1

Para promover el silenciamiento de un gen GUS normal por la presencia de una secuencia de ribozima cerca de el extremo 3' del transcrito del gen GUS, las plantas que contenían pMBW259, pMBW265 o pMBW267 y pBPPGH se construyeron por retransformación. Los ensayos histoquímicos de GUS de los supertransformados mostraron que el fondo de pMBW267 daba proporciones sustancialmente mayores de transformantes que el fondo de pMBW259 o el pMBW265 que mostraban niveles bajos de expresión de GUS como indicaba la falta de fuerte y uniforme tinte azul. Los supertransformantes que contenían pBPPGH y pMBW265 mostraron la mejor expresión de GUS.

La Tabla 2 muestra el resultado del ensayo fluorométrico de GUS (MUG) de los supertransformantes. Las líneas (E y F) que contenían pBPPGH y pMBW267 mostraron uniformemente baja expresión de GUS comparado con las otras líneas. La mejor expresión de GUS vino de la líneas C que contenían pBPPGH y pMBW265.

Entre las tres construcciones ensayadas, pMBW265 no contiene las secuencias de ribozima funcionales de longitud entera del ARN satélite de BYDV en un tramo continuo, y por esto se espera que produzca principalmente poli (A) + ARN. pMBW259 contiene dos copias de la secuencia de ribozima de la cadena positiva, y debería dar lugar a ARN que tiene colas de poli (A) eliminadas por la escisión del ribozima. pMBW267 contiene el ribozima de cadena negativa. Se ha mostrado previamente que el ribozima de cadena negativa era mucho más (al menos 10 veces) eficaz que el ribozima de cadena positiva (Miller y col., 1991), y por lo tanto se espera que pMBW267 produzca poli (A) -ARN de forma más eficaz. El experimento de los autores de la invención mostró que las líneas supertransformadas que tenían el fondo de pMBW267 expresaban uniformemente niveles bajos de actividad de GUS en comparación con las líneas que tenían el fondo de pMBW259 o pMBW265. Las líneas de mayor expresión de GUS fueron las de fondo de pMBW 265, las cuales no producen poliA-ARN.

TABLA 2

*Ensayo MUG de las líneas de tabaco supertransformadas**

Líneas supertransformadas	Lecturas de MUG	Líneas supertransformadas	Lecturas de MUG	Líneas supertransformadas	Lecturas de MUG
A1	10,1	C1	8,84	E1	4,32
A2	15,8	C2	16,9	E2	3,15
A3	30,6	C3	17,9	E3	3,56
A4	47,3	C4	22,8	E4	3,31
A5	0,29	C5	11,7	E5	3,68
A6	10,3	C6	14,5	E6	5,02

ES 2 296 632 T3

A7	5,8	C7	44,0	E7	2,63
A8	13,15	C8	19,0	E8	10,27
A9	7,34	C9	29,8	E9	10,81
A10	9,76	C10	32,1	E10	13,1
A11	17,74	C11	37,1	E11	5,10
A12	34,8	C12	2,51	E12	2,86
A13	4,33	C13	14,5	E13	4,00
A14	3,41	C14	25,8	E14	16,8

A15	11,2	C15	7,20	E15	4,02
A16	2,04	C16	30,2	E16	1,29
A17	13,29	C17	9,70	E17	1,78
A18	14,6	C18	13,4	E18	3,57
A19	0,14	C19	19,3	E19	0,43
A20	17,2	C20	17,0	E20	11,8
A21	9,22	D1	6,01	F1	5,73
A22	17,3	D2	12,9	F2	5,10
B1	9,57	D3	0,19	F3	4,16
B2	44,7	D4	7,88	F4	4,69
B3	17,7	D5	1,24	F5	0
B4	1,25	D6	0,44	F6	1,93
B5	13,5	D7	14,1	F7	3,21
B6	11,4	D8	0,91	F8	2,77
B7	6,28	D9	5,49	F9	1,86
B8	24,8	D10	1,30	F10	3,27
B9	16,3	D11	15,1	F11	2,85
B10	9,72	D12	6,63	F12	3,25
B11	3,71	D13	12,2	F13	2,17
B12	0,08	D14	15,8	F14	2,84
B13	20,6	D15	1,32	F15	3,11
B14	11,9	D16	2,29	F16	2,06
B15	3,11	D17	3,59	F17	2,90
B16	8,25	D18	22,1	F18	3,75
B17	4,12	D19	13,0	F19	4,16
B18	6,04	D20	4,37	F20	2,49

A y B, desde la supertransformación de dos líneas independientes pMBW259 con pBPPGH; C y D, de la supertransformación de dos líneas independientes pMBW265 con pBPPGH; E y F de la supertransformación de dos líneas independientes pMBW267 con pBPPGH.

Ejemplo 4

Construcciones adicionales de ADN quimérico

- 5 Las construcciones adicionales de ADN quimérico se hacen usando técnicas de clonación de ADN convencionales y se introducen en plantas que comprenden los genes diana apropiados.

Construcciones de silenciamiento de GUS de tipo 1

- 10 Las construcciones GUS que contienen ribozima similares a pMBW259 y pMBW267 (ver ejemplo 1) se adaptan para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento estabilizador de ARN (tallo de histona de genes de histona de mamíferos; ID SEC N° 7) entre la secuencia de nucleótidos derivada del genGUS y secuencia arriba de la región de ADN que codifica el ribozima.

Construcciones de silenciamiento de GUS de tipo 2

- 15 Las construcciones GUS que contienen ribozima similares a pMBW259 y pMBW267 (ver ejemplo 1), pero en las que la secuencia de nucleótidos derivada del gen GUS está en una orientación antisentido (es decir, opuesta a estas secuencias homólogas en pMBW259 y pMBW267) se adaptan para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento estabilizador de ARN (tallo de histona de los genes de histona de mamíferos; ID SEC N° 7) entre la secuencia de nucleótidos derivada del gen GUS y secuencia arriba la región de ADN que codifica el ribozima.

Construcciones de silenciamiento de GUS de tipo 3

- 25 Los genes de silenciamiento de GUS quiméricos se construyen similares a los genes quiméricos de silenciamiento de GUS descritos en el documento WO99/53050 (particularmente página 36) que comprenden una región ADN adicional que codifica un ribozima entre la región de ADN que codifica el ARN horquilla y la región ADN que codifica la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Estas construcciones comprenden los siguientes elementos

- 30
- un promotor CaMV35S (como se describe en el ejemplo 1)
 - una secuencia de nucleótidos de al menos 500 pb derivada del gen GUS en la orientación del mismo sentido.
 - una secuencia de nucleótidos espaciadora (por ejemplo, que comprende aproximadamente 700 pb del gen PVY Nia, véase el documento WO99/53050)
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos derivada del gen GUS (es decir, parte del gen GUS en orientación antisentido)
 - una región de ADN que codifica el ribozima como en pMBW259 y pMBW267 (Ejemplo 1)
 - un terminador ocs-T (como se describe en el ejemplo 1)
- 35
- 40

Construcciones resistentes a PVY

- 45 Los genes quiméricos resistentes a PVY se construyen comprendiendo los siguientes elementos

- un promotor CaMV35S (como se describe en el ejemplo 1)
 - una secuencia de nucleótidos que comprende aproximadamente 700 pb del gen PVY Nia, véase el documento WO99/53050) en la orientación del mismo sentido
 - una secuencia de nucleótidos espaciadores (por ejemplo, parte del gen GUS)
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos derivada de PVY (es decir, parte de la secuencia de PVY en orientación antisentido)
 - una región de ADN que codifica el ribozima como en pMBW259 y pMBW267 (Ejemplo 1)
 - un terminador ocs-T (como se describe en el Ejemplo 1)
- 50
- 55
- 60

Cuando se analizan las construcciones de silenciamiento de GUS, las plantas transgénicas comprenden un transgén GUS funcional y las construcciones de silenciamiento se introducen por transformación directa de las plantas que contienen el gen GUS transgénico o por cruzamiento de plantas transgénicas apropiadas.

- 65 Cuando se usan las construcciones de silenciamiento de PVY, las plantas transgénicas que comprenden las construcciones de silenciamiento de PVY se inoculan con PVY, de acuerdo con procedimientos estándar (véase el documento WO99/53050).

ES 2 296 632 T3

En las plantas transgénicas que contienen el transgén GUS, la expresión de GUS es eficazmente silenciada tras la introducción de las construcciones de silenciamiento de GUS silenciosas en la mayoría de las líneas transgénicas obtenidas.

- 5 Las plantas transgénicas que contiene los genes resistentes a PVY, son extremadamente resistentes a la infección por PVY en la mayoría de las líneas transgénicas obtenidas.

Referencias

- 10 **An** y Col., 1996 *The Plant Cell*. 8: 15-30
- Bramlage** y Col. 1998 *TIBTECH* 16, 434-438
- Covey** y Col., 1997 *Nature* 385:781-782
- 15 **Eckner** y Col. 1991 *EMBO J.* 10: 3513-3522
- Egli** y **Braus**, 1994 *J. Biol. Chem.* 1994 269: 27378-27383
- 20 **Ellis** y Col. 1987 *EMBO Journal*, 6: 11-16
- Fromm** y Col. 1990 *Bio/Technology* 8: 833
- Gleave**, 1992 *Plant Mol. Biol.* 20: 1203-1207
- 25 **Gordon-Kamm** y Col., 1990 *The Plant Cell* 2: 603
- Hamilton** y Col. 1998 *The Plant Journal* 15(6): 737-746
- Harpster** y Col., 1988 *Mol. Gen. Genet.* 212, 182-190
- 30 **Haselhoff** y **Gerlach**, 1988 *Nature* 334 585-591
- Hiei** y Col., 1994 *Plant Journal* 6: 271 -282
- 35 **Hudspeth** y Col 1989 *Plant Mol Biol* 12: 579-589
- Jefferson** y Col., 1987 *EMBO J.* 6, 3901-3907
- Keil** y Col., 1989 *EMBO J.* 8: 1323-1330
- 40 **Keller** y Col., 1988 *EMBO J.* 7: 3625-3633
- Keller** y Col., 1989 *Genes Devel.* 3: 1639-1646
- 45 **Lee** y Col. 1997 *Plant Journal* 12: 1127-1137
- Mette** y Col., 1999 *EMBO J* 18: 241-248
- Metzlaff** y Col., 1997 *Cell* 88, 845-854
- 50 **Miller** y Col., 1991 *Virology* 183: 711-720, 1991
- Peleman** y Col., 1989 *Gene* 84: 359-369
- 55 **Rubio** y Col. 1999 *J. Virology* 73: 5070-5078
- Vaish** y Col. 1998 *Nucleic Acids Res.* 26: 5237-5242
- Van **Eldik** y Col. 1998 *Nucleic Acids Res.* 26: 5176-5181
- 60 Van **Houdt** y Col., 1997 *Plant Journal* 12: 379-392
- Wang** y Col., 1998 *Acta Horticulturae* 461:1-407
- Wassenegger** y **Pélissier**, 1998 *Plant Mol. Biol.* 37 349-362
- 65 **Waterhouse** y Col. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 13959-13964
- Wilbur** y **Lipmann**, 1983 *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 726

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por la aplicación es solo para la conveniencia del lector. Esto no forma parte del documento de Patente Europeo. Aunque se he llevado cuidado para cumplimentar las referencias, errores u omisiones no pueden ser excluidas y la EPO no reivindica nada a este aspecto.

Documentos patentes en la descripción

- | | | |
|----|-------------------------------------|--|
| | • US 5190131 A [0007] | • WO 9209696 A [0078] |
| 10 | • EP 0467349 A1 [0007] | • EP 522880 A [0085] |
| | • EP 0223399 A1 [0008] | • WO 9221757 A [0085] |
| 15 | • EP 0240208 A [0009] | • WO 9310251 A [0085] |
| | • EP 0647715 A1 [0010] | • WO 9417194 A [0085] |
| | • US 5034323 A [0010] | • WO 9116440 A [0085] |
| 20 | • US 5231020 A [0010] [0085] | • WO 9105865 A [0085] |
| | • US 5283184 A [0010] | • WO 9116426 A [0085] |
| | • WO 9853083 A [0013] | • WO 9217596 A [0085] |
| 25 | • WO 9534688 A [0014] | • WO 9307275 A [0085] |
| | • WO 9515394 A [0015] | • WO 9204456 A [0085] |
| | • US 5908779 A [0015] | • US 5545366 A [0085] |
| 30 | • WO IB9900606 A, Waterhouse [0045] | • WO 9429465 A [0085] |
| | • WO 8903887 A [0067] | • WO 9218625 A [0085] |
| 35 | • WO 8910396 A [0067] [0085] | • WO 9716559 A [0085] |
| | • WO 9213956 A [0067] | • EP 779364 A [0085] |
| | • WO 9713865 A [0067] [0085] | • WO 9211375 A [0085] |
| 40 | • EP 0332104 A [0068] | • WO 9211376 A [0085] |
| | • WO 9008826 A [0068] | • US 5365016 A [0085] |
| | • WO 8905852 A [0070] | • WO 9507355 A [0085] |
| 45 | • WO 9749814 A [0073] | • WO 9418337 A [0085] |
| | • EP 0242246 A [0076] | • US 5530192 A [0085] |
| 50 | • WO 9401560 A [0076] | • WO 9507993 A [0085] |
| | • EP 0116718 A [0077] | • WO 9305159 A [0085] |
| | • EP 0233247 A [0077] | • WO 9305160 A [0085] |
| 55 | • EP 0270356 A [0077] | • US 5597718 A [0085] |
| | • WO 8501856 A [0077] | • WO 9403607 A [0085] |
| | • US 4684611 A [0077] | • WO 9409143 A [0086] |
| 60 | • EP 0067553 A [0077] | • WO 9102069 A [0086] |
| | • US 4407956 A [0077] | • WO 9953050 A [0107] [0107] [0108] [0110] |
| 65 | • US 4536475 A [0077] | • US 09373720 A [0114] |

Documentos no patentes citados en la descripción

- *Nucleic Acids Res.*, vol. 9, 6527-6537 [0056]
- 5 • *Virology*, vol. 173, 352-356 [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056]
- *Virology*, vol. 173, 352-358 [0056]
- 10 • *J. Gen Virol.*, vol. 75, 1543-1549 [0056]
- *J. Gen Virol.*, vol. 75, 1543-1549 [0056]
- 15 • *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, 3711-3715 [0056]
- *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, 3711-3715 [0056]
- *Acta Hort.*, vol. 386, 522-530 [0056]
- 20 • *Plant Dis.*, vol. 81, 154-158 [0056]
- *J. Virol.*, vol. 72, 7397-7406 [0056] [0056]
- 25 • *J. Virol.*, vol. 72, 7397-7406 [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056] [0056]
- *J. Virol.*, vol. 72, 7397-7408 [0056]
- *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, 11262-11267 [0056]
- 30 • *Virology*, vol. 183, 711-720 [0056]
- *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol. 154, 318-325 [0056]
- 35 • *J. Gen Virol.*, vol. 71, 1897-1903 [0056]
- *FEBS Lett.*, vol. 159, 185-190 [0056] [0056]
- *J. Gen. Virology*, vol. 69, 2369-2373 [0056]
- 40 • *Virology*, vol. 151, 186-199 [0056]
- *Virology*, vol. 160, 95-99 [0056]
- 45 • *Virology*, vol. 177, 216-224 [0056] [0056]
- *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, 3681-3691 [0056] [0056]
- *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, 3881-3691 [0056]
- 50 • *J. Virol.*, vol. 71, 6603-6610 [0056]
- *Nucleic Acids Res.*, vol. 20, 6323-6329 [0056] [0056]
- 55 • *J. Cell. Biol.*, vol. 103, 1137-1144 [0056]
- *Cell*, vol. 61, 885-696 [0056]
- *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, 3880-3888 [0056]
- 60 • **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989 [0091]
- **AUSUBEL et al.** *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*. 1994, vol. 1 and 2 [0091]
- 65 • **R. D. D. CROY.** *Plant Molecular Biology Labfax. BIOS Scientific-Publications Ltd*, 1993 [0091]
- **Blackwell.** *Scientific Publications* [0091]

- **AN** *et al.* *The Plant Cell*, 1996, vol. 8, 15-30 [0113]
- **BRAMLAGE** *et al.* *TIBTECH*, 1998, vol. 16, 434-438 [0113]
- 5 • **COVEY** *et al.* *Nature*, 1997, vol. 385, 781-782 [0113]
- **ECKNER** *et al.* *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3513-3522 [0113]
- **EGLI; BRAUS.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 27378-27383 [0113]
- 10 • **ELLIS** *et al.* *EMBO Journal*, 1987, vol. 6, 11-16 [0113]
- **FROMM** *et al.* *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 833 [0113]
- 15 • **GLEAVE.** *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 20, 1203-1207 [0113]
- **GORDON-KAMM** *et al.* *The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 603 [0113]
- **HAMILTON** *et al.* *The Plant Journal*, 1998, vol. 15 (6), 737-746 [0113]
- 20 • **HARPSTER** *et al.* *Mol. Gen. Genet.*, 1988, vol. 212, 182-190 [0113]
- **HASELHOFF; GERLACH.** *Nature*, 1988, vol. 334, 585-591 [0113]
- 25 • **HIEI** *et al.* *Plant Journal*, 1994, vol. 6, 271-282 [0113]
- **HUDSPETH** *et al.* *Plant Mol Biol*, 1989, vol. 12, 579-589 [0113]
- **JEFFERSON** *et al.* *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 3901-3907 [0113]
- 30 • **KEIL** *et al.* *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1323-1330 [0113]
- **KELLER** *et al.* *EMBO J.*, 1988, vol. 7, 3625-3633 [0113]
- 35 • **KELLER** *et al.* *Genes Devel.*, 1989, vol. 3, 1639-1646 [0113]
- **LEE** *et al.* *Plant Journal*, 1997, vol. 12, 1127-1137 [0113]
- 40 • **METTE** *et al.* *EMBO J*, 1999, vol. 18, 241-248 [0113]
- **METZLAFF** *et al.* *Cell*, 1997, vol. 88, 845-854 [0113]
- **MILLER** *et al.* *Virology*, 1991, vol. 183, 711-720 [0113]
- 45 • **PELEMAN** *et al.* *Gene*, 1989, vol. 84, 359-369 [0113]
- **RUBIO** *et al.* *J. Virology*, 1999, vol. 73, 5070-5078 [0113]
- **VAISH** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1998, vol. 26, 5237-5242 [0113]
- 50 • **VAN ELDIK** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1998, vol. 26, 5176-5181 [0113]
- **VAN HOUDT** *et al.* *Plant Journal*, 1997, vol. 12, 379-392 [0113]
- 55 • **WANG** *et al.* *Acta Horticulturae*, 1998, vol. 461, 1-407 [0113]
- **WASSENEGGER; PÉLISSIER.** *Plant Mol. Biol.*, 1998, vol. 37, 349-362 [0113]
- 60 • **WATERHOUSE** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1998, vol. 95, 13959-13964 [0113]
- **WILBUR; LIPMANN.** *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 726 [0113]

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de proporcionar al núcleo de dicha célula vegetal ARN no poliadenilado que comprende una secuencia de nucleótidos homosen-tido específica diana, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos específica diana una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida por dicho ácido nucleico de interés.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ARN no poliadenilado que comprende dicha secuencia de nucleótidos homosen-tido específica diana es producido por transcripción de un ADN quimérico comprendido en dicha célula vegetal, comprendiendo dicho ADN quimérico un promotor expresable en plantas operativamente unido a una región de ADN específica diana que codifica dicho ARN.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho ADN quimérico además comprende una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', precedida por una región de ADN que codifica el ribozima autoeliminador de intrones.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el dicho ADN quimérico se introduce en el genoma nuclear de dicha célula vegetal.
5. El procedimiento de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha secuencia de nucleótidos específica diana corresponde a uno o más exones consecutivos o regiones no traducidas de dicha molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico de interés añadido.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ARN no poliadenilado además comprende una secuencia antisentido específica diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos homosen-tido específica diana y dicha secuencia de nucleótidos antisentido específica diana pueden formar entre sí una estructura de horquilla artificial.
7. Una molécula de ADN quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresado en una célula vegetal, comprendiendo dicha molécula de ADN quimérico:
 - a. una región de promotor expresable en plantas;
 - b. una región de ADN específica diana, comprendiendo dicha región de ADN específica diana una secuencia de nucleótidos homosen-tido de 20 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico añadido de interés;
 - c. una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones, y
 - d. una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';
 en el que dicho ADN quimérico cuando se transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos homosen-tido específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, que cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende la secuencia de nucleótidos homosen-tido específica diana en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.
8. La molécula de ADN quimérica de la reivindicación 7, en la que dicha región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones está localizada inmediatamente secuencia arriba de dicha región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3'.
9. La molécula de ADN quimérico de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en la que dicha región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones comprende un ADNc copia de un ribozima autoeliminador de intrones de viroide del manchado solar del aguacate, viroide del mosaico latente del melocotonero, viroide del moteado clorótico del crisantemo, viroide asociado al debilitamiento del clavel, transcrito del satélite 2 de tritón, ARN VS de neurospora, ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada, ARN satélite del virus del mosaico arabis, ARN S1 satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria, ARN satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa, ARN satélite de las manchas anulares del tabaco, ARN satélite del virus del moteado del trébol subterráneo, ARN satélite del virus del moteado de *Solanum nodiflorum*, ARN vSCMoV satélite del virus del moteado aterciopelado del tabaco o ARN cscRNA1 de tipo viroide circular pequeño del cerezo.
10. La molécula de ADN quimérico de la reivindicación 9, en la que dicha región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones comprende una ADNc copia de una ribozima autoeliminador de intrones del ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada.

11. La molécula de ADN quimérica de la reivindicación 11, en la que dicha región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones comprende la secuencia de nucleótidos del ID SEC N° 1 o ID SEC N° 2.

12. La molécula de ADN quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en la que dicha molécula de ADN quimérico además comprende una región de ADN que codifica un elemento estabilizador de ARN, que precede a dicha región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones.

13. La molécula de ADN quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en la que dicha segunda molécula de ARN comprende un intrón persistente o carece de estructura de caperuza de 5'.

14. La molécula de ADN quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en la que dicho promotor expresable en plantas se selecciona de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, un promotor reconocido por una sola subunidad de la ARN polimerasa de un bacteriófago, un promotor reconocido por una ARN polimerasa I eucariota o un promotor reconocido por una ARN polimerasa III eucariota.

15. La molécula de ADN quimérico de la reivindicación 14, en la que dicho promotor es un promotor reconocido por una ARN polimerasa I eucariota o un promotor reconocido por una ARN polimerasa III eucariota y dicho ADN quimérico además comprende un terminador de dicha ARN polimerasa I o dicha ARN polimerasa III.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicho ADN quimérico es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicho ácido nucleico de interés es un transgén o un gen endógeno.

18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, en el que dicho ácido nucleico de interés esta comprendido en un virus o vector vírico.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16 ó 16 a 18, que además comprende la etapa de regenerar una planta transgénica a partir dicha célula vegetal transgénica.

20. Un célula vegetal que comprende un ácido nucleico de interés el cual normalmente puede ser fenotípicamente expresado, y además comprende el ADN quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15.

21. Una planta que comprende la célula vegetal de la reivindicación 20.

22. Un procedimiento para identificar un fenotipo asociado con la expresión de un ácido nucleico de interés en una célula vegetal, comprendiendo dicho procedimiento:

- a. seleccionar en dicho ácido nucleico de interés una secuencia de específica diana de al menos 20 nucleótidos consecutivos;
- b. introducir un ADN quimérico dentro del núcleo de una célula vegetal huésped apropiada que comprende dicho ácido nucleico de interés, comprendiendo dicho ADN quimérico los siguientes fragmentos de ADN operativamente unidos;
 - i. una región promotora expresable en plantas;
 - ii. una región de ADN específica diana que comprende una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de 100% con una parte de una molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicha secuencia específica diana; seguida por
 - iii. una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones situado inmediatamente secuencia arriba de
 - iv. una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3';
- c. observar el fenotipo por un procedimiento apropiado.

23. Un procedimiento para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, el cual normalmente puede ser expresados en una célula eucariota, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de proporcionar al núcleo de dicha célula eucariota ARN no poliadenilado que comprende una secuencia de nucleótidos específica diana homossentido que comprende 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos de una parte de la molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico de interés.

24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dicho ARN no poliadenilado que comprende dicha secuencia de nucleótidos específica diana es producido por transcripción de un ADN quimérico comprendido en dicha célula

eucariota, comprendiendo dicho ADN quimérico un promotor funcional en dicha célula eucariota, operativamente ligado a una región de ADN específica diana que codifica dicho ARN.

25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho promotor funcional en dicha célula eucariota se selecciona de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, un promotor reconocido por una sola subunidad de la ARN polimerasa de un bacteriófago, un promotor reconocido por una ARN polimerasa I eucariota o un promotor reconocido por una ARN polimerasa III eucariota.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que dicho ADN quimérico además comprende una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', precedida por una región de ADN que codifica el ribozima autoeliminador de intrones.

27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que dicha secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana corresponde a uno o mas exones consecutivos o regiones no traducidas de dicha molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico de interés.

28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en el que dicho ARN no poliadenilado además comprende una secuencia de nucleótidos antisentido específica diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana y dicha secuencia de nucleótidos antisentido específica diana pueden formar entre sí una estructura de horquilla artificial.

29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de introducir en el genoma nuclear de dicha célula eucariota un ADN quimérico para generar una célula transgénica eucariota, comprendiendo dicho ADN quimérico las siguientes partes operativamente ligadas:

- a. una región de promotor funcional en dicha célula eucariota;
- b. una región de ADN específica diana que comprende una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos de una parte de la molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico de interés;
- c. una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones; y
- d. una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', en la que dicho ADN quimérico cuando se transcribe produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, el cual cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende la secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.

30. Una célula eucariota que comprende un ácido nucleico de interés, que normalmente puede ser fenotípicamente expresado, y además comprender un ADN que comprende las siguientes partes operativamente ligadas:

- a. una región de promotor funcional en dicha célula eucariota;
- b. una región de ADN específica diana que comprende una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos de una parte de la molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico de interés;
- c. una región de ADN que codifica un ribozima autoeliminador de intrones; y
- d. una región de ADN implicada en la formación y poliadenilación del extremo 3', en la que dicho ADN quimérico cuando se transcribe en dicha célula eucariota produce una primera molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana y un ribozima autoeliminador de intrones, el cual cuando se escinde por autocatálisis produce una segunda molécula de ARN que comprende la secuencia de nucleótidos específica diana en la que se ha eliminado el extremo 3' de la primera molécula de ARN que comprende el sitio de poliadenilación.

31. Un organismo eucariota no humano que comprende la célula eucariota de la reivindicación 30.

32. Una célula eucariota que comprende

- i) un ácido nucleico de interés el cual normalmente puede ser expresado en dicha célula eucariota; y
- ii) ARN no poliadenilado el cual se proporciona a dicha célula eucariota, que comprende una secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos específica diana una secuencia de nucleótidos de 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia de nucleótidos de una parte de una molécula ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido

ES 2 296 632 T3

nucleico de interés, en la que la expresión de dicho ácido nucleico de interés es reducido por la presencia de dicho ARN no poliadenilado.

33. La célula eucariota de la reivindicación 32, en la que dicho ARN no poliadenilado está presente en el núcleo de dicha célula eucariota.

34. La célula eucariota de la reivindicación 32 ó 33, en la que dicho ácido nucleico añadido de interés es un ARN.

35. La célula eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, que es una célula vegetal.

36. La célula eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, en la que dicha secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana corresponde a uno o mas exones consecutivos o a regiones no traducidas de dicha molécula de ARN transcrita o producida a partir de dicho ácido nucleico de interés.

37. La célula eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, en la que dicho ARN no poliadenilado además comprende una secuencia antisentido específica diana, en la que dicha secuencia de nucleótidos homosenrido específica diana y dicha secuencia de nucleótidos antisentido específica diana pueden formar entre sí una estructura de horquilla artificial.

38. Un organismo no humano eucariota que comprende la célula eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 37.

39. El organismo no eucariota de la reivindicación 38, que es una planta.

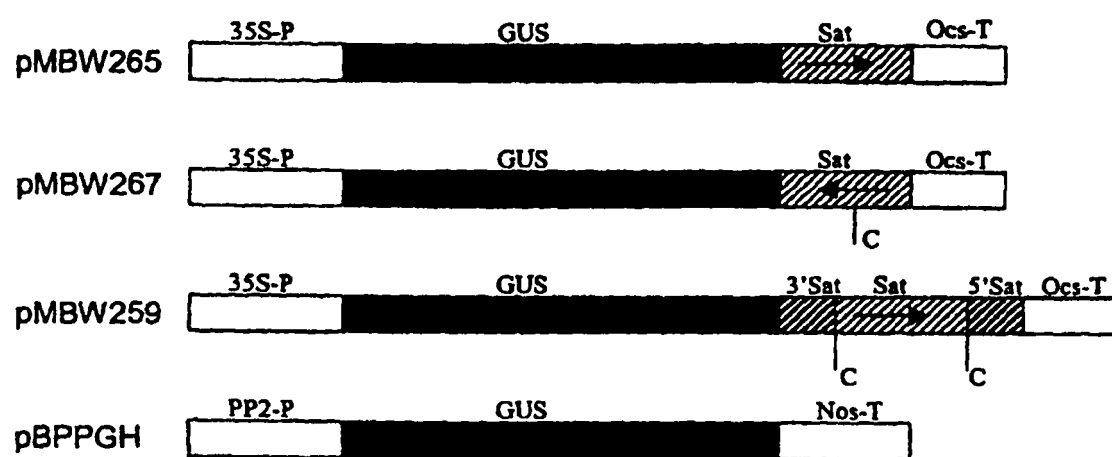


Figura 1

ES 2 296 632 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Wang, Ming-Bo
Waterhouse, Peter
5 Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
<120> Procedimientos y medios para obtener fenotipos modificados
<130> PLTPS
<140>
10 <141>
<150> US 09/373720
<151> 1999-08-13
15 <160> 7
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 322
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada (cadena negativa)

<400> 1
30

Tatccacgaa ataggaagtc gatcttttgc aagagtagcg aactcgttgc tctgtaaag 60
Attgatcgat tgtttcccg tgcctcaagg tgcgtcaatt gactgatgag tccgaaagga 120
35 Cgaaacacca gtgtccagt gcgagcgaaa gctcgggctg aacaaacacg taaagcaagt 180
Ctctcattc gaaagagtgg tggccacctg gtggtgccac aattggagat cttacttcg 240
Gtggatttct gtatctattt gttggacgag gcaccagcct tctagtccgc gcggatacgt 300
40 Cgtcagacag tacgcgctct gt 322

<210> 2
45 <211> 322
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción o secuencia artificial: ARN satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada (cadena positiva)

<400> 2
55

acagagcgcg tactgtctga cgacgtatcc gcgcggacta gaaggctggt gcctcgtcca 60
60 acaaatagat acagaaatcc accgaagtaa agatctccaa ttgtggcacc accaggtggc 120
caccactctt tgaagtgagg agacttgctt tacgtgttg ttcagcccga gcttctgctc 180
gcactggaac actggtgttt cgtcctttcg gactcatcag tcaaggtagc caccttgaga 240
65 caccgggaaa caatcgatca atctttcaca gagcaacgag ttcgctcatc ttgcaaaga 300
tcgatttctt atttcgtgga ta 322

ES 2 296 632 T3

	<210> 3	
	<211> 32	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido cebador de la PCR SATPR1	
10	<400> 3	
	cgcggatccg ttaacagagc gcgtactgtc tg	32
15	<210> 4	
	<211> 28	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido cebador de la PCR SATPR2	
25	<400> 4	
	gccgagctca agtctcctca ctcaaag	28
30	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido cebador de la PCR SATPR2	
40	<400> 5	
	gcgctgcagc ttacgtgtt tggtcagc	28
45	<210> 6	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido cebador de la PCR SATPR4	
55	<400> 6	
	gcgggatccg atatccacga aataggaagt cg	32
60	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 296 632 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos que codifica un tallo de histona del gen de la histona de mamíferos

5

<400> 7

ctgcaggccc ttatcagggc c

21

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65