



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 304 814**

② Número de solicitud: 200402480

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **14.10.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2008**

Fecha de la concesión: **07.10.2009**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **26.10.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2009**

⑦ Titular/es: **Universidad de Sevilla  
OTRI-Pabellón de Brasil  
Paseo de las Delicias, s/n  
41013 Sevilla, ES**

⑦ Inventor/es: **Chávez de Diego, Sebastián y  
Rodríguez Gil, Alfonso**

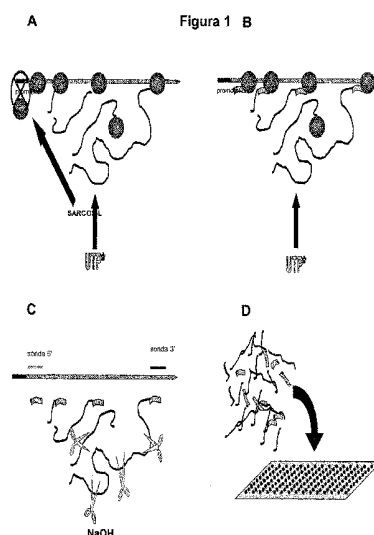
⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método para el ensayo de la expresión del genoma de una muestra biológica y kit para su realización.**

⑤ Resumen:

Método para el ensayo de la expresión del genoma de una muestra biológica y kit para su realización.

El objeto de la presente invención consiste en un método y un conjunto de útiles para el ensayo de la distribución intragénica de las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo el genoma de manera efectiva. El método aplica técnicas de localización genómica de las RNA polimerasas, basadas en procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos, y las extiende a escala multigénica mediante el diseño de matrices de ácidos nucleicos (DNA arrays) donde cada gen está representado al menos por una sonda de la zona inicial (5') de la unidad transcripcional y por otra situada en la zona final (3'). La relación de intensidades de hibridación entre la sonda 5' y la 3' proporciona un parámetro indicativo de la distribución intragénica de polimerasas, que puede ser detectado simultáneamente en todos los genes representados en la matriz. Los campos de aplicación de la presente invención son aquellos que se relacionan con la caracterización funcional de muestras biológicas y la producción de bienes útiles para dicha caracterización. Son campos generales de aplicación las siguientes áreas: Biología, Bioquímica, Genética, Medicina, Farmacia, Veterinaria, Ingeniería agronómica, entre otros.



ES 2 304 814 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método para el ensayo de la expresión del genoma de una muestra biológica y kit para su realización.

### 5 Objeto de la invención

El objeto de la presente invención consiste en un método y un conjunto de útiles para el ensayo de la distribución intragénica de las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo el genoma de manera efectiva. El método aplica técnicas de localización genómica de las RNA polimerasas, basadas en procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos, y las extiende a escala multigénica mediante el diseño de matrices de ácidos nucleicos (DNA arrays) donde cada gen está representado al menos por una sonda de la zona inicial (5') de la unidad transcripcional y por otra situada en la zona final (3'). La relación de intensidades de hibridación entre la sonda 5' y la 3' proporciona un parámetro indicativo de la distribución intragénica de polimerasas, que puede ser detectado simultáneamente en todos los genes representados en la matriz.

15 La localización de las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo en la fase de elongación puede realizarse mediante run-on nuclear, es decir, mediante el marcaje *in situ* del RNA transcrito por polimerasas ya situadas en la fase de elongación transcripcional, tanto en células permeabilizadas como en núcleos aislados. Alternativamente, la localización de las polimerasas puede conseguirse mediante técnicas de precipitación selectiva de los fragmentos de DNA en los que se encuentran localizadas las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo de manera efectiva.

Mediante la presente invención es posible obtener una medida simultánea de la distribución intragénica de las RNA polimerasas que se encuentren transcribiendo los genes representados en la matriz.

### 25 Campo de aplicación

Los campos de aplicación de la presente invención son aquellos que se relacionan con la caracterización funcional de muestras biológicas y la producción de bienes útiles para dicha caracterización. Son campos generales de aplicación las siguientes áreas: Biología, Bioquímica, Genética, Medicina, Farmacia, Veterinaria, Ingeniería agronómica, y de forma más específica campos como:

Diagnóstico molecular

Detección y cuantificación de la expresión génica

35 Farmacogenómica

Diseño de drogas

40 Mejora genética

La presente invención sería asimismo de aplicación en todos aquellos campos donde sea de utilidad el conocimiento de la distribución intragénica de las RNA polimerasas en un genoma.

### 45 Estado de la técnica

La actividad transcripcional de un gen puede ser estudiada de diversas formas. La más extendida de todas es la cuantificación de los niveles estacionarios de RNA mensajero mediante procedimientos de northern blot, hibridación *in situ*, protección frente a nucleasas y otros basados en técnicas de hibridación entre los RNA presentes en la muestra y una sonda específica. Si bien estos procedimientos son una buena aproximación para la medida de la expresión génica, no reflejan directamente la actividad transcripcional, ya que el nivel de RNA mensajero medido no sólo es función de la actividad transcripcional sino también del procesamiento del RNA y de su estabilidad.

La actividad transcripcional de un gen es también estudiada con frecuencia mediante la construcción de unidades transcripcionales quiméricas que fusionan las regiones promotoras y reguladoras de la transcripción del gen estudiado con la región codificante de un gen indicador que expresa una proteína fácilmente cuantificable. Este procedimiento permite comparar la actividad transcripcional de distintos genes en el nivel de su iniciación, siempre que se mantengan secuencias comunes para el procesamiento de los ARN mensajeros y para su traducción, pero excluye la influencia que la región transcrita del gen estudiado ejerce sobre la actividad transcripcional en sus etapas de elongación y terminación. Este procedimiento es asimismo difícilmente aplicable a escala genómica.

Una alternativa eficiente para medir directamente la actividad transcripcional es el procedimiento de run-on nuclear, que permite medir la densidad de RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo el gen en un momento concreto (Figura 1).

65 Este procedimiento se basa en la capacidad que conservan las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo para continuar la transcripción de dicho gen en condiciones en las que se destruye la integridad celular por permeabilización o aislamiento de núcleos. Una vez que una RNA polimerasa supera la fase de iniciación de la transcripción

en la región promotora de un gen y ha entrado en una fase de elongación competente, conserva su capacidad de transcribir aun en condiciones donde nuevas polimerasas son incapaces de iniciar la transcripción. La permeabilización de una célula o el aislamiento de su núcleo implica una parada de las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo debido a la ausencia de nucleótidos-trifosfato (NTPs). La presencia de detergentes suaves como el sarcosil (N-laurilsarcosina sódica), que puede emplearse a su vez como agente permeabilizante, impide la formación de complejos de inicio de la transcripción. Si en esas condiciones se suministra una concentración adecuada de NTPs las RNA polimerasas continúan elongando en el punto donde estaban detenidas. La presencia de sarcosil, en concentraciones tan altas como 0,6%, no inhibe la elongación de la transcripción. Los procedimientos de run-on nuclear, descritos originalmente en 1974 (véase Gariglio, Buss and Green, FEBS Lett 44, p. 330-333) aprovechan esa circunstancia para marcar el RNA transcrito incorporando UTP marcado radiactivamente, normalmente con  $^{32}\text{P}$  o  $^{33}\text{P}$  en posición  $\alpha$ . El RNA así marcado es un indicador directo del número de polimerasas que se encontraban transcribiendo ese gen en una población de células y de la posición donde esas RNA polimerasas se localizaban en el momento de la permeabilización o el aislamiento nuclear. Para cuantificar la cantidad de RNA marcado correspondiente a un determinado gen debe recurrirse a procedimientos de hibridación con sondas frías inmovilizadas en un soporte sólido. Si se usan varias sondas para cada gen, correspondientes a diferentes regiones del mismo, y se somete al RNA marcado a un álcali en condiciones controladas para lograr su fraccionamiento parcial, se consigue identificar la distribución de las RNA polimerasas que se encontraban transcribiendo el gen en el momento de la permeabilización o el aislamiento nuclear. Para una descripción detallada de los procedimientos de run-on nuclear véase Hirayoshi and Lis, *Methods in Enzymology*, 304, p. 351-362 (1999).

Un procedimiento alternativo al run-on nuclear para medir el número de polimerasas que se encuentran transcribiendo un gen y su distribución a lo largo de la unidad transcripcional consiste en la inmunoprecipitación de cromatina utilizando anticuerpos que reconocen alguna de las subunidades de la RNA polimerasa (Figura 2). La radiación ultravioleta o agentes entrecruzadores como el formaldehído pueden lograr la formación de enlaces covalentes entre la RNA polimerasa y el DNA que se encuentran transcribiendo. La posterior precipitación selectiva de estos complejos RNA polimerasa-DNA permite localizar las regiones donde se encontraban unidas las polimerasas y cuantificar la densidad de estas en genes determinados. Para mejor comprender los procedimientos de inmunoprecipitación de cromatina véase por ejemplo Orlando y Paro, *Cell*, 75, p. 1187-1198 (1993). La inmunoprecipitación de complejos RNA polimerasa-DNA no requiere la permeabilización de células o el aislamiento de núcleos con carácter previo al entrecruzamiento y permite por tanto reflejar la distribución de RNA polimerasas sin las interferencias que estos procedimientos de rotura de la integridad celular puedan causar. Sin embargo, la utilización de esta técnica para la cuantificación de las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo una región del genoma adolece de que no discrimina entre aquellas RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo efectivamente, en fase de elongación productiva, de aquellas otras que están iniciando la transcripción o se encuentran bloqueadas y no son por tanto competentes para la transcripción. En este sentido la técnica de run-on nuclear es mucho más precisa.

La visión más simple y predominante de la fase de elongación transcripcional asume que una vez que una RNA polimerasa inicia la transcripción y adquiere competencia para elongar, su tasa de elongación es constante. Numerosas publicaciones sin embargo han puesto de manifiesto que esta no es la situación general y que la distribución de RNA polimerasas en un gen dado no es homogénea. Es conocido que al menos un cierto número de genes presentan de forma constante RNA polimerasas competentes para elongar en la región del gen adyacente al sitio de inicio de la transcripción, incluso en condiciones en las que operan mecanismos que impiden la completa transcripción del gen. Véase por ejemplo Bentley and Groudine, *Nature* 321, p. 702-706 (1986) y Rougvie and Lis, *Cell* 54, p. 795-804 (1988). De forma aún más general, aquellos genes que están siendo expresados de manera efectiva, mantienen una mayor densidad de RNA polimerasas en fase de elongación en su región adyacente al inicio de la transcripción como consecuencia de mecanismos de control de la calidad del transcrito que operan en ese nivel. Véase a este respecto Morillon *et al*, *Science* 300, p. 492-495 (2003). En consecuencia, la distribución intragénica de RNA polimerasas es algo que puede diferenciar unas unidades transcripcionales de otras (Figura 3). El cociente entre las RNA polimerasas situadas en la región inmediatamente anterior al término de la transcripción (región 3') y las situadas en la región adyacente al inicio de la transcripción (región 5') es un parámetro que permite estimar la distribución intragénica de RNA polimerasas. Un bajo cociente 3'/5' indica una acumulación de RNA polimerasas en la región 5', lo que puede ser consecuencia de mecanismos de represión de la expresión génica que operan en ese nivel o de fenómenos de interferencia con la elongación transcripcional y/o de los procesos asociados a ésta. Una diferencia del cociente 3'/5' de un determinado gen entre, por ejemplo, dos condiciones fisiológicas o dos tejidos pone de manifiesto una relación directa o indirecta entre la distribución de RNA polimerasas en dicho gen y la variable que diferencia a ambas muestras.

El ensayo de la expresión de un gen aislado proporciona información valiosa sobre dicho gen pero no suministra una información generalizada sobre la expresión del genoma, ya que la expresión de cada gen responde a mecanismos muy específicos que integran las señales regulatorias que lo controlan. La disponibilidad de matrices (arrays) de sondas específicas para el conjunto de los genes que conforman el genoma, o al menos para un amplio subconjunto de los mismos, permite el análisis simultáneo de la expresión de todos los genes representados en la matriz.

Las matrices de genes (gene-arrays) han sido utilizadas para investigar diversos estadios de la expresión génica. La versión más clásica de los métodos de análisis de la expresión génica basados en matrices de genes utilizan procedimientos de marcaje de los RNA mensajeros y su posterior hibridación con la matriz, siguiendo métodos análogos a los de la hibridación northern. Buenos ejemplos de ello son las patentes US2003157529-WO03050312-EP1453973-AU2002346717 de Gingeras y otras afines registradas por Affymetrix Inc. Con este método se consigue una medida

de los niveles estacionarios de RNA en la célula en el momento de la toma de la muestra, siempre en términos relativos con los niveles presentes en otra muestra de referencia.

Este tipo de procedimientos, cuando se aplica a muestras procedentes de enfermos, permite realizar diagnósticos de las patologías presentes en el paciente. Su utilización ha avanzado de forma importante en el campo de la anatomía patológica. Sirva como ejemplo el método de clasificación de gliomas descrito en las patentes AU2003225851-WO03078603-US2004053277 de Dougherty *et al.*

En algunas patentes registradas las matrices están formadas por regiones del genoma que se corresponden con elementos singulares de los genes representados en la matriz. Por ejemplo en las patentes WO0157251-AU200133114-GB2373500-EP1290217 de Hanzel *et al.* cada sonda presente en la matriz se corresponde con un exón del genoma. De forma similar, en las patentes US6716579-WO0077257-AU200054766-EP1185701 de Baidya *et al.* las sondas son complementarias a las regiones no traducidas de RNA mensajeros en posición 3'.

En todos los métodos anteriores los patrones de expresión génica obtenidos reflejan los niveles de RNA mensajero presentes en las células en el momento de obtención de la muestra. Como se ha discutido *supra*, dichos niveles sólo reflejan parcialmente la actividad transcripcional del genoma, al existir fenómenos no transcripcionales, como la degradación de RNA, que afectan a su abundancia. Las matrices de genes permiten sin embargo la medida directa de las tasas transcripcionales siempre que se utilicen procedimientos de marcaje de los RNAs durante la propia transcripción de los genes por las RNA polimerasas, es decir, en caso de que se acoplen procedimientos de run-on nuclear y análisis genómico por matrices de genes. Este es el caso de la patente US6617112 de Beals, cuyo método permite cuantificar las tasas transcripcionales de los genes representados en el array, así como, mediante comparación con los niveles estacionarios de RNA mensajeros, calcular las vidas medias de los RNA transcritos a partir de dichos genes. Un método similar es el descrito por García-Martínez *et al.*, Mol Cell 15, p. 303-313 (2004).

Con las salvedades antes descritas, la técnica de run-on puede ser sustituida por la inmunoprecipitación de cromatina mediante anticuerpos que inmunoprecipitan RNA polimerasas. Si se combina esta técnica de inmunoprecipitación con la hibridación del DNA precipitado frente a sondas inmovilizadas en una matriz, puede conseguirse asimismo obtener un patrón de la actividad transcripcional del genoma. Véase e este respecto Sandoval *et al.* Nucleic Acids Res 32, e82 (2004). La generalidad de los procedimientos de medida de la expresión génica sobre matrices de genes descritos anteriormente implican la comparación de la muestra problema con una muestra de referencia. Alternativamente, otros métodos reivindicados en patentes se basan en la comparación de varias medidas realizadas sobre una misma matriz. Sirvan como ejemplo Bao *et al.* (US2001018183) que describe un método para la medida simultánea de expresión génica y anomalías genómicas, y Shi and Huang (WO03087774) que presentan métodos para medir sobre una misma matriz de islas CpG la expresión génica, la metilación del DNA y la acetilación de histonas. En estos casos, el resultado se obtiene tras hibridar con distintas poblaciones de ácidos nucleicos, aportando cada una de ellas una información biológica específica.

### Explicación de la invención

La presente invención ofrece un método para obtener información precisa sobre el estado transcripcional del genoma al permitir una medida de la distribución de RNA polimerasas en cada uno de los genes representados en una matriz.

El método implica la obtención de una población de ácidos nucleicos marcados a partir de la muestra que reflejan directamente la distribución de RNA polimerasas a lo largo de cada gen (RNA marcado *in situ* por run-on nuclear o DNA inmunoprecipitado con anticuerpos anti-RNA polimerasa) y su hibridación con una matriz de sondas de ácidos nucleicos que se corresponden con las regiones de cada gen situadas tras el inicio de la transcripción (región 5') y antes de la terminación de la transcripción (región 3') (Figura 4). Los cocientes de 3'/5' de las hibridaciones proporciona una medida de distribución intragénica de las RNA polimerasas. La medida simultánea de los cocientes 3'/5' de RNA polimerasas de todos los genes representados en la matriz permite obtener una nueva visión del estado de expresión del genoma, que complementa las perspectivas existentes en genómica funcional.

A diferencia de los procedimientos de análisis transcripcional descritos en el estado de la técnica, el cociente 3'/5' es un parámetro que se obtiene aisladamente para cada muestra, sin necesidad de comparar con una muestra de referencia. Los valores del cociente 3'/5' obtenidos para una muestra dada son a su vez comparables con los obtenidos para otras muestras.

El cociente 3'/5' implica la comparación de dos medidas (los valores de hibridación para las sondas 3' y 5' de cada gen), pero ambas son obtenidas simultáneamente en una misma hibridación. Adicionalmente es necesario un procedimiento de hibridación con DNA genómico. Esta segunda hibridación sin embargo no aporta información biológica sobre la muestra y sirve únicamente para normalizar las cantidades de sonda presentes en la matriz. De hecho, en caso de reutilización de la matriz para nuevas medidas de muestras diferentes, es innecesario proceder a una nueva hibridación con DNA genómico.

La matriz de ácidos nucleicos contiene una pluralidad de elementos plurinucleotídicos que actúan como sonda (entre 100 y 1000000 para permitir estimar suficientemente el estado transcripcional del genoma) inmovilizados sobre un soporte sólido y accesibles, que pueden ser oligonucleótidos de al menos 20 monómeros o fragmentos de polinu-

## ES 2 304 814 B1

cleótidos, mono o bicatenarios, de mayor longitud. Los elementos plurinucleotídicos inmovilizados pueden ser DNA, RNA o bien ácidos nucleicos peptídicos (PNA); estos últimos permiten hibridaciones estables con sondas más cortas. En todos los casos cada gen está representado en la matriz por al menos un fragmento correspondiente a su región 5' y otro correspondiente a su región 3'. En el caso de genes eucarióticos divididos por intrones, esto puede corresponderse con regiones situadas en el primer y último exón respectivamente.

El método de marcaje de las poblaciones de ácidos nucleicos que se manipulan puede ser radiactivo. El uridín trifosfato marcado con  $^{32}\text{P}$  o  $^{33}\text{P}$  en su fosfato alfa es la posibilidad más sencilla de incorporar selectivamente un marcaje radiactivo al RNA naciente en procedimientos de run-on nuclear. Alternativamente el uridín trifosfato puede ser marcado con un grupo fluorescente, con un grupo químico como la digoxigenina, que sea reconocido como antígeno mediante un método inmunológico o sea utilizado como sustrato por una enzima; alternativamente el nucleótido puede estar modificado con un grupo reactivo como el aminoalilo, que permita su marcaje radiactivo o fluorescente *in vitro* tras su extracción.

El marcaje del DNA genómico, necesario para normalizar las cantidades de sonda inmovilizadas en la matriz de genes, puede ser marcado mediante análogos procedimientos radiactivos, fluorescentes, inmunoquímicos o bioquímicos.

En caso de que se utilice el mismo tipo de marcaje para las dos hibridaciones -tanto la de la población de ácidos nucleicos indicadora de la actividad transcripcional como la de DNA genómico para normalizar las cantidades de sonda- ambas hibridaciones han de realizarse secuencialmente, procediendo a la deshibridación de la primera población antes de realizar la segunda hibridación. Por contra, si el método de marcaje utilizado para cada población es diferente, ambas hibridaciones pueden realizarse simultáneamente, permitiendo una mayor rapidez en la obtención de los resultados finales.

El procedimiento de localización de las RNA polimerasas mediante run-on nuclear implica la accesibilidad a la cromatina por parte de los nucleótidos, marcados y no marcados, empleados como sustratos en la reacción de transcripción (Figura 1). En el caso de que se proceda a aislar núcleos celulares o cromatina transcripcionalmente activa, la accesibilidad de los nucleótidos está garantizada. Si por el contrario se realiza el método con células enteras, es necesario proceder a permeabilizar la membrana plasmática de las células para permitir el acceso de los nucleótidos empleados como sustratos. Este efecto permeabilizante puede conseguirse con detergentes suaves a baja concentración tales como el sarcosil. Este detergente consigue además evitar la formación de complejos de preiniciación de la transcripción, impidiendo por tanto que nuevas RNA polimerasas inicien la transcripción durante el ensayo y distorsionen el resultado. Otra alternativa para permeabilizar las células es el uso de agentes permeabilizadores no detergentes como la nistatina. En este caso, es necesario añadir algún agente que impida la iniciación de la transcripción, como por ejemplo sarcosil a concentraciones insuficientes para una permeabilización óptima pero adecuadas para impedir la iniciación de la transcripción.

La localización de las RNA polimerasas en el genoma, en lugar de emplear procedimientos de run-on nuclear, puede realizarse mediante la inmunoprecipitación de fragmentos de DNA unidos a las RNA polimerasas o a factores de elongación asociados a éstas (Figura 2). En este caso, ha de emplearse un anticuerpo que reconozca específicamente alguna subunidad de las RNA polimerasas o de los factores de elongación asociados a éstas, o algún otro procedimiento de afinidad que permita aislar selectivamente éstas proteínas del resto de la cromatina. Una posibilidad factible es utilizar anticuerpos que reconocen la forma fosforilada del dominio carboxi-terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II de los eucariontes. La forma fosforilada de la RNA polimerasa II es la que adopta esta enzima cuando se encuentra en fase de elongación transcripcional, lo que permite distinguirla de las polimerasas que se encuentran en el complejo de preiniciación, aún sin fosforilar.

Las matrices de genes utilizadas en este método pueden ser muy variadas y su naturaleza no es un requerimiento rígido, aunque se ve influida por el procedimiento de marcaje de los ácidos nucleicos. En caso de que se utilicen procedimientos radiactivos de marcaje, están especialmente indicadas las matrices sobre filtros de nailon, normalmente conocidas como macroarrays. En estos casos la densidad de sondas por unidad de superficie no suele superar los 10 elementos por centímetro cuadrado. Si se utilizan por el contrario procedimientos de marcaje fluorescente, es posible el empleo de matrices de alta densidad (microarrays) donde se pueden alcanzar los 10000 elementos-sonda por centímetro cuadrado.

El método de análisis de la expresión génica aquí descrito es de aplicación a toda muestra biológica que contenga células transcripcionalmente competentes. Ello incluye cultivos microbianos, vegetales, animales, líneas celulares de dichas procedencias, muestras humanas. En este último caso, el método es de aplicación tanto a células sanguíneas como a otro tipo de tejidos, patológicos o no. En el caso de muestras procedentes de tejidos patológicos, como los procedentes de un tumor, es especialmente relevante la comparación de los resultados obtenidos con los procedentes de tejidos sanos análogos, lo que puede permitir la realización de un diagnóstico.

La realización del método aquí descrito implica la utilización de diversos materiales:

En todos los casos es necesaria una matriz de ácidos nucleicos con elementos sonda correspondientes a las regiones 5' y 3' de diferentes unidades transcripcionales de un genoma.

## ES 2 304 814 B1

También se requiere una forma marcada de un desoxinucleótido-trifosfato o alguno de sus derivados, para el marcaje del DNA genómico con el que normalizar las cantidades de las sondas inmovilizadas en la matriz.

5 Si se emplean procedimientos de run-on nuclear para localizar las RNA polimerasas que se encuentran transcribiendo el genoma, y no se recurre al aislamiento de núcleos celulares, se necesita una sustancia permeabilizadora de las células de la muestra biológica, como el sarcosil o la nistatina.

10 En todos los casos de run-on nuclear se requiere una sustancia inhibidora de la iniciación de la transcripción, como el sarcosil y una forma marcada de un ribonucleótido, preferentemente el uridín-trifosfato (UTP).

15 Si se utiliza un procedimiento de precipitación del DNA asociado a las RNA polimerasas como forma de localizar la posición de las mismas en el genoma, es necesario un anticuerpo que reconozca alguna de las subunidades de las RNA polimerasas o de factores auxiliares de elongación de la transcripción que acompañan a las RNA polimerasas durante la transcripción, o en su defecto otro elemento que permita su purificación selectiva.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1

20 *Experimento de run-on nuclear*

A: La adición de sarcosil a las células impide a la polimerasa iniciar nuevas rondas de transcripción, permitiendo sin embargo a las polimerasas elongantes continuar transcribiendo.

25 B: La incorporación de UTP marcado por tanto se producirá solamente en aquellos lugares donde se halle una polimerasa elongante.

30 C: Se procede a la extracción del RNA marcado y a su fragmentación, para que el marcaje tenga la mayor resolución posible

D: El RNA marcado se hibrida con la matriz de ácidos nucleicos.

Figura 2

35 *Experimento de inmunoprecipitación de cromatina*

A: Las proteínas que están en contacto con el DNA se unen covalentemente a este gracias a la adición de una molécula capaz de reaccionar con ellos, como el formaldehído.

40 B: se procede a la extracción del DNA y a su fragmentación mediante sonicación.

45 C: La proteína de interés, en este caso la RNA polimerasa, es purificada mediante un procedimiento de afinidad, en este caso, precipitación mediante anticuerpos específicos. La proteína purificada lleva unidos aquellos fragmentos de DNA en los que se encontrase en el momento de producirse la unión covalente. Se revierte esta unión y se purifica el DNA.

D: El DNA se marca y se hibrida con la matriz de ácidos nucleicos.

Figura 3

50 *Distribución diferencial de RNA polimerasas en el genoma*

55 Las RNA polimerasas no han de encontrarse distribuidas uniformemente a lo largo de las unidades transcripcionales del genoma. Como se representa en esta figura la distribución de polimerasas dentro de cada unidad transcripcional puede variar ampliamente, así, en las unidades transcripcionales 1, 3, 5 y 6 las polimerasas son más abundantes en el extremo inicial (3') de la unidad, en las unidades 2 y 4 la densidad de polimerasas es mayor en el extremo final (5'), mientras que en las unidades 7 y 8 la distribución es más uniforme en toda la longitud de la unidad transcripcional.

Figura 4

60 *Sondas inmovilizadas sobre una membrana para el ensayo de la distribución de RNA polimerasas en el genoma*

65 Se han obtenido sondas para los extremos 5' y 3' de 76 genes (open reading frames) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las sondas fueron obtenidas por PCR y se fijaron por duplicado a membranas de nylon en la disposición que se muestra, incluyendo sondas correspondientes a DNA genómico de *S. cerevisiae* como control positivo y de *Escherichia coli* como control negativo. Se muestra una hibridación de una de las membranas con DNA genómico de *S. cerevisiae* marcado con a [<sup>33</sup>P]-dCTP.

Figura 5

*Resultados de la aplicación del procedimiento al ensayo de la distribución de RNA polimerasas en 76 genes de la levadura Saccharomyces cerevisiae*

Se muestra una imagen de una hibridación de un run-on de una estirpe silvestre BY4741 de *S. cerevisiae*. La media de resultados obtenidos para al menos tres experimentos independientes se muestra en logaritmo en base 2 mediante un código de colores. Como puede apreciarse la distribución de polimerasas varía ampliamente entre unas unidades transcripcionales y otras.

Figura 6

*Resultados de la aplicación del procedimiento a la detección del efecto de una mutación sobre la distribución de RNA polimerasas en 76 genes de la levadura Saccharomyces cerevisiae*

Se muestra una imagen de una hibridación de un run-on de una estirpe silvestre BY4741 de *S. cerevisiae* y un mutante spt4L. La media de resultados obtenidos para al menos tres experimentos independientes se muestra en logaritmo en base 2 mediante un código de colores. Puede observarse cómo el valor para el cociente 3'/5' es menor en la mayoría de los casos para el mutante, indicando una menor capacidad de la polimerasa para alcanzar el final de la unidad transcripcional.

El histograma muestra la distribución de cocientes 3'/5' para el silvestre y el mutante, y las medias de estos cocientes para ambos en forma de diamantes en el eje superior. Los recuadros resaltan algunos genes para los que las diferencias de señal entre las sondas 3' y 5' para el mutante y el silvestre pueden apreciarse a simple vista.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención esta relacionada con la detección de la distribución intragénica de las RNA polimerasa II y comprende:

1. Una matriz compuesta por un soporte sólido en el que estén depositadas de forma ordenada sondas de ácidos nucleicos correspondientes a al menos dos fragmentos, inicial y final, de cada una de una pluralidad de unidades transcripcionales de uno o varios organismos. Este soporte sólido de la matriz puede ser una membrana de nylon, nitrocelulosa, o cualquier otro polímero sintético, un portaobjetos de vidrio, o cualquier otro soporte que permita la deposición de ácidos nucleicos de forma ordenada en su superficie. Las sondas de ácidos nucleicos pueden estar compuestas por fragmentos de DNA o RNA de cadena doble o sencilla, modificados o no mediante grupos reactivos, con una longitud comprendida entre 20 y 1000 nucleótidos. Estas sondas pueden ser obtenidas por diversos procedimientos, como por ejemplo, pero no exclusivamente, PCR, corte por encimas de restricción, síntesis *in vitro*, síntesis y purificación a partir de organismos biológicos. La deposición de las sondas sobre el soporte sólido se realiza mediante alguna de las tecnologías existentes de fabricación de matrices de ácidos nucleicos, o bien manualmente. La unión de las sondas con el soporte sólido se producirá mediante enlace covalente entre los grupos reactivos presentes en los fragmentos de ácidos nucleicos, modificados o no, y los grupos reactivos presentes en el soporte, o bien por adsorción.

2. Un procedimiento para marcar la localización de las RNA polimerasa II en el DNA. Preferentemente estos procedimientos serán:

a. La técnica de run-on, que permite añadir nucleótidos marcados al RNA naciente por las polimerasas elongantes, pero no de polimerasas que aun no han iniciado la elongación o que se encuentran arrestadas (figura 2). Para poder realizar esta técnica es necesario permeabilizar las células para permitir que la molécula marcada penetre en la célula. Esta permeabilización se realiza mediante cualquier detergente, preferentemente el sarcosil, capaz de inhibir la iniciación de la transcripción pero no la elongación de la misma, o mediante cualquier agente biológico que sea capaz de romper la integridad de la membrana plasmática, como la nistatina. El paso de la permeabilización puede ser sustituido por el aislamiento de núcleos celulares o de cromatina transcripcionalmente activa. El marcaje se puede realizar mediante nucleótidos marcados radiactivamente, derivados fluorescentes de ribonucleótidos, un derivado de un ribonucleótido al que posteriormente se une *in vitro* una molécula radiactiva o fluorescente, o un derivado de un ribonucleótido que posteriormente se detecta mediante un procedimiento inmunológico o enzimático.

b. La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (figura 3). Esta técnica consiste en la unión covalente de las proteínas que se encuentren en contacto con el DNA a éste, y la posterior precipitación selectiva de la proteína de interés unida a los fragmentos de DNA en los que esta proteína se encuentra localizada. La unión de las proteínas al DNA se realiza mediante, un agente químico como por ejemplo el formaldehído, o bien mediante un pulso de luz ultravioleta. Una vez unidas covalentemente DNA y proteínas, se procede a la fragmentación del DNA mediante sonicación, y posteriormente se precipita selectivamente mediante anticuerpos, u otros procesos de afinidad, la proteína de interés. Se revierte la unión covalente entre DNA y proteínas, y se purifica el DNA. Este DNA se marca mediante nucleótidos radiactivos, derivados fluorescen-

## ES 2 304 814 B1

tes de ribonucleótidos, un derivado de un ribonucleótido al que posteriormente se une *in vitro* una molécula radiactiva o fluorescente, o un derivado de un ribonucleótido que posteriormente se detecta mediante un procedimiento inmunológico o enzimático.

5 3. Un procedimiento para poner en contacto el RNA o DNA marcado con el soporte que contiene las sondas. Preferentemente se utilizarán procedimientos convencionales de hibridación de ácidos nucleicos, descritos ampliamente en la literatura.

10 4. Un procedimiento para cuantificar la señal. Este procedimiento dependerá de la forma de marcaje de las poblaciones de ácidos nucleicos.

15 5. Un procedimiento para normalizar la cantidad de señal obtenida en cada hibridación. El objetivo de esta normalización es corregir las posibles desviaciones en los resultados de la hibridación de la primera población de ácidos nucleicos debido a las diferentes cantidades de sonda depositadas en cada punto de la matriz, o de la distinta eficiencia de hibridación de cada una de las sondas. Para ello, tras proceder a la deshibridación de la matriz nucleicos con la primera población de ácidos nucleicos marcados, se realiza una segunda hibridación de la matriz de ácidos nucleicos con una población de DNA genómico derivado de la muestra biológica, y marcada mediante nucleótidos radiactivos, derivados fluorescentes de ribonucleótidos, un derivado de un ribonucleótido al que posteriormente se une *in vitro* una molécula radiactiva o fluorescente, o un derivado de un ribonucleótido que posteriormente se detecta mediante un procedimiento inmunológico o enzimático. La señal obtenida para esta segunda hibridación es usada como factor de corrección sobre la intensidad de la señal obtenida en a primera hibridación. Alternativamente, las dos hibridaciones pueden realizarse simultáneamente siempre que el procedimiento de detección permita distinguir entre las dos poblaciones de ácidos nucleicos, al estar marcadas de forma diferente.

25 Se calcula la relación de polimerasas entre el final (3') y el principio (5') de cada una de las unidades transcripcionales presentes en la membrana. Esta relación permite conocer la distribución de las RNA polimerasas dentro de esa unidad transcripcional (figura 1)

### Modo de realización de la invención

30 Ejemplo 1

El presente ejemplo muestra la capacidad de la técnica descrita para determinar simultáneamente la distribución intragénica de RNA polimerasa II un amplio conjunto de unidades transcripcionales distintas de un organismo eucariote. Para realizar el ejemplo se realizó un ensayo de run-on sobre cultivos de una estirpe silvestre BY4741 de la levadura *S. cerevisiae* en condiciones de crecimiento exponencial en medio de cultivo rico (YPD). El resultado del experimento de run-on se hibrida con membranas que portan sondas correspondientes a los extremos 5' y 3' de 76 genes de *S. cerevisiae*.

40 Fabricación de los macroarrays sobre membranas de Nylon cargadas positivamente:

Sondas de unas doscientas pares de bases de los extremos 5' y 3' de setenta y seis genes de levadura se obtuvieron mediante PCR. Estas sondas fueron fijadas a membranas de nylon cargadas positivamente mediante un robot *BioGRID* (*BioRobotics*). Como se muestra en la figura 4, cada una de las sondas fue depositada por duplicado en cada una de las membranas, y se incluyeron varios controles correspondientes a DNA genómico de *E. coli* como control negativo y de *S. cerevisiae* como control positivo.

Experimento de run-on:

50 a. se recogieron células de *S. cerevisiae* de un cultivo en medio YPD densidad óptica 0.5 mediante centrifugación.

b. se lavaron las células con TMN frío (10 mM tris HCl, pH 7,4, 100 mM Na Cl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se resuspendieron en 1ml de agua destilada fría.

55 c. Se añadió sarcosil hasta una concentración de 0,5% para permeabilizar las células, e inhibir la iniciación de la transcripción, y se incubó en hielo durante 20 minutos.

60 d. Se recogieron las células por centrifugación, eliminando todo el sobrenadante, y se resuspendieron en 150 µl de tampón de transcripción (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM ditiotreitól, 0,5 mM ATP, CTP y GTP, 100 µCi, α [<sup>33</sup>P]-UTP (3000 Ci/mmol) (NUCLIBER), 10 mM fosfocreatina y 1,2 mg/ml creatín kinasa).

e. Se permitió progresar la elongación de la transcripción incubando durante dos minutos a 30°C, de forma que la incorporación de la radiactividad ocurrió sólo en aquellos lugares donde se encontrara una polimerasa elongante.

65 f. Se detuvo la reacción de la elongación mediante la adición de 1 ml de TMN frío. Se centrifugó la muestra y se eliminó el sobrenadante con la radiactividad no incorporada



## ES 2 304 814 B1

g. Se procedió a la extracción del ARN celular mediante el procedimiento del fenol ácido caliente: Se resuspendieron las células en 400  $\mu$ l TES (Tris-HCl 20 mM, pH7.5, EDTA 20 mM pH8, SDS 1%) y 400  $\mu$ l fenol ácido. La muestra agitó vigorosamente y se incubó a 65°C durante una hora. Tras esta incubación la muestra se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 min. y la fase acuosa se trasvasó a un nuevo tubo de microcentrifuga conteniendo 400  $\mu$ l de fenol ácido.  
5 Se agitó vigorosamente, se incubó en hielo 5 min. y se centrifugó nuevamente a 13.000 r.p.m. durante 5 min. La fase acuosa se trasvasó a un nuevo tubo de microcentrifuga conteniendo 400  $\mu$ l de cloroformo. Se agitó vigorosamente, se incubó en hielo 5 min. y se centrifugó nuevamente a 13.000 r.p.m. durante 5 min. La fase acuosa se trasvasó a otro tubo de microcentrifuga conteniendo 1 ml de etanol 96° y 40  $\mu$ l de acetato sódico 3M, pH 5,5. Se precipitó el RNA al menos durante 4 h. a -20°C. Tras ello se centrifugó durante 15 min. a 13.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet de RNA con etanol 70°, se centrifugó 5 min a 13.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante. Finalmente se resuspendió en 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas.  
10

Marcaje de DNA genómico de *S. cerevisiae* BY4741:

15 1  $\mu$ g DNA se resuspendió en 35  $\mu$ l de agua destilada. Se incubó a 100°C durante 5 min. y se depositó en hielo, para producir la apertura del DNA. Se añadieron 5  $\mu$ l de una mezcla de dATP, dGTP y dTTP 0.5 M cada uno, 5  $\mu$ l de una mezcla de hexanucleótidos aleatorios (Amersham), 4  $\mu$ l de  $\alpha$  [<sup>33</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol) (NUCLIBER) y 1  $\mu$ l de polimerasa Klenow (2U/  $\mu$ l). Se incubó a 37°C durante 45 min. Se purificó la sonda marcada centrifugándola en una columna de sefadex G-50.  
20

Hibridación del RNA marcado con las membranas. Las membranas fueron prehibridadas con solución de prehibridación (Denhart 5X, SSC 5X, SDS 0,5%, tRNA 100  $\mu$ g/ml) a 65°C durante dos horas. El ARN procedente del experimento de run-on se fragmentó tratando con NaOH 0,01 M durante 5 min. en hielo, para obtener fragmentos de tamaño similar al de las sondas depositadas en la membrana, se neutralizó con HCl y se procedió a la hibridación del RNA marcado con las membranas, en solución de hibridación (Denhart 5X, SSC 5X, SDS 0,5%, tRNA 100  $\mu$ g/ml, RNA marcado), durante 48 horas a 65°C.  
25

Se lavaron las membranas para eliminar la radiactividad sobrante, una vez con 100 ml de solución de lavado 1 (2X SSC, 0,1% SDS) durante 20 min. a 65°C y dos veces con 100 ml de solución de lavado 2 (0,2X SSC, 0,1% SDS) durante 30 min. a 65°C.  
30

Se expusieron las membranas en un cassette FUJI BAS con una pantalla FUJI BAS IP screen durante 4 días, y se leyeron mediante un lector FUJI FLA3000.

35 Las membranas se deshibridaron con vertiendo sobre ellas tras veces 150 ml de solución de deshibridación (5 mM KPO<sub>3</sub>, 0,1% SDS) a 100°C y se volvieron a hibridar con el DNA genómico marcado, siguiendo el mismo protocolo de hibridación.

Se obtuvo la relación en la señal en las sondas 3' y 5' de cada una de las unidades transcripcionales representadas en la membrana, corregidas por el número de uracilos presentes en cada sonda, y por la señal de la hibridación con DNA genómico. De esta forma se consigue obtener un valor absoluto para la relación de polimerasas situadas en el extremo 3' y en el extremo 5' de cada una de las unidades transcripcionales para cada experimento. Este valor se representó en logaritmo en base dos.  
40

45 En la figura 5 se muestra la media de los resultados obtenidos para cada unidad transcripcional en al menos tres experimentos independientes. Como se aprecia, el cociente 3'/5' de distribución de polimerasas varía hasta por un factor de diez entre unas unidades transcripcionales y otras.

### Ejemplo 2

50 En este ejemplo se muestra la capacidad de la técnica descrita para detectar alteraciones transcripcionales en un amplio conjunto de unidades transcripcionales de un organismo eucarionte. Para realizar el ejemplo se realiza un ensayo de run-on sobre cultivos de dos estirpes de *S. cerevisiae*, una estirpe silvestre BY4741 y un mutante afectado en elongación transcripcional, *spt4* $\Delta$ . El experimento se realiza como en el ejemplo anterior.  
55

Los resultados se muestran en la figura 6. Puede apreciarse cómo la relación de polimerasas elongantes entre las sondas de los extremos 3' y 5' disminuye para la gran mayoría de las unidades transcripcionales, indicando que la mutación *spt4* $\Delta$  afecta severamente la distribución de RNA polimerasas dentro de un amplio número de genes.  
60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el ensayo de la expresión del genoma de una muestra biológica basado en la detección de la distribución intragénica de las RNAPolimerasas que se encuentran transcripcionalmente activas, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- a. Suministrar una matriz (array), o réplicas de la misma, formada por una pluralidad de elementos polinucleotídicos con capacidad para actuar como sondas inmovilizados en un soporte sólido, siendo todos los elementos sustancialmente complementarios a ácidos nucleicos indicativos de la expresión de un genoma bajo condiciones de hibridación preestablecidas, y donde la representación de cada una de las unidades transcripcionales del genoma presentes en la matriz está compuesta por un elemento cuya secuencia polinucleotídica se corresponde con la secuencia de la región transcrita situada tras el inicio de la transcripción (región 5') y por otro elemento cuya secuencia polinucleotídica se corresponde con la secuencia de la región transcrita situada antes de la terminación de la transcripción (región 3').
  - b. Suministrar al menos dos poblaciones de ácidos nucleicos marcadas:
    - i. Una población de RNA marcada *in situ* dentro de las células de la muestra biológica, gracias a la actividad de las RNA polimerasas que se encuentran transcripcionalmente activas en el genoma, en condiciones donde la iniciación de la transcripción ha sido inhibida.
    - ii. Una población de DNA genómico derivada de la muestra biológica y marcada
  - c. Poner en contacto la matriz de elementos con las dos poblaciones de ácidos nucleicos marcados, bajo condiciones de hibridación.
  - d. Detectar la presencia e intensidad de los marcadores correspondientes a los marcadores de cada población de ácidos nucleicos obtenidos a partir de la muestra biológica.
  - e. Calcular la proporción entre las RNA polimerasas activas transcripcionalmente localizadas en las regiones 5' y 3' de cada una de las unidades transcripcionales representadas en la matriz, a partir de la intensidad de RNA marcado *in situ* detectada en cada elemento de la matriz, normalizada según la intensidad de DNA genómico marcado detectada en el mismo elemento.
2. El método de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la representación de cada una de las unidades transcripcionales del genoma presentes en la matriz está compuesta al menos por un ácido nucleico mono- o bicatenario de entre 20 y 1000 nucleótidos de longitud cuya secuencia polinucleotídica se corresponde con los 1000 nucleótidos transcritos situados tras el inicio de la transcripción (región 5') y por otro ácido nucleico mono- o bicatenario de entre 20 y 1000 nucleótidos de longitud cuya secuencia polinucleotídica se corresponde con los 1000 nucleótidos transcritos situados antes de la terminación de la transcripción (región 3').
3. El método de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la representación de cada una de las unidades transcripcionales del genoma presentes en la matriz está compuesta por un ácido nucleico cuya secuencia polinucleotídica se corresponde con el extremo 5' del primer exón y por otro ácido nucleico cuya secuencia polinucleotídica se corresponde con el extremo 3' del último exón.
4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque
- a. las dos poblaciones de ácidos nucleicos se marcan con el mismo marcador,
  - b. tras la hibridación de la matriz con la población de RNA marcada *in situ* y la detección de la presencia e intensidad del marcador sobre la matriz, se deshibrida la matriz y se procede a hibridar la población de DNA genómico marcado.
5. El método de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque
- a. las dos poblaciones se marcan con diferente marcador
  - b. las dos poblaciones se hibridan simultáneamente con la matriz.
6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el RNA se marca *in situ* con un ribonucleótido, preferentemente uridin-trifosfato (UTP), marcado radiactivamente.
7. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el RNA se marca *in situ* con un derivado fluorescente de un ribonucleótido, preferentemente uridin-trifosfato (UTP).
8. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el RNA se marca *in situ* con un ribonucleótido, preferentemente uridin-trifosfato (UTP), modificado mediante la incorporación de un grupo aminoalilo, al que pos-

## ES 2 304 814 B1

teriormente se une *in vitro* una molécula radiactiva o fluorescente con capacidad para unirse covalentemente a dicho grupo.

5 9. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el RNA se marca *in situ* con un nucleótido, preferentemente uridin-trifosfato (UTP), modificado mediante la incorporación de un grupo químico, preferentemente digoxigenina, que posteriormente se detecta con un anticuerpo que reconoce específicamente como antígeno dicho grupo químico o mediante una enzima que lo usa como sustrato.

10 10. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el DNA genómico se marca radiactivamente.

11. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el DNA genómico se marca fluorescentemente.

15 12. El método de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el DNA genómico se marca con un nucleótido modificado cuya detección se realiza mediante un método inmunológico o enzimático.

20 13. El método de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la muestra biológica se permeabiliza para el marcaje *in situ* del RNA con un detergente, preferentemente sarcosil, capaz de inhibir la iniciación de la transcripción pero no la elongación de la misma.

14. El método de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la muestra biológica se permeabiliza para el marcaje *in situ* del RNA con cualquier agente químico o biológico, preferentemente nistatina, que rompa la integridad de la membrana plasmática.

25 15. El método de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque se sustituye el paso de permeabilización de la muestra por el aislamiento de núcleos celulares o cromatina transcripcionalmente activa.

30 16. El método de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque la matriz de ácidos nucleicos comprende entre 100 y 1000000 elementos-sonda inmovilizados sobre la superficie de un sustrato.

17. El método de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque la matriz de ácidos nucleicos comprende entre 4 y 10000 elementos-sonda por centímetro cuadrado.

35 18. El método de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque la matriz de ácidos nucleicos inmovilizados comprende al menos un ácido nucleico peptídico (PNA).

40 19. El método de las reivindicaciones 1 a 5, 10 a 13 y 16 a 18, **caracterizado** porque la población de RNA marcada *in situ* se sustituye por fragmentos de DNA genómico procedentes de un extracto de la muestra biológica precipitados mediante un sistema de afinidad, preferentemente un anticuerpo, que reconoce una subunidad de una RNA polimerasa o algunos de los factores de elongación transcripcional que acompañan a las RNA polimerasas durante la fase de elongación transcripcional, que son posteriormente marcados *in vitro*.

20. El método de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la muestra biológica es un cultivo microbiano.

45 21. El método de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la muestra biológica es una planta.

22. El método de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la muestra biológica es de procedencia animal.

23. El método de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la muestra biológica es de procedencia humana.

50 24. El método de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado** porque la muestra biológica es una línea celular.

25. El método de las reivindicaciones 1 a 19 y 23, **caracterizado** porque la muestra biológica son células sanguíneas.

55 26. El método de las reivindicaciones 1 a 19, 22 y 23, **caracterizado** porque la muestra biológica es un tumor o parte de él.

60 27. El método de las reivindicaciones 1 a 26, **caracterizado** porque el procedimiento se realiza con dos muestras biológicas diferentes, y se comparan los resultados obtenidos.

28. El método de la reivindicación 27, **caracterizado** porque una de las muestras biológicas es la problema y la otra es una referencia.

65 29. El método de la reivindicación 27, **caracterizado** porque las dos muestras biológicas proceden de un tejido sano y otro enfermo.

## ES 2 304 814 B1

30. Un kit diseñado para la realización del método de las reivindicaciones 1 a 29, que comprende todos o parte de los siguientes elementos:

- 5 a. Una matriz de ácidos nucleicos con elementos sonda correspondientes a las regiones 5' y 3' de diferentes unidades transcripcionales de un genoma, como la descrita en la reivindicación 1.
- b. Una sustancia permeabilizadora de las células de la muestra biológica, preferentemente el sarcosil o la nistatina.
- 10 c. Una sustancia inhibidora de la iniciación de la transcripción, preferentemente el sarcosil.
- d. Una forma marcada de un ribonucleótido, preferentemente el uridin-trifosfato (UTP).
- e. Una forma marcada de un desoxinucleótido-trifosfato o alguno de sus derivados, para el marcaje de DNA genómico.
- 15 f. Un elemento, preferentemente un anticuerpo, para la precipitación de RNA polimerasas o de factores auxiliares de elongación de la transcripción que acompañan a las RNA polimerasas durante la transcripción.

20

25

30

35

40

45

50

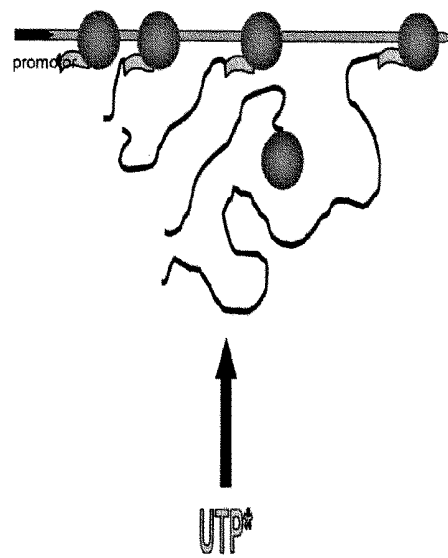
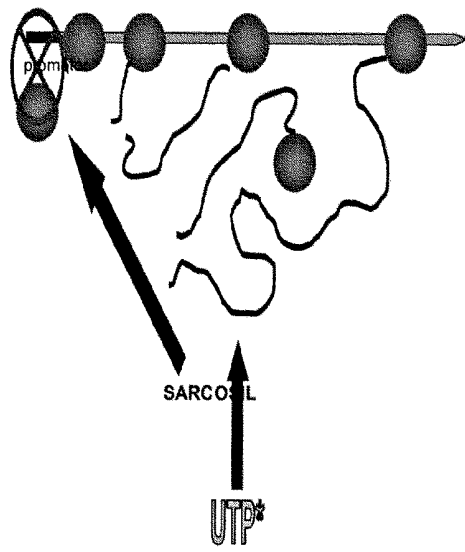
55

60

65

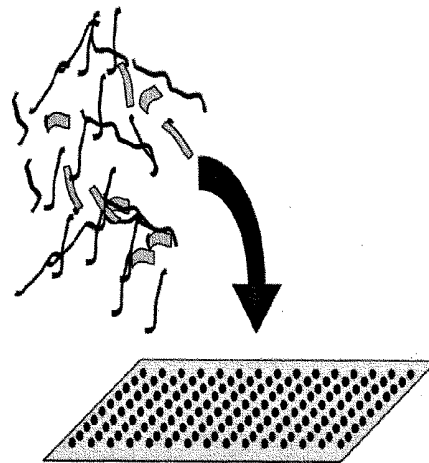
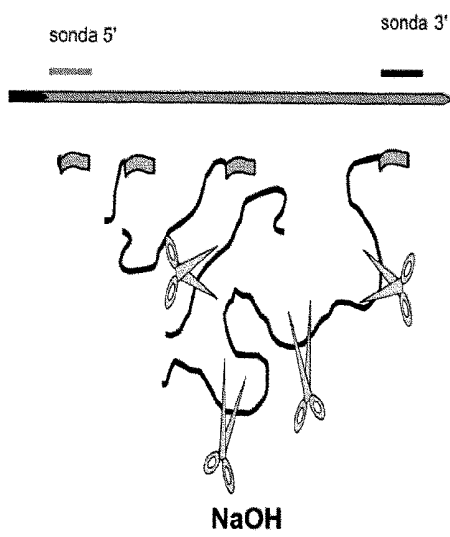
A

Figura 1 B



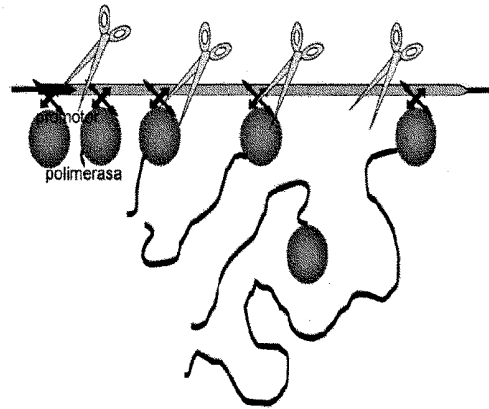
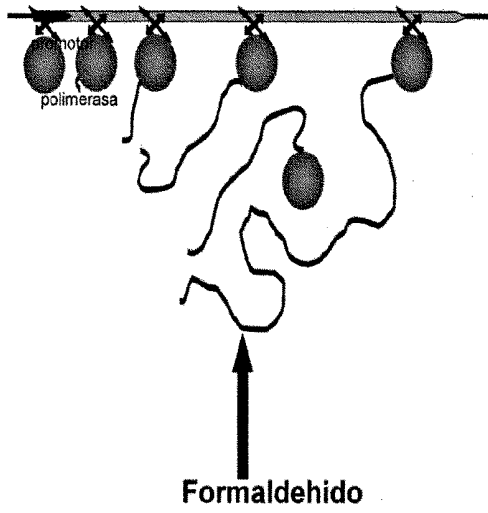
C

D



A

Figura 2 B



C

D

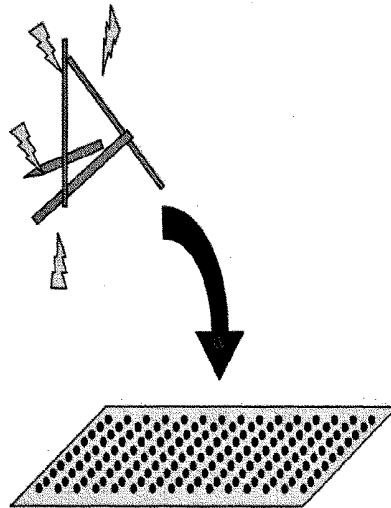
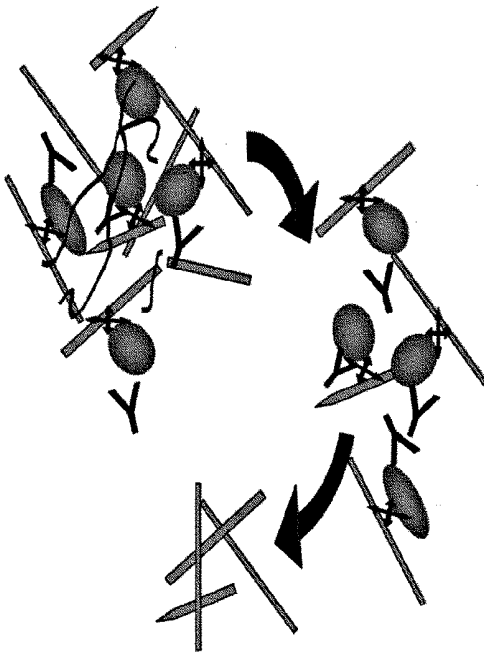


Figura 3

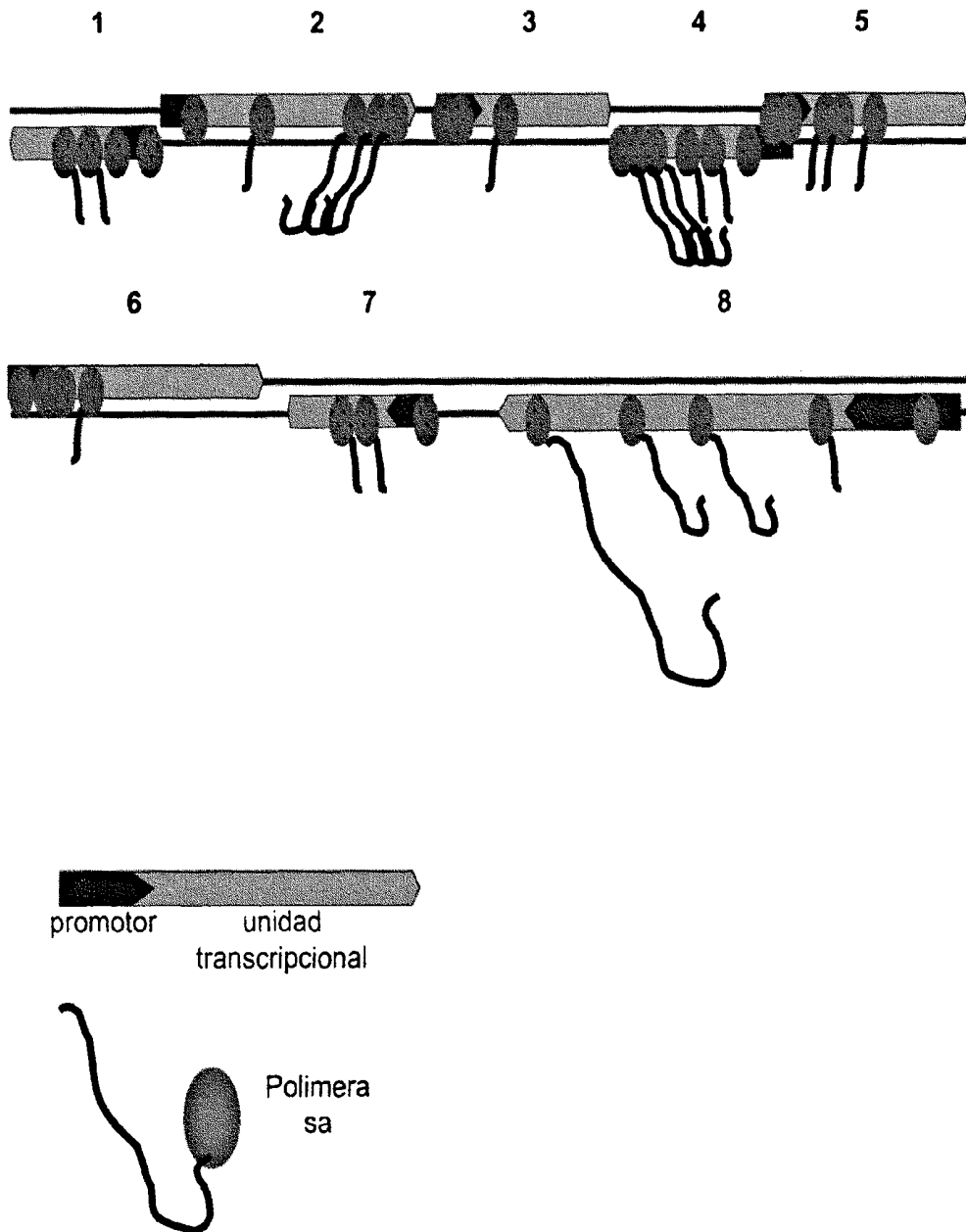


Figura 4

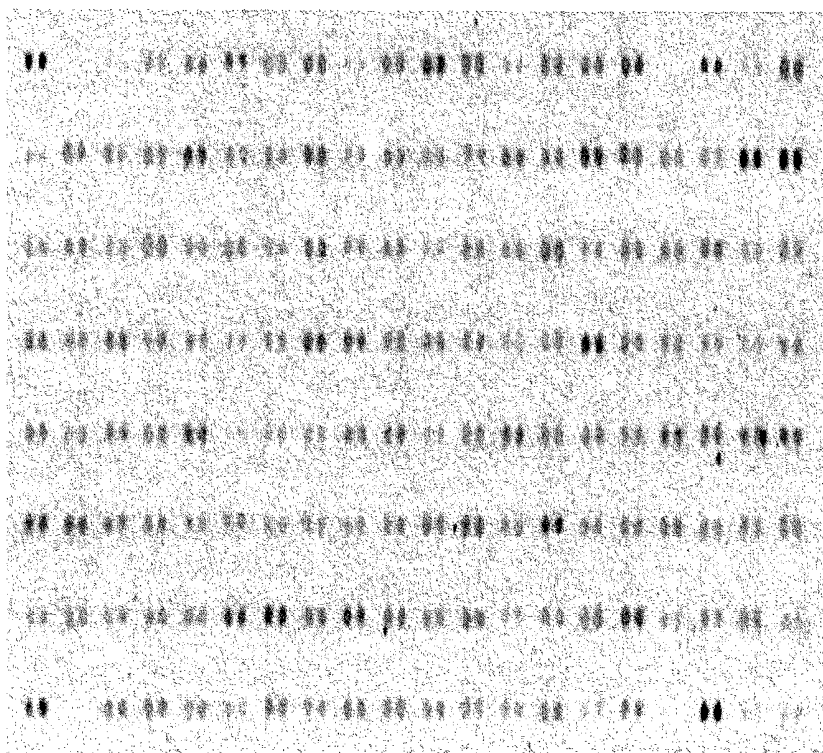
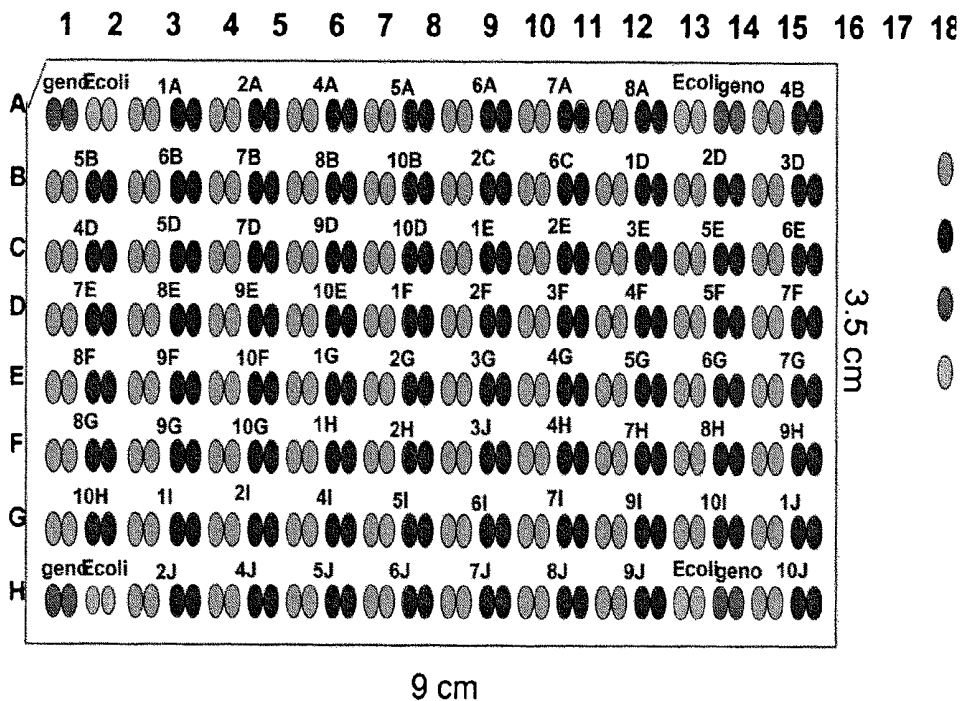




Figura 5

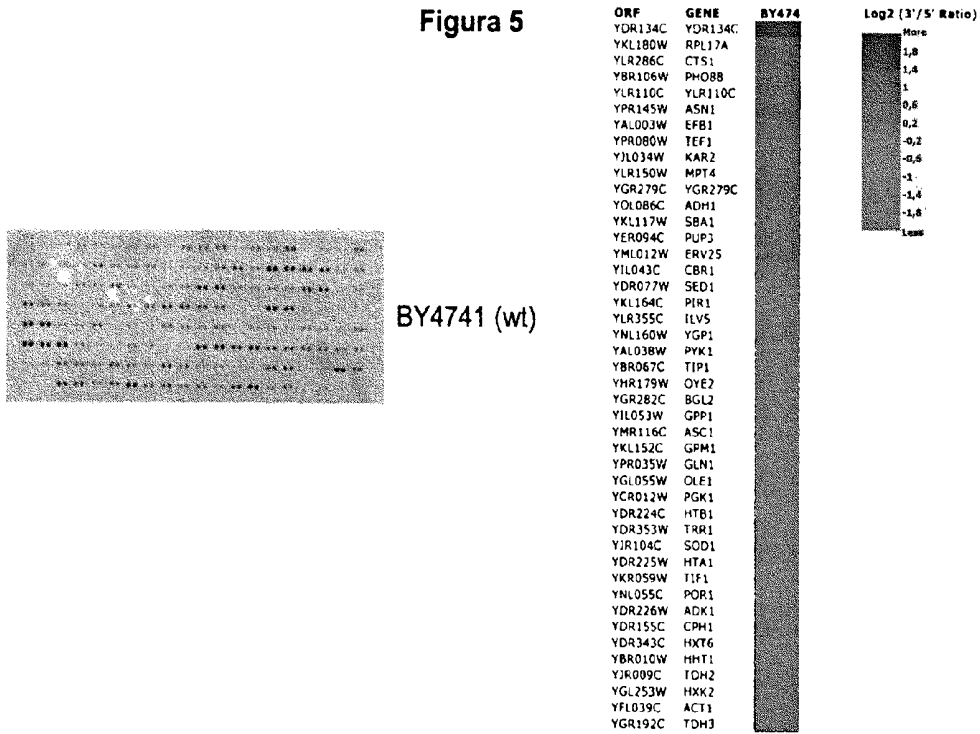
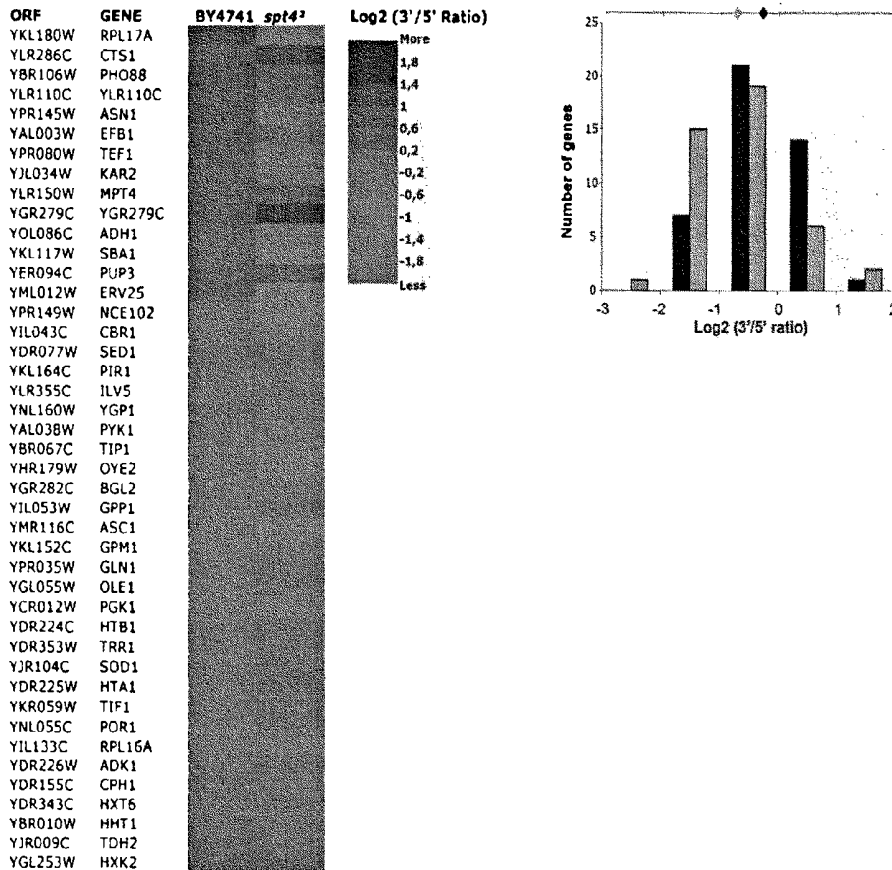


Figura 6





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 814

② Nº de solicitud: 200402480

② Fecha de presentación de la solicitud: **14.10.2004**

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GARIGLIO, P., et al. "Clustering of RNA polymerase B molecules in the 5' moiety of the adult beta-globin gene of hen erythrocytes". Nucl. Acids Res. 11-junio-1981, vol. 9, número 11, páginas 2589-2598. Ver todo el documento.	1-30
Y	REN, B., et al. "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints". Genes Dev. 15-enero-2002. Vol. 16, páginas 245-256. Ver Resumen, Figura 1, y Materiales y métodos.	1-30
A	SANDOVAL, J., et al. "RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time geen transcription" Nucl. Acids Res. 24-junio-2004 (on-line). Vol. 32, n° 11, e88. Ver todo el documento.	
A	US 6617112 B2 (BEALS, T.P.) 09.09.2003, resumen; columna 2, línea 65 - columna 3, línea 3; columna 4, líneas 4-17; columna 6, líneas 44-55; columna 7, líneas 6-28; columna 9, líneas 14-29; reivindicaciones 1-5.	
A	GARCÍA-MARTÍNEZ, J. "Genomic run-on evaluates transcription technique rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms" Mol. Cell. 23-julio-2004. Vol. 15, páginas 303-313. Ver Resumen, Introducción, Figura 1 y Procedimiento experimental.	

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

01.10.2008

**Examinador**

B. Pérez Esteban

Página

1/1