

**Übersetzung der neuen europäischen  
Patentschrift**

(12)

(97) Veröffentlichungsnummer: EP 1309726

(96) Anmeldenummer: 2001922870  
(96) Anmeldetag: 30.03.2001  
(45) Ausgabetag: 20.05.2022

(51) Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

(30) Priorität:  
30.03.2000 US 193594 P beansprucht.  
01.12.2000 EUROPÄISCHES PATENTAMT  
00126325 beansprucht.  
31.01.2001 US 265232 P beansprucht.

(97) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
14.05.2003 Patentblatt 03/20

(97) Bekanntmachung des Hinweises auf die  
Patenterteilung:  
02.12.2009 Patentblatt 09/49

(97) Hinweis auf Einspruchsentscheidung:  
03.10.2018 Patentblatt 18/40

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
LU MC NL PT SE TR

(56) Entgegenhaltungen:  
Die Entgegenhaltungen entnehmen Sie bitte der  
entsprechenden europäischen Druckschrift.

(73) Patentinhaber:  
WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL  
RESEARCH  
CAMBRIDGE, MA 02142 (US)  
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.  
80539 MÜNCHEN (DE)  
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF  
TECHNOLOGY  
CAMBRIDGE, MA 02139-4307 (US)  
UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS  
BOSTON, MA 02110 (US)

(72) Erfinder:  
TUSCHL, THOMAS  
NEW YORK, NY 10021 (US)  
SHARP, PHILLIP, A.  
NEWTON, MA 02458 (US)  
ZAMORE, PHILLIP, D.  
NORTHBOROUGH, MA 01532 (US)  
BARTEL, DAVID, P.  
BROOKLINE, MA 02146 (US)

(74) Vertreter:  
Patentanwalt Miksovsky KG  
2100 Korneuburg (ÖSTERREICH)

(54) **MEDIATOREN VON RNS-INTERFERENZ, DIE RNS- SEQUENZSPEZIFISCH SIND**

# TECHNISCHER HINTERGRUND DER ERFINDUNG

RNA-Interferenz oder RNAi ist ein Begriff, der ursprünglich von Fire und Mitarbeitern geprägt wurde, um die Beobachtung zu beschreiben, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) die Genexpression blockieren kann, wenn sie in Würmer eingeschleust wird (Fire et al., (1998) Nature 391, 806-811). dsRNA lenkt genspezifische, posttranskriptionale Genstilllegung (silencing) in vielen Organismen, einschließlich Wirbeltieren, und hat ein neues Werkzeug zur Untersuchung der Genfunktion geliefert. RNAi ist mit mRNA-Abbau verbunden, aber viele der biochemischen Mechanismen, die dieser Interferenz zugrunde liegen, sind unbekannt. Für eine biochemische Analyse des Phänomens ist die Rekapitulation der wesentlichen Merkmale der RNA-Interferenz in vitro erforderlich.

10 Tuschl, T. et al. (Genes Dev., 13, 3191-97,1999) offenbaren einen zellfreien Extrakt aus Drosophila-Embryonen im Stadium des synzytialen Blastoderms, der RNA-Interferenz vermittelt. Die Verwendung des Extrakts zur Untersuchung von RNAi wird beschrieben. Das Dokument kommt zu dem Schluss, dass eine Mindestlänge der dsRNA von mehr als 49 Basenpaaren erforderlich ist.

Hammond, SM. et al. (Nature, 404, 293-96, 2000) offenbaren die Stilllegung der Genexpression in 15 kultivierten Drosophila-Zellen durch Transfektion mit sequenzspezifischer doppelsträngiger RNA. Es erweist sich, dass Extrakte von transfizierten Zellen eine Nuclease-Aktivität enthalten, die mit RNA-Fragmenten von etwa 25 bp kofraktioniert.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung, die durch die beigefügten Ansprüche definiert wird, bietet ein 20 Verfahren zur Erzeugung von doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nucleotiden, wobei das Verfahren aufweist:

- (a) Vereinigen von doppelsträngiger RNA mit einem löslichen Extrakt, der RNA-Interferenz vermittelt, wodurch eine Kombination erzeugt wird;
- (b) Halten der Kombination von (a) unter Bedingungen, bei denen die doppelsträngige RNA 25 zu doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nucleotiden verarbeitet wird; und
- (c) ferner umfassend das Isolieren der doppelsträngigen RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nucleotiden aus der Kombination.

Die Erfindung bezieht sich auch auf Verfahren, die RNA-Interferenz verwenden, einschließlich Verfahren zur Vermittlung von RNA-Interferenz und zur Untersuchung der Genfunktion, wie in den 30 Ansprüchen definiert. Offenbart sind hierin ebenfalls Verfahren zur Produktion von Knockdown-Zellen und zur Identifikation von 21-23 nt RNAs, die RNA-Interferenz vermitteln.

Die Verfahren der vorliegenden Erfindung wurden unter Anwendung genspezifischer dsRNA-vermittelter Interferenz in einem zellfreien System ermittelt, das von Drosophila-Embryonen im Stadium des synzytialen Blastoderms abgeleitet war. Das In-vitro-System ergänzt genetische Ansätze zur Zerlegung 35 der molekularen Basis von RNAi. Wie hierin beschrieben, wurden die der RNAi zugrunde liegenden molekularen Mechanismen unter Verwendung des Drosophila-In-vitro-Systems untersucht. Ergebnisse zeigten, dass RNAi ATP-abhängig, doch von der mRNA-Translation entkoppelt ist. Das heißt, für RNAi in vitro ist keine Proteinsynthese erforderlich. Bei der RNAi-Reaktion werden beide Stränge (Sense- und Antisense-Strang) der dsRNA zu kurzen RNA-Fragmenten oder -Segmenten von etwa 21 bis etwa 23

- Nucleotiden (nt) Länge verarbeitet (RNAs mit Mobilität in Sequenzierungsgelen, die Markern von 21-23 nt Länge entsprechen, wahlweise als 21-23 nt RNA bezeichnet). Die Verarbeitung der dsRNA zu den kurzen RNA-Fragmenten erfordert nicht die Target-mRNA, was demonstriert, dass die kurze RNA-Spezies durch Verarbeitung der dsRNA und nicht als Produkt des dsRNA-gerichteten mRNA-Abbaus erzeugt wird. Die mRNA wird nur innerhalb der mit der dsRNA identischen Region gespalten. Spaltung tritt an Orten auf, die 21-23 Nucleotide voneinander getrennt sind, das gleiche Intervall, das für die dsRNA selbst beobachtet wird, was darauf schließen lässt, dass die 21-23 Nucleotidfragmente von der dsRNA die mRNA-Spaltung steuern. Dass gereinigte 21-23 nt RNAs RNAi vermitteln, bestätigt, dass diese Fragmente die mRNA-Spaltung steuern.
- Dementsprechend werden hierin isolierte (doppelsträngige, einzelsträngige) RNA-Moleküle von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden beschrieben, die RNAi vermitteln. Das heißt, die isolierten RNAs vermitteln den Abbau der mRNA eines Gens, dem die mRNA entspricht (vermitteln den Abbau von mRNA, die das Transkriptionsprodukt des Gens ist, das auch als Target-Gen bezeichnet wird). Der Bequemlichkeit halber wird eine solche mRNA hierin auch als abzubauen mRNA bezeichnet. Die Begriffe RNA, RNA-Molekül(e), RNA-Segment(e) und RNA-Fragment(e), wie sie hierin gebraucht werden, werden austauschbar zur Bezeichnung von RNA benutzt, die RNA-Interferenz vermittelt. Diese Begriffe schließen doppelsträngige RNA, einzelsträngige RNA, isolierte RNA (teilweise gereinigte RNA, im Wesentlichen reine RNA, synthetische RNA, rekombinant produzierte RNA) ebenso wie veränderte RNA ein, die sich von natürlich auftretender RNA durch die Addition, Deletion, Substitution und/oder Veränderung eines oder mehrerer Nucleotide unterscheidet. Solche Veränderungen können die Anlagerung von Nichtnucleotid-Material einschließen, beispielsweise an das (die) Ende(n) der 21-23 nt RNA oder innerhalb dieser (an ein oder mehrere Nucleotide der RNA). Nucleotide in den RNA-Molekülen können auch Nichtstandard-Nucleotide aufweisen, einschließlich nicht natürlich auftretender Nucleotide oder Desoxyribonucleotide. Zusammen werden alle derartig veränderten RNAs als Analoge oder Analoge von natürlich auftretender RNA bezeichnet. RNA von 21-23 Nucleotiden braucht natürlicher RNA nur ausreichend ähnlich zu sein, damit sie RNAi vermitteln kann (vermittelt). Der Ausdruck "vermittelt RNAi", wie er hierin gebraucht wird, betrifft (bezeichnet) die Fähigkeit, zu unterscheiden, welche RNAs durch den RNAi-Mechanismus oder -Prozess abzubauen sind. RNA, die RNAi vermittelt, tritt in Wechselwirkung mit dem RNAi-Mechanismus, so dass sie den Mechanismus zum Abbau der jeweiligen mRNAs lenkt. In einer Ausführungsform der Offenbarung werden hierin RNA-Moleküle von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden beschrieben, welche die Spaltung von spezifischer mRNA lenken, der ihre Sequenz entspricht. Eine ideale Korrespondenz der Sequenzen ist nicht notwendig, aber die Korrespondenz muss ausreichend sein, um die RNA zu befähigen, die RNAi-Spaltung der Target-mRNA zu lenken. In einer besonderen Ausführungsform weisen die 21-23 nt RNA-Moleküle eine 3'-Hydroxylgruppe auf.
- Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Produktion von RNA-Molekülen von 21 bis 23 Nucleotiden mit der Fähigkeit zur Vermittlung der RNAi-Spaltung. In einer Ausführungsform wird das Drosophila-In-vitro-System verwendet. In dieser Ausführungsform wird dsRNA mit einem löslichen Extrakt vereinigt, der vom Drosophila-Embryo abgeleitet ist, wodurch eine Kombination erzeugt wird. Die Kombination wird unter Bedingungen gehalten, bei denen die dsRNA zu RNA-Molekülen von 21 bis 23 Nucleotiden verarbeitet wird. In einer weiteren Ausführungsform wird das Drosophila-In-vitro-System

- verwendet, um RNA-Sequenzen von 21 bis 23 Nucleotiden zu erhalten, die RNA-Interferenz der mRNA eines bestimmten Gens (z. B. eines Krebsgens, eines Virusgens) vermitteln. In dieser Ausführungsform wird doppelsträngige RNA, die einer Sequenz des zu adressierenden Gens entspricht, mit einem vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt vereinigt, wodurch eine Kombination erzeugt wird. Die
- 5 Kombination wird unter Bedingungen gehalten, bei denen die doppelsträngige RNA zu RNA von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden Länge verarbeitet wird. Wie hierin gezeigt, vermittelt 21-23 nt RNA RNA der mRNA des adressierten Gens (des Gens, dessen mRNA abzubauen ist). Das Verfahren zur Gewinnung von 21-23 nt RNAs unter Verwendung des Drosophila-In-vitro-Systems weist ferner die Isolierung der RNA-Sequenz aus der Kombination auf.
- 10 Gleichfalls hierin beschrieben werden durch die erfindungsgemäßen Verfahren produzierte 21-23 nt RNA sowie durch andere Verfahren, wie z. B. chemische Synthese oder rekombinante DNA-Techniken, produzierte 21-23 nt RNAs, die gleiche oder weitgehend gleiche Sequenzen aufweisen wie natürlich auftretende RNAs, die RNAi vermitteln, wie z. B. diejenigen, die durch die erfindungsgemäßen Verfahren produziert werden. Alle diese RNAs werden als 21-23 nt RNAs bezeichnet, die RNA-Interferenz
- 15 vermitteln. Der Begriff "isolierte RNA", wie er hierin gebraucht wird, schließt durch beliebige Mittel gewonnene RNA ein, wozu Verarbeitung oder Spaltung von dsRNA, wie hierin beschrieben, Erzeugung durch chemische Syntheseverfahren und Produktion durch rekombinante DNA-Techniken gehören. Gleichfalls beschrieben werden Verwendungen der 21-23 nt RNAs, wie z. B. zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung, und Zusammensetzungen mit 21-23 nt RNAs, die RNAi vermitteln, wie z.B.
- 20 pharmazeutische Zusammensetzungen mit 21-23 nt RNAs, und einem geeigneten Träger (z. B. einem Puffer oder Wasser).
- Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein In-vitro-Verfahren zur Vermittlung von RNA-Interferenz der mRNA eines Gens in einer Zelle. In einer Ausführungsform wird RNA von 21 bis 23 nt, welche die abzubauen mRNA adressiert, in die Zelle eingeschleust. Die Zelle wird unter Bedingungen
- 25 gehalten, unter denen ein Abbau der mRNA auftritt, wodurch RNA-Interferenz der mRNA des Gens in der Zelle vermittelt wird. Die Zelle kann eine Zelle sein, in der RNAi in der unveränderten Zelle auftritt, oder die Zelle kann eine Zelle sein, die so modifiziert worden ist, dass RNAi auftritt (z. B. durch Addition von Komponenten, die aus einer Zelle oder einem Zellextrakt gewonnen werden, die (der) RNAi oder eine Aktivierung endogener Komponenten vermittelt). Der Begriff "Zelle, in der RNAi auftritt", wie er hierin
- 30 gebraucht wird, schließt sowohl eine Zelle ein, in der RNAi in der unveränderten Zelle auftritt, als auch eine Zelle, die so modifiziert worden ist, dass RNAi auftritt. In einer weiteren Ausführungsform beinhaltet das In-vitro-Verfahren zur Vermittlung von RNA-Interferenz eines Gens in einer Zelle die Vereinigung von doppelsträngiger RNA, die einer Sequenz des Gens entspricht, mit einem vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt, wodurch eine Kombination erzeugt wird. Die Kombination wird unter
- 35 Bedingungen gehalten, bei denen die doppelsträngige RNA zu RNAs von 21 bis 23 Nucleotiden verarbeitet wird. 21-23 nt RNA wird dann isoliert und in die Zelle eingeschleust. Die Zelle wird unter Bedingungen gehalten, bei denen ein Abbau von mRNA des Gens erfolgt, wodurch RNA-Interferenz des Gens in der Zelle vermittelt wird. Wie für die vorhergehende Ausführungsform beschrieben, handelt es sich bei der Zelle um eine Zelle, in der RNAi natürlich auftritt (in der unveränderten Zelle), oder die so codiert worden

ist, dass RNAi auftritt. 21-23 nt RNAs können auch durch andere Verfahren produziert werden, wie z. B. chemische Syntheseverfahren oder rekombinante DNA-Techniken.

Gleichfalls hierin beschrieben werden biochemische Komponenten einer Zelle, wie z. B. einer Drosophila-Zelle, die doppelsträngige RNA zu RNA von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden verarbeiten. Außerdem werden biochemische Komponenten einer Zelle beschrieben, die an der Adressierung von mRNA durch RNA von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden beteiligt sind. In beiden Ausführungsformen können die biochemischen Komponenten aus einer Zelle gewonnen werden, in der sie auftreten, oder können durch andere Verfahren produziert werden, wie z. B. chemische Synthese oder rekombinante DNA-Techniken. Der Begriff "isoliert", wie er hierin gebraucht wird, schließt Materialien (z. B. biochemische Komponenten, RNA) ein, die aus einer Quelle gewonnen werden, in der sie auftreten, und Materialien, die durch Verfahren wie z. B. chemische Synthese oder rekombinante Nucleinsäure- (RNA-, DNA-)Verfahren produziert werden,

Beschrieben wird hierin außerdem ein Verfahren zum (teilweisen oder vollständigen) Abschalten des adressierten Gens, wodurch eine Alternative zu derzeit verfügbaren Verfahren zum teilweisen (oder vollständigen) Abschalten eines oder mehrerer Gene geboten wird. Dieses Verfahren zum Abschalten der Genexpression kann therapeutisch oder zu Forschungszwecken angewandt werden (z. B. zur Erzeugung von Modellen von Erkrankungszuständen, zur Untersuchung der Funktion eines Gens, um einzuschätzen, ob ein Wirkstoff auf ein Gen wirkt, zur Validierung von Zielen für die Erzeugung neuer Pharmazeutika). Letzteres trifft nur für nichtmenschliche Organismen zu. In den Fällen, wo die Genfunktion eliminiert wird, kann die resultierende Zelle oder der resultierende nichtmenschliche Organismus als auch Knockout (-Zelle oder -Organismus) bezeichnet werden. Eine Ausführungsform des Verfahrens zur Produktion von Knockdown-Zellen beinhaltet das Einschleusen in eine Zelle, in der ein Gen (als adressiertes Gen bezeichnet) abzuschalten ist, RNA von 21 bis 23 nt, die das Gen adressiert, und das Halten der resultierenden Zelle oder des resultierenden Organismus unter Bedingungen, unter denen RNAi auftritt, und führt zum Abbau der mRNA des adressierten Gens, wodurch Knockdown-Zellen produziert werden. Durch das vorliegende Verfahren produzierte Knockdown-Zellen und nichtmenschliche Organismen werden gleichfalls beschrieben.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein In-vitro-Verfahren zur Untersuchung oder Beurteilung der Funktion eines Gens in einer Zelle. In einer Ausführungsform wird RNA mit 21 bis 23 nt, die mRNA des Gens für den Abbau adressiert, in eine Zelle eingeschleust, in der RNAi auftritt. Die Zelle wird als Testzelle bezeichnet. Die Testzelle wird unter Bedingungen gehalten, unter denen ein Abbau von mRNA des Gens auftritt. Der Phänotyp der Testzelle wird dann beobachtet und mit dem einer geeigneten Kontrollzelle verglichen, wie z. B. einer entsprechenden Zelle, die auf die gleiche Weise behandelt wird, mit der Ausnahme, dass das adressierte (spezifische) Gen nicht adressiert wird. Eine 21-23 nt-RNA, welche die mRNA nicht für den Abbau adressiert, kann anstelle der in die Testzelle eingeschleusten RNA in die Kontrollzelle eingeschleust werden, obwohl dies nicht notwendig ist. Ein Unterschied zwischen den Phänotypen der Test- und Kontrollzellen liefert Informationen über die Funktion der abgebauten mRNA. In einer weiteren Ausführungsform wird doppelsträngige RNA, die einer Sequenz des Gens entspricht, mit einem löslichen Extrakt, der RNAi vermittelt, wie z. B. dem hierin beschriebenen, vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt, unter Bedingungen vereinigt, bei denen die doppelsträngige RNA verarbeitet

wird, um RNA von 21 bis 23 Nucleotiden zu erzeugen. Die RNA von 21 bis 23 Nucleotiden wird isoliert und dann in eine Zelle eingeschleust, in der RNAi auftritt (Testzelle). Die Testzelle wird unter Bedingungen gehalten, unter denen Abbau der mRNA auftritt. Der Phänotyp der Testzelle wird dann beobachtet und mit dem einer geeigneten Kontrolle verglichen, wie z. B. einer entsprechenden Zelle, die auf die gleiche Weise wie die Testzelle behandelt wird, außer dass das adressierte Gen nicht adressiert wird. Ein Unterschied zwischen den Phänotypen der Test- und Kontrollzellen liefert Informationen über die Funktion des adressierten Gens. Die gelieferten Informationen können ausreichen, um die Funktion des Gens zu identifizieren (definieren), oder können zu diesem Zweck in Verbindung mit Informationen verwendet werden, die aus anderen Assays oder Analysen gewonnen werden.

Ebenfalls hierin beschrieben wird ein Verfahren zur Validierung, ob ein Wirkstoff auf ein Gen wirkt. Bei diesem Verfahren wird RNA von 21 bis 23 Nucleotiden, welche die abzubauen mRNA adressiert, in eine Zelle oder einen nichtmenschlichen Organismus eingeschleust, in der (dem) RNAi auftritt. Die Zelle oder der Organismus (die (der) die eingeschleuste RNA enthält) wird unter Bedingungen gehalten, unter denen Abbau von mRNA auftritt, und der Wirkstoff wird in die Zelle oder den Organismus eingebracht. Es wird ermittelt, ob der Wirkstoff eine Wirkung auf die Zelle oder den Organismus hat; wenn der Wirkstoff keine Wirkung auf die Zelle oder den Organismus hat, dann wirkt der Wirkstoff auf das Gen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein In-vitro-Verfahren zur Validierung, ob ein Genprodukt ein Ziel (Target) für die Neu- oder Weiterentwicklung von Medikamenten ist. RNA von 21 bis 23 Nucleotiden, welche die dem Gen entsprechende mRNA für den Abbau adressiert, wird in eine Zelle eingeschleust. Die Zelle wird unter Bedingungen gehalten, unter denen der Abbau der mRNA auftritt, was zu einer verminderten Expression des Gens führt. Es wird ermittelt, ob die verminderte Expression des Gens eine Wirkung auf die Zelle hat, wobei, wenn die verminderte Expression des Gens eine Wirkung hat, dann das Genprodukt ein Ziel für die Neu- oder Weiterentwicklung von Medikamenten ist.

Außerdem wird hierin ein Verfahren zur Behandlung einer Erkrankung oder eines Leidens beschrieben, die (das) mit der Anwesenheit eines Proteins in einem Patienten verbunden ist, wobei das Verfahren die Verabreichung an den Patienten einer RNA von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden beinhaltet, welche die mRNA des Proteins (die für das Protein codierende mRNA) für den Abbau adressiert. Als Ergebnis wird das Protein nicht produziert oder nicht in dem Umfang produziert wie ohne die Behandlung.

Ferner wird ein Gen beschrieben, das durch Sequenzierung von endogenen RNA-Molekülen mit 21 bis 23 Nucleotiden, die RNAi vermitteln, identifiziert wird.

Ebenfalls hierin beschrieben wird ein Verfahren zur Identifikation von Zielorten innerhalb einer mRNA, die sich besonders für RNAi eignen, sowie ein Verfahren zur Einschätzung der Fähigkeit von 21-23 nt RNAs, RNAi zu vermitteln.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Reporter-mRNAs und dsRNAs Rr-Luc und Pp-Luc. Längen und Positionen der ssRNA, asRNA und dsRNAs sind in schwarzen Säulen relativ zu den Reporter-mRNA-Sequenzen Rr-Luc und Pp-Luc dargestellt. Schwarze Rechtecke zeigen die zwei nicht verwandten Luciferase- Codierungssequenzen, Linien entsprechen den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen der mRNAs.

Fig. 2A zeigt ein Diagramm des Verhältnisses von Luciferase-Aktivitäten nach der Adressierung von 50 pM Pp-Luc-mRNA mit 10 nM ssRNA, asRNA oder dsRNA aus dem 505 bp-Segment des Pp-Luc-

Gens, das genspezifische Interferenz durch dsRNA in vitro aufweist. Die Daten sind die Mittelwerte von sieben Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Es wurden vier unabhängig voneinander hergestellte Lysate verwendet. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Puffer-Kontrolle normiert; ein Verhältnis gleich 1 zeigt keine genspezifische Interferenz an.

5 Fig. 2B zeigt ein Diagramm des Verhältnisses von Luciferase-Aktivitäten nach der Adressierung von 50 pM Rr-Luc-mRNA mit 10 nM ssRNA, asRNA oder dsRNA aus dem 501 bp-Segment des Rr-Luc-Gens, das genspezifische Interferenz durch dsRNA in vitro aufweist. Die Daten sind die Mittelwerte von sechs Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Ein Rr-Luc/Pp-Luc-Verhältnis gleich 1 zeigt keine genspezifische Interferenz an.

10 Fig. 3A zeigt eine schematische Darstellung der experimentellen Strategie, die angewandt wurde, um zu zeigen, dass Inkubation des Drosophila-Embryo-Lysats dsRNA für genspezifische Interferenz potenziert. Die gleichen dsRNAs wie die in Fig. 2 verwendeten (oder Puffer) wurden nacheinander mit zweifachen Verdünnungen in sechs aufeinanderfolgenden Reaktionen mit Drosophila-Embryo-Lysat vorinkubiert, dann auf ihre Fähigkeit zum Blockieren der mRNA-Expression getestet. Als Kontrolle wurde  
15 die gleiche Menge dsRNA (10 nM) oder Puffer direkt in Puffer verdünnt und mit Pp-Luc- und Rr-Luc-mRNAs und Lysat inkubiert.

Fig. 3B zeigt ein Diagramm der Potenzierung beim Adressieren von Pp-Luc-mRNA. Schwarze Säulen zeigen an, dass die dsRNA oder der Puffer nacheinander vorinkubiert wurden; weiße Säulen entsprechen einer direkten 32-fachen Verdünnung der dsRNA. Die Werte wurden auf diejenigen der  
20 Pufferkontrollen normiert.

Fig. 3C zeigt ein Diagramm der Potenzierung beim Adressieren von Rr-Luc-mRNA. Die entsprechende Pufferkontrolle ist in Fig. 3B dargestellt.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm, das die Wirkung von konkurrierender dsRNA auf die genspezifische Interferenz darstellt. Steigende Konzentrationen von nanos-dsRNA (508 bp) wurden den Reaktionen  
25 zugesetzt, die 5 nM dsRNA enthielten (die gleichen dsRNAs wie die in den Figuren 2A und 2B verwendeten), die Pp-Luc-mRNA (schwarze Säulen, linke Achse) oder Rr-Luc-mRNA (weiße Säulen, rechte Achse) adressierten. Jede Reaktion enthielt sowohl eine Target-mRNA (Pp-Luc für die schwarzen Säulen, Rr-Luc für die weißen) als auch eine nicht verwandte mRNA (Rr-Luc für die schwarzen Säulen, Pp-Luc für die weißen). Die Werte wurden auf die Pufferkontrolle normiert (nicht dargestellt). Die  
30 Reaktionen wurden unter Standardbedingungen inkubiert (siehe Methoden).

Fig. 5A zeigt ein Diagramm, das die Wirkung von dsRNA auf die mRNA-Stabilität darstellt. Kreise, Pp-Luc-mRNA; Quadrate, Rr-Luc-mRNA; ausgefüllte Symbole, Pufferinkubation; Kontursymbole, Inkubation mit Pp-dsRNA.

Fig. 5B zeigt ein Diagramm, das die Stabilität von Rr-Luc-mRNA darstellt, die mit Rr-dsRNA  
35 oder Pp-dsRNA inkubiert wird. Ausgefüllte Quadrate, Puffer; Konturquadrate, Pp-dsRNA (10 nM); Konturkreise, Rr-dsRNA (10 nM).

Fig. 5C zeigt ein Diagramm, das die Abhängigkeit von der dsRNA-Länge darstellt: Die Stabilität der Pp-Luc-mRNA wurde nach Inkubation in Lysat in Anwesenheit von Puffer oder dsRNAs von verschiedener Länge eingeschätzt. Ausgefüllte Quadrate, Puffer; Konturkreise, 49 bp dsRNA (10 nM);  
40 umgekehrte Konturdreiecke, 149 bp dsRNA (10 nM); Konturdreiecke, 505 bp dsRNA (10 nM):

Konturrhomben, 997 bp dsRNA (10 nM). Die Reaktionen wurden unter Standardbedingungen inkubiert (siehe Methoden).

Fig. 6 zeigt ein Diagramm, das darstellt, dass RNAi Adenosintriphosphat (ATP) erfordert. Creatinkinase (CK) nutzt Creatinphosphat (CP) zur Rückgewinnung von ATP. Kreise, +ATP, +CP, +CK; Quadrate, -ATP, +CP, +CK; Dreiecke, -ATP, -CP, +CK; umgekehrte Dreiecke, -ATP, +CP, -CK.

Fig. 7A zeigt ein Diagramm der Proteinsynthese, widergespiegelt durch Luciferase-Aktivität, die nach Inkubation von Rr-Luc mRNA bei der 1-stündigen In-vitro-RNAi-Reaktion in Anwesenheit der Proteinsynthese-Inhibitoren Anisomycin, Cycloheximid oder Chloramphenicol erzeugt wird, in Bezug auf die Reaktion ohne Inhibitor, und zeigt, dass RNAi keine mRNA-Translation erfordert.

Fig. 7B zeigt ein Diagramm, das die Translation von Pp-Luc mRNAs mit 7-Methylguanosin- bzw. Adenosin-Capping (Kreise bzw. Quadrate) bei der RNAi-Reaktion in Abwesenheit von dsRNA darstellt, gemessen durch Luciferase-Aktivität, die in einer einstündigen Inkubation erzeugt wird.

Fig. 7C zeigt ein Diagramm, das die Inkubation in einer RNAi-Reaktion von gleichmäßig mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierter Pp-Luc-mRNA mit 7-Methylguanosin-Capping (Kreise) und Pp-Luc-mRNA mit Adenosin-Capping (Quadrate) in Anwesenheit (Kontursymbole) und Abwesenheit (ausgefüllte Symbole) von 505 bp Pp-Luc-dsRNA darstellt.

Fig. 8A zeigt ein Diagramm der denaturierenden Agarosegel-Analyse von Pp-Luc-mRNA, inkubiert in einer Standard-RNAi-Reaktion mit Puffer, 505 nt Pp-asRNA oder 505 bp Pp-dsRNA über die angegebenen Zeiten, und zeigt, dass asRNA eine geringe Menge RNAi in vitro verursacht.

Fig. 8B zeigt ein Diagramm der denaturierenden Agarosegel-Analyse von Rr-Luc-mRNA, inkubiert in einer Standard-RNAi-Reaktion mit Puffer, 505 nt Pp-asRNA oder 505 bp Pp-dsRNA über die angegebenen Zeiten, und zeigt, dass asRNA eine geringe Menge RNAi in vitro verursacht.

Fig. 9 zeigt ein Schema der Positionen der drei dsRNAs 'A', 'B' und 'C' bezüglich der Rr-Luc-mRNA.

Fig. 10 zeigt die auf die ersten 267 nt der Rr-Luc-mRNA (SEQ ID Nr.: 1) abgebildeten Spaltorte an. Der blaue Balken unter der Sequenz zeigt die Position von dsRNA 'C' an, und blaue Kreise zeigen die Position der durch diese dsRNA verursachten Spaltstellen an. Der grüne Balken bezeichnet die Position von dsRNA 'B', und grüne Kreise bezeichnen die Spaltstellen. Der magentarote Balken zeigt die Position von dsRNA 'A' an, und magentarote Kreise bezeichnen die Spaltungen. Eine außergewöhnliche Spaltung innerhalb einer Reihe von 7 Uracilen ist mit einer roten Pfeilspitze markiert.

Fig. 11 zeigt ein vorgeschlagenes Modell für RNAi. Es besteht die Vorstellung, dass RNAi mit einer Spaltung der dsRNA in Produkte mit 21-23 nt durch eine dsRNA-spezifische Nuclease beginnt, vielleicht in einem Multiproteinkomplex. Diese kurzen dsRNAs könnten dann durch eine ATP-abhängige Helicase, möglicherweise eine Komponente des Anfangskomplexes, in 21-23 nt asRNAs gespalten werden, die dann die mRNA für die Spaltung adressieren könnten. Es besteht die Vorstellung, dass die kurzen asRNAs mit den RNAi-spezifischen Proteinen (Kreise) assoziiert bleiben, die ursprünglich durch die Vollängen-dsRNA gebunden waren, wodurch sich die Unfähigkeit von asRNA zur Auslösung der RNAi in vivo und in vitro erklärt. Schließlich würde eine Nuclease (Dreiecke) die mRNA spalten.



Fig. 12 ist ein Säulendiagramm, das die sequenzspezifische Genstilllegung durch 21-23 nt-Fragmente darstellt. Dargestellt wird das Verhältnis der Luciferase-Aktivität nach der Adressierung von Pp-Luc- und Rr-Luc-mRNA durch 5 nM Pp-Luc- oder Rr-Luc-dsRNA (500 bp) oder 21-23 nt Fragmente, die aus einer früheren Inkubation der jeweiligen dsRNA in *Drosophila*-Lysat isoliert wurden. Die Menge der in der Inkubationsreaktion anwesenden isolierten 21-23-meren entspricht etwa der gleichen Menge von 21-23-meren, die während einer Inkubationsreaktion mit 5 nM 500 bp dsRNA erzeugt werden. Die Daten sind Mittelwerte über 3 Versuche, und die Standardabweichung wird durch Fehlersäulen angegeben. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Pufferkontrolle normiert.

Fig. 13A veranschaulicht die Reinigung von RNA-Fragmenten auf einer Superdex HR 200 10/30-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) unter Anwendung des in Beispiel 4 beschriebenen Verfahrens. dsRNA wurde <sup>32</sup>P-markiert, und die in jeder Säulenfraktion zurückgewonnene Radioaktivität ist graphisch dargestellt. Die Fraktionen wurden auch durch denaturierende Gelelektrophorese (Nebenbild) analysiert.

Fig. 13B demonstriert die Fähigkeit der Rr-Luciferase-RNA, nach Inkubation in dem *Drosophila*-Lysat und Fraktionierung wie in Fig. 13A eine sequenzspezifische Interferenz mit Expression einer Rr-Luciferase-Target-mRNA zu vermitteln. Ein Mikroliter jeder resuspendierten Fraktion wurde in 10 Mikroliter In-vitro-RNAi-Reaktion getestet (siehe Beispiel 1). Dieses Verfahren ergibt eine RNA-Konzentration in der Standard-In-vitro-RNAi-Reaktion, die annähernd gleich der Konzentration dieser RNA-Spezies in der ursprünglichen Reaktion vor dem Beladen der Säule ist. Die relative Lumineszenz pro Sekunde ist auf den Mittelwert der zwei Pufferkontrollen normiert worden.

Fig. 13C ist die Spezifitätskontrolle für Fig. 13B. Sie demonstriert, dass die fraktionierte RNA von Fig. 13B sequenzspezifische Interferenz mit Expression einer Pp-Luciferase mRNA nicht effizient vermittelt. Die Assays sind die gleichen wie in Fig. 13B.

Die Figuren 14A und 14B sind schematische Darstellungen von Reporterkonstrukten und siRNA-Duplexen. Fig. 14A veranschaulicht die Glühwürmchen(Pp-Luc)- und Seequallen(Rr-Luc)-Luciferase-Reporterregionen von den Plasmiden pGL2-Kontrolle, pGL3-Kontrolle und pRL-TK (Promega). Regulatorische Elemente SV40, der HSV-Thymidinkinase-Promotor, und zwei Introns (Linien) sind angezeigt. Die Sequenz von GL3-Luciferase ist zu 95% identisch mit GL2, aber RL steht in keinem Zusammenhang zu beiden. Die Luciferase-Expression aus pGL2 ist etwa um den Faktor 10 niedriger als die aus pGL3 in transfizierten Säugetierzellen. Die durch die siRNA-Duplexe adressierte Region ist als schwarzer Balken unterhalb der Codierungsregion der Luciferase-Gene angezeigt. Fig. 14B zeigt die Sense-(oben) und Antisense-Sequenzen (unten) der siRNA-Duplexe, die GL2 (SEQ ID Nrn.: 10 und 11), GL3 (SEQ ID Nrn.: 12 und 13) adressieren, und RL-Luciferasen (SEQ ID Nrn.: 14 und 15) sind dargestellt. Die GL2- und GL3-siRNA-Duplexe unterscheiden sich nur durch 3 einzelne Nucleotid-Substitutionen (grau eingrahmt). Als unspezifische Kontrolle wurde ein Duplex mit der invertierten GL2-Sequenz, invGL2 (SEQ ID Nrn.: 16 und 17) synthetisiert. Der 2 nt 3'-Überhang von 2'-Desoxythymidin wird als TT bezeichnet; uGL2 (SEQ ID Nrn.: 18 und 19) ist GL2 siRNA ähnlich, enthält aber Ribo-Uridin-3'-Überhänge.

Die Figuren 15A-15J sind Diagramme, die RNA-Interferenz durch siRNA-Duplexe darstellen. Die Verhältnisse von Target- zu Kontroll-Luciferase wurden auf eine Pufferkontrolle (Pu, schwarze Säulen) normiert; graue Säulen bezeichnen Verhältnisse von *Photinus pyralis*-(Pp-Luc)-GL2- oder -GL3-Luciferase

zu Renilla reniformis-(Rr-Luc-)RL-Luciferase (linke Achse), weiße Säulen bezeichnen Verhältnisse von RL zu GL2 oder GL3 (rechte Achse). Die Figuren 15A, 15C, 15E, 15G und 15I zeigen Ergebnisse von Experimenten, die mit der Kombination von pGL2-Kontrolle- und pRL-TK-Reporterplasmiden durchgeführt wurden, die Figuren 15B, 15D, 15F, 15H und 15J zeigen Ergebnisse mit pGL3-Kontrolle- und pRL-TK-Reporterplasmiden. Die für das Interferenz-Experiment verwendete Zelllinie ist am oberen Ende jedes Diagramms angegeben. Die Verhältnisse Pp-Luc/Rr-Luc für die Pufferkontrolle (Pu) variierten zwischen 0,5 und 10 für pGL2/pRL bzw. zwischen 0,03 und 1 für pGL3/pRL vor der Normierung und zwischen den verschiedenen getesteten Zelllinien. Die aufgezeichneten Daten wurden über drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung gemittelt.

Die Figuren 16A-16F sind Diagramme, welche die Wirkungen von 21 nt siRNAs, 50 bp und 500 bp dsRNAs auf die Luciferase-Expression in HeLa-Zellen zeigen. Die genaue Länge der langen dsRNAs ist unter den Säulen angegeben. Die Figuren 16A, 16C und 16E beschreiben Experimente, die mit pGL2-Kontrolle- und pRL-TK-Reporterplasmiden durchgeführt wurden.

Die Figuren 16B, 16D und 16F zeigen Ergebnisse mit pGL3-Kontrolle- und pRL-TK-Reporterplasmiden. Die Daten wurden über zwei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung gemittelt. Figuren 16A, 16B, absolute Pp-Luc-Expression, aufgetragen in willkürlichen Lumineszenz-Einheiten. Figuren 16C, 16D, Rr-Luc-Expression, aufgetragen in willkürlichen Lumineszenz-Einheiten.

Figuren 16E, 16F, Verhältnisse von normierter Target- zu Kontroll-Luciferase. Die Verhältnisse der Luciferase-Aktivität für siRNA-Duplexe wurden auf eine Pufferkontrolle normiert (Pu, schwarze Säulen); die Lumineszenz-Verhältnisse für 50 oder 500 bp dsRNAs wurden auf die entsprechenden Verhältnisse normiert, die für 50 und 500 bp dsRNA aus humanisiertem GFP (hG, schwarze Säulen) beobachtet wurden. Zu bemerken ist, dass die Gesamt-Sequenzdifferenzen zwischen 49 und 484 bp dsRNAs, die GL2 und GL3 adressieren, nicht ausreichend sind, um Spezifität zwischen GL2- und GL3-Targets zu verleihen (43 nt ununterbrochene Identität im 49 bp Segment, 239 nt längste ununterbrochene Identität im 484 bp-Segment) (Parrish, S. et al., Mol. Cell. 6:1077-1087 (2000)).

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Doppelsträngige RNA (dsRNA) lenkt den sequenzspezifischen Abbau von mRNA durch einen als RNA-Interferenz (RNAi) bekannten Prozess. Es ist bekannt, dass der Prozess in vielen verschiedenen Organismen auftritt, zu denen Embryonen von Säugetieren und anderen Wirbeltieren gehören. Mit dem hierin beschriebenen Drosophila-In-vitro-System ist demonstriert worden, dass dsRNA zu Segmenten von 21-23 Nucleotiden (nt) Länge verarbeitet wird, und dass diese 21-23 nt-Fragmente außerdem, wenn sie gereinigt und Drosophila-Extrakten wieder zugesetzt werden, in Abwesenheit längerer dsRNA RNA-Interferenz vermitteln. Folglich sind diese 21-23 nt-Fragmente sequenzspezifische Mediatoren von RNA-Abbau. Ein molekulares Signal, das die spezifische Länge der Fragmente sein kann, muss in diesen 21-23 nt-Fragmenten vorhanden sein, um an der RNAi beteiligte zelluläre Faktoren heranzuziehen. Wir beschreiben hierin diese 21-23 nt-Fragmente und ihre Verwendung für die spezifische Inaktivierung der Genfunktion. Die Verwendung dieser Fragmente (oder rekombinant produzierter oder chemisch synthetisierter Oligonucleotide gleicher oder ähnlicher Natur) ermöglicht die Adressierung spezifischer mRNAs für den Abbau in Säugetierzellen. Die Verwendung langer dsRNAs in Säugetierzellen, um RNAi auszulösen, ist gewöhnlich nicht praktikabel, vermutlich wegen der schädlichen Auswirkungen der

Interferonantwort. Spezifische Adressierung einer bestimmten Genfunktion, die mit 21-23 nt-Fragmenten möglich ist, ist in funktionellen genomischen und therapeutischen Anwendungen brauchbar.

Insbesondere werden hierin RNA-Moleküle von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden beschrieben, die RNAi vermitteln. In einer Ausführungsform betrifft die Offenbarung RNA-Moleküle von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden, welche die Spaltung von spezifischer mRNA lenken, der sie entsprechen. Die 21-23 nt-RNA-Moleküle können auch eine 3'-Hydroxylgruppe aufweisen. Die 21-23 nt-RNA-Moleküle können einzelsträngig oder doppelsträngig sein (wie zwei 21-23 nt-RNAs); derartige Moleküle können stumpfe Enden oder überhängende Enden (z. B. 5', 3') aufweisen. In bestimmten Ausführungsformen der Offenbarung ist das RNA-Molekül doppelsträngig und weist entweder stumpfe Enden oder überhängende Enden auf (wie zwei 21-23 nt-RNAs).

In einer Ausführungsform der Offenbarung hat mindestens ein Strang des DNA-Moleküls einen 3'-Überhang mit einer Länge von etwa 1 bis etwa 6 Nucleotiden (z. B. Pyrimidin-Nucleotiden, Purin-Nucleotiden). In anderen Ausführungsformen der Offenbarung hat der 3'-Überhang eine Länge von etwa 1 bis etwa 5 Nucleotiden, etwa 1 bis etwa 3 Nucleotiden und etwa 2 bis etwa 4 Nucleotiden. In einer Ausführungsform der Offenbarung ist das RNA-Molekül doppelsträngig, ein Strang hat einen 3'-Überhang, und der andere Strang kann ein stumpfes Ende oder einen Überhang aufweisen. In der Ausführungsform, in der das RNA-Molekül doppelsträngig ist und beide Stränge einen Überhang aufweisen, kann die Länge der Überhänge für jeden Strang gleich oder unterschiedlich sein. In einer besonderen Ausführungsform der Offenbarung weist die RNA 21 Nucleotidstränge auf, die gepaart sind und Überhänge von etwa 1 bis etwa 3, insbesondere etwa 2 Nucleotiden an beiden 3'-Enden der RNA aufweisen. Um die Stabilität der RNA weiter zu verbessern, können die 3'-Überhänge gegen Abbau stabilisiert werden. In einer Ausführungsform der Offenbarung wird die RNA durch Einbau von Purin-Nucleotiden stabilisiert, wie z. B. Adenosin- oder Guanosin-Nucleotiden. Alternativ wird die Substitution von Pyrimidin-Nucleotiden durch modifizierte Analoge, z. B. Substitution von Uridin 2-Nucleotid-3'-Überhängen durch 2'-Desoxythymidin toleriert und beeinflusst die Effizienz von RNAi nicht. Die Abwesenheit eines 2'-Hydroxyls verbessert die Nucleasebeständigkeit des Überhangs im Gewebekulturmedium erheblich.

Die 21-23 nt-RNA-Moleküle können durch eine Anzahl dem Fachmann bekannter Techniken gewonnen werden. Zum Beispiel kann die RNA unter Anwendung dem Fachmann bekannter Verfahren chemisch synthetisiert oder rekombinant produziert werden. Die 21-23 nt-RNAs können auch unter Verwendung des hierin beschriebenen Drosophila-In-vitro-Systems gewonnen werden. Die Verwendung des Drosophila-In-vitro-Systems erfordert die Vereinigung von dsRNA mit einem vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt, wodurch eine Kombination produziert wird. Die Kombination wird unter Bedingungen gehalten, bei denen die dsRNA zu RNA von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden verarbeitet wird. Das Drosophila-In-vitro-System kann auch verwendet werden, um RNA mit einer Länge von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden zu erhalten, die RNA-Interferenz der mRNA eines bestimmten Gens (z. B. eines Krebsgens, eines Virusgens) vermittelt. In dieser Ausführungsform wird doppelsträngige RNA, die einer Sequenz des Gens entspricht, mit einem vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt vereinigt, wodurch eine Kombination produziert wird. Die Kombination wird unter Bedingungen gehalten, bei denen die doppelsträngige RNA zu der RNA von etwa 21 bis etwa 23 Nucleotiden verarbeitet wird. Wie hierin

gezeigt, vermittelt 21-23 nt RNA die RNAi der abzubauenen mRNA. Die vorliegende Offenbarung betrifft außerdem die durch die hierin beschriebenen Verfahren produzierten 21-23 nt-RNA-Moleküle.

In einer Ausführungsform der Offenbarung werden die hierin beschriebenen Verfahren angewandt, um 21-23 nt-RNA-Moleküle zu identifizieren oder zu gewinnen, die als sequenzspezifische Mediatoren des RNA-Abbaus verwendbar sind, und folglich zur Inhibition von mRNAs, wie z. B. humanen mRNAs, die für Produkte codieren, die mit einer Erkrankung oder einem unerwünschten Zustand verbunden oder dafür ursächlich sind. Zum Beispiel kann die Produktion eines Onkoproteins oder Virusproteins bei Menschen inhibiert werden, um dem Auftreten der Erkrankung oder des Zustands vorzubeugen, das Ausmaß des Auftretens zu begrenzen oder umzukehren. Wenn die Sequenz des zu adressierenden Gens bei Menschen bekannt ist, können 21-23 nt-RNAs produziert und auf ihre Fähigkeit zur Vermittlung von RNAi in einer Zelle getestet werden, wie z. B. einer menschlichen oder Primatenzelle. Diejenigen humanen 21-23 nt-RNA-Moleküle, die sich als Vermittler von RNAi erweisen, können auf Wunsch in einem geeigneten Tiermodell getestet werden, um ihre Wirksamkeit in vivo weiter einzuschätzen. Zusätzliche Kopien von 21-23 nt-RNAs, die sich als Vermittler von RNAi erweisen, können nach den hierin beschriebenen Verfahren produziert werden.

Das Verfahren zur Gewinnung der 21-23 nt RNA-Sequenz unter Verwendung des Drosophila-In-vitro-Systems weist ferner die Isolierung der RNA-Sequenz aus der Kombination auf. Die 21-23 nt-RNA-Moleküle können mit einer Anzahl dem Fachmann bekannter Verfahren isoliert werden. Zum Beispiel kann Gelelektrophorese angewandt werden, um die 21-23 nt-RNAs von der Kombination zu trennen, Gelstücke mit den entfernten RNA-Sequenzen und die aus den Gelstücken eluierten RNAs abzutrennen. Alternativ können nicht denaturierende Verfahren, wie z. B. nicht denaturierende Säulenchromatographie, angewandt werden, um die produzierte RNA zu isolieren. Zusätzlich können Chromatographie (z. B. Größenausschlusschromatographie), Glyceringradienten-Zentrifugation, Affinitätsreinigung mit Antikörpern angewandt werden, um 21-23 nt-RNAs zu isolieren. Der aus dem Drosophila-In-vitro-System isolierte RNA-Proteinkomplex kann auch direkt in den hierin beschriebenen Verfahren verwendet werden (z. B. im Verfahren zur Vermittlung der RNAi von mRNA eines Gens). Vom Drosophila-Embryo abgeleitete lösliche Extrakte, die RNAi vermitteln, sind in der Offenbarung eingeschlossen. Der lösliche Drosophila-Extrakt kann auf verschiedene Arten gewonnen werden. Zum Beispiel kann der lösliche Extrakt aus Drosophila-Embryonen im Stadium des synzytialen Blastoderms gewonnen werden, wie in den Beispielen 1, 2 und 3 beschrieben. Lösliche Extrakte können von anderen Zellen abgeleitet werden, in denen RNAi auftritt. Alternativ können lösliche Extrakte von einer Zelle gewonnen werden, die keine RNAi ausführt. In diesem Fall können die zur Vermittlung von RNAi benötigten Faktoren in eine solche Zelle eingeschleust werden, und dann wird der lösliche Extrakt gewonnen. Die Komponenten des Extrakts können auch chemisch synthetisiert und/oder unter Anwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren kombiniert werden.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann irgendeine dsRNA verwendet werden, vorausgesetzt, dass sie ausreichende Homologie zu dem adressierten Gen aufweist, um RNAi zu vermitteln. Die Sequenz der dsRNA zur Verwendung bei den erfindungsgemäßen Verfahren braucht nicht bekannt zu sein. Alternativ kann die dsRNA zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung einer bekannten Sequenz entsprechen, wie z. B. der eines gesamten Gens (eines oder mehrerer) oder eines Abschnitts davon. Es gibt

keine Obergrenze für die Länge der dsRNA, die verwendet werden kann. Zum Beispiel kann die dsRNA von etwa 21 Basenpaaren (bp) des Gens bis zur vollen Länge des Gens oder mehr reichen. In einer Ausführungsform hat die in den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete dsRNA eine Länge von etwa 1000 bp. In einer anderen Ausführungsform hat die dsRNA eine Länge von etwa 500 bp. In einer weiteren Ausführungsform hat die dsRNA eine Länge von etwa 22 bp.

Die hierin beschriebenen 21-23 nt-RNAs können auf verschiedene Arten verwendet werden. Zum Beispiel können die 21-23 nt-RNA-Moleküle zur Vermittlung der RNA-Interferenz von mRNA eines Gens in einer Zelle oder einem Organismus eingesetzt werden. In einer spezifischen Ausführungsform der Offenbarung wird die 21-23 nt RNA in menschliche Zellen oder einen Menschen eingeschleust, um RNA-Interferenz in den Zellen oder in Zellen der Person zu vermitteln, beispielsweise um eine Erkrankung oder einen unerwünschten Zustand zu verhüten oder zu behandeln. Bei diesem Verfahren werden ein oder mehrere Gene adressiert, welche die Erkrankung oder den unerwünschten Zustand verursachen oder dazu beitragen, und die entsprechende mRNA (das Transkriptionsprodukt des adressierten Gens) wird durch RNAi abgebaut. In dieser Ausführungsform der Offenbarung wird eine RNA von etwa 21-23 Nucleotiden, welche die entsprechende mRNA (die mRNA des adressierten Gens) für den Abbau adressiert, in die Zelle oder den Organismus eingeschleust. Die Zelle oder der Organismus wird unter Bedingungen gehalten, unter denen der Abbau der entsprechenden mRNA auftritt, wodurch RNA-Interferenz der mRNA des Gens in der Zelle oder dem Organismus vermittelt wird. In einer besonderen Ausführungsform der Offenbarung beinhaltet das Verfahren zur Vermittlung von RNA-Interferenz eines Gens in einer Zelle die Vereinigung von doppelsträngiger RNA, die einer Sequenz des Gens entspricht, mit einem vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt, wodurch eine Kombination produziert wird. Die Kombination wird unter Bedingungen gehalten, bei denen die doppelsträngige RNA zu RNA von 21 bis 23 Nucleotiden verarbeitet wird. Die 21-23 nt RNA wird dann isoliert und in die Zelle oder den Organismus eingeschleust. Die Zelle oder der Organismus wird unter Bedingungen gehalten, bei denen der Abbau der mRNA des Gens auftritt, wodurch RNA-Interferenz des Gens in der Zelle oder dem Organismus vermittelt wird. Falls die 21-23 nt RNA in eine Zelle eingeschleust wird, in der RNAi normalerweise nicht auftritt, werden die zur Vermittlung von RNAi benötigten Faktoren in eine solche Zelle eingeschleust, oder die Expression der benötigten Faktoren wird in einer solchen Zelle induziert. Alternativ kann durch andere Verfahren (z. B. chemische Synthese, rekombinante DNA-Produktion) produzierte 21-23 nt RNA mit der gleichen oder einer ausreichend ähnlichen Zusammensetzung wie der einer 21-23 nt RNA, die als Vermittler von RNAi bekannt ist, entsprechend zur Vermittlung von RNAi eingesetzt werden. Außerdem wird offenbart, dass derartige 21-23 nt-RNAs durch Addition, Deletion, Substitution oder Modifikation eines oder mehrerer Nucleotide verändert werden können und/oder Nichtnucleotid-Materialien aufweisen können. Ferner wird eine Ex-vivo-Methode zur Behandlung von Zellen von einer Person offenbart, um ein oder mehrere Gene abzubauen, die eine Erkrankung oder einen unerwünschten Zustand verursachen oder damit verbunden sind, wie z. B. Leukämie oder AIDS. In dieser Ausführungsform der Offenbarung gewinnt man zu behandelnde Zellen von der Person unter Anwendung bekannter Verfahren (z. B. Phlebotomie oder Entnahme von Knochenmark), und 21-23 nt-RNAs, die den Abbau entsprechender mRNA(s) vermitteln, werden in die Zellen eingeschleust, die dann wieder in die Person eingebracht werden. Wenn notwendig,

können auch biochemische Komponenten, die für das Auftreten von RNAi benötigt werden, in die Zellen eingeschleust werden.

Die mRNA irgendeines Gens kann unter Anwendung der hierin beschriebenen Verfahren zur Vermittlung der Interferenz von mRNA für den Abbau adressiert werden. Zum Beispiel kann irgendeine  
5 zelluläre oder virale mRNA adressiert werden, und als Ergebnis wird die Expression des codierten Proteins (z. B. eines Onkoproteins, eines Virusproteins) vermindert. Zusätzlich kann die mRNA irgendeines Proteins, das mit einer Erkrankung oder einem unerwünschten Zustand verbunden oder dafür ursächlich ist, unter Anwendung der hierin beschriebenen Verfahren für den Abbau adressiert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein In-vitro-Verfahren zur Untersuchung der Funktion  
10 eines Gens in einer Zelle. In einer Ausführungsform dieses Verfahrens wird eine RNA-Sequenz von 21 bis 23 Nucleotiden, welche die mRNA des Gens für den Abbau adressiert, in die Zelle eingeschleust. Die Zelle wird unter Bedingungen gehalten, unter denen der Abbau von mRNA des Gens auftritt. Der Phänotyp der Zelle wird dann beobachtet und mit einer geeigneten Kontrolle verglichen, wodurch Informationen über die Funktion des Gens geliefert werden. In einer anderen Ausführungsform der Offenbarung wird  
15 doppelsträngige RNA, die einer Sequenz des Gens entspricht, mit einem vom Drosophila-Embryo abgeleiteten löslichen Extrakt unter Bedingungen vereinigt, bei denen die doppelsträngige RNA zu RNA von 21 bis 23 Nucleotiden verarbeitet wird. Die RNA von 21 bis 23 Nucleotiden wird isoliert und dann in die Zelle eingeschleust. Die Zelle wird unter Bedingungen gehalten, bei denen ein Abbau der mRNA des Gens auftritt. Der Phänotyp der Zelle wird dann beobachtet und mit einer geeigneten Kontrolle verglichen,  
20 wodurch die Funktion des Gens ermittelt wird.

Ebenfalls hierin beschrieben wird ein Verfahren, um die Fähigkeit von 21-23 nt-RNAs zur Vermittlung von RNAi einzuschätzen und insbesondere festzustellen, welche 21-23 nt RNA(s) RNAi besonders effizient vermitteln. In einer Ausführungsform des Verfahrens wird dsRNA, die einer Sequenz einer abzubauenen mRNA entspricht, mit einer nachweisbar markierten (z. B. endmarkierten, wie etwa  
25 radioaktiv markierten) mRNA und dem erfindungsgemäßen löslichen Extrakt vereinigt, wodurch eine Kombination produziert wird. Die Kombination wird unter Bedingungen gehalten, unter denen die doppelsträngige RNA verarbeitet und die mRNA abgebaut wird. Die Stellen der wirksamsten Spaltung werden kartiert, indem die Wanderung der markierten mRNA-Spaltprodukte mit Markern von bekannter Länge verglichen wird. Dann werden diese Stellen überbrückende 21-mere konstruiert und auf ihre  
30 Effizienz bei der Vermittlung von RNAi getestet.

Alternativ kann der hierin beschriebene Extrakt verwendet werden, um zu ermitteln, ob es ein oder mehrere bestimmte, einem Gen entsprechende Segmente der mRNA gibt, die effizienter durch RNAi adressiert werden als andere Regionen und daher besonders gut verwendbare Target-Stellen sein können. In einer Ausführungsform der Offenbarung wird dsRNA, die einer Sequenz einer abzubauenen, markierten  
35 mRNA eines Gens entspricht, mit einem löslichen Extrakt vereinigt, der RNAi vermittelt, wodurch eine Kombination produziert wird. Die resultierende Kombination wird unter Bedingungen gehalten, unter denen die dsRNA abgebaut wird, und die Stellen an der mRNA, die besonders effizient gespalten werden, werden unter Anwendung bekannter Verfahren identifiziert, wie z. B. durch Vergleich mit bekannten Größenstandards auf einem Sequenzierungsgel.

## ÜBERSICHT ÜBER DIE BEISPIELE

Die biochemische Analyse von RNAi ist mit der Entwicklung des In-vitro-Drosophila-Embryo-Lysats möglich geworden, das die in Beispiel 1 beschriebene dsRNA-abhängige Stilllegung der Genexpression rekapituliert (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). In dem In-vitro-System adressiert dsRNA, aber nicht Sense- oder Antisense-RNA, eine entsprechende mRNA für den Abbau, beeinflusst jedoch nicht die Stabilität einer nicht verwandten Kontroll-mRNA. Außerdem potenziert eine Vorinkubation der dsRNA in dem Lysat ihre Aktivität für den Abbau der Target-mRNA, woraus sich schließen lässt, dass die dsRNA durch Bindungsproteine im Extrakt oder durch kovalente Modifikation in eine aktive Form umgewandelt werden muss (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)).

Hierin wird die Entwicklung eines zellfreien Systems aus Drosophila-Embryonen im Stadium des synzytialen Blastoderms beschrieben, die viele der Merkmale von RNAi rekapituliert. Die bei dieser Reaktion beobachtete Interferenz ist sequenzspezifisch, wird durch dsRNA, aber nicht durch einzelsträngige RNA gefördert, funktioniert durch spezifischen mRNA-Abbau, erfordert eine Mindestlänge der dsRNA und ist besonders effizient mit langer dsRNA. Überdies potenziert Vorinkubation von dsRNA ihre Aktivität. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass RNAi durch sequenzspezifische Prozesse in löslichen Reaktionen vermittelt wird.

Wie in Beispiel 2 beschrieben, wurde das In-vitro-System benutzt, um die Bedingungen von RNAi zu analysieren und das Schicksal der dsRNA und der mRNA zu ermitteln. RNAi in vitro erfordert ATP, erfordert aber weder mRNA-Translation noch Erkennung der 7-Methylguanosin-Kappe der adressierten mRNA. Die dsRNA, aber nicht einzelsträngige RNA, wird in vitro zu einer Population von 21-23 nt-Spezies verarbeitet. Desaminierung von Adenosinen innerhalb der dsRNA scheint für die Bildung der 21-23 nt-RNAs nicht erforderlich zu sein. Wie hierin beschrieben, wird die mRNA nur in der Region gespalten, die der Sequenz der dsRNA entspricht, und die Spaltung der mRNA in Intervallen von 21-23 nt weist deutlich darauf hin, dass die 21-23 nt-Fragmente von der dsRNA die Spaltung der mRNA adressieren. Außerdem vermitteln die 21-23 nt-Fragmente RNA, wenn sie gereinigt und dem löslichen Extrakt wieder zugesetzt werden, wie in den Beispielen 3 und 4 beschrieben.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, die in keiner Weise als Einschränkung gedacht sind.

### BEISPIEL 1. GEZIELTER MRNA-ABBAU DURCH DOPPELSTRÄNGIGE RNA IN VITRO

#### Materialien und Methoden

##### RNAs

Die Rr-Luc-mRNA bestand aus der 926 nt-Rr-Luciferase-Codierungssequenz, flankiert von 25 nt einer 5'-untranslatierten Sequenz von dem pSP64-Plasmid-Polylinker und 25 nt einer 3'-untranslatierten Sequenz, die aus 19 nt der pSP64-Plasmid-Polylinkersequenz bestand, gefolgt von einer 6 nt SacI-Stelle. Die Pp-Luc-mRNA enthielt die 1653 nt Pp-Luciferase-Codierungssequenz mit einer Kpn I-Stelle, die unmittelbar vor dem Pp-Luciferase-Stoppodon eingebaut war. Die Pp-Codierungssequenz war von 5'-untranslatierten Sequenzen flankiert, die aus 21 nt pSP64-Plasmid-Polylinker bestanden, gefolgt von den 512 nt der 5'-untranslatierten Region (UTR) von der Drosophila-Buckel-mRNA und 3'-untranslatierten Sequenzen, die aus der 562 nt Buckel-3'-UTR bestanden, gefolgt von einer 6 nt Sac I-Stelle. Die verwendeten Buckel-3'-UTR-Sequenzen enthielten sechs G-U-Mutationen, welche die Funktion der Nanos-

Antwortelemente in vivo und in vitro unterbrechen. Beide Reporter-mRNAs endeten in einem in dem transkribierten Plasmid codierten 25 nt Poly(A)-Schwanz. Für beide Rr-Luc- und Pp-Luc- mRNAs wurden die Transkripte durch Run-off-Transkription aus Plasmidmatrizen erzeugt, die an einer unmittelbar auf den codierten 25 nt Poly(A)-Schwanz folgenden Nsi I-Stelle gespalten wurden. Um sicherzustellen, dass die  
5 Transkripte mit einem Poly(A)-Schwanz endeten, wurden die Nsi I-gespaltenen Transkriptionsmatrizen mit T4 DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs herausgeschnitten. Für In-vitro-Transkription wurde der SP6 mMessage mMachine-Kit (Ambion) benutzt. Unter Verwendung dieses Kits werden etwa 80% der resultierenden Transkripte mit 7-Methylguanosin verkappt. Radioaktive <sup>32</sup>P-Markierung erfolgte durch Einbau von α-<sup>32</sup>P-UTP in der Transkriptionsreaktion.

10 Für Pp-Luc entsprachen ss-, as- und dsRNA den Positionen 93 bis 597 bezüglich des Translationsstarts und ergaben eine 505 bp dsRNA. Für Rr-Luc entsprachen ss-, as- und dsRNA den Positionen 118 bis 618 bezüglich des Translationsstarts und ergaben eine 501 bp dsRNA. Die konkurrierende Drosophila-nanos-dsRNA entsprach den Positionen 122 bis 629 bezüglich des Translationsstarts und ergab eine 508 bp dsRNA. ssRNA, asRNA und dsRNA (diagrammatisch dargestellt  
15 in Fig. 1) wurden in vitro mit T7 RNA-Polymerase von Matrizen transkribiert, die durch die Polymerase-Kettenreaktion erzeugt wurden. Nach der Gelreinigung der T7 RNA-Transkripte wurde die restliche DNA-Matrix durch Behandlung mit RQ1 DNase (Promega) entfernt. Die RNA wurde dann mit Phenol und Chloroform extrahiert und dann ausgefällt und in Wasser gelöst.

#### RNA-Annealing (Reassoziaton) und native Gelelektrophorese

20 ssRNA und asRNA (0,5 µM) in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 20 mM NaCl wurden 1 min auf 95°C erhitzt, dann abgekühlt und einem Annealing von 12 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur ausgesetzt. Die RNAs wurden ausgefällt und in Lysepuffer resuspendiert (weiter unten). Zur Überwachung des Annealings wurden RNAs in einem 2%-igen Agarosegel in TBE-Puffer elektrophoretisiert und mit Ethidiumbromid gefärbt (Sambrook et al., Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press,  
25 Plainview, NY. (1989)).

#### Herstellung von Lysat

Null bis zwei Stunden alte Embryonen von Oregon R-Fliegen wurden auf mit Hefe versetztem Melasse-Agar bei 25°C gesammelt. Die Embryonen wurden 4 bis 5 Minuten in 50 Vol.-% Bleichmittel dechorioniert, mit Wasser gewaschen, trocken getupft und in einen gekühlten Potter-Elvehjem-  
30 Gewebehomogenisator (Kontes) übertragen. Die Embryonen wurden bei 4°C in 1 ml Lysepuffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 2 mM Magnesiumacetat) lysiert, der 5 mM Dithiothreitol (DTT) und 1 mg/ml Pefabloc SC (Boehringer-Mannheim) pro Gramm feuchter Embryonen enthielt. Das Lysat wurde 25 Minuten mit 14500 × g bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde in Aliquoten in flüssigem Stickstoff schnellgefroren und bei -80°C gelagert.

#### Reaktionsbedingungen

Lysatherstellung und Reaktionsbedingungen wurden von den durch Hussain und Leibowitz beschriebenen abgeleitet (Hussain und Leibowitz, Gene 46:13-23 (1986)). Die Reaktionen enthielten 50 Vol.-% Lysat, mRNAs (10 bis 50 pM Endkonzentration) und 10 Vol.-% Lysepuffer, der die ssRNA, asRNA oder dsRNA (10 nM Endkonzentration) enthielt. Jede Reaktion enthielt außerdem 10 mM  
40 Creatinphosphat, 10 µg/ml Creatinphosphokinase, 100 µM GTP 100, µM UTP, 100 µM CTP, 500 µM



ATP, 5  $\mu$ M DTT, 0,1 Einheit/ml RNasin (Promega) und 100  $\mu$ M jeder Aminosäure. Die Endkonzentration von Kaliumacetat wurde auf 100 mM eingestellt. Für Standardbedingungen wurden die Reaktionen auf Eis zusammengestellt und dann 10 Minuten bei 25°C vorinkubiert, bevor mRNA zugesetzt wurde. Nach Zugabe von mRNAs wurde die Inkubation weitere 60 Minuten fortgeführt. Der Vorinkubationsschritt von 10 Minuten wurde für die Experimente in den Figuren 3A-3C und 5A-5C weggelassen. Die Reaktionen wurden mit vier Volumina 1,25× Passiv-Lysepuffer (Promega) gelöscht. Pp- und Rr-Luciferase-Aktivität wurde in einem Monolight 2010-Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory) unter Verwendung des Dual-Luciferase-Reporter-Assaysystems (Promega) nachgewiesen.

#### RNA-Stabilität

Reaktionen mit  $^{32}$ P-radioaktiv markierter mRNA wurden durch Zugabe von 40 Volumina 2× PK-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2 g/100ml Natriumdodecylsulfat) gelöscht. Proteinase K (E. M. Merck; in Wasser gelöst) wurde bis zu einer Endkonzentration von 465  $\mu$ g/ml zugesetzt. Die Reaktionen wurden dann 15 Minuten bei 65°C inkubiert, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und mit einem gleichen Volumen Isopropanol ausgefällt. Die Reaktionen wurden durch Elektrophorese in einem Formaldehyd/Agarose-Gel (0,8 g/100 ml) analysiert (Sambrook et al., Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1989)). Radioaktivität wurde nachgewiesen, indem das Agarosegel [unter Vakuum auf Nytran Plus-Membran (Amersham) getrocknet] auf eine Bildplatte (Fujix) aufgenommen und unter Verwendung eines (Bio-Bildanalysators) Fujix Bas 2000 und der Software Image Gauge 3.0 (Fujix) quantitativ bestimmt wurde.

#### Handelsübliche Lysate

Unbehandelte Kaninchen-Retikulozytenlysate- (Ambion) und Weizenkeimextrakt- (Ambion) Reaktionen wurden nach den Anweisungen des Herstellers zusammengestellt. dsRNA wurde in dem Lysat 10 Minuten bei 27°C (Weizenkeime) oder 30°C (Retikulozytenlysate) vor der Zugabe von mRNAs inkubiert.

#### Ergebnisse und Diskussion

Um zu beurteilen, ob dsRNA die Genexpression in vitro spezifisch blockieren konnte, wurden von zwei verschiedenen Luciferasegenen abgeleitete Reporter-mRNAs verwendet, die sowohl in der Sequenz als auch in der Spezifität für Luciferin-Substrat nicht verwandt sind: Renilla reniformis- (Seequallen) Luciferase (Rr-Luc) und Photuris pennsylvanica- (Glühwürmchen-) Luciferase (Pp-Luc). Aus einem Gen erzeugte dsRNA wurde zur Adressierung dieser Luciferase-mRNA verwendet, während die andere Luciferase-mRNA eine in der gleichen Reaktion kotranslatierte interne Kontrolle war. dsRNAs von etwa 500 bp wurden durch Transkription von Polymerase-Kettenreaktionsprodukten aus den Rr-Luc- und Pp-Luc-Genen hergestellt. Jede dsRNA begann ~100 bp stromabwärts vom Translationsstart (Fig. 1). Sense- (ss-) und Antisense- (as-) RNA wurden in vitro transkribiert und miteinander reassoziert, um dsRNA zu produzieren. Es wurde eine native Gelelektrophorese der individuellen Rr 501 und Pp 505 nt als den zur Bildung der Rr- und Pp-dsRNAs verwendeten RNA und ssRNA durchgeführt. Die ssRNA, asRNA und dsRNAs wurden jeweils auf ihre Fähigkeit getestet, die Expression ihrer zugehörigen bzw. verwandten mRNA, aber nicht die Expression der nicht verwandten internen Kontroll-mRNA spezifisch zu blockieren.

Die ssRNA, asRNA oder dsRNA wurde 10 Minuten in einer Reaktion inkubiert, die Drosophila-Embryo-Lysat enthielt, dann wurden sowohl Pp-Luc als auch Rr-Luc zugesetzt, und die Inkubation wurde

weitere 60 Minuten fortgeführt. Das Drosophila-Embryo-Lysat translatiert effizient exogen transkribierte mRNA unter den angewandten Bedingungen. Die Mengen der Pp-Luc- und Rr-Luc-Enzymaktivitäten wurden gemessen und zur Berechnung der Verhältnisse Pp-Luc/Rr-Luc (Fig. 2A) oder Rr-Luc/Pp-Luc (Fig. 2B) verwendet. Um den Vergleich verschiedener Experimente zu erleichtern, wurden die Verhältnisse von  
5 jedem Experiment auf das Verhältnis normiert, das für eine Kontrolle beobachtet wurde, bei welcher der Reaktion Puffer anstelle von ssRNA, asRNA oder dsRNA zugesetzt wurde.

Fig. 2A zeigt, dass eine Konzentration von 10 nM der 505 bp dsRNA, die mit einem Abschnitt der Sequenz des Pp-Luc-Gens identisch ist, spezifisch die Expression der Pp-Luc-mRNA inhibierte, aber die Expression der internen Kontrolle Rr-Luc nicht beeinflusste. Weder ssRNA noch asRNA beeinflusste die  
10 Expression von Pp-Luc oder der internen Kontrolle Rr-Luc. Folglich wurde die Expression von Pp-Luc spezifisch durch ihre zugehörige dsRNA inhibiert. Umgekehrt inhibierte eine Konzentration von 10 nM der direkt gegen die Rr-Luc mRNA gerichteten 501 bp dsRNA spezifisch die Expression von Rr-Luc, aber nicht die der internen Kontrolle Pp-Luc (Fig. 2B). Ferner hatten vergleichbare ssRNA- oder asRNA-Spiegel wenig oder keine Auswirkung auf die Expression der einen oder anderen Reporter-mRNA. Im Durchschnitt  
15 verringerte dsRNA die spezifische Luciferase-Expression um 70% in diesen Experimenten, in denen die Luciferase-Aktivität nach 1-stündiger Inkubation gemessen wurde. In anderen Experimenten, in denen die Translationskapazität der Reaktion durch Zugabe von frischem Lysat und Reaktionskomponenten ergänzt wurde, wurde eine weitere Verringerung der adressierten Luciferase-Aktivität bezüglich der internen Kontrolle beobachtet.

20 Die Fähigkeit von dsRNA, aber nicht von asRNA, Genexpression in diesen Lysaten zu inhibieren, ist nicht bloß eine Folge der größeren Stabilität der dsRNA (Halbwertszeit etwa 2 Stunden) gegenüber den einzelsträngigen RNAs (Halbwertszeit ~ 10 min). Mit einer 7-Methylguanosin-Kappe transkribierte ssRNA und asRNA waren in dem Lysat ebenso stabil wie nicht verkappte dsRNA, inhibieren aber nicht die Genexpression. Dagegen blockiert aus der verkappten ssRNA und asRNA gebildete dsRNA spezifisch die  
25 Expression der adressierten mRNA.

Effektive RNAi in Drosophila erfordert die Injektion von etwa 0,2 fmol dsRNA in einen Embryo im Stadium des synzytialen Blastoderms (Kennerdell und Carthew, Cell 95:1017-1026 (1998); Carthew, [www1.pitt.edu/~carthew/manual/RNAi\\_Protocol.html](http://www1.pitt.edu/~carthew/manual/RNAi_Protocol.html) (1999)). Da das mittlere Volumen eines Drosophila-Embryos etwa 7,3 nl beträgt, entspricht dies einer intrazellulären Konzentration von etwa 25 nM (Mazur et  
30 al., Cryobiology 25:543-544 (1988)). Die Genexpression im Drosophila-Lysat wurde durch eine vergleichbare Konzentration von dsRNA (10 nM) inhibiert, aber eine Absenkung der dsRNA-Konzentration um den Faktor 10 verminderte den Grad der spezifischen Interferenz. 10 nM dsRNA entspricht einem 200-fachen Überschuss von dsRNA gegenüber der Target-mRNA, der dem Lysat zugesetzt wird. Um zu prüfen, ob dieser dsRNA-Überschuss einen zeit- und/oder konzentrationsabhängigen  
35 Schritt widerspiegeln könnte, in dem die eingesetzte dsRNA in eine für genspezifische Interferenz aktive Form umgewandelt wurde, wurde die Auswirkung einer Vorinkubation der dsRNA auf ihre Fähigkeit untersucht, die Expression ihrer zugehörigen mRNA zu inhibieren. Da die Translationskapazität der Lysate nach 30 Minuten Inkubation bei 25°C erheblich vermindert wird (unveröffentlichte Beobachtungen), wollte man sicherstellen, dass alle für RNAi notwendigen Faktoren während der gesamten Vorinkubationszeit  
40 aktiv blieben. Daher wurde alle 30 Minuten eine Reaktion, die dsRNA und Lysat enthielt, mit einer frischen

Reaktion vermischt, die nicht inkubiertes Lysat enthielt (Fig. 3A). Nach sechs aufeinanderfolgenden seriellen Transfers, die sich über 3 Stunden Vorinkubation erstreckten, wurde die dsRNA, jetzt um den Faktor 64 bezüglich ihrer ursprünglichen Konzentration verdünnt, 60 Minuten mit Lysat und 50 pM Target-mRNA inkubiert. Schließlich wurden die Pp-Luc- und Rr-Luc-Enzymspiegel gemessen. Zum Vergleich wurde die eingesetzte dsRNA-Menge (10 nM) 32-fach in Puffer verdünnt, und ihre Fähigkeit zur Erzeugung von genspezifischer dsRNA-Interferenz in Abwesenheit irgendeines Vorinkubationsschritts wurde beurteilt.

Die Vorinkubation der dsRNA in Lysat potenzierte ihre Fähigkeit zur Inhibition einer spezifischen Genexpression erheblich. Während die 32-fach verdünnte dsRNA keine Wirkung zeigte, war die vorinkubierte dsRNA, innerhalb des experimentellen Fehlers, ebenso leistungsfähig wie unverdünnte dsRNA, obwohl sie 64-fach verdünnt worden war. Potenzierung der dsRNA durch Vorinkubation wurde für dsRNAs beobachtet, die sowohl die Pp-Luc-mRNA (Fig. 3B) als auch die Rr-Luc-mRNA (Fig. 3C) adressierten. Unter Berücksichtigung der 64-fachen Verdünnung ermöglichte die durch Vorinkubation erteilte Aktivierung die Inhibition von 50 pM Target-mRNA durch eine Konzentration von 156 pM dsRNA. Ferner kann die Verdünnung der "aktivierten" dsRNA wirksam sein, ist aber nicht geprüft worden. Wir beobachten, dass, obwohl beide getesteten dsRNAs durch das Vorinkubationsverfahren aktiviert wurden, jede ihre Spezifität, mit der Expression nur der mRNA zu interferieren, zu der sie homolog ist, voll bewahrte. Eine weitere Untersuchung der Reaktionen kann einen Weg zur Ermittlung des Mechanismus der dsRNA-Potenzierung liefern.

Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass Vorinkubation der dsRNA Fähigkeit zur Inhibition der Genexpression in diesen Lysaten steigert, ist, dass spezifische Faktoren die dsRNA entweder modifizieren oder sich mit ihr verbinden. Dementsprechend könnte die Zugabe steigender dsRNA-Anteile zu der Reaktion derartige Faktoren titrieren und den Grad der genspezifischen Interferenz verringern, die durch eine zweite dsRNA mit nicht verwandter Sequenz verursacht wird. Sowohl für Pp-Luc-mRNA als auch für Rr-Luc-mRNA verringerte die Zugabe steigender Konzentrationen der nicht verwandten *Drosophila nanos*-dsRNA zur Reaktion den Grad der genspezifischen Interferenz, die durch die Reporter-mRNA adressierende dsRNA verursacht wurde (Fig. 4). Keine der getesteten Konzentrationen von *nanos*-dsRNA beeinflusste die Transkriptionsspiegel der nicht adressierten mRNA, was demonstriert, dass die *nanos*-dsRNA spezifisch Faktoren titrierte, die an der genspezifischen Interferenz beteiligt waren, und nicht Komponenten des Translationsmechanismus. Der bzw. die begrenzende(n) Faktor(en) wurde(n) durch die Zugabe von etwa 1000 nM dsRNA titriert, einem 200-fachen Überschuss über die 5 nM dsRNA, die zur Erzeugung spezifischer Interferenz verwendet werden.

Interferenz in vitro könnte entweder eine spezifische Inhibition der mRNA-Translation oder die gezielte Zerstörung der spezifischen mRNA widerspiegeln. Um zwischen diesen zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden die Schicksale der Pp-Luc- und Rr-Luc-mRNAs unter Verwendung von mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierten Substraten direkt untersucht. Die Stabilität von 10 nM Pp-Luc-mRNA oder Rr-Luc-mRNA wurde untersucht, die in Lysat entweder mit Puffer oder mit 505 bp Pp-dsRNA (10 nM) inkubiert wurden. Proben wurden nach den angegebenen Zeiten deproteinisiert, und die mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierten mRNAs wurden dann durch denaturierende Gelelektrophorese aufgelöst. In Abwesenheit von dsRNA waren sowohl die Pp-Luc- als auch die Rr-Luc-mRNAs in den Lysaten stabil, wobei ~ 75% der

eingesetzten mRNA nach 3 Stunden Inkubation übrig blieben. (Etwa 25% der eingesetzten mRNA werden in der Reaktion schnell abgebaut und repräsentieren wahrscheinlich nicht verkappte mRNA, die durch den In-vitro-Transkriptionsprozess erzeugt wird.) In Anwesenheit von dsRNA (10 nM, 505 bp), welche die Pp-Luc-mRNA adressiert, blieben nach 3 Stunden weniger als 15% der Pp-Luc-mRNA übrig (Fig. 5A). Wie erwartet, blieb die Rr-Luc-mRNA in Anwesenheit der Pp-Luc-mRNA adressierenden dsRNA stabil. Umgekehrt verursachte Rr-Luc-mRNA adressierende dsRNA (10 nM, 501 bp) die Zerstörung der Rr-Luc-mRNA, hatte aber keine Auswirkung auf die Stabilität von Pp-Luc-mRNA (Fig. 5B). Folglich verursachte die dsRNA spezifisch einen beschleunigten Zerfall der mRNA, zu der sie homolog ist, ohne Auswirkung auf die Stabilität der nicht verwandten Kontroll-mRNA. Dieser Befund lässt erkennen, dass in vivo, zumindest bei Drosophila, die Wirkung von dsRNA darin besteht, die Target-mRNA direkt zu destabilisieren, und nicht die subzelluläre Lokalisierung der mRNA zu verändern, indem sie zum Beispiel bewirkt, dass die mRNA spezifisch im Nucleus zurückgehalten wird, was zu unspezifischem Abbau führt.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass RNAi in vivo zu niedrigeren zytoplasmatischen mRNA-Spiegeln führt, wie durch In-situ-Hybridisierung (Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)) und Northern Blotting (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998)) gemessen. Northern-Blot-Analysen bei Trypanosomen und Hydra lassen darauf schließen, dass dsRNA typischerweise mRNA-Spiegel um weniger als 90% absenkt (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998); Lohmann et al., Dev. Biol. 214:211-214 (1999)). Die hier dargestellten Daten zeigen, dass In-vitro-mRNA-Spiegel nach drei Stunden Inkubation um 65 bis 85% reduziert werden, eine Wirkung, die mit Beobachtungen in vivo vergleichbar ist. Sie stimmen auch mit dem Befund überein, dass RNAi in C. elegans posttranskriptional ist (Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)). Die einfachste Erklärung für die spezifischen Wirkungen auf die Proteinsynthese ist, dass sie die beschleunigte Zerfallsrate von RNA widerspiegeln. Die Ergebnisse schließen jedoch unabhängige, aber spezifische Wirkungen auf die Translation sowie die Stabilität nicht aus.

In vivo scheint RNAi eine Mindestlänge von dsRNA zu erfordern (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:14687-14692 (1998)). Es wurde die Fähigkeit von RNA-Duplexen mit Längen von 49 bp, 149 bp, 505 bp und 997 bp (diagrammatisch in Fig. 1 dargestellt) eingeschätzt, den Abbau der Pp-Luc-mRNA in vivo zu adressieren. In guter Übereinstimmung mit In-vivo-Beobachtungen war die 49 bp dsRNA in vitro ineffektiv, während die 149 bp dsRNA die Zersetzung der mRNA nur leicht förderte, und die 505 und 997 bp dsRNAs zu starkem mRNA-Abbau führten (Fig. 5C). 50 bp dsRNA, die andere Abschnitte der mRNA adressiert, führt zu nachweisbarem mRNA-Abbau, obwohl nicht so stark wie der für 500 bp dsRNA festgestellte. Folglich vermitteln zwar einige kurze dsRNAs nicht RNAi, aber andere von etwa gleicher Länge, aber unterschiedlicher Zusammensetzung, sind dazu imstande.

Es wurde untersucht, ob die in Drosophila-Lysaten beobachtete genspezifische Interferenz eine allgemeine Eigenschaft zellfreier Translationssysteme war. Die Wirkungen von dsRNAs auf die Expression von Pp-Luc- und Rr-Luc-mRNA wurden in handelsüblichen Weizenkeimextrakten und Kaninchen-Retikulozytenlysaten untersucht. Die Zugabe von 10 nM ssRNA, asRNA oder dsRNA hatte keine Wirkung auf die eine oder andere Reporter-mRNA in Weizenkeimextrakten. Dagegen verursachte die Zugabe von 10 nM dsRNA zu dem Kaninchen-Retikulozytenlysat eine starke und schnelle, unspezifische Verminderung

der mRNA-Stabilität. Zum Beispiel führte die Zugabe von Rr-Luc-dsRNA zum Abbau sowohl von Rr-Luc- als auch von Pp-Luc-mRNAs innerhalb von 15 Minuten. Die gleiche unspezifische Wirkung wurde nach Zugabe von Pp-Luc-dsRNA beobachtet. Die unspezifische Zerstörung von mRNA, die durch die Zugabe dsRNA zu dem Kaninchen-Retikulozytenlysat induziert wurde, spiegelt vermutlich die früher beobachtete Aktivierung von RNase L durch dsRNA wider (Clemens und Williams, Cell 13:565-572 (1978); Williams et al., Nucleic Acids Res. 6:1335-1350 (1979); Zhou et al., Cell 72:753-765 (1993); Matthews, Interactions between Viruses and the Cellular Machinery for Protein Synthesis (Wechselwirkungen zwischen Viren und dem zellulären Mechanismus für Proteinsynthese). In Translational Control (Hrsg. J. Hershey, M. Mathews und N. Sonenberg), S. 505-548. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1996)). Maus-Zelllinien mit fehlenden dsRNA-induzierten antiviralen Wegen sind kürzlich beschrieben worden (Zhou et al., Virology 258:435-440 (1999)) und können bei der Suche nach Säugetier-RNAi brauchbar sein. Obwohl bekannt ist, dass RNAi in bestimmten Säugetierzellen existiert (Wianny und Zernicka-Goetz, Nat. Cell Biol. 2: 70-75 (2000)), wird in vielen Säugetierzelltypen ihre Gegenwart wahrscheinlich durch die schnelle Induktion unspezifischer antiviraler Antworten überdeckt.

Gezielte Zerstörung spezifischer mRNA durch dsRNA ist charakteristisch für RNAi, die in vielen Organismen, einschließlich Drosophila, in vivo beobachtet worden ist. Das oben beschriebene System rekapituliert in einer Reaktion in vitro viele Aspekte von RNAi. Die adressierte mRNA wird spezifisch abgebaut, während in der gleichen Lösung anwesende, nicht verwandte mRNAs nicht beeinflusst werden. Der Prozess ist besonders effizient bei dsRNAs von mehr als 150 bp Länge. Die dsRNA-spezifische Abbaureaktion in vitro ist wahrscheinlich bei vielen, wenn nicht allen mRNAs verbreitet, da beobachtet wurde, dass sie zwei nicht verwandte Gene nutzt.

Die hierin beschriebene Größe der Wirkungen auf die Stabilität von mRNA in vitro ist vergleichbar mit der in vivo beobachteten (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:14687-14692 (1998); Lohmann et al., Dev. Biol., 214:211-214 (1999)). Die Reaktion in vitro erfordert jedoch einen Überschuss an dsRNA bezüglich mRNA. Im Gegensatz dazu können wenige dsRNA-Moleküle pro Zelle die Genexpression in vivo inhibieren (Fire et al., Nature, 391: 806-811 (1998); Kennerdell und Carthew, Cell, 95:1017-1026 (1998)). Der Unterschied zwischen der Stöchiometrie von dsRNA zur Adressierung von mRNA in vivo und in vitro dürfte insofern nicht überraschend sein, als die meisten In-vitro-Reaktionen weniger effizient sind als ihre entsprechenden In-vivo-Prozesse. Interessanterweise bewirkte Inkubation der dsRNA in dem Lysat eine starke Potenzierung ihrer Aktivität für RNAi, was erkennen lässt, dass sie entweder modifiziert oder mit anderen Faktoren assoziiert wird oder beides. Vielleicht ist eine kleine Anzahl von Molekülen bei der Inhibition der adressierten mRNA in vivo effektiv, da die injizierte dsRNA durch einen ähnlichen Prozess aktiviert worden ist wie den, der hier für RNAi in Drosophila-Lysaten beschrieben wird.

## BEISPIEL 2. DOPPELSTRÄNGIGE RNA LENKT DIE ATP-ABHÄNGIGE SPALTUNG VON MRNA IN INTERVALLEN VON 21 BIS 23 NUCLEOTIDEN

### Methoden und Materialien

#### In-vitro-RNAi

In-vitro-RNAi-Reaktionen und Lysat-Herstellung waren, wie in Beispiel 1 beschrieben (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)), außer dass die Reaktion 0,03 g/ml Creatinkinase, 25 µM

Creatinphosphat (Fluka) und 1 mM ATP enthielt. Creatinphosphat wurde für jedes Experiment frisch in 500 mM Wasser aufgelöst. GTP wurde aus den Reaktionen weggelassen, außer in den Figuren 2 und 3.

#### RNA-Synthese

Pp-luc- und Rr-Luc-mRNAs und Pp- und Rr-dsRNAs (einschließlich dsRNA 'B' in Fig. 6) wurden durch In-vitro- Transkription synthetisiert, wie früher beschrieben (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Um Transkriptionsmatrizen für dsRNA 'C' zu erzeugen, war der 5'-Sense-RNA-Primer gcgtaatacgaactactataGAACAAAGGAAACGGATGAT (SEQ ID Nr.: 2), und der 3'-Sense-RNA-Primer war GAAGAAGTTATTCTCCAAAA (SEQ ID Nr.: 3; der 5'-asRNA-Primer war gcgtaatacgaactactataGAAGAAGTTATTCTCCAAAA (SEQ ID Nr.: 4), und der 3'-asRNA-Primer war GAACAAAGGAAACGGATGAT (SEQ ID Nr.: 5). Für dsRNA'A' war der 5'-Sense-RNA-Primer gcgtaatacgaactactataGTAGCGCGGTGTATTATACC (SEQ ID Nr.: 6), und der 3'-Sense-RNA-Primer war GTACAACGTCAGGTTTACCA (SEQ ID Nr.: 7); der 5'-asRNA-Primer war gcgtaatacgaactactataGTACAACGTCAGGTTTACCA (SEQ ID Nr.: 8), und der 3'-asRNA-Primer war GTAGCGCGGTGTATTATACC (SEQ ID Nr.: 9) (Kleinbuchstaben: T7-Promotorsequenz).

mRNAs wurden mit Guanylyltransferase (Gibco/BRL), S-Adenosylmethionin (Sigma), and  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-GTP (3000 Ci/mmol; New England Nuclear) gemäß den Herstelleranweisungen am 5'-Ende markiert. Radioaktiv markierte RNAs wurden durch Poly(A)-Selektion unter Verwendung des Poly(A) Tract III-Kits (Promega) gereinigt. Nicht radioaktive RNAs mit 7-Methylguanosin- und Adenosin-Kappe wurden bei In-vitro-Transkriptionsreaktionen mit 5-fachem Überschuss von 7-Methyl-G(5')ppp(5')G oder A(5')ppp(5')G bezüglich GTP synthetisiert. Kappen-Analoge wurden von New England Biolabs bezogen.

#### ATP-Abreicherung und Inhibition der Proteinsynthese

ATP wurde abgereichert, indem das Lysat 10 Minuten bei 25°C mit 2 mM Glucose und 0,1 Einheit/ml Hexokinase (Sigma) inkubiert wurde. Proteinsynthese-Inhibitoren wurden von Sigma bezogen und in absolutem Ethanol als 250-fach konzentrierte Ansätze aufgelöst. Die Endkonzentrationen von Inhibitoren in der Reaktion waren: Anisomycin, 53 mg/ml; Cycloheximid, 100 mg/ml; Chloramphenicol, 100 mg/ml. Die relative Proteinsynthese wurde durch Aktivitätsmessung des durch Translation der Rr-Luc-mRNA in der RNAi nach 1 Stunde produzierten Rr-Luciferase-Proteins bestimmt, wie früher beschrieben (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)).

#### Analyse der dsRNA-Verarbeitung

Intern mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP markierte dsRNAs (505 bp Pp-Luc oder 501 bp Rr-Luc) oder mit 7-Methylguanosin verkappte Rr-Luc-Antisense-RNA (501 nt) wurden bei einer Endkonzentration von 5 nM in Anwesenheit oder Abwesenheit von unmarkierten mRNAs in Drosophila-Lysat zwei Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 2x-Proteinase K-Puffer gestoppt und deproteinisiert, wie früher beschrieben (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-3197 (1999)). Die Produkte wurden durch Elektrophorese in 15% oder 18% Polyacrylamid-Sequenzierungsgelen analysiert. Längenstandards wurden durch vollständige RNase T1-Verdauung von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP-markierten 501 nt Rr-Luc-Sense-RNA und -asRNA erzeugt.

Zur Analyse der mRNA-Spaltung wurde radioaktiv 5'-<sup>32</sup>P markierte mRNA (oben beschrieben) mit dsRNA inkubiert, wie früher beschrieben (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-3197 (1999)), und durch Elektrophorese in 5% (Fig. 5B) und 6% (Fig. 5C) Polyacrylamid-Sequenzierungsgelen analysiert.

Längenstandards waren unter anderem im Handel erhältliche RNA-Größenstandards (FMC Bioproducts), radioaktiv markiert mit Guanylyltransferase, wie oben beschrieben, und fragmentiert durch partielle alkalische Hydrolyse, und RNase T1-Leitern, die aus der radioaktiv 5'-markierten mRNA erzeugt wurden.

#### Desaminierungsanalyse

5 Intern mit  $^{32}\text{P}$ -ATP markierte dsRNAs (5 nM) wurden in Drosophila-Lysat 2 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Deproteinisierung wurden Proben auf 12%-igen Sequenzierungsgelen verarbeitet, um Vollängen-dsRNAs von den 21-23 nt-Produkten zu trennen. RNAs wurden über Nacht in 0,3 M NaCl aus den Gelstücken eluiert, mit Ethanol ausgefällt, durch Zentrifugieren aufgefangen und in 20 µl Wasser wiederaufgelöst. Die RNA wurde mit Nuclease P1 zu Nucleosid-5-  
10 phosphaten hydrolysiert (10 µl Reaktion enthielt 8 µl RNA in Wasser, 30 mM KOAc, pH 5,3, 10 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 10 µg oder 3 Einheiten Nuclease P1, 3 Stunden, 50°C). Proben (1 ml) wurden zusammen mit nicht radioaktiven 5-Mononucleiden [0,05 OD-Einheiten (OD = opt. Dichte) ( $A_{26}$ ) von pA, pC, pG, pI und pU] auf Cellulose-HPTLC-Platten (EM Merck) getupft und in der ersten Dimension in Isobuttersäure/25%  
15 Ammoniak/Wasser (66/1/33, v/v/v) und in der zweiten Dimension in 0,1M Natriumphosphat, pH 6,8/Ammoniumsulfat/1-Propanol (100/60/2, v/w/v; Silberklang et al., 1979) getrennt. Die Wanderung der nicht radioaktiven Standards wurde durch UV-Schattierung bestimmt.

#### Ergebnisse und Diskussion

##### RNAi erfordert ATP

Wie in Beispiel 1 beschrieben, rekapitulieren Drosophila-Embryo-Lysate RNAi originalgetreu  
20 (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Früher wurde die dsRNA-vermittelte Stilllegung eines Gens durch Messung der Synthese von Luciferaseprotein aus der adressierten mRNA überwacht. Daher enthielten diese RNAi-Reaktionen ein ATP-regenerierendes System, das für die effiziente Translation der mRNA benötigt wurde. Um zu prüfen, ob ATP tatsächlich für RNAi erforderlich war, wurden die Lysate durch Behandlung mit Hexokinase und Glucose, die ATP in ADP umwandelt, an ATP abgereichert, und  
25 RNAi wurde durch Verfolgen des Schicksals von mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierter Renilla reniformis-Luciferase-(Rr-Luc-)mRNA direkt überwacht (Fig. 6). Behandlung mit Hexokinase und Glucose reduzierte den endogenen ATP-Spiegel im Lysat von 250 µM auf unter 10 µM. Die ATP-Rückgewinnung erforderte sowohl exogenes Creatinphosphat als auch Creatinkinase, die den Transfer eines energiereichen Phosphats von Creatinphosphat zu ADP bewirkt. Wenn ATP-abgereicherte Extrakte getrennt entweder mit  
30 Creatinphosphat oder mit Creatinkinase ergänzt wurden, wurde keine RNAi beobachtet. Daher erfordert RNAi in vitro ATP. Wenn ATP, Creatinphosphat und Creatinkinase alle zusammen Reaktionen zugesetzt wurden, die das ATP-abgereicherte Lysat enthielten, wurde der dsRNA-abhängige Abbau der Rr-Luc-mRNA wiederhergestellt (Fig. 6). Die Zugabe von exogenem ATP war für effiziente RNAi in dem abgereicherten Lysat nicht erforderlich, vorausgesetzt, dass sowohl Creatinphosphat als auch Creatinkinase  
35 anwesend waren, was demonstriert, dass die endogene Konzentration (250 mM) von Adenosin-Nucleotid ausreicht, um RNAi zu unterstützen. RNAi mit einer Photinus pyralis-Luciferase-(Pp-Luc-)mRNA war gleichfalls ATP-abhängig.

Die Stabilität der Rr-Luc-mRNA in Abwesenheit von Rr-dsRNA war in ATP-abgereicherten Lysaten gegenüber der beobachteten reduziert, wenn das Energierückgewinnungssystem einbezogen wurde,  
40 aber der Zerfall der mRNA unter diesen Bedingungen wies nicht die schnelle Zerfallskinetik auf, die für

RNAi in vitro charakteristisch ist, noch erzeugte er die stabilen mRNA-Spaltprodukte, die für dsRNA-gelenkte RNAi charakteristisch sind. Diese Experimente beweisen nicht, ob der ATP-Bedarf für RNAi direkt ist, was ATP in einem oder mehreren Schritten im RNAi-Mechanismus impliziert, oder indirekt, und eine Rolle für ATP bei der Aufrechterhaltung hoher Konzentrationen eines anderen Nucleosidtriphosphats in dem Lysat widerspiegelt.

#### Translation ist für RNAi in vitro nicht erforderlich

Der Bedarf an ATP ließ darauf schließen, dass RNAi mit einer mRNA-Translation gekoppelt sein könnte, einem äußerst energieabhängigen Prozess. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden der Reaktion verschiedene Inhibitoren der Proteinsynthese zugesetzt, indem eine denaturierende Agarosegel-Analyse von radioaktiv 5'-<sup>32</sup>P-markierter Pp-Luc-mRNA nach Inkubation über angegebene Zeiten in einer Standard-RNAi-Reaktion mit und ohne Proteinsynthese-Inhibitoren angesetzt wurde. Getestet wurden die eukaryotischen Translationsinhibitoren Anisomycin, ein Inhibitor der anfänglichen Bildung von Peptidbindungen, Cycloheximid, ein Inhibitor der Peptidkettenverlängerung, und Puromycin, eine tRNA-Nachbildung, die vorzeitigen Translationsabbruch verursacht (Cundliffe, Antibiotic Inhibitors of Ribosome Function (Antibiotische Inhibitoren der Ribosomfunktion). In The Molecular Basis of Antibiotic Action, E. Gale, E. Cundliffe, P. Reynolds, M. Richmond und M. Warning, Hrsg. (New York: Wiley), S. 402-547. (1981)). Jeder dieser Inhibitoren reduzierte die Proteinsynthese in dem Drosophila-Lysat um mehr als den Faktor 1900 (Fig. 7A). Im Gegensatz dazu hatte Chloramphenicol, ein Inhibitor der mitochondrialen Drosophila-Proteinsynthese (Page und Orr-Weaver, Dev. Biol., 183:195-207 (1997)), keine Wirkung auf die Translation in den Lysaten (Fig. 7A). Trotz der Anwesenheit von Anisomycin, Cycloheximid oder Chloramphenicol erfolgte die RNAi mit normaler Effizienz. Puromycin bewirkte gleichfalls keine Störung der effizienten RNAi. Daher ist die Proteinsynthese für RNAi in vitro nicht erforderlich.

Der Translationsstart ist ein ATP-abhängiger Prozess, der die Erkennung der 7-Methylguanosin-Kappe der mRNA erfordert (Kozak, Gene, 234:187-208 (1999); Merrick und Hershey, The Pathway and Mechanism of Eukaryotic Protein Synthesis (Weg und Mechanismus der eukaryotischen Proteinsynthese). In Translational Control, J. Hershey, M. Mathews und N. Sonenberg, Hrsg. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), S. 31-69 (1996)). Das als Träger der RNAi in vitro verwendete Drosophila-Lysat rekapituliert gleichfalls die Kappenabhängigkeit der Translation; Pp-Luc-mRNA mit einer 7-Methylguanosin-Kappe wurde mit mehr als der zehnfachen Effizienz translatiert als die gleiche mRNA mit einer A(5')ppp(5')G-Kappe (Fig. 7B). Beide RNAs waren in dem Drosophila-Lysat gleich stabil, was zeigt, dass dieser Effizienzunterschied nicht bloß durch schnelleren Zerfall der mRNA mit einer Adenosin-Kappe erklärt werden kann (siehe auch Gebauer et al., EMBO J., 18:6146-54 (1999)). Obwohl der Translationsmechanismus zwischen Pp-Luc-mRNAs mit 7-Methylguanosin- und Adenosin-Kappen unterscheiden kann, waren die zwei mRNAs gleich empfindlich gegen RNAi in Anwesenheit von Pp-dsRNA (Fig. 7C). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Schritte zur Kappenerkennung nicht an RNAi beteiligt sind.

#### dsRNA wird zu 21-23 nt-Spezies verarbeitet

RNAs von 25 nt Länge werden sowohl aus Sense- als auch aus Antisense-Strängen von Genen erzeugt, die der posttranslationalen Genstilllegung in Pflanzen unterliegen (Hamilton and Baulcombe, Science, 286:950-2 (1999)). Es wurde eine denaturierende Acrylamid-Gelanalyse der Produkte



durchgeführt, die in einer zweistündigen Inkubation von gleichmäßig radioaktiv  $^{32}\text{P}$ -markierten dsRNAs und verkappter asRNA in Lysat unter Standard-RNAi-Bedingungen in Anwesenheit oder Abwesenheit von Target-mRNAs gebildet wurden. Es wurde festgestellt, dass dsRNA auch zu kurzen RNA-Fragmenten verarbeitet wird. Bei Inkubation in Lysat traten etwa 15% der eingesetzten Radioaktivität sowohl der 501bp  
5 Rr-dsRNA als auch der 505 bp Pp-dsRNA in RNA-Fragmenten von 21-23 nt Länge auf. Da die dsRNAs länger als 500 bp sind, bedeutet die Ausbeute von 15% Fragmenten, dass aus jedem dsRNA-Molekül von voller Länge mehrere 21-23 nt-RNAs produziert werden. Es wurden keine anderen stabilen Produkte nachgewiesen. Die kurzen RNA-Spezies wurden aus dsRNAs produziert, in denen beide Stränge gleichmäßig mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markiert waren. Die Bildung der 21-23 nt-RNAs aus der dsRNA erforderte  
10 nicht die Anwesenheit der entsprechenden mRNA, was zeigt, dass die kurze RNA-Spezies durch Verarbeitung der dsRNA statt als Produkt des dsRNA-adressierten mRNA-Abbaus erzeugt wird. Es wurde festgestellt, dass 22 Nucleotide zwei Windungen einer RNA-RNA-Helix in A-Form entsprechen.

Bei Inkubation von dsRNAs, die innerhalb entweder des Sense- oder des Antisense-Strangs radioaktiv markiert waren, mit Lysat in einer Standard-RNAi-Reaktion wurden 21-23 nt-RNAs mit  
15 vergleichbarer Effizienz erzeugt. Diese Daten stützen die Vorstellung, dass die 21-23 nt-RNAs durch symmetrische Verarbeitung der dsRNA erzeugt werden. Verschiedene Daten stützen die Vorstellung, dass die 21-23 nt-RNA nur aus dsRNA effizient erzeugt werden und nicht die Folge einer Wechselwirkung zwischen einzelsträngiger RNA und der dsRNA sind. Erstens wurde eine mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierte 505 nt Pp-Luc-Sense-RNA oder -asRNA nicht effizient in das 21-23 nt-Produkt umgewandelt, wenn sie mit 5  
20 nM nicht radioaktiver 505 bp Pp-dsRNA inkubiert wurde. Zweitens produzierte in Abwesenheit von mRNA eine 501 nt-Rr-asRNA mit 7-Methylguanotin-Kappe nur eine kaum nachweisbare Menge 21-23 nt-RNA (verkappte einzelsträngige RNAs sind in dem Lysat ebenso stabil wie dsRNA, Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191- 7 (1999)), wahrscheinlich aufgrund einer kleinen Menge dsRNA, die das Antisense-Präparat verunreinigte. Wenn jedoch Rr-Luc-mRNA in der Reaktion mit der mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten,  
25 verkappten Rr-asRNA enthalten war, wurde eine kleine Menge 21-23 nt-Produkt erzeugt, die 4% der Menge der 21-23 nt-RNA entsprach, die aus einer äquimolaren Menge Rr-dsRNA produziert wurde. Es ist unwahrscheinlich, dass dieses Ergebnis die Anwesenheit verunreinigender dsRNA in dem Rr-asRNA-Präparat widerspiegelt, da aus der asRNA erheblich mehr Produkt in Anwesenheit der Rr-Luc-mRNA erzeugt wurde als in deren Abwesenheit. Stattdessen lassen die Daten darauf schließen, dass asRNA mit den  
30 komplementären mRNA-Sequenzen wechselwirken kann, um in der Reaktion dsRNA zu bilden, und dass die resultierende dsRNA anschließend zu den kurzen RNA-Spezies verarbeitet wird. Rr-asRNA kann für einen niedrigen Spiegel von echter RNAi in vitro sorgen (siehe unten), in Übereinstimmung mit dieser Erklärung.

Als Nächstes wurde gefragt, ob die Produktion der 21-23 nt-RNAs aus dsRNA ATP erforderte.  
35 Wenn die 505 bp Pp-dsRNA in einem Lysat inkubiert wurde, das durch Behandlung mit Hexokinase und Glucose an ATP abgereichert war, wurde 21-23 nt-RNA erzeugt, wenn auch 6 mal langsamer als bei der Rückgewinnung von ATP in dem abgereicherten Lysat durch die Aufnahme von Creatinkinase und Creatinphosphat. Daher ist ATP unter Umständen für die Produktion der 21-23 nt-RNA-Spezies nicht erforderlich, sondern kann statt dessen einfach ihre Bildung verstärken. Alternativ kann ATP für die  
40 Verarbeitung der dsRNA erforderlich sein, aber bei einer niedrigeren Konzentration als derjenigen, die nach

der Hexokinasebehandlung übrig bleibt. Die molekulare Basis für die langsamere Beweglichkeit der in dem ATP-abgereicherten Lysat erzeugten kurzen RNA-Fragmente ist nicht klar.

Wagner und Sun (Wagner und Sun, Nature, 391:744-745 (1998)) und Sharp (Sharp, Genes Dev., 13:139-41 (1999)) haben Vermutungen angestellt, dass der Bedarf an dsRNA bei der Stilllegung von Genen durch RNAi die Beteiligung einer dsRNA-spezifischen Adenosindesaminase an dem Prozess widerspiegelt. dsRNA-Adenosindesaminasen entspiralisieren dsRNA durch Umwandlung von Adenosin in Inosin, das kein Basenpaar mit Uracil bildet. dsRNA-Adenosindesaminasen haben eine Funktion im posttranskriptionalen Editing von mRNA (zur Übersicht siehe Bass, Trends Biochem. Sci., 22:157-62 (1997)). Um die Beteiligung von dsRNA-Adenosindesaminase an RNAi zu prüfen, wurde der Umsetzungsgrad von Adenosin in Inosin in den 501 bp Rr-Luc- und 505 bp Pp-Luc-dsRNAs nach Inkubation mit Drosophila-Embryo-Lysat in einer Standard-In-vivo-RNAi-Reaktion untersucht. Die Adenosin-Desaminierung in Vollängen-dsRNA und der 21-23 nt-RNA-Spezies wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie eingeschätzt. Anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) wurde durch den Abbau von Mononucleotiden durch Phosphatasen produziert, die im Handel erhältliche Nuclease P1 verunreinigen (Auxilien et al., J. Mol. Biol., 262:437-458 (1996)). Der Grad der Adenosin-Desaminierung in den 21-23 nt-Spezies wurde gleichfalls bestimmt. Die Vollängen-dsRNA, radioaktiv markiert mit [ $^{32}P$ ]-Adenosin, wurde in dem Lysat inkubiert, und sowohl die Vollängen-dsRNA als auch die 21-23 nt-Produkte wurden durch Reinigung aus einem denaturierenden Acrylamid-Gel gewonnen, mit Nuclease P1 in Mononucleotide aufgespalten und durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie analysiert.

Eine erhebliche Fraktion der Adenosine in der Vollängen-dsRNA war nach 2 Stunden in Inosin umgewandelt (3,1% bzw. 5,6% Umsetzung für Pp-Luc- bzw. Rr-Luc-dsRNAs). Im Gegensatz dazu wurden nur 0,4% (Pp-dsRNA) oder 0,7% (Rr-dsRNA) der Adenosine in den 21-23 nt-Spezies desaminiert. Diese Daten bedeuten, dass weniger als 1 von 27 Molekülen der 21-23 nt-RNA-Spezies ein Inosin enthält. Daher ist es unwahrscheinlich, dass dsRNA-abhängige Adenosin-Desaminierung innerhalb der 21-23 nt-Spezies für ihre Produktion erforderlich ist.

#### asRNA erzeugt ein geringes Ausmaß an RNAi in vitro

Wenn mRNA innerhalb der 5'-7'-Methylguanosin-Kappe mit  $^{32}P$  radioaktiv markiert wurde, sammelten sich stabile 5'-Zerfallsprodukte während der RNAi-Reaktion an. Solche stabilen 5'-Zerfallsprodukte wurden sowohl für die Pp-Luc- als auch für die Rr-Luc-mRNAs beobachtet, wenn sie mit ihren verwandten dsRNAs inkubiert wurden. Früher wurde berichtet, dass effiziente RNAi nicht auftritt, wenn asRNA anstelle von dsRNA verwendet wird (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Nichtsdestoweniger war mRNA messbar weniger stabil, wenn sie mit asRNA statt mit Puffer inkubiert wurde (Figuren 8A und 8B). Dies war besonders offensichtlich für die Rr-Luc-mRNA: etwa 90% der RNA blieben nach 3 Stunden Inkubation in Lysat intakt, aber nur 50%, wenn asRNA zugesetzt wurde. Weniger als 5% blieben übrig, wenn dsRNA zugesetzt wurde. Interessanterweise wurde die durch asRNA verursachte Abnahme der mRNA-Stabilität durch die Bildung einer kleinen Menge der stabilen 5'-Zerfallsprodukte begleitet, die für die RNAi-Reaktion mit dsRNA charakteristisch sind. Dieser Befund entspricht der Beobachtung, dass eine geringe Menge 21-23 nt-Produkt aus der asRNA gebildet wird, wenn diese mit der mRNA inkubiert wird (siehe oben), und stärkt die Vorstellung, dass asRNA, wenn auch ineffizient, in den RNAi-Weg eintreten kann.

mRNA-Spaltstellen werden durch die Sequenz der dsRNA bestimmt

Die Stellen der mRNA-Spaltung wurden unter Verwendung von drei verschiedenen dsRNAs untersucht, 'A', 'B' und 'C', die entlang einer Rr-Luc-Sequenz um etwa 100 nt verschoben waren. Es wurde eine denaturierende Acrylamid-Gelanalyse der stabilen 5'-Spaltprodukte durchgeführt, die nach Inkubation der Pp-Luc-mRNA über die angegebenen Zeiten mit jeder der drei dsRNAs 'A', 'B' und 'C' oder mit Puffer (Ø) produziert wurden. Deren Positionen bezüglich der Rr-Luc-mRNA-Sequenz sind in Fig. 9 dargestellt. Jede der drei dsRNAs wurde in einer Standard-RNAi-Reaktion mit Rr-Luc-mRNA inkubiert, die innerhalb der 5'-Kappe mit <sup>32</sup>P radioaktiv markiert war. In Abwesenheit von dsRNA wurden selbst nach 3 Stunden Inkubation in Lysat keine stabilen 5'-Spaltprodukte für die mRNA nachgewiesen. Dagegen produzierte nach einer Inkubation von 20 Minuten jede der drei dsRNAs eine Leiter von Banden, die einer Gruppe von mRNA-Spaltprodukten entsprachen, die für diese besondere dsRNA charakteristisch sind. Für jede dsRNA waren die stabilen 5'-mRNA-Spaltprodukte auf die Region der Rr-Luc-mRNA beschränkt, die der dsRNA entsprach (Figuren 9 und 10). Für dsRNA 'A' lagen die Längen der 5'-Spaltprodukte im Bereich von 236 bis unmittelbar unter ~750 nt; dsRNA 'A' erstreckt sich über die Nucleotide 233 bis 729 der Rr-Luc-mRNA. Inkubation der mRNA mit dsRNA 'B' produzierte mRNA-5'-Spaltprodukte im Längenbereich von 150 bis ~600 nt; dsRNA 'B' erstreckt sich über die Nucleotide 143 bis 644 der mRNA. Schließlich produzierte die dsRNA 'C' mRNA-Spaltprodukte von 66 bis ~500 nt Länge. Diese dsRNA erstreckt sich über die Nucleotide 50 bis 569 der Rr-Luc-mRNA. Daher bietet die dsRNA nicht nur Spezifität für die RNAi-Reaktion, indem sie auswählt, welche mRNA aus der gesamten Menge zellulärer mRNAs abgebaut wird, sondern bestimmt auch die genauen Spaltungspositionen entlang der mRNA-Sequenz.

Die mRNA wird in Intervallen von 21-23 Nucleotiden gespalten

Um weitere Einsicht in den Mechanismus von RNAi zu gewinnen, wurden die Positionen verschiedener mRNA-Spaltstellen für jede der drei dsRNAs kartiert (Fig. 10). Es wurde eine hochauflösende denaturierende Acrylamid-Gelanalyse einer Teilmenge der oben beschriebenen 5'-Spaltprodukte durchgeführt. Bemerkenswerterweise traten die meisten Spaltungen in Intervallen von 21-23 nt auf (Fig. 10). Dieser Abstand ist besonders erstaunlich angesichts unserer Beobachtung, dass die dsRNA zu einer 21-23 nt-RNA-Spezies verarbeitet wird, und des Befunds von Hamilton und Baulcombe, dass eine 25 nt-RNA mit der posttranskriptionalen Genstilllegung in Pflanzen korreliert (Hamilton and Baulcombe, Science, 286:950-2 (1999)). Von den von uns kartierten 16 Spaltstellen (2 für dsRNA 'A', 5 für dsRNA 'B' und 9 für dsRNA 'C') spiegeln alle bis auf zwei das Intervall von 21-23 nt wider. Eine der zwei Ausnahme-Spaltungen war eine schwache Spaltstelle, die durch dsRNA 'C' erzeugt wurde (angedeutet durch einen leeren blauen Kreis in Fig. 10). Diese Spaltung trat im Abstand von 32 nt 5' zur nächsten Spaltstelle auf. Die andere Ausnahme ist besonders faszinierend. Nach vier Spaltungen in Abständen von 21-23 nt bewirkte die dsRNA 'C' eine Spaltung der mRNA im Abstand von nur neun nt 3' zur vorhergehenden Spaltstelle (rote Pfeilspitze in Fig. 10). Diese Spaltung trat in einer Reihe von sieben Uracilresten auf und scheint den Maßstab für die Spaltung "zurückzusetzen"; die nächste Spaltstelle lag im Abstand von 21-23 nt 3' zu der Ausnahmestelle. Die drei nachfolgenden, von uns kartierten Spaltstellen lagen gleichfalls in Abständen von 21-23 nt. Merkwürdigerweise treten von den sechzehn Spaltstellen, die durch die drei verschiedenen dsRNAs verursacht werden, vierzehn an Uracilresten auf. Die Bedeutung dieses Befunds ist nicht klar, er lässt aber darauf schließen, dass die mRNA-Spaltung durch einen Prozess bestimmt wird, der Intervalle von

21-23 nt misst und Sequenzen zur Spaltung bei Uracil bevorzugt. Die Ergebnisse zeigen, dass die durch Inkubation von ~500 bp dsRNA im Lysat produzierte 21-23 nt-RNA sequenzspezifische Interferenz in vitro verursachte, wenn sie aus einem Acrylamid-Gel isoliert und anstelle der Vollängen-dsRNA einer neuen RNAi-Reaktion zugesetzt wurde.

#### 5 Ein Modell für dsRNA-gelenkte mRNA-Spaltung

Ohne uns durch die Theorie binden zu wollen, lassen die hierin beschriebenen biochemischen Daten, zusammen mit jüngsten genetischen Experimenten bei *C. elegans* und *Neurospora* (Cogoni und Macino, *Nature*, 399:166-9 (1999); Grishok et al., *Science*, 287: 2494-7 (2000); Ketting et al., *Cell*, 99:133-41 (1999); Tabara et al., *Cell*, 99:123-32 (1999)) auf ein Modell dafür schließen, wie dsRNA mRNA zur Zerstörung adressiert (Fig. 11). In diesem Modell wird die dsRNA zunächst in einem Prozess, der wahrscheinlich mit Genen verbunden ist, wie z. B. den *C. elegans*-Genorten *rde-1* und *rde-4*, in 21-23 nt lange Fragmente gespalten. Die resultierenden Fragmente, wahrscheinlich ebenso kurz wie durch RNAi-spezifische Proteine gebundene asRNAs, bilden dann Paare mit der mRNA und rekrutieren eine Nuclease, die mRNA spaltet. Alternativ könnte ein Strangaustausch in einem Protein-RNA-Komplex auftreten, der vorübergehend ein 21-23 nt-dsRNA-Fragment nahe der mRNA aufnimmt. Die Trennung der zwei Stränge der dsRNA anschließend an die Fragmentierung könnte durch eine ATP-abhängige RNA-Helicase unterstützt werden, was die beobachtete ATP-Verstärkung der 21-23 nt-RNA-Produktion erklärt.

Es ist wahrscheinlich, dass jedes kurze RNA-Fragment eine, oder höchstens zwei, Spaltungen in der mRNA produziert, vielleicht an den 5'- oder 3'-Enden des 21-23 nt-Fragments. Die kurzen RNAs können durch eine RNA-gelenkte RNA-Polymerase amplifiziert werden, wie z. B. diejenige, die durch das *ego-1*-Gen in *C. elegans* (Smardon et al., *Current Biology*, 10:169-178 (2000)) oder das *qde-1*-Gen in *Neurospora* (Cogoni und Macino, *Nature*, 399:166-9 (1999)) codiert wird, wodurch lang andauernde posttranskriptionale Stilllegung des Gens in Abwesenheit der dsRNA erzeugt wird, die den RNAi-Effekt auslöst. Vererbbarer RNAi in *C. elegans* erfordert, dass die *rde-1*- und *rde-4*-Gene in nachfolgenden Generationen starten, aber nicht weiterbestehen. Die Gene *rde-2*, *rde-3* und *mut-7* in *C. elegans* sind in Gewebe erforderlich, wo RNAi auftritt, sind aber nicht für die Initiierung von vererbbarer RNAi erforderlich (Grishok et al., *Science*, in Druck, 2000). Diese 'Effektor'-Gene (Grishok et al., *Science*, in Druck, 2000) codieren wahrscheinlich für Proteine, die bei der eigentlichen Selektion von mRNA-Targets und ihrer nachfolgenden Spaltung funktionieren. ATP kann in irgendeinem von einer Anzahl von Schritten während der RNAi erforderlich sein, einschließlich der Komplexbildung an der dsRNA, der Strangdissoziation während oder nach der dsRNA-Spaltung, der Paarung der 21-23 nt-RNAs mit der Target-mRNA, der mRNA-Spaltung und der Wiederverwendung des Targeting-Komplexes. Die Prüfung dieser Vorstellungen mit dem In-vitro-RNAi-System wird eine wichtige Herausforderung für die Zukunft sein. Einige an RNAi beteiligte Gene sind auch wichtig für die Stilllegung und Kosuppression von Transposons. Kosuppression ist ein allgemeines biologisches Phänomen, das Pflanzen, Insekten und vielleicht Menschen umfasst. Der wahrscheinlichste Mechanismus bei *Drosophila-melanogaster* ist transkriptionale Stilllegung (Pal-Bhanra et al, *Cell* 99: 35-36). Daher sind 21-23 nt-Fragmente wahrscheinlich an der Transkriptionskontrolle ebenso wie an der posttranskriptionalen Kontrolle beteiligt.

#### 40 BEISPIEL 3. ISOLIERTE 21-23-MERE, DIE BEI ZUGABE ZU EINER NEUEN RNAI-REAKTION DURCH SEQUENZSPEZIFISCHE INTERFERENZ VERURSACHT WERDEN

Isolierung von 21-23 nt-Fragmenten aus einer Inkubationsreaktion von 500 bp-dsRNA in Lysat

Doppelsträngige RNA (ab 500 bp) wurde in einer Konzentration von 10 nM in Drosophila-Embryo-Lysat 3 Stunden bei 25°C unter Standardbedingungen inkubiert, wie hierin beschrieben. Nach Deproteinisierung der Probe wurden die 21-23 nt-Reaktionsprodukte durch denaturierende Polyacrylamid-  
 5 (15%)Gelelektrophorese von unverarbeiteter dsRNA abgetrennt. Zum Nachweis der nicht radioaktiv markierten 21-23 nt-Fragmente wurde eine Inkubationsreaktion mit radioaktiv markierter dsRNA in eine getrennte Bahn des gleichen Gels geladen. Gelstücke, welche die nicht radioaktiven 21-23 nt-Fragmente enthielten, wurden ausgeschnitten, und die 21-23 nt-Fragmente wurden über Nacht bei 4°C in 0,4 ml 0,3 M NaCl aus den Gelstücken eluiert. Die RNA wurde durch Ausfällen mit Ethanol und Zentrifugieren aus dem  
 10 Überstand zurückgewonnen. Das RNA-Pellet wurde in 10 µl Lysepuffer aufgelöst. Als Kontrolle wurden auch Gelstücke ein wenig oberhalb und unterhalb der 21-23 nt-Bande ausgeschnitten und den gleichen Elutions- und Ausfällungsverfahren unterworfen. Außerdem wurden eine auf das 15%-Gel geladene dsRNA und ein 21-23 nt-Fragmenten entsprechendes Gelstück ausgeschnitten und eluiert. Alle Pellets aus den Kontrollversuchen wurden in 10 µl-Lysepuffer gelöst. Die Verluste an RNA während der  
 15 Rückgewinnung aus Gelstücken durch Elution betragen etwa 50%.

Inkubation von gereinigten 21-23 nt-Fragmenten in einem translationsbasierten RNAi-Assay

1 µl eluiertes 21-23-mer oder die Kontroll-RNA-Lösung wurden für eine 10 µl- Standard-RNAi-Inkubationsreaktion verwendet (siehe oben). Die 21-23-meren wurden vor der Zugabe der Target- und Kontroll-mRNA 10 bis 30 Minuten in dem lysathaltigen Reaktionsgemisch vorinkubiert. Während der  
 20 Vorinkubation können an der RNA-Interferenz beteiligte Proteine aufgrund eines auf diesen RNAs vorhandenen spezifischen Signals mit den 21-23-meren reassoziieren. Die Inkubation wurde eine weitere Stunde fortgesetzt, um Translation der Target- und Kontroll-mRNAs zu ermöglichen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von passivem Lysepuffer (Promega) gelöscht, und die Luciferase-Aktivität wurde gemessen. Die RNA-Interferenz wird als das Verhältnis der Target- zur Kontroll-Luciferaseaktivität ausgedrückt,  
 25 normiert durch eine RNA-freie Pufferkontrolle. Spezifische Suppression des Target-Gens wurde bei entweder 10 oder 30 Minuten Vorinkubation beobachtet. Die Suppression war reproduzierbar und reduzierte das relative Verhältnis des Targets zur Kontrolle um den Faktor 2-3. Keines der als Kontrollen isolierten RNA-Fragmente zeigte spezifische Interferenz. Zum Vergleich beeinflusst die Inkubation von 5 nM 500 bp-dsRNA (10 Minuten Vorinkubation) das relative Verhältnis der Kontrolle zum Target  
 30 annähernd um den Faktor 30.

Stabilität von isolierten 21-23 nt-Fragmenten in einer neuen Lysat-Inkubationsreaktion

In Übereinstimmung mit der Beobachtung von RNAi, die durch gereinigte 21-23 nt-RNA-Fragmente vermittelt wurde, zeigte sich, dass 35% der eingesetzten 21-23 nt-RNA länger als 3 Stunden in einer solchen Inkubationsreaktion weiterbestehen. Dies lässt darauf schließen, dass sich zelluläre Faktoren mit den deproteinisierten 21-23 nt-Fragmenten verbinden und ein funktionelles mRNA-abbauendes Teilchen wiederherstellen. Für diese Beobachtung sind wahrscheinlich Signale verantwortlich, die mit diesen 21-23 nt-Fragmenten oder ihrem möglichen Doppelstrang-Charakter oder ihren spezifischen Längen verbunden sind. Die 21-23 nt-Fragmente weisen eine terminale 3'-Hydroxylgruppe auf, wie durch veränderte Beweglichkeit auf einem Sequenzierungsgel im Anschluss an einer Periodatbehandlung und Beta-Elimination nachgewiesen wird.

Beispiel 4. 21-23-meren, die durch nicht denaturierende Methoden gereinigt wurden, bewirkten sequenzspezifische Interferenz, wenn sie einer neuen RNAi-Reaktion zugesetzt wurden

50 nM doppelsträngige RNA (501 bp Rr-Luc-dsRNA, wie in Beispiel 1 beschrieben) wurden in einer 1 ml-In-vitro-Reaktion mit Lysat bei 25°C inkubiert (siehe Beispiel 1). Die Reaktion wurde dann durch Zugabe eines gleichen Volumens 2× PK-Puffer gestoppt (siehe Beispiel 1), und Proteinase K wurde bis zu einer Endkonzentration von 1,8 µg/µl zugesetzt. Die Reaktion wurde eine weitere Stunde bei 25°C inkubiert, mit Phenol extrahiert, und dann wurden die RNAs mit 3 Volumina Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag in Ethanol wurde durch Zentrifugieren aufgefangen, und das Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und auf eine Superdex HR 200 10/30-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) aufgebracht, die mit Lysepuffer bei 0,75 ml/min betrieben wurde. 200 µl-Fractionen wurden aus der Säule aufgefangen. Jeder Fraktion wurden 20 µl 3M Natriumacetat und 20 µg Glycogen zugesetzt, und die RNA wurde durch Fällung mit 3 Volumina Ethanol zurückgewonnen. Die Niederschläge wurden in 30 µl Lysepuffer resuspendiert. Säulenprofile nach der Fraktionierung von <sup>32</sup>P-markierter Einsatz-RNA sind in Fig. 13A dargestellt.

Ein Mikroliter jeder resuspendierten Fraktion wurde in einer 10 µl-Standard-In-vitro-RNAi-Reaktion getestet (siehe Beispiel 1). Dieses Verfahren liefert eine RNA-Konzentration in der In-vitro-RNAi-Reaktion, die annähernd gleich der Konzentration dieser RNA-Spezies in der ursprünglichen Reaktion vor dem Beladen der Säule ist. Die Fraktionen wurden in dem lysathaltigen Reaktionsgemisch vor der Zugabe von 10 nM Rr-Luc-mRNA-Target- und 10 nM Pp-Luc-Kontroll-mRNA 30 Minuten vorinkubiert. Während der Vorinkubation können an der RNA-Interferenz beteiligte Proteine aufgrund eines auf diesen RNAs vorhandenen spezifischen Signals mit den 21-23-meren reassoziieren. Die Inkubation wurde weitere drei Stunden fortgesetzt, um Translation der Target- und Kontroll-mRNAs zu ermöglichen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von passivem Lysepuffer (Promega) gelöscht, und die Luciferase-Aktivität wurde gemessen. Die Suppression der Rr-Luc-mRNA-Target-Expression durch die gereinigten 21-23 nt-Fragmente war reproduzierbar und reduzierte das relative Verhältnis des Targets zur Kontrolle um einen Faktor >30, ein Betrag, der mit einer 50 nM 500 bp dsRNA-Kontrolle vergleichbar ist. Die Suppression der Target-mRNA-Expression war spezifisch: es wurde wenig oder keine Wirkung auf die Expression der Pp-Luc-mRNA-Kontrolle beobachtet.

Die Daten zeigen, dass sowohl die Fraktionen, die ungespaltene dsRNA (Fraktionen 3-5) oder lange, teilweise gespaltene dsRNA (Fraktionen 7-13) enthielten, als auch die Fraktionen, welche die voll

verarbeiteten 21-23 nt-siRNAs enthielten (Fraktionen 41-50), effektive RNA-Interferenz in vitro vermitteln (Fig. 13B). Die Suppression der Target-mRNA war spezifisch: es wurde wenig oder keine Wirkung auf die Expression der Pp-Luc-mRNA-Kontrolle beobachtet (Fig. 13C). Diese Daten, zusammen mit denen in den früheren Proben, demonstrieren, dass die 21-23 nt-siRNAs (1) echte Zwischenprodukte auf dem RNAi-Weg und (2) effektive Mediatoren von RNA-Interferenz in vitro sind.

#### BEISPIEL 5. siRNA-DUPLEXE MIT 21 NUCLEOTIDEN VERMITTELN RNA-INTERFERENZ IN MENSCHLICHEN GEWEBEKULTUREN

##### Methoden

##### Herstellung der RNA

21 nt-RNAs wurden mit Expedite RNA-Phosphoramiditen und Thymidinphosphoramidit (Proligo, Deutschland) chemisch synthetisiert. Synthetische Oligonucleotide wurden entschützt und auf Gel gereinigt (Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T., Genes & Dev. 15, 188-200 (2001)), und anschließend durch eine Sep-Pak C18-Kartusche (Waters, Milford, MA, USA) gereinigt (Tuschl, T. et al., Biochemistry, 32:11658-11668 (1993)). Die siRNA-Sequenzen, die GL2- (Zugriffs-Nr. X65324) und GL3-Luciferase (Zugriffs-Nr. U47296) adressierten, entsprachen den Codierungsregionen 153-173 bezüglich des ersten Nucleotids des Startcodons; siRNAs, die RL (Zugriffs-Nr. AF025846) adressierten, entsprachen der Region 119-129 nach dem Startcodon. Längere RNAs wurden mit T7 RNA-Polymerase aus PCR-Produkten transkribiert, mit anschließender Gel- und Sep-Pak-Reinigung. Die GL2- bzw. GL3-dsRNAs mit 49 bzw. 484 bp entsprachen den Positionen 113-161 bzw. 113-596 bezüglich des Transkriptionsstarts; die RL-dsRNAs mit 50 bzw. 501 bp entsprachen den Positionen 118-167 bzw. 118-618. PCR-Matrizen für die dsRNA-Synthese, die auf humanisierte GFP (hG) gerichtet war, wurden aus pAD3 amplifiziert (Kehlenbach, R.H., et al., J. Cell Biol., 141:863-874 (1998)), wodurch hG dsRNA mit 50 bzw. 501 bp den Positionen 118-167 bzw. 118-618 in Bezug auf das Startcodon entsprach.

Zum Annealing (Reassoziaton) von siRNAs wurden 20 µM Einzelstränge in Annealing-Puffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 2 mM Magnesiumacetat) 1 Minute bei 90°C und anschließend 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Inkubationsschritt bei 37°C wurde für die dsRNAs mit 50 bzw. 500 bp über Nacht ausgedehnt, und diese Annealing-Reaktionen wurden bei Strang-Konzentrationen von 8,4 µM bzw. 0,84 µM durchgeführt.

##### Zellkultur

S2-Zellen wurden in Schneider's Drosophila Medium (Life Technologies), das mit 10% FBS, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt wurde, bei 25°C vermehrt. 293, NIH/3T3, HeLa S3, COS-7-Zellen wurden bei 37°C in modifiziertem Eagle's-Medium von Dulbecco vermehrt, das mit 10% FBS, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt wurde. Zellen wurden regelmäßig passagiert, um ein exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten. 24 Stunden vor der Transfektion bei etwa 80% Konfluenz wurden Säugetierzellen trypsinisiert und im Verhältnis von 1:5 mit frischem Medium ohne Antibiotika verdünnt ( $1-3 \times 10^5$  Zellen/ml) und auf 24-Loch-Platten (500 µl/Loch) übertragen. S2-Zellen wurden vor der Spaltung nicht trypsinisiert. Die Transfektion wurde mit dem Reagens Lipofectamine 2000 (Life Technologies) ausgeführt, wie durch den Hersteller für adhärenzte Zelllinien beschrieben. Pro Loch wurden 1,0 µg pGL2-Kontrolle (Promega) oder pGL3-Kontrolle (Promega), 0,1 µg pRL-TL (Promega) und 0,28 µg siRNA-Duplex oder dsRNA, zu Liposomen formuliert, aufgebracht; das

Endvolumen betrug 600 µl pro Loch. Die Zellen wurden nach der Transfektion 20 Stunden inkubiert und erschienen danach gesund. Anschließend wurde die Luciferase-Expression mittels Dual-Luciferase-Assay (Promega) überwacht. Die Transfektionseffizienzen wurden durch Fluoreszenzmikroskopie für Säugetierzelllinien nach Kotransfektion von 1,1 µg hGFP-codierender pAD3<sup>22</sup> und 0,28 µg invGL2-siRNA bestimmt und betrugen 70-90%. Reporterplasmide wurden in XL-1 Blue (Stratagene) amplifiziert und mit dem Qiagen EndoFree Maxi Plasmid Kit gereinigt.

#### Ergebnisse

RNA-Interferenz (RNAi) ist der Prozess der sequenzspezifischen, posttranskriptionalen Genstilllegung in Tieren und Pflanzen, initiiert durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die in ihrer Sequenz homolog zu dem stillgelegten Gen ist (Fire, A., Trends Genet., 15:358-363 (1999); Sharp, P.A. & Zamore, P.D., Science, 287:2431-2433 (2000); Sijen, T. & Kooter, J.M., Bioessays, 22:520-531 (2000); Bass, B.L., Cell, 101:235-238 (2000); Hammond, S.M., et al., Nat. Rev. Genet., 2:110-119 (2001)). Die Mediatoren des sequenzspezifischen mRNA-Abbaus sind kurze interferierende RNAs (siRNAs) von 21 und 22 nt, die durch Spaltung mit RNase III aus längeren dsRNAs<sup>6-10</sup> erzeugt werden (Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C., Science, 286:950-952 (1999); Hammond, S.M., et al., Nature, 404:293-296 (2000); Zamore, P.D., et al., Cell, 101:25-33 (2000); Bernstein, E., et al., Nature, 409:363-366 (2001); Elbashir, S.M., et al., Genes & Dev., 15:188-200 (2001)). Wie hierin gezeigt, können 21 nt-siRNA-Duplexe die Reportergen-Expression in multiplen Säugetier-Gewebekulturen spezifisch unterdrücken, einschließlich humaner embryonaler Nieren-(293) und HeLa-Zellen. Im Gegensatz zu dsRNAs von 50 oder 500 bp aktivieren siRNAs die Interferonantwort nicht. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass siRNA-Duplexe ein verbreitetes Werkzeug für sequenzspezifische Wechselwirkung der Genfunktion in Säugetierzellen sind.

Basengepaarte 21 und 22 nt-siRNAs mit überhängenden 3'-Enden vermitteln einen effizienten sequenzspezifischen mRNA-Abbau in Lysaten, die aus *D. melanogaster*-Embryonen gewonnen werden (Elbashir, S.M., et al., Genes & Dev., 15:188-200 (2001)). Um zu prüfen, ob siRNAs auch imstande sind, RNAi in Gewebekultur zu vermitteln, wurden 21 nt-siRNA-Duplexe mit symmetrischen 2 nt 3'-Überhängen konstruiert, die gegen Reportergene gerichtet waren, die für Seequallen-(*Renilla reniformis*)-Luciferasen und zwei Sequenzvarianten der Glühwürmchen-(*Photinus pyralis*, GL2- und GL3-) Luciferasen codieren. Die siRNA-Duplexe wurden mittels kationischer Liposome mit den Reporterplasmid-Kombinationen pGL2/pRL oder pGL3/pRL in *D. melanogaster* Schneider S2-Zellen oder Säugetierzellen kotransfiziert. Luciferase-Aktivitäten wurden 20 Stunden nach der Transfektion bestimmt. In allen geprüften Zelllinien wurde spezifische Verminderung der Expression der Reportergene in Anwesenheit von verwandten siRNA-Duplexen beobachtet (Figuren 15A-15J). Bemerkenswerterweise waren die absoluten Luciferase-Expressionsspiegel von nicht verwandten siRNAs unbeeinflusst, was auf das Fehlen von schädlichen Nebenwirkungen durch 21 nt RNA-Duplexe hindeutet (z. B. Figuren 16A-16D für HeLa-Zellen). In *D. melanogaster* S2-Zellen (Figuren 15A, 15B) war die spezifische Inhibition von Luciferasen vollständig und Ergebnissen ähnlich, die früher für längere dsRNAs ermittelt wurden (Hammond, S.M., et al., Nature, 404:293-296 (2000); Caplen, N.J., et al., Gene, 252:95-105 (2000); Clemens, M & Williams, B., Cell, 13:565-572 (1978); Ui-Tei, K., et al., FEBS Letters, 479:79-82 (2000)). In Säugetierzellen, wo die Reportergene um den Faktor 50 bis 100 stärker exprimiert wurden, war die spezifische Suppression weniger vollständig (Figuren 15C-15J). Die GL2-Expression war als Reaktion auf die verwandten siRNAs um den



Faktor 3 bis 12 reduziert, die GL3-Expression um den Faktor 9 bis 25, und die RL-Expression um den Faktor 1 bis 3. Für 293-Zellen war die Adressierung von RL-Luciferase durch RL-siRNAs ineffektiv, obwohl GL2- und GL3-Targets spezifisch reagierten (Figuren 15I, 15J). Es ist wahrscheinlich, dass die mangelnde Verringerung der RL-Expression in 293-Zellen auf ihre um den Faktor 5 bis 20 höhere Expression im Vergleich zu jeder anderen geprüften Säugetierzelllinie und/oder auf die begrenzte Zugänglichkeit der Zielsequenz wegen der RNA-Sekundärstruktur oder damit verbundener Proteine zurückzuführen ist. Nichtsdestoweniger ließ die spezifische Adressierung von GL2- und GL3-Luciferase durch die verwandten siRNA-Duplexe erkennen, dass RNAi auch in 293-Zellen funktioniert.

Der 2 nt 3'-Überhang in allen siRNA-Duplexen mit Ausnahme von uGL2 bestand aus (2'-Desoxy)thymidin. Substitution von Uridin durch Thymidin im 3'-Überhang wurde in dem *D. melanogaster*-In-vitro-System gut toleriert, und die Sequenz des Überhangs war für die Zielerkennung unkritisch (Elbashir, S.M., et al., *Genes & Dev.*, 15:188-200 (2001)). Der Thymidin-Überhang wurde gewählt, da angenommen wird, dass er die Nucleasebeständigkeit von siRNAs in dem Gewebekulturmedium und innerhalb transfizierter Zellen verbessert. Tatsächlich war thymidin-modifizierte GL2-siRNA in allen geprüften Zelllinien ein wenig potenter als die nichtmodifizierte uGL2-siRNA (Figuren 15A, 15C, 15E, 15G, 15I). Es ist vorstellbar, dass weitere Modifikationen der 3'-überhängenden Nucleotide zusätzliche Vorteile für die Abgabe und Stabilität von siRNA-Duplexen bieten.

In Kotransfektions-Experimenten wurden 25 nM siRNA-Duplexe, bezogen auf das Endvolumen des Gewebekulturmediums, eingesetzt (Figuren 15A-15J, 16A-16F). Erhöhen der siRNA-Konzentration auf 100 nM verbesserte die spezifischen Stilllegungswirkungen nicht, begann aber wegen der Konkurrenz um Liposomverkapselung zwischen Plasmid-DNA und siRNA die Transfektionseffizienzen zu beeinflussen. Verringern der siRNA-Konzentration auf 1,5 nM reduzierte die spezifische Stilllegungswirkung nicht, wenn auch die siRNAs jetzt nur 2 bis 20 mal stärker konzentriert waren als die DNA-Plasmide. Dies lässt erkennen, dass siRNAs außergewöhnlich leistungsfähige Reagenzien zum Vermitteln der Genstilllegung sind und dass siRNAs in Konzentrationen wirksam sind, die um mehrere Größenordnungen unter den Konzentrationen liegen, die in herkömmlichen Antisense- oder Ribozym-Gen-Targeting-Experimenten angewandt werden.

Um die Wirkung längerer dsRNAs auf Säugetierzellen zu überwachen, wurden 50 und 500 bp-dsRNAs hergestellt, die mit den Reportergenen verwandt waren. Als unspezifische Kontrolle wurden dsRNAs aus humanisierter GFP verwendet (Kehlenbach, R.H., et al., *J. Cell Biol.*, 141:863-874 (1998)). Wenn dsRNAs in Mengen (nicht Konzentrationen) kotransfiziert wurden, die mit denen der siRNA-Duplexe identisch waren, wurde die Reportergen-Expression stark und unspezifisch reduziert. Diese Wirkung wird für HeLa-Zellen als repräsentatives Beispiel veranschaulicht (Figuren 16A-16D). Die absoluten Luciferase-Aktivitäten wurden durch 50 bp-dsRNA unspezifisch um den Faktor 10 bis 20 bzw. durch 500 bp-dsRNA um den Faktor 20 bis 200 reduziert. Ähnliche unspezifische Wirkungen wurden für COS-7- und NIH/3T3-Zellen beobachtet. Für 293-Zellen wurde eine unspezifische Verminderung um den Faktor 10 bis 20 nur für 500 bp-dsRNAs beobachtet. Eine unspezifische Verminderung der Reportergen-Expression durch dsRNA > 30 bp wurde als Teil der Interferonantwort erwartet (Matthews, M., *Interactions between viruses and the cellular machinery for protein synthesis in Translational Control* (Wechselwirkungen zwischen Viren und dem zellulären Proteinsyntheseapparat bei der

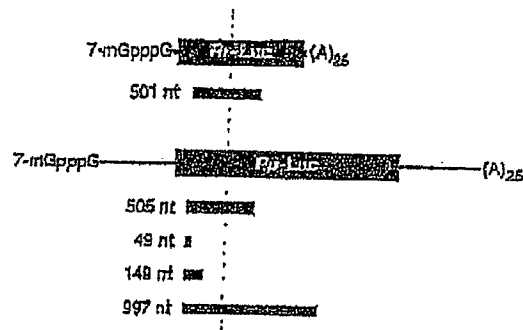
Translationskontrolle) (Hrsg. Hershey, J., Matthews, M. & Sonenberg, N.) 505-548 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY; 1996); Kumar, M. & Carmichael, G.G., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:1415-1434 (1998); Stark, G.R., et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 67:227-264 (1998)). Überraschenderweise wurde trotz der starken unspezifischen Verminderung der Reportergen-Expression zusätzliche  
5 sequenzspezifische, dsRNA-vermittelte Stilllegung reproduzierbar nachgewiesen. Die spezifischen Stilllegungswirkungen waren jedoch nur dann offensichtlich, wenn die entsprechenden Reportergen-Aktivitäten auf die hG dsRNA-Kontrollen normiert wurden (Figuren 16E, 16F). Eine spezifische Verminderung um den Faktor 2 bis 10 als Antwort auf die zugehörige dsRNA wurde auch in den anderen drei geprüften Säugetierzelllinien beobachtet. Spezifische Stilllegungswirkungen mit dsRNAs (356-1662 bp)  
10 wurden früher in CHO-K1-Zellen berichtet, aber die zum Nachweis einer spezifischen Verminderung um den Faktor 2 bis 4 erforderlichen dsRNA-Mengen waren etwa 20 mal höher als in unseren Experimenten (Ui-Tei, K., et al., *FEBS Letters*, 479:79-82 (2000)). Außerdem fehlt CHO-K1-Zellen anscheinend die Interferonantwort. Gemäß einem anderen Bericht wurden 293-, NIH/3T3- und BHK-21-Zellen mit Luciferase/lacZ-Reporter-Kombinationen und spezifischer 829 bp lacZ- oder unspezifischer 717 bp-GFP-  
15 dsRNA auf RNAi geprüft (Caplen, N.J., et al., *Gene*, 252:95-105 (2000)). Das Misslingen des Nachweises von RNAi in diesem Fall ist wahrscheinlich auf den weniger empfindlichen Luciferase/lacZ-Reporter-Assay und die Längenunterschiede von Target- und Kontroll-dsRNA zurückzuführen. Zusammengekommen lassen die hierin beschriebenen Ergebnisse erkennen, dass die RNAi in Säugetierzellen aktiv ist, dass aber die Stilllegungswirkung schwer nachweisbar ist, wenn das Interferonsystem durch dsRNA > 30  
20 bp aktiviert wird.

Der Mechanismus des durch 21 nt-siRNA vermittelten Interferenzprozesses in Säugetierzellen bleibt noch aufzudecken, und die Stilllegung kann posttranskriptional und/oder transkriptional auftreten. In *D. melanogaster*-Lysat vermitteln siRNA-Duplexe posttranskriptionale Genstilllegung durch Rekonstitution von siRNA-Proteinkomplexen (siRNPs), welche die Erkennung und gezielte Spaltung von mRNA lenken  
25 (Hammond, S.M., et al., *Nature*, 404:293-296 (2000); Zamore, P.D., et al., *Cell*, 101:25-33 (2000); Elbashir, S.M., et al., *Genes & Dev.*, 15:188-200 (2001)). In Pflanzen ist dsRNA-vermittelte posttranskriptionale Stilllegung auch mit RNA-gelenkter DNA-Methylierung in Zusammenhang gebracht worden, die auch durch 21 nt-siRNAs gelenkt werden kann (Wassenegger, M., *Plant Mol. Biol.*, 43:203-220 (2000); Finnegan, E.J., et al., *Curr. Biol.*, 11:R99-R102 (2000)). Methylierung von Promotorregionen kann zu  
30 transkriptionaler Stilllegung führen (Metter, M.F., et al., *EMBO J.*, 19:5194-5201 (2000)), aber Methylierung in Codierungssequenzen muss dies nicht (Wang, M.-B., *RNA*, 7:16-28 (2001)). DNA-Methylierung und transkriptionale Stilllegung in Säugetieren sind gut dokumentierte Prozesse (Kass, S.U., et al., *Trends Genet.*, 13:444-449 (1997); Razin, A., *EMBO J.*, 17:4905-4908 (1998)), sind jedoch nicht mit posttranskriptionaler Stilllegung in Zusammenhang gebracht worden. Methylierung in Säugetieren ist  
35 überwiegend auf CpG-Reste gerichtet. Da in der RL siRNA kein CpG anwesend ist, aber RL siRNA spezifische Stilllegung in Säugetiergewebekultur vermittelt, ist es unwahrscheinlich, dass DNA-Methylierung entscheidend für den von uns beobachteten Stilllegungsprozess ist. Um zusammenzufassen: hierin wird siRNA-vermittelte Genstilllegung in Säugetierzellen beschrieben. Die Verwendung von 21 nt-siRNAs berechtigt zu großen Hoffnungen für die Inaktivierung der Genfunktion in humaner Gewebekultur  
40 und die Entwicklung von genspezifischen Therapeutika.

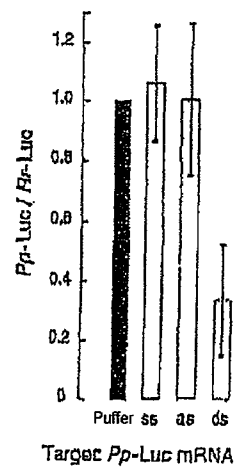
PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Herstellen einer doppelsträngigen RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden, das Folgendes umfasst:
  - (a) Kombinieren der doppelsträngigen RNA mit einem löslichen Extrakt, der  
5 RNA-Interferenz vermittelt, wodurch eine Kombination hergestellt wird;
  - (b) Halten der Kombination von (a) unter Bedingungen, unter denen die doppelsträngige RNA zu doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden verarbeitet wird; und
  - (c) ferner umfassend das Isolieren der doppelsträngigen RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden aus der Kombination.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die doppelsträngige RNA einer Sequenz von einem abzubauenen Gen entspricht; und die RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden RNA-Interferenz von mRNA des abzubauenen Gens vermittelt, wodurch doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden hergestellt wird, die RNA-Interferenz der mRNA des Gens vermittelt.
3. In-vitro-Verfahren zum Vermitteln von RNA-Interferenz von mRNA von einem Gen in einer  
15 Zelle, das Folgendes umfasst:
  - (a) Einführen von doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden und die einer Sequenz des Gens entspricht, welche die mRNA des Gens zum Abbau targetiert, in die Zelle *in vitro*;
  - (b) Halten der Zelle, die in (a) hergestellt wurde, unter Bedingungen, unter denen der Abbau der mRNA auftritt, wodurch RNA-Interferenz der mRNA des Gens in der Zelle vermittelt wird.
- 20 4. Verfahren zum Untersuchen der Funktion eines Gens in einer Testzelle, welches das Vermitteln der RNA-Interferenz von mRNA eines Gens in einer Zelle nach Anspruch 3 umfasst, worin die Zelle eine Testzelle ist; und
  - (c) Beobachten des Phänotyps der Testzelle, die in (b) hergestellt wurde, und Vergleichen des beobachteten Phänotyps mit dem einer geeigneten Kontrollzelle, wodurch Information über die Funktion  
25 des Gens bereitgestellt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, das ferner Folgendes umfasst:
  - (a) Kombinieren von doppelsträngiger RNA, die einer Sequenz des Gens entspricht, mit einem löslichen Extrakt, der RNA-Interferenz vermittelt, wodurch eine Kombination hergestellt wird;
  - (b) Halten der Kombination, die in (a) hergestellt wurde, unter Bedingungen, unter denen die  
30 doppelsträngige RNA zu RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden verarbeitet wird, wodurch doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden hergestellt wird;
  - (c) Isolieren der doppelsträngigen RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden, die in (b) hergestellt wurde, vor dem Schritt des Einführens von in (c) isolierter RNA in die Zelle.
6. Verfahren zur Beurteilung, ob ein Genprodukt ein geeignetes Target zur Arzneimittelentdeckung  
35 ist, welches das Vermitteln von RNA-Interferenz von mRNA eines Gens in einer Zelle nach Anspruch 3 umfasst, worin der Abbau der mRNA zur verringerten Expression des Gens führt; und:
  - (c) Ermitteln der Wirkung der verringerten Expression des Gens auf die Zelle, worin, wenn die verringerte Expression eine Wirkung ausübt, das Genprodukt dann ein Target für die Arzneimittelentdeckung ist.

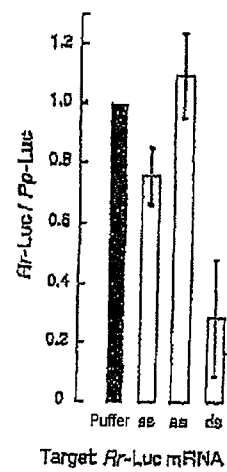
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3-6, worin das Gen für eine zelluläre mRNA oder eine virale mRNA kodiert.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, worin die doppelsträngige RNA von doppelsträngiger RNA erhalten wird, die in Fragmente mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden gespalten wurde.
- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, worin die doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden eine terminale 3'-Hydroxylgruppe umfasst.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 3-9, worin die doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden chemisch synthetisierte RNA ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, worin die RNA ein oder mehr nicht standardmäßige(s)  
10 Nukleotid(e), einschließlich nicht natürlich vorkommender Nukleotide umfasst.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, worin die doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden unter Verwendung von Gelelektrophorese isoliert wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, worin die doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden komplementär zu einer von zellulärer Säuger-mRNA oder viraler mRNA ist.
- 15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 5, worin der lösliche Extrakt aus syncytialem Blastoderm von *Drosophila*-Embryonen abgeleitet ist.



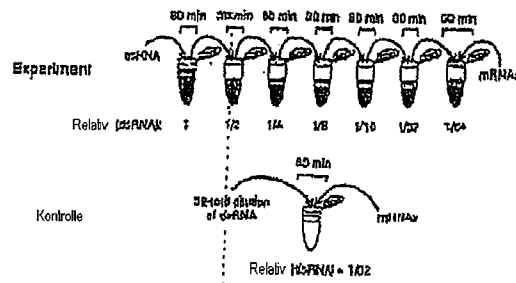
Figur 1



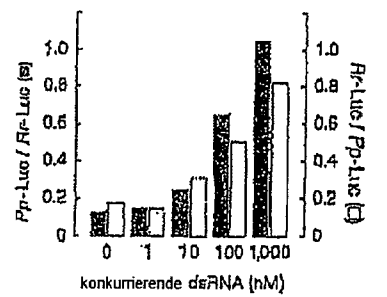
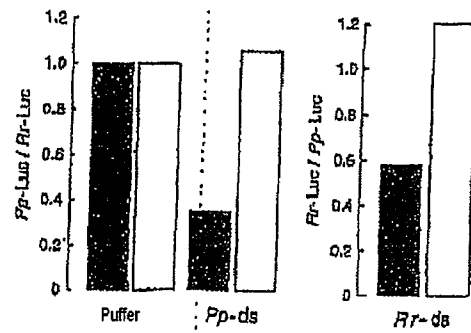
Figur 2A



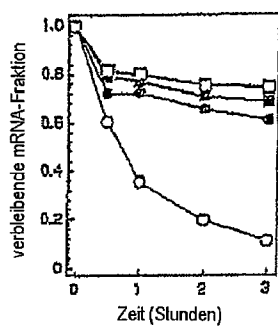
Figur 2B



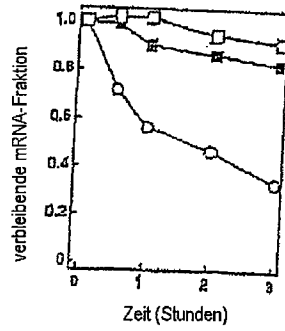
Figur 3A



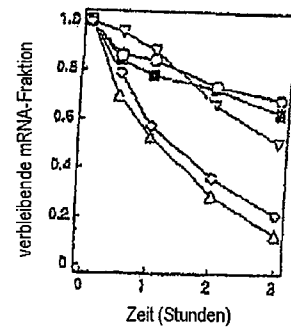
Figur 4



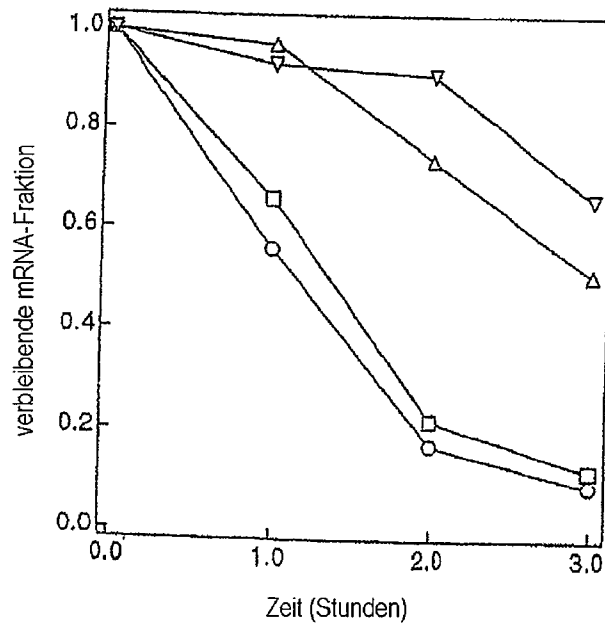
Figur 5A



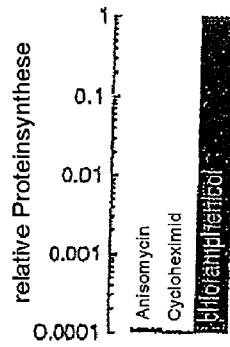
Figur 5B



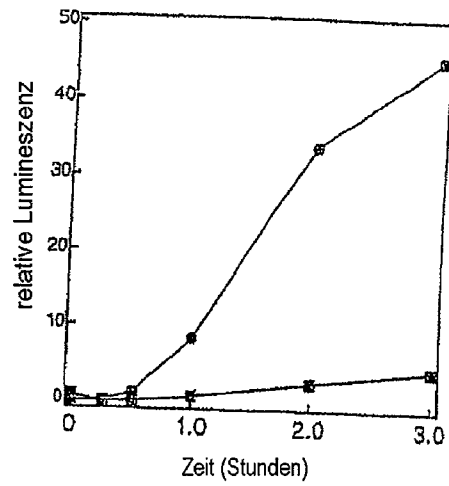
Figur 5C



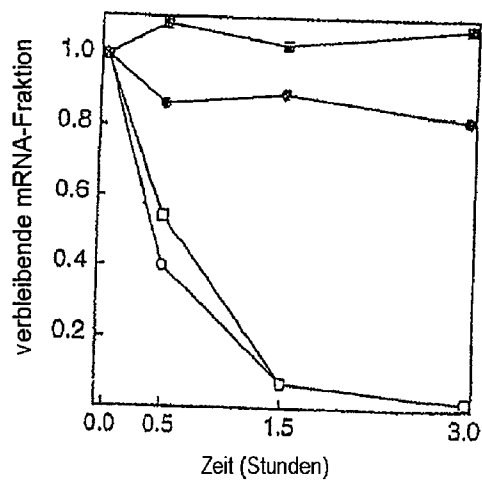
Figur 6



Figur 7A

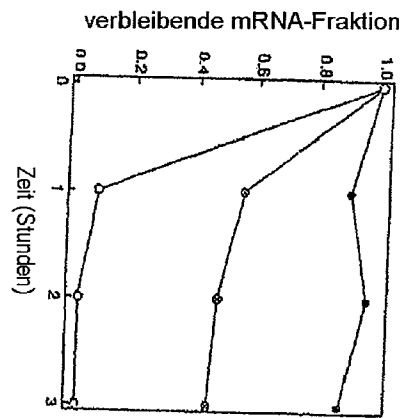


Figur 7B

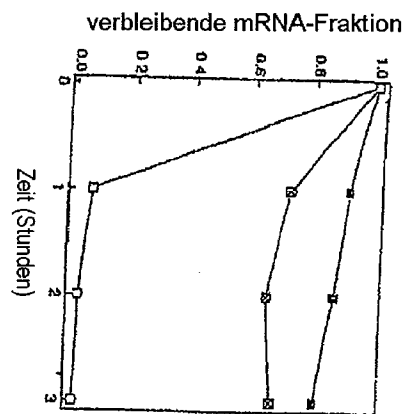


Figur 7C

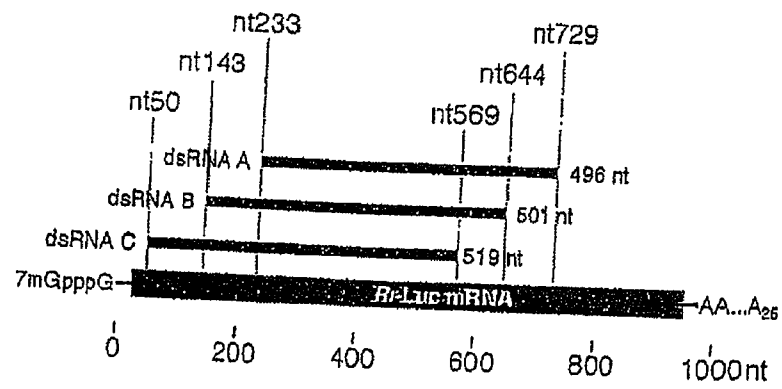




Figur 8A

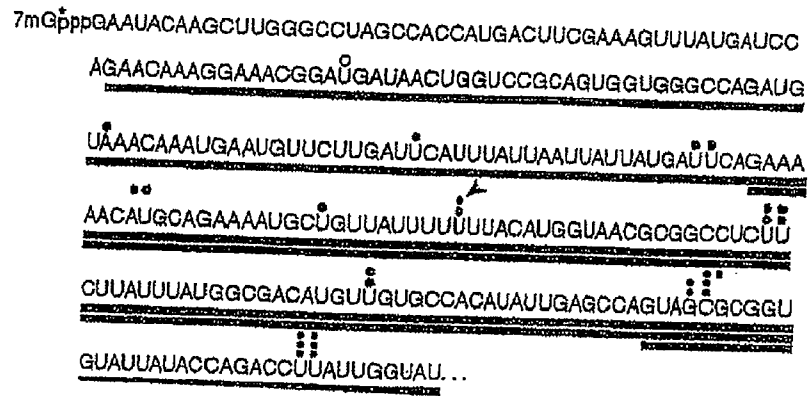


Figur 8B

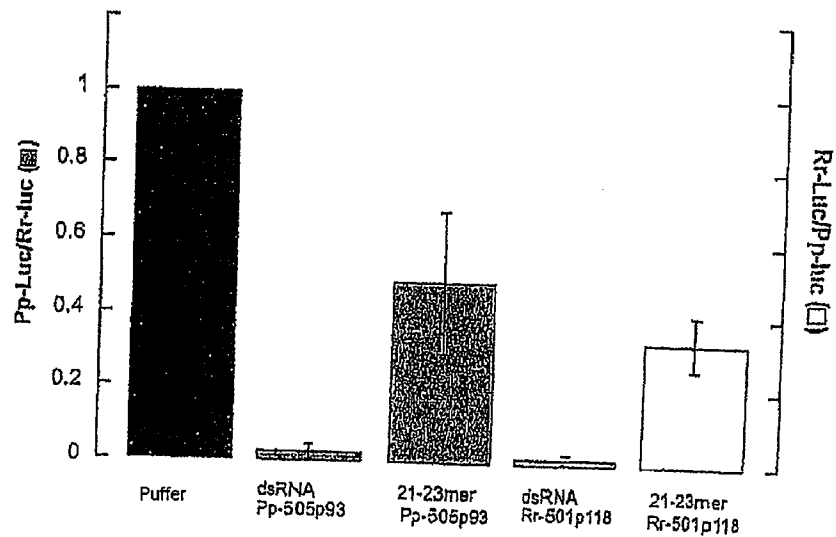


Figur 9

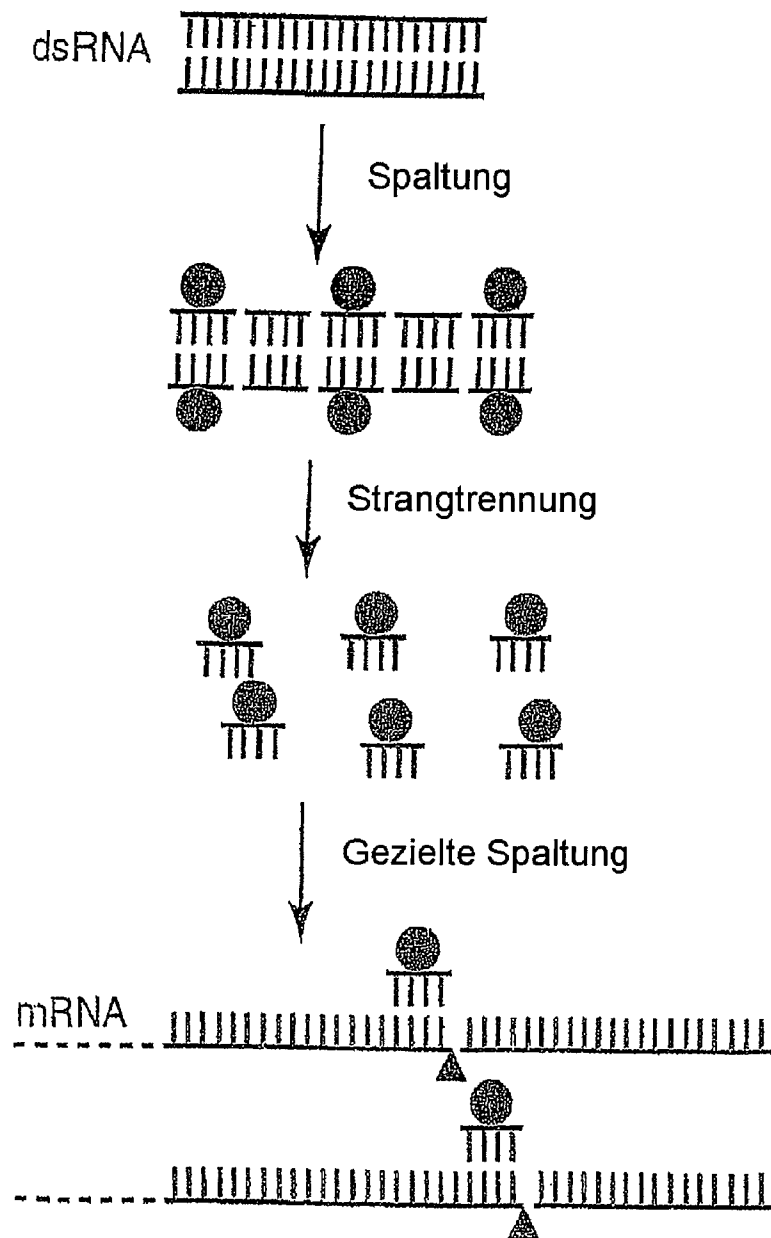
Figur 10



Sequenzspezifische Genstilllegung durch 21-23 nt-Fragmente

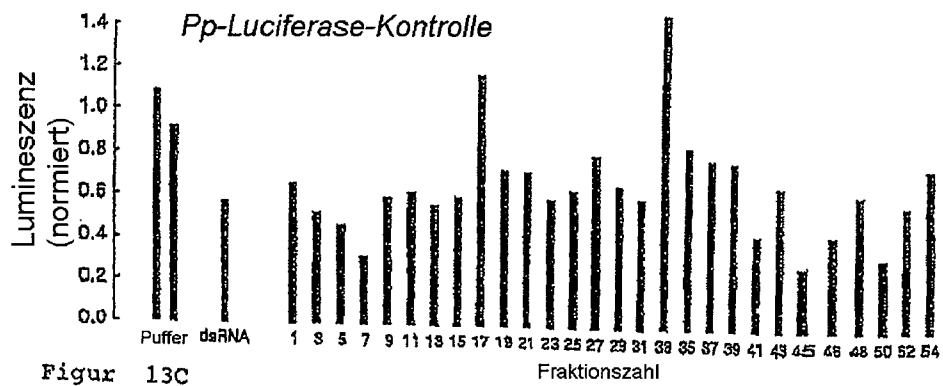
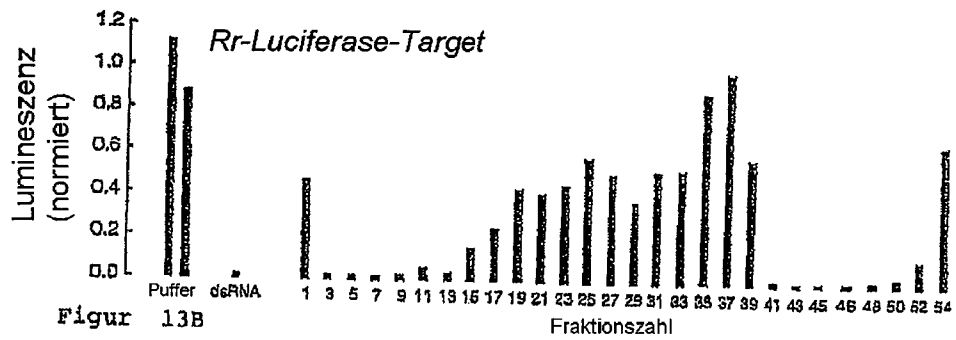
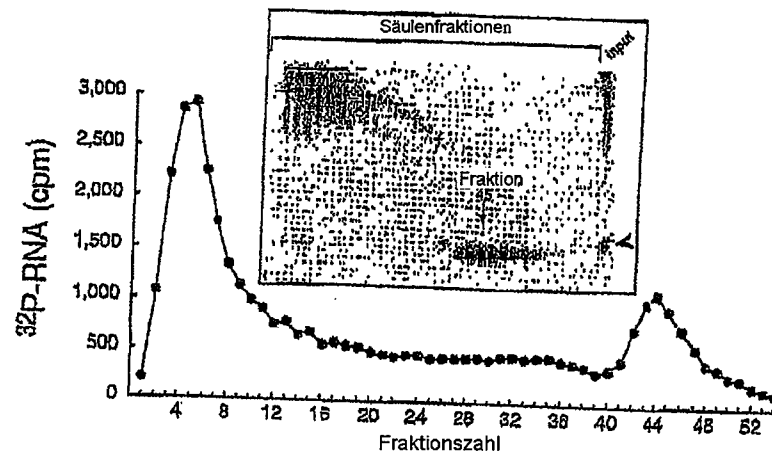


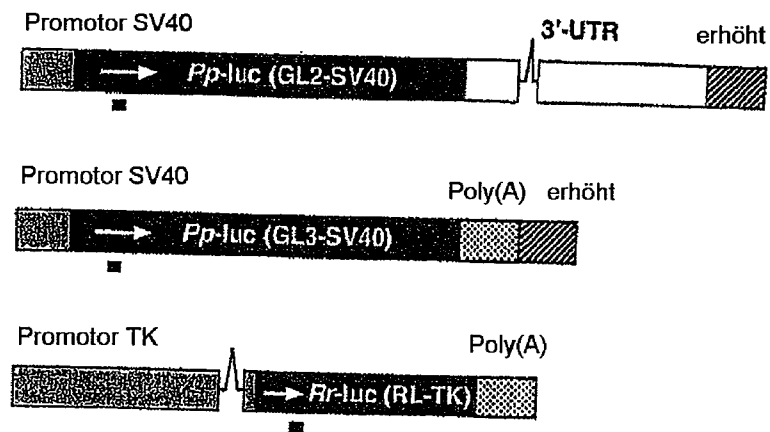
Figur 12



Figur 11

Figur 13A

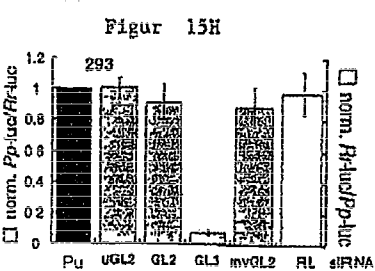
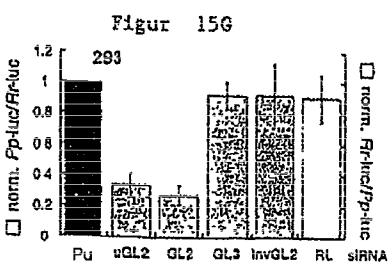
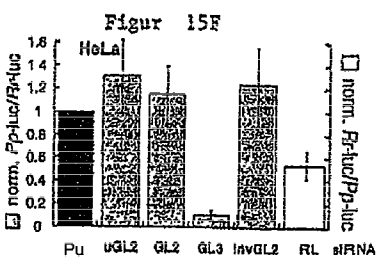
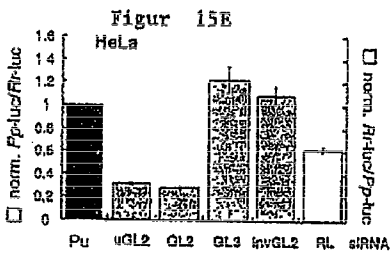
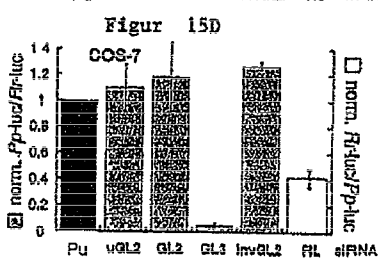
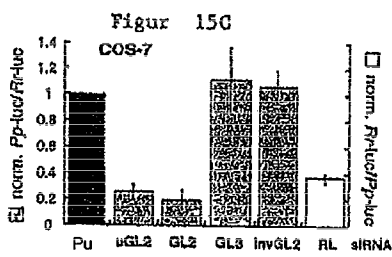
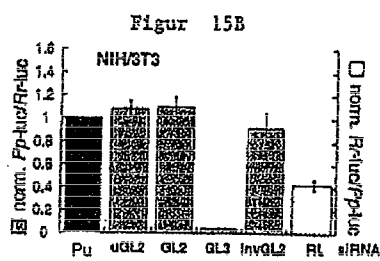
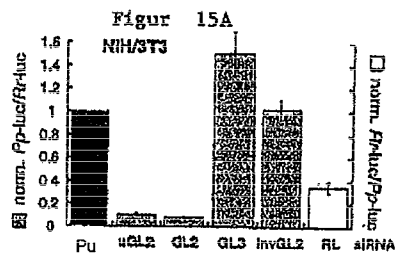
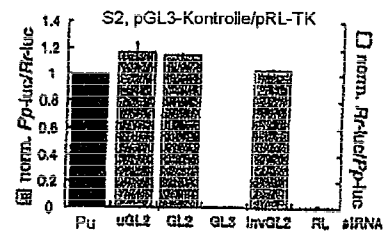
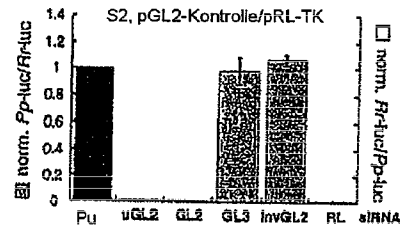




Figur 14A

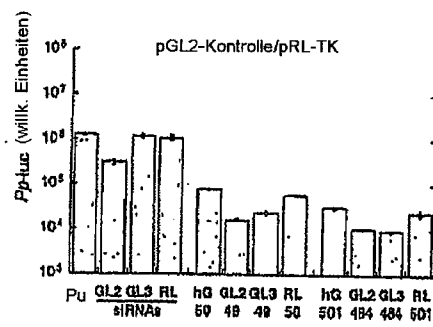
siRNA-Duplex	
uGL2	5' <sup>3'</sup> CGUACGCGGAUACUUCGAUU UUGCAUCCGCUUAUGAAGCU 5'
GL2	5' <sup>3'</sup> CGUACGCGGAUACUUCGATT TTGCAUCCGCUUAUGAAGCU 5'
GL3	5' <sup>3'</sup> CUUACGCUAGUACUUCGATT TTGCAUCCGCUUAUGAAGCU 5'
InvGL2	5' AGCUUCAUAAGCGCGAUGCCTT TTUCCAAGUAUCCGCGUACG 5'
RL	5' AAACAUGCAGAAAUGCUGTT TTUUUGUACGUCUUUACGAC 5'

Figur 14B

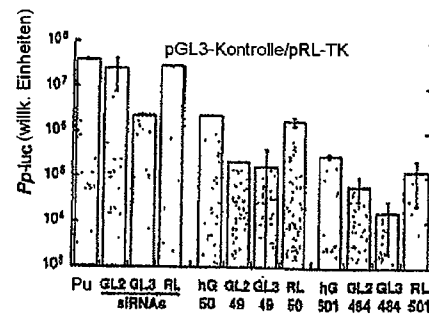


Figur 15I

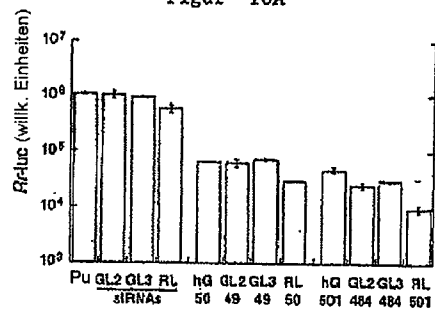
Figur 15J



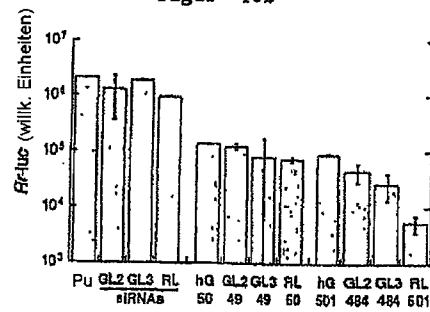
Figur 16A



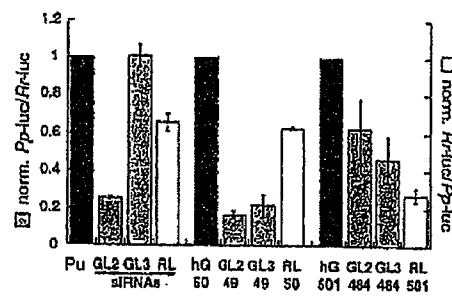
Figur 16B



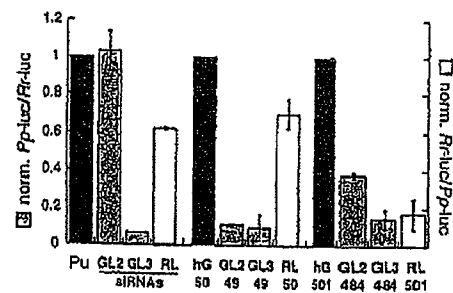
Figur 16C



Figur 16D



Figur 16E



Figur 16F