

(11) Número de Publicação: **PT 1309726 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12Q 1/68** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2001.03.30</b>	(73) Titular(es):
(30) Prioridade(s): <b>2000.03.30 US 193594 P</b>	<b>WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL</b>
<b>2000.12.01 EP 00126325</b>	<b>RESEARCH</b>
<b>2001.01.31 US 265232 P</b>	<b>NINE CAMBRIDGE CTR. CAMBRIDGE,</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.05.14</b>	<b>MASSACHUSETTS 02142</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.12.02</b>	<b>US</b>
<b>045/2010</b>	<b>MAX-PLANCK-GES. ZUR FORDERUNG</b>
	<b>WISSENSCHAFTEN E.V.</b>
	<b>DE</b>
	<b>MASSACHUSETTS INSTITUTE OF</b>
	<b>TECHNOLOGY</b>
	<b>US</b>
	<b>UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS</b>
	<b>US</b>
	(72) Inventor(es):
	THOMAS TUSCHL
	PHILLIP A. SHARP
	PHILLIP D. ZAMORE
	DAVID P. BARTEL
	US
	US
	US
	US
(74) Mandatário:	
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MEDIADORES DE INTERFERÊNCIA POR RNA ESPECÍFICOS DE SEQUÊNCIA DE RNA**

(57) Resumo:

**RESUMO****"MEDIADORES DE INTERFERÊNCIA POR RNA ESPECÍFICOS DE SEQUÊNCIA DE RNA"**

O presente invento está relacionado com um sistema *in vitro* de *Drosophila*, o qual foi usado para demonstrar que o dsRNA é processado em segmentos de RNA de 21-23 nucleótidos (nt) de comprimento. Ainda, quando estes fragmentos de 21-23 nt foram purificados e adicionados novamente a extractos de *Drosophila*, mediaram a interferência por RNA na ausência de dsRNA longo. Assim, estes fragmentos de 21-23 nt são mediadores da degradação de RNA específicos de sequência. Um sinal molecular, que pode ser o seu comprimento específico, deve estar presente nestes fragmentos de 21-23 nt para recrutar factores celulares envolvidos em RNAi. O presente invento inclui estes fragmentos de 21-23 nt e a sua utilização para especificamente inactivar a função de genes. A utilização destes fragmentos (ou oligonucleótidos sintetizados quimicamente da mesma natureza ou similar) permite dirigir mRNAs específicos para degradação em células de mamífero, onde a utilização de dsRNAs longos para induzir RNAi geralmente não é realizável, presumivelmente devido aos efeitos adversos da resposta ao interferão. O facto de se poder atingir especificamente a função de um gene particular é útil em aplicações funcionais genómicas e terapêuticas.

**DESCRIÇÃO**

**"MEDIADORES DE INTERFERÊNCIA POR RNA ESPECÍFICOS DE  
SEQUÊNCIA DE RNA"**

**FUNDAMENTO DO INVENTO**

A interferência por RNA ou "RNAi" é um termo usado pela primeira vez por Fire e colaboradores para descrever a observação de que o RNA de cadeia dupla (dsRNA) pode bloquear a expressão de genes quando é introduzido em vermes (Fire et al., (1998) *Nature* 391, 806-811). dsRNA dirige o silenciamento pós-transcrição específico de genes em muitos organismos, incluindo vertebrados, e proporcionou uma nova ferramenta para o estudo da função dos genes. RNAi envolve a degradação de mRNA, mas muitos dos mecanismos bioquímicos subjacentes a esta interferência são desconhecidos. A reconstituição das características essenciais de RNAi *in vitro* é necessária para uma análise bioquímica do fenómeno.

Tuschl T et al. (*Genes Dev.*, 13, 3191-97, 1999) descrevem um extracto acelular, derivado de embriões de *Drosophila* na fase de blastoderme sincicial, que medeia a interferência por RNA. É descrita a utilização do extracto para estudar RNAi. A referência conclui que é necessário um comprimento mínimo do dsRNA superior a 49 pares de bases.

Hammond SM et al. (Nature, 404, 293-96, 2000) descrevem o silenciamento da expressão de genes em células de *Drosophila* em cultura, através da transfecção com RNA de cadeia dupla específico de sequência. Observou-se que os extractos de células transfectadas possuem uma actividade de nuclease que cofracciona com fragmentos de DNA de aproximadamente 25 pb.

#### SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento, que é definido pelas reivindicações apensas, proporciona um método para a produção de RNA de cadeia dupla entre 21 e 23 nucleótidos de comprimento compreendendo:

(a) combinação de RNA de cadeia dupla com um extracto solúvel que medeia a interferência por RNA, produzindo assim uma combinação; e

(b) manutenção da combinação de (a) em condições tais que o RNA de cadeia dupla seja processado em RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento.

São igualmente descritos métodos relacionados usando interferência por RNA, incluindo métodos de mediação da interferência por RNA, de avaliação da função de genes, de produção de células "knock-down" e de identificação de RNAs de 21-23 nt que medeiam a interferência por RNA.

Os métodos do presente invento foram identificados usando interferência por RNA, mediada por dsRNA específico de genes, num sistema acelular derivado de embriões de *Drosophila* na fase de blastoderme sincicial. O sistema *in vitro* complementa abordagens genéticas para dissecar a base molecular de RNAi. Como aqui descrito, os mecanismos moleculares subjacentes foram examinados usando o sistema *in vitro* de *Drosophila*. Os resultados mostraram que RNAi é dependente de ATP, ainda que não acoplado à tradução de mRNA. Ou seja, a síntese proteica não é necessária para RNAi *in vitro*. Na reacção de RNAi, ambas as cadeias (codificadora e complementar da codificadora) do dsRNA foram processadas em pequenos RNAs, fragmentos ou segmentos entre cerca de 21 e cerca de 23 nucleótidos (nt) de comprimento (RNAs com mobilidade nos géis de sequenciação que correspondem a marcadores que têm 21-23 nt de comprimento, facultativamente referidos como RNAs de 21-23 nt). O processamento do dsRNA em pequenos fragmentos de RNA não requer o mRNA alvo, o que demonstra que as espécies de pequenos RNAs são geradas por processamento do dsRNA e não como produto da degradação do mRNA alvo com dsRNA. O RNA é clivado apenas dentro da região de identidade com dsRNA. A clivagem ocorre em locais fora dos 21-23 nucleótidos, o mesmo intervalo observado para o próprio dsRNA sugerindo que os fragmentos de 21-23 nucleótidos do dsRNA conduzem a clivagem do mRNA. Esses RNAs de 21-23 nt modificados confirmam que estes fragmentos conduzem a clivagem de mRNA.

Assim, são aqui descritas moléculas de RNA isoladas (cadeia dupla; cadeia simples) entre cerca 21 e cerca de 23 nucleótidos que medeiam RNAi. Ou seja, os RNAs isolados medeiam a degradação do mRNA de um gene ao qual o RNA corresponde (degradação mediada do mRNA que é o produto da transcrição do gene, o qual também é referido como um gene alvo). Por conveniência, tal mRNA é igualmente aqui referido como mRNA a ser degradado. Como aqui é usado, os termos RNA, molécula(s) de RNA, segmento(s) de RNA e fragmento(s) de RNA são usados indiferentemente para referir RNA que medeia interferência por RNA. Estes termos incluem RNA de cadeia dupla, RNA de cadeia simples, RNA isolado (RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético, RNA produzido por via recombinante), assim como RNA alterado que difere do RNA natural pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleótidos. Tais alterações podem incluir adição de material não nucleotídico, como seja aos extremos do RNA de 21-23 nt ou internamente (num ou mais nucleótidos do RNA). Os nucleótidos nas moléculas de RNA podem também compreender nucleótidos não convencionais, incluindo nucleótidos ou desoxirribonucleótidos não naturais. Colectivamente, todos esses RNAs alterados são referidos como análogos ou análogos de RNA natural. O RNA de 21-31 nucleótidos necessita apenas de ser suficientemente similar ao RNA natural para ter capacidade para mediar (medeia) RNAi. Como aqui usada a frase "medeia RNAi" refere-se a (indica) a capacidade para distinguir quais os RNAs a serem degradados pela maquinaria ou processo de RNAi. O RNA que medeia RNAi

interage com a maquinaria de RNAi de forma a dirigir a maquinaria para degradar um mRNA particular. Numa realização, são aqui descritas moléculas de RNA entre cerca de 21 e cerca de 23 nucleótidos que dirigem a clivagem de mRNA específico ao qual a sua sequência corresponde. Não é necessário que exista uma correspondência perfeita entre as sequências, mas a correspondência deve ser suficiente para permitir que o RNA dirija a clivagem por RNAi do mRNA alvo. Numa realização particular, as moléculas de RNA de 21-23 nt compreendem um grupo hidroxilo 3'.

O presente invento também está relacionado com métodos para a produção de moléculas de RNA de 21 a 23 nucleótidos com capacidade para mediar a clivagem por RNAi. Numa realização, é usado o sistema *in vitro* de *Drosophila*. Nesta realização, dsRNA é combinado com um extracto solúvel derivado de embrião de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições nas quais o dsRNA é processado em moléculas de RNA de 21 a 23 nucleótidos. Numa outra realização, o sistema *in vitro* de *Drosophila* é usado para obter sequências de RNA de 21 a 23 nucleótidos que medeiam a interferência por RNA do mRNA de um gene particular (e.g., oncogene, gene viral). Nesta realização, o RNA de cadeia dupla que corresponde a uma sequência do gene a ser atingido é combinado com um extracto solúvel derivado de embrião de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições nas quais o RNA de cadeia dupla é processado em RNA de aproximadamente 21 a cerca de 23 nucleótidos de

comprimento. Como aqui mostrado, o RNA de 21-23 nt medeia RNAi do mRNA do gene alvo (o gene cujo mRNA se pretende degradar). O método de obtenção de RNAs de 21-23 nt usando o sistema *in vitro* de *Drosophila* pode, ainda, compreender o isolamento da sequência de RNA a partir da combinação.

Também é aqui descrito um DNA de 21-23 nt produzido pelos métodos do presente invento, assim como RNAs de 21-23 nt, produzidos por outros métodos, tais como síntese química ou técnicas de DNA recombinante, que possuem as mesmas sequências ou substancialmente as mesmas sequências dos RNAs naturais que medeiam RNAi, como os produzidos pelos métodos do presente invento. Todos estes são referidos como RNAs de 21-23 nt que medeiam a interferência por RNA. Como aqui usado, o termo RNA isolado inclui RNA obtido por quaisquer métodos, incluindo processamento ou clivagem de dsRNA como aqui descrito; produção por métodos de síntese química; e produção por técnicas de DNA recombinante. Também são descritas utilizações de RNAs de 21-23 nt, tais como tratamento terapêutico ou profiláctico e composições compreendendo RNAs de 21-23 nt que medeiam RNAi, tais como composições compreendendo RNAs de 21-23 nt e um veículo adequado (e.g., um tampão ou água).

O presente invento também está relacionado com um método para mediar a interferência por RNA do mRNA de um gene numa célula ou organismo (e.g., mamífero como seja um murganho ou um ser humano). Numa realização, RNA de 21 a 23 nt que tem como alvo o mRNA a ser degradado é introduzido

na célula ou organismo. A célula ou organismo é mantido em condições nas quais ocorre a degradação do mRNA do gene na célula ou organismo. A célula ou organismo pode ser um em que ocorre RNAi naturalmente na célula ou organismo ou uma célula ou organismo pode ser um que tenha sido modificado de forma a ocorrer RNAi (e.g., através da adição de componentes obtidos a partir de uma célula ou extracto celular que medeia RNAi ou activação de componentes endógenos). Como aqui usado, o termo "célula ou organismo em que ocorre RNAi" inclui uma célula ou organismo em que ocorre RNAi naturalmente na célula ou organismo ou uma célula ou organismo que foi modificado de forma a ocorrer RNAi. Numa outra realização, o método de mediação da interferência por RNA de um gene numa célula compreende a combinação do RNA de cadeia dupla, que corresponde a uma sequência do gene, com um extracto solúvel derivado do embrião de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições tais que o RNA de cadeia dupla seja processado em RNAs com aproximadamente 21 a cerca de 23 nucleótidos. O RNA de 21 a 23 nt é então isolado e introduzido na célula ou organismo. A célula ou organismo é mantido em condições tais que ocorra a degradação de mRNA do gene, mediando assim a interferência por RNA do gene na célula ou organismo. Como descrito para a realização anterior, a célula ou organismo é uma em que ocorra RNAi naturalmente (na célula ou organismo conforme adequado) ou que tenha sido modificada de forma que ocorra RNAi. Os RNAs de 21 a 23 nt podem também ser produzidos por outros métodos, tais como métodos de síntese química ou técnicas de DNA recombinante.

São igualmente descritos componentes bioquímicos de uma célula, como seja uma célula de *Drosophila*, que processam dsRNA em RNA de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos. Ainda, são descritos os componentes bioquímicos de uma célula que estão envolvidos na degradação do mRNA por RNA de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. Em ambas as realizações, os componentes bioquímicos podem ser obtidos a partir de uma célula em que surjam ou podem ser produzidos por outros métodos, tais como síntese química ou métodos de DNA recombinante. Como aqui usado, o termo "isolado" inclui materiais (e.g., componentes bioquímicos, RNA) obtidos a partir de uma fonte em que ocorrem e materiais produzidos por métodos tais como síntese química ou métodos de ácido nucleico (DNA, RNA) recombinante.

O presente invento também está relacionado com um método para inactivar (parcialmente ou totalmente) o gene alvo, proporcionando assim uma alternativa para os métodos presentemente disponíveis de inactivação ("knocking down" ou "knocking out") de um gene ou genes. Este método de eliminação da expressão de um gene pode ser usado para fins terapêuticos ou para pesquisa (e.g., para gerar modelos de estado de doença, para examinar a função de um gene, para avaliar se um agente actua sobre um gene, para validar alvos para a descoberta de fármacos). Este último apenas se aplica a organismos não humanos. Nos casos em que a função do gene é eliminada, a célula ou organismo resultante não

humano podem também ser referido como "knockout". Uma realização do método de produção de células "knockdown" compreende a introdução numa célula, em que um gene (referido como gene alvo) deve ser inactivado, de RNA de 21 a 23 nt que se pretende atinja o gene e mantenha a célula ou organismo resultante em condições tais que ocorra RNAi, resultando na degradação do mRNA do gene alvo, produzindo assim células "knockdown". As células "knockdown" e os organismos não humanos produzidos pelo presente método são igualmente descritos.

O presente invento também está relacionado com um método de examinação ou avaliação da função de um gene numa célula ou organismo. Numa realização, RNA de 21 a 23 nt que tem como alvo mRNA do gene para a degradação é introduzido numa célula ou organismo não humano em que ocorre RNAi. A célula ou organismo não humano é referido como uma célula ou organismo a testar. A célula ou organismo não humano a testar é mantido em condições nas quais ocorre degradação do mRNA do gene. O fenótipo da célula ou organismo a testar é então observado e comparado com o de uma célula ou organismo controlo adequado, como seja uma célula ou organismo não humano correspondente, que é tratado da mesma forma excepto o gene alvo (específico) não ser atingido. Um RNA de 21 a 23 nt que não tem como alvo o mRNA para degradação pode ser introduzido numa célula ou organismo não humano controlo em vez do RNA introduzido na célula ou organismo não humano a testar, ainda que não seja necessário fazê-lo. Uma diferença entre os fenótipos das células ou organismos

a testar e controlo proporciona informação acerca da função do mRNA degradado. Numa outra realização, RNA de cadeia dupla que corresponde a uma sequência do gene é combinado com um extracto solúvel que medeia RNAi, como seja o extracto solúvel derivado de embrião de *Drosophila* aqui descrito, em condições nas quais o RNA de cadeia dupla é processado para gerar RNA de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. O RNA de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos é isolado e depois introduzido numa célula ou organismo não humano em que ocorre RNAi (célula ou organismo a testar). A célula ou organismo a testar é mantido em condições nas quais ocorre degradação do mRNA. O fenótipo da célula ou organismo a testar é então observado e comparado com a de um controlo adequado, como seja uma célula ou organismo correspondente, que é tratado da mesma forma que célula ou organismo a testar excepto o gene alvo não ser atingido. Uma diferença entre os fenótipos das células ou organismos a testar ou controlo proporciona informação acerca da função do gene alvo. A informação proporcionada pode ser suficiente para identificar (definir) a função do gene ou pode ser usada conjuntamente com a informação obtida outros ensaios ou análises para o fazer.

Igualmente o objectivo do presente invento é um método para validar se um agente actua num gene. Neste método, o RNA de 21 a 23 nucleótidos que tem como alvo o mRNA a ser degradado é introduzido numa célula ou organismo não humano em que ocorre RNAi. A célula ou organismo (que

contém o RNA introduzido) é mantido em condições nas quais ocorre a degradação do mRNA e o agente é introduzido na célula ou organismo. Se o agente possuir um efeito na célula ou organismo ele é determinado; se o agente não tiver efeito na célula ou organismo, então o agente actua no gene.

O presente invento também está relacionado com um método de validação se um produto de um gene é um alvo para a descoberta ou desenvolvimento de fármacos. RNA de 21 a 23 nucleótidos que dirige o mRNA, que corresponde ao gene, para degradação é introduzido numa célula ou organismo não humano. A célula ou organismo é mantida em condições nas quais a degradação do RNA ocorre, resultando no decréscimo da expressão do gene. É determinado se o decréscimo na expressão do gene tem um efeito na célula ou organismo, pelo que se o decréscimo da expressão do gene tiver efeito, então o produto do gene é um alvo para a descoberta ou desenvolvimento de fármacos.

É igualmente aqui descrito um método de tratamento de uma doença ou condição, associada à presença de uma proteína num indivíduo, compreendendo a administração do RNA individual de cerca de 21 e cerca de 23 nucleótidos que tem como alvo o mRNA da proteína (o mRNA que codifica a proteína) para degradação. Como resultado, a proteína não é produzida ou não é produzida no grau em que seria na ausência do tratamento.

É igualmente descrito um gene identificado por sequenciação das moléculas de RNA endógenas de 21 a 23 nucleótidos que medeiam a interferência por RNA.

Está também incluído no presente invento um método de identificação de locais alvo dentro de um mRNA, que sejam particularmente adequados para RNAi, assim como um método de avaliação da capacidade de RNAs de 21-23 nt para mediarem RNAi.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática de mRNAs repórteres e dsRNAs Rr-Luc e Pp-Luc. Os comprimentos e posições dos ssRNA, asRNA e dsRNAs estão apresentados como barras pretas relativamente às sequências de mRNA repórter Rr-Luc e Pp-Luc. Os rectângulos pretos indicam as duas sequências codificadoras da luciferase não relacionadas, as linhas correspondem às regiões não traduzidas 5' e 3' dos mRNAs.

Figura 2A é um gráfico do índice de actividade de luciferase, após tratamento do mRNA Pp-Luc 50 pM com ssRNA, asRNA ou dsRNA 10 nM do segmento de 505 pb do gene Pp-Luc, que mostra interferência específica por dsRNA *in vitro*. Os dados são os valores médios de sete ensaios  $\pm$  desvio padrão. Foram usados quatro lisados preparados independentemente. A actividade de luciferase foi normalizada relativamente ao controlo de tampão; um índice igual a um indica que ausência de interferência específica de gene.

Figura 2B é um gráfico do índice de actividade de luciferase após tratamento de mRNA Rr-Luc 50 pM com ssRNA, asRNA ou dsRNA 10 nM derivado do segmento de 501 pb do gene Rr-Luc mostrando interferência específica por dsRNA *in vitro*. Os dados são os valores médios de seis ensaios  $\pm$  desvio padrão. Foram usados quatro lisados preparados independentemente. Um índice igual a um indica ausência de interferência específica de gene.

Figura 3A é uma representação esquemática da estratégia experimental usada para mostrar que a incubação no lisado de embrião de *Drosophila* potencia dsRNA para a interferência específica de gene. Os mesmos dsRNAs usados na Figura 2 (ou tampão) foram essencialmente pré-incubados, usando diluições de duas vezes, em seis reacções sucessivas com lisado de embrião de *Drosophila*, depois testados relativamente à sua capacidade para bloquear a expressão de mRNA. Como controlo, a mesma quantidade de dsRNA (10 nM) ou tampão foi diluída directamente em tampão e incubada com mRNAs PpLuc e Rr-Luc e lisado.

Figura 3B é um gráfico de potenciação quando se pretende atingir mRNA Pp-Luc. As colunas pretas indicam que o dsRNA ou tampão foi seriadamente pré-incubado; colunas brancas correspondem a uma diluição directa de 32 vezes do dsRNA. Os valores foram normalizados relativamente aos dos controlos tampão.

Figura 3C é um gráfico de potenciação quando se pretende atingir mRNA Rr-Luc. O controlo do tampão correspondente está apresentado na Figura 3B.

Figura 4 é um gráfico que mostra o efeito do dsRNA competidor na interferência específica de gene. Concentrações crescentes de dsRNA nanos (508 pb) foram adicionadas a reacções contendo dsRNA 5 nM (os mesmos dsRNAs usados nas Figuras 2A e 2B) para atingir mRNA Pp-Luc (colunas a preto, eixo da esquerda) ou mRNA Rr-Luc (colunas brancas, eixo da direita). Cada uma das reacções continha um mRNA alvo (Pp-Luc para as colunas pretas, Rr-Luc para as brancas) e um mRNA controlo não relacionado (Rr-Luc para as colunas pretas, Pp-Luc para as brancas). Os valores foram normalizados relativamente ao controlo tampão (não apresentado). As reacções foram incubadas em condições convencionais (ver Métodos).

Figura 5A é um gráfico que mostra o efeito de dsRNA na estabilidade do mRNA. Círculos, mRNA Pp-Luc; quadrados, mRNA Rr-Luc; símbolos preenchidos, incubação com tampão; símbolos vazios, incubação com Pp-dsRNA.

Figura 5B é um gráfico que mostra a estabilidade de mRNA Rr-Luc incubado com Rr-dsRNA ou Pp-dsRNA. Quadrados preenchidos, tampão; quadrados vazios, Pp-dsRNA (10 nM); círculos vazios, Rr-dsRNA (10 nM).

Figura 5C é um gráfico que mostra a dependência

do comprimento do dsRNA: A estabilidade do mRNA Pp-Luc foi avaliada após incubação no lisado, na presença de tampão ou de dsRNAs de diferentes comprimentos. Quadrados preenchidos, tampão; círculos vazios, dsRNA 49 pb (10 nM); triângulos invertidos vazios, dsRNA de 149 pb (10 nM); triângulos vazios, dsRNA de 505 pb (10 nM); losangos vazios, dsRNA de 997 pb (10 nM). As reacções foram incubadas em condições convencionais (ver Métodos).

Figura 6 é um gráfico que mostra que RNAi requer ATP. A cinase de creatina (CK) usa fosfatase de creatina (CP) para regenerar ATP. Círculos, +ATP, +CP, +CK; quadrados, -ATP, +CP, +CK; triângulos, -TP, -CP, +CK; triângulos invertidos, -ATP, +CP, -CK.

Figura 7A é um gráfico de síntese proteica, reflectida pela actividade de luciferase após incubação de mRNA Rr-Luc na reacção de RNAi *in vitro* durante 1 hora, na presença dos inibidores de síntese proteica anisomicina, ciclo-hexamida ou cloranfenicol, relativamente a uma reacção sem qualquer inibidor mostrando que RNAi não requer a tradução de mRNA.

Figura 7B é um gráfico que mostra a tradução de mRNAs Pp-Luc com a estrutura "cap" 7-metil-guanosina e adenosina (círculos e quadrados, respectivamente) na reacção RNAi na ausência de dsRNA, conforme medido pela actividade de luciferase produzida numa incubação de uma hora.

Figura 7C é um gráfico que mostra a incubação numa reacção de RNAi de mRNA Pp-Luc com "cap" 7-metilguanosina (círculos) e de mRNA de Pp-Luc com "cap" de adenosina (quadrados) marcados radioactivamente de forma uniforme com  $^{32}\text{P}$ , na presença (símbolos vazios) e ausência (símbolos preenchidos) de dsRNA Pp-luc de 505 pb.

Figura 8A é um gráfico da análise em gel de agarose desnaturante de mRNA Pp-luc incubado numa reacção de RNAi convencional com tampão, Pp-asRNA de 505 nt ou Pp-dsRNA de 505 pb durante os tempos indicados, mostrando que asRNA origina uma pequena quantidade RNAi *in vitro*.

Figura 8B é um gráfico da análise em gel de agarose desnaturante de mRNA Rr-Luc incubado numa reacção de RNAi convencional com tampão, Pp-asRNA de 505 nt ou Pp-dsRNA de 505 pb, durante os tempos indicados mostrando que asRNA provoca uma pequena quantidade de RNAi *in vitro*.

Figura 9 é uma representação esquemática das posições dos três dsRNAs, 'A', 'B' e 'C', relativamente ao mRNA de Rr-luc.

Figura 10 indica os locais de clivagem mapeados nos primeiros 267 nt do mRNA Rr-luc (SEQ ID NO:1). A barra azul por baixo da sequência indica a posição do dsRNA 'C' e os círculos azuis indicam a posição dos locais de clivagem causada por este dsRNA. A barra verde representa a posição de dsRNA 'B' e os círculos verdes, os locais de clivagem. A

barra magenta indica a posição de dsRNA 'A' e os círculos magenta, as clivagens. Uma clivagem excepcional dentro de um segmento de 7 uracilos está assinalada com uma seta vermelha.

Figura 11 é um modelo proposto para RNAi. RNAi é considerada como começando com clivagem do dsRNA em produtos de 21-23 nt por uma nuclease específica de dsRNA, talvez num complexo multiproteico. Estes curtos dsRNAs devem então ser dissociados por uma helicase dependente de ATP, possivelmente um componente do complexo inicial, em asRNAs de 21-23 nt que poderão então dirigir o mRNA para clivagem. Os asRNAs curtos são imaginados como permanecendo associados com proteínas específicas de RNAi (círculos) que foram originalmente ligadas pelo dsRNA de tamanho completo, explicando assim a ineficiência de asRNA para induzir RNAi *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, uma nuclease (triângulos) clivará o mRNA.

Figura 12 é um gráfico de barras que mostra o silenciamento de genes, específico de sequências, por fragmentos de 21-23 nt. A proporção de actividade de luciferase após os mRNAs Pp-Luc e Rr-Luc serem degradados por dsRNA Pp-Luc ou Rr-Luc (500 pb) ou fragmentos de 21-23 nt isolados a partir de uma incubação prévia do respectivo dsRNA em lisado de *Drosophila*. A quantidade de 21-23 meros isolados, presentes na reacção de incubação, corresponde a aproximadamente a mesma quantidade de 21-23 meros gerados durante a reacção de incubação com dsRNA de 500 pb 5 nM. Os

dados são valores médios de 3 ensaios e o desvio padrão é representado por barras de erro. A actividade de luciferase foi normalizada relativamente ao controlo tampão.

Figura 13A ilustra a purificação de fragmentos de RNA numa coluna de filtração em gel Superdex HR200 10/30 (Pharmacia) usando o método descrito no Exemplo 4. dsRNA foi marcado com  $^{32}\text{P}$  e a radioactividade recuperada em cada fracção da coluna está representada no gráfico. As fracções foram também analisadas através de electroforese num gel desnaturante (inserção).

Figura 13B demonstra a capacidade do RNA de Rr-luciferase, após incubação no lisado de *Drosophila* e fraccionamento como na Fig. 13A, para mediar a interferência específica de sequência com a expressão de um mRNA alvo de Rr-luciferase. Um microlitro de cada fracção ressuspensa foi testado numa reacção *in vitro* de RNAi de 10 microlitros (ver Exemplo 1). Este procedimento dá origem a uma concentração de RNA na reacção RNAi padrão *in vitro* que é aproximadamente igual à concentração daquela espécie de RNA na reacção original antes da aplicação na coluna. A luminescência relativa por segundo foi normalizada relativamente ao valor médio dos dois controlos tampão.

Figura 13 C é o controlo da especificidade para a Fig 13B. Demonstra que o RNA fraccionado da Fig. 13B não medeia eficazmente a interferência específica de sequência com a expressão de um mRNA de Pp-luciferase. Os ensaios são como na Fig. 13B.

Figuras 14A e 14B são representações esquemáticas de construções repórter e de duplas cadeias de siRNA. A Figura 14A ilustra as regiões dos genes repórter para a luciferase do pirilampo (Pp-luc) e de amor-perfeito do mar (Rr-luc) dos plasmídeos pGL2-Control, pGL3-Control e pRL-TK (Promega). Os elementos reguladores de SV40, o promotor da timidina-cinase de HSV e dois intrôns (linhas) estão indicados. A sequência da luciferase GL3 é 95% idêntica à de GL2, mas RL é totalmente não relacionada com ambas. A expressão de luciferase a partir de pGL2 é aproximadamente 10 vezes inferior à de pGL3 em células de mamífero transfectadas. A região visada pelas duplas cadeias de siRNA está indicada como barras pretas abaixo da região codificadora dos genes da luciferase. A Figura 14B mostra as sequências codificadoras (parte de cima) e complementares (parte de baixo) das cadeias duplas de siRNA tendo como alvo GL2 (SEQ ID NOS: 10 e 11), GL3 (SEQ ID NOS: 12 e 13) e luciferase RL (SEQ ID NOS: 14 e 15). As duplas cadeias de siRNA GL2 e GL3 diferem apenas em 3 substituições de nucleótidos isoladas (assinalado com uma caixa cinzenta). Como controlo específico, foi sintetizada uma cadeia dupla com a sequência GL2 invertida, invGL2 (SEQ ID NOS: 16 e 17). Os extremos salientes 3' de 2 nt de 2'-desoxitimidina está indicado como TT; uGL2 (SEQ ID NOS: 18 e 19) é semelhante a siRNA de GL2 mas contém extremos salientes 3' de ribo-uridina.

As Figuras 15A-15J são gráficos que mostram a

interferência por RNA através das cadeias duplas de siRNA. As razões entre luciferase alvo e controlo foram normalizadas relativamente a um controlo tampão (bu, barras negras); barras cinzentas indicam razões entre a luciferase de *Photinus pyrallis* (Pp-Luc) GL2 ou GL3 e a Luciferase de *Renilla reniformis* (Rr-Luc) RL (eixo da esquerda), as barras brancas indicam as razões entre RL e GL2 ou GL3 (eixo da direita). As Figuras 15A, 15C, 15E, 15G e 15I mostram resultados de experiências realizadas com a combinação dos plasmídeos repórteres pGL2-Control e pRL-TK, as Figuras 15B, 15D, 15F, 15H e 15J com os plasmídeos repórteres pGL3-Control e pRL-TK. A linha celular usada para a experiência de interferência está indicada no topo de cada gráfico. As razões entre Pp-luc/Rr-Luc para o controlo tampão (u) variaram entre 0,5 e 10 para GL2/pRL e entre 0,03 e 1 para pGL3/pRL, respectivamente, antes da normalização e entre as várias linhas celulares testadas. Os dados representados graficamente foram a média de três experiências independentes  $\pm$  DP.

Figuras 16-16F são gráficos que mostram os efeitos de siRNAs de 21 nt, 50 pb e 500 pb na expressão de luciferase em células HeLa. O comprimento exacto dos dsRNAs longos está indicado por baixo das barras. As Figuras 16A, 16C e 16E descrevem experiências realizadas com os plasmídeos repórteres pGL2-Control e pRL-TK, as Figuras 16B, 16D e 16F com os plasmídeos repórteres pGL3-Control e pRL-TK. Os dados foram a média de duas experiências independentes  $\pm$  D.P. Figuras 16A, 16B, expressão absoluta de Pp-luc,

apresentada em unidades arbitrárias de luminescência. Figura 16C, 16D, expressão de *Rr-luc*, representada em unidades arbitrárias de luminescência. Figuras 16E, 16F, razões entre luciferase alvo normalizada e controlo. Os índices de actividade de luciferase para as cadeias duplas de siRNA foram normalizados relativamente a um controlo tampão (bu, barras pretas); os índices de luminescência para dsRNA de 50 ou 500 pb foram normalizados relativamente às respectivas razões observadas para dsRNAs de 50 e 500 pb derivados de GFP humanizada (hG, barras pretas). Deve-se notar que as diferenças globais na sequência entre os dsRNA de 49 e 484 pb que têm como alvo GL2 e GL3 não são suficientes para conferir especificidade entre os alvos GL2 e GL3 (43 nt de identidade sem interrupção em segmento de 49 pb, 239 nt de comprimento de identidade sem interrupção em segmento de 484 pb) (Parrish, S., et al., Mol. Cell, 6:1077-1087 (2000)).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

A cadeia dupla (dsRNA) dirige a degradação específica de sequência de RNA através de um processo conhecido como interferência por RNA (RNAi). Sabe-se que o processo ocorre numa grande variedade de organismos, incluindo embriões de mamífero e outros vertebrados. Usando o sistema *in vitro* de *Drosophila* aqui descrito, foi demonstrado que dsRNA é processado em segmentos de RNA de 21-23 nt (nt) de comprimento e, ainda, que quando estes fragmentos de 21-23 nt são purificados e novamente

adicionados aos extractos de *Drosophila*, eles medeiam a interferência por RNA na ausência de dsRNA mais longos. Assim, estes fragmentos de 21-23 nt são mediadores específicos de sequência da degradação de RNA. Um sinal molecular, o qual pode ser o comprimento específico dos fragmentos, deve estar presente nestes fragmentos de 21-23 nt para recrutar factores celulares envolvidos em RNAi. Descrevemos aqui estes fragmentos de 21-23 nt e a sua utilização para especificamente inactivarem a função de genes. A utilização destes fragmentos (produzidos por via recombinante ou oligonucleótidos obtidos por síntese química da mesma natureza ou similares) permite que mRNAs específicos sejam dirigidos para degradação em células de mamífero. A utilização de dsRNAs longos em células de mamífero para induzir RNAi geralmente não é prática, presumivelmente devido aos efeitos adversos da resposta de interferão. A inactivação específica da função de um gene particular, a qual é possível com fragmentos de 21-23 nt, é útil em aplicações genómicas e terapêuticas funcionais.

Em particular, são aqui descritas moléculas de RNA entre cerca de 21 e cerca de 23 nucleótidos que medeiam RNAi. Numa realização, a descrição está relacionada com moléculas de RNA de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos que dirigem a clivagem de mRNA específico às quais correspondem. As moléculas de RNA de 21-23 nt podem também compreender um grupo hidroxilo 3'. As moléculas de RNA de 21-23 nt podem ser de cadeia simples ou dupla (como dois RNAs de 21-23 nt); tais moléculas podem ser dotadas de

extremos censes ou possuir extremos salientes (e.g. 5', 3'). Em realizações específicas, a molécula de RNA é de cadeia dupla e com extremos censes ou com extremos salientes (como dois RNAs de 21-23 nt).

Numa realização, pelo menos uma cadeia da molécula de DNA possui um extremo saliente 3' entre cerca de 1 e cerca de 6 nucleótidos (e.g., nucleótidos pirimidina, nucleótidos urina) de comprimento. Noutras realizações, o extremo saliente 3' tem entre cerca de 1 e cerca de 5 nucleótidos, entre cerca de 1 e cerca de 3 nucleótidos e entre cerca de 2 e cerca de 4 nucleótidos de comprimento. Numa realização, a molécula de RNA é de cadeia dupla, uma cadeia possui um extremo saliente 3' e a outra cadeia pode ter extremos censes ou ter um extremo saliente. Na realização, em que a molécula de RNA possui cadeia dupla e ambas as cadeias compreendem um extremo saliente, o comprimento dos extremos salientes pode ser igual ou diferente para cada cadeia. Numa realização particular, o RNA compreende cadeias de 21 nucleótidos, as quais são emparelhadas e possuem extremos salientes entre cerca de 1 e cerca de 3, particularmente cerca de 2, nucleótidos em ambos os extremos 3' do RNA. De modo a aumentar mais a estabilidade do RNA contra a degradação, numa realização, o RNA é estabilizado através da inclusão de nucleótidos de purinas, tais como nucleótidos de adenosina ou de guanosina. Como alternativa, a substituição de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, e.g. substituição de 2 nucleótidos salientes 3' de uridina por 2'-desoxi-

timidina é tolerado e não afecta a eficiência de RNAi. A ausência de um hidroxilo 2' aumenta significativamente a resistência a nucleases do extremo saliente em meio de cultura de tecidos.

As moléculas de 21-23 nt podem ser obtidas usando uma série de técnicas conhecidas dos familiarizados com a matéria. Por exemplo, o RNA pode ser sintetizado quimicamente ou produzido por via recombinante usando métodos conhecidos na área. Os RNAs de 21-23 nt podem também ser obtidos usando o sistem *in vitro* de *Drosophila* aqui descrito. A utilização do sistema *in vitro* de *Drosophila* engloba a combinação de dsRNA com um extracto solúvel derivado de embrião de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições nas quais o dsRNA é processado em RNA de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos. O sistema *in vitro* de *Drosophila* pode também ser usado para obter RNA de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de comprimento que medeia interferência por RNA do mRNA particular de um gene particular (e.g., oncogene, gene viral). Nesta realização, o RNA de cadeia dupla que corresponde a uma sequência do gene é combinado com um extracto solúvel derivado de embrião de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições nas quais o RNA de cadeia dupla é processado no RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleótidos. Como aqui se mostra, o RNA de 21-23 nt medeia RNAi do mRNA a ser degradado. A presente descrição também está relacionada com as moléculas de RNA de 21-23 nt produzidas pelos métodos aqui descritos.

Numa realização, os métodos aqui descritos são usados para identificar ou obter moléculas de RNA de 21-23 nt que são úteis como mediadores da degradação de RNA e, assim, da inibição de mRNAs, como sejam mRNAs humanos, que codificam produtos associados ou causadores de uma doença ou de uma condição indesejável. Por exemplo, a produção de uma oncoproteína ou de uma proteína viral pode ser inibida em seres humanos, de forma a evitar que a doença ou condição ocorra, limitar o grau em que ocorre ou revertê-la. Se for conhecida a sequência do gene a ser inactivado, podem ser produzidos RNAs de 21-23 nt e testados relativamente à sua capacidade para mediar RNAi numa célula, como seja uma célula humana ou de outro primata. As moléculas de RNA humanas de 21-23 nt que se demonstrou mediarem RNAi podem ser testadas, caso se pretenda, num modelo animal apropriado para avaliar a sua eficácia *in vivo*. Cópias adicionais de RNAs de 21-23 nt que se demonstrou mediarem RNAi podem ser produzidas pelos métodos aqui descritos.

O método de obtenção da sequência de RNA de 21-23 nt que utiliza o sistema *in vitro* de *Drosophila* pode ainda compreender o isolamento da sequência de RNA a partir da combinação. As moléculas de RNA de 21-23 nt podem ser isoladas usando uma série de técnicas conhecidas dos familiarizados com a matéria. Por exemplo, a electroforese em gel pode ser usada para separar RNAs de 21-23 nt da combinação, fatias de gel compreendendo as sequências de

RNA removidas e os RNAs eluídos das fatias de gel. Como alternativa, métodos não desnaturantes de cromatografia em coluna, podem ser usados para isolar o RNA produzido. Ainda, cromatografia (e.g., cromatografia de exclusão por tamanho), centrifugação em gradiente de glicerol, purificação por afinidade com anticorpos poder ser usadas para isolar RNAs de 21-23 nt. O complexo de RNA-proteína isolado a partir do sistema *in vitro* de *Drosophila* pode também ser usado directamente nos métodos aqui descritos (e.g., método de mediação de RNAi para mRNA de um gene). Os extractos solúveis derivados de embrião de *Drosophila* que medeiam RNAi estão incluídos na descrição. O extracto solúvel de *Drosophila* pode ser obtido por uma variedade de formas. Por exemplo, o extracto solúvel pode ser obtido a partir de embriões de *Drosophila* na fase de blastoderme sincial como descrito nos Exemplos 1, 2 e 3. Os extractos solúveis podem derivar de outras células em que o RNAi ocorre. Como alternativa, os extractos solúveis podem ser obtidos a partir de uma célula que não possui RNAi. Neste caso, os factores necessários para mediar RNAi podem ser introduzidos em tal célula e o extracto solúvel é então obtido. Os componentes do extracto podem também ser sintetizados quimicamente e/ou combinados usando métodos conhecidos na área.

Qualquer dsRNA pode ser usado nos métodos do presente invento, desde que tenha homologia suficiente com o gene alvo para mediar RNAi. A sequência do dsRNA para usar nos métodos do presente invento não necessita de ser

conhecida. Como alternativa, o dsRNA para usar no presente invento pode corresponder a uma sequência conhecida, como a de um gene completo (ou mais) ou porção do mesmo. Não existe limite superior no comprimento do dsRNA que pode ser usado. Por exemplo, o dsRNA pode variar entre cerca de 21 pares de bases (pb) do gene até ao comprimento completo do gene ou mais. Numa realização, o dsRNA usado nos métodos do presente invento tem cerca de 1000 pb de comprimento. Numa outra realização, o dsRNA tem cerca de 500 pb de comprimento. Ainda numa outra realização, o dsRNA tem cerca de 22 pb de comprimento.

Os RNAs de 21-23 nt aqui descritos podem ser usados numa variedade de formas. Por exemplo, as moléculas de RNA de 21 a 23 nt podem ser usadas para mediar a interferência por RNA do mRNA de um gene numa célula ou organismo. Numa realização específica, o RNA de 21 a 23 nt é introduzido em células humanas ou num ser humano, de forma a mediar interferência por RNA nas células ou em células no indivíduo, de forma a prevenir ou tratar uma doença ou condição indesejável. Neste método, um gene (ou genes) que causam ou contribuem para a doença ou condição indesejável é inactivado sendo o mRNA correspondente (o produto de transcrição do gene alvo) degradado através de RNAi. Nesta realização, um RNA de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos que tem como alvo o mRNA correspondente (o mRNA do gene alvo) para degradação é introduzido na célula ou organismo. A célula ou organismo é mantido em condições nas quais ocorre a degradação do correspondente mRNA, mediando

assim a interferência por RNA do mRNA do gene na célula ou organismo. Numa realização particular, o método de mediação da interferência por RNA de um gene numa célula compreende a combinação de RNA de cadeia dupla, que corresponde a uma sequência do gene, com um extracto solúvel derivado de embrião de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições tais que o RNA de cadeia dupla seja processado em RNA de 21 a 23 nucleótidos. O RNA de 21 a 23 nt foi então isolado e introduzido na célula ou organismo. A célula ou organismo é mantida em condições tais que ocorra degradação de mRNA do gene, mediando assim interferência por RNA do gene na célula ou organismo. No caso de o RNA de 21-23 nt ser introduzido numa célula em que RNAi normalmente não ocorre, os factores necessários para mediar RNAi são introduzidos em tal célula ou a expressão dos factores necessários é induzida em tal célula. Como alternativa, o RNA de 21-23 nt produzido por outros métodos (e.g., síntese química, produção de DNA recombinante) para ter uma composição igual ou suficientemente similar ao RNA de 21 a 23 nt para mediar RNAi pode ser usado de forma semelhante para mediar RNAi. Também é descrito que tais RNAs de 21 a 23 nt podem ser alterados pela adição, deleção, substituição ou modificação de um ou mais nucleótidos e/ou podem compreender materiais não nucleotídicos. É ainda descrito um método *ex vivo* de tratamento de células de um indivíduo para degradar um ou mais genes que causem ou estejam associados a uma doença ou condição indesejável, como seja leucemia ou SIDA. Nesta realização, as células a serem tratadas são obtidas do

indivíduo usando métodos conhecidos (e.g., flebotomia ou colheita de medula) e RNAs de 21-23 nt, que medeiam a degradação de um ou mais mRNAs correspondentes, são introduzidos nas células, as quais são então re-introduzidas no indivíduo. Se necessário, os componentes bioquímicos para RNAi ocorrer podem também ser introduzidos nas células.

O mRNA de qualquer gene pode ser dirigido para degradação usando os métodos de mediação de interferência de mRNA aqui descrito. Por exemplo, qualquer mRNA celular ou viral pode ser alvejado e, como resultado, a expressão da proteína codificada (e.g., uma oncoproteína, uma proteína viral), será diminuída. Ainda, o mRNA de qualquer proteína associada ou causadora de uma doença ou condição indesejável pode ser dirigido para degradação usando os métodos aqui descritos.

O presente invento também está relacionado com um método de avaliação da função de um gene numa célula ou organismo não humano. Numa realização, uma sequência de RNA de 21 a 23 nucleótidos que tem como alvo mRNA do gene para degradação é introduzida na célula ou organismo. A célula ou organismo é mantida em condições tais que ocorre degradação de mRNA do gene. O fenótipo da célula ou organismo é então observado e comparado com um controlo adequado, proporcionando assim informação acerca da função do gene. Numa outra realização, o RNA de cadeia dupla que corresponde a uma sequência do gene é combinado com um extracto solúvel derivado de *Drosophila* em condições tais

que o RNA de cadeia dupla seja processado para gerar RNA de 21 a 23 nucleótidos. O RNA de 21 a 23 nucleótidos é isolado e depois introduzido na célula ou organismo não humano. A célula ou organismo é mantido em condições nas quais ocorre degradação do mRNA do gene. O fenótipo da célula ou organismo é então observado e comparado com um controlo adequado, identificando assim a função do gene.

Um outro aspecto deste invento é um método de avaliação da capacidade dos RNAs de 21-23 nt para mediar RNAi e, em particular, determinação de quais os RNAs de 21-23 nt medeiam mais eficientemente RNAi. Numa realização do método, dsRNA correspondendo à sequência de um mRNA a ser degradado é combinado com mRNA marcado de forma detectável (e.g., marcado nos extremos, como seja marcado radioactivamente) e com o extracto solúvel deste invento, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida em condições tais que o RNA de cadeia dupla seja processado e o mRNA seja degradado. Os locais da clivagem mais eficiente são mapeados por comparação da migração dos produtos de clivagem do mRNA marcado com a dos marcadores de tamanho conhecido. Os 21 meros que abrangem estes locais são então projectados e testados relativamente à sua eficácia na mediação de RNAi.

Como alternativa, o extracto do presente invento pode ser usado para determinar se existe um segmento particular ou segmentos particulares do mRNA correspondente a um gene que sejam mais eficientemente alvejados por RNAi

do que outras regiões e, assim, podem ser locais alvo especialmente úteis. Numa realização, dsRNA correspondente a uma sequência de um gene a ser degradado e mRNA marcado do gene são combinados com um extracto solúvel que medeia RNAi, produzindo assim uma combinação. A combinação resultante é mantida em condições tais que o dsRNA seja degradado e os locais no mRNA que são mais eficazmente clivados sejam identificados, usando métodos conhecidos, como seja comparação com padrões de tamanho conhecido num gel de sequenciação.

#### PANORAMA GERAL DOS EXEMPLOS

A análise bioquímica do RNAi tornou-se possível com o desenvolvimento do lisado de embrião de *Drosophila in vitro* que reconstitui o silenciamento, dependente de dsRNA, da expressão do gene descrito no Exemplo 1 (Tuschl et al., *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)). No sistema *in vitro*, dsRNA, mas não RNA codificador ou asRNA, dirige um mRNA correspondente para degradação, no entanto não afecta a estabilidade de um mRNA controlo não relacionado. Ainda, a pré-incubação do dsRNA no lisado potencia a sua actividade de degradação do mRNA alvo, sugerindo que o dsRNA deve ser convertido numa forma activa através da ligação de proteínas no extracto ou através da modificação covalente (Tuschl et al., *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)).

É aqui descrito o desenvolvimento de um sistema acelular a partir de embriões de *Drosophila* na fase de

blastoderme sincicial que recapitula muitas das características de RNAi. A interferência observada nesta reacção é específica de sequência, é promovida por dsRNA mas não por RNA de cadeia simples, funciona por degradação de mRNA específico, requer um comprimento mínimo de dsRNA e é mais eficiente com dsRNA longo. Ainda, a pré-incubação de dsRNA potencia a sua actividade. Estes resultados demonstram que RNAi é mediada por processos específicos de sequência em reacções solúveis.

Como descrito no Exemplo 2, o sistema *in vitro* foi usado para analisar os requisitos de RNAi e para determinar o destino do dsRNA e do mRNA. RNAi *in vitro* requer ATP, mas não requer tradução de mRNA ou reconhecimento da estrutura "cap" 7-metil-guanosina do mRNA alvo. O dsRNA, mas não o RNA de cadeia simples, é processado *in vitro* para dar origem a uma população de espécies de 21-23 nt. A desaminação de adeninas dentro do dsRNA não parece ser necessária para a formação dos RNAs de 21-23 nt. Como aqui descrito, o mRNA é clivado apenas na região correspondente à sequência do dsRNA e o mRNA é clivado em intervalos de 21-23 nt, indicando fortemente que os fragmentos de 21-23 nt do dsRNA têm como alvo a clivagem do mRNA. Ainda, como descrito nos Exemplos 3 e 4, quando os fragmentos de 21-23 nt são purificados e adicionados novamente ao extracto solúvel, medeiam RNAi.

O presente invento está ilustrado nos exemplos que se seguem, os quais não se destinam a ser de alguma forma limitantes.

Exemplo 1 Degradação de mRNA alvo por RNA de cadeia dupla *in vitro*

#### Materiais e Métodos

##### RNAs

O mRNA de Rr-Luc consistiu na sequência codificadora da luciferase Rr de 962 nt flanqueada por 25 nt de sequência não traduzida derivada do poli-adaptador do plasmídeo pSP64 e 25 nt da sequência 3' não traduzida consistindo em 19 nucleótidos da sequência do poliadaptador do plasmídeo pSP64 seguido de um local SacI de 6 nt. O mRNA de Pp-Luc continha a sequência codificadora da luciferase Pp de 1653 nt com um local KpnI introduzido imediatamente antes do codão de paragem da luciferase Pp. A sequência codificadora de Pp foi flanqueada por sequências 5' não traduzidas consistindo em 21 nt do poli-adaptador do plasmídeo pSP64 seguido de 512 nt da região 5' não traduzida (UTR) derivada do mRNA *humpback* de *Drosophila* e as sequências não traduzidas 3' consistindo em 562 nt da UTR 3' de *humpback* seguido de um local SacI de 6 nt. As sequências UTR 3' de corcunda usadas continham seis mutações G para U que destroem a função dos Elementos de Resposta Nanos *in vivo* e *in vitro*. Ambos os mRNAs repórteres terminavam numa caudam poli(A) de 25 nt codificada no plasmídeo transcrito. Para os mRNAs Rr-Luc e Pp-Luc, os transcritos foram gerados por transcrição corrida ("run-

off") a partir das matrizes de plasmídeo clivadas no local NsiI imediatamente após os 25 nt codificadores da cauda poli(A). Para assegurar que os transcritos terminavam numa cauda poli(A), as matrizes de transcrição clivadas com NsiI foram dotadas de extremos censes com DNA-polimerase de T4 na presença de dNTPs. Usou-se o kit SP6 mMessage mMachine (Ambion) para a transcrição *in vitro*. Usando este kit, cerca de 80% dos transcritos resultantes apresentam estrutura "cap" 7-metilguanosina. A marcação com  $^{32}\text{P}$  foi conseguida através da inclusão de  $\alpha^{32}\text{P}$  -UTP na reacção de transcrição.

Para Pp-Luc, ssRNA, asRNA e dsRNA correspondentes às posições 93 a 597 relativamente ao início da tradução deram um dsRNA de 505 pb. Para Rr-Luc, ssRNA, asRNA e dsRNA correspondentes às posições 118 a 618 relativamente ao início da tradução deram um dsRNA de 501 pb. O dsRNA competidor nanos de *Drosophila* correspondeu às posições 122 a 629 relativamente ao início da tradução, dando um dsRNA de 508 pb. ssRNA, asRNA e dsRNA (esquematizados na figura 1) foram transcritos *in vitro* com a RNA-polimerase de T7 a partir de matrizes geradas por reacção em cadeia da polimerase. Após purificação em gel dos transcritos de RNA-polimerase de T7, a matriz de DNA residual foi removida por tratamento com DNase RQ1 (Promega). O RNA foi então extraído com fenol e clorofórmio, e depois precipitado e dissolvido em água.

Emparelhamento do RNA e electroforese em gel nativo.

ssRNA e asRNA (0,5  $\mu$ M) em Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) com NaCl 20 mM foram aquecidos a 95°C durante 1 min, depois arrefecidos e emparelhados à temperatura ambiente durante 12 a 16 horas. Os RNAs foram precipitados e ressuspensos em tampão de lise (abaixo). Para monitorizar o emparelhamento, os RNAs foram sujeitos a electroforese num gel de 2% de agarose em tampão TBE e corados com brometo de etídio (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1989)).

#### Preparação do lisado

Embriões com zero a duas horas de idade de moscas Oregon R foram colhidos em agar de melaço e levedura a 25°C. Os embriões foram descorionados durante 4 a 5 min em 50% (v/v) de lexívia, lavados com água, secos sobre papel de filtro e transferidos para um triturador de tecido Potter-Elvehjem arrefecido (Kontes). Os embriões foram lisados a 4°C em um ml de tampão de lise (acetato de potássio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, acetato de magnésio 2 mM) contendo ditiotreitol (DTT) 5 mM e 1 mg/ml de Pefabloc SC (Boehringer-Mannheim) por grama de embriões húmidos. O lisado foi centrifugado durante 25 minutos a 14500 xg, a 4°C, e o sobrenadante instantaneamente congelado em alíquotas em azoto líquido e guardado a -80°C.

## Condições de reacção

A preparação de lisado e as condições de reacção foram derivadas das descritas por Hussain e Leibowitz (Hussain e Leibowitz, Gene 46:13-23 (1986)). As reacções continham GTP 100  $\mu$ M, 50% (v/v) de lisado, mRNAs (10 a 50 pM concentração final) e 10% (v/v) de tampão de lise contendo o ssRNA, asRNA ou dsRNA (concentração final 10 mM). Cada uma das reacções também continha fosfato de creatina 10 mM, 10  $\mu$ g/ml de fosfocinas de creatina, GTP 100  $\mu$ M, UTP 100  $\mu$ M, CTP 100  $\mu$ M, ATP 500  $\mu$ M, DTT 5  $\mu$ M, 0,1 U/ml de RNasin (Promega) e 100  $\mu$ M de cada aminoácido. A concentração final de acetato de potássio foi ajustada a 100 mM. Para as condições padrão, as reacções foram montadas em gelo e depois pré-incubadas a 25°C durante 10 minutos antes da adição de mRNA. Após adição dos mRNAs, a incubação continuou durante mais 60 min. O passo de 10 min de pré-incubação foi omitido nas experiências das Figuras 3A-3C e 5A-5C. As reacções foram paradas com quatro volumes de tampão Passive Lysis 1,25X (Promega). A actividade de luciferase Pp e Rr foi detectada num luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory) usando o sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega).

## Estabilidade do RNA

As reacções com mRNA marcado radioactivamente com  $^{32}$ P foram paradas pela adição de 40 volumes de tampão PK 2x (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, EDTA 25 mM, NaCl 300 mM, 2% p/v

de dodecilsulfato de sódio). Foi adicionada proteinase K (E.M. Merck; dissolvida em água) para uma concentração final de 465 µg/ml. As reacções foram então incubadas durante 15 min a 65°C, extraídas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitadas com igual volume de isopropanol. As reacções foram analisadas por electroforese num gel de formaldeído/agarose (0,8% p/v) (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1989)). A radioactividade foi detectada através da exposição do gel de agarose [seco sob vácuo numa membrana Nytran Plus (Amersham)] a uma placa de imagem (Fujix) e quantificado usando programas Fujix Bas 2000 e Image Gauge 3.0 (Fujix).

#### Lisados comerciais

Reacções de lisado de reticulócitos de coelho não tratados (Ambion) e de extracto de gérmén de trigo (Ambion) foram montadas de acordo com as instruções do fabricante. dsRNA foi incubado no lisado a 27°C (gérmén de trigo) ou a 30°C (lisado de reticulócito) durante 10 minutos antes da adição de mRNAs.

#### Resultados e discussão

Para avaliar se o dsRNA pode especificamente bloquear a expressão de genes *in vitro*, foram usados mRNAs repórter derivados de dois genes diferentes da luciferase que não estão relacionados, tanto no respeita à sequência

como na especificidade ao substrato luciferina: luciferase de *Renilla reniformis* (amor-perfeito do mar) (Rr-Luc) e luciferase de *Photuris pennsylvanica* (pirilampo) (Pp-Luc). dsRNA gerado a partir de um gene foi usado para atingir o mRNA de uma das luciferases, enquanto o mRNA da outra luciferase foi um controlo interno cotraduzido na mesma reacção. dsRNAs de aproximadamente 500 pb foram preparados por transcrição dos produtos da reacção em cadeia da polimerase a partir dos genes Rr-Luc e Pp-Luc. Cada dsRNA começou ~100 pb a jusante do início da tradução (Figura 1). Os RNAs codificadores (ss) e complementares (as) foram transcritos *in vitro* e emparelhados um com o outro para produzir o dsRNA. Foi realizada electroforese em gel nativo dos asRNA e ssRNA individuais, de 501 nt para Rr e 505 nt para PP, usados para formar os dsRNAs Rr e Pp. O ssRNA, asRNA e dsRNA foram testados quanto à sua capacidade para bloquear especificamente a expressão do seu mRNA cognato mas não a expressão do mRNA controlo interno não relacionado.

O ssRNA, asRNA ou dsRNA foi incubado durante 10 min numa reacção contendo lisado de embriões de *Drosophila*, depois ambos os mRNAs Pp-Luc e Rr-Luc foram adicionados e a incubação continuou durante mais 60 min. O lisado de embriões de *Drosophila* traduz eficazmente mRNA transscrito exogenamente nas condições usadas. As quantidades das actividades Pp-Luc e Rr-Luc foram medidas e usadas para calcular as razões Pp-Luc/Rr-Luc (Figura 2A) ou Rr-Luc/Pp-Luc (Figura 2B). Para facilitar a comparação de diferentes

experiências, as razões de cada experiência foram normalizadas em relação à razão observada para um controlo em que o tampão foi adicionado à reacção em vez de ssRNA, as RNA ou dsRNA.

A Figura 2A mostra que uma concentração de 10 nM de dsRNA de 505 pb, idêntico a uma porção da sequência do gene Pp-Luc, inibiu especificamente a expressão do mRNA Pp-Luc mas não afectou a expressão do controlo interno Rr-Luc. Nem ssRNA nem asRNA afectaram a expressão de Pp-Luc ou do controlo interno Rr-Luc. Assim, a expressão de Pp-Luc foi especificamente inibida pelo seu dsRNA coganto. Ao contrário, uma concentração de dsRNA de 501 pb dirigido contra o mRNA Re-Luc inibiu especificamente a expressão de Rr-Luc mas não a do controlo interno Pp-Luc (Figura 2B). Novamente, níveis comparáveis de ssRNA ou de asRNA tiveram pouco ou nenhum efeito na expressão de qualquer um dos mRNAs repórteres. Em média, o dsRNA reduziu a expressão de luciferase específica em 70% nestas experiências, nas quais a actividade de luciferase foi medida após 1 h de incubação. Noutras experiências em que a capacidade de tradução da reacção foi mantida pela adição de lisado fresco e dos componentes da reacção, foi observada uma redução adicional na actividade da luciferase alvo relativamente ao controlo interno.

A capacidade de dsRNA, mas não de asRNA, inibir a expressão do gene nestes lisados não é meramente uma consequência da maior estabilidade do dsRNA (semi-vida de

cerca de 2 h) relativamente aos RNAs de cadeia simples (semi-vida ~10 min). ssRNA e asRNA transcritos com uma estrutura "cap" 7-metilguanosina eram são estáveis no lisado como o dsRNA sem "cap", mas não inibem a expressão do gene. Pelo contrário, o dsRNA formado a partir do ssRNA e do asRNA bloqueiam especificamente a expressão do mRNA alvo.

RNAi eficaz em *Drosophila* requer a injecção de cerca de 0,2 fmol de dsRNA num embrião na fase de blastoderme sincicial (Kennerdell e 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)). Uma vez que o volume médio de um embrião de *Drosophila* é de aproximadamente 7,3 nl, isto corresponde a uma concentração intracelular de aproximadamente 25 nM (Mazur et al., Criobiology 25:543-544 (1988)). A expressão do gene no lisado de *Drosophila* foi inibida por uma concentração comparável de dsRNA (10 nM), mas baixando a concentração de dsRNA dez vezes baixou a quantidade de interferência específica. dsRNA dez nanomolar corresponde a um excesso de 200 vezes do dsRNA relativamente ao mRNA alvo adicionado ao lisado. Para testar se este excesso de dsRNA deve reflectir um passo dependente do tempo e/ou concentração em que o dsRNA adicionado foi convertido numa forma activa para interferência específica de gene, foi avaliado o efeito da pré-incubação do dsRNA na sua capacidade para inibir a expressão do seu mRNA cognato. Devido à capacidade de tradução dos lisados ser, significativamente, reduzida após 30 minutos de incubação a 25°C (observações não

publicadas), foi desejável assegurar que todos os factores necessários a RNAi permanecessem activos ao longo do período de pré-incubação. Assim, cada 30 minutos, uma reacção contendo dsRNA e lisado foi misturada com uma reacção fresca contendo lisado não incubado (Figura 3A). Após seis transferências sucessivas seriadas abrangendo 3 horas de pré-incubação, o dsRNA, agora diluído 64 vezes relativamente à sua concentração original, foi incubado com lisado e 50 pM de mRNA alvo durante 60 min. Finalmente, os níveis de enzima Pp-Luc e Rr-Luc foram medidos. Para comparação, a quantidade de dsRNA adicionada (10 nM) foi diluída 32 vezes em tampão e avaliada a sua capacidade para gerar interferência por RNA específica de gene na ausência de qualquer passo de pré-incubação.

A pré-incubação do dsRNA no lisado potenciou significativamente a sua capacidade para inibir a expressão específica de um gene. Enquanto o dsRNA diluído 32 vezes não mostrou efeito, o dsRNA pré-incubado foi, dentro do erro experimental, tão forte quanto o dsRNA não diluído, apesar de ter sofrido uma diluição de 60 vezes. A potenciação do dsRNA através de pré-incubação foi observada para dsRNAs tendo como alvo o mRNA de Pp-Luc (Figura 3B) e o mRNA de Rr-Luc (Figura 3C). Tendo em consideração a diluição de 64 vezes, a activação conferida pela pré-incubação permitiu que uma concentração de 156 pM de dsRNA inibisse mRNA alvo 50 pM. Ainda, a diluição do dsRNA "activado" pode ser eficaz mas não foi testada. Observámos que, apesar de ambos os dsRNA testados serem activados pela pré-incubação,

cada um deles manteve a sua especificidade para interferir com a expressão apenas do mRNA de que é homólogo. Outros estudos das reacções podem proporcionar uma via de identificação do mecanismo de potenciação do dsRNA.

Uma explicação possível para a observação de que a pré-incubação do dsRNA aumenta a sua capacidade para inibir a expressão do gene nestes lisados é que factores específicos modificam e/ou se associam ao dsRNA. Assim, a adição de quantidades crescentes de dsRNA à reacção deverá titular tais factores e baixar a quantidade de interferência específica de gene causada por um segundo dsRNA de sequência não relacionada. Para o mRNA de Pp-Luc e para o mRNA de Rr-Luc, a adição à reacção de concentrações crescentes de dsRNA nanos de *Drosophila* não relacionado decresceu a quantidade de interferência específica de gene causada pelo dsRNA tendo como alvo o mRNA repórter (Figura 4). Nenhuma das concentrações testadas de dsRNA nanos afectou os níveis de tradução do mRNA não alvo, demonstrando que o dsRNA nanos titulou especificamente factores envolvidos na interferência específica de gene e não componentes da maquinaria de tradução. Um ou mais factores limitantes foram titulados pela adição de dsRNA aproximadamente 1000 nM, um excesso de 200 vezes relativamente ao dsRNA 5 nM usado para produzir interferência específica.

A interferência *in vitro* deverá reflectir a inibição específica da tradução do mRNA ou a destruição dirigida do mRNA específico. Para distinguir estas duas

possibilidades, os destinos dos mRNAs de Pp-Luc e de Rr-Luc foram examinados directamente usando substratos marcados radioactivamente com  $^{32}\text{P}$ . A estabilidade do mRNA de Pp-Luc ou do mRNA de Rr-Luc 10 nM incubado em lisado, com tampão ou com Pp-dsRNA de 505 pb (50 nM). As amostras foram desproteinizadas e os mRNAs marcados radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  foram então resolvidos por electroforese em gel desnaturante. Na ausência de dsRNA, ambos os mRNAs de Pp-Luc e de Rr-Luc mostraram-se estáveis nos lisados, com ~75% do mRNA adicionado permanecendo após 3 h de incubação. (cerca de 25% do mRNA adicionado foi rapidamente degradado na reacção e provavelmente representa mRNA sem "cap" gerado pelo processo de transcrição *in vitro*. Na presença de dsRNA (10 nM, 505 pb) tendo como alvo mRNA de Pp-Luc, menos de 15% do mRNA de Pp-Luc se manteve após 3 h (Figura 5A). Conforme esperado, o mRNA de Rr-Luc manteve-se estável na presença do dsRNA tendo como alvo mRNA de Pp-Luc. Pelo contrário, dsRNA (10 nM, 502 pb) tendo como alvo o mRNA de Rr-Luc causou a destruição do mRNA de Rr-Luc mas não teve qualquer efeito na estabilidade do mRNA de Pp-Luc (Figura 5B). Assim, o dsRNA causou especificamente um decaimento acelerado do mRNA de que é homólogo sem efeito na estabilidade do mRNA controlo não relacionado. Este resultado indica que *in vivo*, pelo menos em *Drosophila*, o efeito do dsRNA é directamente desestabilizar o mRNA alvo, não alterar a sua localização subcelular, por exemplo, causando a sua retenção específica no núcleo, resultando em degradação não específica.

Estes resultados são consistentes com a observação de que RNAi conduz a níveis reduzidos de mRNA citoplasmático *in vivo*, conforme medido por hibridação *in situ* (Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)) e transferências Northern (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998)). As análises de transferências Northern em tripanossomas e hidras sugerem que o dsRNA tipicamente cause decréscimo dos níveis de mRNA em menos de 90% (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998); Lohman et al., Dev. Biol. 214:211-214 (1999)). Os dados aqui apresentados mostram que os níveis de mRNA *in vitro* são reduzidos 65 a 85% após três horas de incubação, um efeito comparável com observações *in vivo*. Eles também concordam que o resultado de RNAi em *C. elegans* é pós-transcricional (Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)). A explicação mais simples para os efeitos específicos na síntese proteica é que reflectam a velocidade acelerada do decaimento do RNA. No entanto, os resultados não excluem efeitos independentes mas específicos na tradução, assim como na estabilidade.

*In vivo*, o RNAi parece requerer um comprimento mínimo de dsRNA (Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:14687-14692 (1998)). A capacidade do RNA de cadeia dupla de comprimentos 49 pb, 149 pb, 505 pb e 997 pb (esquematizado na Figura 1) para direcionar a degradação do mRNA de Pp-Luc *in vitro* foi avaliada. De acordo com as observações *in vivo*, o dsRNA de 49 pb foi ineficaz *in vitro*, enquanto o

dsRNA de 149 pb estimulou o decaimento do mRNA apenas ligeiramente e ambos os dsRNAs de 505 e de 997 pb causaram degradação robusta do mRNA (Figura 5C). O dsRNA de 50 pb tendo como alvo outras porções do mRNA causaram degradação detectável do mRNA, ainda que não tão robusta como a observada com o dsRNA de 500 pb. Assim, apesar de alguns dsRNA curtos não mediarem RNAi, outros com aproximadamente o mesmo comprimento, mas diferente composição, serão capazes de o fazer. Avaliou-se se a interferência específica de gene observada em lisados de *Drosophila* era uma propriedade geral dos sistemas de tradução acelulares. Os efeitos dos dsRNAs na expressão de mRNA de Pp-Luc e de Rr-Luc foram avaliados em extractos comerciais de germén de trigo e em lisados de reticulócitos de coelho. Não houve efeito na adição de ssRNA, asRNA ou dsRNA 10 nM na expressão de mRNA repórter nos extractos de gérmén de trigo. Pelo contrário, a adição de dsRNA 10 nM ao lisado de reticulócitos de coelho causou um decréscimo profundo e rápido não específico na estabilidade do mRNA. Por exemplo, a adição de dsRNA Rr-Luc causou a degradação dos mRNAs de Rr-Luc e de Pp-Luc dentro de 15 min. O mesmo efeito não específico foi observado quando da adição de dsRNA Pp-Luc. A destruição não específica de mRNA, induzida pela adição de dsRNA ao lisado de reticulócito de coelho, presumivelmente reflecte a activação previamente observada de RNase L por dsRNA (Clemens e 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".

In "Translational Control" (eds. J. Hershey, M. Mathews and N. Sonenberg), pp. 505-548. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1996)). Foram recentemente descritas linhas celulares de murganho sem vias anti-virais induzidas por dsRNA (Zhou *et al.*, *Virology* 258:435-440 (1999)) que podem ser úteis na pesquisa de RNAi em mamíferos. Ainda que se saiba da sua existência em algumas linhas celulares de mamífero (Wianny e Zernicka-Goetz *Nat. Cell Biol.* 2:70-75 (2000)), em muitos tipos de células de mamífero é provavelmente obscurecida pela indução rápida por dsRNA de respostas anti-virais não específicas.

A destruição dirigida por dsRNA de mRNA específico é característica de RNAi, a qual foi observada *in vivo* em muitos organismos, incluindo *Drosophila*. O sistema descrito atrás reconstitui numa reacção *in vitro* muitos aspectos de RNAi. O mRNA alvo é especificamente degradado enquanto mRNAs controlo não relacionados, presentes na mesma solução, não são afectados. O processo é mais eficiente com dsRNAs superiores a 150 pb de comprimento. A reacção de degradação específica de dsRNA *in vitro* é provavelmente geral para muitos, senão todos, os mRNAs, uma vez que foi observada com dois genes não relacionados.

O grau de grandeza dos efeitos na estabilidade do mRNA *in vitro* aqui descrito é comparável aos descritos *in vivo* (Ngo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:14687-14692 (1998); Lohmann *et al.*, *Dev. Biol.*, 214: 211-214 (1999). No entanto, a reacção *in vitro* requer um excesso de

dsRNA relativamente ao mRNA. Pelo contrário, algumas moléculas de dsRNA por célula podem inibir a expressão do gene *in vivo* (Fire *et al.*, *Nature*, 391:806-811 (1998); Kennerdell e Carthew, *Cell*, 95:1017-1026 (1998)). A diferença entre a estequiometria do dsRNA e do mRNA alvo, *in vivo* e *in vitro*, não deve ser surpreendente por a maioria das reacções *in vitro* serem menos eficientes do que os seus correspondentes processos *in vivo*. É interessante que a incubação do dsRNA no lisado potenciou grandemente a sua actividade para RNAi, indicando que é modificado ou se associa a outros factores ou ambos. Talvez um pequeno número de molécuas seja eficaz na inibição do mRNA alvo *in vivo* devido ao dsRNA injectado ter sido activado por um processo semelhante ao aqui descrito para RNAi em lisados de *Drosophila*.

Exemplo 2 RNA de cadeia dupla dirige a clivagem, dependente de ATP, de mRNA em intervalos de 21 a 23 nucleótidos

#### Métodos e Material

##### RNAi *in vitro*

As reacções de RNAi *in vitro* e a preparação de lisados foram como descrito no Exemplo 1 (Tuschl *et al.*, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)) excepto a reacção conter 0,33 g/ml de cinase de creatina, fosfato de creatina 25  $\mu$ M (Fluka) e ATP 1 mM. Para cada experiência, o fosfato de

creatina foi dissolvido de fresco, em água, para 500 mM. GTP foi omitido das reacções, excepto nas Figuras 2 e 3.

#### Síntese de RNA

Os mRNAs de Pp-Luc e de Rr-Luc e dsRNAs Pp e Rr (incluindo dsRNA 'B' na Figura 6) foram sintetizados por transcrição *in vitro* como anteriormente descrito (Tuschl *et al.*, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)). Para gerar matrizes para transcrição para dsRNA 'C', a sequência iniciadora do RNA 5' codificador foi gcgtaatacgactcactataGAACAAAGGAAACG-GATGAT (SEQ ID NO:2) e a sequência iniciadora 3' do RNA codificador foi GAAGAAGTTATTCTCCAAAA (SEQ ID NO:3); a sequência iniciadora do asRNA 5' foi gcgtaatacgactcactataGAAGTTATTCTCCAAAA (SEQ ID NO:4) e a sequência iniciadora 3' do asRNA foi GAACAAAGGAAACGGATGAT (SEQ ID NO:5). Para o dsRNA 'A', a sequência iniciadora do RNA 5' codificador foi gcgtaatacgactcactataGTAGCGCGGTGTATTATACC (SEQ ID NO:6) e a sequência iniciadora 3' do RNA codificador foi CAACGTCAGGTTACCA (SEQ ID NO:7); a sequência iniciadora do asRNA 5' foi gcgtaatacgactcactataGTA-CAACGTCAGGTTACCA (SEQ ID NO:8) e a sequência iniciadora 3' do asRNA foi GTAGCGCGGTGTATTATACC (SEQ ID NO:9) (letras minúsculas, sequência do promotor de T7).

Os mRNAs foram marcados no extremo 5' usando guanilil-transferase (Gibco/BRL), S-adenosil-metionina (Sigma) e  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-GTP (3000 Ci/mmol; New England Nuclear) de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs marcados

radioactivamente foram purificados por selecção de poli(A) usando o kit Poly(A) Tract III kit (Promega). Os RNAs não radioactivos com estruturas "cap" 7-metilguanosina e adenosina foram sintetizados em reacções de transcrição *in vitro* com um excesso de 5 vezes de 7-metil-G(5')ppp(5')G ou A(5')ppp(5')G relativamente a GTP. Os análogos de "cap" foram comprados à New England Biolabs.

#### Depleção de ATP e inibição da síntese proteica

O ATP foi eliminado através de incubação do lisado durante 10 minutos a 25°C com glucose 2 mM e 0,1 U/ml de hexocinase (Sigma). Os inibidores da síntese proteica foram comprados à Sigma e dissolvidos em etanol absoluto como stocks concentrados 250 vezes. As concentrações finais de inibidores na reacção foram: anisomicina, 53 mg/ml; ciclo-heximida, 100 mg/ml; cloranfenicol, 100 mg/ml. A síntese proteica relativa foi determinada medindo a actividade da proteína luciferase Rr produzida por tradução do mRNA de Rr-Luc na reacção de RNAi após 1 hora, como descrito anteriormente (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)).

#### Análise do processamento de dsRNA

Internamente, dsRNAs marcados com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP (Pp-Luc de 505 pb ou Rr-Luc de 501 pb) ou RNA complementar de Rr-luc com "cap" 7-metilguanosina (501 nt) foram incubados numa concentração final de 5 nM, na presença ou ausência de

mRNAs não marcados, em lisado de *Drosophila* durante 2 horas em condições padrão. As reacções foram paradas pela adição de tampão proteinase K 2x e desproteinizadas como descrito anteriormente (Tuschl et al., *Genes Dev.*, 13:3191-3197 (1999)). Os produtos foram analisados por electroforese em géis de sequenciação de 15% ou 18% de poliacrilamida. Os padrões de comprimento foram gerados por digestão completa da RNase de T1 do RNA codificador e do asRNA de Rr-luc de 501 nt marcado com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP.

Para a análise da clivagem de mRNA, o mRNA marcado com <sup>32</sup>P em 5' (descrito atrás) foi incubado com dsRNA como descrito anteriormente (Tuschl et al., *Genes Dev.*, 13:3191-3197 (1999)) e analisado por electroforese em géis de sequenciação de 5% (Figura 5B) e 6% (Figura 6C) de poliacrilamida. Os padrões de comprimento incluíram padrões de tamanhos de RNA comerciais (FMC Bioproducts) marcados radioactivamente com guanilil-transferase como descrito atrás e hidrólise parcial com bases e escadas geradas com RNase T1 a partir de mRNA marcado radioactivamente em 5'.

#### Ensaio de desaminação

dsRNAs marcados internamente com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP (5 nM) foram incubados em lisado de *Drosophila* durante 2 horas em condições convencionais. Após desproteinização, as amostras foram corridas em géis de sequenciação de 12% para separar dsRNAs de tamanho completo dos produtos de 21-23 nt. Os RNAs foram eluídos das fatias de gel em NaCl 0,3M durante a

noite, precipitados com etanol, colhidos por centrifugação e redissolvidos em 20  $\mu$ l de água. O RNA foi hidrolizado em fosfatos 5' de nucleósidos com a nuclease P1 (10  $\mu$ l de reacção contendo 8  $\mu$ l de RNA em água, KOAc 30 mM, pH 5,3, ZnSO<sub>4</sub> 10 mM, 10  $\mu$ g ou 3 unidades da nuclease P1, 3 horas, 50°C). As amostras (1 ml) foram co-separadas conjuntamente com 5'-mononucleótidos não radioactivos [0,05 unidades DO ( $A_{260}$ ) de pA, pC, pG, pI e pU] em placas de HPTLC de celulose (EM Merck) e resolvidos na primeira dimensão em ácido isobutírico/25% de amónia/água (66/1/33, v/v/v) e na segunda dimensão em fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8/sulfato de amónio/1-propanol (100/60/2, v/p/v; Silberklang et al., 1979). A migração dos padrões internos não radioactivos foi determinada por exposição a UV.

#### Resultados e discussão

##### RNAi requer ATP

Como descrito no Exemplo 1, os lisados de embriões de *Drosophila* reconstituem fielmente RNAi (Tuschl et al., Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Anteriormente, o silenciamento de genes mediado por ds-RNA foi monitorizado através da medição da síntese da proteína luciferase a partir do mRNA alvo. Assim, estas reacções de RNAi continham um sistema de regeneração de ATP, necessários para a tradução eficiente do mRNA. Para testar se o ATP foi, de facto, necessário para RNAi, os lisados foram depletados de ATP através do tratamento com hexocinase e

glucose, o qual converte ATP em ADP e RNAi foi monitorizada directamente, seguindo o destino do mRNA da luciferase de *Renilla reniformis* (Rr-luc) marcado radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  (Figura 6). O tratamento com hexocinase e glucose reduziu o nível de ATP endógeno no lisado de 250  $\mu\text{M}$  para 10  $\mu\text{M}$ . A regeneração do ATP requereu fosfato de creatina e cinase de creatina exógenos, os quais actuam para transferir um fosfato de elevada energia derivado do fosfato de creatina em ADP. Quando os extractos sem ATP foram suplementados com fosfato de creatina ou cinase de creatina, não foi observada RNAi. Assim, a RNAi requer ATP *in vitro*. Quando ATP, fosfato de creatina e cinase de creatina foram todos adicionados às reacções contendo o lisado sem ATP, foi restaurada a degradação por dsRNA do mRNA de Rr-luc (Figura 6). A adição de ATP exógeno não foi necessária para eficiente RNAi no lisado sem ATP, desde que estivessem presentes fosfato de creatina e cinase de creatina, demonstrando que a concentração endógena (250 mM) do nucleósido de adenosina é suficiente para suportar RNAi. RNAi com um mRNA da luciferase de *Photinus pyralis* (Pp-luc) foi também dependente de ATP.

A estabilidade do mRNA de Rr-luc na ausência de Rr-dsRNA foi reduzida nos lisados sem ATP, relativamente ao observado quando o sistema de regeneração de energia foi incluído, mas o decaimento do mRNA nestas condições não apresenta a cinética de decaimento rápida característica do RNAi *in vitro*, nem gera os produtos de clivagem de mRNA estáveis característicos de RNAi dirigida por dsRNA. Estas

experiências não estabelecem se a necessidade de ATP para RNAi é directa, implicando ATP num ou mais passos no mecanismo de RNAi, ou indirecta, reflectindo um papel para o ATP na manutenção de concentrações elevadas de um outro trifosfato de nucleósido no lisado.

#### A tradução não é necessária para RNAi *in vitro*

A necessidade de ATP sugeriu que RNAi possa estar acoplada à tradução de mRNA, um processo altamente dependente de energia. Para testar esta possibilidade, vários inibidores da síntese proteica foram adicionados à reacção e preparando uma análise em gel de agarose desnaturante de mRNA de *Pp-luc* marcado radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  em 5', após incubação durante os tempos indicados numa reacção de RNAi padrão, com e sem inibidores da síntese proteica. Foram testados os inibidores da tradução eucariótica anisomicina, um inibidor da formação da ligação peptídica inicial, ciclo-heximida, um inibidor da elongação da cadeia peptídica, e puromicina, um simulador de tRNA que causa a terminação prematura da tradução (Cundliffe, "Antibiotic Inhibitors of Ribosome Function". In "The Molecular Basis of Antibiotic Action", E. Gale, E. Cundliffe, P. Reynolds, M. Richmond e M. Warning, eds. (New York: Wiley), pp. 402-547. (1981)). Cada um destes inibidores reduziu a síntese proteica no lisado de *Drosophila* em mais de 1900 vezes (Figura 7A). Pelo contrário, cloranfenicol, um inibidor da síntese proteica mitocondrial de *Drosophila* (Page e Orr-Weaver, Dev. Biol., 183:195-207 (1997)), não teve efeito na

tradução nos lisados (Figura 7A). Apesar da presença de anisomicina, ciclo-hexamida ou cloranfenicol, RNAi decorreu com eficiência normal. A puromicina também não perturbou a eficiência de RNAi. Assim, a síntese proteica não é necessária para RNAi *in vitro*.

A iniciação da tradução é um processo dependente de ATP que envolve o reconhecimento de "cap" 7-metilguanosina do mRNA (Kozak, *Gene*, 234:187-208 (1999); Merrick and Hershey, "The Pathway and Mechanism of Eukaryotic Protein Synthesis". In "Translational Control", J. Hershey, M. Mathews e N. Sonenberg, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 31-69 (1996)). O lisado de *Drosophila* usado para suportar RNAi *in vitro* reconstitui a tradução dependente de "cap"; mRNA de Pp-luc com um "cap" 7-metilguanosina foi traduzido mais de dez vezes mais eficientemente do que o mesmo mRNA com um "cap" A(5')ppp(5')G (Figura 7B). Ambos os RNAs foram igualmente estáveis no lisado de *Drosophila*, mostrando que esta diferença na eficiência não pode ser meramente explicada pelo decaimento mais rápido do mRNA com um "cap" de adenosa (ver também Gebauer et al., *EBO J.*, 18:6146-54 (1999)). Se bem que a maquinaria de tradução possa descrever entre mRNAs de Pp-Luc com "caps" de 7-metilguanosina e de adenosa, os dois mRNAs foram igualmente suscetíveis a RNAi na presença de Pp-dsRNA (Figura 7C). Estes resultados sugerem que os passos no reconhecimento de "cap" não estão envolvidos em RNAi.

dsRNA é processado em espécies de 21-23 nt

RNAs de 25 nt de comprimento foram gerados a partir das cadeias codificadora e complementar dos genes que sofrem silenciamento de genes pós-transcrição em plantas (Hamilton e Baulcombe, *Science*, 286:950-2 (1999)). Foi efectuada a análise em gel de acrilamida desnaturante dos produtos formados numa incubação de duas horas de dsRNAs marcados radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  e asRNA com "cap" em lisado usando condições de RNAi convencionais, na presença ou ausência de mRNAs alvo. Encontrou-se que dsRNA é também processado em pequenos fragmentos de RNA. Quando incubado em lisado, aproximadamente 15% da radioactividade adicionada de Rr-dsRNA de 501 pb e Pp-dsRNA de 505 pb surgiu em fragmentos de RNA de 21-23 nt. Devido aos dsRNAs terem mais de 500 pb de comprimento, o rendimento de 15% dos fragmentos implica que múltiplos RNAs de 21-23 nt são produzidos a partir de cada molécula de dsRNA de tamanho completo. Não foram detectados outros produtos estáveis. As espécies de pequenos RNAs foram produzidas a partir de dsRNAs em que ambas as cadeias foram uniformemente marcadas radioactivamente com  $^{32}\text{P}$ . A formação dos RNAs de 21-23 nt a partir do dsRNA não requereu a presença do correspondente mRNA, demonstrando que as espécies de pequenos RNAs são geradas por processamento do dsRNA, em vez de ser um produto da degradação de mRNA dirigido por dsRNA. Foi observado que os 22 nucleótidos correspondem a duas voltas de uma hélice de RNA-RNA, forma A.

Quando os dsRNAs marcados radioactivamente, na cadeia codificadora ou na complementar, foram incubados com lisado numa reacção de RNAi padrão, foram produzidos RNAs de 21-23 nt com eficiência comparável. Estes dados suportam a ideia de que os RNAs de 21-23 nt são gerados por processamento simétrico do dsRNA. Uma variedade de dados suportam a ideia de que o RNA de 21-23 nt é eficientemente gerado apenas a partir de dsRNA e não é a consequência de uma interacção entre RNA de cadeia simples e dsRNA. Primeiro, um RNA codificador ou asRNA de Pp-luc de 505 nt marcado radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  não foi eficientemente convertido no produto de 21-23 nt quando foi incubado com Pp-dsRNA de 505 pb não radioactivo 5 nM. Em segundo lugar, na ausência de mRNA, um Rr-asRNA com "cap" de 7-metil-guanosina de 501 nt produziu apenas uma quantidade dificilmente detectável de RNA de 21-23 nt (RNAs de cadeia simples com "cap" são tão estáveis no lisado como dsRNA, Tuschl *et al.*, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)), provavelmente devido a uma pequena quantidade de dsRNA contaminante da preparação de RNA complementar. No entanto, quando mRNA de Rr-luc foi incluído na reacção com o Rr-asRNA com "cap" e marcado radioactivamente com  $^{32}\text{P}$ , foi gerada uma pequena quantidade de produto de 21-23 nt, correspondendo a 4% da quantidade de RNA de 21-23 nt produzido a partir de uma quantidade equimolar de rR-dsRNA. É pouco provável que este resultado seja reflexo da presença de dsRNA contaminante na preparação de Rr-asRNA, uma vez que significativamente mais produto foi gerado a partir do asRNA na presença do mRNA Rr-luc do que na sua ausência. Pelo contrário, os dados

sugerem que asRNA possa interagir com as sequências de mRNA complementares para formar dsRNA na reacção e que o dsRNA resultante seja subsequentemente processado em espécies de pequenos RNAs. Rr-asRNA pode suportar um nível baixo de RNAi *bona fide in vitro* (ver abaixo), consistente com esta explicação.

Foi em seguido questionado se a produção dos RNAs de 21-23 nt derivados de dsRNA necessitou de ATP. Quando o Pp-dsRNA de 505 pb foi incubado num lisado sem ATP por tratamento com hexocinase e glucose, foi produzido RNA de 21-23 nt, ainda que 6 vezes menos que quando o ATP foi regenerado no lisado sem ATP através da inclusão da cinase de creatina e fosfato de creatina. Assim, o ATP pode ser necessário para a produção de espécies de RNA de 21-23 nt, mas pode simplesmente aumentar a sua formação. Como alternativa, ATP pode ser necessário para o processamento do dsRNA, mas numa concentração inferior à que fica após o tratamento com hexocinase. A base molecular para a mobilidade mais lenta dos fragmentos de pequenos RNAs gerados no lisado sem ATP não está compreendida.

Wagner e Sun (Wagner e Sun, *Nature*, 391:744-745 (1998)) e Sharp (Sharp, *Genes Dev.*, 13:139-41 (1999)) especularam que a necessidade de dsRNA no silenciamento de genes por RNAi reflecte o envolvimento de uma desaminase de adenosina específica de dsRNA no processo. As desaminases de adenosina do dsRNA desenrolam dsRNA ao converter adenosina em inosina, a qual não emparelha com uracilo.

Desaminases de adenosina de dsRNA funcionam na edição pós-tradução de mRNA (para revisão ver Bass, Trends Biochem. Sci., 22:157-62 (1997)). Para testar o envolvimento da desaminase de adenosina de dsRNA em RNAi, foi avaliado o grau de conversão de adenosina em inosina nos dsRNAs Rr-luc de 501 pb e Pp-luc de 505 pb após incubação com lisado de embrião de *Drosophila* numa reacção *in vitro* padrão de RNAi. A desaminação de adenosina em dsRNA de tamanho completo e as espécies de RNA de 21-23 nt foram avaliadas por cromatografia bidimensional em camada fina. O fosfato inorgânico ( $P_i$ ) foi produzido pela degradação de mononucleótidos por fosfatases que contaminam a nuclease P1 comercial (Auxilien et al., J. Mol. Biol., 262:437-458 (1996)). O grau de desaminação da adenosina nas espécies de 21-23 nt foi também determinado. O dsRNA de tamanho completo marcado radioactivamente com  $[^{32}P]$ -adenosina foi incubado no lisado e tanto o dsRNA de tamanho completo como os produtos de RNA de 21-23 nt foram purificados a partir de um gel de acrilamida desnaturante, clivado por mononucleótidos com nuclease P1 e analisado por cromatografia em camada fina bidimensional.

Uma fracção significativa das adenosinas no dsRNA de tamanho completo foi convertida em inosina após 2 horas (3,1% e 5,6% de conversão para dsRNAs de Pp-luc e Rr-luc, respectivamente). Pelo contrário, apenas 0,4% (Pp-dsRN) ou 0,7% (Rr-dsRNA) das adenosinas nas espécies de 21-23 nt foram desaminadas. Estes dados implicam que menos de 1 em 27 moléculas das espécies de RNA de 21-23 nt possuem uma

inosina. Assim, é improvável que a desaminação de adenosina dependente de dsRNA dentro das espécies de 21-23 nt seja necessária para a sua produção.

asRNA origina uma pequena quantidade de RNAi *in vitro*

Quando o mRNA foi marcado radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  dentro da estrutura "cap" 5'-7-metilguanosina, acumularam-se produtos estáveis de decaimento 5' durante a reacção de RNAi. Tais produtos estáveis do decaimento 5' foram observados para mRNAs Pp-luc e Rr-luc quando foram incubados com os seus dsRNAs cognatos. Anteriormente, foi descrito que RNAi eficiente não ocorre quando asRNA foi usado em vez de dsRNA (Tuscl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). No entanto, o mRNA foi mensuravelmente menos estável quando incubado com asRNA do que quando incubado com tampão (Figuras 8A e 8B). Isto foi particularmente evidente para o mRNA de Rr-luc: aproximadamente 90% do RNA permaneceu intacto após uma incubação de 3 horas em lisado, mas penas 50% quando asRNA foi adicionado. Menos de 5% permaneceu quando foi adicionado dsRNA. É interessante que o decréscimo da estabilidade do mRNA causado por asRNA foi acompanhado da formação de uma pequena quantidade de produtos de decaimento 5' estáveis, característicos da reacção de RNAi com dsRNA. Este resultado é paralelo à observação de que uma pequena quantidade do produto de 21-23 nt formou-se a partir de asRNA quando foi incubado com o mRNA (ver atrás) e deu força à ideia de que o asRNA pode entrar na via de RNAi, ainda que de forma pouco eficaz.

Os locais de clivagem do RNA são determinados pela sequência do dsRNA

Os locais de clivagem do mRNA foram examinados usando três dsRNAs diferentes, 'A', 'B' e 'C', distanciados ao longo da sequência Rr-luc de aproximadamente 100 nts. Foi feita a análise em gel desnaturante de acrilamida dos produtos de clivagem 5' estáveis produzidos, após incubação do mRNA Rr-luc nos tempos indicados, para cada um dos três dsRNAs, 'A', 'B' e 'C' ou com tampão ( $\phi$ ). As posições destes relativamente à sequência de mRNA Rr-luc estão apresentadas na Figura 9. Cada um destes três dsRNAs foi incubado numa reacção de RNAi padrão com mRNA de Rr-luc marcado radioactivamente com  $^{32}\text{P}$  dentro da estrutura "cap" 5'. Na ausência de dsRNA, não foram detectados produtos de clivagem 5' para o mRNA, mesmo após 3 horas de incubação no lisado. Pelo contrário, após uma incubação de 20 minutos, cada um dos três dsRNAs produziu uma escada de bandas correspondendo a uma série de produtos de clivagem de mRNA, característicos daquele dsRNA particular. Para cada dsRNA, os produtos de clivagem 5' do mRNA foram restringidos à região do mRNA de Rr-luc que correspondeu ao dsRNA (Figuras 9 e 10). Para dsRNA 'A', os comprimentos dos produtos de clivagem 5' variaram entre 236 e até menos de ~750 nt; dsRNA 'A' abrange os nucleótidos 233 a 729 do mRNA de Rr-luc. A incubação do mRNA com dsRNA 'B' produziu produtos de clivagem 5' do mRNA variando em comprimento de 150 a ~600 nt; dsRNA 'B' abrange os nucleótidos 143 a 644 do mRNA.

Finalmente, dsRNA 'C' produziu produtos de clivagem de mRNA entre 66 e ~500 nt de comprimento. Este dsRNA abrange os nucleótidos 50 a 569 do mRNA de Rr-luc. Assim, o dsRNA não só proporciona especificidade para a reacção de RNAi, seleccionando qual o mRNA de entre o conjunto de mRNA celular total será degradado, mas também determina a posição precisa de clivagem ao longo da sequência de mRNA.

O mRNA é clivado em intervalos de 21-23 nucleótidos

Para compreender melhor o mecanismo de RNAi, as posições de vários locais de clivagem do mRNA para cada um dos três dsRNAs foram mapeadas (Figura 10). Procedeu-se à análise de elevada resolução em gel de acrilamida desnaturante de uma subsérie de produtos de clivagem 5' atrás descritos. É de salientar que a maioria das clivagens ocorre em intervalos de 21-23 nt (Figura 10). Este espaçamento é especialmente importante face à nossa observação de que o dsRNA é processado em espécies de RNA de 21-23 nt e ao resultado de Hamilton e Baulcombe que um RNA de 25 nt está associado ao silenciamento pós-transcrição de um gene em plantas (Hamilton e Baulcombe, *Science*, 286:950-2 (1999)). Dos 16 locais de clivagem mapeados (2 para dsRNA 'A', 5 para dsRNA 'B' e 9 para dsRNA 'C'), todos excepto dois reflectem o intervalo de 21-23 nt. Um dos dois locais de clivagem que são excepção era um local de clivagem fraco produzido por dsRNA 'C' (indicado por um círculo azul vazio na Figura 10). Esta clivagem

ocorreu 32 nt 5' relativamente ao local de clivagem seguinte. A outra exceção é particularmente intrigante. Após quatro clivagens espaçadas 21-23 nt, dsRNA 'C' causou clivagem do mRNA nove nt imediatamente 3' relativamente ao local de clivagem anterior (seta a vermelho na Figura 10). Esta clivagem ocorreu num segmento de sete resíduos uracilo e parece "reprogramar" o medidor da clivagem; o local de clivagem seguinte foi 21-23 nt 3' relativamente ao local excepcional. Os três locais de clivagem subsequentes que mapeámos estavam também espaçados 21-23 nt. Curiosamente, dos dezasseis locais de clivagem causados pelos três dsRNAs diferentes, quatorze ocorrem em resíduos de uracilo. O significado deste resultado não está compreendido, mas sugere que a clivagem do mRNA é determinada por um processo que mede intervalos de 21-23 nt e que possui uma preferência de sequência para clivagem em uracilo. Os resultados mostram que as espécies de RNA de 21-23 nt, produzidas por incubação de dsRNA de ~500 pb no lisado causou interferência específica de sequência *in vitro*, quando isoladas do gel de acrilamida e adicionadas a uma nova reacção de RNAi em vez do dsRNA de tamanho completo.

Um modelo para a clivagem de mRNA dirigida por dsRNA

Sem pretender estar amarrado a uma teoria, os dados bioquímicos aqui descritos, juntamente com experiências genéticas recentes em *C. elegans* e *Neurospora* (Cogoni e 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)), sugerem um modelo para como dsRNA marca o mRNA para destruição (Figura 11). Neste modelo, o dsRNA é primeiro clivado em fragmentos de 21-23 nt de comprimento num processo que, provavelmente, envolve genes tais como o loci *rde-1* e *rde-4* de *C. elegans*. Os fragmentos resultantes, provavelmente tão curtos quanto os asRNAs ligados por proteínas específicas de RNAi, emparelharão então com o mRNA e recrutam uma nuclease que cliva o mRNA. Como alternativa, a troca de cadeia poderá ocorrer num complexo de proteína-RNA que transitoriamente mantém um dsRNA de 21-23 nt perto do mRNA. A separação das duas cadeias do dsRNA após fragmentação deverá ser auxiliada por uma helicase de RNA dependente de ATP, explicando o aumento da produção de RNA de 21-23 nt observado com ATP. É provável que cada fragmento de pequeno RNA produza uma, ou no máximo duas, clivagens no mRNA, talvez nos extremos 5' ou 3' do fragmento de 21-23 nt. Os pequenos RNAs podem ser amplificados por uma RNA-polimerase dirigida por RNA, como seja a codificada pelo gene *ego-1* em *C. elegans* (Smardon et al., Current Biology, 10:169-178 (2000)) ou o gene *qde-1* em *Neurospora* (Cogoni e Macino, Nature, 399:166-9 (1999)), produzindo silenciamento de genes, duradouro e pós-transcrição, na ausência do dsRNA que iniciou o efeito RNAi. RNAi hereditário em *C. elegans* requer os genes *rde-1* e *rde-4* para iniciar, mas não para persistir nas gerações subsequentes. Os genes *rde-2*, *rde-3* e *mut-7* em *C. elegans* são necessários no tecido em que ocorre RNAi, mas não são necessários para iniciação de RNAi

hereditário (Grishok *et al.*, *Science*, no prelo 2000). Estes genes "efectores" (Grishok *et al.*, *Science* no prelo 2000) provavelmente codificam proteínas que funcionam na selecção de mRNAs alvo e na sua clivagem subsequente. O ATP pode ser necessário em qualquer um de uma série de passos durante RNAi, incluindo a formação de complexos no dsRNA, dissociação de cadeias durante ou após clivagem do dsRNA, emparelhamento dos RNAs de 21-23 nt com o mRNA alvo, clivagem de mRNA e reciclagem do complexo alvo. Testar estas ideias com o sistema de RNAi *in vitro* será um desafio importante para o futuro. Alguns genes envolvidos em RNAi são também importantes para o silenciamento e co-supressão de transposões. A co-supressão é um fenómeno biológico lato que abrange plantas, insectos e talvez os seres humanos. O mecanismo mais provável em *Drosophila melanogaster* é o silenciamento da transcrição (Pal-Bhanra *et al.*, *Cell* 99:35-36). Assim, os fragmentos de 21-23 nt provavelmente estarão envolvidos no controlo da transcrição, assim como no controlo pós-transcrição.

Exemplo 3 21-23 meros isolados causaram interferência específica de sequência quando adicionados a uma nova reacção de RNAi.

Isolamento de fragmentos de 21-23 nt a partir da reacção de incubação do dsRNA de 500 pb no lisado.

RNA de cadeia dupla (500 pb) foi incubado numa concentração de 10 nM em lisado de embriões de *Drosophila*,

durante 3 h, a 25°C em condições convencionais como aqui descrito. Após desproteinização da amostra, os produtos de reacção de 21-23 nt foram separados do dsRNA não processado por electroforese em gel de poliacrilamida (15%) desnaturante. Para a detecção dos fragmentos de 21-23 nt não marcados radioactivamente, uma reacção de incubação com dsRNA marcado radioactivamente foi aplicada numa pista separada do mesmo gel. Fatias de gel contendo os fragmentos de 21-23 nt não radioactivos foram cortadas e os fragmentos de 21-23 nt foram eluídos das fatias de gel a 4°C, durante a noite, em 0,4 ml de NaCl 0,3 M. O RNA foi recuperado do sobrenadante por precipitação com etanol e centrifugação. O sedimento de RNA foi dissolvido em 10 µl de tampão de lise. Como controlo, as fatias de gel ligeiramente acima e abaixo da banda de 21-23 nt foram também cortadas e sujeitas aos mesmos procedimentos de eluição e precipitação. Igualmente, um dsRNA não incubado foi aplicado no gel de 15% e uma fatia de gel, correspondendo a fragmentos de 21-23 nt, foi cortada e eluída. Todos os sedimentos das experiências controlo foram dissolvidos em tampão de lise. As perdas de RNA durante a recuperação das fatias de gel por eluição foram de aproximadamente 50%.

A incubação de fragmentos de 21-23 nt num ensaio de RNAi baseado em tradução

1 µl de 21-23 mero eluído ou solução de RNA controlo foi usado numa incubação de RNAi de 10 µl padrão (ver atrás). Os 21-23 meros foram pré-incubados na mistura

de reacção contendo lisado durante 10 ou 30 minutos antes da adição do mRNA alvo e controlo. Durante a pré-incubação, as proteínas envolvidas no interferência por RNA podem reassociar-se com os 21-23 meros devido a um sinal específico presente nestes RNAs. A incubação continuou durante mais uma hora para permitir a tradução dos mmRNAs alvo e controlo. A reacção foi parada pela adição de tampão de lise passiva (Promega) e medida a actividade de luciferase. A interferência por RNA é expressa como a razão entre a actividade de luciferase alvo e controlo normalizada por controlo tampão sem RNA. A supressão específica do gene alvo foi observada com 10 ou 30 minutos de pré-incubação. A supressão foi reproduzível e reduziu a quantidade de alvo relativamente ao controlo em 2-3 vezes. Nenhum dos fragmentos de RNA isolados como controlos apresentaram interferência específica. Para comparação, a incubação de dsRNA de 500 pb 5 nM (10 min de pré-incubação) afecta a quantidade relativa do gene controlo relativamente ao alvo aproximadamente 30 vezes.

Estabilidade dos fragmentos de 21-3 nt numa nova reacção de incubação de lisado.

Consistente com a observação de RNAi ser mediada por fragmentos de RNA de 21-23 nt, encontrou-se que 35% do RNA de 21-23 nt adicionado persiste durante mais de 3 h em tal reacção de incubação. Isto sugere que factores celulares associam-se com os fragmentos de 21-23 nt desproteinizados e reconstituem uma partícula funcional de

degradação de mRNA. Sinais associados a estes fragmentos de 21-23 nt ou a sua possível natureza de cadeia dupla ou comprimentos específicos são, provavelmente, responsáveis por esta observação. Os fragmentos de 21-23 nt possuem um grupo hidroxilo 3' terminal, conforme evidenciado pela mobilidade alterada num gel de sequenciação após tratamento com periodato e beta-eliminação. Os 21-23 meros do exemplo 4 purificados por métodos não desnaturantes causaram interferência específica de sequência quando adicionados a uma nova reacção de RNAi.

RNA de cadeia dupla cinquenta nanomolar (dsRNA Rr-luc de 501 pb, como descrito no exemplo 1) foi incubado numa reacção de 1 ml *in vitro* com lisado a 25°C (ver exemplo 1). A reacção foi então parada pela adição de igual volume de tampão PK 2x (ver exemplo 1) e proteinase K foi adicionada para uma concentração final de 1,8 µg/µl. A reacção foi incubada durante mais 1 h a 25°C, extraída com fenol e depois os RNAs foram precipitados com 3 volumes de etanol. O precipitado de etanol foi colido por centrifugação e o sedimento foi ressuspenso em 100 µl de tampão de lise e aplicado numa coluna de filtração em gel Superdex HR 200 10/30 (Pharmacia) corrida em tampão de lise a 0,75 ml/min. Fracções de 200 µl foram colhidas da coluna. Vinte µl de acetato de sódio 3M e 20 µg de glicogénio foram adicionados a cada uma das fracções e o RNA foi recuperado por precipitação com 3 volumes de etanol. O precipitado foi ressuspenso em 30 µl de tampão de lise. Os perfis de coluna após o fraccionamento do RNA marcado com <sup>32</sup>P adicionado estão apresentados na Figura 13A.

Um microlitro de cada fracção ressuspensa foi testado numa reacção de RNAi *in vitro* padrão de 10  $\mu$ l, que é aproximadamente igual à concentração daquela espécie de RNA na reacção original antes da aplicação na coluna. As fracções foram pré-incubadas no lisado contendo a mistura de reacção durante 30 min, antes da adição de mRNA alvo Rr-luc 10 nM e mRNA controlo Pp-luc 10 nM. Durante a pré-incubação, as proteínas envolvidas na interferência por RNA podem reassociar-se com os 21-23 meros devido a um sinal específico presente nestes RNAs. A incubação foi continuada durante mais três horas para permitir a tradução dos mRNAs alvo e controlo. A reacção foi parada pela adição de tampão de lise passiva (Promega) e medida a actividade de luciferase. A supressão da expressão de mRNA alvo Rr-luc pelos fragmentos de 21-23 nt purificados foi reproduzível e reduziu a taxa relativa de alvo em função do controlo em >30 vezes, uma quantidade comparável a um dsRNA controlo de 500 pb. A supressão da expressão de mRNA alvo foi específica: pouco ou nenhum efeito na expressão do controlo do mRNA Pp-luc foi observado.

Os dados mostram que ambas as fracções contendo dsRNA não clivado (fracções 3-5) ou dsRNA longo parcialmente clivado (fracções 7-13) e as fracções contendo siRNAs de 21-23 nt totalmente processadas (fracções 41-50) medeiam interferência por RNA eficaz *in vitro* (Figura 13B). A supressão da expressão do mRNA alvo foi específica: pouco ou nenhum efeito na expressão de mRNA controlo Pp-luc foi

observado (Figura 13C). Estes dados, juntamente com os de exemplos anteriores, demonstram que os siRNAs de 21-23 nt são (1) verdadeiros intermediários na via de RNAi e (2) mediadores eficazes da interferência por RNA *in vitro*.

Exemplo 5 Duplas cadeias de siRNA de 21 nucleótidos medeiam a interferência por RNA em culturas de tecido humano

#### Métodos

##### Preparação de RNA

RNAs de 21 nt foram obtidos por síntese química usando fosforamidetos de RNA Expedite e fosforamideto de timidina (Proligo, Alemanha). Oligonucleótidos sintéticos foram desprotegidos e purificados em gel (Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T., Genes & Dev. 15, 188-200 (2001)), seguido de purificação em cassetes Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, USA) (Tuschl, T., et al., Biochemistry, 32:11658-11668 (1993)). As sequências de siRNA tendo como alvo a luciferase GL2 (Acc. X65324) e GL3 (Acc. U47296) corresponderam às regiões codificadoras de 153-173 relativamente ao primeiro nucleótido do codão de iniciação, siRNAs tendo como alvo RL (Acc. AF025846) corresponderam à região 119-129 após o primeiro codão de iniciação. RNAs mais longos foram transcritos com a RNA-polimerase de T7 a partir dos produtos de PCR, seguido de purificação em gel e Sep-Pak. Os dsRNAs de GL2 e GL3

corresponderam à posição 113-161 e 113-596, respectivamente, relativamente ao início da tradução; os dsRNAs RL de 10 e 501 pb corresponderam às posições 118-167 e 118-618, respectivamente. As matrizes de PCR para a síntese de dsRNA tendo como alvo GFP humanizado (hG) foram amplificadas a partir de pAD3 (Kehlenbach, R.H., et al., *J. Cell Biol.*, 141:863-874 (1988)), pelo que dsRNA hG de 50 e 501 pb corresponderam às posições 118-167 e 118-618, respectivamente, relativamente ao codão de iniciação.

Para o emparelhamento de siRNAs, cadeias simples 20  $\mu$ M foram incubadas em tampão de emparelhamento (acetato de potássio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, acetato de magnésio 2 mM) durante 1 min a 90°C, seguido de 1 h a 37°C. O passo de incubação a 37°C foi prolongado durante a noite para os dsRNAs de 50 e 500 pb e estas reacções de emparelhamento foram realizadas em concentrações de cadeia de 8,4  $\mu$ M e 0,84  $\mu$ M, respectivamente.

#### Cultura de células

As células S2 foram propagadas em meio de Schneider para *Drosophila* (Life Technologies) suplementado com 10% FBS, 100 unidades/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina a 25°C. Células 293, NIH/3T3, HeLa S3, COS-7 foram crescidas a 37°C em meio de Eagle modificação de Dulbecco suplementado com 10% FBS, 100 unidades/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina. As células foram regularmente passadas para manter o crescimento expo-

nencial. 24 h antes da transfecção, a aproximadamente 80% de confluência, as células de mamífero foram tripsinizadas e diluídas a 1:5 com meio fresco sem antibióticos (1-3 x 105 células/ml) e transferidas para placas de 24 alvéolos (500  $\mu$ l/alvéolo). As células S2 não foram tripsinizadas antes da subcultura. A transfecção foi realizada com reagente Lipofectamine 2000 (Lige Technologies) como descrito pelo fabricante para as linhas de células aderentes. Por alvéolo, foram aplicados 1,0  $\mu$ g de pGL2-Control (Promega) ou pGL3-Control (Promega), 0,1  $\mu$ g de pRL-TK (Promega) e 0,28  $\mu$ g de siRNA de cadeia dupla ou dsRNA, formulado em lipossomos; o volume final foi de 600  $\mu$ l por alvéolo. As células foram incubadas 20 h após transfecção e pareceram saudáveis a partir daí. A expressão de luciferase foi subsequentemente monitorizada com o ensaio Dual Luciferase (Promega). As eficiências de transfecção foram determinadas por microscopia de fluorescência para as linhas celulares de mamífero após cotransfecção de 1,1  $\mu$ g de pAD3<sup>32</sup> codificador de hGFP e 0,28  $\mu$ g de siRNA invGL2 e foram de 70-90%. Os plasmídeos repórteres foram amplificados em XL-Blue 1 (Stratagene) e purificados usando o kit Qiagen EndoFree Maxi Plamisd.

## Resultados

A interferência por RNA (RNAi) é o processo de silenciamento de genes pós-transcrição, específico de sequência, em animais e plantas, iniciado por RNA de cadeia dupla (dsRNA) homólogo da sequência do gene silenciado

(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)). Os mediadores da degradação de mRNA específico de sequência são pequenos RNAs interferentes (siRNAs) de 21 e 22 nt, gerados por clivagem com RNase III a partir de dsRNAs mais longos<sup>6-10</sup> (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)). Como se mostra aqui, cadeias duplas de siRNA de 21 nt são capazes de especificamente suprimir a expressão de genes repórteres em múltiplas culturas de células de mamífero, incluindo células de rim embrionário humano (293) e HeLa. Ao contrário dos dsRNAs de 50 ou 500 pb, os siRNAs não activam a resposta ao interferão. Estes resultados indicam que as cadeias duplas de siRNA são uma ferramenta geral para a inactivação específica de sequência da função de um gene em células de mamífero.

siRNAs emparelhados de 21 e 22 nt com extremos salientes 3' medeiam eficazmente a degradação de mRNA específica de sequência em lisados preparados a partir de embriões de *D. melanogaster* (Elbashir, S.M., et al., Genes & Dev., 15:188-200 (2001)). Para testar se os siRNAs são também capazes de mediar RNAi em culturas de tecidos, foram construídas cadeias duplas de siRNA de 21 nt com extremos

salientes 3' simétricos de 2 nt dirigidos contra genes repórteres codificadores da luciferase do amor-perfeito do mar (*Renilla reniformis*) e duas sequências variantes de luciferase do pirilampo (*Photinus pyralis*, GL2 e GL3) (Figuras 14A, 14B). As cadeias duplas de siRNA foram cotransfetadas com combinações de plasmídeo repórter pGL2/pRL ou pGL3/pRL, em células Schneider S2 de *D. melanogaster* ou células de mamífero usando lipossomas catiónicos. As actividades de luciferase foram determinadas 20 h após transfecção. Em todas as linhas celulares testadas, foi observada redução específica da expressão de genes repórteres na presença das cadeias duplas de siRNA cognato (Figuras 15A-15J). É de salientar que os níveis de expressão absolutos de luciferase não foram afectados pelos siRNAs não cognatos, indicando a ausência de efeitos adversos devidos às cadeias duplas de RNA de 21 nt (e.g. Figuras 16A-16D, para células HeLa). Em células S2 de *D. melanogaster* (Figuras 15A, 15B), a inibição específica de luciferases foi completa e semelhantes aos resultados anteriormente obtidos com dsRNAs mais longos (Hammond, S.M., et al., *Nature*, 404: 293-296 (2000); Caplen, N.J., et al., *Gene*, 256:95-105 (2000); Clemens, M & Williams, B., *Cell*, 13:565-572 (1978); Ui-Tei, K., et al., *FEBS Letters*, 479:79-82 (2000)). Em células de mamífero, em que os genes repórteres eram expressos com 50 a 100 vezes mais força, a supressão específica foi menos completa (Figuras 15C-15J). A expressão de GL2 foi reduzida 3 a 12 vezes, a expressão de GL3 9-25 vezes e a expressão de RL 1 a 3 vezes, como resposta aos siRNAs cognatos. Para as células 293, tentar

atingir a luciferase RL com siRNAs RL foi ineficaz, se bem que os alvos GL2 e GL3 tenham respondido especificamente (Figuras 15I, 15J). É provável que a não redução da expressão de RL em células 293 seja devido à expressão 5 a 20 vezes superior comparativamente com qualquer outra linha de células de mamífero testada e/ou devido a acessibilidade limitada da sequência alvo, devido à estrutura secundária do RNA ou a proteínas associadas. No entanto, o facto de a luciferase GL2 e GL3 ser atingida especificamente pelas cadeias duplas de siRNA cognatas indicou que RNAi também funciona em células 293.

O extremo saliente 3' de 2 nt em todas as cadeias duplas de siRNA, excepto para uGL2, é composto por (2'-desoxi)timidina. A substituição de timidina por uridina no extremo saliente 3' foi bem tolerada no sistema *in vitro* de *D. melanogaster*, e a sequência do extremo saliente não foi crítica para o reconhecimento do alvo (Elbashir, S.M., et al., Genes & Dev., 15:188-200 (2001)). O extremo saliente de timidina foi escolhido devido a ser suposto aumentar a resistência a nucleases de siRNAs em meio de cultura de tecidos e dentro das células transfetadas. De facto, o siRNA GL2 modificado com timidina foi ligeiramente mais potente do que siRNA uGL2 não modificado em todas as linhas celulares testadas (Figuras 15A, 15C, 15E, 15G, 15I). É concebível que outras modificações dos nucleótidos 3' salientes proporcionem benefícios adicionais à entrega e estabilidade das cadeias duplas de siRNA.

Nas experiências de cotransfecção, foram usadas duplas cadeias de siRNA 25 nM relativamente ao volume final do meio de cultura de tecidos (Figuras 15A-15J, 16A-16F). O aumento da concentração de siRNA para 100 nM não aumentou os efeitos de silenciamento específico, mas começou a afectar as eficiências de transfecção devido à competição para encapsulação em lipossomas entre o DNA de plasmídeo e siRNA. O decréscimo da concentração de siRNA para 1,5 nM não reduziu o efeito de silenciamento específico, mesmo apesar dos siRNAs estarem agora apenas 1 a 20 vezes mais concentrados do que os plasmídeos de DNA. Isto indica que os siRNAs são reagentes extraordinariamente potentes para mediar o silenciamento de genes e que os siRNAs são eficazes em concentrações que estão várias ordens de grandeza abaixo das concentrações aplicadas nas experiências convencionais que pretendem atingir genes e que utilizam ácidos nucleicos complementares ou ribozimas.

De forma a monitorizar o efeito de dsRNAs mais longos nas células de mamífero, foram preparados dsRNAs de 50 e 500 pb cognatos para os genes repórteres. Como controlo não específico, foram usados dsRNAs derivados de GFP humanizada (hG) (Kehlenbach, R.H., et al., *J. Cell Biol.*, 141:863-874 (1998)). Quando os dsRNAs foram cotransfetados, em quantidades idênticas (não concentrações) às das cadeias duplas de siRNA, a expressão do gene repórter foi fortemente e inespecificamente reduzida. Este efeito está ilustrado para as células HeLa como exemplo representativo (Figuras 16A-16D). As actividades absolutas

de luciferase foi diminuída inespecificamente 10 a 20 vezes por cotransfecção de dsRNA de 50 pb e 20-200 vezes por cotransfecção de dsRNA de 500 pb, respectivamente. Efeitos inespecíficos semelhantes foram observados para células COS-7 e células NIH/3T3. Para as células 293, uma redução não específica de 10 a 20 vezes foi observada apenas para dsRNAs de 500 pb. A redução não específica da expressão do gene repórter por dsRNA >30 pb era esperada como parte da resposta ao interferão (Matthews, M., "Interactions between viruses and the cellular machinery for proteins synthesis" in "Translational Control" (eds., 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)). Surpreendentemente, apesar do forte decréscimo inespecífico na expressão do gene repórter, foi reproduтивemente detectado silenciamento específico adicional mediado por dsRNA específico de sequência. No entanto, os efeitos de silenciamento específico foram apenas aparentes quando as actividades dos genes repórteres foram normalizadas relativamente aos controlos de dsRNA hG (Figuras 16E, 16F). Foi observada uma redução específica de 2 a 10 vezes na resposta a dsRNA cognato também nas três outras linhas celulares de mamífero testadas. Os efeitos de silenciamento específico com dsRNAs (356-1662 pb) foram anteriormente descritos em células CHO-K1, mas as quantidades de dsRNA necessárias para detectar uma redução específica de 2 a 4 vezes foram cerca de 20 vezes mais elevadas do que nas

nossas experiências (Ui-Tei, K., et al., FEBS Letters, 479:79-82 (2000)). Igualmente, as células CHO-KI parecem ser eficientes na resposta ao interferão. Numa outra descrição, células 293, NIH/3T3 e BHK-21 foram testadas relativamente a RNAi usando combinações dos repórteres luciferase/lacZ e dsRNA de 829 pb específico para lacZ ou de 717 pb não específico de GFP (Caplean, N.J., et al., Gene, 252:95-105 (2000)). A incapacidade para detectar RNAi neste caso foi, provavelmente, devido ao ensaio repórter luciferase/lacZ ser menos sensível e às diferenças de comprimento do dsRNA alvo e controlo. No seu conjunto, os resultados aqui descritos indicam que RNAi é activa em células de mamífero, mas que o efeito de silenciamento é difícil de detectar se o sistema de interferão for activado por dsRNA >30 pb.

O mecanismo do processo de interferência mediado por siRNA de 21 nt em células de mamífero mantém-se por descobrir e o silenciamento pode ocorrer após transcrição e/ou durante a transcrição. No lisado de *D. melanogaster*, as cadeias duplas de siRNA medeiam o silenciamento de genes pós-tradução através da reconstituição de complexos de siRNA-proteína (siRNPs), que guiam o reconhecimento do mRNA e a clivagem do alvo (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)). Em plantas, o silenciamento pós-transcrição mediado por dsRNA também está associado a metilação de DNA dirigida por RNA, a qual pode também ser dirigida por

siRNAs de 21 nt (Wassenegger, M., *Plant Mol. Biol.*, 43:203-220 (2000); Finnegan, E.J., et al., *Curr. Biol.*, 11:R99-R102 (2000)). A metilação das regiões do promotor podem conduzir ao silenciamento da transcrição (Metter, M.F., et al., *EMBO J.*, 19:5194-5201 (2000)), mas a metilação nas sequências codificadoras não o deve fazer (Wang, M.-B., *RNA*, 7:16-28 (2001)). A metilação do DNA e o silenciamento da transcrição em mamíferos são processos bem documentados (Kass, S.U., et al., *Trends Genet.*, 13:444-449 (1997); Razin, A., *EMBO J.*, 17:4905-4908 (1998)), ainda que não tenham sido ligados a silenciamento pós-transcrição. A metilação em mamíferos é predominantemente dirigida contra resíduos CpG. Devido a não existir CpG no siRNA de RL, mas siRNA de RL mediar o silenciamento específico na cultura de tecidos de mamífero, é improvável que a metilação de DNA seja crítica para o nosso processo de silenciamento observado. Resumidamente, é aqui descrito o silenciamento de genes mediado por siRNA em células de mamífero. A utilização de siRNAs de 21 nt é bastante promissora para a inactivação da função de genes em cultura de tecidos humanos e no desenvolvimento de terapias específicas de genes.

Lisboa, 1 de Março de 2010

**REIVINDICAÇÕES**

1. Um método de produção de RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento compreendendo:

- (a) combinação do RNA de cadeia dupla com um extracto solúvel que medeia a interferência por RNA, produzindo assim uma combinação; e
- (b) manutenção da combinação de (a) em condições nas quais o RNA de cadeia dupla seja processado em RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento.

2. O método da reivindicação 1 compreendendo ainda o isolamento de RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento a partir da combinação.

3. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que o RNA de cadeia dupla corresponde a uma sequência de um gene a ser degradado; e o RNA de 21 a 23 nucleótidos de comprimento medeia interferência por RNA do mRNA do gene a ser inactivado, produzindo assim RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento que medeia a interferência por RNA do mRNA do gene.

4. Um método de mediação de interferência por RNA de mRNA de um gene numa célula ou organismo não humano compreendendo:

- (a) introdução de RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento e correspondendo a uma sequência do gene que dirige o mRNA do gene para degradação na célula *in vitro* ou numa célula do organismo *in vitro* e devolvendo a célula do organismo ao organismo;
- (b) manutenção da célula ou organismo produzido em
  - (a) em condições nas quais a degradação do mRNA ocorre, mediando assim a interferência por RNA do mRNA do gene na célula ou organismo, pelo que no caso da célula voltar para o organismo, o método não é terapêutico nem de diagnóstico.

5. Um método de avaliação da função de um gene numa célula a testar ou organismo a testar, compreendendo mediação de interferência por RNA do mRNA de um gene numa célula ou organismo, como reivindicado na reivindicação 4, em que o organismo é um organismo não humano e a célula e organismo são uma célula a testar e organismo a testar respectivamente; e

- (c) observação do fenótipo da célula a testar ou organismo a testar produzida em (b) e, facultativamente, comparação do fenótipo observado com o de uma célula controlo ou organismo controlo, proporcionando assim informação acerca da função do gene.

6. Um método como reivindicado na reivindicação 4 compreendendo ainda:

- (a) combinação de RNA de cadeia dupla que corresponde a uma sequência do gene com um extracto solúvel que medeia a interferência por RNA, produzindo assim uma combinação;
- (b) manutenção da combinação produzida em (a) em condições nas quais o RNA de cadeia dupla é processado em RNA de 21 a 23 nucleótids de comprimento, produzindo assim RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento;
- (c) isolamento do RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nt de comprimento produzido em (b) antes do passo de introdução do RNA isolado em (c) na célula ou organismo.

7. Um método de avaliação se um agente actua num produto de um gene compreendendo mediação da interferência por RNA de um gene numa célula ou organismo como reivindicado na reivindicação 4, em que o organismo é um organismo não humano e:

- (c) introdução do agente na célula *in vitro* ou na célula do organismo *in vitro* de (b) antes da célula voltar para o organismo; e
- (d) determinação se o agente tem um efeito na célula ou organismo, em que se o agente não tiver efeito na célula ou organismo então o agente actua sobre o produto do gene numa via biológica que envolve o produto do gene.

8. Um método de avaliação se um produto de um gene é um alvo adequado para a descoberta de fármacos, compreendendo a mediação de interferência por RNA do mRNA de um gene numa célula ou organismo como reivindicado na reivindicação 4 em que o organismo é um organismo não humano e a degradação do mRNA resulta no decréscimo da expressão do gene; e:

(c) determinação do efeito do decréscimo da expressão do gene na célula ou organismo, pelo que se o decréscimo na expressão tiver um efeito, então o produto do gene é um alvo para a descoberta de fármacos.

9. O método de qualquer uma das reivindicações 4-8, em que o gene codifica um mRNA celular ou um mRNA viral.

10. Um método de produção de células "knock-down", compreendendo a introdução nas células, em que um gene deve ser inactivado, de RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento e correspondendo a uma sequência do gene, que pretende atingir o mRNA correspondente ao gene e manutenção das células resultantes em condições tais que ocorra RNAi, resultando em degradação do mRNA do gene, produzindo assim células "knockdown".

11. Um método de identificação de locais alvo

dentro do mRNA que são eficientemente clivados pelo processo de RNAi, compreendendo a combinação de RNA de cadeia dupla de 21 a 23 nucleótidos de comprimento e correspondendo a uma sequência de um gene a ser degradado, mRNA marcado correspondendo ao gene e um extracto solúvel que medeia a interferência por RNA, produzindo assim uma combinação; manutenção da combinação em condições tais que o RNA de cadeia dupla seja degradado e identificação dos locais no mRNA que são eficientemente clivados.

12. Um método de identificação de RNAs de 21-23 nucleótidos que eficientemente medeia RNAi, em que os referidos RNAs de 21-23 nt abrangem os locais alvo identificados dentro do mRNA ao realizar-se o método da reivindicação 11, e ainda compreendendo a identificação de um RNA de 21-23 nucleótidos que abrange os locais alvo.

13. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1-12 em que o RNA de cadeia dupla é obtido a partir de RNA de cadeia dupla que foi clivado em fragmentos de 21 a 23 nucleótidos de comprimento.

14. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1-13, em que o RNA de cadeia dupla compreende um grupo hidroxilo terminal 3'.

15. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1-14, em que o RNA de cadeia dupla é RNA obtido por síntese química.

16. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1-15, em que o RNA compreende um ou mais nucleótidos não convencionais, incluindo nucleótidos não naturais.

17. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1-16, em que o RNA de cadeia dupla é isolado usando um método seleccionado entre electroforese em gel, métodos não desnaturantes, ou cromatografia em coluna não desnaturante.

18. Um método como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1-17, em que o RNA de cadeia dupla é complementar de um ou mais de entre mRNA de células de mamífero, mRNA humano ou mRNA viral.

19. O método de qualquer uma das reivindicações 1-3, 6, 11 ou 12, em que o extracto solúvel deriva de embriões de *Drosophila* na fase de blastoderme sincicial.

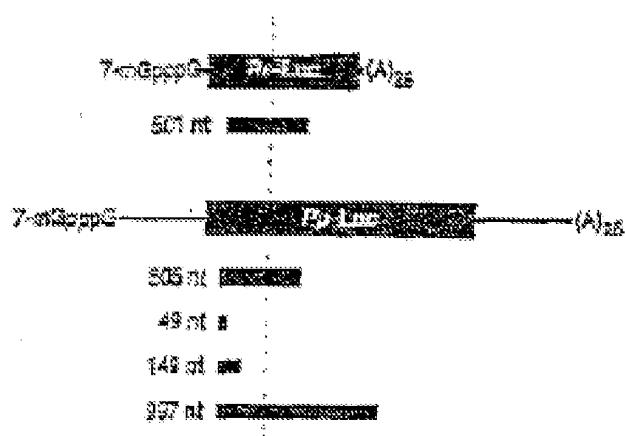


Figura 1

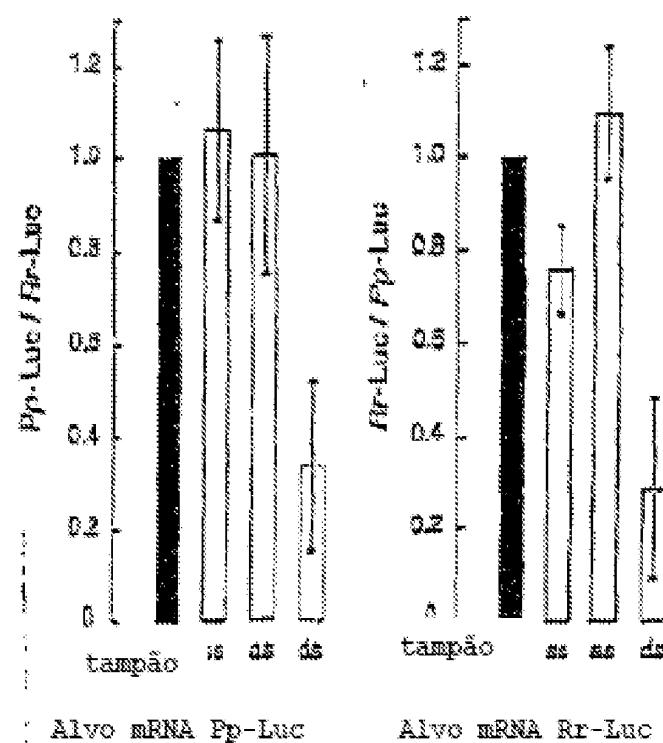




Figura 3A

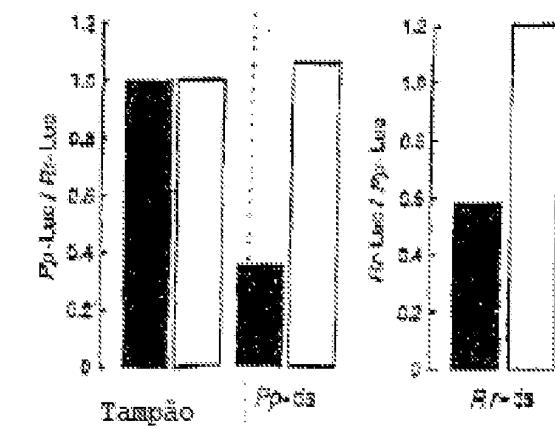
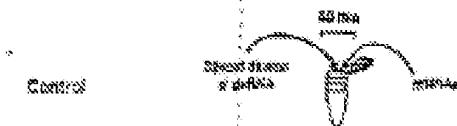
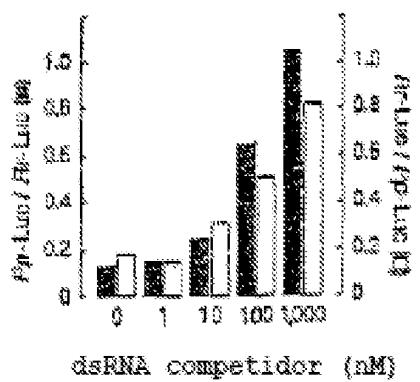


Figura 3B

Figura 3C



dsRNA competidor (nM)

Figura 3C

Figura 4

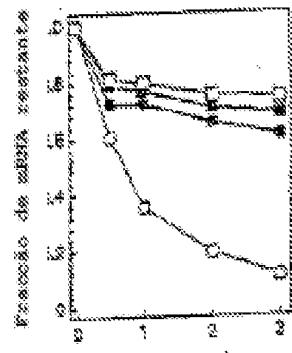


Figura 5A

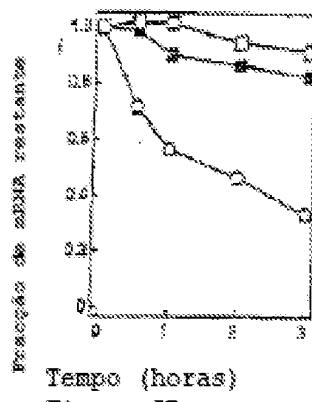


Figura 5B

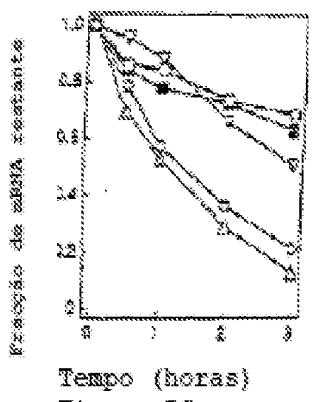
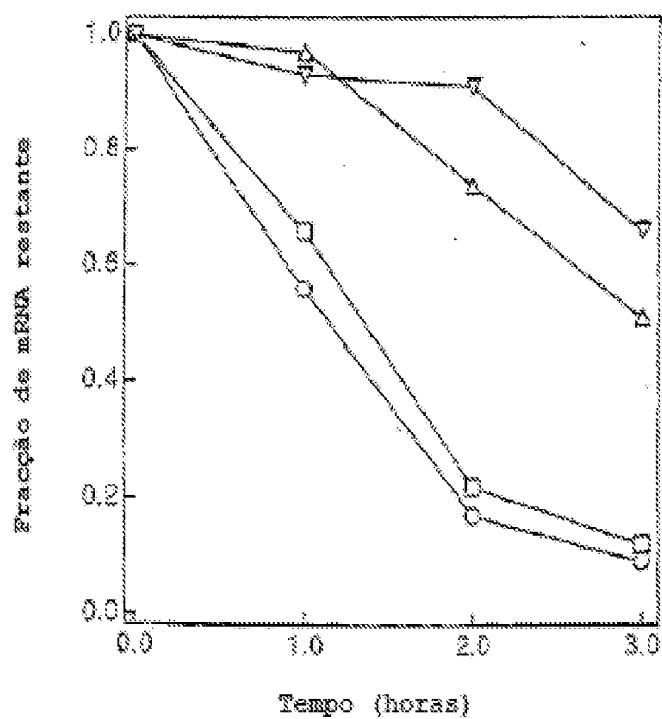


Figura 5C



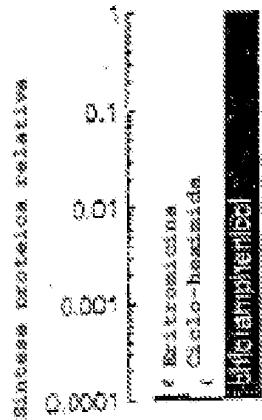


Figura 7A

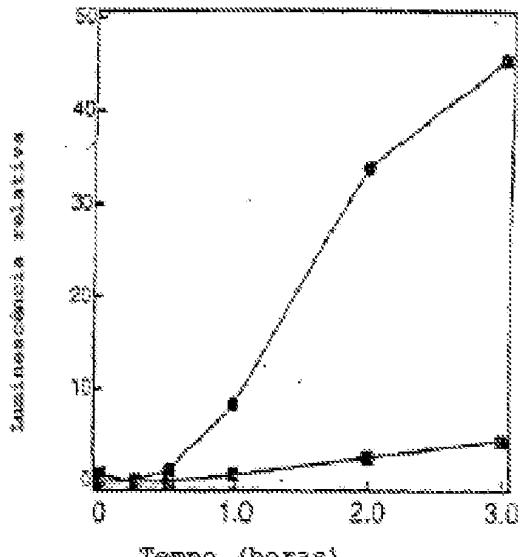


Figura 7B

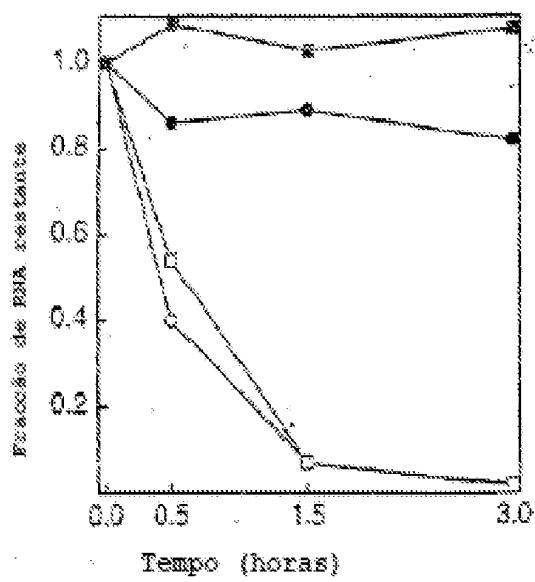


Figura 7C

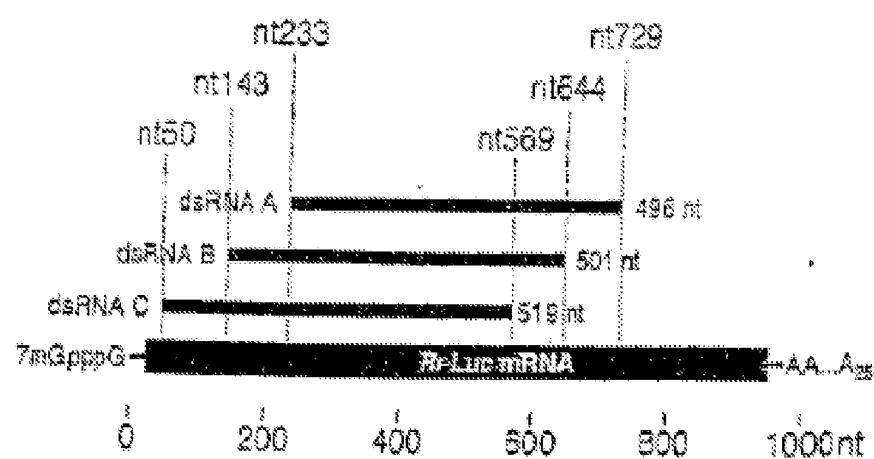
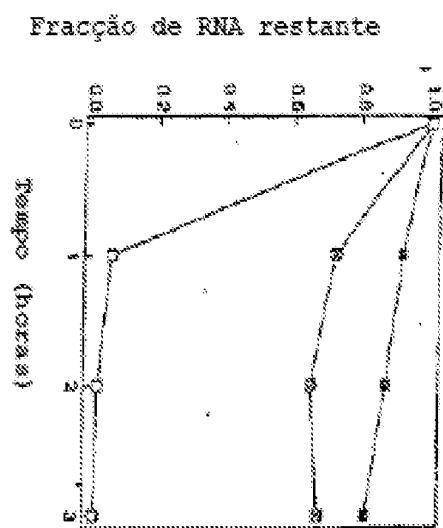
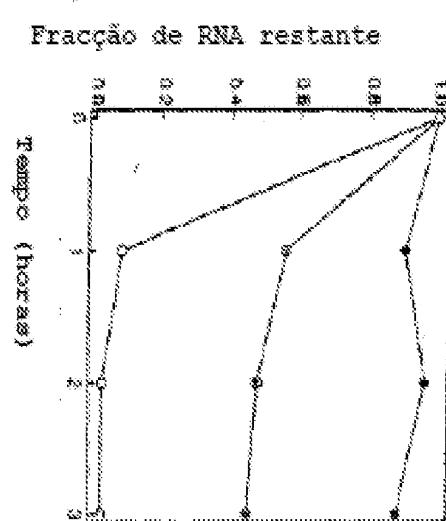


Figura 10

7mG<sub>ppp</sub>GAAUACAAGCUUUGGGCCUAGCCACCAUGACUUCGAAAGUUUAUGAUCC  
AGAACAAAGGAAACGGA<sup>9</sup>GUAUACUUGGUCCACAGUGGUGGGCCAGAUG  
UAAACAAAGGAAUGAUGGUUCUUSAUUCAUUUAUUAUUAUUAUGAUUCAGAAA  
AACAUUGCAGAAAUGCCGUUAUUUUUUACAUUGGUACGGGCCUCUU  
CUUAUUAUGGCCACAUUGGUUGGUCCACAUUAUUGGCCAGUAGGCCGU  
GUUAUUAUACCAAGACCUUAUUGGUAU...

Silenciamento de gene específico de sequência por  
 fragmentos de 21-23 nt

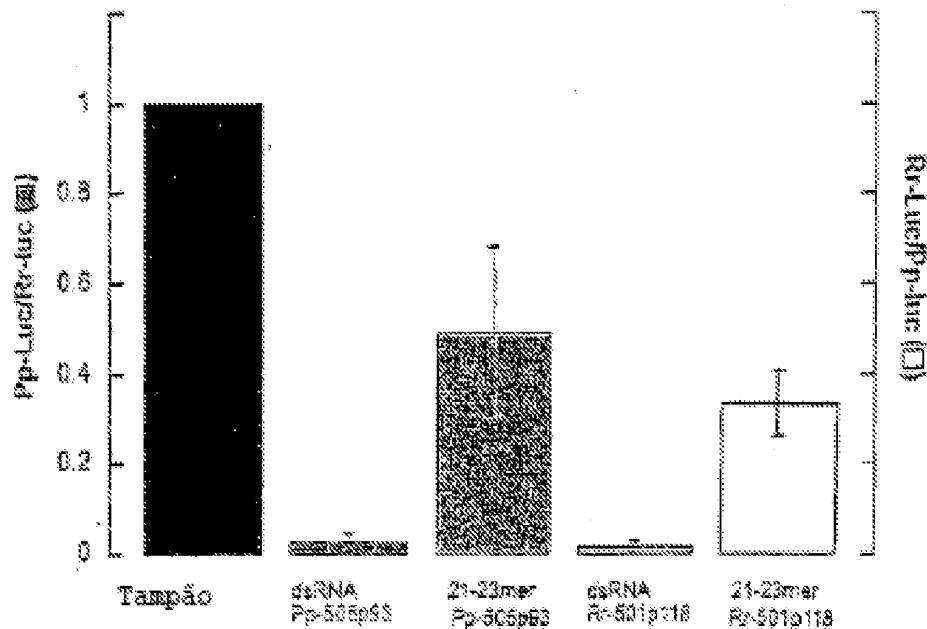


Figura 12

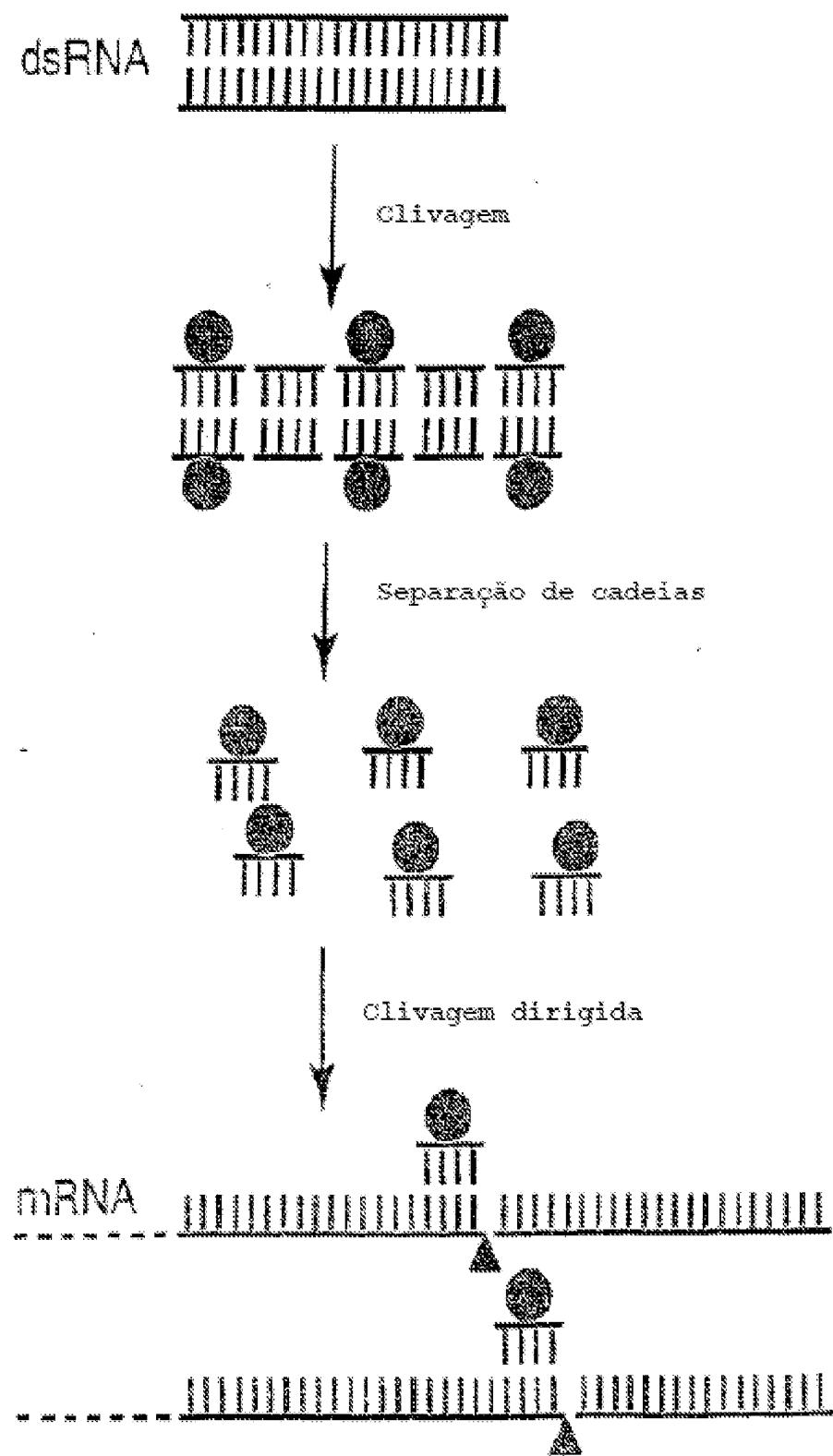


Figura 11

Figura 13A

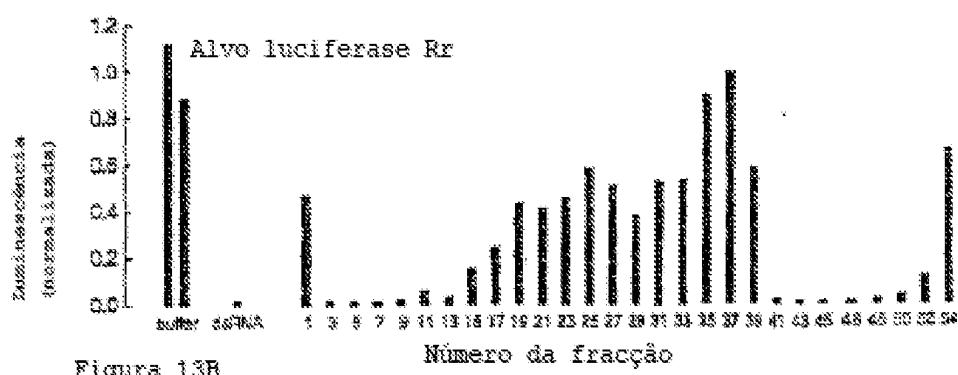
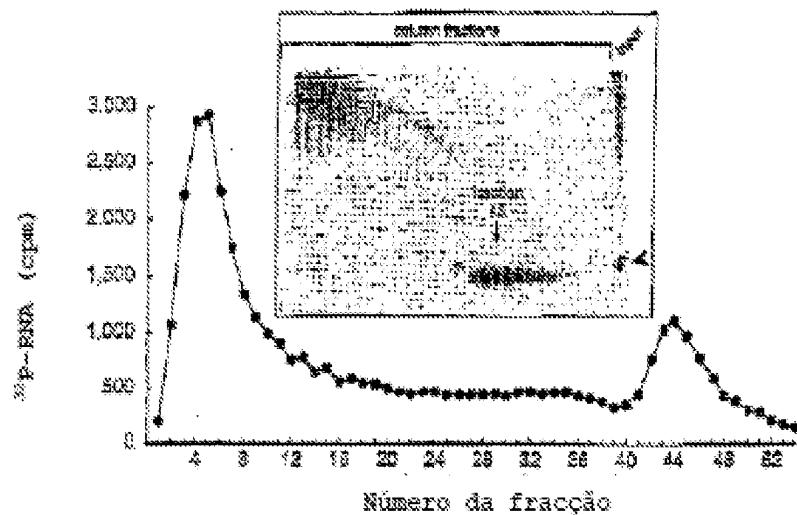


Figura 13B

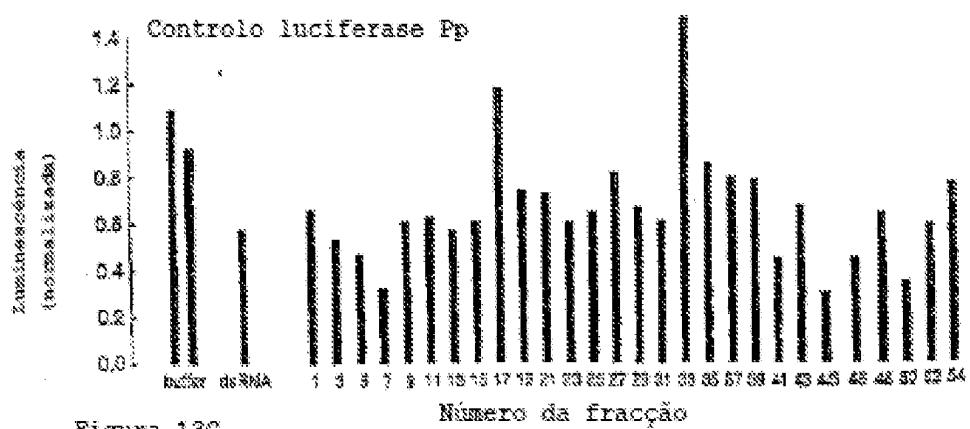


Figura 13C

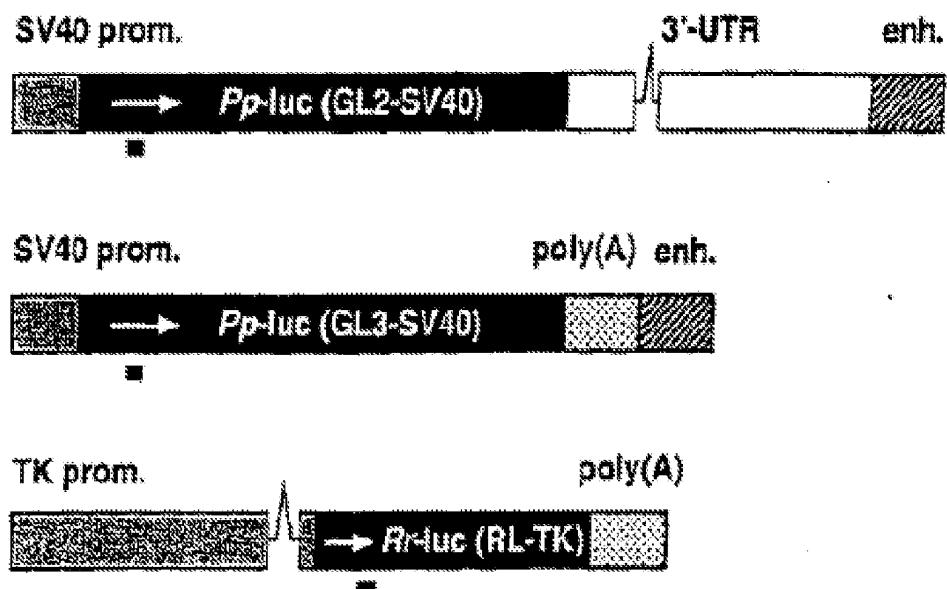
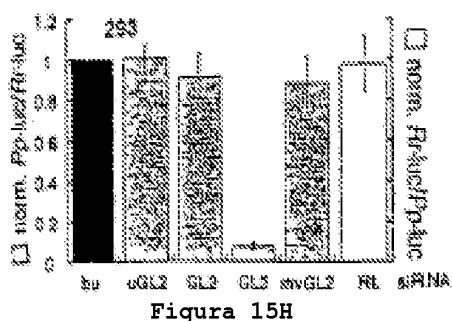
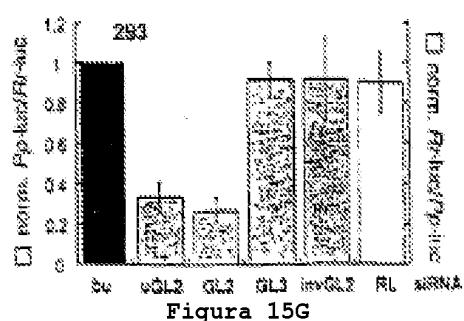
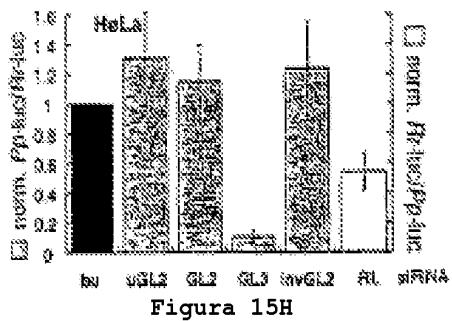
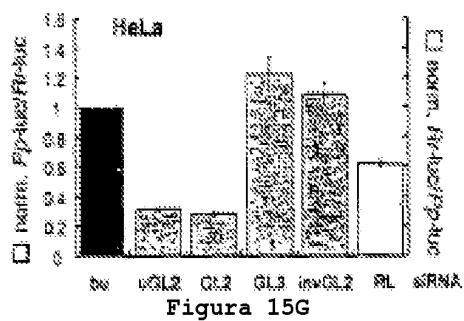
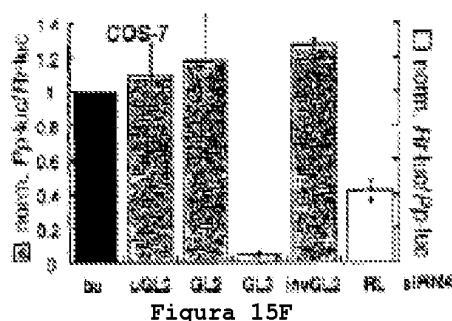
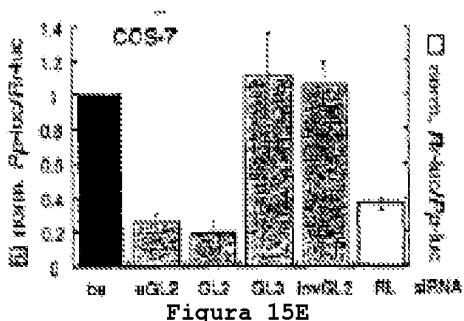
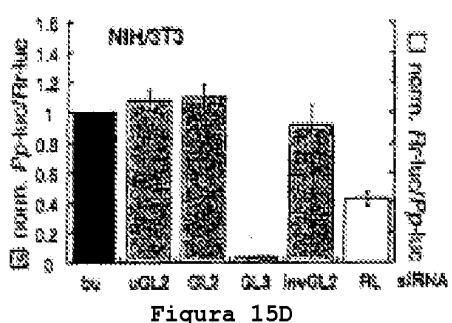
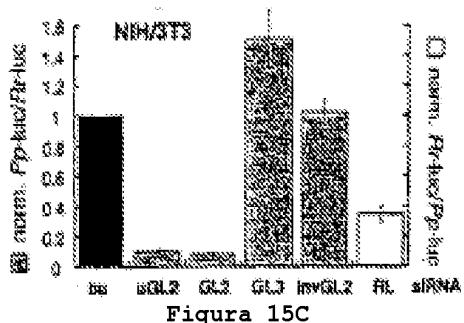
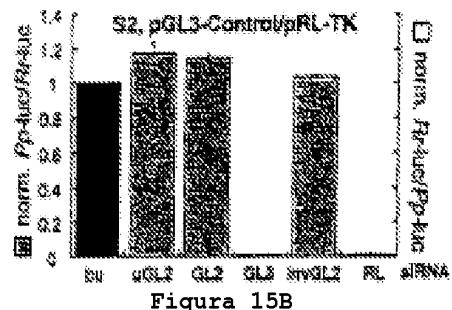
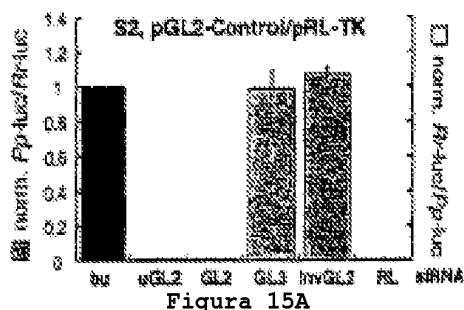


Figura 14A

Dupla cadeia  
de siRNA

uGL2	5' CGUACGCCGAAUACUUCGAAU UUCCAUCCGGGCUUAGGAAGCT 3'
GL2	5' CGUACGCCGAAUACUUCGAAU TTGCAUCCGGGCUUAGGAAGCT 3'
GL3	5' CGUACGCCGAAUACUUCGAAU TTGCAUCCGGGCUUAGGAAGCT 3'
InvGL2	5' AGCCUCACAAAGGGCGAUUCCTT TTTCAAGUAUUCGGGCTACG 3'
RL	5' AAACAUCCGAGAAAUCCGCGTT TTTUUUUAACCGUCUUTAACGAC 3'

Figura 14B



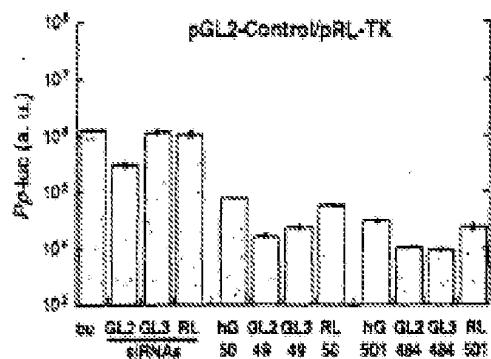


Figura 16A

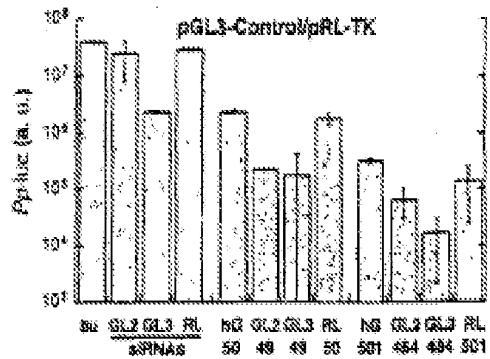


Figura 16B

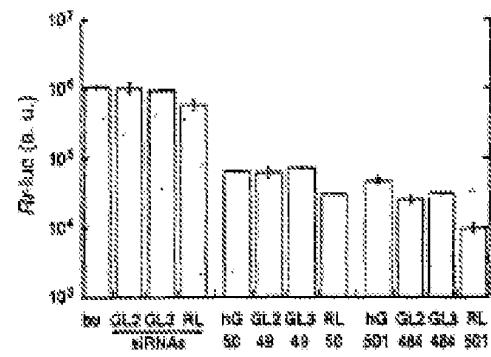


Figura 16C

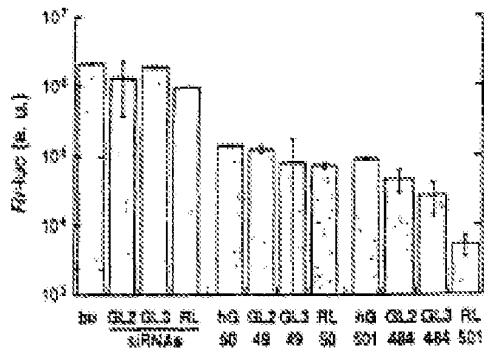


Figura 16D

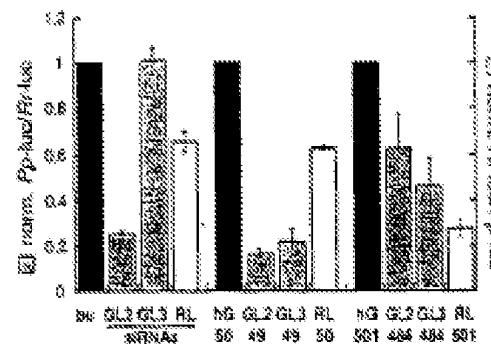


Figura 16E

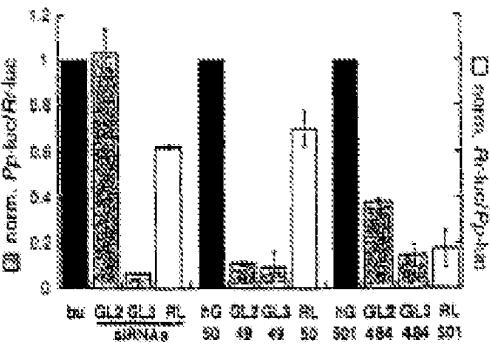


Figura 16F