

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0054518**(43) 공개일자** 2021년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) **C12N 15/80** (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/80 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2021-7006457**

(22) 출원일자(국제) **2019년08월02일**
 심사청구일자 **없음**

(85) 번역문제출일자 **2021년03월03일**

(86) 국제출원번호 **PCT/AU2019/050814**

(87) 국제공개번호 **WO 2020/024019**
 국제공개일자 **2020년02월06일**

(30) 우선권주장
 2018902840 2018년08월03일 오스트레일리아(AU)
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인
**커먼웰쓰 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치
 오가니제이션**
 오스트레일리아 오스트레일리안 캐피탈 테리토리
 2601 액턴 클러니즈 로스 스트리트

(72) 발명자
스미스 네일 앤드류
 오스트레일리아 2614 오스트레일리안 캐피탈 테리
 토리 쿡크 드라이브 스트리트 27

왕 밍 보
 오스트레일리아 2617 오스트레일리안 캐피탈 테리
 토리 맥켈라 슬래서 크레센트 43에이
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 비정규 염기쌍을 포함하는 RNA 분자**(57) 요약**

본 발명은 새로운 이중 가닥 RNA(dsRNA) 구조 및 유전자 침묵화에서 이의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8279 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/33 (2013.01)
C12N 2310/531 (2013.01)
C12N 2310/532 (2013.01)

(72) 발명자

장 다아이

오스트레일리아 2615 오스트레일리안 캐피탈 테리
 토리 브루스 크리스프 서큐트 11/121

도란 티모시 제임스

오스트레일리아 3226 빅토리아 오션 그루브 돌핀
 코트 18

티자드 마크

오스트레일리아 3216 빅토리아 하이톤 차드리 코트
 3

알루 안나푸르나 데비

인도 517507 안드라 프라데시 티루파티 망가람 칼
 캄바디 로드 인디안 인스티튜트 오브 사이언스 에
 듀케이션 앤드 리서치 내

그래비스 이안 케빈

오스트레일리아 2905 오스트레일리안 캐피탈 테리
 토리 리차드슨 그림샤 스트리트 39

가오 링링

오스트레일리아 6014 웨스턴 오스트레일리아 플로
 렛 언더우드 애비뉴 147 씨에스아이알오 에이 앤
 에프 내

앤더슨 조나단 폴

오스트레일리아 6014 웨스턴 오스트레일리아 플로
 렛 언더우드 애비뉴 147 씨에스아이알오 에이 앤
 에프 내

디 페이터 로버트

오스트레일리아 2601 오스트레일리안 캐피탈 테리
 토리 액톤 클루니스 로스 스트리트 커먼웰쓰 사이
 언티팩 앤드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션 내

(30) 우선권주장

2018902896 2018년08월08일 오스트레일리아(AU)
 PCT/AU2018/051015 2018년09월17일 오스트레일
 리아(AU)
 2019900941 2019년03월20일 오스트레일리아(AU)

명세서

청구범위

청구항 1

제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 서로 혼성화하여 dsRNA 영역을 형성할 수 있는, 적어도 20개 인접한 뉴클레오타이드 길이의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 적어도 20개 인접한 뉴클레오타이드 길이의 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하는, 키메라 리보핵산(RNA) 분자로서,

- i) 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- ii) 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- iii) 제1 5' 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,
- iv) 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 제1 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,
- v) 전체적으로, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 약 5% 내지 약 40%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,
- vi) dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,
- vii) RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,
- viii) RNA 분자 또는 적어도 일부 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있고,
- ix) RNA 분자는 시험관내 또는 세포에서 또는 둘 다에서 전사에 의해 효소적으로 제조될 수 있는 키메라 RNA 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 1000개 리보뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 200개 리보뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 50개 리보뉴클레오타이드, 또는 적어도 10개 뉴클레오타이드, 또는 10개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드, 또는 10개 내지 200개 리보뉴클레오타이드, 또는 10개 내지 50개 리보뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 서열이 RNA의 단일 인접 가닥에 포함되도록 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에, 또는 바람직하게는 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 키메라 RNA 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, RNA 분자에서 루프 서열은 진핵 세포에 내인성인 RNA 분자에 상보적인 하나 이상의 결합 서열을 포함하고/포함하거나, RNA 분자에서 루프 서열은 폴리펩티드 또는 기능성 폴리뉴클레오타이드를 인코딩하는 개방 해독틀을 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 4

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, dsRNA의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드의 약 5% 내지 약 40%가 전체적으로 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하고, 보다 바람직하게는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성하는 키메라 RNA 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA의 영역에 완전 상보적이고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA의 영역에서의 C 뉴클레오타이드를 U 뉴클레오타이드로 대체함으로써 표적 RNA 영역에 대해 서열이 상이한 키메라 RNA 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 서로 혼성화하여 제2 dsRNA 영역을 형성할 수 있고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되거나 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되거나 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열 각각은 적어도 20개 인접한 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자와 서열 관련성이 없거나 표적 RNA 분자와 서열 관련성이 있는 개입 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 공유 연결되거나, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 리보뉴클레오타이드 서열 없이 공유 연결되는 키메라 RNA 분자.

청구항 12

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체와 서열 관련성이 없거나 표적 RNA 분자와 서열 관련성이 있는 개입 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 공유 연결되거나, 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 리보뉴클레오타이드 서열 없이 공유 연결되는 키메라 RNA 분자.

청구항 13

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 전체적으로 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오타이드가 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고, 바람직하게는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성하며, 제2 dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않으며, RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하는, 키메라 RNA 분자.

청구항 14

제6항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 독립적으로 4개 내지 약 2000개 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 4개 내지 약 1200개 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게는 4개 내지 약 200개 뉴클레오타이드 길이 및 가장 바람직하게는 4개 내지 약 50개 뉴클레오타이드 길이인 키메라 RNA 분자.

청구항 15

제6항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 5' 리더 서열 또는 3' 트레일러 서열, 또는 둘 모두를 추가로 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 16

제1 RNA 성분 및 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분을 포함하는 키메라 RNA 분자로서,

제1 RNA 성분은 제1 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하고, 이는 서로 혼성화하여 제1 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 적어도 4개 뉴클레오타이드의 제1 개입 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고,

제2 RNA 성분은 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제2 개입 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 RNA 분자에서 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 혼성화하고,

제1 RNA 성분에서,

- i) 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- ii) 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- iii) 제1 5' 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,
- iv) 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 제1 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,
- v) 전체적으로, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오타이드는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,
- vi) 제1 dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,

키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,

- (a) 키메라 RNA 분자 또는 적어도 일부의 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있거나,
- (b) 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체 영역과 서열이 적어도 50% 동일한, 바람직하게는 서열이 적어도 90% 또는 100% 동일한, 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 서열을 포함하거나,
- (c) (a) 및 (b) 둘 다인, 키메라 RNA 분자.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드가 모두 표적 RNA 분자의 제1 영역의 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성할 수 있는 키메라 RNA 분자.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 분자가 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및 이와 염기쌍을 형성하는 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 안티센스 서열은 표적 RNA 분자의 영역과 각각 상보적이고, 바람직하게는 전체적으로 상보적인 키메라 RNA 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 상보적인 키메라 RNA 분자.

청구항 20

제18항에 있어서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 상보적인 키메라 RNA 분자.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오타이드에 걸쳐 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 개입 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 헤어핀 RNA(hpRNA) 구조를 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오타이드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드의 약 15% 내지 약 30%, 또는 약 16% 내지 약 25%가 전체적으로 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고, 바람직하게는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하며, 보다 바람직하게는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성하는 키메라 RNA 분자.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 비-정규 염기쌍의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%가 G:U 염기쌍인 키메라 RNA 분자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, dsRNA 영역에서 리보뉴클레오타이드의 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 1% 미만 또는 0%가 염기쌍을 형성하지 않는 키메라 RNA 분자.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, dsRNA 영역에서 4개마다 1개 내지 6개마다 1개의 리보뉴클레오타드가 비-정규 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고, 바람직하게는 G:U 염기쌍을 형성하는 키메라 RNA 분자.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, dsRNA 영역이 8개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는 키메라 RNA 분자.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, dsRNA 영역이 적어도 8개의 인접한 정규 염기쌍, 바람직하게는 8개 이상 12개 이하의 인접한 정규 염기쌍을 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, dsRNA 영역 내, 또는 각 dsRNA 영역 내의 모든 리보뉴클레오타드가 정규 염기쌍 또는 비-정규 염기쌍과 염기쌍을 형성하는 키메라 RNA 분자.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 리보뉴클레오타드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타드 또는 안티센스 리보뉴클레오타드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타드, 또는 둘 다가 염기쌍을 형성하지 않는 키메라 RNA 분자.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 RNA 서열이 표적 RNA 분자 영역의 상보체와 서열이 100% 미만인 동일하거나, 약 80% 내지 99.9% 동일하거나, 약 90% 내지 98% 동일하거나, 약 95% 내지 98% 동일한 키메라 RNA 분자.

청구항 32

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 RNA 서열이 표적 RNA 분자 영역과 서열이 100% 동일한 키메라 RNA 분자.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 및/또는 안티센스 리보뉴클레오타드 서열, 바람직하게는 둘 모두가 적어도 50개, 적어도 약 100개, 적어도 약 200개, 적어도 약 300개, 적어도 약 400개, 적어도 약 500개, 적어도 약 600개, 적어도 약 700개, 적어도 약 800개, 적어도 약 900개, 적어도 약 1,000개, 또는 약 100개 내지 약 1,000개, 또는 20개 내지 약 1000개 뉴클레오타드, 또는 20개 내지 약 500개 뉴클레오타드 길이인 키메라 RNA 분자.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 리보뉴클레오타드 서열에서 리보뉴클레오타드의 수가 안티센스 리보뉴클레오타드 서열에서 리보뉴클레오타드의 수의 약 90% 내지 약 110%인 키메라 RNA 분자.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 센스 리보뉴클레오타드 서열에서 리보뉴클레오타드의 수가 안티센스 리보뉴클레오타드 서열에서 리보뉴클레오타드의 수와 동일한 키메라 RNA 분자.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 RNA 분자가 제1 5' 리보뉴클레오타드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 또는 제2 3' 리보뉴클레오타드에 공유 연결되는 3' 연장 서열, 또는 둘 다를 추가로 포함하는 키메라

RNA 분자.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 RNA 분자가 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 또는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열, 또는 둘 다를 추가로 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 동일하거나 상이한 2개 이상의 dsRNA 영역을 포함하는 키메라 RNA 분자.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포에서 발현되는 경우 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 유사한 RNA 분자의 가공과 비교될 때 22개 및/또는 20개 리보뉴클레오타이드 길이인 더 많은 asRNA 분자가 형성되는 키메라 RNA 분자.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 키메라 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오타이드.

청구항 41

제40항에 있어서, DNA 작제물인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 숙주 세포에서 RNA 분자를 발현을 유도시킬 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 43

제42항에 있어서, 프로모터가 RNA 폴리머라제 프로모터, 예컨대 RNA 폴리머라제 III 프로모터, RNA 폴리머라제 II 프로모터, 또는 시험관내 기능하는 프로모터인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게는 5' 연장 서열에 또는 적어도 하나의 루프 서열에 인트론을 포함하는 RNA 전구체 분자를 인코딩하며, 인트론은 숙주 세포에서 또는 시험관내에서 폴리뉴클레오타이드의 전사 동안 스플라이싱되어 나갈 수 있는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 45

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 46

제45항에 있어서, 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 47

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 또는 제45항 또는 제46항의 벡터 중 하나 이상 또는 전부를 포함하는 숙주 세포.

청구항 48

제47항에 있어서, 박테리아 세포, 효모 세포와 같은 진균 세포, 식물 세포 또는 동물 세포 바람직하게는 식물 세포인 숙주 세포.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 죽어있거나/죽어있고 재생이 불가능한 숙주 세포.

청구항 50

제42항, 제43항, 또는 제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자를 인코딩하고/하거나 포함하며, 폴리뉴클레오타이드의 프로모터 영역은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 인코딩하는 대응하는 폴리뉴클레오타이드의 프로모터와 비교되는 경우 더 낮은 수준의, 예컨대 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만 또는 약 20% 미만의 메틸화를 갖는 폴리뉴클레오타이드 또는 숙주 세포.

청구항 51

제50항에 있어서, 바람직하게는 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성된 작은 RNA 분자, 또는 이 둘 모두를 포함하는 식물 세포 또는 진균 세포이고, 키메라 RNA 분자는 5'에서 3' 순서로, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열, 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 숙주 세포.

청구항 52

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포이며 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 적어도 2개 카피를 포함하며,

- i) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성의 감소 수준은 세포가 단일 카피의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 경우 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성의 감소 수준과 대략 동일하거나, 혹은 더 크며, 그리고/또는
- ii) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성의 감소 수준은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 포함하는 대응하는 세포와 비교되는 경우 더 낮은 숙주 세포.

청구항 53

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 또는 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포 중 하나 이상 또는 전부를 포함하는 비-인간 유기체.

청구항 54

제53항에 있어서, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 트랜스 제닉 비-인간 유기체, 바람직하게는 식물 또는 진균인 비-인간 유기체.

청구항 55

제54항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 유기체의 게놈 내로 안정적으로 통합되는 비-인간 유기체.

청구항 56

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자를 제조하는 방법으로서, 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, RNA 분자를 적어도 부분적으로 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 58

제54항 또는 제55항의 비인간 유기체를 제조하는 방법으로서, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 도입하여 이것이 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합되도록 하는 단계, 및 세포로부터 비-인간 유기체를 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 59

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 추출물은 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 또는 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 숙주 세포의 추출물.

청구항 60

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 또는 제59항의 추출물, 및 하나 이상의 적합한 담체 중 하나 이상을 포함하는 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 약학 조성물인 조성물.

청구항 62

제60항에 있어서, 노지에서 성장하는 식물로의 적용에 적합한 조성물.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 RNA 분자, 및 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상의 안정성을 증가시키고/시키거나 RNA 분자, 키메라 RNA 분자 또는 폴리뉴클레오타이드가 유기체의 세포에 의해 섭취되는 것을 보조하는 적어도 하나의 화합물을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, 화합물이 전달감염 촉진제인 조성물.

청구항 65

세포 또는 유기체에서 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시키거나 하향-조절하기 위한 방법으로서, 세포 또는 유기체에 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물 중 하나 이상을 전달하는 것을 포함하는 키트.

청구항 66

제65항에 있어서, 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성된 작은 RNA 분자, 또는 이 둘 모두는 세포 또는 유기체에 대한 국소 적용에 의해 세포 또는 유기체, 바람직하게는 식물 세포, 식물, 진균 또는 곤충과 접촉되거나, 유기체를 위한 먹이에 제공되는 방법.

청구항 67

유해물 또는 병원체에 의해 비-인간 유기체에 야기된 손상을 감소시키는 방법으로서, 방법은 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물 중 하나 이상을 유해물 또는 병원체에 전달하거나, 유해물 또는 병원체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 68

비-인간 유기체를 제어하는 방법으로서, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물,

또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물 중 하나 이상을 비-인간 유기체에 전달하는 단계를 포함하며, RNA 분자 작은 RNA 분자는 비-인간 유기체 상에 유해한 효과를 갖는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 비-인간 유기체가 절지동물 또는 식물인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 비-인간 유기체가 식물이고, 절지동물이 식물 또는 이의 일부를 먹는 방법.

청구항 71

대상체에서 질병을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 방법은 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물 중 하나 이상을 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 또는 둘 모두가, 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 키메라 RNA 분자, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 조성물이 국소, 경구 투여되거나 주사되는 방법.

청구항 73

제71항 또는 제72항에 있어서, 대상체가 척추동물인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 척추동물이 포유류, 예컨대 인간인 방법.

청구항 75

대상체에서 질병을 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물로서, 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 또는 둘 모두가, 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물.

청구항 76

대상체에서 질병을 예방하거나 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터, 제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물의 용도로서, 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 또는 둘 모두가, 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는 용도.

청구항 77

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자, 제40항 내지 제44항 또는 제50항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제45항 또는 제46항의 벡터,

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포, 제59항의 추출물, 또는 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항의 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 새로운 이중 가닥 RNA(dsRNA) 구조 및 유전자 침묵화에서 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] RNA 침묵화는 진핵 생물에서 진화적으로 보존된 유전자 침묵화 기전으로서, 이는 헤어핀 구조 RNA(hairpin structured RNA; hpRNA)로 명명되는 형태일 수 있는 이중-가닥 RNA(double-stranded RNA; dsRNA)에 의해 유도된다. 기본 RNA 침묵화 경로에서, dsRNA는 다이스 단백질에 의해 짧은 20개 내지 25개 뉴클레오타이드(nt)의 작은 RNA 이중체로 가공되고, 이 중 하나의 가닥이 아르고나트(Argonaute; AGO) 단백질에 결합하여 RNA-유도 침묵화 복합체를 형성한다. 이러한 침묵화 복합체는 상보적 단일-가닥 RNA를 찾고 결합하도록 가이드로서 작은 RNA를 사용하고, 여기서 AGO 단백질은 RNA를 절단하여 이의 분해를 일으킨다.

[0003] 식물에는 마이크로RNA(miRNA), 트랜스-작용 소간섭 RNA(tasiRNA), 반복-관련 siRNA(rasiRNA) 및 외인성(바이러스 및 트랜스유전자) siRNA(exosiRNA) 경로를 포함하여 여러 RNA 침묵화 경로가 존재한다. miRNA는 MIR 유전자로부터 RNA 폴리머라제 II에 의해 전사된 짧은 줄기-루프 전구체 RNA로부터 다이스-유사 1(DCL1)에 의해 핵에서 가공되는 20 nt 내지 24 nt의 작은 RNA이다. tasiRNA는 miRNA-절단 TAS RNA 단편에서 RNA-의존적 RNA 폴리머라제 6(RDR6)에 의해 합성된 긴 dsRNA의 DCL4 가공으로부터 얻어진 크기가 주로 21 nt인 위상적 siRNA이다. 24-nt rasiRNA는 DCL3에 의해 가공되고, 전구체 dsRNA는 게놈에서 반복적 DNA로부터의 RDR2 및 식물-특이적 DNA-의존적 RNA 폴리머라제 IV(PolIV)의 조합된 기능에 의해 생성된다. exosiRNA 경로는 tasiRNA 및 rasiRNA 경로와 중복되고, DCL4와 DCL3 둘 모두 exosiRNA 가공에 관여한다. DCL1, DCL3 및 DCL4 외에, 모델 식물 *아라비도시스 탈리아나* 및 기타 고등 식물은 22-nt exosiRNA를 포함하여 22-nt siRNA를 생성하는 DCL2 또는 등가물을 인코딩하고, 식물에서 전신성 및 전이성 유전자 침묵화에 중요한 역할을 한다. 이러한 식물들 모두는 작은 RNA는 HUA 인핸서 1(HEN1)에 의해 3' 말단 뉴클레오타이드의 2'-하이드록실 기에서 메틸화되고, 이러한 3' 말단 2'-O-메틸화는 식물 세포에서 작은 RNA를 안정화시키는 것으로 사료된다. miRNA, tasiRNA 및 exosiRNA는 동물에서 전사후 유전자 침묵화 또는 RNA의 서열-특이적 분해에 관여하는 동물 세포의 작은 RNA와 기능적으로 유사하다. 그러나, rasiRNA는 식물에 고유하며, RNA-유도 DNA 메틸화(RdDM)로 알려진 전사 유전자 침묵화 기전인, 동족 DNA에서의 드 노보 시토신 메틸화를 유도하는 기능을 한다.

[0004] dsRNA에 의해 유도된 RNA 침묵화는 다양한 진핵 생물계에서 유전자 활성을 감소시키기 위해 광범위하게 이용되었으며, 많은 유전자 침묵화 기법이 개발되었다. 상이한 유기체는 흔히 상이한 유전자 침묵화 접근법을 따른다. 예를 들어, 긴 dsRNA(적어도 100개 염기쌍 길이)는 dsRNA-유도 인터페론 반응으로 인해 포유류 세포에서 RNA 침묵화를 유도하는 데 덜 적합하므로, 포유류 세포에서는 일반적으로 더 짧은 dsRNA(30 개 미만 염기쌍)가 사용되고, 반면에 식물에서는 긴 dsRNA 줄기를 갖는 헤어핀 RNA(hpRNA)가 매우 효과적이다. 식물에서, 상이한 RNA 침묵화 경로로 인해서 인공 miRNA, 인공 tasiRNA 및 바이러스-유도 유전자 침묵화 기법과 같은 상이한 유전자 침묵화 기법이 야기되었다. 그러나, 식물에서 RNA 침묵화의 성공적인 적용은 지금까지 주로 긴 hpRNA 트랜스유전자를 사용함으로써 달성되었다. hpRNA 트랜스유전자 작제물은 전형적으로, 식물 세포에서 발현을 위해 프로모터와 전사 종결자 사이에 삽입되는 스페이서 서열(hpRNA의 루프를 형성함)에 의해 분리된 표적 유전자 서열(전사 시 hpRNA의 dsRNA 줄기를 형성함)의 완전 상보적 센스 및 안티센스 서열로 구성된 역방위 반복부로 이루어진다. 스페이서 서열은 작제물 제조 동안 박테리아에서 역방위-반복 DNA를 안정화시키는 기능을 한다. 생성된 hpRNA 전사체의 dsRNA 줄기는 DCL 단백질에 의해 siRNA로 가공되고, 이는 표적 유전자 침묵화를 유도한다. hpRNA 트랜스유전자는 작물 개량을 위해 식물에서 유전자 발현을 억제하고, 대사 경로를 변경하고, 질병 및 해충 내성을 향상시키는 데 널리 사용되어 왔으며, 현재 작물 개량에서 이러한 기술의 다수 성공적인 적용이 보고되었다(Guo et al., 2016; Kim et al., 2019).

[0005] 그러나, 최근 연구에 따르면, hpRNA 트랜스유전자는 자가-유도 전사 억제에 주어져 표적 유전자 침묵화의 안정성 및 효능을 저해하는 것으로 시사되었다. 모든 트랜스유전자는 잠재적으로 위치 또는 카피 수-의존적 전사 침묵화에 주여지지만, hpRNA 트랜스유전자는 RdDM 경로를 통해 DNA 메틸화를 자신의 서열로 유도할 수 있는 siRNA를 생성하기 때문에 고유하며, 이는 전사적 자가-침묵화를 일으킬 가능성이 있다.

[0006] dsRNA 유도된 유전자 침묵화는 유기체의 표현형 변경에 있어서 귀중한 도구인 것으로 증명되었으나, RNAi를 위해 사용될 수 있는 대안적인, 바람직하게는 개선된 dsRNA 분자가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명자들은, 본원에서 루프-말단 dsRNA(lcdRNA)라 불리는, 둘 이상의 루프 서열을 갖는 형태를 포함하여, 다중의 비-정규적으로 염기쌍을 형성하는 뉴클레오타이드 또는 염기쌍을 형성하지 않는 뉴클레오타이드, 또는 둘 모두를 포함하는 하나 이상의 이중-가닥 RNA 영역을 포함하는 RNA 분자를 생성하기 위한 신규한 설계의 유전 작제물을 구상했다. 이들 RNA 분자는 다음 특징들 중 하나 이상을 갖는다; 이들은 용이하게 합성되고, 이들은 이들을 인코딩하는 유전 작제물의 전사 시 세포에서 더 높은 수준으로 축적되고, 이들은 더 쉽게 dsRNA 구조를 형성하고 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 효율적인 침묵화를 유도하고, 이들은 식물 세포에서의 가공 시 원형 RNA 분자를 형성할 수 있다. RNA 분자는 또한 식물에 국소 적용되거나 곤충과 같은 동물에게 공급될 때 효과적이다.
- [0008] 제1 양태에서, 본 발명은 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 서로 혼성화하여 dsRNA 영역을 형성할 수 있는, 적어도 20개 인접한 뉴클레오타이드 길이의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 적어도 20개 인접한 뉴클레오타이드 길이의 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하는, 키메라 리보핵산(RNA) 분자를 제공하며, 여기서
- [0009] i) 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0010] ii) 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0011] iii) 제1 5' 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,
- [0012] iv) 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 제1 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,
- [0013] v) 전체적으로, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 약 5% 내지 약 40%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,
- [0014] vi) dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,
- [0015] vii) RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,
- [0016] viii) RNA 분자 또는 적어도 일부 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있고,
- [0017] ix) RNA 분자는 시험관내 또는 세포에서 또는 둘 다에서 전사에 의해 효소적으로 제조될 수 있다.
- [0018] 제1 양태의 바람직한 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 1000개 리보뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 200개 리보뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 50개 리보뉴클레오타이드, 또는 적어도 10개 뉴클레오타이드, 또는 10개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드, 또는 10개 내지 200개 리보뉴클레오타이드, 또는 10개 내지 50개 리보뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 서열이 RNA의 단일 인접 가닥에 포함되도록 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 또는 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결된다. 또 다른 구현예에서, 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 서열이 RNA의 단일 인접 가닥에 포함되도록 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에, 또는, 바람직하게는 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결된다.

- [0019] 가장 간단한 형태로, 이러한 RNA 분자는 헤어핀 RNA(hpRNA)로 지칭된다. 보다 바람직한 구현예에서, dsRNA의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드의 약 5% 내지 약 40%가 전체적으로 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하고, 보다 바람직하게는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한다. 즉, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 모든 리보뉴클레오타이드는 정규 염기쌍 또는 비-정규 염기쌍에서 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드에 염기쌍을 형성하고, 이에 의해 dsRNA는 일부 비-정규 염기쌍을 비롯하여 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 따라서 dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 본 발명의 hpRNA의 보다 바람직한 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA의 영역에 완전 상보적이다. 이러한 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 hpRNA에서의 표적 RNA의 영역에서의 C 뉴클레오타이드를 U 뉴클레오타이드로 대체함으로써 표적 RNA의 영역에 대해 서열이 상이하다. 이러한 분자는 실시예 6 내지 실시예 11에서 G:U 염기쌍을 포함하는 헤어핀 RNA에서 예시된다. 바람직한 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 길이는 20개 내지 약 1000개 뉴클레오타이드, 또는 20개 내지 약 500개 뉴클레오타이드, 또는 본원에 기재되는 바와 같은 다른 길이이다. 더욱 바람직하게는, hpRNA는 식물 세포 또는 진균 세포에서 생성되거나, 이로 도입된다. 이러한 구현예에서, 표적 RNA는 세포에서 내인성 유전자의, 또는 식물 병원체의, 또는 해충과 같은 유해물의 전사체일 수 있다.
- [0020] 더욱 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하고, 이에 따라 ledRNA 구조를 형성한다. 대안적인 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하고, 이에 따라 ledRNA 구조를 형성한다.
- [0021] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 서로 혼성화하여 제2 dsRNA를 형성할 수 있고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되거나 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 또는 선택적으로 포함하고, 이에 따라 ledRNA 구조를 형성한다. 추가의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 연결되고, 이에 의해 제1 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고, RNA 분자는, 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이의 루프 서열을 포함하고 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 공유 연결되거나 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 제2 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 추가로 또는 선택적으로 포함하고, 이에 따라 ledRNA 구조를 형성한다. 보다 바람직한 구현예에서, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열 각각은, RNA 분자가 존재하는 경우, 적어도 20개 인접한 뉴클레오타이드 길이를 포함한다. 이러한 구현예에서, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자와 서열 관련성이 없거나 표적 RNA 분자와 서열 관련성이 있는 개입 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 공유 연결될 수 있거나, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 리보뉴클레오타이드 서열 없이 공유 연결된다. 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자와 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 하나의 인접한 센스 리보뉴클레오타이드 영역을 형성할 수 있다. 추가의 구현예에서, 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체와 서열 관련성이 없거나 표적 RNA 분자와 서열 관련성이 있는 개입 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 공유 연결될 수 있거나, 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 리보뉴클레오타이드 서열 없이 공유 연결된다. 제1 및 제2 안

티센스 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체와 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 하나의 인접한 안티센스 리보뉴클레오타이드 영역을 형성할 수 있다. 이들 구현예에서, RNA 분자는 염기쌍 형성에 의해 혼성화하는 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 바람직하게는 전체적으로 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오타이드가 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고, 바람직하게는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성하며, 제2 dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않으며, RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성한다.

- [0022] 가장 바람직한 구현예에서, RNA 분자 내의 전체 및 각 dsRNA 영역으로서 RNA 분자를 고려하여, 염기쌍 형성에 의해 혼성화하는 각 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 이의 대응하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오타이드는 전체적으로 비-정규 염기쌍에서 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고, 전체로서 RNA 분자는 임의의 이의 dsRNA 영역에서 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고, RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내에서 가공될 수 있고, 이에 의해 각 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성한다.
- [0023] 바람직한 구현예에서, 각각의 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 독립적으로 4개 내지 약 2000개 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 4개 내지 약 1200개 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게는 4개 내지 약 200개 뉴클레오타이드 길이 및 가장 바람직하게는 4개 내지 약 50개 뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더 서열 또는 3' 트레일러 서열, 또는 둘 모두를 추가로 포함한다.
- [0024] 제2 양태에서, 본 발명은 서로 혼성화하여 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하는, 키메라 리보핵산(RNA) 분자를 제공한다,
- [0025] i) 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0026] ii) 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0027] iii) 제1 5' 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,
- [0028] iv) 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 제1 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,
- [0029] v) 전체적으로, 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 약 5% 내지 약 40%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,
- [0030] vi) dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,
- [0031] vii) RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,
- [0032] viii) RNA 분자 또는 적어도 일부 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있고,
- [0033] ix) RNA 분자는 시험관내 또는 세포에서 또는 둘 다에서 전사에 의해 효소적으로 제조될 수 있다.
- [0034] 당업자가 알고 있는 바와 같이, 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 길이가 20개 미만의 인접한 뉴클레오타이드인 것 이외에, 제1 양태에 관한 각각의 구현예는 제2 양태에 적용된다.
- [0035] 제3 양태에서, 본 발명은 제1 RNA 성분, 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분 및 선택적으로, (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오타이드 서열, (ii) 5' 리더 서열 및 (iii) 3' 트레일러 서열 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 리보핵산(RNA) 분자를 제공하며,
- [0036] 제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고, 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 20개의

인접한 리보뉴클레오타이드의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제1 루프 서열 및 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 혼성화하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역과 혼성화될 수 있고,

[0037] 제2 RNA 성분은, 연결 리보뉴클레오타이드 서열이 존재하는 경우 이를 통해 또는 연결 리보뉴클레오타이드 서열이 존재하지 않는 경우 직접적으로, 제1 5' 리보뉴클레오타이드 또는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고,

[0038] 제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고, 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제2 루프 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 RNA 분자에서 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 혼성화하고,

[0039] 5' 리더 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성되고,

[0040] 3' 트레일러 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성된다.

[0041] 제4 양태에서, 본 발명은 제1 RNA 성분, 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분 및 선택적으로, (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오타이드 서열, (ii) 5' 리더 서열 및 (iii) 3' 트레일러 서열 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 RNA 분자를 제공하며,

[0042] 제1 RNA 성분은, 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고, 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제1 루프 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 각각 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성됨으로써 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드는 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드와 전체적으로 염기쌍을 형성하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 또는 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자의 제1 영역 또는 그 상보체 각각 또는 둘 다와 서열이 동일하고,

[0043] 제2 RNA 성분은 연결 리보뉴클레오타이드 서열이 존재하는 경우 이를 통해, 제1 5' 리보뉴클레오타이드 또는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고,

[0044] 제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되고, 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제2 루프 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 염기쌍을 형성하고,

[0045] 5' 리더 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성되고,

[0046] 3' 트레일러 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우에는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성된다.

[0047] 상기 양태들의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 키메라 RNA 분자이다.

[0048] 제5 양태에서, 본 발명은 제1 RNA 성분 및 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분을 포함하는 키메라 RNA 분자를 제공하며,

[0049] 제1 RNA 성분은 제1 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하고, 이는 서로 혼성화하여 제1 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및 제1 센스 리보뉴클레오타이드

서열과 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 적어도 4개 뉴클레오타이드의 제1 개입 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고,

- [0050] 제2 RNA 성분은 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 공유 연결하는 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제2 개입 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 RNA 분자에서 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 혼성화하고,
- [0051] 제1 RNA 성분에서,
- [0052] i) 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0053] ii) 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0054] iii) 제1 5' 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,
- [0055] iv) 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 제1 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,
- [0056] v) 전체적으로, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오타이드는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,
- [0057] vi) 제1 dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,
- [0058] 키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,
- [0059] (a) 키메라 RNA 분자 또는 적어도 일부의 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있거나,
- [0060] (b) 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체 영역과 서열이 적어도 50% 동일한, 바람직하게는 서열이 적어도 90% 또는 100% 동일한, 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 서열을 포함하거나,
- [0061] (c) (a) 및 (b) 둘 다이다.
- [0062] RNA 분자가 제1 RNA 성분을 갖는 경우의 구현예에서, 제1 RNA 성분의 제1 5' 리보뉴클레오타이드 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드는 서로에 대해 염기쌍을 형성한다. 그 염기쌍은 제1 RNA 성분의 자가-혼성화에 의해 형성되는 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍으로 본원에서 정의된다. 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열이 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되고 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 구현예에서, 제1 5' 리보뉴클레오타이드는 센스 서열 및 안티센스 서열 중 하나에 직접 연결되고, 제1 3' 리보뉴클레오타이드는 센스 서열 및 안티센스 서열 중 다른 하나에 직접 연결된다.
- [0063] 바람직한 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드는 모두 표적 RNA 분자의 제1 영역의 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성할 수 있다. 이러한 맥락에서, 염기쌍 형성은, 예를 들어, 적어도 일부 G:U 염기쌍을 갖는 정규 또는 비-정규일 수 있다. 각 G:U 염기쌍에 대해 독립적으로, G는 표적 RNA 분자의 제1 영역 또는 바람직하게는 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 있을 수 있다. 대안적으로, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드가 표적 RNA 분자의 제1 영역의 뉴클레오타이드와 모두 염기쌍을 형성하는 것은 아니다. 예를 들어, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 중 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개가 표적 RNA 분자의 제1 영역과 염기쌍을 형성하지 않는다. 하나의 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되거나, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되거나, 둘 다이다.
- [0064] 상기 양태의 구현예에서, RNA 분자는 하나 이상의 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 적어도 부분적으로 표적 RNA 분자의 영역 또는 그 상보체와 동일한, 표적 RNA 분자와 서열이 관련된다. 바람직한 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 제1 및 제2 RNA 성분에서의 센스 서열과 함께 하나의 인접한 센스 서열의 일부를 형성하거나, 제1 및 제2 RNA 성분에서의 안티센스 서열과 함께 하나의 인접한 안

티센스 서열의 일부를 형성한다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 20개 미만의 리보뉴클레오타이드이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자와 혼성화된다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체의 일부와 동일하다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 1개 내지 10개의 리보뉴클레오타이드이다.

[0065] 상기 양태의 구현예에서, RNA 분자는 (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오타이드 서열, (ii) 5' 연장 서열 및 (iii) 3' 연장 서열 중 하나 이상 또는 전부를 포함하며, 각각, 5' 연장 서열은, 존재하는 경우, 제1 RNA 성분에 또는 제2 RNA 성분에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성되고, 3' 연장 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분에 또는 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 하나의 구현예에서, 제1 RNA 성분 및 제2 RNA 성분은 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 통해 공유 연결된다. 대안적인 구현예에서, 제1 RNA 성분 및 제2 RNA 성분은 임의의 연결 리보뉴클레오타이드 서열의 존재 없이 직접 연결된다.

[0066] 제1 내지 제5 양태의 구현예에서, RNA 분자는 각각 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 동일한 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, RNA 분자는 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 염기쌍을 형성한 하나 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 하나 이상의 안티센스 서열은 표적 분자의 영역과 상보적이고, 바람직하게는 전체적으로 상보적이다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 동일하며, 이는 표적 RNA 분자에서 인접할 수도 인접하지 않을 수도 있다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 동일하다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 루프 서열을 갖지 않는다, 즉, 이들은 표적 RNA 분자 대비 인접해 있다.

[0067] 제1 내지 제5 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및 이와 염기쌍을 형성한 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이 안티센스 서열은 각각 표적 RNA 분자의 영역과 상보적이거나, 바람직하게는 완전히 상보적이다. 이들이 상보적인 표적 RNA 분자의 영역은 표적 RNA 분자에서 인접할 수도 인접하지 않을 수도 있다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 상보적이다. 하나의 구현예에서, 제2의 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 제1의 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 상보적이다. 바람직한 구현예에서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 루프 서열을 갖지 않는다, 즉 이들은 표적 RNA 분자의 상보체 대비 인접해 있다. 바람직한 구현예에서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 센스 리보뉴클레오타이드 서열 중 하나 또는 둘 다는 정규 염기쌍을 통해, 또는 일부 정규 및 일부 비-정규 염기쌍, 바람직하게는 G:U 염기쌍을 통해 이의 전장을 따라 염기쌍을 형성한다.

[0068] 제1 내지 제5 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 단일 가닥의 리보뉴클레오타이드이다. 가장 간단한 형태로, 5' 말단, RNA 분자는 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오타이드에 걸쳐 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 개입 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 헤어핀 RNA(hpRNA) 구조를 포함한다. RNA 분자는 5'-리더 서열 및/또는 3'-트레일러 서열을 포함할 수 있다. 다른 형태에서, RNA 분자는 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오타이드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 5'에서 3'으로의 순서는 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 이어서 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열일 수 있거나, 반대일 수 있다. 하나의 구현예에서, 5' 말단에서의 리보뉴클레오타이드 및 3' 말단에서의 리보뉴클레오타이드는 인접해있고, 각각 염기쌍을 형성하며, 직접 공유 결합되지 않고, 예를 들어 도 1을 참고한다.

[0069] 제1 내지 제5 양태의 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 표적 RNA의 제1 영역과 혼성화되는 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 표적 RNA의 제2 영역과 혼성화되는 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 표적 RNA의 제2 영역은 표적 RNA의 제1 영역과 상이하고, RNA 분자는 표적 RNA와 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 단 하나의 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 2개의 안티센스 서열은 RNA 분자에서 인접하지 않다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA의 제1 및 제2 영역은 표적 RNA에서 인접해 있다. 대안적으로, 이들은 인접하지 않다.

[0070] 제1 내지 제5 양태의 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 표적 RNA의 제1 영역과 적어도 60% 동일한 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 표적 RNA의 제2 영역과 적어도 60% 동일한 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 표적 RNA의 제2 영역은 표적 RNA의 제1 영역과 상이하고, RNA 분자는 표적 RNA와 혼성화되는 단 하나의 안티센스

리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 2개의 센스 서열은 RNA 분자에서 인접하지 않다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA의 제1 및 제2 영역은 표적 RNA 분자에서 인접해 있다. 대안적으로, 이들은 인접하지 않다. 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 각각 독립적으로, 표적 RNA의 각각의 영역과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일하다, 즉, 제1 센스 서열은 그 표적 영역과 적어도 70% 동일할 수 있고 제2 서열은 그 표적 서열과 적어도 80% 동일할 수 있는 등이다.

[0071] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오타이드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오타이드이다. 보다 바람직한 구현예에서, RNA 분자에서의 염기쌍 형성이 일부 비-정규 염기쌍, 가장 바람직하게는 일부 G:U 염기쌍이 포함되는 적어도 21개의 인접한 염기쌍 길이인 이중-가닥 영역에 포함되며, 이중-가닥 영역은 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0072] 제3 및 제4 양태의 바람직한 구현예에서, 제2 RNA 성분은 다음을 특징으로 한다:

[0073] i) 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제3 RNA 서열 및 제3 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되며,

[0074] ii) 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제3 5' 리보뉴클레오타이드, 제4 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되고,

[0075] iii) 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 제2 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,

[0076] iv) 제3 3' 리보뉴클레오타이드는 제3 5' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,

[0077] 키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성한다. 가장 바람직하게는, 제2 안티센스 서열로부터 생성된 asRNA 분자는 제1 RNA 성분의 제1 안티센스 서열로부터 생성된 asRNA 없이 또는 이와 함께, 표적 RNA의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0078] 제5 양태의 바람직한 구현예에서, 제2 RNA 성분은 다음을 특징으로 한다:

[0079] i) 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제3 5' 리보뉴클레오타이드, 제3 RNA 서열 및 제3 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되며,

[0080] ii) 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제4 5' 리보뉴클레오타이드, 제4 RNA 서열 및 제4 3' 리보뉴클레오타이드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드로 구성되고,

[0081] iii) 제3 5' 리보뉴클레오타이드는 제4 3' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,

[0082] iv) 제3 3' 리보뉴클레오타이드는 제3 5' 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성하고,

[0083] 키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오타이드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성한다.

[0084] 상기 바람직한 구현예의 각각에서, 전체적으로 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및/또는 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및/또는 혼성화하는 각 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 이의 대응하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오타이드가 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고/않거나 dsRNA 영역이 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는 상보적 센스 및 안티센스 서열 사이에서 형성되는 것이 보다 바람직하다. 보다 바람직하게는, 전체적으로 바람직하게는 RNA 분자에서 모든 dsRNA 영역에 대해, 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 이의 대응하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 21%, 약 24%, 약 27%, 약 30%, 10% 내지 30%, 또는 15% 내지 30%, 또는 보다 더 바람직하게는 16% 내지 25%의 리보뉴클레오타이드는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는다. 보다 더욱 바람직하게는, 전체적으로 RNA 분자에서 dsRNA 영역(들)의 리보뉴클레오타이드의 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 21%, 약 24%, 약 27%, 약 30%, 10% 내지 30%, 또는 15% 내지 30%, 또는 보다 더 바람직하게는 16% 내지 25%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하며 RNA 분자에서 dsRNA 영역(들)의 모든 다른 리보뉴클레오타이드는 정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성한다. 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 dsRNA 영역, 또는 전체 중 모든 dsRNA 영역에서 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%,

적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 가장 바람직하게는, 이들 구현예에서,

- [0085] (a) 키메라 RNA 분자 또는 적어도 일부의 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있거나,
- [0086] (b) 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 RNA 분자 내의 모든 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체의 영역과 서열이 적어도 50% 동일한, 바람직하게는 표적 RNA 분자의 상보체의 영역과 적어도 60% 동일한, 보다 바람직하게는 적어도 70% 동일한, 보다 더 바람직하게는 적어도 80% 동일한, 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일한 또는 100% 동일한, 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 서열을 포함하거나,
- [0087] (a) 및 (b) 둘 다이다.
- [0088] 제1 내지 제5 양태의 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더 서열 또는 5' 연장 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더/연장 서열 및 3' 트레일러/연장 서열을 둘 다 포함한다.
- [0089] 제1 내지 제5 양태의 하나의 구현예에서, RNA 분자의 각각의 리보뉴클레오타이드는 2개의 다른 뉴클레오타이드에 공유 연결된다, 즉, 공유 폐쇄된 원이다. 대안적으로, RNA 분자는 덤벨 모양(도 1)으로 나타낼 수 있지만, 이중-가닥 구조의 한 부분에 겹 또는 닉(nick)을 가질 수 있다.
- [0090] 제1 내지 제5 양태의 하나의 구현예에서, RNA 분자의 루프 서열 중 적어도 하나의 또는 전부는 20개 뉴클레오타이드보다 길다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 루프 중 적어도 하나는 4개 내지 1,200개 리보뉴클레오타이드 길이, 또는 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 보다 바람직한 구현예에서, 루프는 모두 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 보다 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 루프 중 적어도 하나는 4개 내지 200개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 루프는 모두 4개 내지 200개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 루프 중 적어도 하나는 4개 내지 50개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 가장 바람직한 구현예에서, 루프는 모두 4개 내지 50개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 구현예에서, 루프의 최소 길이는 20개 뉴클레오타이드, 30개 뉴클레오타이드, 40개 뉴클레오타이드, 또는 50개 뉴클레오타이드이다. 하나의 구현예에서, 진핵 세포는 척추동물 세포 또는 식물 세포이고, RNA 분자의 각각의 루프는 독립적으로 20개 내지 50개 리보뉴클레오타이드, 또는 20개 내지 40개 리보뉴클레오타이드 또는 20개 내지 30개 리보뉴클레오타이드 길이이다.
- [0091] 바람직한 구현예에서, RNA 분자에서 적어도 하나의 루프 서열은, 예를 들어, 진핵 세포의 miRNA 또는 다른 조절 RNA와 같이 진핵 세포에 내인성인 RNA 분자에 상보적인 하나 이상의 결합 서열을 포함한다. 용이하게 이해될 바와 같이, 이러한 특징은 임의의 루프 길이 특징, 비-정규 염기쌍 형성 및 RNA 분자에 대해 상술된 임의의 다른 특징과 조합될 수 있다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 루프 서열은 miRNA에 대한 다중 결합 서열, 또는 다중 miRNA에 대한 결합 서열, 또는 이 둘 모두를 포함한다. 하나의 구현예에서, RNA 분자에서 적어도 하나의 루프 서열은 폴리펩타이드 또는 기능성 폴리뉴클레오타이드를 인코딩하는 개방 해독틀을 포함한다. 개방 해독틀은 바람직하게는 번역 개시 서열에 조작 가능하게 연결되고, 이에 의해 개방 해독틀은 관심 진핵 세포에서 번역될 수 있다. 예를 들어, 번역 개시 서열은 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함하거나, 이에 포함된다. IRES는 바람직하게는 진핵 IRES이다. 번역된 폴리펩타이드는 바람직하게는 50개 내지 400개 아미노산 잔기 길이, 또는 50개 내지 300개 또는 50개 내지 250개, 또는 50개 내지 150개 아미노산 잔기 길이이다. 이러한 RNA 분자는, 식물 세포에서 생산될 때, 루프 서열의 대부분 또는 전부를 포함하는 원형 RNA 분자를 형성하도록 가공될 수 있고, 이는 고수준의 폴리펩타이드를 제공하도록 번역될 수 있다.
- [0092] 제1 내지 제5 양태의 구현예에서, RNA 분자는 이중-가닥 영역에 볼록부(bulge)가 없거나, 1개 또는 2개 이상의 볼록부(bulge)를 갖는다. 상기 맥락에서, 볼록부는 dsRNA 영역에서 염기쌍을 형성하지 않고 dsRNA 영역 중 상보적 서열에서의 대응 위치에 미스매치된 뉴클레오타이드를 갖지 않는, 센스 또는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에서의 하나의 뉴클레오타이드, 또는 2개 이상의 인접한 뉴클레오타이드이다. RNA 분자의 dsRNA 영역은 센스 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다 내에서 2개 또는 3개 초과 뉴클레오타이드의 서열을 포함할 수 있고, 이는 dsRNA 구조가 형성되는 경우 dsRNA 영역에서 루프로 튀어나온다. 루프가 튀어나오는 서열은 자체가 일부 내부 염기쌍을 형성할 수 있고, 예를 들어 자체가 줄기-루프 구조를 형성할 수 있다.
- [0093] 제1 내지 제5 양태의 구현예에서, RNA 분자는 이중-가닥 영역에 볼록부(bulge)가 없거나, 1개 또는 2개 이상의

볼록부(bulge)를 갖는다. 상기 맥락에서, 볼록부는 dsRNA 영역에서 염기쌍을 형성하지 않고 dsRNA 영역 중 상보적 서열에서의 대응 위치에 미스매치된 뉴클레오타이드를 갖지 않는, 센스 또는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에서의 하나의 뉴클레오타이드, 또는 2개 이상의 인접한 뉴클레오타이드이다. RNA 분자의 dsRNA 영역은 센스 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다 내에서 2개 또는 3개 초과 뉴클레오타이드의 서열을 포함할 수 있고, 이는 dsRNA 구조가 형성되는 경우 dsRNA 영역에서 루프로 튀어나온다. 루프가 튀어나오는 서열은 자체가 일부 내부 염기쌍을 형성할 수 있고, 예를 들어 자체가 줄기-루프 구조를 형성할 수 있다.

[0094] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 3개, 또는 4개 이상의 루프를 갖는다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 2개의 루프만을 갖는다. 하나의 구현예에서, RNA 분자의 제1 이중-가닥 영역, 또는 제1 및 제2 dsRNA 영역, 또는 모든 dsRNA 영역은 이중-가닥 영역에서 염기쌍을 형성하지 않는 1개, 또는 2개 이상의 뉴클레오타이드, 또는 독립적으로, 염기쌍을 형성하지 않는 이중-가닥 영역 내 최대 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0095] 제1 내지 제5 양태의 바람직한 구현예에서, 표적 RNA 분자 또는 본 발명의 RNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에 있다. 예를 들어, 진핵 세포는 식물 세포, 동물 세포 또는 진균 세포일 수 있다. 하나의 구현예에서, 진핵 세포는, 예를 들어, 하나 이상의 식물 종, 예를 들어, *푸사리움* 종, *베르티실리움* 종 또는 밀두균병을 일으키는 진균의 진균 병원체의 세포와 같은 진균 세포이다. 하나의 구현예에서, 진핵 세포는 절지동물 세포, 예를 들어, 곤충 세포이다. 바람직한 곤충은 진디와 같은 수액 흡입 곤충이다. 예를 들어, 곤충은 인시목 곤충, 딱정벌레목 곤충 또는 쌍시류 곤충일 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 세포, 예를 들어 박테리아 세포 또는 다른 미생물 세포에서 생성되며, 이는 표적 RNA를 포함하는 세포와 상이하다. 바람직한 구현예에서, 미생물 세포는 RNA 분자가 RNA 분자를 인코딩하는 유전 작체물로부터 전사에 의해 생성되는 세포이고, 여기서 RNA 분자는 하나 이상의 루프 서열, 하나 이상의 dsRNA 영역, 또는 이 둘 모두 내에서 절단에 의해 미생물 세포에서 실질적으로, 또는 바람직하게는 우선적으로 가공되지 않는다. 예를 들어, 미생물 세포는 효모 세포 또는 다이스 효소를 갖지 않는 또 다른 진균 세포이다. RNA 분자의 생성을 위한 매우 바람직한 세포는 *사카로마이세스 세레비지에* 세포이다. 미생물 세포는 살아있을 수 있거나, 열 처리와 같은 어떠한 처리에 의해 사멸되었을 수 있거나, 건조 분말의 형태일 수 있다. 유사하게, 하나의 구현예에서 본 발명의 RNA 분자는 본 발명의 RNA 분자가 생성되는 경우 표적 RNA를 포함하지 않는 진핵 세포에서 생성되지만, 본 발명의 RNA 분자 및/또는 그 가공 RNA 산물을 포함하는 진핵 세포는, 예를 들어 표적 RNA가 바이러스 RNA 또는 다른 도입된 RNA인 경우, 표적 RNA에 대한 숙주가 될 수 있다. 이러한 세포는 바이러스 또는 다른 도입된 RNA에 대해 예방적으로 보호될 수 있다.

[0096] 제1 내지 제5 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 시험관내 또는 세포에서 또는 둘 다에서 전사에 의해 효소적으로 제조될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 세포에서 발현된다, 즉 RNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 핵산으로부터의 전사에 의해 세포에서 생성된다. RNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 핵산은 바람직하게는 DNA 분자이며, 이는 세포에서 벡터 상에 존재하거나 세포의 게놈 내로 세포의 핵 게놈 또는 세포의 원형자 DNA에 통합될 수 있다. RNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 핵산은 또한 바이러스 벡터와 같은 RNA 분자일 수 있다.

[0097] 따라서 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 RNA 분자를 포함하는 세포를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 세포에서 발현되었고 세포로부터 단리되고/되거나 정제된, 본원에서 기재되는 RNA 분자를 제공한다. 따라서 본 발명은 제1 내지 제5 양태 중 하나 이상 그리고 그러한 맥락에서 기술된 구현예 중 임의의 것에 따른 단리된 RNA 분자의 제조물을 제공하며, 이는 표적 RNA를 포함하거나 표적 RNA를 포함할 수 있는 세포에 대한 투여에 적합하다.

[0098] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 표적 RNA는 단백질을 인코딩한다. 대안적으로, 하나 이상의 표적 RNA, 예컨대 rRNA, tRNA, snoRNA 또는 miRNA는 단백질을 인코딩하지 않는다.

[0099] 제1 내지 제5 양태의 구현예에서, 전체적으로 dsRNA 영역을 형성하는 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 이의 대응하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드의 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 21%, 약 24%, 또는 약 15% 내지 약 30%, 또는 바람직하게는 약 16% 내지 약 25%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자에서 하나의 dsRNA 영역, 또는 모든 dsRNA 영역에서 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 각각의 G:U 염기쌍에서 G 뉴클레오타이드는 독립적으로 센스 리보뉴클레오타이드 서열 또는 바람직하게는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 있을 수 있다. dsRNA 영역의 G:U 염기쌍에서 G 뉴클레오타이드에 관하여, 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 60% 또는 70%, 보다 더 바람직하게는 적어도 80%

또는 90%가 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 있고, 가장 바람직하게는 이의 적어도 95%가 dsRNA 영역에서 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 있다. 상기 특징은 RNA 분자에서 하나 이상 또는 모든 dsRNA 영역에 독립적으로 적용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 전체적으로 RNA 분자에서 하나의 dsRNA 영역에서 또는 모든 dsRNA 영역에서, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만, 보다 바람직하게는 1% 미만의 리보뉴클레오타이드는 염기쌍을 형성하지 않거나 가장 바람직하게는 염기쌍을 형성하지 않는 리보뉴클레오타이드가 없다. 바람직한 구현예에서, 전체적으로 하나의 dsRNA 영역 또는 dsRNA 영역들에서 4개 내지 6개 리보뉴클레오타이드 당 하나씩은 RNA 분자 내에서 비-정규 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 전체적으로 하나의 dsRNA 영역 dsRNA 영역들은 10개 또는 9개 또는 바람직하게는 8개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 대안적인 구현예에서, dsRNA 영역은 적어도 8개의 인접한 정규 염기쌍, 예를 들어 8개 내지 12개 또는 8개 내지 14개 또는 8개 내지 10개의 인접한 정규 염기쌍을 포함한다. 바람직한 구현예에서, dsRNA 영역, 또는 RNA 분자 내의 모든 dsRNA 영역에서 모든 리보뉴클레오타이드는 정규 염기쌍 또는 비-정규 염기쌍과 염기쌍을 형성한다. 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 또는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드, 또는 둘 다는 염기쌍을 형성하지 않는다. 하나의 구현예에서, 각각의 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 및 각각의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드는 본 발명의 RNA 분자에서 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0100] 하나의 구현예에서, 하나 이상 또는 모든 RNA 분자의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자 영역의 상보체 또는 2개의 이러한 영역과 서열이 100% 미만이 동일하거나, 약 80% 내지 99.9% 동일하거나, 약 90% 내지 98% 동일하거나, 약 95% 내지 98% 동일하거나, 바람직하게는 98% 내지 99.9% 동일하며, 이는 표적 RNA 분자에서 인접할 수도 인접하지 않을 수도 있다. 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 안티센스 RNA 서열은 표적 RNA 분자의 상보체 영역과, 예를 들어 21개, 23개, 25개, 27개, 30개, 또는 32개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함하는 영역과 서열이 100% 동일하다. 하나의 구현예에서, 센스 또는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 둘 모두는 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 약 100개, 적어도 약 200개, 적어도 약 300개, 적어도 약 400개, 적어도 약 500개, 적어도 약 600개, 적어도 약 700개, 적어도 약 800개, 적어도 약 900개, 적어도 약 1,000개, 또는 약 100개 내지 약 1,000개의 인접한 뉴클레오타이드 길이이다. 식물 세포 또는 진균 세포에서, 또는 비-척추동물 세포를 위해 RNA 분자를 사용하는 경우, 적어도 100개 뉴클레오타이드 길이가 바람직하다. 척추동물 세포에서 RNA 분자를 사용하는 경우, dsRNA에서의 센스 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에 있어서 50개 이하 뉴클레오타이드, 예를 들어 31개 내지 50개 뉴클레오타이드 길이가 바람직하다. 그러나, dsRNA 영역에서 50개 초과 염기쌍, 예를 들어, 최대 100개 또는 심지어 200개의 염기쌍을 갖는 RNA 분자는, dsRNA 영역이 dsRNA 영역에서 G:U 염기쌍 중 염기쌍을 형성한 뉴클레오타이드를 10% 내지 30% 갖는 한, 척추동물 세포에서 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열에서의 리보뉴클레오타이드 수는 이것이 혼성화되는 대응하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에서의 리보뉴클레오타이드 수의 약 90% 내지 약 110%, 바람직하게는 95% 내지 105%, 보다 바람직하게는 98% 내지 102%, 보다 더 바람직하게는 99% 내지 101%이다. 가장 바람직한 구현예에서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열에서의 리보뉴클레오타이드 수는 대응하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열에서의 리보뉴클레오타이드 수와 동일하다. 이러한 특징은 RNA 분자에서 각각의 dsRNA 영역에 적용될 수 있다.

[0101] 제1 내지 제5 양태의 구현예에서, RNA 분자에서 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드는 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드, 또는 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드, 또는 바람직하게는 4개 내지 200개 리보뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 4개 내지 50개 리보뉴클레오타이드로 구성되는 루프 서열에 의해 공유 연결된다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 또는 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 또는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. 상기 구현예에서, RNA 분자는 혼성화하여 RNA 분자를 형성하는 2개의 별도 가닥의 RNA를 포함하지만, 이는 단일 RNA 전사체로서 핵산 분자로부터의 전사에 의해 생성된 후 2개의 RNA 가닥을 포함하도록 가공되었을 수 있다.

[0102] 임의의 인트론을 스플라이싱해낸 후 그러나 다이스 효소 또는 다른 RN아제에 의한 RNA 분자의 임의의 가공 전에, 단일 가닥의 RNA로서 생성되는 본 발명의 RNA 분자의 전반적 길이는 전형적으로 50개 내지 2000개 리보뉴클레오타이드, 바람직하게는 60개 또는 70개 내지 2000개 리보뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 80개 또는 90개 내지 2000개 리보뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 100개 또는 110개 내지 2000개 리보뉴클레오타이드이다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 최소 길이는 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 180개, 또는 200개 뉴클레오타이드이고, 최대 길이는 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1200개, 1400개, 1500개 또는 2000개 리보뉴클레오타이드이다. 이들 언급된 최소 및 최대 길이의 각각의 조합이 고려된다. 표적 RNA 분자가 하향-조

절되어야 하는 시험관내 또는 세포, 예컨대 박테리아 또는 다른 미생물 세포, 바람직하게는 에스. 세레비지에 세포 내, 또는 진핵 세포 내 전사에 의한 이러한 길이의 RNA 분자의 생성은 쉽게 달성된다

[0103] 제1 내지 제5 양태의 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 서열이 동일하거나 바람직하게는 상이한 2개 이상의 dsRNA 영역을 포함한다.

[0104] 제1 내지 제5 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 진핵 세포에서 발현된다, 즉 세포에서 전사에 의해 생성된다. 이러한 구현예에서, 더 큰 비율의 dsRNA 분자는 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 유사 RNA 분자의 가공과 비교되는 경우, 22개 및/또는 20개 리보뉴클레오타이드 길이의 RNA 분자의 가공에 의해 형성된다. 즉, 이들 구현예의 RNA 분자는 RNA 분자로부터 생성된 20개 내지 24개 뉴클레오타이드 asRNA의 총 수의 비율로서, 그 dsRNA 영역이 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 유사 RNA 분자보다 보다 쉽게 가공되어 22개-리보뉴클레오타이드 및/또는 20개-리보뉴클레오타이드의 짧은 안티센스 RNA를 제공한다. 상이하게 발현되면, 더 적은 비율의 dsRNA 분자는 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 유사 RNA 분자의 가공과 비교되는 경우, 23개 및/또는 21개 리보뉴클레오타이드 길이의 RNA 분자의 가공에 의해 형성된다. 즉, 이들 구현예의 RNA 분자는 RNA 분자로부터 생성된 20개 내지 24개 뉴클레오타이드 asRNA의 총 수의 비율로서, 그 dsRNA 영역이 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 유사 RNA 분자보다 덜 쉽게 가공되어 23개-리보뉴클레오타이드 및/또는 21개-리보뉴클레오타이드의 짧은 안티센스 RNA를 제공한다. 바람직하게는, 유전 작제물로부터 전사에 의해 세포에서 생성된 RNA 전사체의 적어도 50%는 다이스에 의해 가공되지 않는다. 하나의 구현예에서, RNA 분자가 진핵 세포에서 발현되는 경우, 즉, 세포 내에서 전사에 의해 생성되는 경우, RNA 분자의 가공에 의해 형성되는 더 큰 비율의 짧은 안티센스 RNA 분자는 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 유사 RNA 분자의 가공과 비교되는 경우, 5' 말단에 공유 부착된 하나 이상의 포스페이트를 갖는다. 즉, 더 큰 비율의 짧은 안티센스 RNA 분자는 겔 전기영동 실험에서 분자의 이동성 변화로 관찰될 수 있는 변경된 전하를 갖는다.

[0105] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 본원에서 기재되는 RNA 분자의 2개 이상의 특징의 조합을 포함한다.

[0106] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 RNA 분자, 바람직하게는 본원에서 기재되는 키메라 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 더 큰 DNA 분자, 예컨대 염색체 내로 통합될 수 있는 DNA 작제물이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에서 RNA 분자의 발현을 유도할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 숙주 세포는 박테리아 세포, 예컨대 대장균(*E. coli*), 진균 세포, 예컨대 효모 세포, 예를 들어, 에스. 세레비지에, 또는 진핵 세포, 예컨대 식물 세포 또는 동물 세포일 수 있다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 폴리뉴클레오타이드에 대해 이중성이다. RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 키메라 또는 제조합 폴리뉴클레오타이드, 또는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 시험관내 기능할 수 있으며, 예를 들어 박테로오파지 프로모터, 예컨대 T7 RNA 폴리머라제 프로모터 또는 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터, 예컨대 U6 프로모터 또는 H1 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 II 프로모터이며, 이는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 발생적으로 조절되는 프로모터 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에서 폴리뉴클레오타이드의 전사 동안 또는 이후 스플라이싱되어 나갈 수 있는 적어도 하나의 루프 서열에 인트론을 포함하는 RNA 전구체 분자를 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다. 하나의 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 하나의 구현예에서, 벡터는 플라스미드 벡터, 예컨대 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와의 사용에 적합한 이원성 벡터이다.

[0107] 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는, RNA 분자, 바람직하게는 hpRNA, 및 전사 종결 및/또는 폴리아데닐화 영역을 인코딩하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 숙주 세포에서 RNA 분자의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 순서대로 포함하는 키메라 DNA이다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 루프 서열 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 헤어핀 RNA 구조를 포함하고, 더욱 바람직하게는 센스 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역을 형성하고, dsRNA 영역에서 리보뉴클레오타이드의 약 5% 내지 약 40%는 비-정규 염기쌍, 바람직하게는 G:U 염기쌍에서 염기쌍을 형성한다. 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 식물 세포 또는 진균 세포이다.

[0108] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터가 진핵 숙주 세포, 바람직하게는 식물 또는 진균 세포에 있는 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자를 인코딩하는 영역과 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터의 프로모터 영역은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 인코딩하는

대응하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 프로모터와 비교되는 경우 더 낮은 메틸화 수준을 갖는다. 하나의 구현예에서, 더 낮은 메틸화 수준은 대응하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 프로모터와 비교되는 경우, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만 또는 20% 미만이다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 적어도 2개 카피의 본 발명의 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함한다. 상기 구현예에서:

- [0109] i) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성의 감소 수준은 한 카피의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 갖는 대응하는 진핵 세포 대비 적어도 동일하고/하거나,
- [0110] ii) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성의 감소 수준은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 포함하는 대응하는 세포 대비 더 낮다.
- [0111] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 본원에서 기재되는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 비-인간 세포, 예컨대 박테리아 세포, 진균 세포, 예를 들어 에스. 세레비지에 세포와 같은 효모 세포, 식물 세포 또는 비-인간 동물 세포, 바람직하게는 식물 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 세포 배양에서의 비-인간 세포 또는 인간 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 진핵 세포, 예컨대 동물 세포가 아닌 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 미생물 세포, 예컨대 원핵 세포이다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 살아있다. 대안적인 구현예에서, 숙주 세포는 죽어있거나/죽어있고 재생이 불가능하다. 숙주 세포는 RNA 분자가 전사 및/또는 가공에 의해 생성된 세포일 수 있거나, 세포는 RNA 분자가 전사 및/또는 가공에 의해 생성된 세포가 아닌 세포, 예컨대, 표적 RNA 분자를 포함하는 세포일 수 있다.
- [0112] 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 바람직하게는 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성된 작은 RNA 분자, 또는 이 둘 모두를 포함하는 식물 세포 또는 진균 세포이고, 여기서 키메라 RNA 분자는 5'에서 3'로의 순서로, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 루프 서열을 포함하는 제1 연결 리보뉴클레오티드 서열, 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0113] 다른 구현예에서, 숙주 세포는 진핵 세포이며 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키메라 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 적어도 2개 카피를 포함하며,
- [0114] i) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성의 감소 수준은 세포가 단일 카피의 폴리뉴클레오티드를 갖는 경우 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성의 감소 수준과 대략 동일하거나, 혹은 더 크며, 그리고/또는
- [0115] ii) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성의 감소 수준은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 포함하는 대응하는 세포와 비교되는 경우 더 낮은 숙주 세포.
- [0116] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNA 분자, 바람직하게는 본원에서 기재되는 키메라 RNA 분자, 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이) 또는 이를 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 비-인간 유기체, 바람직하게는 동물 또는 식물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체, 바람직하게는 식물 또는 진균은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 한 트랜스제닉이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 비-인간 유기체의 게놈 내로 안정적으로 통합된다. 본 발명은 또한 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성된 작은 RNA 분자(20nt 내지 24nt 길이), 또는 이 둘 모두, 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는, 동물 및 식물 부분, 및 이로부터 얻어진 산물, 예를 들어, 이로부터 생산된 종자, 작물, 수확된 산물 및 수확후 산물을 포함한다.
- [0117] 또 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하는 단계를 포함하는, 본 발명의 RNA 분자를 제조하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드는 RNA 분자를 인코딩하는 키메라 DNA 분자이다. 이 구현예에서, 방법은 RNA 분자를 적어도 부분적으로 정제하는 단계를 추가로 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0118] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 RNA 분자를 세포, 바람직하게는 동물 세포, 식물 또는 진균 내로 도입하여, 바람직하게는 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 이의 일부가 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합되도록 하는 단계를 포함하는, 세포 또는 비-인간 유기체, 바람직하게는 식물 세포, 식물 또는 진균을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 세포는 동물 세포, 예를 들어, 인간 세포이고, 이는 배양 중인 동물 세포일 수 있다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 세포 또는 자손 세포로부터, 예를 들어 트랜스제닉 식물을 재조합으로써 그리고 선택적으로 그로부터 자손 식물을 생성함으로써 생성된다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 세포 또는 하나 이상의 자손 세포를 비-인간 유기체 내

로 도입하여 생성된다. 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 세포 게놈 내로의 안정적 통합에 대안적으로, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 게놈 내로의 통합 없이 세포 내로 도입되어, 예를 들어 세포 또는 유기체에서 RNA 분자를 일시적으로 생성할 수 있다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체, 예를 들어, 동물 또는 식물은 유해물 또는 병원체, 예를 들어, 동물 유해물 또는 병원체, 식물 유해물 또는 병원체, 바람직하게는 해충 또는 진균 병원체에 내성이 있다. 하나의 구현예에서, 방법은 유해물 또는 병원체에 대한 내성을 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 RNA 분자를 포함하는, 하나 이상의 비-인간 유기체, 바람직하게는 식물을 시험하는 단계를 포함한다. 시험되는 비-인간 유기체, 예를 들어, 식물은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 RNA 분자가 먼저 도입된 비-인간 유기체, 바람직하게는 식물로부터의 자손일 수 있고, 따라서 방법은 이러한 자손을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 추가로 유해물 또는 병원체에 내성인 비-인간 유기체, 예를 들어, 동물 또는 식물을 확인하고/확인하거나 선택하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 각각 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 RNA 분자를 포함하는 다중 비-인간 유기체, 예를 들어, 동물 또는 식물은 유해물 또는 병원체에 내성이 있는 지를 확인하고, 확인된 비-인간 유기체, 동물 또는 식물로부터 수득된 자손에 대해 시험될 수 있다.

[0119] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포 또는 유기체 또는 이의 일부의 추출물을 제공하며, 여기서 추출물은 본 발명의 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 RNA 분자, 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 또는 본 발명의 방법에 의해 제조되는 추출물 중 하나 이상, 및 하나 이상의 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 약학 조성물, 예컨대 인간 또는 다른 동물에 대한 투여에 적합한 조성물이다. 약학 조성물은 예방 또는 질병의 치료, 또는 국소 적용, 예컨대 미용 적용에 적합할 수 있다. 하나의 구현예에서, 조성물은 식물, 바람직하게는 야외의 식물 또는 식물 집단으로의, 또는 곤충 또는 곤충 집단으로의 적용, 예를 들어 국소 분무에 적합하다. 하나의 구현예에서, 조성물은 작물에, 예를 들어 야외의 작물 식물 상에 분무하여 적용하기 적합하다.

[0120] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다를 포함하는 추출물 또는 조성물은 키메라 RNA 분자, 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터의 안정성을 증강시키는 적어도 하나의 화합물을 추가로 포함하며, 이에 의해 적어도 하나의 화합물은 RNA 분자를 보조하고, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 세포, 예컨대 유기체의 세포에 의해 섭취된다. 하나의 구현예에서, 화합물은 전달감염 촉진제, 예를 들어 지질-함유 화합물이다.

[0121] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포 또는 유기체에서 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시키거나 하향조절하는 방법을 제공하며, 방법은 세포 또는 유기체, 예를 들어 그의 일부분에 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 조성물을 전달하는 단계를 포함한다. 이러한 맥락에서, 전달은 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자, 또는 이들의 혼합, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포 또는 유기체에 공급하거나, 접촉시키거나, 노출하거나, 형질전환시키거나, 달리 도입함으로써 이루어질 수 있다. 도입은, 예를 들어, 전달감염 촉진제, DNA- 또는 RNA-결합 폴리펩타이드의 도움으로 본 발명의 RNA 분자, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 흡수를 증가시키는 작용제의 사용에 의해 향상될 수 있거나, 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에 트랜스제닉인 종자를 심고 종자가 본 발명의 RNA 분자를 발현하는 트랜스제닉 식물로 성장할 수 있게 함으로써 그러한 체제를 첨가하지 않고 이루어질 수 있다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자는 단백질을 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 방법은 하나를 초과하는 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시키며, 표적 RNA 분자들은 상이하고, 예를 들어 유전자 패밀리로부터, 서열이 관련되는 2개 이상의 표적 RNA의 수준 및/또는 활성이 감소된다. 따라서, 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성된 작은 RNA 분자, 또는 이 둘 모두는 세포 또는 유기체에 대한 국소 적용에 의해 세포 또는 유기체, 바람직하게는 식물 세포, 식물, 진균 또는 곤충과 접촉되거나, 유기체를 위한 먹이에 제공된다.

[0122] 또 다른 양태에서, 본 발명은 비-인간 유기체, 예를 들어 동물 유해물 또는 병원체 또는 식물 유해물 또는 병원체를 제어하는 방법을 제공하며, 방법은 비-인간 유기체에 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물

을 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 RNA 분자 및/또는 작은 RNA 분자는 비-인간 유기체 상에서 유해한 효과를 갖는다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 절지동물, 예컨대 곤충, 또는 식물, 예컨대 잡초이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 식물이며, 곤충은 식물 또는 이의 일부를 먹고, 이에 의해 곤충이 제어된다. 방제는 유해물 또는 병원체의 생존 감소, 또는 유해물 또는 병원체의 건강 또는 번식의 감소, 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다. 방제는 RNA 분자가 먼저 도입된 유해물 또는 병원체의 자손의 생존 및/또는 번식의 감소를 포함할 수 있다.

[0123] 본 발명의 또 다른 양태는, 비-인간 유기체, 예를 들어 동물 또는 식물에 대해 유해물 또는 병원체에 의해 야기되는 손상을 감소시키는 방법에 관한 것이며, 방법은 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물을 유해물 또는 병원체에 전달하거나, 유해물 또는 병원체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 방법은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 대해 트랜스제닉인 종자를 파종하는 단계를 포함하고, 이에 의해 얻어진 식물은 본 발명의 RNA 분자를 생성하도록 트랜스유전자를 발현함으로써 유해물 또는 병원체에 의해 초래되는 손상을 감소시킨다. 따라서, 본 발명은 동물 또는 식물의 유해물 또는 병원체를 방제하는 수단을 농부에게 제공한다. 본 발명은 세포 또는 유기체에 제공된 본 발명의 RNA 분자, 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 세포 및 유기체, 예를 들어, 동물 또는 식물, 또는 이의 부분으로, 그리고 RNA 분자 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성된 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 이 둘 모두, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 유해물 또는 병원체로 연장된다. 유해물 또는 병원체는 살아 있거나 죽어 있을 수 있다. 본 발명은 또한 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자 또는 이 둘 모두를 포함하는 자손 세포 또는 유기체에 관한 것이다.

[0124] 하나의 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 질병을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 키메라 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자 또는 둘 모두는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유의한 효과를 갖는다. 하나의 구현예에서, RNA 분자 또는 작은 RNA 분자, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 조성물은 국소, 경구 투여되거나 주사된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 척추동물이다. 하나의 구현예에서, 척추동물은 포유류, 예컨대 인간, 가축 동물, 예컨대 소 또는 양, 또는 새, 예컨대 닭 및 다른 가금이다.

[0125] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질병을 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 RNA 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물을 제공하며, 여기서 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자 또는 둘 모두는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유의한 효과를 갖는다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 질병 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명의 RNA 분자 또는 이로부터 생성되는 작은 RNA 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 RNA 분자 또는 이로부터 생성되는 작은 RNA 분자 또는 둘 모두는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유의한 효과를 갖는다.

[0126] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNA 분자(들) 또는 이로부터 생성되는 작은 RNA 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 추가로 키트의 사용을 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0127] 트랜스제닉 발현 시스템에서 더 널리 사용되지만, 본원에 논의된 바와 같이 질병 및/또는 유해물을 방제하기 위해 작물을 살포하는 것과 같은 dsRNA 분자의 대규모 생산에 대한 요구에 의거한 dsRNA 기술의 응용이 또한 존재한다. 본 발명자들은 대규모 생산 공정에서 사용하기에 적합한 유기체로서 *एस. 세레비지애*를 확인하였는데, 그 이유는 이에 발현되는 dsRNA 분자가 절단되지 않기 때문이다. 따라서, 추가의 양태에서, 본 발명은 dsRNA 분자를 생성하기 위한 공정으로서, 공정은

[0128] a) 하나 이상의 dsRNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 *एस. 세레비지애*를 배양하는 단계, 및

[0129] b) dsRNA 분자를 생성하는 *एस. 세레비지애*, 또는 *एस. 세레비지애*로부터의 dsRNA 분자를 수확하는 단계를 포함하고,

- [0130] *에스. 세레비지애*는 적어도 1 리터의 부피로 배양되는, 공정을 제공한다.
- [0131] dsRNA는 본 발명의 shRNA, miRNA 또는 dsRNA와 같은 임의의 구조를 가질 수 있다.
- [0132] 하나의 구현예에서, *에스. 세레비지애*는 적어도 10 리터, 적어도 100 리터, 적어도 1,000 리터, 적어도 10,000 리터 또는 적어도 100,000 리터의 부피로 배양된다.
- [0133] 하나의 구현예에서, 공정은 적어도 0.1, 적어도 0.5 또는 적어도 1 g/리터의 본 발명의 RNA 분자를 생성한다.
- [0134] 본 공정을 이용하여 생성된 *에스. 세레비지애*, 또는 이로부터 단리된 dsRNA 분자(정제된 또는 부분 정제된(예컨대, 추출물) 상태로)는 본원에 기재되는 방법, 예컨대, 비제한적으로 세포 또는 유기체에서 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시키거나 하향-조절하기 위한 방법, 비-인간 유기체에 유해물 또는 병원체에 의해 초래되는 손상을 감소시키는 방법, 비-인간 유기체를 방제하는 방법 또는 대상체에서 질병을 예방하거나 치료하는 방법에서 사용될 수 있다.
- [0135] 본원의 임의의 구현예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 임의의 다른 구현예에 준용되도록 적용되어야 한다.
- [0136] 본 발명은 본원에서 기재되는 특정 구현예에 의해 범위가 제한되지 않으며, 단지 예시의 목적을 위한 것이다. 기능적으로-동등한 산물, 조성물 및 방법은 본원에서 기재되는 바와 같이, 명확히 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0137] 본 명세서를 통해, 구체적으로 달리 언급되지 않는 한 또는 맥락 상 달리 요구되지 않는 한, 단일 단계, 해당 조성물, 단계 그룹 또는 해당 조성물 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상)의 이들 단계, 해당 조성물, 단계 그룹 또는 해당 조성물 그룹을 포괄하려는 것이다.
- [0138] 이후 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 첨부되는 도면을 참조하여 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0139] **도 1.** 두 ledRNA 분자의 도식적 설계. (A) 상기 ledRNA 분자는 개입 스페이서 서열 없이 공유 연결되고 표적 RNA와 동일성을 갖는 2개의 인접한 센스 서열로 간주될 수 있는 센스 서열, 센스 서열과 상보적이고 2개 영역, 5' 영역 및 3' 영역으로 구분되는 안티센스 서열, 및 센스 서열을 안티센스 서열과 분리하는 2개의 루프를 포함한다. (B) 상기 ledRNA 분자는 개입 스페이서 서열 없이 공유 연결되고 표적 RNA의 상보체와 동일성을 갖는 2개의 인접한 안티센스 서열로 간주될 수 있는 안티센스 서열, 안티센스 서열과 상보적이고 2개 영역으로 구분되는 센스 서열, 및 센스 서열을 안티센스 서열과 분리하는 2개의 루프를 포함한다. 전사에 의해, 예를 들어 프로모터, 예컨대 T7 또는 Sp6 프로모터로부터의 시험관내 전사에 의해 생성되는 RNA 분자는 상보적 센스 및 안티센스 서열 간 염기쌍 형성에 의해 자가-어닐링하여 각각의 말단에 루프를 갖고 안티센스 또는 센스 서열에 "닉"을 갖는 이중-가닥 영역을 형성한다. 추가 서열은 5'-연장부 또는 3'-연장부로서 5' 말단 및/또는 3' 말단에 연결될 수 있다.
- 도 2.** ledRNA는 센스/안티센스 어닐링 또는 헤어핀 RNA보다 dsRNA를 형성하는 데 더 효율적이다. 3가지 형태의 이중-가닥 RNA 분자의 모식도를 나타낸다: a, 2개의 별도 가닥의 어닐링에 의해 형성되는 통상적 dsRNA; b, 5'-연장부 및 3'-연장부를 갖는 헤어핀 RNA; 및 c, ledRNA 분자. 하부 패널은 GUS 유전자 또는 GFP 유전자를 표적화하는 3가지 유형의 RNA 분자에 대한 RNA 전사체의 겔 전기영동 후 사진을 나타낸다.
- 도 3.** 처리(a 및 b) 및 미처리 원위(c 및 d) 조직의 노던 블롯 혼성화는 ledRNA가 dsRNA보다 안정하며 담배 잎 조직을 통해 확산됨을 나타낸다. 원위 조직(c 및 d, 상부 패널)에서, 강한 ledRNA 신호와 대조적으로 dsRNA 신호는 검출할 수 없었다.
- 도 4.** ledRNA 처리는 처리 영역(1) 및 미처리 영역 위(3) 모두에서 GUS의 하향조절을 유도하였다.
- 도 5.** ledRNA는 니코티아나 벤탐미아나(*N. benthamiana*) 앞에서 FAD2.1 유전자의 침묵화를 유도한다.
- 도 6.** 노던 블롯 혼성화는 6시간 및 24시간째에 ledFAD2.1로의 처리에 의해 FAD2.1 mRNA의 강한 하향조절을 확인시켜준다.
- 도 7.** GUS 표적 유전자 영역의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:14) 및 hpGUS[G:U] 작제물의 센스 서열(SEQ ID NO:11의 뉴클레오타이드 9 내지 208)의 정렬. 52개 시티딘(C) 뉴클레오타이드를 티미딘(T) 뉴클레오타이드로 치환하였다. 보존된 뉴클레오타이드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.
- 도 8.** GUS 표적 유전자 영역의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:14) 및 hpGUS[1:4] 작제물의 센스 서열(SEQ ID

NO:12의 뉴클레오타이드 9 내지 208)의 정렬. 대응하는 야생형 센스 서열 대비 hpGUS[1:4]에서 4번째마다의 뉴클레오타이드를 치환하였고, 이에 의해 4번째마다의 뉴클레오타이드는 C가 G로 변화되었고, G가 C로 변화되었고, A가 T로 변화되었고, T가 A로 변화되었다. 보존된 뉴클레오타이드는 별표시하고, 치환된 G 및 C는 별표시하지 않고, 치환된 A 및 T는 세미콜론을 붙여 나타낸다.

도 9. GUS 표적 유전자 영역의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:14) 및 hpGUS[2:10] 작제물의 센스 서열(SEQ ID NO:13의 뉴클레오타이드 9 내지 208)의 정렬. 대응하는 야생형 센스 서열 대비 hpGUS[2:10]에서 10개 뉴클레오타이드의 각 블록의 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오타이드를 치환하였고, 이에 의해 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오타이드에 있어서, C는 G로 변화되었고, G는 C로 변화되었고, A는 T로 변화되었고, T는 A로 변화되었다. 보존된 뉴클레오타이드는 별표시하고, 치환된 G 및 C는 별표시하지 않고, 치환된 A 및 T는 세미콜론을 붙여 나타낸다.

도 10. GUS mRNA를 표적화하는 변형 헤어핀 RNA를 인코딩하는 유전 작제물의 구조를 나타내는 모식도.

도 11. 담배 식물을 형질전환하여 GUS 표적 유전자를 제공하기 위해 사용된 벡터 pWBPPGH의 모식도. T-DNA는 벡터의 오른쪽 경계(RB)로부터 왼쪽 경계(LB)로 연장된다. T-DNA 상의 선별 마커 유전자는 하이그로마이신 내성을 인코딩하는 35S-HPT-tml¹ 유전자이다.

도 12. GUS 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 변형 헤어핀 RNA를 인코딩하는 작제물로 형질전환된 식물에서의 GUS 활성. hp 비함유: hpGUS 작제물을 함유하지 않는 대조군 PPGH11 및 PPGH24 식물. 대응하는 대조군 PPGH11 또는 PPGH24 식물 대비 10% 미만 GUS 활성을 나타내는 식물의 수 및 평가된 식물의 수 대비 이러한 식물의 백분율을 괄호 안에 제공한다.

도 13. (a) 모든 트랜스제닉 식물: hpGUS[wt]에 대해 59개 식물, hpGUS[G:U]에 대해 74개 식물, hpGUS[1:4]에 대해 33개 식물 및 hpGUS[2:10]에 대해 41개 식물의 평균 GUS 활성. (b) 모든 침묵화된 식물(hpGUS[wt]에 대해 32개, hpGUS[G:U]에 대해 71개, hpGUS[1:4]에 대해 33개 및 hpGUS[2:10]에 대해 28개)의 평균 GUS 활성.

도 14. hpGUS[wt], hpGUS[G:U] 또는 hpGUS[1:4]를 함유하는 트랜스제닉 자손 식물의 GUS 활성.

도 15. hpGUS[G:U] 작제물로 형질전환된 16개 식물로부터의 DNA의 서던 블롯의 자가방사선촬영. DNA를 HindIII로 소화시킨 후 겔 전기영동하고 OCS-T 탐침으로 탐침분석하였다. 레인 1: 크기 마커(HindIII-소화된 람다 DNA); 레인 2 및 3, 모체 식물 PPGH11 및 PPGH24로부터의 DNA; 레인 4-19: 16개의 상이한 트랜스제닉 식물로부터의 DNA.

도 16. 트랜스제닉 담배 식물에서 발현된 헤어핀 RNA로부터 유도된 센스(상부 패널) 및 안티센스(하부 패널) sRNA를 검출하기 위한 노던 블롯 혼성화 실험의 자가방사선촬영그래프. 레인 1 및 2는 hpGUS 작제물이 없는 모체 식물 PPGH11 및 PPGH24로부터 수득된 RNA를 함유하였다. 레인 3 내지 11은 hpGUS[wt] 식물로부터의 RNA를 함유하였고 레인 12 내지 20은 hpGUS[G:U] 식물로부터의 RNA를 함유하였다.

도 17. 트랜스제닉 식물로부터 안티센스 sRNA를 검출하기 위한 노던 블롯 혼성화의 자가방사선촬영. 레인 1 내지 10은 hpGUS[wt] 식물의 것이었고, 레인 11 내지 19는 hpGUS[G:U] 식물의 것이었다. 안티센스 sRNA는 20 nt 내지 24 nt 길이에 해당하는 이동성을 갖는다. 블롯을 레인-로딩 대조군으로 U6 RNA에 대한 안티센스로 재탐침 분석하였다.

도 18. 트랜스제닉 식물로부터 안티센스 sRNA를 검출하기 위한 반복 노던 블롯 혼성화의 자가방사선촬영

도 19. 트랜스제닉 식물에서 hpGUS 작제물에서의 35S 프로모터 및 센스 GUS 영역의 접합 영역의 DNA 메틸화 분석. 접합 단편을 PCR-증폭한 후 식물 DNA를 McrBC 효소로 처리하거나(+) 처리하지 않았다(-).

도 20. 트랜스제닉 식물에서 hpGUS 작제물에서의 35S 프로모터 영역의 DNA 메틸화 분석. 35S 단편을 PCR-증폭한 후 식물 DNA를 McrBC 효소로 처리하거나(+) 처리하지 않았다(-).

도 21. 가공된 RNA의 크기 분포 및 존재비. (a) EIN2 작제물. (b) GUS 작제물.

도 22. hpEIN2[G:U] 작제물의 센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:22의 뉴클레오타이드 17 내지 216) 및 아라비돕시스 탈리아나(A. thaliana) EIN2 표적 유전자에 대응하는 cDNA 영역의 뉴클레오타이드 서열(하부 서열, SEQ ID NO:27)의 정렬. 야생형 서열에서의 43개 시티딘(C) 뉴클레오타이드를 티미딘(T) 뉴클레오타이드로 대체하여 센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오타이드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 23. hpCHS[G:U] 작제물의 센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:24의 뉴클레오티드 13 내지 212)과 아라비돕시스 탈리아나 CHS 표적 유전자에 대응하는 cDNA 영역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:28, 하부 서열)의 정렬. 야생형 서열에서 65개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 24. hpEIN2[G:U/U:G] 작제물의 안티센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:25의 뉴클레오티드 8 내지 207)과 아라비돕시스 탈리아나 EIN2 표적 유전자의 상보체 영역의 뉴클레오티드 서열(하부 서열, SEQ ID NO:29)의 정렬. 야생형 서열에서 49개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 안티센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 25. hpCHS[G:U/U:G] 작제물의 안티센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:26의 뉴클레오티드 13 내지 212)과 아라비돕시스 탈리아나 CHS 표적 유전자의 상보체 영역의 뉴클레오티드 서열(하부 서열, SEQ ID NO:30)의 정렬. 야생형 서열에서 49개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 안티센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 26. EIN2(ethylene insensitive 2) 및 CHS(칼론 신타아제) hpRNA 작제물의 모식도. 35S: CaMV 35S 프로모터; EIN2 및 CHS 영역을 야생형 서열(wt) 또는 G:U 변형 서열(G:U)로 나타낸다. 화살표는 DNA 단편의 배향을 나타낸다 - 오른쪽에서 왼쪽으로의 화살표는 안티센스 서열을 나타낸다. 제한 효소 부위를 또한 나타낸다.

도 27. hpEIN2[wt] 또는 hpEIN2[G:U]를 함유하는, EIN2 검정에서의 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나 묘목의 하배축 길이

도 28. 액틴2 RNA 수준으로 정상화된, hpCHS[wt] 또는 hpCHS[G:U] 작제물에 대해 트랜스제닉인, 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나에서의 CHS mRNA에 대한 qRT-PCR. Col-0은 야생형(비트랜스제닉) 아라비돕시스 탈리아나이다.

도 29. hpEIN2[wt] 또는 hpEIN2[G:U]로 형질전환된 식물로부터의 RNA의 노던 블롯 혼성화의 자가방사선촬영. 상부 패널은 그 라인에 대한 하배축 길이를 나타낸다. 자가방사선촬영은 안티센스 sRNA를 검출하기 위한 EIN2 센스 탐침으로 탐침분석된 노던 블롯을 나타낸다. 동일한 블롯을 로딩 대조군(U6 RNA)으로서 U6 RNA 탐침으로 재-탐침분석하였다.

도 30. 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나 식물의 게놈 DNA에서 35S 프로모터 및 35S-센스 EIN2 서열의 DNA 메틸화 분석.

도 31. 헤어핀 RNA 작제물의 프로모터 및 5' 영역에서의 DNA 메틸화 수준.

도 32. hpEIN2[wt] 집단의 최소 메틸화된 라인에서의 35S 프로모터는 여전히 유의미한 메틸화를 나타낸다.

도 33. G:U hpEIN2 라인에서의 35S 프로모터는 약한 메틸화(10% 미만)만을 나타낸다.

도 34. 72시간째에 CHO 및 Vero 세포에서 G:U 유전자 침묵화를 갖는 ledRNA 및 hpRNA.

도 35. 48시간째에 HeLa 세포에서 평가된 덤벨 플라스미드.

도 36. dsRNA 분자의 가능한 변형예.

도 37. 그린 피치(green peach) 진디에서 *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자의 발현을 하향조절하기 위해 ledRNA가 보충된 인공 식이의 섭취 후 감소된 진디 수행능력. 상부 패널 (a): 50 ng/ μ l ledRNA 100 μ l으로 10일 기간 후 성체 진디 당 평균 약충 수. 하부 패널 (b): *MpC002*, *MpRack-1*의 200 ng/ μ l ledRNA 또는 대조군 ledGFP를 함유하는 100 μ l 상에서 섭취 후 5일 시간 경과에 걸쳐 생존하는 진디의 백분율.

도 38. 탐침으로서 전장 센스 GUS 전사체를 사용하여 ledGUS 및 hpGUS RNA를 검출한 노던 블롯 혼성화. 하부의 "+"는 높은 GUS 발현을 나타내며; "-"는 저/비 GUS 발현, 즉, 강력한 GUS 침묵화를 나타낸다.

도 39. 긴 hpEIN2 및 ledEIN2 RNA(상부 패널) 및 두 작제물(하부 패널)에서 얻어진 siRNA 검출한 노던 블롯 혼성화.

도 40. GUS hpRNA 작제물로부터 발현된 전사체의 줄기-루프 구조에 대한 개략도. 전사체는 줄기에 대한 염기쌍(bp)의 지시된 길이, 및 루프에서 뉴클레오티드(nt)의 수를 갖는 GUS 서열-특이적 dsRNA 줄기를 형성하도록 염기쌍을 형성하는 상보적 센스 및 안티센스 서열을 갖는다. GFP hpRNA 작제물은 GUS 코딩 서열의 영역으로부터

유래된 루프와 함께 완전 정규 염기쌍 형성인 GFP-특이적 dsRNA 줄기(GFPhp[WT] 또는 G:U 염기쌍으로서 약 25%의 염기쌍을 갖는 dsRNA 줄기(GFPhp[G:U])를 형성한 전사체를 인코딩하였다. GFPhp 전사체에 대한 루프 서열은 miR165/miR166에 상보적이고 이에 따라 이들 miRNA에 대한 결합 부위를 제공하는 두 개의 서열을 각각 포함하였다.

도 41. hpRNA를 인코딩하는 트랜스유전자가 식물 세포에서 발현될 때 루프 서열의 별개의 단편을 생성한다는 것을 보여주는 노던 블롯 혼성화 분석. (A) GUS 표적 유전자 (GUS) 및 1100 nt 스페이서/루프 서열을 갖는 긴 hpRNA 트랜스유전자 GUShp1100의 발현. 오이 모자이크 바이러스 2b RNA 침묵화 억제인자(CMV2b)를 인코딩하는 작제물이 트랜스유전자 발현을 향상시키기 위해 포함되었다. (B) 안정적으로 형질전환된 *아라비도시스 탈리아나* 식물에서 두 개의 짧은 hpRNA 트랜스유전자 GUShp93-1 및 GUShp93-2의 발현으로부터의 RNA를 보여주는 노던 블롯 분석. RNA 샘플은 RN아제 I로 처리되거나(+) 처리되지 않았다(-). 둘 모두의 RNA 블롯이 루프-특이적 안티센스 RNA 탐침과 혼성화되었다.

도 42. GUShp1100의 루프는 *니코티아나 벤타미아나* 세포에서 고수준으로 축적되었으며, RN아제 R 소화에 내성이 있었다.

도 43. GUShp1100 작제물을 발현하는 트랜스제닉 *에스. 세레비지애*는 전장 헤어핀 RNA 전사체에 대응하는 단일 RNA 분자 종을 나타냈다. 하부 패널은 트랜스제닉 *에스. 세레비지애*로부터의 RNA 샘플에 대한 노던 블롯 혼성화를 나타낸다.

도 44. *에스. 세레비지애*에서 발현된 GUShp1100 전사체는 여전히 전장이고, 원형 루프 RNA를 형성하지 않는다. 첫 네 개의 레인은 야생형 *니코티아나 벤타미아나* 잎으로부터 단리된 총 RNA가 보충된 GUShp1100의 전장 또는 dsRNA 줄기의 시험관내 전사체를 사용하였다.

도 45. hpRNA 루프는 miRNA의 효과적인 서열-특이적 리프레서로서 사용될 수 있다. (A) 트랜스제닉 *아라비도시스* 식물에서 강한 miR165/166 억제 표현형을 유도한 GFPhp[G:U] 작제물. (B) 트랜스제닉 *아라비도시스* 식물로부터의 RNA에서 GFPhp의 존재비를 결정한 노던 블롯 혼성화. (C) GFPhp 루프의 원형 RNA에 대한 RT-qPCR 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 목록에 대한 키

SEQ ID NO:1 - GFP 1edRNA의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:2 - GUS 1edRNA의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:3 - 니코티아나 벤타미아나 FAD2.1 1edRNA의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:4 - GFP 1edRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:5 - GUS 1edRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:6 - 니코티아나 벤타미아나 FAD2.1 1edRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:7 - GFP를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:8 - GUS를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:9 - 니코티아나 벤타미아나 FAD2.1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:10 - GUS mRNA를 표적화하는 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:11 - 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[G:U]를 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:12 - 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[1:4]를 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:13 - 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[2:10]을 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

- [0154] SEQ ID NO:14 - GUS 유전자의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오타이드 781~1020의 뉴클레오타이드 서열.
- [0155] SEQ ID NO:15 - hpGUS[wt] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오타이드 서열.
- [0156] SEQ ID NO:16 - hpGUS[G:U] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오타이드.
- [0157] SEQ ID NO:17 - hpGUS[1:4] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오타이드.
- [0158] SEQ ID NO:18 - hpGUS[2:10] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오타이드.
- [0159] SEQ ID NO:19 - 아라비도시스 탈리아나 EIN2 유전자, 접근 번호 NM_120406에 대응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열.
- [0160] SEQ ID NO:20 - 아라비도시스 탈리아나 CHS 유전자, 접근 번호 NM_121396, 1703 nt에 대응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열.
- [0161] SEQ ID NO:21 - 제한 효소 부위가 측면에 있는 아라비도시스 탈리아나 EIN2 유전자에 대응하는 cDNA로부터의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열.
- [0162] SEQ ID NO:22 - hpEIN2[G:U] 작제에서 사용된, 43개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고, SEQ ID NO:21에 대한 것과 같이 EIN2의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열.
- [0163] SEQ ID NO:23 - 제한 효소 부위가 측면에 있는 아라비도시스 탈리아나 CHS 유전자에 대응하는 cDNA로부터의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열.
- [0164] SEQ ID NO:24 - hpCHS[G:U]의 작제에서 사용된, 65개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고, SEQ ID NO:23에 대한 것과 같이 CHS의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열.
- [0165] SEQ ID NO:25 - hpEIN2[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 50개의 C가 T로 대체된, EIN2의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열.
- [0166] SEQ ID NO:26 - hpCHS[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 49개의 C가 T로 대체된, CHS의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열.
- [0167] SEQ ID NO:27 - 아라비도시스 탈리아나로부터의 EIN2 유전자(접근 번호 NM_120406)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 601~900의 뉴클레오타이드 서열.
- [0168] SEQ ID NO:28 - 아라비도시스 탈리아나로부터의 CHS 유전자(접근 번호 NM_121396)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 813~1112의 뉴클레오타이드 서열.
- [0169] SEQ ID NO:29 - 아라비도시스 탈리아나로부터의 EIN2 유전자(접근 번호 NM_120406)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 652~891의 상보체의 뉴클레오타이드 서열.
- [0170] SEQ ID NO:30 - 아라비도시스 탈리아나로부터의 CHS 유전자에 대응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 804~1103의 상보체의 뉴클레오타이드 서열.
- [0171] SEQ ID NO:31 - 아라비도시스 탈리아나의 cDNA의 FANCM I 단백질 코딩 영역, 접근 번호 NM_001333162. 표적 영역 뉴클레오타이드 675~1174(500개 뉴클레오타이드)
- [0172] SEQ ID NO:32 - 브라시카 나푸스(*Brassica napus*)의 cDNA의 FANCM I 단백질 코딩 영역. 표적 영역 뉴클레오타이드 896~1395(500 bp)
- [0173] SEQ ID NO:33 - 아라비도시스 탈리아나의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-At[wt]를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오타이드 38~537; 루프 서열, 뉴클레오타이드 538~1306; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오타이드 1307~1806.
- [0174] SEQ ID NO:34 - 아라비도시스 탈리아나의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-At[G:U]를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오타이드 38~537; 루프 서열, 뉴클레오타이드 538~1306; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오타이드 1307~1806.
- [0175] SEQ ID NO:35 - 브라시카 나푸스의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-Bn[wt]를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오타이드 34~533; 루프 서열, 뉴클레오타이드 534~1300; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오타이드 1301~1800.

- [0176] SEQ ID NO:36 - 브라시카 나푸스의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-Bn[G:U]를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오티드 34~533; 루프 서열, 뉴클레오티드 534~1300; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1301~1800.
- [0177] SEQ ID NO:37 - 브라시카 나푸스 DDM1 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열; 접근 번호 XR_001278527.
- [0178] SEQ ID NO:38 - 브라시카 나푸스 DDM1 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpDDM1-Bn[wt]를 인코딩하는 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0179] SEQ ID NO:39 - 브라시카 나푸스의 DDM1 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpDDM1-Bn[G:U]를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열. DDM1 센스 서열, 뉴클레오티드 35~536; 루프 서열, 뉴클레오티드 537~1304; DDM1 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1305~1805.
- [0180] SEQ ID NO:40 - EGFP cDNA.
- [0181] SEQ ID NO:41 - 프로모터에 대해 안티센스/루프/센스의 순서로, hpEGFP[wt]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0182] SEQ ID NO:42 - EGFP 센스 서열에서 157개의 C에서 T로의 치환을 갖는 hpEGFP[G:U]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0183] SEQ ID NO:43 - EGFP 센스 서열에서 C에서 T로의 치환을 갖지 않는 ledEGFP[wt]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0184] SEQ ID NO:44 - EGFP 센스 서열에서 162개의 C에서 T로의 치환을 갖는 ledEGFP[G:U]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0185] SEQ ID NO:45 - 측면에 제한 효소 부위를 갖지 않고 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[G:U]를 인코딩하는 작제물에 대한 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.
- [0186] SEQ ID NO:46 - 측면에 제한 효소 부위를 갖지 않고 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[1:4]를 인코딩하는 작제물에 대한 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.
- [0187] SEQ ID NO:47 - 측면에 제한 효소 부위를 갖지 않고 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[2:10]을 인코딩하는 작제물에 대한 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.
- [0188] SEQ ID NO:48 - 측면 서열을 갖지 않는 hpEIN2[G:U]의 작제에서 사용된, 43개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고 SEQ ID NO:21에서와 같이 EIN2의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.
- [0189] SEQ ID NO:49 - 측면 서열을 갖지 않는 hpCHS[G:U]의 작제에서 사용된, 65개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고 SEQ ID NO:23에서와 같이 CHS의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.
- [0190] SEQ ID NO:50 - 측면 서열을 갖지 않는 hpEIN2[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 50개의 C가 T로 대체된 EIN2의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.
- [0191] SEQ ID NO:51 - 측면 서열을 갖지 않는 hpCHS[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 49개의 C가 T로 대체된 CHS의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.
- [0192] SEQ ID NO:52 - 200 bp GUS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(GUS-WT-F)
- [0193] SEQ ID NO:53 - 200 bp GUS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(GUS-WT-R)
- [0194] SEQ ID NO:54 - 모든 C가 T로 대체된 hpGUS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(GUS-GU-F)
- [0195] SEQ ID NO:55 - 모든 C가 T로 대체된 hpGUS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(GUS-GU-R)
- [0196] SEQ ID NO:56 - 4번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[1:4] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(GUS-4M-F)
- [0197] SEQ ID NO:57 - 4번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[1:4] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(GUS-4M-R)

- [0198] SEQ ID NO:58 - 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[2:10] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(GUS-10M-F)
- [0199] SEQ ID NO:59 - 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[2:10] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(GUS-10M-R)
- [0200] SEQ ID NO:60 - 순방향 프라이머(35S-F3)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0201] SEQ ID NO:61 - 역방향 프라이머(GUSwt-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0202] SEQ ID NO:62 - 순방향 프라이머(GUSgu-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0203] SEQ ID NO:63 - 역방향 프라이머(GUS4m-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0204] SEQ ID NO:64 - 순방향 프라이머(35S-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0205] SEQ ID NO:65 - 역방향 프라이머(35S-R1)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0206] SEQ ID NO:66 - 야생형 200 bp EIN2 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(EIN2wt-F)
- [0207] SEQ ID NO:67 - 야생형 200 bp EIN2 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(EIN2wt-R)
- [0208] SEQ ID NO:68 - 야생형 200 bp CHS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(CHSwT-F)
- [0209] SEQ ID NO:69 - 야생형 200 bp CHS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(CHSwT-R)
- [0210] SEQ ID NO:70 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(EIN2gu-F)
- [0211] SEQ ID NO:71 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(EIN2gu-R)
- [0212] SEQ ID NO:72 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(CHSgu-F)
- [0213] SEQ ID NO:73 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(CHSgu-R)
- [0214] SEQ ID NO:74 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(asEIN2gu-F)
- [0215] SEQ ID NO:75 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(asEIN2gu-R)
- [0216] SEQ ID NO:76 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(asCHSgu-F)
- [0217] SEQ ID NO:77 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(asCHSgu-R)
- [0218] SEQ ID NO:78 - 순방향 프라이머(CHS-200-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0219] SEQ ID NO:79 - 역방향 프라이머(CHS-200-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0220] SEQ ID NO:80 - 순방향 프라이머(액틴2-For)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0221] SEQ ID NO:81 - 역방향 프라이머(액틴2-Rev)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0222] SEQ ID NO:82 - 순방향 프라이머(Top-35S-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0223] SEQ ID NO:83 - 역방향 프라이머(Top-35S-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0224] SEQ ID NO:84 - 순방향 프라이머(Link-35S-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0225] SEQ ID NO:85 - 역방향 프라이머(Link-EIN2-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0226] SEQ ID NO:86 - 센스 si22의 리보뉴클레오티드 서열

- [0227] SEQ ID NO:87 - 안티센스 si22의 리보뉴클레오티드 서열
- [0228] SEQ ID NO:88 - 순방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열
- [0229] SEQ ID NO:89 - 역방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열
- [0230] SEQ ID NO:90 - 순방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열
- [0231] SEQ ID NO:91 - 역방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열
- [0232] SEQ ID NO:92 - dsRNA 분자의 가능한 변형
- [0233] SEQ ID NO:93 - 브라시카 나푸스 *DDM1* 유전자(접근 번호 XR_001278527)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0234] SEQ ID NO:94 - 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자를 표적화하는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0235] SEQ ID NO:95 - 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자를 표적화하는, G:U 염기쌍을 갖는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0236] SEQ ID NO:96 - 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자를 표적화하는, ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0237] SEQ ID NO:97 - 아라비도시스 탈리아나 *FANCM* 유전자(접근 번호 NM_001333162)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0238] SEQ ID NO:98 - 아라비도시스 탈리아나 *FANCM* 유전자를 표적화하는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0239] SEQ ID NO:99 - 아라비도시스 탈리아나 *FANCM* 유전자를 표적화하는, G:U 염기쌍을 갖는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0240] SEQ ID NO:100 - 아라비도시스 탈리아나 *FANCM* 유전자를 표적화하는, ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0241] SEQ ID NO:101 - 브라시카 나푸스 *FANCM* 유전자(접근 번호 XM_022719486.1)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0242] SEQ ID NO:102 - 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자를 표적화하는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0243] SEQ ID NO:103 - 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자를 표적화하는, G:U 염기쌍을 갖는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0244] SEQ ID NO:104 - 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자를 표적화하는, ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0245] SEQ ID NO:105 - 니코티아나 벤타미아나 *TOR* 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0246] SEQ ID NO:106 - 니코티아나 벤타미아나의 *TOR* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0247] SEQ ID NO:107 - 보리, 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*)의 아세토락테이트 신타아제(ALS) 유전자(접근 번호 LT601589)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0248] SEQ ID NO:108 - 보리(호르데움 불가레)의 ALS 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0249] SEQ ID NO:109 - 보리(호르데움 불가레)의 HvNCED1 유전자(접근 번호 AK361999)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0250] SEQ ID NO:110 - 보리 호르데움 불가레의 HvNCED2 유전자(접근 번호 DQ145931)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0251] SEQ ID NO:111 - 보리 호르데움 불가레 및 밀 트리티쿰 애스티쿰(*Triticum aestivum*)의 *NCED1* 유전자를 표적화

하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

- [0252] SEQ ID NO:112 - 보리 호르데움 불가레 및 밀 트리티쿰 애스티븀의 *NCED2* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0253] SEQ ID NO:113 - ABA-OH-2를 인코딩하는 보리 유전자(접근 번호 DQ145933)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0254] SEQ ID NO:114 - 보리 호르데움 불가레 및 밀 트리티쿰 애스티븀의 ABA-OH-2 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0255] SEQ ID NO:115 - EIN2를 인코딩하는 아라비도시스 탈리아나 유전자(*At5g03280*)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0256] SEQ ID NO:116 - 아라비도시스 탈리아나의 EIN2 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0257] SEQ ID NO:117 - CHS를 인코딩하는 아라비도시스 탈리아나 유전자(접근 번호 NM_121396)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0258] SEQ ID NO:118 - 아라비도시스 탈리아나의 CHS 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0259] SEQ ID NO:119 - 루피누스 앵구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*) N-유사 유전자(접근 번호 XM_019604347)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0260] SEQ ID NO:120 - 루피누스 앵구스티폴리우스 N-유사 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0261] SEQ ID NO:121 - 비티스 슈도레티쿨라타(*Vitis pseudoreticulata*) *MLO* 유전자(접근 번호 KR362912)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0262] SEQ ID NO:122 - 비티스 *MLO* 유전자를 표적화하는 제1 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0263] SEQ ID NO:123 - 마이주스 페르시캐(*Myzus persicae*)의 MpC002 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0264] SEQ ID NO:124 - 마이주스 페르시캐의 MpRack-1 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0265] SEQ ID NO:125 - 마이주스 페르시캐 C002 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 작제물의 뉴클레오티드 서열.
- [0266] SEQ ID NO:126 - 마이주스 페르시캐 Rack-1 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 작제물의 뉴클레오티드 서열.
- [0267] SEQ ID NO:127 - 헬리코베르파 아르미게라(*Helicoverpa armigera*) *ABCwhite* 유전자에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0268] SEQ ID NO:128 - 헬리코베르파 아르미게라의 ABC 트랜스포터 white 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0269] SEQ ID NO:129 - 리네피테마 휴밀레(*Linepithema humile*) PBAN-유형 뉴로펩타이드-유사(XM_012368710)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0270] SEQ ID NO:130 - 아르헨티나 개미에서 PBAN 유전자(접근 번호 XM_012368710)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0271] SEQ ID NO:131 - 루실리아 쿠프리나(*L. cuprina*)의 V-유형 양성자 ATP아제 촉매성 서브유닛 A를 인코딩하는 유전자(접근 번호 XM_023443547)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0272] SEQ ID NO:132 - 루실리아 쿠프리나의 RN아제 1/2를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하

는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

- [0273] SEQ ID NO:133 - 루실리아 쿠프리나의 키틴 신타아제를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0274] SEQ ID NO:134 - 루실리아 쿠프리나의 엑디손 수용체(EcR)를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0275] SEQ ID NO:135 - 루실리아 쿠프리나의 감마-튜불린 1/1-유사를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0276] SEQ ID NO:136 - *TaMlo* 표적 유전자(AF384144).
- [0277] SEQ ID NO:137 - *TaMlo*를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0278] SEQ ID NO:138 - 비티스 슈도레티쿨라타 *MLO* 유전자(접근 번호 KR362912)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.
- [0279] SEQ ID NO:139 - 비티스 *MLO* 유전자를 표적화하는 제1 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0280] SEQ ID NO:140 - *Cyp51* 상동체 1 (접근 번호 KK764651.1, 유전자위 RSAG8_00934).
- [0281] SEQ ID NO:141 - *Cyp51* 상동체 2 (접근 번호 KK764892.1, 유전자위 번호 RSAG8_12664).
- [0282] SEQ ID NO:142 - *Cyp51*를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0283] SEQ ID NO:143 - *CesA3* 표적 유전자 (접근 번호 JN561774.1).
- [0284] SEQ ID NO:144 - *CesA3*를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.
- [0285] 일반 기법 및 정의
- [0286] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다(예컨대, 세포 배양, 분자 유전학, 유전자 침묵화, 단백질 화학, 및 생화학에서).
- [0287] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명에서 이용되는 제조합 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기법은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다. 이러한 기법은 원천 문헌, 예컨대 [J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press(1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996), 및 F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 업데이트 포함)]에 기재되어 있고 설명된다.
- [0288] 본원에서 사용되는 용어 "안티센스 조절 요소" 또는 "안티센스 리보핵산 서열" 또는 "안티센스 RNA 서열"은 이것이 혼성화되는 표적 RNA 분자의 적어도 일부와 적어도 부분적으로 상보적인 RNA 서열을 의미한다. 소정 구현예에서, 안티센스 RNA 서열은, 예를 들어 표적 RNA 분자의 번역 감소를 통해, 표적 RNA 분자의 발현 또는 양 또는 그 활성을 조절한다(증가시키거나 감소시킨다). 소정 구현예에서, 안티센스 RNA 서열은 표적 프리-mRNA의 스플라이싱을 변경하여 상이한 스플라이스 변이체를 생성한다. 안티센스 서열의 예시적 성분에는 비제한적으로 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 유사체, 올리고뉴클레오티드 모사체, 및 이의 키메라 조합이 포함된다.
- [0289] 용어 "안티센스 활성"은 본 개시의 맥락에서 사용되어 그 표적 RNA 분자에 대한 안티센스 RNA 서열의 혼성화에 기인할 수 있는 임의의 검출 가능한 및/또는 측정 가능한 활성을 나타낸다. 이러한 검출 및/또는 측정은 직접적

이거나 간접적일 수 있다. 하나의 예에서, 안티센스 활성은 표적 RNA 분자 전사체의 양을 검출하고 하거나 측정하여 평가된다. 안티센스 활성은 또한 표적 RNA 분자와 연관된 표현형에서의 변화로서 검출될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "표적 RNA 분자"는 본 개시에 따라 안티센스 RNA 서열에 의해 조절되는 유전자 전사체를 나타낸다. 따라서, "표적 RNA 분자"는 그 발현 또는 활성이 안티센스 RNA 서열에 의해 조절될 수 있는 임의의 RNA 분자일 수 있다. 예시적인 표적 RNA 분자에는 비제한적으로 이의 전구체 형태를 포함하는, 표적 단백질을 인코딩하는 DNA로부터 전사된 RNA(비제한적으로 프리-mRNA 및 mRNA 또는 이의 일부를 포함함), rRNA, tRNA, 작은 핵 RNA, 및 miRNA가 포함된다. 표적 RNA는 병원체 또는 해충, 예컨대 바이러스의 게놈 RNA, 또는 이로부터 유래된 RNA 분자, 예컨대 바이러스 병원체의 복제 형태, 또는 이로부터의 전사체일 수 있다. 예를 들어, 표적 RNA 분자는 내인성 유전자(또는 유전자로부터 전사된 mRNA) 또는 그 발현이 특정 표현형, 형질, 장애 또는 질병 상태와 연관되는 진핵 세포 내로 도입되거나 도입될 수 있는 유전자로부터의 RNA, 또는 감염성 체제로부터의 핵산 분자일 수 있다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 진핵 세포에 있다. 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 단백질을 인코딩한다. 상기 맥락에서, 안티센스 활성은, 예를 들어 그 활성, 예컨대 효소 활성, 또는 효소로서가 아닌 기능을 통해, 또는 그 기능과 연관된 표현형을 통해, 표적 단백질의 양을 검출하거나 측정함으로써 평가될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "표적 단백질"은 본 개시에 따른 안티센스 RNA 서열에 의해 조절되는 단백질을 나타낸다.

[0290] 소정 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 RNA 분자 및/또는 절단된 표적 RNA 분자 및/또는 대안적으로 스플라이스된 표적 RNA 분자의 양을 검출함으로써 및/또는 측정함으로써 평가된다.

[0291] 안티센스 활성은 다양한 방법을 사용하여 검출되거나 측정될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 활성은 특정 샘플에서의 활성을 비교하고 그 활성을 대조군 샘플의 활성과 비교함으로써 검출되거나 평가될 수 있다.

[0292] 용어 "표적화"는 본 개시의 맥락에서 사용되어 안티센스 RNA 서열과 특정 표적 RNA 분자 또는 표적 RNA 분자 내의 특정 뉴클레오타이드 영역의 연합을 나타낸다. 하나의 예에서, 본 개시에 따른 안티센스 RNA 서열은 표적 RNA 분자의 적어도 하나의 영역과 상보성을 공유한다. 상기 맥락에서, 용어 "상보성"은 리보뉴클레오타이드 상의 염기 간 수소 결합을 통해, 표적 RNA 분자 상의 리보뉴클레오타이드 서열과 염기쌍을 형성할 수 있는 리보뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 예를 들어, RNA에서, 아데닌(A)은 우라실(U)과 상보적이며 구아닌(G)은 시토신(C)과 상보적이다.

[0293] 소정 구현예에서, "상보적 염기"는 본 발명의 RNA 분자에서 센스 RNA 서열의 또는 그 표적 RNA 분자의 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성할 수 있는 안티센스 RNA 서열의 리보뉴클레오타이드를 나타낸다. 예를 들어, 안티센스 RNA 서열의 소정 위치에서의 리보뉴클레오타이드가 표적 RNA 분자의 소정 위치에서의 리보뉴클레오타이드와 수소 결합할 수 있는 경우, 안티센스 RNA 서열 및 표적 RNA 분자 간 수소 결합의 위치는 그 리보뉴클레오타이드에서 상보적인 것으로 간주된다. 대조적으로, 용어 "비-상보적"은 서로 수소 결합을 형성하지 않거나 달리 혼성화를 지지하지 않는 리보뉴클레오타이드쌍을 나타낸다. 용어 "상보적"은 또한 안티센스 RNA 서열이 상보성을 통해 또 다른 핵산과 혼성화되는 능력을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, RNA 서열 및 그 표적은 각 분자에서 충분한 수의 대응하는 위치가 서로 결합할 수 있는 리보뉴클레오타이드에 의해 점유되어 본 발명의 RNA 분자 및/또는 표적 RNA 분자에서 안티센스 RNA 서열 및 센스 RNA 서열 간 안정한 연합을 허용하는 경우 서로 상보적이다. 당업자는 안티센스 RNA 서열 및 표적이 연합된 채 유지되는 능력을 제거하지 않으면서 미스매치의 도입이 가능함을 인식한다. 따라서, 미스매치된(즉, 표적의 대응하는 뉴클레오타이드와 상보적이지 아닌) 최대 약 20%의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 안티센스 RNA 서열이 본원에서 기재된다. 바람직하게는 안티센스 화합물은 약 15% 이하, 보다 바람직하게는 약 10% 이하, 가장 바람직하게는 5% 이하의 미스매치를 함유하거나 미스매치를 함유하지 않는다. 잔여 리보뉴클레오타이드는 상보적이거나 다르게는 안티센스 RNA 서열 및 센스 RNA 서열 또는 표적 RNA 분자 간 혼성화(예컨대, G:U쌍 또는 A:G쌍)를 손상시키지 않는다. 당업자는 본원에서 기재되는 안티센스 RNA 서열이 표적 RNA 분자의 적어도 하나의 영역과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%(완전) 상보적임을 인식할 것이다.

[0294] 본원에서 사용되는 "키메라 RNA 분자"는 자연에서 자연적으로 확인되지 않는 임의의 RNA 분자를 나타낸다. 하나의 예에서, 본원에서 개시되는 키메라 RNA 분자는 dsRNA의 영역(들)에 미스매치를 생성하기 위해 변형되었다. 예를 들어, 키메라 RNA 분자는 시토신을 우라실로 전환하도록 변형될 수 있다. 하나의 예에서, 키메라 RNA 분자는 비-메틸화 시토신을 우라실로 전환하기 충분한 시간 동안 이러한 조건 하에 바이설파이트로의 처리를 통해 변형되었다.

[0295] 당업자는 다양한 리보뉴클레오타이드 조합이 염기쌍을 형성할 수 있음을 이해할 것이다. 정규 및 비-정규 염기쌍

형성이 본 개시에 의해 고려된다. 하나의 예에서, 염기쌍 형성은 DNA 분자에 A:T 또는 G:C를 또는 RNA 분자에 U:A 또는 G:C를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 염기쌍 형성은 A:G 또는 G:T 또는 U:G를 포함할 수 있다.

[0296] 본 개시에서 사용되는 용어 "정규 염기쌍 형성"은 테옥시리보뉴클레오타이드에 대해 A:T 또는 G:C 또는 리보뉴클레오타이드에 대해 A:U 또는 G:C인 2개의 뉴클레오타이드 간 염기쌍 형성을 의미한다.

[0297] 본 개시에서 사용되는 용어 "비-정규 염기쌍 형성"은 2개의 DNA 또는 2개의 RNA 서열의 맥락에서, 정규 염기쌍 형성이 아닌 2개의 뉴클레오타이드 염기 간 상호작용을 의미한다. 예를 들어, 비-정규 염기쌍 형성에는 G 및 U 간 (G:U) 또는 A 및 G 간(A:G) 쌍 형성이 포함된다. 비-정규 염기쌍 형성의 예에는 퓨린 - 퓨린 또는 피리미딘 - 피리미딘이 포함된다. 본 개시의 맥락에서 가장 일반적으로, 비-정규 염기쌍 형성은 G:U이다. 비-정규 염기쌍의 다른 예는, 덜 선호되지만, A:C, G:T, G:G 및 A:A이다.

[0298] 본 개시는 일련의 리보뉴클레오타이드에 걸쳐 "혼성화되는" RNA 성분을 나타낸다. 당업자는 "혼성화하다" 및 "혼성화되는"과 같은 용어가 상보적 핵산 서열에 기반하여 어닐링되는 분자를 설명하기 위해 사용됨을 이해할 것이다. 이러한 분자는 혼성화되기 위해 100% 상보적일 필요는 없다(즉, 이들이 "전체적으로 염기쌍을 형성할" 필요는 없음). 예를 들어, 서열 상보성에 하나 이상의 미스매치가 존재할 수 있다. 하나의 예에서, 본원에서 기재되는 RNA 성분은 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화된다. 용어 "엄격한 혼성화 조건"은 RNA 분자의 길이를 이용한 혼성화 온도의 변이를 포함하여, 당분야에 친숙한 파라미터를 나타낸다. 리보뉴클레오타이드 혼성화 파라미터는 이러한 방법을 컴파일링하는 참고문헌[Sambrook, et al. (상기 문헌), 및 Ausubel, et al. (상기 문헌)]에서 확인될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 엄격한 혼성화 조건은 혼성화 완충액(3.5xSSC, 0.02% Ficoll, 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민(BSA), 2.5 mM NaH₂PO₄(pH7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA) 중 65°C에서의 혼성화에 이어, 50°C에서 0.2.xSSC, 0.01% BSA 중 1회 이상의 세척을 나타낼 수 있다. 더 짧은 RNA 성분, 예컨대 20개 내지 24개 뉴클레오타이드 길이의 RNA 서열은 저엄격성 조건 하에 혼성화된다. 용어 "저엄격성 혼성화 조건"은 RNA 분자의 길이를 이용한 혼성화 온도의 변이를 포함하는, 당분야에 친숙한 파라미터를 나타낸다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 저엄격성 혼성화 조건은 혼성화 완충액(3.5xSSC, 0.02% Ficoll, 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민(BSA), 2.5 mM NaH₂PO₄(pH7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA) 중 42°C에서의 혼성화에 이어, 30°C에서 0.2.xSSC, 0.01% BSA 중 1회 이상의 세척을 나타낼 수 있다.

[0299] 본 발명은 또한 인접한 리보뉴클레오타이드에 걸쳐 "전체적으로 염기쌍을 형성하는" RNA 성분을 포괄한다. 용어 "전체적으로 염기쌍을 형성한다"는 본 개시의 맥락에서 사용되어 일련의 인접한 리보뉴클레오타이드 염기쌍 형성을 나타낸다. 전체적으로 염기쌍을 형성한 일련의 인접한 리보뉴클레오타이드는 시리즈 내에 겹 또는 염기쌍을 형성하지 않은 뉴클레오타이드를 포함하지 않는다. 용어 "인접한"은 일련의 리보뉴클레오타이드를 나타내기 위해 사용된다. 인접한 시리즈를 포함하는 리보뉴클레오타이드는 연속 시리즈의 포스포디에스테르 결합에 의해 연결될 것이고, 각각의 리보뉴클레오타이드는 다음과 직접 결합된다.

[0300] 본 발명의 RNA 분자는 센스 서열 및 대응하는 안티센스 서열을 포함한다. 이들 서열 간 상관관계가 본원에서 정의된다. 표적 RNA 분자에 관한 안티센스 서열의 서열 상관관계 및 활성이 또한 본원에서 정의된다.

[0301] 용어 "공유 연결된"은 본 개시의 맥락에서 제1 및 제2 RNA 성분 또는 임의의 RNA 서열 또는 리보뉴클레오타이드 간 연결을 나타내기 위해 사용된다. 당업자가 이해할 바와 같이, 공유 연결 또는 결합은 원자 간 전자쌍 공유가 관여되는 화학적 결합이다. 하나의 예에서, 제1 및 제2 RNA 성분 또는 센스 RNA 서열 및 안티센스 RNA 서열은 자가-상보성을 통해 자체 상에서 다시 폴딩될 수 있는 단일 RNA 가닥의 일부로서 공유 연결된다. 상기 예에서, 성분은 포스포디에스테르 결합에 의해 하나 이상의 리보뉴클레오타이드에 걸쳐 공유 연결된다.

[0302] 본 개시의 맥락에서, 용어 "혼성화"는 상보적 염기의 염기쌍 형성을 통한 상보적 폴리뉴클레오타이드의 쌍 형성을 의미한다. 특정 기전에 제한되지 않고, 쌍 형성의 가장 일반적인 기전에는 수소 결합이 관여되며, 이는 상보적 리보뉴클레오타이드 간 왓슨-크릭 수소 결합일 수 있다.

[0303] 본원에서 사용되는 어구 "RNA 분자가 비-인간 유기체 상에서 유해한 효과를 갖는다" 또는 유사한 어구는 분자의 표적 RNA 분자가 비-인간 유기체에 존재하며, 표적 RNA 분자에 대한 표적 RNA 분자를 발현하는 세포의 노출이 RNA 분자가 없는 동일한 세포와 비교되는 경우 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시킴을 의미한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자는 성장, 생식 또는 성장에 중요한 단백질을 인코딩한다. 일례로서, 비-인간 유기체가 작물 해충 또는 병원체, 또는 동물의 해충 또는 병원체인 경우, RNA 분자는 해충 또는 병원체에 의한 섭취, 세포 아포토시스, 세포 분화 및 발생, 성적 생식 능력 또는 육구, 근육 형성, 근육 단일수축, 근육 수축, 청소년 호르몬 형성, 청소년 호르몬 조절, 이온 조절 및 수송, 세포막 전위의 유지, 아미노산 생합성, 아미노산

분해, 정자 형성, 페로몬 합성, 페로몬 감지, 더듬이 형성, 날개 형성, 다리 형성, 알 형성, 유충 성숙, 소화 효소 형성, 혈림프 합성, 혈림프 유지, 신경전달, 유충 단계 변이, 번데기화, 번데기화로부터의 우화, 세포 분열, 에너지 대사, 호흡, 키틴 대사, 세포골격 구조의 형성에 대해 유해한 효과를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 비-인간 유기체는 잡초이며 RNA 분자는 아미노산 생합성, 광합성, 지방산 합성, 세포막 온전성, 색소 합성 또는 성장에 대해 유해한 효과를 갖는다.

[0304] 본원에서 사용되는 어구 "RNA 분자가 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는다" 또는 유사한 어구는 분자의 표적 RNA가 대상체에 존재하며 RNA 분자에 대한 표적 RNA를 발현하는 세포의 노출이 RNA 분자가 없는 동일한 세포와 비교되는 경우 표적 RNA의 수준 및/또는 활성을 감소시킴을 의미한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA는 질병의 존재 하에 역할을 담당하는 단백질을 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 질병은 암 또는 암성 질병, 감염성 질병, 심혈관 질병, 신경학적 질병, 프리온 질병, 염증성 질병, 자가면역 질병, 폐 질병, 신장 질병, 간 질병, 미토콘드리아 질병, 내분비 질병, 생식 관련 질병 및 조건, 및 세포 또는 유기체에서 발현되는 유전자 산물 수준에 반응할 수 있는 임의의 다른 적응증이다.

[0305] 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 대상체에 투여될 수 있다. "대상체", "환자" 또는 "개체"와 같은 용어는 맥락에서, 본 개시와 상호 교환적으로 사용될 수 있는 용어이다. 하나의 예에서, 대상체는 포유류이다. 포유류는 반려 동물, 예컨대 개 또는 고양이, 또는 가축 동물, 예컨대 말 또는 소일 수 있다. 일례에서, 대상체는 인간이다. 예를 들어, 대상체는 성체일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 어린이일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 청소년일 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 곤충에게 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 식물에 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 진균 세포 또는 집단에 투여될 수 있다.

[0306] 본원에서 사용되는 "내성이 있는" 또는 이의 변형어는 RNA 분자의 존재로 인한 내성의 증가, 예를 들어, 유해물 또는 병원체 번식의 감소, 또는 유기체에 대한 손상 수준의 감소라는 점에서 상대적 용어이다.

[0307] 본원에서 사용되는 용어 "표적과 서열 관련성이 없는"은 개입 RNA 서열의 전장에 따라 50% 미만의 동일성을 갖는 분자를 지칭한다. 다른 한 편으로, 용어 "표적과 서열 관련성이 있는"은 개입 RNA 서열의 전장에 따라 50% 이상의 동일성을 갖는 분자를 지칭한다.

[0308] 용어 "및/또는", 예컨대, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 두 의미 모두 또는 어느 하나의 의미에 대한 명시적 지지를 제공하는 것으로 간주되어야 한다.

[0309] 본원에서 사용되는 용어 약은, 달리 언급되지 않는 한, 명명된 값의 $\pm 20\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 10\%$ 를 나타낸다.

[0310] 본 명세서에 걸쳐 단어 "포함한다(comprise)", 또는 변형, 예컨대 "포함하는(comprises 또는 comprising)"은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 포함을 시사하지만 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계 그룹의 배제는 시사하지 않음이 이해될 것이다.

[0311] 비-정규 염기쌍 형성

[0312] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 서로 혼성화하여 일부 비-정규 염기쌍을 갖는, 즉 정규 및 비-정규 염기쌍 형성의 조합을 갖는 이중 가닥(ds) RNA 영역을 형성할 수 있는 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 각각 하나의(인접한) 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열 영역과 혼성화하여 일부 비-정규 염기쌍을 갖는 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어, 도 1b를 참고한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 각각 하나의(인접한) 센스 리보뉴클레오타이드 서열 영역과 혼성화하여 일부 비-정규 염기쌍을 갖는 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 2개 이상의 안티센스 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어, 도 1a를 참고한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 2개 이상의 안티센스 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 각각의 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 혼성화하여 2개 이상의 dsRNA 영역을 형성할 수 있고, 하나 또는 둘 다는 일부 비-정규 염기쌍 형성을 포함한다.

[0313] 하기 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 전장 dsRNA 영역(즉, 전체 dsRNA 영역)은 하나의(인접한) dsRNA 영역만 존재하는 경우 그 특징에 대한, 또는 RNA 분자에 2개 이상의 dsRNA 영역이 존재하는 경우 RNA 분자의 각각의 dsRNA 영역에 대한 맥락으로서 간주된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 5%는 비-정규 염

기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 6%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 7%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 8%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 9% 또는 10%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 11% 또는 12%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 15% 또는 약 15%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 20% 또는 약 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 25% 또는 약 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 30% 또는 약 30%는 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 최대 40%가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍의 최대 35%가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍의 최대 30%가 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 덜 바람직하게는, dsRNA 영역에서 염기쌍의 약 35%가 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 보다 덜 바람직하게는, dsRNA 영역에서 염기쌍의 약 40%가 비-정규 염기쌍이다. 각각의 상기 구현예에서, dsRNA 영역은 센스 서열 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다에서, 하나 이상의 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드를 포함할 수도 포함하지 않을 수도 있다.

[0314] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 40%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 35%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 30%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 15%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 15% 내지 30%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 15% 내지 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 15% 내지 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 30%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 15%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 10%는 비-정규 염기쌍이다. 각각의 상기 구현예에서, dsRNA 영역은 센스 서열 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다에서, 하나 이상의 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드를 포함할 수도 포함하지 않을 수도 있다.

[0315] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 20개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 20개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0316] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은

염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 23개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0319] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 24개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 24개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0320] 하기 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 전장 dsRNA 영역(즉, 전체 dsRNA 영역)은 하나의(인접한) dsRNA 영역만 존재하는 경우 그 특징에 대한, 또는 RNA 분자에 2개 이상의 dsRNA 영역이 존재하는 경우 RNA 분자의 각각의 dsRNA 영역에 대한 맥락으로서 간주된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고, 즉 20개의 인접한 염기쌍의 모든 하위영역에는 적어도 하나의 비-정규 염기쌍, 바람직하게는 적어도 하나의 G:U 염기쌍이 포함된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 19개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 18개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 17개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 16개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 15개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 14개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 13개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 12개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 11개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 9개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 8개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 7개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 상기 구현예에서, RNA 분자의 dsRNA 영역에서 인접한 정규 염기쌍 형성의 가장 긴 하위영역, 또는 RNA 분자에서 각각의 모든 dsRNA 영역이 5개, 6개 또는 7개의 인접한 정규 염기쌍인 것이, 즉 언급된 더 짧은 길이를 향하는 것이 바람직하다. 상기 구현예의 각각의 특징은 바람직하게는 하기 특징을 가지며 RNA 분자에서 조합된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개 내지 19개 또는 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 바람직한 구현예에서, dsRNA 영역은 12개 내지 19개 또는 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 14개 내지 19개 또는 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 이러한 구현예에서, dsRNA 영역은 15개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 16개, 17개, 18개 또는 19개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 인접한 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하는 적어도 하나의 비-정규 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 인접한 염기쌍 영역에서의 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다.

[0321] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 4개의 정규 염기쌍의 하위영역, 즉 4개의 정규 염기쌍의 각 말단에 인접한 적어도 1개의, 바람직하게는 1개 또는 2개의(2개 이하의) 비정규 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 2개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의

길이에 의해 결정됨이 쉽게 이해된다.

- [0324] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개의 인접한 염기쌍의 하위영역을 포함하며, 여기서 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 3개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 4개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 5개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 10개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각 15개의 인접한 염기쌍의 4개의 하위영역을 포함하며, 여기서 15개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 6개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 50개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 40개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 30개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 20개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, RNA 분자의 하나(인접한) 이상, 또는 모든 dsRNA 영역에서 비-정규 염기쌍은 인접해 있는 비-염기쌍이 아니다. 또 다른 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 비-염기쌍으로부터 적어도 2개의 인접한 염기쌍이다. 또 다른 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 비-염기쌍으로부터 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 인접한 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, RNA 분자의 하나(인접한) 이상, 또는 모든 dsRNA 영역에서 비-정규 염기쌍은 인접해 있는 루프 서열이 아니다. 또 다른 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 루프 서열로부터 적어도 2개의 인접한 염기쌍이다. 또 다른 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 루프 서열로부터 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 인접한 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 하위영역에서 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 상기 구현예의 변형에서, 일부 또는 모든 하위영역에 있어서, 2개 내지 4개 또는 2개 내지 6개의 비-정규 염기쌍 중 하나 이상은 센스 서열, 안티센스 서열 또는 두 서열 모두에서 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오타이드로 대체된다. 상기 구현예에서, 하위영역의 최대 수는 RNA 분자에서 dsRNA 영역의 길이에 의해 결정됨이 쉽게 이해된다.
- [0325] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 2.5:1 내지 3.5:1, 예를 들어 약 3:1이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 3.5:1 내지 4.5:1, 예를 들어 약 4:1이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 4.5:1 내지 5.5:1, 예를 들어 약 5:1이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 5.5:1 내지 6.5:1, 예를 들어 약 6:1이다. RNA 분자에서 상이한 dsRNA 영역은 상이한 비를 가질 수 있다.
- [0326] 상기 구현예에서, RNA 분자의 dsRNA 영역(들)에서 비-정규 염기쌍은 바람직하게는 모두 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 99%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 98%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 97%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 95%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 90%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 90% 내지 95%는 G:U 염기쌍이다. 예를 들어, 10개의 비-정규 염기쌍이 존재하는 경우, 적어도 9개(90%)는 G:U 염기쌍이다.
- [0327] 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 3% 내지 50%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 5% 내지 30%는 G:U 염기쌍이다. 다른 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 10% 내지 30%는 G:U 염기쌍이다. 다른 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 15% 내지 20%는 G:U 염기쌍이다.
- [0328] 상기 구현예의 하나의 예에서, RNA 분자의 하나(인접한) 이상, 또는 모든 dsRNA 영역에는 적어도 3개의 G:U 염기쌍이 존재한다. 또 다른 예에서, 적어도 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 G:U 염기쌍이 존재한다. 또 다른 예에서, 적어도 3개 내지 10개의 G:U 염기쌍이 존재한다. 또 다른 예에서, 적어도 5개 내지 10개의 G:U 염기쌍이 존재한다.
- [0329] 비-정규 염기쌍 형성(들)을 포함하는 dsRNA 영역은 안티센스 조절 요소로 작용하는 20개의 인접한 뉴클레오타이드

의 안티센스 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 안티센스 조절 요소는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 또는 가장 바람직하게는 100% 상보적이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 동일한 표적 RNA 분자와(즉, 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과) 상보적이거나 상이한 표적 RNA 분자와 상보적인 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 안티센스 조절 요소를 포함한다.

[0330] 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 또는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드, 또는 둘 다는 센스 및 안티센스 서열이 혼성화되는 경우 dsRNA 영역에서 염기쌍을 형성하지 않는다. 상기 구현예에서, dsRNA 영역에는 센스 및 안티센스 서열을 공유 결합시키는 임의의 루프 서열이 포함되지 않는다. dsRNA 영역 또는 하위영역의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드는 염기쌍을 형성하지 않을 수 있다. 따라서, 상기 구현예에서, dsRNA 영역의 센스 가닥은 그 대응하는 안티센스 가닥과 전체적으로 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0331] 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 분자의 루프의 염기에서 비-정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상 또는 모든 비-정규 염기쌍은 정규 염기쌍이 측면에 있다.

[0332] 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 적어도 하나의 식물 DCL-1 절단 부위를 포함한다.

[0333] 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자는 바이러스 RNA 분자가 아니다.

[0334] 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자는 남아프리카 카사바 모자이크 바이러스 RNA 분자가 아니다.

[0335] 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 정규 염기쌍, 비-정규 염기쌍, 또는 정규 염기쌍과 비-정규 염기쌍이 측면에 있는, 적어도 하나의 비-염기쌍, 또는 비-염기쌍의 신장부를 포함한다. 예를 들어, 이는 본원에 기재되는 바와 같은 블록부일 수 있다.

[0336] 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 11개 초과와 정규 염기쌍을 갖는 이중 가닥 영역을 포함하지 않는다.

[0337] 또한, 하나의 구현예에서 그리고 선택적으로 상기 구현예의 임의의 특징과 조합되어, 센스 서열(들)에서 리보뉴클레오타이드의 총 수 및 안티센스 서열(들)에서 리보뉴클레오타이드의 총 수는 바람직하게는 동일하지만, 동일하지 않을 수 있다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역의 센스 리보뉴클레오타이드 서열(들)에서 리보뉴클레오타이드의 총 수는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열(들)에서 리보뉴클레오타이드의 총 수의 90% 내지 110%이다. 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열(들)에서 리보뉴클레오타이드의 총 수는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열(들)에서 리보뉴클레오타이드의 총 수의 95% 내지 105%이다. 하나의 구현예에서, 본 개시의 키메라 RNA 분자는 하나 이상의 구조적 요소, 예컨대 내부 또는 말단부 블록부 또는 루프를 포함할 수 있다. 블록부 및 루프의 다양한 구현예는 위에서 논의된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 구조적 요소, 예컨대 블록부 또는 루프에 의해 분리된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 개입(스페이서) 서열에 의해 분리된다. 스페이서 서열의 일부 리보뉴클레오타이드는 mRNA 분자에서 다른 리보뉴클레오타이드와, 예를 들어 스페이서 서열 내에서 다른 리보뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성할 수 있거나, 이들은 RNA 분자에서 염기쌍을 형성하지 않거나, 각각이 일부씩 있을 수 있다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 말단부 루프에 연결된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 말단부 루프가 측면에 있다.

[0338] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역이 5개의 인접한 염기쌍의 임의의 하위영역에 적어도 3개의 비-정규 염기쌍을 갖는 경우, 비-정규 염기쌍은 인접하지 않고 하나 이상의 정규 염기쌍에 의해 분리되며, 즉 dsRNA 영역은 3개 이상의 인접한 비-정규 염기쌍을 갖지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 4개 이상의 인접한 비-정규 염기쌍을 갖지 않는다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개 염기쌍의 하위영역에 적어도 3개의 비-정규 염기쌍을 포함하며, 여기서 각각의 비-정규 염기쌍은 4개의 정규 염기쌍에 의해 분리된다.

[0339] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 1개를 초과하는 dsRNA 영역을 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 dsRNA 영역을 포함한다. 상기 예에서, 하나 이상의 또는 모든 dsRNA 영역은 상기 예시된 특성, 예컨대 비-정규 염기쌍 형성 및/또는 안티센스 조절 요소의 수를 포함할 수 있다.

[0340] 침묵화 활성

[0341] 본 개시의 RNA 분자는 표적 RNA 분자의 영역과 본질적으로 상보적인 센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 한, 안티센스 활성을 갖는다. 예를 들어, 리보뉴클레오타이드 서열은 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 영역과 본질적으로 상보적이다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 박테리아 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동

물 세포에 있을 수 있다. 본원에서 정의되는 RNA 분자의 이러한 성분은 "안티센스 조절 요소"로 언급될 수 있다. "본질적으로 상보적"이란 센스 리보뉴클레오타이드 서열이 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 상보체와 대비되어 삽입, 결실 및 개별 점 돌연변이를 가질 수 있음을 의미한다. 바람직하게는, 안티센스 활성을 갖는 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 표적 RNA 분자 간에, 상동성은 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 100%이다. 예를 들어, 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 동일한 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 또는 약 19개 이상의 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 동일한 약 20개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0342] "안티센스 활성"은 본 개시의 맥락에서 사용되어 표적 RNA 분자의 발현을 조절하는(증가시키거나 감소시키는) 본원에서 정의되는 RNA 분자로부터의 안티센스 조절 요소를 나타낸다.

[0343] 다양한 예에서, 본 개시에 따른 안티센스 조절 요소는 연결기에 의해 함께 연결된 복수의 단량체 서브유닛을 포함할 수 있다. 예에는 프라이머, 탐침, 안티센스 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오타이드, 대체 스플라이서, 갭머(gapmer), siRNA 및 마이크로RNA가 포함된다. 이와 같이, 본 개시에 따른 RNA 분자는 단일-가닥, 이중-가닥, 원형, 분기형 또는 헤어핀 구조를 갖는 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 안티센스 서열은 구조적 요소, 예컨대 내부 또는 말단부 볼록부 또는 루프를 함유할 수 있다.

[0344] 하나의 예에서, 본 개시의 RNA 분자는 키메라 올리고머 성분, 예컨대 키메라 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 상이하게 변형된 뉴클레오타이드, 혼합-골격 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 키메라 올리고머 화합물은 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 및/또는 표적 RNA 분자에 대해 증가된 결합 친화도를 부여하기 위해 변형된 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다.

[0345] 안티센스 조절 요소는 다양한 길이를 가질 수 있다. 다양한 예에 걸쳐, 본 개시는 X-Y 연결 염기로 구성되는 안티센스 조절 요소를 제공하며, 여기서 X 및 Y는 각각 독립적으로 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로부터 선택된다(단, $X < Y$). 예를 들어, 소정 구현예에서, 본 개시는 8-9개, 8-10개, 8-11개, 8-12개, 8-13개, 8-14개, 8-15개, 8-16개, 8-17개, 8-18개, 8-19개, 8-20개, 8-21개, 8-22개, 8-23개, 8-24개, 8-25개, 8-26개, 8-27개, 8-28개, 8-29개, 8-30개, 9-10개, 9-11개, 9-12개, 9-13개, 9-14개, 9-15개, 9-16개, 9-17개, 9-18개, 9-19개, 9-20개, 9-21개, 9-22개, 9-23개, 9-24개, 9-25개, 9-26개, 9-27개, 9-28개, 9-29개, 9-30개, 10-11개, 10-12개, 10-13개, 10-14개, 10-15개, 10-16개, 10-17개, 10-18개, 10-19개, 10-20개, 10-21개, 10-22개, 10-23개, 10-24개, 10-25개, 10-26개, 10-27개, 10-28개, 10-29개, 10-30개, 11-12개, 11-13개, 11-14개, 11-15개, 11-16개, 11-17개, 11-18개, 11-19개, 11-20개, 11-21개, 11-22개, 11-23개, 11-24개, 11-25개, 11-26개, 11-27개, 11-28개, 11-29개, 11-30개, 12-13개, 12-14개, 12-15개, 12-16개, 12-17개, 12-18개, 12-19개, 12-20개, 12-21개, 12-22개, 12-23개, 12-24개, 12-25개, 12-26개, 12-27개, 12-28개, 12-29개, 12-30개, 13-14개, 13-15개, 13-16개, 13-17개, 13-18개, 13-19개, 13-20개, 13-21개, 13-22개, 13-23개, 13-24개, 13-25개, 13-26개, 13-27개, 13-28개, 13-29개, 13-30개, 14-15개, 14-16개, 14-17개, 14-18개, 14-19개, 14-20개, 14-21개, 14-22개, 14-23개, 14-24개, 14-25개, 14-26개, 14-27개, 14-28개, 14-29개, 14-30개, 15-16개, 15-17개, 15-18개, 15-19개, 15-20개, 15-21개, 15-22개, 15-23개, 15-24개, 15-25개, 15-26개, 15-27개, 15-28개, 15-29개, 15-30개, 16-17개, 16-18개, 16-19개, 16-20개, 16-21개, 16-22개, 16-23개, 16-24개, 16-25개, 16-26개, 16-27개, 16-28개, 16-29개, 16-30개, 17-18개, 17-19개, 17-20개, 17-21개, 17-22개, 17-23개, 17-24개, 17-25개, 17-26개, 17-27개, 17-28개, 17-29개, 17-30개, 18-19개, 18-20개, 18-21개, 18-22개, 18-23개, 18-24개, 18-25개, 18-26개, 18-27개, 18-28개, 18-29개, 18-30개, 19-20개, 19-21개, 19-22개, 19-23개, 19-24개, 19-25개, 19-26개, 19-27개, 19-28개, 19-29개, 19-30개, 20-21개, 20-22개, 20-23개, 20개 내지 24개, 20-25개, 20-26개, 20-27개, 20-28개, 20-29개, 20-30개, 21-22개, 21-23개, 21-24개, 21-25개, 21-26개, 21-27개, 21-28개, 21-29개, 21-30개, 22-23개, 22-24개, 22-25개, 22-26개, 22-27개, 22-28개, 22-29개, 22-30개, 23-24개, 23-25개, 23-26개, 23-27개, 23-28개, 23-29개, 23-30개, 24-25개, 24-26개, 24-27개, 24-28개, 24-29개, 24-30개, 25-26개, 25-27개, 25-28개, 25-29개, 25-30개, 26-27개, 26-28개, 26-29개, 26-30개, 27-28개, 27-29개, 27-30개, 28-29개, 28-30개, 또는 29-30개의 연결된 염기를 포함하는 안티센스 조절 요소를 제공한다.

[0346] 본 개시에 따른 RNA 분자는 여러 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 적어도 2개, 적

어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 안티센스 조절 요소는 동일하다. 상기 예에서, RNA 분자는 적어도 2카피, 적어도 3카피, 적어도 4카피, 적어도 5카피, 적어도 6카피, 적어도 7카피, 적어도 8카피, 적어도 9카피, 적어도 10카피의 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자는 상이한 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 조절 요소는 경로, 예컨대 지질 생합성에서 여러 유전자를 표적화하기 위해 제공될 수 있다. 상기 예에서, RNA 분자는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 상이한 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0347] 본 개시에 따른 안티센스 조절 요소는 다양한 표적 RNA 분자의 발현 또는 양을 조절할(증가시키거나 감소시킬) 수 있다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 지방산 생합성 유전자이다. 이러한 유전자의 예에는 아세틸 트랜스아실라제, 아실 수송 단백질("아실 캐리어 단백질"), 탈포화효소, 예컨대 스테아릴 탈포화효소 또는 마이크로솜 D12-탈포화효소, 특히 Fad2-1 유전자, 말로닐 트랜스아실라제, -케토아실-ACP 합성효소, 3-케토-ACP 환원효소, 에노일-ACP 하이드롤라제, 티오에스터라제, 예컨대 아실-ACP 티오에스터라제, 에노일-ACP 환원효소를 인코딩하는 유전자가 포함된다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 FAD2 유전자(예를 들어 Genbank 접근 번호: AF124360 (브라시카 카리나타(*Brassica carinata*)), AF042841(브라시카 라파(*Brassica rapa*)), L26296(아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)), A65102(코릴러스 아벨라나(*Corylus avellana*))으로 기재된 것들)이다. 예를 들어, 표적 RNA 분자는 FAD2.1 유전자일 수 있다. 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 FAD2.2 유전자일 수 있다. 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 FAD2.1 및 FAD2.2 유전자일 수 있다. 표적 RNA 분자일 수 있는 지질 조성의 변형에 관여되는 다른 유전자의 예는 당분야에 알려져 있다(예를 들어, Shure et al., 1983; Preiss et al., 1987; Gupta et al., 1988; Olive et al., 1989; Bhattacharyya et al., 1990; Dunwell, 2000; Brar et al., 1996; Kishore and Somerville, 1993; US 5,530,192 and WO 94/18337 참조).

[0348] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 절지동물 유전자, 예컨대 곤충 유전자 전사체이다. 이러한 유전자의 예에는 키틴 신타아제 유전자, 예컨대 CHS1 및/또는 CHS2 또는 곤충 활성화, 행동, 생식, 성장 및/또는 발생을 제어하는 다른 유전자가 포함된다. 다양한 병원체의 다양한 필수 유전자는 당업자에게 알려져 있다(예를 들어 선충 내성 유전자는 WO 93/10251, WO 94/17194에 요약되어 있음).

[0349] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 질병과 연관된다. 예를 들어, 표적 RNA 분자는 종양유전자 또는 종양 억제인자 유전자 전사체일 수 있다. 예시적인 종양유전자에는 ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA, ERBB, EBRB2, FGR, FOS, FYN, HRAS, JUN, LCK, LYN, MYB, MYC, NRAS, RET 또는 SRC가 포함된다. 예시적인 종양 억제인자 유전자에는 BRCA1 또는 BRCA2; 부착 분자; 사이클린 키나제 및 이의 억제제가 포함된다.

[0350] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 과일 성숙의 지연과 연관된다. 지연된 과일 성숙은, 예를 들어 폴리갈락투로나제, 펙틴 에스터라제, β -(1-4)글루카나제(셀룰라제), β -갈락타나제(β -갈락토시다제), 또는 에틸렌 생합성 유전자, 예컨대 1-아미노사이클로프로판-1-카복실레이트 신타아제, 카로티노이드 생합성 유전자, 예컨대, 프레피토크 또는 피토크 생합성 유전자, 예를 들어 피토크 탈포화효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자의 유전자 발현을 감소시킴으로써 달성될 수 있다.

[0351] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 노화 증상의 지연과 연관된다. 적합한 표적 RNA 분자에는 신나모일-CoA:NADPH 환원효소 또는 신나모일 알코올 탈수소효소가 포함된다. 추가 표적 RNA 분자가 기재되어 있다(WO 1995/07993 예).

[0352] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 식품, 바람직하게는 종자에서 섬유 함량의 변형과 연관된다. 예를 들어, RNA 분자는 코페산 O-메틸트랜스퍼라제 또는 신나모일 알코올 탈수소효소의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0353] 1edRNA 분자

[0354] 소정 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 제2 RNA 성분에 공유 연결되는 제1 RNA 성분을 포함한다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 자가-혼성화되거나 폴딩되어 "덤벨" 또는 1edRNA 구조를 형성하며, 예를 들어 도 1을 참고한다. 하나의 구현예에서, 분자는 하기 중 하나 이상을 추가로 포함한다:

[0355] - 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오타이드 서열;

[0356] - 5' 리더 서열; 및,

[0357] - 3' 트레일러 서열.

- [0358] 하나의 구현예에서, 제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되며, 여기서 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제1 루프 서열 및 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 혼성화하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역과 혼성화될 수 있다.
- [0359] 또 다른 구현예에서, 제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되며, 여기서 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제1 루프 서열 및 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드의 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체와 서열이 동일하다. 이의 일례로서 이들 두 구현예의 제1 RNA 성분을 도 1a의 왼쪽 방향 절반에 또는 도 1b의 오른쪽 방향 절반에 도식적으로 나타낸다.
- [0360] 또 다른 구현예에서, 제1 RNA 성분은 제1 5' 리보뉴클레오타이드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되며, 여기서 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 제1 RNA 성분에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제1 루프 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 각각 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드이고 이에 의해 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드는 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드와 전체적으로 염기쌍을 형성하고, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일하다.
- [0361] 이러한 구현예에서, 제1 5' 리보뉴클레오타이드 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드 간에 형성되는 염기쌍은 제1 RNA 성분의 자가-혼성화에 의해 형성되는 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍인 것으로 간주된다, 즉 이것이 dsRNA 영역의 말단을 정의한다.
- [0362] 하나의 구현예에서, 제1 센스 서열은 표적 RNA의 영역과 실질적인 서열 동일성을 가지며, 이 동일성은 20개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 서열에 대한 것일 수 있다. 하나의 구현예에서 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 서열이 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 100% 동일하다. 하나의 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5' 말단으로부터의 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개의 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자 영역과 100% 동일하며, 나머지 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일하다.
- [0363] 하나의 구현예에서 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또한, 상기 구현예에서, 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자 영역과 100% 동일할 수 있고, 나머지 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 100% 동일하다.
- [0364] 하나의 구현예에서, 제1 안티센스 서열은 표적 RNA 영역의 상보체와 실질적인 서열 동일성을 가지며, 이 동일성은 상보체의 20개 미만의 뉴클레오타이드 길이의 서열에 대한 것일 수 있다. 하나의 구현예에서 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체는

서열이 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체는 100% 동일하다. 하나의 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 5' 말단으로부터 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개의 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자 영역의 상보체와 100% 동일하며, 나머지 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자의 상보체와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일하다.

[0365] 하나의 구현예에서 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체는 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또한, 상기 구현예에서, 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개의 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자 영역의 상보체와 100% 동일하며, 나머지 리보뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자의 상보체와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오타이드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 100% 동일하다.

[0366] 또 다른 구현예에서, 제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드로 구성되며, 여기서 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오타이드는 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오타이드의 제2 루프 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 제2 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열과 염기쌍을 형성한다. 이 구현예에서, 제2 5' 리보뉴클레오타이드 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드 간에 형성된 염기쌍은 제2 RNA 성분의 자가-혼성화에 의해 형성되는 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍으로 간주된다.

[0367] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더 서열, 또는 5' 연장 서열을 포함하며, 이는 전사 시작 부위부터 나머지 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 시작부까지 유전 작제물에서 프로모터로부터의 전사 결과 생성될 수 있다. 상기 5' 리더 서열 또는 5' 연장 서열이 나머지 분자에 비해 상대적으로 짧은 것이 바람직하며, RN아제 처리에 의한 구현예에 있어서, RNA 분자는 전사-후 제거될 수 있다. 5' 리더 서열 또는 5' 연장 서열은 대부분 염기쌍을 형성하지 않을 수 있거나, 하나 이상의 줄기-루프 구조를 함유할 수 있다. 상기 구현예에서, 5' 리더 서열은 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우 제1 5' 리보뉴클레오타이드에, 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성될 수 있다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 서열은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 100개, 적어도 200개 리보뉴클레오타이드 길이이고, 바람직하게는 최대 250개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 또 다른 구현예에서, 5' 리더 서열은 적어도 50개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 서열은 적합한 증폭 반응을 통해 RNA 분자의 증폭을 위한 연장 서열로서 작용할 수 있다. 구현예에 있어서, 연장 서열은 폴리머라제를 통한 증폭을 촉진할 수 있다.

[0368] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 전사 종료 또는 RNA 분자를 인코딩하는 작제물에서의 폴리아데닐화 신호 전까지 계속되는 전사의 결과로 생성될 수 있는 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열을 포함한다. 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열은 폴리A 테일을 포함할 수 있다. 상기 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열이 나머지 분자 대비 상대적으로 짧은 것이 바람직하며, RN아제 처리에 의한 구현예에 있어서, RNA 분자로부터 전사-후 제거될 수 있다. 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열은 대부분 염기쌍을 형성하지 않을 수 있거나, 하나 이상의 줄기-루프 구조를 함유할 수 있다. 상기 구현예에서, 3' 트레일러 서열은 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성될 수 있다. 하나의 구현예에서, 3' 리더 서열은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 100개, 적어도 200개 리보뉴클레오타이드 길이이고, 바람직하게는 최대 250개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 또 다른 구현예에서, 3' 리더 서열은 적어도 50개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 3' 트레일러 서열은 적합한 증폭 반응을 통해 RNA 분자의 증폭을 위한 연장 서열로서 작용할 수 있다. 구현예에 있어서, 연장 서열은 폴리머라제를 통한 증폭을 촉진할 수 있다.

[0369] 하나의 구현예에서, 2개의 리보뉴클레오타이드를 제외한 모두가 2개의 다른 뉴클레오타이드에 공유 연결된다, 즉 RNA 분자는 자가-상보적 영역을 가진 단 하나의 RNA 가닥으로 구성되며, 이에 따라 단 하나의 5' 말단부 뉴클레오타이드 및 하나의 3' 말단부 뉴클레오타이드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 4개의 리보뉴클레오타이드를 제외한 모

두가 2개의 다른 뉴클레오타이드에 공유 연결된다, 즉 RNA 분자는 혼성화되는 상보적 영역을 갖는 2개의 RNA 가닥으로 구성되며, 이에 따라 단 2개의 5' 말단부 뉴클레오타이드 및 2개의 3' 말단부 뉴클레오타이드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 각각의 리보뉴클레오타이드는 2개의 다른 뉴클레오타이드에 공유 연결된다, 즉 RNA 분자는 원형일 뿐만 아니라 자가-상보적 영역을 가지며, 이에 따라 5' 말단부 뉴클레오타이드 및 3' 말단부 뉴클레오타이드를 갖지 않는다.

[0370] 하나의 구현예에서, RNA 분자의 이중-가닥 영역은 센스 RNA 서열 또는 안티센스 RNA 서열, 또는 둘 다에서 페어링되지 않은 뉴클레오타이드로 생성되는 하나 이상의 볼록부를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 일련의 볼록부를 포함한다. 구현예에 있어서, RNA 분자의 이중-가닥 영역은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 볼록부를 가질 수 있다. 각각의 볼록부는 독립적으로, 1개 또는 2개 이상의 페어링되지 않은 뉴클레오타이드 내지 10개만큼 많은 뉴클레오타이드일 수 있다. 더 긴 서열은 dsRNA 영역에서 센스 또는 안티센스 서열에서 루프에 빠져나올 수 있고, 이는 내부적으로 염기쌍을 형성하거나 페어링되지 않은 채 유지될 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자의 이중-가닥 영역은 볼록부를 포함하지 않는다, 즉 dsRNA 영역의 전장에 따라 전체적으로 염기쌍을 형성한다.

[0371] 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되거나, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열은 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되거나, 둘 다이다. 또 다른 구현예에서, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 개입 뉴클레오타이드가 존재한다. 이러한 개입 뉴클레오타이드는 표적 RNA 분자와 서열이 관련되지는 않지만, 인접한 센스 및 안티센스 서열의 염기쌍 형성 안정화를 보조할 수 있는 것으로 이해된다.

[0372] 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열의 20개의 연속 뉴클레오타이드는 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되며, 제1 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열의 20개의 연속 뉴클레오타이드는 임의의 개입 뉴클레오타이드 없이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 개입 뉴클레오타이드가 존재한다. 이러한 개입 뉴클레오타이드는 RNA 분자의 이중-가닥 영역의 일부로서 염기쌍을 형성할 수 있지만, 표적 RNA와 서열이 관련되지 않는다. 이들은 이중-가닥 영역에 증가된 안정성을 제공하거나 RNA 분자의 2개 말단을 함께 유지하고 5' 또는 3' 말단, 또는 둘 다가 염기쌍을 형성하지 않은 채 놔두지 않는 것을 보조할 수 있다.

[0373] 하나의 구현예에서, 상기 참조된 제1 및 제2 RNA 성분은 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일한 제1 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 분자의 다른 성분 간 스페이서로서 작용한다. 예를 들어, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 상기 영역 및 루프 간에 스페이서로서 작용할 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일한 여러 센스 리보뉴클레오타이드 서열 및 이들 서열 간에 스페이서로서 작용하는 연결 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일한 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 리보뉴클레오타이드 서열이 RNA 분자에서 제공되며, 각각 연결 리보뉴클레오타이드 서열에 의해 다른 서열(들)과 분리된다.

[0374] 하나의 구현예에서, 상기 참조된 RNA 분자는 5' 리더 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 서열은 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되거나 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 연결되는 경우 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 리보뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 지질기, 예컨대 콜레스테롤, 또는 비타민, 예컨대 바이오틴, 또는 폴리펩타이드의 부착에 의한 구현예에 있어서, 변형된 5' 또는 3' 말단을 갖는다. 이러한 변형은 RNA가 기능할 진행 세포 내로의 RNA 분자의 흡수를 보조할 수 있다.

[0375] 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 100개 미만의 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 50개 미만의 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 20개 미만의 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 10개 미만의 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 5개 미만의 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 1개 내지 100개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 1개 내지 50개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의

구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 1개 내지 20개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 1개 내지 10개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열은 1개 내지 5개 리보뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드는 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 연결 리보뉴클레오타이드 서열의 리보뉴클레오타이드는 모두 염기쌍을 형성하거나, 1개, 2개 또는 3개를 제외한 모든 리보뉴클레오타이드가 염기쌍을 형성한다.

[0376] 하나의 구현예에서, 제1 또는 제2 RNA 성분은 헤어핀 구조를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 RNA 성분은 각각 헤어핀 구조를 포함한다. 이러한 구현예에서, 헤어핀 구조는 줄기-루프일 수 있다. 따라서, 하나의 구현예에서, RNA 분자는 각각 헤어핀 구조를 포함하는 제1 및 제2 RNA 성분을 포함할 수 있고, 여기서 헤어핀은 링커 서열에 의해 공유 결합된다. 예를 들어, 도 1을 참고한다. 하나의 구현예에서, 링커 서열은 하나 이상의 페어링되지 않은 리보핵산(들)이다. 하나의 구현예에서, 링커 서열은 1개 내지 10개의 페어링되지 않은 리보뉴클레오타이드이다.

[0377] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 이중 헤어핀 구조, 즉 "ledRNA 구조" 또는 "덤벨 구조"를 갖는다. 상기 구현예에서, 제1 헤어핀은 제1 RNA 성분이며 제2 헤어핀은 제2 RNA 성분이다. 이러한 구현예에서, 제1 3' 리보뉴클레오타이드 및 제2 5' 리보뉴클레오타이드, 또는 제2 3' 리보뉴클레오타이드 및 제1 5' 리보뉴클레오타이드 중 한 쪽만 공유 연결된다. 상기 구현예에서, 다른 5'/3' 리보뉴클레오타이드는 닉에 의해 분리될 수 있다(즉, 5'/3' 리보뉴클레오타이드 간 포스포다이에스테르 결합이 없는 dsRNA 분자 내 불연속성). 상기 유형 배열의 하나의 구현예를 도 1b에 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 각각의 5'/3' 리보뉴클레오타이드는 루프에 의해 분리될 수 있다. 5' 리더 및 3' 트레일러 서열의 길이는 동일하거나 상이할 수 있다. 구현예에 있어서, 5' 리더는 3' 트레일러 서열보다 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 50개, 100개, 200개, 500개 리보뉴클레오타이드가 더 길 수 있거나 반대일 수 있다.

[0378] RNA 분자가 이중 헤어핀 구조를 갖는 구현예에서, 제2 헤어핀(제1 헤어핀 구조에 부가하여)은 표적 RNA 분자 영역 또는 그 상보체와 각각 서열이 실질적으로 동일한 센스 RNA 서열 및 안티센스 RNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 각각의 헤어핀은 동일한 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 실질적으로 동일한 일련의 리보뉴클레오타이드를 갖는다. 하나의 구현예에서, 각각의 헤어핀은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 실질적으로 동일한 일련의 리보뉴클레오타이드를 갖는다. 하나의 구현예에서, 각각의 헤어핀은 상이한 표적 RNA 분자 영역과 서열이 실질적으로 동일한 일련의 리보뉴클레오타이드를 가지며, 즉 RNA 분자는 서열이 관련되지 않을 수 있는 2개의 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0379] RNA 분자의 이중 헤어핀 구조의 각각의 헤어핀에서, 각각의 헤어핀에서의 센스 및 안티센스 RNA 서열의 순서는, 5'에서 3' 순서로, 독립적으로 센스에 이어서 안티센스, 또는 안티센스에 이어서 센스일 수 있다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 이중 헤어핀 구조에서 센스 및 안티센스 서열의 순서는 안티센스-센스-센스-안티센스로서, 2개의 센스 서열이 인접하거나(도 1a), 센스-안티센스-안티센스-센스로서, 2개의 안티센스 서열이 인접해 있다(도 1b).

[0380] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5'에서 3' 순서로, 5' 리더 서열, 제1 루프, 센스 RNA 서열, 제2 루프 및 3' 트레일러 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 5' 및 3' 리더 서열은 센스 가닥에 공유 결합하여 dsRNA 서열을 형성한다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 서로 공유 결합되지 않는다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 닉에 의해 분리된다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 함께 결합되어 폐쇄된 구조를 갖는 RNA 분자를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 루프에 의해 분리된다.

[0381] 용어 "루프"는 본 개시의 맥락에서 사용되어 일련의 비-상보적 리보뉴클레오타이드에 의해 형성되는 본원에서 개시되는 RNA 분자에서의 루프 구조를 나타낸다. 루프는 일반적으로 제1 및 제2 RNA 성분 간에 일련의 염기쌍을 뒤따르거나 제1 및 제2 RNA 성분 중 하나 또는 둘 다에서 센스 RNA 서열 및 안티센스 RNA 서열을 연결한다. 하나의 구현예에서, 모든 루프 리보뉴클레오타이드는 일반적으로 4개~10개 리보뉴클레오타이드의 더 짧은 루프에 있어서, 비-상보적이다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 루프에서의 일부 리보뉴클레오타이드는 이들 염기쌍이 루프 구조를 형성할 수 있도록 하는 한, 상보적이며 루프 서열 내에 염기쌍을 형성할 수 있다. 예를 들어, 적어도 5%, 적어도 10%, 또는 적어도 15%의 루프 리보뉴클레오타이드는 상보적이다. 루프의 구현예에는 줄기 루프 또는 헤어핀, 슈도노트(pseudoknot) 및 테트라루프가 포함된다.

[0382] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 2개의 루프만을 포함하며, 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개 루프, 바람

직하게는 최대 10개 루프를 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 4개 루프를 포함할 수 있다.

- [0383] 다양한 크기의 루프가 본 개시에 의해 고려된다. 예를 들어, 루프는 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 루프는 15개, 20개, 25개 또는 30개 뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 하나의 또는 모든 루프 서열은 20개 뉴클레오타이드보다 길다. 다른 구현예에서, 루프는 더 크며, 예를 들어 50개, 100개, 150개, 200개 또는 300개 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 루프는 160개 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 덜 바람직하게는, 루프가 센스 및 안티센스 RNA 서열의 혼성화를 방해하지 않는 한, 루프는 200개, 500개, 700개 또는 1,000개 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 각각의 루프는 동일한 수의 리보뉴클레오타이드를 갖는다. 예를 들어, 루프는 100개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 루프는 600개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 루프는 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 예를 들어, 루프는 바람직하게는 4개 내지 50개 리보뉴클레오타이드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 루프는 상이한 수의 리보뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0384] 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 루프는 RNA 분자에서 스플라이스되어 나올 수 있는 인트론을 포함한다. 하나의 구현예에서, 인트론은 식물 유전자로부터 유래된다. 예시적인 인트론에는 옥수수 알코올 탈수소효소 1(Adh 1)의 인트론 3(GenBank: AF044293), 콩 베타-콘글리시닌 알파 서브유닛의 인트론 4(GenBank: AB051865); 리블로스-1,5-비스포스페이트 카복실라제(RBC) 소형 서브유닛에 대한 완두콩 rbcS-3A 유전자의 인트론 중 하나(GenBank: X04333)가 포함된다. 적합한 인트론의 다른 구현예는 문헌(McCullough and Schuler, 1997; Smith et al., 2000)에서 논의된다.
- [0385] 다양한 구현예에서, 루프는 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 연속 염기쌍의 말단에 있을 수 있고, 이는 정규 염기쌍일 수 있거나 하나 이상의 비-정규 염기쌍이 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 덜 바람직하게는, 특히 척추동물 세포에 있어서, 루프는 적어도 20개, 30개, 50개, 100개, 200개, 또는 500개 이상의 연속 염기쌍의 말단에 있을 수 있다.
- [0386] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및 이와 전체적으로 염기쌍을 형성한 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이는 각각 표적 RNA 분자 영역과 서열이 동일하다. 예를 들어, RNA 분자는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 또는 12개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 및 이와 전체적으로 염기쌍을 형성한 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 이 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 각각 독립적으로 표적 RNA 분자 영역과 서열이 동일하다. 상기 구현예에서, 임의의 하나 이상의 또는 모든 서열은 연결 리보뉴클레오타이드 서열(들)에 의해 분리될 수 있다. 상기 구현예에서, 임의의 하나 이상의 또는 모든 서열은 루프에 의해 분리될 수 있다.
- [0387] 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 동일하다. 예를 들어, 서열은 동일한 표적 분자의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개의 영역과 동일할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 서열이 동일하다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 동일한 영역과 서열이 동일하다. 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 상이한 표적 RNA 분자와 서열이 동일하다. 구현예에 있어서, 서열은 상이한 표적 분자의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 영역과 동일할 수 있다.
- [0388] 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오타이드 서열은 개입 루프(스페이스) 서열을 갖지 않는다.
- [0389] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오타이드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오타이드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오타이드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오타이드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오타이드를 갖는다. 상기 구현예에서, 5' 말단의 리보뉴클레오타이드 및 3' 말단의 리보뉴클레오타이드는 직접 공유 결합되지 않지만 염기쌍을 형성한 각각에 인접하여 배치된다.
- [0390] 또 다른 구현예에서, RNA 성분의 연속 염기쌍에는 적어도 하나의 갭이 산재된다. 하나의 구현예에서, "갭"은 페어링되지 않은 리보뉴클레오타이드에 의해 제공된다. 또 다른 구현예에서, "갭"은 결합되지 않은 5' 리더 서열 및/또는 3' 트레일러 서열에 의해 제공된다. 상기 구현예에서, 갭은 "결합되지 않은 갭"으로 언급될 수 있다. 미스매치 및 결합되지 않은 갭(들)은 RNA 분자의 다양한 위치(들)에 배치될 수 있다. 구현예에 있어서, 결합되지 않은 갭은 안티센스 서열을 바로 뒤따를 수 있다. 또 다른 구현예에서, 결합되지 않은 갭은 RNA 분자의 루프에

가까울 수 있다. 또 다른 구현예에서, 결합되지 않은 갭은 적어도 2개의 루프 사이에 거의 동일 거리에 배치된다.

[0391] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 단일 가닥의 RNA로부터 생성된다. 하나의 구현예에서, 단일 가닥은 원형으로 폐쇄되지 않고, 예를 들어, 결합되지 않은 갭을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 원형으로 폐쇄된 분자이다. 폐쇄된 분자는 결합되지 않은 갭을 포함하는 상기 참조된 RNA 분자를, 예를 들어 RNA 리가제로 결합시켜 생성될 수 있다.

[0392] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 5'-연장 서열 또는 3'-연장 서열, 또는 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다.

[0393] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다.

[0394] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0395] - 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열;

[0396] - 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열;

[0397] - 제1 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열;

[0398] - 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열;

[0399] - 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열;

[0400] - 제2 5' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오타이드에 공유 연결되는 3' 연장 서열.

[0401] RNA 분자를 인코딩하는 핵산

[0402] 당업자는 상기 기재로부터 본 개시가 또한 본원에서 개시된 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 핵산 및 이의 성분 부분을 제공함을 이해할 것이다. 예를 들어, 핵산은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 중 임의의 하나 이상에 나타난 서열을 포함한다. 핵산은 숙주 세포에서의 발현 후 부분적으로 정제될 수 있다. 용어 "부분적으로 정제된"은 일반적으로 지질, 핵산, 다른 펩타이드, 및 숙주 세포에서 연관되는 다른 오염 분자와 분리된 RNA 분자를 나타내기 위해 사용된다. 바람직하게는, 부분적으로 정제된 폴리뉴클레오타이드는 연관되는 다른 성분이 적어도 60% 없고, 보다 바람직하게는 적어도 75% 없고, 보다 바람직하게는 적어도 90% 없다.

[0403] 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 폴리뉴클레오타이드는 이중성 폴리뉴클레오타이드이다. 용어 "이중성 폴리뉴클레오타이드"는 당분야에서 잘 이해되며, 세포에 내인성이 아닌 폴리뉴클레오타이드를 나타내거나, 천연 서열이 변경된 천연 폴리뉴클레오타이드, 또는 그 발현이 재조합 DNA 기법에 의한 세포의 조작 결과 정량적으로 변경되는 천연 폴리펩타이드이다.

[0404] 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 폴리뉴클레오타이드는 합성 폴리뉴클레오타이드이다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 기존 핵산 서열을 필요로 하지 않는 기법, 예컨대 DNA 프린팅 및 올리고뉴클레오타이드 합성을 사용하여 생성될 수 있다. 또 다른 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 이중(xeno) 핵산으로부터 생성된다.

[0405] 실시예에서, 바람직하게는 5' 연장 서열에 또는 적어도 하나의 루프 서열에 인트론을 포함하는 RNA 전구체 분자를 인코딩하며, 인트론은 숙주 세포에서 또는 시험관내에서 폴리뉴클레오타이드의 전사 동안 스플라이싱되어 나갈 수 있는, 본원에서 기재되는 폴리뉴클레오타이드. 또 다른 예에서, 루프 서열은 2개, 3개, 4개, 또는 5개 이상의 인트론을 포함한다. 본 개시는 또한 발현 작제물, 예컨대 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 개시의 단리된 핵산을 포함하는 DNA 작제물을 제공한다. 하나의 예에서, 이러한 단리된 핵산 및/또는 발현 작제물은 세포 또는

비-인간 유기체에서 제공된다. 하나의 예에서 단리된 핵산은 세포 또는 비-인간 유기체의 게놈 내로 안정적으로 통합된다. 적합한 발현 작제물, 프로모터 및 이를 포함하는 세포의 다양한 예가 아래에서 논의된다.

[0406] 본 개시에 따른 RNA 분자의 합성은 당분야에 알려진 다양한 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 실시예 섹션은 시험관내 합성예를 제공한다. 상기 예에서, 본원에서 개시되는 RNA 분자를 포함하는 작제물은 3' 말단에서 제한효소로 절단되고, 침전되고, 정제되고, 정량된다. RNA 합성은 T7, IPTG 시스템을 사용하여 HT115 전기전공 적격 세포의 형질전환 및 RNA 합성의 유도 후 박테리아 배양에서 달성될 수 있다.

[0407] 재조합 벡터

[0408] 본 발명의 하나의 구현예에는 재조합 벡터가 포함되며, 이는 본원에서 정의되는 적어도 하나의 RNA 분자를 포함하며 RNA 분자를 숙주 세포 내로 전달할 수 있다. 재조합 벡터에는 발현 벡터가 포함된다. 재조합 벡터는 이중성 폴리뉴클레오티드 서열, 즉, 본원에서 정의되는 RNA 분자에 자연적으로 인접해서 확인되지 않는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하며, 이는 바람직하게는 상이한 종으로부터 유래된다. 벡터는 RNA 또는 DNA일 수 있고, 전형적으로 바이러스로부터 유래되는 바이러스 벡터, 또는 플라스미드이다.

[0409] 다양한 바이러스 벡터가 본 개시에 따라 RNA 분자를 전달하고 발현을 매개하기 위해 사용될 수 있다. 바이러스 벡터의 선택은 일반적으로 다양한 파라미터, 예컨대 전달을 위해 표적화된 세포 또는 조직, 벡터의 형질도입 효율 및 병원성에 의존할 것이다. 하나의 예에서, 바이러스 벡터는 숙주 세포 염색질 내로 통합된다(예컨대 렌티바이러스). 또 다른 예에서, 바이러스 벡터는 우선적으로 염색체외 에피솜으로 세포 핵에서 지속된다(예컨대 아테노바이러스). 이들 유형의 바이러스 벡터의 예에는 종양레트로바이러스, 렌티바이러스, 아테노-연관 바이러스, 아테노바이러스, 헤르페스 바이러스 및 레트로바이러스가 포함된다.

[0410] 플라스미드 벡터에는 전형적으로 용이한 선택, 증폭, 및 원핵 세포에서 발현 카세트의 형질전환을 제공하는 추가적인 핵산 서열, 예컨대, pUC-유래 벡터, pGEM-유래 벡터 또는 하나 이상의 T-DNA 영역을 함유하는 이원성 벡터가 포함된다. 추가적인 핵산 서열에는 벡터의 자율 복제를 제공하기 위한 복제 기원, 바람직하게는 항생제 또는 제초제 내성을 인코딩하는, 선별 마커 유전자, 핵산 작제물에서 인코딩되는 핵산 서열 또는 유전자를 삽입하기 위한 여러 부위를 제공하는 고유한 다중 클로닝 부위, 및 원핵 및 진핵(특히 식물) 세포의 형질전환을 증강시키는 서열이 포함된다.

[0411] 본원에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 핵산(예컨대, DNA) 절편 간 기능적 상관관계를 나타낸다. 전형적으로, 이는 전사 조절 요소(프로모터)의 전사된 서열에 대한 기능적 상관관계를 나타낸다. 예를 들어, 프로모터는 이것이 적절한 세포에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 조절하는 경우, 본원에서 정의되는 RNA 분자의 코딩 서열과 작동 가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 전사되는 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 전사 조절 요소는 전사되는 서열에 물리적으로 인접하며, 즉 이들은 시스 작용한다. 그러나, 일부 전사 조절 요소, 예컨대 인핸서는 이들이 전사를 증강시키는 코딩 서열에 물리적으로 인접하거나 가까운 인근에 배치될 필요는 없다.

[0412] 여러 프로모터가 존재하는 경우, 각각의 프로모터는 독립적으로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0413] 형질전환체의 확인을 촉진하기 위해, 재조합 벡터는 바람직하게는 선별 또는 스크리닝 가능한 마커 유전자를 포함한다. "마커 유전자"란 마커 유전자를 발현하는 세포에 독특한 표현형을 부여하며, 이에 따라 이러한 형질전환된 세포가 마커를 갖지 않는 세포와 구별될 수 있도록 하는 유전자를 의미한다. 선별 마커 유전자는 선택 제제(예컨대, 제초제, 항생제)에 대한 내성에 기반하여 "선택할" 수 있는 형질을 부여한다. 스크리닝 가능한 마커 유전자(또는 리포터 유전자)는 관찰 또는 평가를 통해, 즉 "스크리닝"에 의해 확인할 수 있는 형질(예컨대, 형질전환되지 않은 세포에 존재하지 않는 β -글루쿠코니다제, 루시페라제, GFP 또는 다른 효소 활성)을 부여한다. 식물 형질전환체의 선택을 위한 예시적인 선별 마커에는 비제한적으로 하이그로마이신 B 내성을 인코딩하는 *hyg* 유전자; 카나마이신, 파로모마이신에 대한 내성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(*npt II*) 유전자; 예를 들어, EP 256223에 기재된 바와 같이, 글루타치온 유래 제초제에 대한 내성을 부여하는 래트 간으로부터의 글루타치온-S-트랜스퍼라제 유전자; 예를 들어, WO 87/05327에 기재된 바와 같은, 과발현 시, 글루타민 합성효소 억제제, 예컨대 포스포노트리신에 대한 내성을 부여하는 글루타민 합성효소 유전자; 예를 들어, EP 275957에 기재된 바와 같은, 선택 제제 포스포노트리신에 대한 내성을 부여하는 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*)로부터의 아세틸트랜스퍼라제 유전자; 예를 들어, 문헌[Hinchee et al. (1988)]에 기재된 바와 같은, N-포스포노메틸글리신에 대한 내성을 부여하는 5-에놀시킴이트-3-포스페이트 신타아제(EPSPS)를 인코딩하는 유전자; 예를 들어, WO91/02071에 기재된 바와 같은 비알라포스에 대한 내성을 부

여하는 *bar* 유전자; 니트릴라제 유전자, 예컨대 브로목시닐에 대한 내성을 부여하는 클레브시엘라 오제내 (*Klebsiella ozaenae*)로부터의 *bxn*(Stalker et al., 1988); 메토티렉세이트에 대한 내성을 부여하는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자(Thillet et al., 1988); 이미다졸리논, 설폰닐우레아, 또는 다른 ALS-억제 화학물질에 대한 내성을 부여하는 돌연변이체 아세트락테이트 신타아제 유전자(ALS)(EP 154,204); 5-메틸 트립토판에 대한 내성을 부여하는 돌연변이된 안트라닐레이트 신타아제 유전자; 또는 제초제에 대한 내성을 부여하는 달라폰 데할로게나제 유전자가 포함된다.

[0414] 바람직하게는, 재조합 벡터는 세포, 예컨대 식물 세포의 게놈 내로 안정적으로 포함된다. 따라서, 재조합 벡터는 벡터가 게놈 내로, 또는 세포의 염색체 내로 포함될 수 있도록 하는 적절한 요소를 포함할 수 있다.

[0415] 발현 벡터

[0416] 본원에서 사용되는 "발현 벡터"는 숙주 세포를 형질전환하고 본원에서 정의되는 RNA 분자의 발현을 일으킬 수 있는 DNA 벡터이다. 본 발명의 발현 벡터는 조절 서열, 예컨대 전사 제어 서열, 번역 제어 서열, 복제 기원, 및 숙주 세포와 상용성이고 본 개시에 따른 RNA 분자의 발현을 제어하는 다른 조절 서열을 함유한다. 특히, 본 발명의 발현 벡터에는 전사 제어 서열이 포함된다. 전사 제어 서열은 전사의 개시, 신장, 및 종결을 제어하는 서열이다. 특히 중요한 전사 제어 서열은 전사 개시를 제어하는 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터 및 리프레서 서열이다. 사용되는 조절 서열의 선택은 표적 유기체, 예컨대 관심 식물 및/또는 표적 기관 또는 조직에 의존한다. 이러한 조절 서열은 임의의 진행 유기체, 예컨대 식물 또는 식물 바이러스로부터 수득될 수 있거나, 화학적으로 합성될 수 있다.

[0417] 식물 세포의 안정한 전달감염에 또는 트랜스제닉 식물의 확립에 적합한 예시적인 벡터는, 예를 들어 문헌 [Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987, Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989, 및 Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990]에 기재되었다. 전형적으로, 식물 발현 벡터에는, 예를 들어, 5' 및 3' 조절 서열의 전사 제어 하의 하나 이상의 클로닝된 식물 유전자 및 우성 선별 마커가 포함된다. 이러한 식물 발현 벡터는 또한 프로모터 조절 영역(예컨대, 유도성 또는 구성적, 환경적으로 또는 발생학적으로 조절되는, 또는 세포-특이적 또는 조직-특이적 발현을 제어하는 조절 영역), 전사 개시 시작 부위, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 부위, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다.

[0418] 본 발명의 벡터는 또한 무세포 발현 시스템에서 본원에서 정의되는 RNA 분자를 생성하기 위해 사용될 수 있고, 이러한 시스템은 당분야에 잘 알려져 있다.

[0419] 하나의 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 RNA 분자를 발현을 유도할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 예에서, 프로모터는 시험관내에서 기능한다. 하나의 예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 프로모터이다. 예를 들어, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터일 수 있다. 또 다른 예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 II 프로모터일 수 있다. 그러나, 프로모터의 선택은 표적 유기체, 예컨대 관심 식물, 곤충 및/또는 표적 기관 또는 조직에 의존할 수 있다. 예시적인 포유류 프로모터에는 CMV, EF1a, SV40, PGK1, Ubc, 인간 베타 액틴, CAG, TRE, UAS, CaMKIIa, CAL1, 10, TEF1, GDS, ADH1, CaMV35S, Ubi, H1 및 U6이 포함된다. 예시적인 곤충 프로모터에는 Ac5 및 폴리헤드론이 포함된다. 식물 세포에서 활성이 있는 여러 구성적 프로모터가 또한 기재되었다. 식물에서의 구성적 발현에 적합한 프로모터에는 비제한적으로 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 현삼(Figwort) 모자이크 바이러스(FMV) 35S, 리볼로스-1,5-비스-포스페이트 카복실라제의 작은 서브유닛(SSU)으로부터의 광-유도성 프로모터, 쌀 세포질 트리오스포스페이트 이소머라제 프로모터, 아라비도시스 아테닌 포스포리보실트랜스퍼라제 프로모터, 쌀 액틴 1 유전자 프로모터, 만노핀 신타아제 및 옥토판 신타아제 프로모터, Adh 프로모터, 수크로스 신타아제 프로모터, R 유전자 복합체 프로모터, 및 엽록소 α/β 결합 단백질 유전자 프로모터가 포함된다. 이들 프로모터는 식물에서 발현된 DNA 벡터를 생성하기 위해 사용되었으며, 예를 들어, WO 84/02913을 참고한다. 이들 프로모터는 모두 다양한 유형의 식물-발현 가능 재조합 DNA 벡터를 생성하기 위해 사용되었다.

[0420] 식물의 원천 조직, 예컨대, 잎, 종자, 뿌리 또는 줄기에서의 발현 목적을 위해, 본 발명에서 이용되는 프로모터가 이들 특정 조직에서 상대적으로 고발현되는 것이 바람직하다. 상기 목적을 위해, 조직 또는 세포에 특이적이거나 여기서 증강되는 발현을 갖는 유전자에 대한 여러 프로모터로부터 선택할 수 있다. 문헌에서 보고되는 이러한 프로모터의 예에는 완두콩으로부터의 엽록체 글루타민 합성효소 GS2 프로모터, 밀로부터의 엽록체 프록토스-1,6-바이포스파타제 프로모터, 감자로부터의 핵 광합성 ST-LS1 프로모터, 아라비도시스 탈리아나로부터의 세린/트레오닌 키나제 프로모터 및 글루코아밀라제(CHS) 프로모터가 포함된다. 동양 낙엽송(라릭스 라리시나

(*Larix laricina*))으로부터의 리볼로스-1,5-비스포스페이트 카복실라제 프로모터, Cab 유전자, 소나무로부터의 Cab6에 대한 프로모터, 밀로부터 Cab-1 유전자에 대한 프로모터, 시금치로부터 Cab-1 유전자에 대한 프로모터, 쌀로부터의 Cab 1R 유전자에 대한 프로모터, 옥수수(*Zea mays*)로부터의 피루베이트, 오르소포스페이트 디키나제 (PPDK) 프로모터, 담배 Lhcb1*2 유전자에 대한 프로모터, 아라비도시스 탈리아나 Suc2 수크로스-H³⁰ 심포터 프로모터, 및 시금치로부터 틸라코이드 막 단백질 유전자(PsaD, PsaF, PsaE, PC, FNR, AtpC, AtpD, Cab, RbcS)에 대한 프로모터가 또한 광합성 활성 조직에서 활성이 있는 것으로 보고된다. 엽록소 α/β -결합 단백질에 대한 다른 프로모터, 예컨대 백겨자(시나피스 알바(*Sinapis alba*))로부터의 LhcB 유전자 및 PsbP 유전자에 대한 프로모터가 또한 본 발명에서 이용될 수 있다.

[0421] (1) 열, (2) 빛(예컨대, 완두콩 RbcS-3A 프로모터, 옥수수 RbcS 프로모터), (3) 호르몬, 예컨대 아브시스산, (4) 상처(예컨대, WunI), 또는 (5) 화학물질, 예컨대 메틸 자스모네이트, 살리실산, 스테로이드 호르몬, 알코올, 독성완화제(WO 97/06269)에 의해 조절되는 프로모터를 포함하는 환경, 호르몬, 화학물질, 및/또는 발생 신호에 반응하여 조절되는 다양한 식물 유전자 프로모터가 또한 식물 세포에서 RNA-결합 단백질 유전자의 발현을 위해 사용될 수 있거나, 또한 유리하게는 (6) 기관-특이적 프로모터를 채택할 수 있다

[0422] 본원에서 사용되는 용어 "식물 저장 기관 특이적 프로모터"는 다른 식물 조직과 비교되는 경우, 우선적으로 식물의 저장 기관에서 유전자 전사를 유도하는 프로모터를 나타낸다. 식물의 싱크(sink) 조직, 예컨대 감자 식물의 덩이줄기, 토마토의 과실, 또는 대두, 유채, 목화, 옥수수, 밀, 쌀, 및 보리의 종자에서의 발현 목적을 위해, 본 발명에서 이용되는 프로모터가 이들 특정 조직에서 상대적으로 고발현되는 것이 바람직하다. β -콘글리시닌에 대한 프로모터 또는 다른 종자-특이적 프로모터, 예컨대 나뭇잎, 제인, 리닌 및 파세올린 프로모터가 사용될 수 있다. 뿌리 특이적 프로모터가 또한 사용될 수 있다. 이러한 프로모터의 일례는 산 키티나제 유전자에 대한 프로모터이다. 뿌리 조직에서의 발현은 또한 확인된 CaMV 35S 프로모터의 뿌리 특이적 하위도메인을 이용하여 달성될 수 있었다.

[0423] 특히 바람직한 구현예에서, 프로모터는 지질 생합성이 일어나는 조직 및 기관에서의 발현을 유도한다. 이러한 프로모터는 종자에서 지질 조성의 변형에 적합한 시간에 종자 발생에서 작용할 수 있다. 종자-특이적 발현을 위해 바람직한 프로모터에는 1) 종자에서 지질 생합성 및 축적에 관여되는 효소, 예컨대 탈포화효소 및 신장효소를 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터, 2) 종자 저장 단백질을 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터, 및 3) 종자에서 탄수화물 생합성 및 축적에 관여되는 효소를 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터가 포함된다. 적합한 종자 특이적 프로모터는 지방종자 평지 나뭇잎 유전자 프로모터(US 5,608,152), 비시아 파바(*Vicia faba*) USP 프로모터(Baumlein et al., 1991), 아라비도시스 올레오신 프로모터(WO 98/45461), 파세올루스 불가리스(*Phaseolus vulgaris*) 파세올린 프로모터(US 5,504,200), 브라시카(*Brassica*) Bce4 프로모터(WO 91/13980), 또는 레구민 B4 프로모터(Baumlein et al., 1992), 및 외떡잎 식물, 예컨대 옥수수, 보리, 밀, 호밀, 쌀 등에서 종자-특이적 발현을 야기하는 프로모터이다. 적합한 주목할만한 프로모터는 보리 lpt2 또는 lpt1 유전자 프로모터(WO 95/15389 및 WO 95/23230), 또는 WO 99/16890에 기재된 프로모터(보리 호르데인(hordein) 유전자, 쌀 글루텔린(glutelin) 유전자, 쌀 오리진(oryzin) 유전자, 쌀 프롤라민(prolamin) 유전자, 밀 글리아딘(gliadin) 유전자, 밀 글루텔린(glutelin) 유전자, 옥수수 제인(zein) 유전자, 귀리 글루텔린 유전자, 수수 카시린(kasirin) 유전자, 호밀 세칼린(secalin) 유전자로부터의 프로모터)이다. 다른 프로모터에는 문헌[Brown et al. (1998), Potenza et al. (2004)], US 20070192902 및 US 20030159173에 기재된 것들이 포함된다. 하나의 구현예에서, 종자 특이적 프로모터는 종자의 정의된 부분, 예컨대 떡잎(들) 또는 배젖에서 우선적으로 발현된다. 떡잎 특이적 프로모터의 예에는 비제한적으로 FP1 프로모터(Ellerstrom et al., 1996), 완두콩 레구민 프로모터(Perrin et al., 2000), 및 콩 피토헤마글루티닌 프로모터(Perrin et al., 2000)가 포함된다. 배젖 특이적 프로모터의 예에는 비제한적으로 옥수수 제인-1 프로모터(Chikwamba et al., 2003), 쌀 글루텔린-1 프로모터(Yang et al., 2003), 보리 D-호르데인 프로모터(Horvath et al., 2000) 및 밀 HMW 글루테닌 프로모터(Alvarez et al., 2000)가 포함된다. 추가 구현예에서, 종자 특이적 프로모터는 배에서 및/또는 종자 발아 후 발현되지 않거나 저수준으로만 발현된다.

[0424] 또 다른 구현예에서, 식물 저장 기관 특이적 프로모터는 과실 특이적 프로모터이다. 예에는 비제한적으로 토마토 폴리갈락투로나제, E8 및 Pds 프로모터뿐만 아니라 사과 ACC 산화효소 프로모터(리뷰를 위해, 문헌[Potenza et al., 2004] 참고)가 포함된다. 바람직한 구현예에서, 프로모터는 과실의 식용 부분, 예를 들어 과실의 껍질 또는 과실 내 종자 대비 과실의 심(pith)에서의 발현을 우선적으로 유도한다.

[0425] 하나의 구현예에서, 유도성 프로모터는 아스페르길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) alc 시스템이다. 아스

페르길러스 니들란스 alc 시스템 대신 사용될 수 있는 유도성 발현 시스템의 예는 문헌[Padidam (2003) 그리고 Corrado and Karali (2009)의 리뷰에 기재되어 있다. 또 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 독성완화제 유도성 프로모터, 예컨대, 옥수수 *ln2-1* 또는 *ln2-2* 프로모터(Hershey and Stoner, 1991)이며, 독성완화제 유도성 프로모터는 옥수수 GST-27 프로모터(Jepson et al., 1994), 또는 대두 GH2/4 프로모터(Ulmasov et al., 1995)이다.

[0426] 또 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 노화 유도성 프로모터, 예컨대 아라비돕시스로부터의 노화-유도성 프로모터 SAG(노화 연관 유전자) 12 및 SAG 13(Gan, 1995; Gan and Amasino, 1995) 및 브라시카 나푸스로부터의 LSC54(Buchanan-Wollaston, 1994)이다. 이러한 프로모터는 특히 잎에서, 식물 조직의 노화 개시 근처에 증가된 발현을 나타낸다.

[0427] 무성 조직에서의 발현을 위해, 잎-특이적 프로모터, 예컨대 리볼로스 바이포스페이트 카복실라제(RBCS) 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 토마토 RBCS1, RBCS2 및 RBCS3A 유전자는 잎 및 광 재배 묘목에서 발현된다(Meier et al., 1997). 문헌[Matsuoka et al. (1994)]에 기재된, 고 수준으로 잎과리 및 엽초의 엽육 세포에서 거의 전적으로 발현된 리볼로스 비스포스페이트 카복실라제 프로모터가 사용될 수 있다. 또 다른 잎-특이적 프로모터는 집광 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자 프로모터이다(문헌[Shiina et al., 1997] 참고). 문헌[Li et al. (1996)]에 기재된 아라비돕시스 탈리아나 myb-관련 유전자 프로모터(Atmyb5)는 잎-특이적이다. Atmyb5 프로모터는 어린 로제트 및 경쟁 잎의 가장자리 상의 발생 중인 잎 모상체, 턱엽, 및 표피 세포에서, 그리고 미성숙 종자에서 발현된다. 문헌[Busk et al. (1997)]에 의해 옥수수에서 확인된 잎 프로모터도 사용될 수 있다.

[0428] 일부 경우에서, 예를 들어 LEC2 또는 BBM이 재조합적으로 발현되는 경우, 트랜스유전자가 고수준으로 발현되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에서 사용될 수 있는 프로모터의 일례는 종자-특이적 발현 패턴을 보 유하지만 감소된 발현 수준을 갖는 절단된 나뭇 A 프로모터이다(Tan et al., 2011).

[0429] 5' 비-번역 리더 서열은 본 개시의 RNA 분자의 이중성 유전자 서열을 발현하도록 선택된 프로모터로부터 유래될 수 있거나, 생성될 효소의 코딩 영역에 대해 이중성일 수 있고, mRNA의 번역을 증가시키기 위해 요망되는 경우 특이적으로 변형될 수 있다. 트랜스유전자의 발현 최적화를 위한 리뷰에 대해서는, 문헌[Kozziel et al. (1996)]을 참고한다. 5' 비-번역 영역은 또한 식물 바이러스 RNA(특히 담배 모자이크 바이러스, 담배 부식(etch) 바이러스, 옥수수 난쟁이 모자이크 바이러스, 알팔파 모자이크 바이러스)로부터 적합한 진핵 유전자, 식물 유전자(밀 및 옥수수 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자 리더)로부터, 또는 합성 유전자 서열로부터 수득될 수 있다. 본 발명은 비-번역 영역이 프로모터 서열을 수반하는 5' 비번역 서열로부터 유래되는 작제물로 제한되지 않는다. 리더 서열은 또한 관련되지 않은 프로모터 또는 코딩 서열로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 유용한 리더 서열은 옥수수 Hsp70 리더(US 5,362,865 및 US 5,859,347), 및 TMV 오메가 요소를 포함한다.

[0430] 전사 종결은 관심 RNA 분자에 대해 발현 벡터에서 작동 가능하게 연결된 3' 비번역 DNA 서열에 의해 달성된다. 재조합 DNA 분자의 3' 비번역 영역은 RNA의 3' 말단으로 아데닐레이트 뉴클레오티드의 부가를 유도하도록 식물에서 기능하는 폴리아데닐화 신호를 함유한다. 3' 비번역 영역은 식물 세포에서 발현되는 다양한 유전자로부터 수득될 수 있다. 노팔린(nopaline) 신타아제 3' 비번역 영역, 완두콩 작은 서브유닛 루비스코(Rubisco) 유전자로부터의 3' 비번역 영역, 대두 7S 종자 저장 단백질 유전자로부터의 3' 비번역 영역이 상기 능력에서 일반적으로 사용된다. 아그로박테리움 종양-유도(Ti) 플라스미드 유전자의 폴리아데닐레이트 신호를 함유하는 3' 전사, 비번역 영역도 적합하다.

[0431] 전달 핵산

[0432] 전달 핵산은 세포에 외인성 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위해 사용될 수 있고 1개, 바람직하게는 2개의 경계(border) 서열 및 하나 이상의 관심 RNA 분자를 포함한다. 전달 핵산은 선별 마커를 인코딩할 수도 인코딩하지 않을 수도 있다. 바람직하게는, 전달 핵산은 박테리아에서 이원성 벡터의 일부를 형성하며, 여기서 이원성 벡터는 박테리아에서 벡터의 복제, 이원성 벡터를 함유하는 박테리아 세포의 선택, 또는 유지를 허용하는 요소를 추가로 포함한다. 진핵 세포로의 전달 시, 이원성 벡터의 전달 핵산 성분은 진핵 세포의 게놈 내로 통합될 수 있거나, 일시적 발현 연구를 위해, 단순히 세포에서 발현될 수 있다.

[0433] 본원에서 사용되는 용어 "염색체의 전달 핵산"은 진핵 세포, 예컨대 식물 잎 세포로 박테리아, 예컨대 아그로박테리움 종으로부터 전달될 수 있는 핵산 분자를 나타낸다. 염색체의 전달 핵산은 전달될 수 있는 요소로서 널리 알려진 유전 요소이며, 수신체 세포의 게놈 내로 그 경계 내에 함유된 뉴클레오티드 서열이 후속 통합된다. 이에 관하여, 전달 핵산에는 전형적으로, 2개의 "경계" 서열이 측면에 있지만, 일부 경우에는 하나의 말단에 있는

하나의 경계가 사용될 수 있고 전달되는 핵산의 제2 말단이 전달 공정에서 무작위로 생성된다. 관심 RNA 분자는 전형적으로 전달 핵산의 왼쪽 경계-유사 서열 및 오른쪽 경계-유사 서열 사이에 배치된다. 전달 핵산 내에 함유되는 RNA 분자는 그 발현, 즉 RNA 분자의 전사 및/또는 번역을 촉진하는 여러 상이한 프로모터 및 종결자 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 아그로박테리움 종, 예컨대 아그로박테리움 투메파시엔스 또는 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로부터의 전달 DNA(T-DNA), 및 이의 인공 변이체/돌연변이체가 아마도 전달 핵산의 가장 잘 특성규명된 예일 것이다. 또 다른 예는 식물로부터의 T-DNA 경계-유사 서열을 포함하는 P-DNA("식물-DNA")이다.

[0434] 본원에서 사용되는 "T-DNA"는 식물 세포 내로의 DNA 전달을 위해 기능하는 아그로박테리움 투메파시엔스 Ti 플라스미드 또는 아그로박테리움 리조게네스 Ri 플라스미드로부터의 T-DNA, 또는 이의 변이체를 나타낸다. T-DNA는 오른쪽 및 왼쪽 경계 서열을 둘 다 포함하는 전체 T-DNA를 포함할 수 있지만, 전달을 위해 시스로 요구되는 최소 서열, 즉 오른쪽 T-DNA 경계 서열을 포함하는 것만 요구된다. 본 발명의 T-DNA는 관심 RNA 분자의 오른쪽 및 왼쪽 경계 서열(존재하는 경우) 사이의 임의의 위치에서 내부에 삽입된다. 식물 세포 내로의 T-DNA의 전달을 위해 트랜스로 요구되는 인자를 인코딩하는 서열, 예컨대 vir 유전자가 T-DNA 내로 삽입될 수도 있고, T-DNA와 동일한 레플리콘 상에 존재할 수도 있고, 또는 바람직하게는 아그로박테리움 숙주에서 상용성 레플리콘 상에 트랜스로 존재한다. 이러한 "이원성 벡터 시스템"은 당분야에 잘 알려져 있다. 본원에서 사용되는 "P-DNA"는 식물 계놈으로부터 단리된 전달 핵산, 또는 이의 인공 변이체/돌연변이체를 나타내며, 각 말단에, 또는 하나의 말단에만 T-DNA 경계-유사 서열을 포함한다.

[0435] 본원에서 사용되는 전달 핵산의 "경계" 서열은 선택된 유기체, 예컨대 식물 또는 박테리아로부터 단리되거나, 이의 인공 변이체/돌연변이체일 수 있다. 경계 서열은 이것이 연결되는 RNA 분자의 전달을 도모하고 촉진하며 수신체 세포 계놈에서 그 통합을 촉진할 수 있다. 하나의 구현예에서, 경계-서열은 10 bp 내지 80 bp 길이이다. 아그로박테리움 종으로부터의 T-DNA로부터의 경계 서열은 당분야에 잘 알려져 있으며 문헌[Lacroix et al. (2008)]에 기재된 것들이 포함된다.

[0436] 전통적으로는 아그로박테리움 종만 식물 세포로 유전자를 전달하기 위해 사용되었던 반면, 현재는 아그로박테리움 종과 유사한 방식으로 작용하는 것으로 확인된/개발된 다수의 시스템이 존재한다. 몇몇 비-아그로박테리움 종은 현재 유전자 전달에 적격이 되도록 유전적으로 변형되었다(Chung et al., 2006; Broothaerts et al., 2005). 이들에는 리조비움(*Rhizobium*) 종 NGR234, 시노리조비움 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*) 및 메조리조비움 로티(*Mezorhizobium loti*)가 포함된다.

[0437] 박테리아로부터 진행 숙주로의 진행 발현 플라스미드의 직접적 전달은 포유류 세포 및 플라스미드-운반 대장균(*Escherichia coli*)의 원형질체의 융합에 의해 수십년 전에 최초로 달성되었다(Schaffner, 1980). 그 이래로, 포유류 세포 내로 유전자를 전달할 수 있는 박테리아의 수는 계속 증가해왔으며(Weiss, 2003), 4개 그룹에 의해 독립적으로 발견되고 있다(Sizemore et al. 1995; Courvalin et al., 1995; Powell et al., 1996; Darji et al., 1997).

[0438] 본원에서 사용되는 용어 "전달감염", "형질전환" 및 이의 변형은 일반적으로 상호 교환적으로 사용된다. "전달 감염된" 또는 "형질전환된" 세포는 관심 RNA 분자(들)를 도입하기 위해 조작되었을 수 있거나, 이로부터 유래된 자손 세포일 수 있다.

[0439] 제조합 세포

[0440] 본 발명은 또한 제조합 세포, 예를 들어, 제조합 박테리아 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포를 제공하며, 이는 하나 이상의 RNA 분자 또는 본원에서 정의되는 벡터, 또는 이의 조합으로 형질전환된 숙주 세포이다. 본 발명의 적합한 세포에는 본 개시에 따른 RNA 분자 또는 제조합 벡터로 형질전환될 수 있는 임의의 세포가 포함된다. 하나의 예에서, 형질전환된 숙주 세포는 죽은 세포이다.

[0441] 제조합 세포는 배양 중인 세포, 시험관내, 또는 유기체, 예컨대 식물 내, 또는 기관 내, 예컨대 종자 또는 잎 내의 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 식물 내, 보다 바람직하게는 식물의 종자 내에 있다. 하나의 구현예에서, 제조합 세포는 비-인간 세포이다. 따라서 하나의 예에서, 본 개시는 본원에서 개시되는 하나 이상의 또는 모든 RNA 분자를 포함하는 비-인간 유기체에 관한 것이다.

[0442] 하나의 예에서, 세포는 곤충 세포이다. 하나의 예에서, 곤충 세포는 트리코플러시아(*Trichoplusia*)로부터 유래된다.

- [0443] 적합한 숙주 세포의 또 다른 예는 전기천공 적격 HT115 세포이다.
- [0444] RNA 분자(들)가 도입되는 숙주 세포는 형질전환되지 않은 세포 또는 적어도 하나의 핵산으로 이미 형질전환된 세포일 수 있다. 이러한 핵산은 지질 핵산에 관련될 수도 있고, 관련되지 않을 수도 있다. 본 발명의 숙주 세포는 내인성으로(즉, 자연적으로) 본원에서 정의되는 RNA 분자(들)를 발현할 수 있고, 이 경우 이로부터 유래되는 재조합 세포는 RNA 분자(들)를 생성할 능력이 증강되거나, 본원에서 정의되는 적어도 하나의 RNA 분자로 형질전환된 후에만 상기 RNA 분자(들)를 생성할 수 있다. 하나의 예에서, 세포는 지질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 세포이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 재조합 세포는 비극성 지질, 예컨대 TAG를 생성할 능력이 증강된다.
- [0445] 본 개시의 숙주 세포는 본원에서 기재되는 적어도 하나의 RNA 분자를 발현할 수 있는 임의의 세포일 수 있고, 박테리아, 진균(효모 포함), 기생충, 절지동물, 동물 및 식물 세포가 포함된다. 숙주 세포의 예에는 살모넬라(*Salmonella*), 에스체리키아(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*), 리스테리아(*Listeria*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스포돔테라(*Spodoptera*), 미코박테리아(*Mycobacteria*), 트리코플러시아(*Trichoplusia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), BHK(베이비 햄스터 신장(baby hamster kidney)) 세포, MDCK 세포, CRFK 세포, CV-1 세포, COS(예컨대, COS-7) 세포, 및 Vero 세포가 포함된다. 숙주 세포의 추가 예는 대장균 K-12 유도체를 포함하는 대장균; 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*); 약독화된 균주를 포함하는 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*); 스포돔테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*); 트리코플러시아 나이(*Trichoplusia ni*); 및 비-종양형성 마우스 근모세포 G8 세포(예컨대, ATCC CRL 1246)이다. 추가적인 적절한 포유류 세포 숙주에는 다른 신장 세포주, 다른 섬유아세포 세포주(예컨대, 인간, 쥐 또는 닭 배아 섬유아세포 세포주), 골수종 세포주, 차이니즈 햄스터 난소 세포, 마우스 NIH/3T3 세포, LMTK 세포 및/또는 HeLa 세포가 포함된다.
- [0446] 바람직한 구현예에서, 식물 세포는 종자 세포, 특히 종자의 떡잎 또는 배젖에서의 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 동물 세포이다. 동물 세포는 임의의 유형의 동물, 예컨대, 비-인간 동물 세포, 비-인간 척추동물 세포, 비-인간 포유류 세포, 또는 해양 동물, 예컨대 어류 또는 갑각류, 무척추동물, 곤충 등의 세포일 수 있다. 본 발명의 숙주 세포로서 유용한 조류 세포의 예에는, 예를 들어, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 종(예를 들어, 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*)), 두날리엘라(*Dunaliella*) 종, 헤마토코커스(*Haematococcus*) 종, 클로렐라(*Chlorella*) 종, 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*) 종, 스킴조키트리움(*Schizochytrium*) 종, 및 볼복스(*Volvox*) 종이 포함된다.
- [0447] 트랜스제닉 식물
- [0448] 본 발명은 또한 본원에서 정의되는 하나 이상의 외인성 RNA 분자, 본 개시에 따른 세포, 본 개시에 따른 벡터, 또는 이의 조합을 포함하는 식물을 제공한다. 명사로서 사용되는 경우 용어 "식물"은 전체 식물을 나타내는 반면, 용어 "이의 부분"은 식물 기관(예컨대, 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 과실), 단일 세포(예컨대, 꽃가루), 종자, 종자 부분, 예컨대 배, 배젖, 배반 또는 종자 껍질, 식물 조직, 예컨대 맥관 조직, 식물 세포 및 이의 자손을 나타낸다. 본원에서 사용되는 식물 부분은 식물 세포를 포함한다.
- [0449] 식물에 대한 변형의 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "식물에서(in a plant 및 in the plant)"는 변형이 식물 전체에 걸쳐 일어난 경우를 포함하여 변형이 식물의 적어도 하나의 부분에서 일어났음을 의미하며, 변형이 식물의 하나 이상뿐만 아니라 모든 부분에서 일어나는 경우를 배제하지 않는다. 예를 들어, 조직-특이적 프로모터는 이것이 식물의 소정 부분에서만 발현될 수 있더라도, "식물에서" 발현되는 것으로 언급된다. 유사하게, "식물에서 하나 이상의 해당 및/또는 지방산 생합성 유전자의 발현을 증가시키는 전사 인자 폴리펩타이드"는 증가된 발현이 식물의 적어도 부분에서 일어남을 의미한다.
- [0450] 본원에서 사용되는 용어 "식물"은 식물계에서의 임의의 유기체를 포함하는, 그 가장 광의의 개념으로 사용된다. 여기에는 또한 적조류 및 갈조류뿐만 아니라 녹조류가 포함된다. 여기에는 비제한적으로 임의의 종의 개화 식물, 풀, 작물 또는 곡류(예컨대, 지방종자, 옥수수, 대두), 사료 또는 마초, 과실 또는 야채 식물, 허브 식물, 목재 식물 또는 나무가 포함된다. 식물을 임의의 특정 구조에 제한하려는 것은 아니다. 또한 단세포 식물(예컨대, 미세조류)을 나타낸다. 식물에 대한 용어 "이의 부분"은 식물 세포 및 이의 자손, 복수의 식물 세포, 식물 발생의 임의의 단계에 존재하는 구조, 또는 식물 조직을 나타낸다. 이러한 구조에는 비제한적으로 잎, 줄기, 꽃, 과실, 너트, 뿌리, 종자, 종자 껍질, 배가 포함된다. 용어 "식물 조직"에는 잎, 줄기, 꽃, 과실, 너트, 뿌리, 종자, 예를 들어, 배아 조직, 배젖, 진피 조직(예컨대, 표피, 바깥표피), 맥관 조직(예컨대, 목질부, 체관부), 또는 기저 조직(실질 조직, 후각 조직, 및/또는 후막 조직 세포 포함)에 존재하는 것들을 포함하는 식물

의 분화 및 미분화 조직뿐만 아니라 배양 중인 세포(예컨대, 단일 세포, 원형질체, 유합 조직, 배 등)가 포함된다. 식물 조직은 식물에, 기관 배양에, 조직 배양에, 또는 세포 배양에 존재할 수 있다.

[0451] 상이한 양의 18:3 및 16:3 지방산이 상이한 식물 종의 당지질 내에서 확인된다. 이는 3개의 이중 결합을 갖는 지방산이 일반적으로 항상 C_{18} 원자 길이인 18:3 식물과 C_{16} -지방산 및 C_{18} -지방산을 모두 함유하는 16:3 식물을 구별하기 위해 사용된다. 18:3 엽록체에서, 포스파티데이트의 디아실글리세롤로의 전환 및 디아실글리세롤의 모노갈락토실 디아실글리세롤(MGD)로의 전환을 촉매하는 효소 활성화는 16:3 엽록체에서보다 유의미하게 활성이 더 적다. 18:3 식물의 잎에서, 엽록체는 기질에서 스테아로일-ACP2를 합성하고, 제1 이중 결합을 포화 탄화수소쇄 내로 도입한 후, 티오에스테르를 가수분해한다. 방출된 올레에이트는 엽록체 외피를 통해 세포의 진행 부분, 아마도 소포체의 막 내로 외수송되며, 여기서 PC 내로 포함된다. PC-연결된 올레오일기는 이들 막에서 탈포화된 후 엽록체 내로 다시 이동한다. MGD-연결된 아실기는 제3 이중 결합의 도입을 위한 기질로 2개의 리놀레노일 잔기를 갖는 MGD를 산출한다. 상기 갈락토지질은, 예를 들어 18:3 식물, 예컨대 국화과(Asteraceae) 및 콩과(Fabaceae)의 특징이다. 예를 들어, 미나리과(Apiaceae) 및 배추과(Brassicaceae)의 구성원으로 나타내는, 16:3 식물의 광합성 활성 세포에서, 2개 경로가 MGD와 함께 틸라코이드를 제공하도록 병렬적으로 작동한다. 협력적 '진행' 서열은 '원핵' 경로에 의해 다양한 정도로 보충된다. 그 반응은 엽록체에 국한되며 아실기의 전형적 배열뿐만 아니라 이들이 MGD로 에스테르화되는 경우 이의 완전한 탈포화를 일으킨다. 원핵 DAG 골격은 $C_{16}:0$ 및 C-2에서의 그 탈포화 산물을 운반하며 이 위치로부터 C_{18} :지방산이 배제된다. C-1 위치는 C_{18} 지방산에 의해 그리고 적은 정도로 C_{16} 기에 의해 점유된다. 청녹조류로부터의 지질의 DAG 골격에서 16:3 식물에서 엽록체-확인된 경로에 의해 합성된 것들과의 유사성은 계통발생학적 관계를 제시하며 원핵이라는 용어를 합리화한다.

[0452] 본원에서 사용되는 용어 "무성 조직" 또는 "무성 식물 부분"은 식물의 유성 생식을 위한 기관이 아닌 임의의 식물 조직, 기관 또는 부분이다. 식물의 유성 생식을 위한 기관은 구체적으로 종자 보유 기관, 꽃, 꽃가루, 과실 및 종자이다. 무성 조직 및 부분에는 적어도 식물 잎, 줄기(다발 및 새싹을 포함하지만 결구는 제외함), 덩이줄기 및 뿌리가 포함되지만, 꽃, 꽃가루, 종자 껍질, 배 및 배젖을 포함하는 종자, 종과피 조직을 포함하는 과실, 종자-보유 꼬투리 및 종자-보유 결구는 배제된다. 하나의 구현예에서, 식물의 무성 부분은 기생(aerial) 식물 부분이다. 또 다른 또는 추가 구현예에서, 무성 식물 부분은 녹색 부분, 예컨대 잎 또는 줄기이다.

[0453] "트랜스제닉 식물" 또는 이의 변형은 동일한 종, 변종 또는 품종의 야생형 식물에서는 확인되지 않는 트랜스유전자를 함유하는 식물을 나타낸다. 본 발명의 맥락에서 정의되는 트랜스제닉 식물에는 요망되는 식물 또는 이의 부분에서 본원에서 정의되는 적어도 하나의 폴리펩타이드의 생성을 유도하는 재조합 기법을 사용하여 유전적으로 변형된 식물 및 이의 자손이 포함된다. 트랜스제닉 식물 부분은 대응하는 의미를 갖는다.

[0454] 용어 "종자" 및 "난알"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. "난알"은 성숙 난알, 예컨대 수확 난알 또는 여전히 식물 상에 있지만 수확할 준비가 된 난알을 나타내지만, 또한 맥락에 따라, 흡수팽윤 또는 발아 후 난알을 나타낼 수 있다. 성숙 난알은 보통 약 18% 미만의 수분 함량을 갖는다. 바람직한 구현예에서, 난알의 수분 함량은 일반적으로 저장을 위해 안전하게 간주되는 수준, 바람직하게는 5% 내지 15%, 6% 내지 8%, 8% 내지 10%, 또는 10% 내지 15%이다. 본원에서 사용되는 "발생 중인 종자"는 전형적으로 수정 또는 개화 후 식물의 생식 구조에서 확인되는 성숙 전 종자를 나타내지만, 식물로부터 단리되는 성숙 전의 이러한 종자를 나타낼 수도 있다. 성숙 종자는 보통 약 12% 미만의 수분 함량을 갖는다.

[0455] 본원에서 사용되는 용어 "식물 저장 기관"은 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지질의 형태로 에너지를 저장하기 위해 특화된 식물의 부분을 나타낸다. 식물 저장 기관의 예는 종자, 과실, 덩이줄기성 뿌리, 및 덩이줄기이다. 본 발명의 바람직한 식물 저장 기관은 종자이다.

[0456] 본원에서 사용되는 용어 "표현형이 정상인"이란 비변형 식물 또는 이의 부분과 비교되는 경우, 성장하고 번식하는 능력이 유의미하게 감소되지 않은 유전적으로 변형된 식물 또는 이의 부분, 예를 들어 트랜스제닉 식물, 또는 저장 기관, 예컨대 본 발명의 종자, 덩이줄기 또는 과실을 나타낸다. 바람직하게는, 바이오매스, 성장율, 발아율, 저장 기관 크기, 종자 크기 및/또는 생성되는 생활성 종자의 수는 동일한 조건 하에 성장시킨 경우 상기 재조합 폴리뉴클레오티드가 없는 식물의 90% 이상이다. 상기 용어는 야생형 식물과 상이할 수 있지만 상업적 목적을 위한 식물의 유용성에 영향을 미치지 않는 식물의 특징, 예컨대 묘목 잎의 발레리나 표현형은 포괄하지 않는다. 하나의 구현예에서, 표현형이 정상인 유전적으로 변형된 식물 또는 이의 부분은 식물 저장 기관 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결된 침묵화 억제인자를 인코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 대응하는 식물 또는 이의 부분과 본질적으로 동일한 성장 또는 번식 능력을 갖는다.

[0457]

본 발명의 실시에서의 사용을 위해 제공되거나 고려되는 식물에는 외떡잎식물 및 쌍떡잎식물이 모두 포함된다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 식물은 작물 식물(예를 들어, 곡류 및 콩류, 옥수수, 밀, 감자, 쌀, 수수, 기장, 카사바, 보리) 또는 콩과식물, 예컨대 대두, 콩 또는 완두콩이다. 식물은 식용 뿌리, 덩이줄기, 잎, 줄기, 꽃 또는 과실의 생산을 위해 재배될 수 있다. 식물은 그 무성 부분이 식품으로 사용되는 야채 식물일 수 있다. 본 발명의 식물은 아크로코미아 아쿨레아타(*Acrocomia aculeata*)(매쿠버 야자), 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 아라시니스 하이포개아(*Aracinis hypogaea*)(땅콩), 앙스트로카리움 무루무루(*Astrocaryum murumuru*)(무루무루), 아스트로카리움 불가레(*Astrocaryum vulgare*)(투쿠마), 아탈레아 게렌시스(*Attalea geraensis*)(인도아-라테이로), 아탈레아 휴밀리스(*Attalea humilis*)(미국 기름 야자), 아탈레아 올레이페라(*Attalea oleifera*)(안다이아), 아탈레아 팔레라타(*Attalea phalerata*)(우리쿠리), 아탈레아 스페시오사(*Attalea speciosa*)(바바수), 아베나 사티바(*Avena sativa*)(귀리), 베타 불가리스(*Beta vulgaris*)(사탕무), 브라시카 중, 예컨대 브라시카 카리나타(*Brassica carinata*), 브라시카 준세아(*Brassica juncea*), 브라시카 나포브라시카(*Brassica napobrassica*), 브라시카 나푸스(유채), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*)(거짓 아마), 칸나비스 사티바(*Cannabis sativa*)(대마), 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*)(잇꽃), 카리오카르 브라실리엔세(*Caryocar brasiliense*)(빠끼), 코코스 누시페라(*Cocos nucifera*)(코코넛), 크람베 에비시니카(*Crambe abyssinica*)(아비시니아 케일), 쿠쿠미스 멜로(*Cucumis melo*)(멜론), 엘라이스 귀니스(*Elaeis guineensis*)(아프리카 야자), 글리신 맥스(*Glycine max*)(대두), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*)(목화), 헬리안투스 중, 예컨대 헬리안투스 안누우스(*Helianthus annuus*)(해바라기), 호르데움 불가레(보리), 자트로파 쿠르카스(*Jatropha curcas*)(피지 너트), 요하네시아 프린셉스(*Joannesia princeps*)(아라라 너트-나무), 램나 중(*Lemna sp.*)(개구리밥), 예컨대 램나 에퀴녹티알리스(*Lemna aequinoctialis*), 램나 디스페르마(*Lemna disperma*), 램나 에콰도리엔시스(*Lemna ecuadoriensis*), 램나 깃바(*Lemna gibba*)(통통한 좀개구리밥), 램나 자포니카(*Lemna japonica*), 램나 마이너(*Lemna minor*), 램나 미누타(*Lemna minuta*), 램나 옵스쿠라(*Lemna obscura*), 램나 파우시코스타타(*Lemna paucicostata*), 램나 페르푸실라(*Lemna perpusilla*), 램나 테네라(*Lemna tenera*), 램나 트리술카(*Lemna trisulca*), 램나 투리오니페라(*Lemna turionifera*), 램나 발디비아나(*Lemna valdiviana*), 램나 영젠시스(*Lemna yungensis*), 리카니아 리기다(*Licania rigida*)(오이티시카), 리눔 우시타티시움(*Linum usitatissimum*)(아마), 루피누스 앵구스티폴리우스(루핀), 마우리티아 플렉수오사(*Mauritia flexuosa*)(부리티 야자), 맥시밀리아나 마리파(*Maximiliana maripa*)(이나자 야자), 미스칸서스 중, 예컨대 미스칸서스 x 기간테우스(*Miscanthus x giganteus*) 및 미스칸서스 시넨시스(*Miscanthus sinensis*), 니코티아나 중(담배), 예컨대 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*) 또는 니코티아나 벤타미아나, 오에노카르푸스 바카바(*Oenocarpus bacaba*)(바카바-도-아제이트), 오에노카르푸스 бата우아(*Oenocarpus bataua*)(파타우아), 오에노카르푸스 디스티쿠스(*Oenocarpus distichus*)(바카바-데-레쿠에), 오리자 중(쌀), 예컨대 오리자 사티바(*Oryza sativa*) 및 오리자 글라베리마(*Oryza glaberrima*), 파니쿰 비르가툼(*Panicum virgatum*)(스위치그래스), 파라쿠에이바 파라엔시스(*Paraqueiba paraensis*)(마리화나), 페르세아 아멘카나(*Persea amencana*)(아보카도), 폰가미아 핀나타(*Pongamia pinnata*)(인도인 너도밤나무), 포폴루스 트리코카르파(*Populus trichocarpa*), 리시누스 콤무니스(*Ricinus communis*)(피마자), 사카룸 중(사탕수수), 세사뮴 인디쿰(*Sesamum indicum*)(참깨), 솔라눔 투베로썸(*Solanum tuberosum*)(감자), 소르검 중, 예컨대 소르검 바이칼라(*Sorghum bicolor*), 소르검 불가레(*Sorghum vulgare*), 테오브로마 그란디포룸(*Theobroma grandiflorum*)(쿠파아수), 트리폴리움 중, 트리트리낙스 브라실리엔시스(*Trithrinax brasiliensis*)(브라질 바늘 야자), 트리티쿰 중(밀), 예컨대 트리티쿰 애스티툼, 제아 메이스(옥수수), 알팔파(메디카고 사티바(*Medicago sativa*)), 호밀(세칼레 세랄레(*Secale cereale*)), 고구마(로프모에아 бата투스(*Lopmoea batatus*)), 카사바(마니호트 에스쿨렌타(*Manihot esculenta*)), 커피(코페아 속), 파인애플(아나나 코모수스(*Anana comosus*)), 시트러스 나무(시트러스 속), 코코아(테오브로마 카카오(*Theobroma cacao*)), 차(카멜리아 세넨시스(*Camellia senensis*)), 바나나(무사 속), 아보카도(페르세아 아메리카나(*Persea americana*)), 무화과(피쿠스 카시카(*Ficus casica*)), 구아바(프시디움 구아자바(*Psidium guajava*)), 망고(망기퍼 인디카(*Mangifer indica*)), 올리브(올레아 유로파에아(*Olea europaea*)), 파파야(카리카 파파야(*Carica papaya*)), 캐슈(아나카르디움 옥시덴탈레(*Anacardium occidentale*)), 마카다미아(마카다미아 인테르그리폴리아(*Macadamia intergrifolia*)) 및 아몬드(프루누스 아미그달루스(*Prunus amygdalus*))일 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 식물은 니코티아나 벤타미아나일 수 있다.

[0458]

다른 바람직한 식물에는 C4 풀, 예컨대, 상기 언급된 것들에 부가하여, 안드로포곤 게라르디(*Andropogon gerardi*), 보우텔로우아 쿠르티펜둘라(*Bouteloua curtipendula*), B. 그라실리스(*gracilis*), 부클로에 닥틸로이데스(*Buchloe dactyloides*), 시자키리움 스코파리움(*Schizachyrium scoparium*), 소르가스트럼 누탄스(*Sorghastrum nutans*), 스포로볼루스 크립탄드루스(*Sporobolus cryptandrus*); C3 풀, 예컨대 엘리무스 카나텐

시스(*Elymus canadensis*), 콩과식물 레스페데자 카피타타(*Lespedeza capitata*) 및 페탈로스테뮴 빌로섬(*Petalostemum villosum*), 광엽초본 아스테르 아주레우스(*Aster azureus*); 및 목질 식물, 예컨대 쿠에르쿠스 엘립소이달리스(*Quercus ellipsoidal*) 및 *Q. 마크로카르파(macrocarpa)*가 포함된다. 다른 바람직한 식물에는 C3 풀이 포함된다.

[0459] 바람직한 구현예에서, 식물은 속씨식물이다.

[0460] 하나의 구현예에서, 식물은 지방종자 식물, 바람직하게는 지방종자 작물 식물이다. 본원에서 사용되는, "지방종자 식물"은 식물의 종자로부터 지질의 상업적 생산을 위해 사용되는 식물 종이다. 지방종자 식물은, 예를 들어, 지방종자 평지(예컨대 유채), 옥수수, 해바라기, 잇꽃, 대두, 수수, 아마(아마인) 또는 사탕무일 수 있다. 또한, 지방종자 식물은 다른 십자화과 식물, 목화, 땅콩, 양귀비, 순무(rutabaga), 겨자, 피마자 콩, 참깨, 잇꽃, 자트로파 쿠르카스(*Jatropha curcas*) 또는 너트 생산 식물일 수 있다. 식물은 그 과일, 예컨대 올리브, 지방 야자 또는 코코넛에서 높은 수준의 지질을 생산할 수 있다. 본 발명이 적용될 수 있는 원예 식물은 상추, 치커리, 또는 양배추, 브로콜리, 또는 컬리플라워를 포함하는 야채 십자화과 식물이다. 본 발명은 담배, 표주박, 당근, 딸기, 토마토, 또는 후추에서 적용될 수 있다.

[0461] 바람직한 구현예에서, 트랜스제닉 식물은 도입된 각각의 모든 유전자(트랜스유전자)에 대해 동종접합성이어서 그 자손이 요망되는 표현형에 있어서 분리되지 않는다. 트랜스제닉 식물은 또한, 예를 들어 하이브리드 종자로부터 재배된 F1 자손에서, 도입된 트랜스유전자(들)에 대해 이종접합성일 수 있고, 바람직하게는 트랜스유전자에 대해 균일하게 이종접합성일 수 있다. 이러한 식물은 장점, 예컨대 당분야에 잘 알려진 잡종 강세를 제공할 수 있다.

[0462] 형질전환

[0463] 본원에서 개시되는 RNA 분자는 상기 언급된 숙주 세포 및/또는 비-인간 유기체, 예컨대 식물에 안정적으로 도입될 수 있다. 의혹을 피하기 위해, 본 개시의 예는 본원에서 개시되는 RNA 분자로 안정적으로 형질전환된 상기 언급된 식물을 포괄한다. 본원에서 사용되는 용어 "안정적으로 형질전환하는", "안정적으로 형질전환된" 및 이의 변형은 RNA 분자 또는 이를 인코딩하는 핵산이 이의 존재에 대한 양성 선택을 필요로 하지 않고 세포 분열 동안 자손 세포로 전달되도록 하는 이들의 세포 게놈 내로의 통합을 나타낸다. 안정적인 형질전환체, 또는 이의 자손은 당분야에 알려진 임의의 수단, 예컨대 염색체 DNA 상의 서던 블롯, 또는 게놈 DNA의 원 위치 혼성화에 의해 확인되어 이의 선택을 구현할 수 있다.

[0464] 트랜스제닉 식물은 당분야에 알려진 기법, 예컨대 문헌[Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), 및 Christou and Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004)]에 일반적으로 기재된 것들을 사용하여 생산될 수 있다.

[0465] 하나의 구현예에서, 식물은 본 개시에 따른 RNA 분자를 식물 또는 이의 부분에 국소 적용함으로써 형질전환될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 식물 또는 이의 부분의 표면에 적합한 담체를 함유하는 제형물로서 제공되어 분무되거나, 분진처리되거나, 달리 적용될 수 있다. 따라서 하나의 예에서, 본 개시의 방법은 식물에 대한 본원에서 개시되는 RNA 분자의 도입을 포괄하며, 식물 또는 이의 부분에 RNA 분자를 포함하는 조성물을 국소 적용하는 단계를 포함한다.

[0466] 아그로박테리움-매개 전달은 DNA가 식물 세포 게놈에서 DNA의 일시적 발현을 위해 또는 안정적 통합을 위해, 전체 식물 조직, 식물 기관, 또는 조직 배양 중인 외식편 내로 도입될 수 있으므로, 유전자를 식물 세포 내로 도입하기 위해 널리 적용 가능한 시스템이다. 예를 들어, 플로랄-딤(식물 내) 방법이 사용될 수 있다. 식물 세포 내로 DNA를 도입하기 위한 아그로박테리움-매개 식물 통합 벡터의 사용은 당분야에 잘 알려져 있다. 전달될 DNA의 영역은 경계 서열에 의해 정의되며, 개입 DNA(T-DNA)는 보통 식물 게놈 내로 삽입된다. 이는 유전자 전달의 손쉽고 정의된 성질로 인해 선택되는 방법이다.

[0467] 사용될 수 있는 가속화 방법에는, 예를 들어 미세발사체 충격(microprojectile bombardment) 등이 포함된다. 형질전환 핵산 분자를 식물 세포로 전달하기 위한 방법의 일례는 미세발사체 충격이다. 상기 방법은 문헌[Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994)]에 의해 리뷰로 다뤄졌다. 비-생물학적 입자(미세발사체)는 핵산을 껍질로 하여, 추진력에 의해 세포, 예를 들어 미성숙 배의 세포 내로 전달될 수 있다. 예시적인 입자에는 텅스텐, 금, 백금 등으로 이루어진 것들이 포함된다.

[0468] 또 다른 방법에서, 원형자가 안정적으로 형질전환될 수 있다. 고등 식물에서 원형자 형질전환을 위해 개시된 방법에는 선별 마커를 함유하는 DNA의 입자 총 전달 및 상동성 재조합을 통한 원형자 게놈으로의 DNA 표적화가 포

함된다(미국 제5,451,513호, 미국 제5,545,818호, 미국 제5,877,402호, 미국 제5,932,479호, 및 WO 99/05265). 세포 형질전환의 다른 방법이 또한 사용될 수 있으며 비제한적으로 꽃가루 내로의 직접적인 DNA 전달, 식물의 생식 기관 내로의 DNA의 직접 주사, 또는 미성숙 배의 세포 내로의 DNA의 직접 주사에 이어 건조된 배의 재수화에 의한 식물 내로의 DNA 도입이 포함된다.

[0469] 하나의 식물 원형질체 형질전환체로부터 또는 다양한 형질전환된 외식편으로부터의 식물 재생, 발생, 및 경작은 당분야에 잘 알려져 있다(Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). 상기 재생 및 성장 공정에는 전형적으로 형질전환된 세포의 선택 단계, 뿌리형성 모목 단계를 통한 일반적인 배아 발생 단계를 통해 이들 개체화된 세포를 배양하는 단계가 포함된다. 트랜스제닉 배 및 종자는 유사하게 재생된다. 생성 트랜스제닉 뿌리형성 새싹은 이후 적절한 식물 성장 배지, 예컨대 토양에 식재된다.

[0470] 외래의, 외인성 유전자를 함유하는 식물의 발생 또는 재생은 당분야에 널리 알려져 있다. 바람직하게는, 재생된 식물은 자가-수분하여 동종접합성 트랜스제닉 식물을 제공한다. 다르게는, 재생된 식물로부터 수득되는 꽃가루가 농업적으로 중요한 라인의 종자-재배 식물과 교배된다. 반대로, 이들 중요한 라인의 식물로부터의 꽃가루가 재생된 식물을 수분시키는 데 사용된다. 요망되는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 본 발명의 트랜스제닉 식물은 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 배양된다.

[0471] 트랜스제닉 세포 및 식물에서 트랜스유전자의 존재를 확인하기 위해, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭 또는 서던 블롯 블롯이 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 트랜스유전자의 발현 산물은 산물의 성질에 따라, 임의의 다양한 방식으로 검출될 수 있으며, 노던 블롯 혼성화, 웨스턴 블롯 및 효소 검정이 포함된다. 트랜스제닉 식물이 수득되면, 이들은 재배되어 요망되는 표현형을 갖는 식물 조직 또는 부분을 생산할 수 있다. 식물 조직 또는 식물 부분이 수확되고/되거나 종자가 수집될 수 있다. 종자는 요망되는 특징을 갖는 조직 또는 부분을 갖는 추가적인 식물 재배용 원천으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 무성 식물 부분은 무극성 지질의 수율이 최고치인 시점에 수확된다. 하나의 구현예에서, 무성 식물 부분은 대략 개화 시나 개화가 개시된 후에 수확된다. 바람직하게는, 식물 부분은 보통 잎의 황색화 및 건조로 시사되는, 대략 노화가 시작되는 시기에 수확된다.

[0472] 아그로박테리움 또는 다른 형질전환 방법을 사용해서 형성되는 트랜스제닉 식물은 전형적으로 하나의 염색체 상에 단일 유전자 유전자위를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 식물은 부가된 유전자(들)에 대해 반접합성인 것으로 언급될 수 있다. 부가된 유전자(들)에 대해 동종접합성인 트랜스제닉 식물, 즉 2개의 부가된 유전자를 함유하며, 하나의 유전자가 염색체 쌍의 각 염색체 상에서 동일한 유전자위에 있는 트랜스제닉 식물이 보다 바람직하다. 동종접합성 트랜스제닉 식물은 반접합성 트랜스제닉 식물의 자가-수정, 생산된 일부 종자의 발아 및 관심 유전자에 대한 생성 식물의 분석에 의해 수득될 수 있다.

[0473] 또한 2개의 독립적으로 분리하는 외인성 유전자 또는 유전자위를 함유하는 2개의 상이한 트랜스제닉 식물이 또한 교배되어(짝짓기를 거쳐) 두 세트의 유전자 또는 유전자위를 모두 함유하는 자손을 생산할 수 있음이 이해되어야 한다. 적절한 F1 자손의 자가교배는 두 외인성 유전자 또는 유전자위 모두에 대해 동종접합성인 식물을 생산할 수 있다. 모체 식물과의 역교배 및 비-트랜스제닉 식물과의 비자가-교배도 무성 증식으로서 고려된다. 유사하게, 트랜스제닉 식물은 유전 변형, 예컨대 돌연변이체 유전자를 포함하는 제2 식물과 교배될 수 있고 자손은 트랜스유전자 및 확인된 유전 변형을 모두 함유한다. 상이한 형질 및 작물에 대해 일반적으로 사용되는 다른 육종 방법의 설명은 문헌[Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)]에서 확인될 수 있다.

[0474] 제형

[0475] 본 개시에 따른 RNA 분자는 다양한 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 고체, 연고, 젤, 크림, 분말, 페이스트, 현탁액, 콜로이드, 폼 또는 에어로졸의 형태일 수 있다. 고체 형태에는 분진, 분말, 과립, 펠렛, 알약, 향정, 정제, 충전 필름(종자 코팅 포함) 등이 포함될 수 있고, 이는 수분산성("습윤성")일 수 있다. 하나의 예에서, 조성물은 농축물 형태이다.

[0476] 하나의 예에서, RNA 분자는 국소 제형으로서 제공될 수 있다. 하나의 예에서, 제형은 제형 내 및/또는 생체내 RNA 분자를 안정화한다. 예를 들어, RNA 분자는 지질 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 리포솜으로 제공될 수 있다. 하나의 예에서, 제형은 전달감염 촉진제를 포함한다.

[0477] 본원에서 사용되는 용어 "전달감염 촉진제"는 비제한적으로 식물 세포, 곤충 세포 또는 진균 세포를 포함하는

세포로의 흡수를 향상시키기 위해 RNA 분자에 첨가되는 조성물을 지칭한다. 세포를 전달감염하기에 적합한 것으로 당분야에 알려진 임의의 전달감염 촉진제가 사용될 수 있다. 예에는 DOTMA (N-[1-(2,3-디올레오일옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸 암모늄 클로라이드), DOTAP (1,2-비스(올레오일옥시)-3-3-(트리메틸암모늄)프로판), DMRIE (1,2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸-하이드록시 에틸 암모늄 브로마이드), DDAB (디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드), 리포스페르민, 특히, DOSPA (2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카복사미도)에틸]-N,N-디메틸-1-1프로판아미늄 트리플루오로-아세테이트) 및 DOSPER (1,3-디올레일옥시-2-(6카복시 스페르밀)-프로필-아미드, 및 디- 및 테트라-알킬-테트라-메틸 스페르민, 예컨대, 비제한적으로 TMTPS (테트라메틸테트라팔미토일 스페르민), TMTOS (테트라메틸테트라올레일 스페르민), TMTLS (테트라메틸테트라라우릴 스페르민), TMTMS (테트라메틸테트라미리스틸 스페르민) 및 TMDOS (테트라메틸디올레일 스페르민) 중 하나 이상과 같은 양이온성 지질이 포함된다. 양이온성 지질은 비-양이온성 지질, 특히, 중성 지질, 예를 들어, DOPE (디올레일포스파티딜에탄올아민), DPhPE (디피타노일포스파티딜에탄올아민) 또는 콜레스테롤과 같은 지질과 선택적으로 조합된다. 적합한 상업적으로 이용 가능한 전달감염 시약의 비제한적 예는 리포펙타민(Life Technologies) 및 리포펙타민 2000(Life Technologies)을 포함한다.

[0478] 하나의 예에서, RNA 분자는 현장으로의 적용에 적합한 제형 내로 포함될 수 있다. 하나의 예에서, 현장은 식물을 포함한다. 적합한 식물에는 작물 식물(예를 들어, 곡류 및 콩류, 옥수수, 밀, 감자, 타피오카, 쌀, 수수, 대두 밀렛, 카사바, 보리, 또는 완두콩), 또는 콩과식물이 포함된다. 식물은 식용 뿌리, 덩이줄기, 잎, 줄기, 꽃 또는 과실의 생산을 위해 재배될 수 있다. 하나의 예에서, 작물 식물은 곡류 식물이다. 곡류 식물의 예에는 비제한적으로 밀, 보리, 수수 귀리, 및 호밀이 포함된다. 이들 예에서, RNA 분자는 임의의 적합한 방식으로 식물, 또는 식물의 임의의 부분으로의 투여를 위해 제형화될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 식물의 잎, 줄기, 뿌리, 과실 야채, 낱알 및/또는 콩류로의 투여를 위해 제형화될 수 있다. 하나의 예에서, RNA 분자는 식물의 잎으로의 투여를 위해 제형화되며, 식물의 잎 상으로 분무 가능하다.

[0479] 요망되는 제형에 따라, 본원에서 기재되는 RNA 분자는 다양한 다른 제제와 함께 제형화될 수 있다. 예시적인 제제는 현탁화제, 응집제, 염기, 완충액, 쓴맛 가미제, 향료, 보존제, 추진제, 텍소트로프제, 항응결제, 및 착색제 중 하나 이상을 포함한다.

[0480] 다른 예에서, RNA 분자 제형은 살충제, 살해충제, 살진균제, 항생제, 곤충 퇴치제, 항기생충 제제, 항바이러스 제제, 또는 살선충제를 포함할 수 있다.

[0481] 또 다른 예에서, RNA 분자는 약학 조성물 내로 포함될 수 있다. 이러한 조성물에는 전형적으로 본원에서 기재되는 RNA 분자 및 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함된다. 본원에서 사용되는 언어 "약학적으로 허용 가능한 담체"에는 약학 투여와 상용성인, 용매, 분산 매질, 코팅, 향균제 및 항진균제, 등장성 제제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 보충 활성 화합물도 조성물 내로 포함될 수 있다.

[0482] 약학 조성물은 그 의도되는 투여 경로와 상용성으로 제형화된다. 투여 경로의 예에는 비경구, 예컨대, 정맥내, 피내, 피하, 흡입, 경피(국소), 경점막, 경구 및 직장 투여가 포함된다.

[0483] 하나의 구현예에서, 활성 화합물은 화합물을 신체로부터의 신속한 제거에 대해 보호할 담체와 함께, 예컨대 임플란트 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형으로 제조된다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 현탁액이 또한 약학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 알려진 방법, 예를 들어 미국 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0484] 본 개시에 따른 RNA 분자는 키트 또는 팩으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 개시되는 RNA 분자는 상기 언급된 세포 또는 유기체를 생산하기 위한 또는 상태를 치료하기 위한 서면 지침과 함께 적합한 용기에 패키징될 수 있다.

[0485] 비-인간 유기체를 제어하는 방법

[0486] 하나의 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자는 비-인간 유기체, 예컨대 곤충을 제어하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 사용에는 다양한 방법을 사용하여 본 개시에 따른 RNA 분자를 투여하는 단계가 관여된다. 하나의 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자는 곤충에 의한 섭취를 위한 곤충 미끼로서 제공될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 필요에 따라 곤충 상으로 분무될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 식물 또는 작물을 곤충으로부터 보호하기 위해 상기 식물 또는 작물 상으로 분무될 수 있다. 예시적인 작물에는 목화, 옥수수, 토마토, 병아리콩, 비둘기콩, 알팔파, 쌀, 수수 및 동부가 포함된다.

- [0487] 하나의 예에서, RNA 분자는 곤충 행동을 변형하기 위해 제공될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 곤충을 사멸시키기 위해 제공될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 곤충 번식력을 감소시키기 위해 제공될 수 있다. 예시적인 곤충 표적에는 가정 곤충이 포함된다. 다른 예시적인 곤충 표적에는 수액 흡입 곤충, 예컨대 진디(예컨대 마이주스 페르시캐, 메토폴로피움 디르호둠(*Metopolophium dirhodum*), 로팔로시퐁 파디(*Rhopalosiphum padi*), 아피스 글리시네스(*Aphis glycines*), 아피스 파베(*Aphis fabae*))가 포함된다. 추가의 예시적인 곤충 표적에는 거미류, 모기, 외부-기생충, 파리, 거미 진드기, 삽주벌레, 진드기, 새진드기, 개미, 바퀴벌레, 흰개미, 가정-귀뚜라미를 포함하는 귀뚜라미, 줄벌레, 먼지다듬이, 딱정벌레, 집게벌레, 모기 및 벼룩이 포함된다. 다른 예시적인 곤충 표적에는 농업 해충이 포함된다. 예에는 수액 섭취곤충, 예컨대 노린재 및 진디, 섭식성(chewing) 곤충, 예컨대 애벌레, 딱정벌레, 벌레, 갈아먹는(rasping) 곤충, 예컨대 삽주벌레 및 민달팽이, 나방, 파리, 예컨대 초파리, 낱알 해충, 예컨대 낱알 구멍벌레(borer), 비구미, 및 낱알 나방이 포함된다.
- [0488] 하나의 구현예에서, 곤충은 수액 흡입 곤충이다. 상기 예에서, RNA 분자는 MpC002 및/또는 MpRack-1에 대한 안티센스 활성을 가질 수 있다. 하나의 구현예에서, 수액 흡입 곤충은 진디이다. 또 다른 구현예에서, 진디는 마이주스 페르시캐이다.
- [0489] 하나의 구현예에서, 곤충 표적은 개미(예컨대 리네피테마 휴밀레), 목화씨 벌레 또는 회색담배나비 유충(헬리코베르파 아르미게라) 또는 검정파리(예컨대 루실리아 쿠프리나)이다. 하나의 구현예에서, 표적 곤충은 헬리코베르파 아르미게라이며 RNA 분자는 ABC 트랜스포터 white 유전자(ABC white)에 대한 안티센스 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 표적 곤충은 리네피테마 휴밀레이며 RNA 분자는 페로몬 생합성 활성화 신경펩타이드(PBAN)에 대한 안티센스 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 표적 곤충은 루실리아 쿠프리나이데 RNA 분자는 V-유형 양성자 ATP아제 촉매성 서브유닛 A, RN아제 1/2, 키틴 신타아제, 엑시손 수용체 및 감마-튜불린 1/1-유사로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 유전자에 대한 안티센스 활성을 갖는다.
- [0490] 상기 구현예에서, 본원에서 개시되는 조성물 및 RNA 분자는 디스펜서에서 제공될 수 있다. 하나의 예에서, 디스펜서는 트랩(trap) 또는 루어(lure)이다. 하나의 구현예에서, 트랩 및/또는 루어는 본원에서 개시되는 RNA 분자(들)를 포함하는 미끼를 포함한다.
- [0491] 하나의 구현예에서, 본 개시는 곤충 행동을 제어하는 방법을 포괄하며, 곤충에 본원에서 개시되는 RNA 분자를 분무하거나, 분진처리하거나, 달리 적용하는 단계를 포함한다. 상기 구현예에서, RNA 분자는 곤충에 직접 분무되거나, 분진처리되거나, 달리 적용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 곤충 감염 전에 식물 또는 작물에 분무되거나, 분진처리되거나, 달리 적용될 수 있다.
- [0492] 본 발명의 하나의 구현예에서, 곤충 또는 거미류는 하기 목: 진드기아목(Acari), 거미목(Arachnidaa), 이아목(Anoplura), 바퀴목(Blattodea), 딱정벌레목(Coleoptera), 툭토기목(Collembola), 집게벌레목(Dermaptera), 망시상목(Dictyoptera), 줄불이목(Diplura), 파리목(Diptera), 흰개미불이목(Embioptera), 하루살이목(Ephemeroptera), 귀뚜라미불이목(Grylloblatodea), 노린재목(Hemiptera), 이시목(Heteroptera), 동시목(Homoptera), 벌목(Hymenoptera), 흰개미아목(Isoptera), 나비목(Lepidoptera), 새이아목(Mallophaga), 밀들이목(Mecoptera), 풀잠자리목(Neuroptera), 잠자리목(Odonata), 직시목(Orthoptera), 대벌레목(Phasmida), 이목(Phithiraptera), 강도래목(Plecoptera), 낫발이목(Protura), 다듬이벌레목(Psocoptera), 벼룩목(Siphonaptera), 이아목(Siphunculata), 줄목(Thysanura), 진딧물아목(Sternorrhyncha), 부채벌레목(Strepsiptera), 총채벌레목(Thysanoptera), 날도래목(Trichoptera), 민벌레목(Zoraptera) 및 줄목(Zygentom a)에 속할 수 있다.
- [0493] 본 발명의 바람직한, 그러나 비제한적인 구현예에서, 곤충 또는 거미류는 (1) 진드기아목: 후기문진드기목(Ixodida)(진드기)을 포함하는 진드기 (2) 거미목: 거미목(Araneae)(거미) 및 통거미목(Opiliones)(장님거미), 예에는 라트로텍투스 막탄스(Latrodictus mactans)(검은과부거미) 및 록소셀레스 레클루세(Loxosceles recluse)(갈색 은둔 거미)가 포함되고 (3) 이아목: 이, 예컨대 페디쿨러스 휴마누스(Pediculus humanus)(인체의 이) (4) 바퀴목: 독일 바퀴벌레(블라텔라 게르마니카(Blatella germanica)), 페리플라네타속의 미국 바퀴벌레(페리플라나타 아메리카나(Periplaneta americana)) 및 호주 바퀴벌레(페리플라나타 오스트랄리아시아(Periplaneta australiasiae)), 블라타속의 동양 바퀴벌레(블라타 오리엔탈리스(Blatta orientalis)) 및 수펠라속의 갈색-밴드 바퀴벌레(수펠라 롱기팔파(Supella longipalpa))를 포함하는 바퀴벌레로 구성되는 군으로부터 선택된다. 가장 바람직한 표적은 독일 바퀴벌레(블라텔라 게르마니카)이다. (5) 딱정벌레목: 딱정벌레, 예에는 파우더포스트 딱정벌레과(개나무좀과(Bostrichoidea)); 텐드록토누스(Dendroctonus) 속(검은색 테레빈유 딱정벌레, 남부 소나무 딱정벌레, IPS 나무좀 딱정벌레); 카페트 딱정벌레(안트레누스(Anthrenus) 속, 아타게누스

(*Attagenus*) 속); 구가 천공충(세람바이시데(*Cerambycidae*)과: 하일로트루페스 바줄루스(*Hylotrupes bajulus*)); 아노비움 평타텀(*Anobium punctatum*); 트리볼리움(*Tribolium*) 속(밀가루 딱정벌레); 트로고테르마 그라나리움(*Trogoderma granarium*)(곡식수시령이(*Khapra Beetle*)); 오리제필러스 사리나멘시스(*Oryzaephilus sarinamensis*)(저곡 딱정벌레) 등(책벌레)이 포함된다. (6) 집게벌레목: 집게벌레과 (7) 파리목: 모기(모기과(*Culicidae*)) 및 파리(브라키세라(*Brachycera*)), 예는 학질모기아과(*Anophelinae*), 예컨대 아노펠레스(*Anopheles*) 속 및 보통모기아과(*Culicinae*), 예컨대 애데스 풀부스(*Aedes fulvus*); 등예과(*Tabanidae*), 예컨대 타바누스 펑티페르(*Tabanus punctifer*)(집파리), 글로시나 모르시탄스 모르시탄스(*Glossina morsitans morsitans*)(체체 파리), 하수구 파리(나방파리과(*Psychodidae*)) 및 유관류아과(*Calyptratae*), 예컨대 무스카 도메스티카(*Musca domestica*)(집파리), 쉬파리(쉬파리과(*Sarcophagidae*)) 등이다. (8) 이시목: 벌레, 예컨대 시멕스 렉툴라리우스(*Cimex lectularius*)(빈대) (9) 벌목: 개미(개미상과(*Formicoidea*)), 벌(꿀벌상과(*Apoidea*))을 포함하는, 말벌(벌아목(*Apocrita*)): 셀레놉시스 인빅타(*Solenopsis invicta*)(붉은 불개미), 모노모리움 파라오니스(*Monomorium pharaonis*)(파라오 개미), 캄포노투스(*Camponotus*) 속(왕개미), 이아시우스 나이거(*Iasius niger*)(작은 검정 개미), 테트라모리움 캐스피툼(*tetramorium caespitum*)(주름 개미), 미르미카 루브라(*Myrmica rubra*)(빨간 개미), 포르미카(*Formica*) 속(유럽 불개미), 크레마토가스테르 리네올라타(*Crematogaster lineolata*)(잎꾼 개미), 이리도미르멕스 휴밀리스(*Iridomyrmex humilis*)(아르헨티나 개미), 페이돌(*Pheidole*) 속(큰머리 개미, 다시무틸라 옥시덴탈리스(*Dasymutilla occidentalis*)(벨벳 개미) 등 (10) 흰개미아목: 흰개미, 예에는 아미테르메스 플로리덴시스(*Amitermes floridensis*)(플로리다 질은-날개 지하 흰개미), 동부 지하 흰개미(레티쿨리테르메스 플라비페스(*Reticulitermes flavipes*)), 레티쿨리테르메스 헤스페루스(*R. hesperus*)(서부 지하 흰개미), 콤토테르메스 포르모사누스(*Coptotermes formosanus*)(대만 지하 흰개미), 인시시테르메스 마이너(*Incisitermes minor*)(서부 건목재 흰개미), 네오테르메스 콘넥서스(*Neotermes connexus*)(숲나무 흰개미) 및 보통흰개미과(*Termitidae*)가 포함된다. (11) 나비목: 나방, 예에는 곡식좀나방과(*Tineidae*) & 원뿔나방과(*Oecophoridae*), 예컨대 티네올라 비셀리엘라(*Tineola bisselliella*)(옷좀나방), 및 명나방과(*Pyralidae*), 예컨대 피랄리스 파리날리스(*Pyralis farinalis*)(곡나방) 등이 포함된다. (12) 다듬이벌레목: 먼지다듬이(포소시드(*Psocids*)) (13) 벼룩목: 벼룩, 예컨대 풀렉스 이리탄스(*Pulex irritans*) (14) 진딧물아목: 진디(진딧물과(*Aphididae*)) (15) 좀목: 좀벌레, 예는 테르모비아 도메스티카(*Thermobia domestica*) 및 레피스마 사카리나(*Lepisma saccharina*)로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0494]

다른 표적 곤충 또는 거미류에는 공중 보전 및 위생에 관련된 가정 곤충, 외부-기생충 및 곤충 및/또는 거미류, 예컨대 비제한적으로, 파리, 거미 진드기, 삼주벌레, 진드기, 새진드기, 개미(예컨대, 표적화 PBAN에 의한), 바퀴벌레, 흰개미, 가정-귀뚜라미를 포함하는 귀뚜라미, 좀벌레, 먼지다듬이, 딱정벌레, 집게벌레, 모기 및 벼룩이 포함된다. 보다 바람직한 표적은 바퀴벌레(바퀴목), 예컨대 비제한적으로 블라텔라 속(예컨대 블라텔라 게르마니카(독일 바퀴벌레), 페리플라네타 속(예컨대 페리플라나타 아메리카나(미국 바퀴벌레)) 및 페리플라나타 오스트랄리아시애(호주 바퀴벌레)), 블라타 속(예컨대 블라타 오리엔탈리스(동양 바퀴벌레)) 및 수펠라 속(예컨대 수펠라 롱기팔과(갈색-밴드 바퀴벌레)); 개미(개미상과), 예컨대 비제한적으로 솔레놉시스 속(예컨대 솔레놉시스 인빅타(붉은 불개미)), 모노모리움 속(모노모리움 파라오니스(파라오 개미)), 캄포노투스 속(예컨대 캄포노투스 속(왕개미)), 라시우스(*Iasius*) 속(라시우스 나이거(작은 검정 개미)), 테트라모리움 속(예컨대 테트라모리움 캐스피툼(주름 개미)), 미르미카 속(예컨대 미르미카 루브라(빨간 개미)), 포르미카 spp(유럽 불개미), 크레마토가스테르 속(예컨대 크레마토가스테르 리네올라타(잎꾼 개미)), 이리도미르멕스 속(예컨대 이리도미르멕스 휴밀리스(아르헨티나 개미)), 페이돌 속(큰머리 개미), 및 다시무틸라 속(예컨대 다시무틸라 옥시덴탈리스(벨벳 개미)); 흰개미(흰개미아목 및/또는 보통흰개미과), 예컨대 비제한적으로 아미테르메스 속(예컨대 아미테르메스 플로리덴시스(플로리다 질은-날개 지하 흰개미)), 레티쿨리테르메스 속(예컨대 레티쿨리테르메스 플라비페스(동부 지하 흰개미), 레티쿨리테르메스 헤스페루스(서부 지하 흰개미)), 콤토테르메스 속(예컨대 콤토테르메스 포르모사누스(대만 지하 흰개미)), 인시시테르메스 속(예컨대 인시시테르메스 마이너(서부 건목재 흰개미)), 네오테르메스 속(예컨대 네오테르메스 콘넥서스(숲나무 흰개미))이다.

[0495]

하나의 구현예에서, 표적 RNA는 곤충 악테오락테이트 신타아제를 인코딩한다.

[0496]

본 발명의 RNA 분자는 식물에서 전달되는/되거나 발현되는 경우, 예를 들어 작물 형질, 곤충 내성(예컨대 유전자, 예컨대 MpC002, MpRack-1 및 ABC 트랜스포터 유전자의 표적화에 의해), 질병 내성(예컨대 유전자, 예컨대 LanR 또는 MLO의 표적화에 의해), 제초제 내성, 불임, 난알 특징 등에 영향을 미치는 광범위한 요망되는 특성을 가질 수 있다. 표적 RNA 분자는 오일, 전분, 탄수화물, 영양분 등의 대사에 관여될 수 있거나, 단백질, 펩타이드, 지방산, 지질의 합성, 재조합 빈도(유전자, 예컨대 DDM1 및 FANCM의 표적화에 의해), 왁스, 오일(유전자, 예컨대 TOR의 표적화에 의해), 전분, 당, 탄수화물, 풍미, 냄새, 독소, 카로티노이드, 호르몬(유전자, 예컨대

EIN2, NCED1 및 NCED2의 표적화에 의해), 중합체, 플라보노이드(유전자, 예컨대 칼콘 신타아제의 표적화에 의해), 저장 단백질, 페놀산, 알칼로이드, 리그닌, 탄닌, 셀룰로스, 당단백질, 당지질 등에 관여될 수 있다.

[0497] 특정 예에서, 식물은 식물, 예컨대 십자화과 식물, 예를 들어 지방종자 평지 또는 해바라기, 잇꽃, 아마, 목화, 대두 또는 옥수수에서 오일 생산을 위한 효소; 식물, 예컨대 감자, 옥수수, 및 곡류, 예컨대 밀 보리 또는 쌀에서 전분 합성에 관여되는 효소; 천연 약제, 예컨대 약학 제제 또는 수의학적 제품을 합성하는 효소, 또는 자체가 천연 약제, 예컨대 약학 제제 또는 수의학적 제품인 단백질을 증가된 수준으로 생산한다.

[0498] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 알테마리아(*Altemaria*) 속; 아르밀라리아 멜레(*Armillaria mellea*); 아르트로보트리스 올리고스포루스(*Arthrobotrys oligosporus*); 블루메리아 그라미니스(*Blumeria graminis*)(실시예 17에 기재된 바와 같은 RNA 분자를 사용하는 M10 유전자의 표적화에 의해), 볼레투스 그라눌라투스(*Boletus granulatus*); 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*); 보트리티스 파베(*Botrytis fabae*); 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*); 클라비셉스 푸르푸레아(*Claviceps purpurea*); 크로나르티움 리비콜라(*Cronartium ribicola*); 에피코쿰 푸르푸레스센스(*Epicoccum purpureascens*); 에피테르모피톤 플로코섬(*Epidermophyton floccosum*); 포메스 안노수스(*Fomes annosus*); 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*); 게우만노마이세스 가르미니스 변종 트리티시(*Gaeumannomyces graminis var. tritici*); 글로메렐라 싱굴라타(*Glomerella cingulata*); 짐노스포랑지움 주니페리-비르기니아나(*Gymnosporangium juniperi-virginianae*); 마이크로스포룸 카니스(*Microsporum canis*); 모닐리니아 프룩티콜라(*Monilinia fructicola*); 피소데르마 알팔페(*Physoderma alfalfae*); 피토프테라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*); 피티로스포룸 오르비쿨라레(*Pityosporum orbiculare*(말라세지아 푸르푸르(*Malassezia furfur*))); 폴리포르스 설푸레우스(*Polyporus sulphureus*); 푸치니아(*Puccinia*) 속; 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*); 셉토리아 아피콜라(*Septoria apiicola*); 트리코피톤 루브럼(*Trichophyton rubrum*); 트리코피톤 멘타그로피테스(*T. mentagrophytes*); 우스틸라고(*Ustilago*) 속; 벤투리아 이네쿠알리스(*Venturia inaequalis*); 및 베르티실리움 다흘리아(*Verticillium dahliae*)로 구성되는 군으로부터 선택되는 진균 병원체에 의한 감염의 예방적 또는 치료적 처치에 대한 것이다.

[0499] 치료받을 예시적인 병태

[0500] 본 개시에 따른 RNA 분자는 다양한 병태의 방법에서 사용될 수 있다. 일부 예에서, 본 개시는 본원에서 개시되는 RNA 분자를 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 용어 "암"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유류에서의 생리적 병태를 나타내거나 설명한다. 암의 예에는 비제한적으로 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프구 종양이 포함된다. 이러한 암의 보다 구체적인 예에는 비제한적으로 편평상피세포암(예컨대, 상피 편평상피세포암), 소세포 폐암, 비-소세포폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평상피암종을 포함하는 폐암, 복강암, 간세포암, 위장관암 및 위장관 기저암을 포함하는 위의 암 또는 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암 또는 신암, 전립샘암, 외음부암, 갑상샘암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 표재 확산 흑색종, 악성 흑색종, 말단부 흑자 흑색종, 결절 흑색종, 다발 골수종 및 B-세포 림프종(저등급/여포성 비-호지킨 림프종(NHL); 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발렌스트롬 거대글로블린혈증 포함); 만성 림프구 백혈병(CLL); 급성 림프모구 백혈병(ALL); 털세포 백혈병; 만성 골수모구 백혈병; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD)뿐만 아니라 모반종과 연관된 비정상 맥관 증식, 부종(예컨대 뇌 종양과 연관된 부종), 메이그 증후군, 뇌암뿐만 아니라 두부경부암, 및 연관된 전이가 포함된다. 따라서 하나의 예에서, 본 개시는 유방암, 난소암, 결장암, 전립샘암, 폐암, 뇌암, 피부암, 간암, 위암, 췌장암 또는 혈액 기반 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0501] 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 BRCA1, BRCA2, PALB2, 또는 RAD51B, RAD51C, RAD51D 또는 관련 유전자에서의 돌연변이에 연관된 암을 치료하기 위해 사용된다. 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 DNA 미스매치 보수와 연관된 유전자, 예컨대 MSH2, MLH1, PMS2, 및 관련 유전자에서의 돌연변이에 연관된 암을 치료하기 위해 사용된다. 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 침묵화된 DNA 보수 유전자, 예컨대 BRCA1, MLH1, 또는 RAD51B, RAD51C, 또는 RAD51D를 갖는 암을 치료하기 위해 사용된다.

[0502] 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 DNA 보수 공정이 손상된 세포를 사멸시키기 위해 사용된다. 예를 들어, DNA 보수가 손상된 세포는 DNA 보수, DNA 합성, 또는 상동성 재조합에 관여되는 유전자를 비정상적으로 발현할 수 있다. 예시적인 유전자에는 XRCC1, ADPRT(PARP-1), ADPRTL2, (PARP-2), 폴리머라제 BETA, CTPS, MLH1, MSH2, FANCD2, PMS2, p53, p21, PTEN, RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51,

RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCCR, XRCC3, BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD52, RAD54, RAD50, MREU, NB51, WRN, BLM, KU70, KU80, ATM, ATR, CPIK1, CHK2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, 및 RAD9가 포함된다. 하나의 예에서, 본원에 기재되는 방법은 돌연변이체 종양 억제인자 유전자를 갖는 세포를 사멸시키기 위해 사용된다. 예를 들어, 세포는 BRCA1 또는 BRCA2에 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0503] 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 바이러스로 암화된 세포를 치료하기 위해 사용된다. 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 잠복 바이러스로 암화된 세포를 사멸시키기 위해 사용된다. 예시적인 잠복 바이러스에는 CMV, EBV, 단순 헤르페스 바이러스(1형 및 2형), 및 바리셀라 조스터 바이러스가 포함된다. 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 암, 면역결핍, 간염, 뇌염, 폐렴 또는 호흡기 질병을 일으키는 바이러스로 인한 활성 바이러스 감염을 치료하기 위해 사용된다. 예시적인 바이러스에는 파르보바이러스, 포스바이러스, 헤르페스 바이러스가 포함된다.

[0504] 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 지카 바이러스, 콜로라도 진드기열(RNA 바이러스, 콜티바이러스에 의해 유도됨), 웨스트 나일 열(주로 중동 및 아프리카에서 발생하는 플라비바이러스에 의해 유도되는, 뇌염), 황열, 광견병(랩도바이러스과의 여러 상이한 균주의 신경친화성 바이러스에 의해 유도됨), 바이러스성 간염, 노르윙크 및 노르윙크-유사 바이러스, 로타바이러스, 칼리시바이러스, 및 아스트로바이러스에 의해 유도되는 위장염(바이러스성)-급성 바이러스성 위장염, 회색질척수염, 빈번한 항원 변이를 거칠 수 있는 오르소믹소바이러스에 의해 유도되는 인플루엔자(독감), 홍염(루베올라), 파라믹소비리데, 볼거리, 바이러스성 폐렴 및 급성 호흡기 바이러스로 총칭되는 다양한 바이러스에 의해 유도되는 크루프를 포함하는 급성 호흡기 증후군을 포함하는 호흡기 증후군, 및 호흡기 융합 바이러스에 의해 유도되는 호흡기 질병을 치료하기 위해 사용된다.

[0505] **실시예**

[0506] **실시예 1. 물질 및 방법**

[0507] 유전 작제물의 합성

[0508] 전형적인 ledRNA 작제물을 설계하기 위해, 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드, 전형적으로 400개 내지 600개 뉴클레오티드 길이의 표적 RNA 영역을 확인하였다. 하나의 예에서, 서열의 5' 절반 및 대략 130 nt의 측면 영역 그리고 유사하게 3' 절반 및 130 nt의 측면 영역을 프로모터 대비 안티센스 배향으로 배치하였다. 이들 서열을 400개 내지 600개 뉴클레오티드 센스 표적 서열로 단속하였다(도 1a). 생성 작제물의 5' 말단에는 프로모터, 예컨대 T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터가 선행되었고 3' 말단은 시험관내 전사 종결을 허용하기 위해 제한 효소 절단 부위를 포함하도록 조작하였다.

[0509] 세포, 예컨대 박테리아 세포에서의 전사를 위해, 프로모터 및 종결자 서열을, 예를 들어 유도성 프로모터를 사용하여, 트랜스유전자로서의 발현을 촉진하기 위해 포함시켰다. 이중-가닥 영역 및 루프 서열 길이는 변화될 수 있다. 작제물은 표준 클로닝 방법을 사용해서 제조하거나 상업적 서비스 제공업체로부터 주문하였다.

[0510] RNA의 합성

[0511] 3' 말단에서 DNA를 선형화하기 위해 제한 효소로 소화 후, RNA 폴리머라제를 사용하는 전사로 중심 표적 서열에 어닐링하는 ledRNAi 전사체의 5' 및 3' 암을 생성하였고, 분자는 단일 닉(nick) 및 말단부 루프를 갖는 이중-가닥 영역 또는 중심 줄기를 포함하였다. 중심 서열은 프로모터에 대해 센스 또는 안티센스 배향으로 배치할 수 있다(각각 도 1a, 1b).

[0512] 시험관내 합성을 위해, 작제물의 DNA를 적절한 제한 효소를 사용하여 3' 제한 부위에서 소화시키고, 침전시키고, 정제하고, 정량하였다. RNA 합성은 제조업체의 지침에 따라 RNA 폴리머라제를 사용하여 달성하였다. ledRNA는 임의의 미량의 RN아제를 불활성화하기 위해 DEPC-처리수를 사용하여 어닐링 완충액(25 mM Tris-HCL, pH 8.0, 10 mM MgCl₂) 중에 재현탁하였다. 상기 방법에 의해 생성되는 RNA의 수율 및 온전성은 각각 나노-드롭 분석 및 겔 전기영동에 의해 결정하였다(도 2).

[0513] ledRNA의 합성은 대장균 균주 HT115 내로 작제물을 도입하여 박테리아 세포에서 달성하였다. 형질전환된 세포 배양을 IPTG(0.4 mM)로 유도하여 T7 RNA 폴리머라제를 발현하고, ledRNA 작제물의 전사를 제공하였다. 박테리아 세포로부터의 RNA 추출 및 정제는 본질적으로 문헌[Timmons et al. (2001)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0514] Cy3 표지화로의 RNA 전사를 위해, 리보뉴클레오티드(rNTP) 혼합물은 각각 10 mM의 ATP, GTP, CTP, 1.625 mM

UTP 및 8.74 mM Cy3-UTP를 함유하였다. 전사 반응을 2.5시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 전사 반응(160 μ l)을 에펜도르프 튜브로 옮기고, 17.7 μ l 터보 DN아제 완충액 및 1 μ l 터보 DNA를 첨가하고, 10분 동안 37℃에서 인큐베이션하여 DNA를 소화시켰다. 이어서, 17.7 μ l 터보 DN아제 불활성화 용액을 첨가하고, 혼합하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 2분 동안 원심분리하고 상청액을 새로운 RN아제 비함유 에펜도르프 튜브로 옮겼다. 1.5 μ l의 각각의 전사 반응의 샘플을 겔 상에서 전기영동하여 RNA 산물의 품질을 평가하였다. 일반적으로, 작제물에 따라 500 bp 내지 1000 bp 크기에서 하나의 RNA 밴드가 관찰되었다. 88.5 μ l 7.5 M 암모늄 아세테이트 및 665 μ l 저온 100% 에탄올을 각각의 튜브에 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 튜브를 수 시간 또는 하룻밤 동안 -20℃로 냉각한 후, 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상청액을 조심스럽게 제거하고 RNA 펠렛을 -20℃에서 1 ml의 70% 에탄올(뉴클레아제 비함유수로 제조)로 세척하고 원심분리하였다. 펠렛을 건조하고 정제된 RNA를 50 μ l 1x RNAi 어닐링 완충액 중에 재현탁하였다. RNA 농도를 나노드롭 방법을 사용하여 측정하고 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0515] 실시예 2. ledRNA의 설계

도 1a에 도식적으로 나타낸 바와 같이, 전형적인 ledRNA 분자는 공유 연결되고 표적 RNA와 동일성을 갖는 2개의 인접한 센스 서열로 간주될 수 있는 센스 서열, 센스 서열과 상보적이고 2개 영역으로 구분되는 안티센스 서열, 및 센스 서열을 안티센스 서열과 분리하는 2개의 루프를 포함한다. 따라서 상기 형태의 ledRNA를 인코딩하는 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, ledRNA 코딩 영역의 전사를 위한 프로모터, 표적 RNA의 5' 말단을 향한 영역과 상보성을 갖는 제1 안티센스 영역, 제1 루프 서열, 센스 서열, 제2 루프 서열, 이어서 표적 RNA의 3' 말단을 향한 영역과 상보성을 갖는 제2 안티센스 영역, 및 마지막으로 전사를 종결시키기 위한 수단을 포함한다. 상기 배열에서, 2개의 안티센스 서열이 센스 서열 및 루프 서열의 측면에 있었다. 전사되는 경우, 안티센스 서열의 2개 영역은 센스 서열과 어닐링하여, 측면에 있는 2개의 루프를 갖는 dsRNA 줄기를 형성한다.

또 다른, 그러나 관련된 형태의 ledRNA에서, 센스 서열은 2개 영역으로 분할되는 반면, 2개의 안티센스 영역은 하나의 서열로 유지된다(도 1b). 따라서 상기 제2 형태의 ledRNA를 인코딩하는 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, ledRNA 코딩 영역의 전사를 위한 프로모터, 표적 RNA의 3' 말단을 향한 영역과 동일성을 갖는 제1 센스 영역, 제1 루프 서열, 안티센스 서열, 제2 루프 서열, 이어서 표적 RNA의 5' 말단을 향해 동일성을 갖는 제2 센스 영역, 및 마지막으로 전사를 종결시키기 위한 수단을 포함한다. 상기 배열에서, 2개의 센스 서열은 안티센스 서열 및 루프 서열의 측면에 있었다.

이론에 의해 제한받고자 하지 않고, 각 말단에서의 폐쇄된 루프로 인해, 이들 ledRNA 구조는 단일-가닥 센스 및 안티센스 RNA 간에 형성되고 루프를 갖지 않는 개방-말단 dsRNA보다, 그리고 또한 하나의 루프만을 갖는 헤어핀 RNA에 비해 엑소뉴클레아제에 대해 더 내성이 있을 것이다. 또한, 본 발명자들은 dsRNA 줄기의 두 말단에서의 루프가 다이서로 하여금 두 말단에 효율적으로 접근할 수 있도록 함으로써 dsRNA의 sRNA로의 가공 및 침묵화 효율을 증강시킬 것으로 구상하였다.

제1 예로서, 유전 작제물을 T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사를 위해 제조하여 GFP 또는 GUS를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA를 형성하였다. ledGFP 작제물은 순서대로 하기 영역: GFP 코딩 서열(CDS)(SEQ ID NO:7)의 뉴클레오티드 358 내지 131에 대응하는 안티센스 서열의 제1 절반, GFP CDS의 뉴클레오티드 130 내지 1에 대응하는 제1 안티센스 루프, GFP CDS의 뉴클레오티드 131 내지 591에 대응하는 센스 서열, GFP CDS의 뉴클레오티드 731 내지 592에 대응하는 제2 안티센스 루프, 및 GFP CDS의 뉴클레오티드 591 내지 359에 대응하는 안티센스 서열의 제2 절반으로 이루어졌다.

ledGUS 작제물은 순서대로 하기 영역: GUS CDS(SEQ ID NO:8)의 뉴클레오티드 609 내지 357에 대응하는 안티센스 서열의 제1 절반; GUS CDS의 뉴클레오티드 356 내지 197에 대응하는 제1 안티센스 루프, GUS CDS의 뉴클레오티드 357 내지 860에 대응하는 센스 서열, GUS CDS의 뉴클레오티드 1029 내지 861에 대응하는 제2 안티센스 루프; 및 GUS CDS의 뉴클레오티드 861 내지 610에 대응하는 안티센스 서열의 제2 절반으로 이루어졌다.

별도 가닥의 센스/안티센스 GUS dsRNA(통상적 dsRNA)를 제조하기 위해, GUS CDS의 뉴클레오티드 357 내지 860에 대응하는 동일한 표적 서열을 pGEM-T Easy 벡터에서 T7 및 SP6 프로모터 간에 결합하였다. 센스 및 안티센스 가닥을 각각 T7 또는 SP6 폴리머라제로 별도 전사하고, 전사체의 혼합 및 RNA 가닥을 변성시키기 위한 혼합물의 가열 후 어닐링 완충액 중에 어닐링하였다.

[0522] 실시예 3. ledRNA의 안정성

ledRNA가 dsRNA 구조를 형성하는 능력을 개방-말단 dsRNA(즉, 별도의 단일-가닥 센스 및 안티센스 RNA의 어닐링

에 의해 형성되며, 루프 비합유) 및 긴 hpRNA와 비교하였다. ledRNA, 긴 hpRNA, 그리고 센스 및 안티센스 RNA의 혼합물을 가열에 의해 변성시키고 어닐링 완충액(250 mM Tris-HCL, pH 8.0 및 100 mM MgCl₂) 중에 어닐링하도록 둔 후 비변성 조건 하에 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동하였다.

[0524] 도 2에 나타낸 바와 같이, GUS ledRNA 및 GFP ledRNA는 둘 다 이중-가닥 분자에 대해 예상되는 이동성을 갖는 우세한 RNA 밴드를 제공하여, 예측되는 ledRNA 구조의 형성을 시사하였다. 이는 dsRNA에 대한 약한 밴드만을 나타낸 센스 및 안티센스 RNA의 혼합물과는 대조적이어서, 대부분의 센스 및 안티센스 RNA가 dsRNA를 형성하기 위해 서로 쉽게 어닐링되지 않음을 시사하였다. 헤어핀 RNA 샘플은 2개의 뚜렷한 밴드를 제공하여, 전사체의 일부만 예측되는 헤어핀 RNA 구조를 형성함을 시사하였다. 따라서, ledRNA가 예측되는 dsRNA 구조의 형성에 있어서 가장 효율적이었다.

[0525] ledRNA가 잎 표면 상에 남아서 확산되는 능력을 또한 dsRNA와 비교하였다. GUS ledRNA(ledGUS)는 담배 잎 표면의 하부 부분에 적용하는 경우, 24시간 후 잎의 미처리 상부 부분에서 쉽게 검출할 수 있었다(도 3). 그러나, 별도 가닥의 GUS dsRNA(dsGUS)는 잎의 미처리 상부 부분에서 검출할 수 없었다(도 3). 상기 결과는 ledRNA가 dsRNA보다 분해에 더 내성이 있고 이에 따라 식물 잎 조직 내부에서 확산될 수 있음을 시사한다.

[0526] 실시예 4. 국소 전달에 의한 ledRNA의 평가

[0527] 국소 전달 후 ledRNA가 RNAi를 유도하는 능력을 각각 GFP 또는 GUS 리포터 유전자를 발현하는 니코티아나 벤타미아나 및 니코티아나 타바쿰 식물에서 평가하였다. GFP 및 GUS 표적 서열 및 ledRNA 인코딩 작제물의 서열을 각각 SEQ ID NO: 7, 8, 4 및 5에 나타낸다. 인코딩되는 RNA 분자의 리보뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO 1(GFP ledRNA) 및 2(GUS ledRNA)로 제공한다.

[0528] 잎 표면 상으로의 ledRNA의 재현성 있고 균일한 적용을 촉진하기 위해, 25 mM Tris-HCL, pH 8.0, 10 mM MgCl₂ 및 Silwet 77(0.05%) 중 75 µg/ml 내지 100 µg/ml 농도의 ledRNA를 소프트 페인트 브러시를 사용하여 잎의 향측 표면으로 적용하였다. ledRNA 적용 후 6시간 및 3일차에, 잎 샘플을 표적화된 유전자 침묵화의 분석을 위해 채취하였다.

[0529] 니코티아나 벤타미아나 잎에서 GFP에 대한 그리고 니코티아나 타바쿰 잎에서 GUS에 대한 ledRNA의 적용은 처리 후 6시간째에 mRNA(GFP) 또는 단백질 활성(GUS) 수준에서 각각의 표적 유전자 활성의 20% 내지 40% 및 40% 내지 50%의 뚜렷한 감소를 일으켰다. 그러나, 상기 실험에서 처리 후 3일째에는 감소가 지속되지 않았다. 본 발명자들은 3일째의 관찰이 dsRNA 처리에 대한 트랜스유전자의 일부 비특이적인 반응 또는 분산된 양의 ledRNA에 기인할 수 있는 것으로 간주하였다. 그러나, 별도의 실험에서, GUS 침묵화가 ledRNA 처리 후 24시간째에 처리 및 원위 미처리 잎 영역 모두에서 검출되었다(도 4).

[0530] 실시예 5. 내인성 표적 유전자의 ledRNA-유도 침묵화

[0531] 추가 실시예에서, ledRNA를 내인성 유전자, 즉 니코티아나 벤타미아나의 FAD2.1 유전자에 의해 인코딩되는 mRNA를 표적화하도록 설계하였다. 표적 FAD2.1 mRNA 및 ledFAD2.1 인코딩 작제물의 서열을 각각 SEQ ID NO: 9 및 6에 나타낸다. 인코딩되는 RNA 분자의 리보뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO: 3(니코티아나 벤타미아나 FAD2.1 ledRNA)으로 제공한다.

[0532] FAD2.1 ledRNA 작제물은 하기: FAD2.1 CDS(Niben101Scf09417g01008.1)의 뉴클레오타이드 678 내지 379에 대응하는 안티센스 서열의 제1 절반; FAD2.1 CDS의 nt. 378 내지 242에 대응하는 제1 안티센스 루프; nt. 379 내지 979에 대응하는 센스 서열; nt 1115 내지 980에 대응하는 제2 안티센스 루프; 및 FAD2.1 CDS의 nt 979 내지 nt 679에 대응하는 안티센스 서열의 제2 절반으로 이루어졌다.

[0533] 앞 실시예로부터의 ledGUS RNA를 음성 대조군으로서 병렬로 사용하였다. 제1 실험에서, 표적 유전자 침묵화를 FAD2.1 mRNA 및 축적 C18:1 지방산 수준 모두에 대해 검정하였다(도 5). 관련 유전자, FAD2.2의 활성 수준을 또한 검정하였다. 각각의 샘플에 있어서, 대략 3 µg의 총 RNA를 DN아제 처리하고 올리고 dT 프라이머를 사용하여 50분 동안 50°C에서 역전사하였다. 반응을 5분 동안 85°C에서 종료시키고 물로 120 µl까지 희석하였다. 로터 유전자 PCR 기계를 사용하여, 각 샘플 5 µl를 3개씩, 하우스 키핑 유전자 액틴에 대한 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 FAD 2.1 및 FAD 2.2 mRNA의 상대 발현에 대해 분석하였다. 후속 실험에서, 노던 블롯 혼성화를 또한 국소 적용된 ledFAD2.1 RNA에 의한 FAD2.1 유전자의 침묵화를 확인하기 위해 사용하였다(도 6).

[0534] FAD2.1 mRNA는 2시간, 4시간 및 10시간 시점에 ledRNA로 처리된 잎 조직에서 거의 검출 불가능한 수준으로 유의하게 감소되었다(도 5). 상기 실험에서, FAD2.1 mRNA의 수준이 6시간 시점에서만큼 감소되지 않은 이유가 명

확하지 않았다. 도 6에 나타난 반복 실험에서, 6시간 및 24시간에 모두, 특히 24시간 시점에, 강력한 FAD2.1 하향조절이 일어났다. FAD2.1과 서열 상동성을 갖는 관련 FAD2.2 유전자도 *ledRNA*에 의해 2시간 및 4시간 시점에 하향조절을 나타내었다(도 5).

[0535] FAD2.1 및 FAD2.2는 올레산을 리놀레산으로 탈포화시키는 지방산 $\Delta 12$ 탈포화효소를 인코딩하므로, 이들 지방산의 수준을 *ledRNA*로 처리된 잎 조직에서 검정하였다. 2시간, 4시간 및 6시간 시점에 *ledRNA*-처리 잎 조직에서 올레산(18:1) 축적이 명확히 증가했고, 이는 감소된 양의 FAD2 효소를 시사하였다(도 5). 따라서, qRT-PCR 및 지방산 조성 검정은 둘 다 FAD2.1 유전자의 *ledRNA* 유도 침묵화를 나타내었다.

[0536] **실시예 6. G:U 염기쌍 또는 미스매치된 뉴클레오티드를 포함하는 헤어핀 RNA의 설계 및 평가**

[0537] GUS RNA를 표적화하는 변형 헤어핀 RNA

[0538] 리포터 유전자, 예컨대 효소 β -글루쿠로니다제(GUS)를 인코딩하는 유전자는 식물 세포를 포함하는 진핵 세포에서 유전자 침묵화 효율을 측정하기 위해 사용될 수 있는 단순하고 편리한 검정 시스템을 제공한다(Jefferson et al., 1987). 따라서 본 발명자들은 일부 변형 헤어핀 RNA를 설계하고, 생성하고, 유전자-전달 접근을 사용하여 세포에 헤어핀 RNA를 제공하는 표적 유전자로서 GUS 유전자의 발현을 감소시키는 이의 능력에 대해 평가하고, 변형 헤어핀을 통상적 헤어핀 RNA와 비교하였다. 실험에서 대조군으로 사용된 통상적 헤어핀 RNA는 모든 염기쌍이 정규 염기쌍, 즉 임의의 G:U 염기쌍이 없는 G:C 및 A:U 염기쌍이고, 이중-가닥 영역에서 염기쌍을 형성하지 않은 임의의 뉴클레오티드(미스매치)를 갖지 않고, 변형 헤어핀 RNA와 동일한 200 nt 영역의 GUS mRNA 분자를 표적화하는, 200개의 인접한 염기쌍 길이의 이중-가닥 영역을 가졌다. 이중-가닥 영역을 형성한 센스 및 안티센스 서열은 PDK 인트론을 포함하는 스페이서 서열에 의해 공유 연결되어(Helliwell et al., 2005; Smith et al., 2000), 일차 전사체로부터 인트론의 스플라이싱 후 39개 또는 45개 뉴클레오티드(사용된 클로닝 전략에 따라) 길이의 RNA 루프를 제공하였다. 안티센스 서열을 위해 사용된 DNA 단편에는 발현 카세트 내로의 용이한 클로닝을 위해 5' 말단에 *XhoI*-*BamHI* 제한 부위 및 3' 말단에 *HindIII*-*KpnI* 제한 부위가 측면에 있었고, 각각의 센스 서열에는 *XhoI* 및 *KpnI* 제한 부위가 측면에 있었다. 대조군 헤어핀 및 변형 헤어핀 모두에 있어서, 각각의 헤어핀 RNA의 200 bp dsRNA 영역에는 단백질 코딩 영역 내로부터의 야생형 GUS 서열과 전체적으로 상보적인 200개 뉴클레오티드의 안티센스 서열이 포함되었다. SEQ ID NO:10의 뉴클레오티드 13~212에 대응하는 상기 안티센스 서열은 GUS 개방 해독틀(ORF)(SEQ ID NO:8로 제공되는 cDNA 서열)의 뉴클레오티드 804~1003의 상보체였다. 따라서 GUS 표적 mRNA는 1900 nt보다 길었다. 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하는 DNA 단편의 합성을 위해 합리적으로 편리하도록 충분히 작게, 그러나 다이스에 의한 가공 시 여러 sRNA 분자를 제공하도록 충분히 길게, 센스 및 안티센스 서열에 대해 200개 뉴클레오티드 길이를 선택하였다. ORF의 일부로서, 서열은 잠재 스플라이스 부위 또는 전사 종료 부위를 함유하지 않을 것으로 생각되었다.

[0539] 유전 작제물의 제조

[0540] 200 bp GUS ORF 서열을 각각 *XhoI* 및 *BamHI* 부위 또는 *HindIII* 및 *KpnI* 부위를 함유하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍 GUS-WT-F(SEQ ID NO:52) 및 GUS-WT-R(SEQ ID NO:53)을 사용해서 PCR-증폭하여 GUS 서열의 5' 및 3'에 이들 제한 효소 부위를 도입하였다. 증폭된 단편을 벡터 pGEM-T Easy 내로 삽입하고, 정확한 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다. GUS 단편을 *BamHI* 및 *HindIII*로의 소화에 의해 절제하여 pKannibal(Helliwell and Waterhouse, 2005)의 *BamHI*/*HindIII* 부위 내로 삽입하고, 이를 작동 가능하게 연결된 CaMV e35S 프로모터(Grave, 1992) 및 *ocs* 유전자 폴리아데닐화/전사 종결자(*Ocs*-T) 대비 안티센스 배향으로 GUS 서열에 삽입하였다. 생성 벡터를 pMBW606으로 명명하였고, 이는 5'에서 3'으로 35S::PDK 인트론::안티센스 GUS::Ocs-T 발현 카세트를 함유하였다. 상기 벡터가 4개의 hpRNA 작제물을 조립하기 위한 기본 벡터로서 사용된 중간체 벡터였다.

[0541] 정규 염기쌍만 갖는 작제물 hpGUS[wt]

[0542] 정규 염기쌍만 갖는, 실험에서 대조군으로서 사용되는 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는 hpGUS[wt]로 명명된 벡터를 제조하기 위해, 200 bp GUS PCR 단편을 *XhoI* 및 *KpnI*로 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 절제하고, pMBW606에서 35S 프로모터 및 PDK 인트론 간 *XhoI*/*KpnI* 부위 내로 삽입하였다. 이는 35S::센스 GUS[wt]::PDK 인트론::안티센스 GUS::Ocs-T 발현 카세트를 함유하는, pMBW607로 명명된 벡터를 생성하였다. 상기 카세트를 *NotI*로의 소화에 의해 절제하고, pART27(Gleave, 1992)의 *NotI* 부위 내로 삽입하여, GUS mRNA를 표적화하는 정규 염기쌍 형성 헤어핀 RNA를 인코딩하는, hpGUS[wt]로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0543] 200 nt 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 상기 헤어핀은 GUS 서열에 대응하는 200

개 연속 염기쌍의 이중-가닥 영역을 가졌다. 발현 카세트에서의 센스 및 안티센스 서열에는 GUS 센스 서열 대비 5' 및 3' 말단에 각각 존재하는 *Bam*HI 및 *Hind*III 제한 부위가 각 측면에 있었다. 전사되는 경우, 이들 부위에 대응하는 뉴클레오티드는 또한 혼성화하여, 각 말단에서 6 bp만큼 이중-가닥 영역을 연장할 수 있었다. 발현 카세트의 전사 및 PDK 인트론의 일차 전사체로부터의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 39개 뉴클레오티드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 RNA 구조의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:15로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -471.73 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다. 자유 에너지는 PDK 인트론 서열의 스플라이싱 제거 후 뉴클레오티드 서열에 기반하여 "RNAfold"(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)를 사용하여 계산하였다.

[0544] 35S 프로모터 및 OCS-T 종결자를 갖는 발현 카세트로부터 전사되는 경우, 생성 헤어핀 RNA를 5' 말단에 부가된 8개 뉴클레오티드 및 3' 말단에서의 임의의 폴리-A 테일의 부가는 고려하지 않고, 3' 말단에 부가된 대략 178개의 뉴클레오티드를 갖는 더 큰 RNA 분자에 포매하였다. 동일한 프로모터-종결자 설계를 변형 헤어핀 RNA에 대해 사용하였으므로, 이들 분자도 5' 및 3' 말단에 이러한 연장을 가졌다. 따라서 PDH 인트론의 스플라이싱 후 헤어핀 RNA 분자의 길이는 대략 630개 뉴클레오티드였다.

[0545] *G:U* 염기쌍을 포함하는 작제물 *hpGUS[G:U]*

[0546] 동일한 200개 뉴클레오티드의 센스 서열을 포함하지만, 대응하는 야생형 GUS 영역의 모든 52개 시티딘 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 치환된 DNA 단편을 증폭 올리고뉴클레오티드 GUS-GU-F(SEQ ID NO:54) 및 GUS-GU-R(SEQ ID NO:55)의 어닐링 및 고-정확도 LongAmp Taq 폴리머라제(New England Biolabs, catalogue number M0323)를 사용하는 3' 말단의 PCR 연장에 의해 조립하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 삽입하고 정확한 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:11)을 서열분석에 의해 확인하였다. 이어서 변형된 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I로의 소화에 의해 절제하고 기본 벡터 pMBW606의 *Xho*I/*Kpn*I 부위 내로 삽입하였다. 이는 발현 카세트 35S::센스 GUS[G:U]::PDK 인트론::안티센스 GUS::OCS-T를 함유하는, pMBW608로 명명된 작제물을 생성하였다. 상기 발현 카세트를 *Not*I 소화로 절제하고 pART27의 *Not*I 부위 내로 삽입하여, G:U 염기쌍 형성 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는, *hpGUS[G:U]*로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0547] 상기 카세트는 GUS mRNA를 표적화하는 헤어핀 RNA를 인코딩하였고, 200 nt 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 52개의 G:U 염기쌍(*hpGUS[wt]*에서의 G:C 염기쌍 대신) 및 148개의 정규 염기쌍을 가졌다. 즉, 이중-가닥 영역의 뉴클레오티드의 26%가 G:U 염기쌍에 관여되었다. *hpGUS[G:U]*에서의 148개의 정규 염기쌍은 49개의 U:A 염기쌍, 45개의 A:U 염기쌍 및 54개의 G:C 염기쌍을 포함하여, 대응하는 위치에서 대조군 헤어핀 RNA에서와 동일하였다. 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 9개 염기쌍이었다. 이에 의해 *hpGUS[G:U]*의 안티센스 뉴클레오티드 서열은 대조군 헤어핀 RNA *hpGUS[wt]*의 안티센스 서열과 길이(200 nt) 및 서열이 동일하였다. 발현 카세트의 전사 및 일차 전사체로부터 PDK 인트론의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 45개 뉴클레오티드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 구조의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:16으로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -331.73 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 *hpGUS[wt]*에 대한 것과 마찬가지로, 개별적으로 *hpGUS[wt]*에서의 G:C 염기쌍에 비해 훨씬 더 약한 52개의 G:U 염기쌍에도 불구하고, 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다.

[0548] 변형된 GUS 센스 서열(SEQ ID NO:11의 뉴클레오티드 9~208)과 GUS 표적 유전자(SEQ ID NO:14)의 대응하는 영역의 정렬을 도 7에 나타낸다.

[0549] 4번째 뉴클레오티드마다 미스매치된 뉴클레오티드를 포함하는 작제물 *hpGUS[1:4]*

[0550] 동일한 200 bp 센스 서열을 포함하지만 대응하는 야생형 GUS 서열의 4번째 뉴클레오티드마다 치환된 DNA 단편을 설계하고 조립하였다. 4개 뉴클레오티드의 각 블록에서의 모든 4번째 뉴클레오티드(위치 4, 8, 12, 16, 20 등에서의 뉴클레오티드)는 C를 G로, G를 C로, A를 T로, 및 T를 A로 변화시켜 치환하였고, 다른 뉴클레오티드는 변화시키지 않고 놔두었다. 이들 치환은 모두 변위 치환이었고, 전이 치환에 비해 생성 헤어핀 RNA 구조에 대해 더 큰 탈안정화 효과를 가질 것으로 예상되었다. 증폭 올리고뉴클레오티드 GUS-4M-F(SEQ ID NO:56) 및 GUS-4M-R(SEQ ID NO:57)의 어닐링 및 LognAmp Taq 폴리머라제를 사용하는 3' 말단의 PCR 연장에 의해 DNA 단편을 조립하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 삽입하고 정확한 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:12)을 서열분석에 의해 확인하였다. 이어서 변형된 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I로의 소화에 의해 절제하고 기본 벡터 pMBW606의 *Xho*I/*Kpn*I 부위 내로 삽입하였다. 이는 발현 카세트 35S::센스 GUS[1:4]::PDK 인트론::안티

센스 GUS::OCS-T를 함유하는, pMBW609로 명명된 작제물을 생성하였다. 상기 발현 카세트를 *NotI* 소화로 절제하고, pART27의 *NotI* 부위 내로 삽입하여, 1:4 미스매치 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는, hpGUS[1:4]로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0551] 상기 카세트는 GUS mRNA를 표적화하며, 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 위치 200에서의 뉴클레오타이드에 대한 미스매치를 포함하여, 200 nt 안티센스 서열의 50개 뉴클레오타이드에 대한 미스매치를 가진 헤어핀 RNA를 인코딩하였다. 위치 200을 제외하고, 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역은 199 nt 센스 및 안티센스 서열 길이에 걸쳐 150개의 정규 염기쌍 및 49개의 미스매치 뉴클레오타이드쌍을 가졌다, 즉 이중-가닥 영역 뉴클레오타이드의 24.6%가 미스매치됨(염기쌍에 관여되지 않을) 것으로 예측되었다. 발현 카세트의 전사 및 일차 전사체로부터 PDK 인트론의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 45개 뉴클레오타이드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 구조의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:17로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -214.05 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 hpGUS[wt]에 대한 것과 마찬가지로, 미스매치 뉴클레오타이드에도 불구하고, 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다.

[0552] 변형된 GUS 센스 서열(SEQ ID NO:12의 뉴클레오타이드 9~208)과 GUS 표적 유전자(SEQ ID NO:14)의 대응하는 영역의 정렬을 도 8에 나타낸다.

[0553] 10개의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 9 및 10이 미스매치된 작제물 hpGUS[2:10]

[0554] 동일한 200 bp 센스 서열을 포함하지만 대응하는 야생형 GUS 서열의 9번째 및 10번째 뉴클레오타이드마다 치환된 DNA 단편을 설계하고 조립하였다. 10개 뉴클레오타이드의 각 블록에서의 모든 9번째 및 10번째 뉴클레오타이드(위치 9, 10, 19, 20, 29, 30 등에서의 뉴클레오타이드)는 C를 G로, G를 C로, A를 T로, 및 T를 A로 변화시켜 치환하였고, 다른 뉴클레오타이드를 변화시키지 않고 놔두었다. 중복 올리고뉴클레오타이드 GUS-10M-F(SEQ ID NO:58) 및 GUS-10M-R(SEQ ID NO:59)의 어닐링 및 LognAmp Taq 폴리머라제를 사용하는 3' 말단의 PCR 연장에 의해 DNA 단편을 조립하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 삽입하고 정확한 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:13)을 서열분석에 의해 확인하였다. 이어서 변형된 서열을 포함하는 DNA 단편을 *XhoI* 및 *KpnI* 로의 소화에 의해 절제하고 기본 벡터 pMBW606의 *XhoI/KpnI* 부위 내로 삽입하였다. 이는 발현 카세트 35S::센스 GUS[2:10]::PDK 인트론::안티센스 GUS::OCS-T를 함유하는, pMBW610으로 명명된 작제물을 생성하였다. 상기 발현 카세트를 *NotI* 소화로 절제하고, pART27의 *NotI* 부위 내로 삽입하여, 2:10 미스매치 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는, hpGUS[2:10]으로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0555] 상기 카세트는 GUS mRNA를 표적화하며, 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 위치 199 및 200에서의 뉴클레오타이드에 대한 미스매치를 포함하여, 200 nt 안티센스 서열의 50개 뉴클레오타이드에 대한 미스매치를 가진 헤어핀 RNA를 인코딩하였다. 위치 199 및 200을 제외하고, 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역은 198 nt 센스 및 안티센스 서열 길이에 걸쳐 160개의 정규 염기쌍 및 19개의 디-뉴클레오타이드 미스매치를 가졌다, 즉 이중-가닥 영역 뉴클레오타이드의 19.2%가 미스매치됨(염기쌍에 관여되지 않을) 것으로 예측되었다. 41개의 U:A 염기쌍, 34개의 A:U 염기쌍, 42개의 G:C 및 43개의 C:G 염기쌍을 포함하는 hpGUS[2:10]에서의 160개의 염기쌍은 대응하는 위치에서 대조군 헤어핀 RNA에서와 동일하였다. 발현 카세트의 전사 및 일차 전사체로부터 PDK 인트론의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 45개 뉴클레오타이드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 구조의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:18로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -302.78 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 hpGUS[wt]에 대한 것과 마찬가지로, 헤어핀 구조의 줄기 밖에서 볼록부로 돌출할 것으로 예상되는 미스매치 뉴클레오타이드에도 불구하고, 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다.

[0556] 변형된 GUS 센스 서열(SEQ ID NO:13의 뉴클레오타이드 9~208)과 GUS 표적 유전자(SEQ ID NO:14)의 대응하는 영역의 정렬을 도 9에 나타낸다.

[0557] 대조군 및 변형 헤어핀 RNA의 발현을 위한 4개의 유전 작제물을 도 10에 도식적으로 나타낸다.

[0558] 실시예 7. 트랜스제닉 식물에서 변형 헤어핀 RNA의 평가

[0559] GUS 표적 유전자로 형질전환된 니코티아나 타바쿰(담배) 중 식물을 사용하여 상술된 4개의 헤어핀 RNA 작제물의 효능을 평가하였다. 구체적으로, 표적 식물은 각각 도 11에 도식적으로 나타내는 벡터 pWBPPGH로부터의 GUS 트랜스유전자의 단일-카피 삽입을 함유하는, 2개의 동종접합성, 독립적 트랜스제닉 라인인 PPGH11 및 PPGH24로부터 유래되었다. pWBPPGH의 T-DNA에서의 GUS 유전자는 쿠쿠르비타 페포(*Cucurbita pepo*) L. cv. Autumn

Gold(Wang et al., 1994; Wang, 1994)로부터의 체관부 단백질 2(PP2) 유전자의 1.3 kb 길이 프로모터에 작동 가능하게 연결된 GUS 코딩 영역(SEQ ID NO:8의 뉴클레오티드 7~1812)을 가졌다. PP2 프로모터와 5' UTR 및 램다 계놈 클론 CPP1.3(Wang, 1994)으로부터, PP2의 처음 18개 아미노산을 인코딩하는 PP2 단백질 코딩 영역의 54개 뉴클레오티드를 절제하고, 상기 단편을 GUS의 세 번째 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오티드로 시작하는 GUS 코딩 서열과 융합하여, GUS 활성을 갖는 N-말단부 융합 폴리펩타이드를 생성함으로써 작제물 pWBPPGH를 제조하였다. pPP2::GUS:Nos-T 카세트를 pWVec2a(Wang et al., 1998) 내로 삽입하여 pWBPPGH를 생성하고, 이를 사용하여 아그로박테리움 투메파시엔스-매개 잎 디스크 형질전환(Ellis et al., 1987)을 사용하여 니코티아나 타바쿰 cv. Wisconsin 38 식물을 형질전환하고, 하이그로마이신에 대한 내성에 대해 선택하였다. 2개의 트랜스제닉 라인 PPGH11 및 PPGH24의 동종접합성 자손 식물에서의 GUS 활성은 유사하였다. 두 트랜스제닉 식물 모두에서 GUS 발현은 체관부로 제한되지 않았고 식물의 대부분의 조직에 존재하였다. 따라서 이들 식물에서 PP2 프로모터로부터의 GUS 발현은 구성적인 것으로 나타났다. 평가 식물로서 PP2-GUS 식물을 선택한 데에는 2가지 이유가 있었다: i) 이들은 35S-GUS 식물과 거의 동일한 구성적으로 높은 수준의 GUS 발현을 제공하며; ii) PP2 프로모터는 hpRNA 트랜스유전자의 발현을 유도하기 위해 사용되는 35S 프로모터와 상이한 서열을 갖는 쿠쿠르비타 페 포로부터 유래되는 내인성 PP2 유전자 프로모터이고, 이에 따라 도입 35S 프로모터에 의한 전사 공동억제를 거치지 않을 것이다.

[0560] 모든 4개의 헤어핀 RNA 작제물(실시예 6)을 사용하여 아그로박테리움-매개 잎-디스크 방법(Ellis et al., 1987)을 사용하고 선택 제제로서 50 mg/l 카나마이신을 사용하여 PPGH11 및 PPGH24 식물을 형질전환시켰다. pWBPPGH의 T-DNA를 도입하기 위해 사용된 이전에 사용된 하이그로마이신과는 상이한 제제인 카나마이신을 이용한 상기 선택 시스템은 형질전환된 식물만을 산출하는 것으로 관찰되었고, 형질전환되지 않은 식물은 재생되지 않았다. hpGUS 작제물로부터의 T-DNA를 함유하는 재생된 트랜스제닉 식물을 온실에서의 성장을 위해 토양으로 옮겨 약 4주 동안 유지한 후 GUS 활성을 검정하였다. 검정되었을 때, 트랜스제닉 식물은 건강하고, 잘 자라고 있었으며, 외관에 있어서 형질전환되지 않은 대조군 식물 그리고 모체 PPGH11 및 PPGH24 식물과 동일하였다. 전체적으로, hpGUS[wt]를 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 59개의 트랜스제닉 식물을 수득하였고, hpGUS[G:U]를 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 74개의 식물을 수득하였고, hpGUS[1:4]를 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 33개의 식물을 수득하였고, hpGUS[2:10]을 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 41개의 식물을 수득하였다.

[0561] 형광계측 4-메틸움벨리페릴 β-D-글루쿠로니드(MUG) 검정(Jefferson et al., 1987)에 이어 문헌[Chen et al. (2005)]에 기재된 변형된 역학적 방법을 사용하여 GUS 발현 수준을 측정하였다. 잘 퍼지고, 건강하고, 녹색인 잎을 골라, 각 식물에서 3개의 상이한 잎으로부터 약 1 cm 지름의 잎 샘플을 채취하여 식물을 검정하였다. 평가 식물이 대조군 식물과 동일한 성장 및 발달 단계에 있도록 주의하였다. 각 검정에서는 잎 샘플 당 5 μg 추출 단백질을 사용하였고, 문헌[Chen et al. (2005)]에 기재된 바와 같이 MUG의 절단율을 측정하였다.

[0562] 각각의 독립적인 트랜스제닉 식물에 대해 GUS 활성(검정에서 MUG 단위)을 나타내는, 대표 데이터를 도 12에 나타낸다. hpGUS[wt] 작제물로부터의 데이터는 일부 식물이 적어도 90% 활성 감소를 갖는 강력한 침묵화를 나타내고, 다른 것은 더 약한 침묵화를 나타냄을 보였으므로, 상기 맥락에서 식물을 2개 분류로 분류하고 상이한 작제물을 비교하는 활성 수준으로 대조군 식물 대비 10% GUS 활성을 선택하였다.

[0563] 정규 엽기쌍을 형성한 hpGUS[wt]를 인코딩하는 유전 작제물은 강력한 침묵화에 대한 벤치마크로서 10% 활성 수준을 사용하여 평가된 59개의 트랜스제닉 식물 중 32개(54.2%)에서 강력한 GUS 침묵화를 유도하였다. 다른 27개 식물은 모두 감소된 GUS 활성을 나타내었으나 대조군 식물 대비 10% 초과 효소 활성을 보유하고, 이에 따라 상기 맥락에서 약한 침묵화를 나타내는 것으로 간주되었다. 상기 작제물을 이용한 트랜스제닉 식물은 통상적 헤어핀 설계에 있어서 전형적인(Smith et al., 2000) 1% 미만부터 약 80% 활성 잔여까지 광범위한 정도의 GUS 유전자 침묵화를 나타내었다(도 12).

[0564] 명확히 대비되어, hpGUS[G:U] 작제물은 독립적인 트랜스제닉 라인에 걸쳐 일관되고 균일한 침묵화를 유도하였고, 평가된 74개 식물 중 71개(95.9%)가 강력한 GUS 침묵화를 나타내었다. 또 다시 상이하게, 평가된 모든 33개의 hpGUS[1:4] 식물은 감소된 수준의 GUS 활성을 나타내었고, 8개(24%)만 대조군 식물 대비 10% 미만의 GUS 활성을 산출하였고, 다른 25개는 더 약한 침묵화를 갖는 것으로 분류되었다. 이들 결과는 상기 작제물이 트랜스제닉 라인에 걸쳐 더 약하지만 더 균일한 수준의 GUS 하향조절을 유도함을 시사하였다. hpGUS[2:10] 작제물은 hpGUS[wt] 작제물과 더 유사하게 작용하여, 일부 라인(41개 중 28개, 또는 68.3%)에서 우수한 수준의 침묵화를 유도하였고, 나머지 13개 식물에서는 GUS 침묵화를 거의 또는 전혀 일으키지 않았다.

[0565] 침묵화된 라인(10% 미만 잔여 활성)만을 비교를 위해 사용하여 평균 GUS 활성을 계산한 경우, hpGUS[wt] 식물이

가장 높은 평균 침묵화 정도를 나타내었고, 그 다음은 hpGUS[G:U] 식물 그리고 hpGUS[2:10] 식물 순서였다(도 13). hpGUS[1:4] 식물은 GUS 활성의 가장 적은 평균 감소를 나타내었다. GUS 침묵화 정도는 4개의 상이한 hpRNA 작제물로부터 유래되는 예측되는 hpRNA 구조의 열역학적 안정성과 우수한 상관관계를 나타내었다(실시예 6).

[0566] 그 차이가 자손 식물에서 지속될지 여부를 평가하기 위해, 동종접합성인 두 표적 GUS 유전자를 모두 함유하는 대표 트랜스제닉 식물, 및 hpGUS 트랜스유전자(반접합성)를 자가-수정시켰다. hpGUS 라인으로부터의 카나마이신-내성 자손 식물을 선택하여, hpGUS 트랜스유전자가 없는 모든 무(null) 분리물을 폐기하였다. 이로써 hpGUS 트랜스유전자가 동종접합성 또는 이종접합성 상태로, 모든 자손에 확실히 존재하도록 하였다. 자손 식물을 GUS 활성에 대해 검정하였고, 대표 데이터를 도 14에 나타낸다. hpGUS[wt] 트랜스유전자를 함유하는 자손은 확실히 2개 분류에, 즉 강한 GUS 침묵화를 갖는 것들 및 약한 침묵화를 나타내거나 침묵화를 나타내지 않는 것들에 속했다. 이들 클래스는 이전 세대의 표현형과 잘 연관되어, 표적 유전자 침묵화 정도가 유전 가능함을 나타내었다. 평가된 hpGUS[G:U] 라인의 모든 식물은 일관되게 강력한 침묵화를 나타낸 반면, hpGUS[1:4] 라인의 식물은 일관되게 더 약한 침묵화를 나타내었다. 본 발명자들은 모체 세대에서 관찰된 표현형이 자손 식물에서 일반적으로 유지된다고 결론지었다.

[0567] 형질전환된 식물에 대한 서던 블롯 혼성화 실험

[0568] hpGUS[G:U] 작제물로 생성된 다수의 독립적 트랜스제닉 식물에서 관찰된 강력한 유전자 침묵화의 균일성은 엄청난 것일뿐 아니라 놀랍고 예상치 못한 것이었다. 본 발명자들은 hpGUS[G:U] RNA에 의해 유도된 효과가 아닌 임의의 설명이 침묵화의 균일성을 유도하고 있는지 여부를 확립하고자 했다. 여러 트랜스제닉 식물이 의도한 바와 같이 독립적 형질전환 이벤트로부터 생성되었는지 여부를 평가하기 위해, hpGUS[G:U] 작제물을 함유하는 18개의 대표 트랜스제닉 식물로부터 단리된 DNA 상에서 서던 블롯 혼성화 실험을 수행하였다. 문헌[Wang et al. (2008)]에 의해 기재된 고온-페놀 방법을 사용하여 일 조직으로부터 DNA를 단리하였다. 서던 블롯 혼성화를 위해, 각 식물 샘플로부터 대략 10 µg의 DNA를 HindIII 효소로 소화시키고, TBE 완충액 중 1% 아가로스 겔에서 겔 전기영동에 의해 분리하고, 모세관 방법을 사용하여 Hybond-N+ 막 상으로 블로팅하였다(Sambrook et al., 1989). 막을 OCS-T 종결자 영역으로부터의 ³²P-표지 DNA 단편과 42°C에서 하룻밤 동안 혼성화하였다. 상기 탐침은 hpGUS[G:U] 트랜스유전자에 혼성화하지만 OCS-T 종결자 서열을 갖지 않는 GUS 표적 유전자에는 혼성화하지 않으므로, 이를 선택하였다. 막을 고염격성으로 세척하고 보유된 탐침을 PhosphoImager로 가시화하였다.

[0569] 혼성화된 블롯의 자가방사선촬영을 도 15에 나타낸다. 각각의 레인은 1개 내지 5개 또는 6개의 혼성화 밴드를 나타내었다. 동일한 패턴을 나타내는 2개 레인은 없었다, 즉 자가방사선촬영은 16개의 대표 hpGUS[G:U] 식물이 각각 혼성화된 상이한 패턴의 HindIII 단편을 가지고 이에 따라 상이한 트랜스유전자 삽입으로부터 얻어짐을 나타내었다. 본 발명자들은 hpGUS[G:U] 라인에 대해 관찰된 균일한 GUS 침묵화가 식물에서의 유사한 트랜스유전자 삽입 패턴에 기인하지 않으며, 침묵화의 균일성은 hpGUS[G:U] RNA의 구조에 의해 유도된다고 결론지었다. 본 발명자들은 또한 강력한 유전자 침묵화를 수득하기 위해 여러 카피의 hpGUS[G:U] 트랜스유전자가 요구되지 않으며; 단일 카피의 트랜스유전자가 충분한 것으로 결론지었다.

[0570] 형질전환된 식물에 대한 노던 블롯 혼성화 실험

[0571] hpGUS[G:U] RNA가 트랜스제닉 식물에서 대조군 헤어핀 RNA와 동일한 방식으로 가공되었는지 여부를 결정하기 위해, 트랜스제닉 식물의 잎으로부터 단리된 RNA 상에서 노던 블롯 혼성화 실험을 수행하였다. 노던 블롯 실험을 수행하여 헤어핀 RNA의 다이버-가공으로 생성된 더 짧은 RNA(sRNA, 대략 21개 내지 24개 뉴클레오타이드 길이)를 검출하였다. (센스) mRNA로 발현되는 GUS 표적 유전자를 또한 함유하는 트랜스제닉 hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U] 식물로부터 단리된 작은 RNA 상에서 실험을 수행하였다. 각각의 작제물에 대해 9개 식물을 sRNA 분석을 위해 선택하였다. hpGUS[wt] 트랜스제닉 집단에 있어서, 약한 GUS 침묵화를 나타내는 식물뿐만 아니라 강력한 GUS 침묵화를 나타내는 것들도 포함시켰다. 고온-페놀 방법(Wang et al., 2008)을 사용하여 작은 RNA 샘플을 단리하고, 문헌[Wang et al. (2008)]에 따라 노던 블롯 혼성화를 수행하고, RNA 샘플의 겔 전기영동을 변성 조건 하에 수행하였다. 사용된 탐침은 SEQ ID NO:8의 뉴클레오타이드 804~1003에 대응하는 센스 서열 또는 안티센스 서열에 대응하는 32P-표지 RNA였다.

[0572] 헤어핀 RNA로부터 유래된 센스 sRNA 분자를 검출하기 위해 안티센스 탐침과 혼성화되거나(상부 패널), 안티센스 sRNA를 검출하기 위해 센스 탐침과 혼성화된(하부 패널), 노던 블롯의 자가방사선촬영을 도 16에 나타낸다. 하부에서, 도면은 hpGUS 작제물이 없는 대조군 식물 대비 GUS 발현 수준에 대한 정성적 스코어를 나타낸다. 다른 실험에서 알려진 길이의 RNA 대비 sRNA의 이동성에 기반하여, 약 20개 내지 25개 뉴클레오타이드의 작은 RNA에 대한 혼성화가 관찰되었다. hpGUS[wt] 라인은 sRNA 축적량에서 다양한 변이를 나타내었다. 이는 센스 및 안티센스

sRNA 모두에 대해 관찰되었으나, 안티센스 sRNA 밴드는 센스 밴드만큼 명확하지 않았다. hpGUS[wt] 식물이 200 nt 표적 영역에 대응하는 센스 및 안티센스 서열을 모두 발현하는 hpGUS 트랜스유전자, 및 전장 센스 유전자를 발현하는 GUS 표적 유전자를 모두 함유하므로, 센스 sRNA는 헤어핀 RNA 또는 표적 mRNA로부터 생성되었을 수 있다. sRNA 수준 및 hpGUS[wt] 식물에서의 GUS 침묵화 정도 간에 음의 상관관계가 있는 것으로 드러났다. 예를 들어, 레인 4 및 5에 나타난 2개의 식물은 상대적으로 더 많은 sRNA를 축적하였으나 중등도 정도의 GUS 하향조절만을 나타내었다. 대조적으로, 레인 7 및 8에 나타난 2개 식물은 강력한 GUS 침묵화를 가졌으나, 상대적으로 낮은 수준의 sRNA를 축적하였다.

[0573] hpGUS[wt] 식물과는 대조적으로 그리고 hpGUS[G:U] 작제물에 의한 상대적으로 균일한 정도의 침묵화와 일관되게, hpGUS[G:U] 식물은 라인에 걸쳐 균일한 양의 안티센스 sRNA를 축적하였다. 또한, GUS 침묵화 정도는 안티센스 sRNA의 양과 우수한 상관관계를 나타내는 것으로 드러났다. 이들 식물에서 센스 sRNA는 거의 검출되지 않았다. 노던 블롯 혼성화에서 사용된 RNA 탐침이 야생형 GUS 서열로부터 전사되고 이에 따라 모든 C 뉴클레오타이드가 U 뉴클레오타이드로 대체되어 hpGUS[G:U]로부터의 센스 sRNA와 낮은 수준의 상보성을 가져서 저엄격성 혼성화만을 허용하므로, 이것이 예상되었다. 그러나, 상기 실험은 hpGUS[G:U] RNA가 더 적은 센스 sRNA를 생성하도록 가공되거나 이들이 더 빨리 분해될 가능성을 배제하지 않았다.

[0574] 노던 블롯 혼성화 실험을 반복하되, 이번에는 안티센스 sRNA를 검출하기 위해 센스 탐침만을 사용하였다; 자가방사선허영을 도 17에 나타낸다. 또 다시, hpGUS[wt] 작제물로부터의 안티센스 sRNA의 생성은 GUS 활성화와 음으로 연관되었다(도 17의 상부 패널). 강력하게 침묵화된 식물은 높은 수준의 안티센스 sRNA를 산출한 반면(레인 1, 3, 5, 8 및 10) 약한 침묵화만 나타내거나 침묵화를 나타내지 않은 식물은 본 실험에서 혼성화 신호를 생성하지 않았다(레인 2, 4, 6, 7 및 9). 매우 명확히 대조되어, hpGUS[G:U]를 발현하는 식물은 훨씬 더 낮은, 그러나 일관된 양의 안티센스 sRNA를 생성하였다. hpGUS[G:U]를 발현하는 강력히 침묵화된 식물이 hpGUS[wt]를 발현하는 강력히 침묵화된 식물보다 훨씬 더 낮은 수준의 sRNA를 축적했다는 관찰은 흥미로운 것이었고 본 발명자들에게 hpGUS[wt]가 식물에서 상이한 기전에 의해 가공되지만 대략 hpGUS[wt] 작제물만큼 여전히 효과적임을 제시하였다. 본 실험에서의 추가 관찰은 hpGUS[G:U] 식물에 대한 2개의, 상대적으로 희미한 안티센스 밴드가 hpGUS[wt]로부터의 안티센스 sRNA 밴드에 대해 관찰된 제2 및 제4 밴드에서와 동일한 이동성을 갖는 것으로 드러난다는 실마리를 제공하였다. 이는 후술되는 추가 실험에서 확인되었다. 본 발명자들은 hpGUS[wt]로부터의 sRNA에 대한 4개 밴드가 24-머, 22-머, 21-머 및 20-머를 나타내며, hpGUS[G:U] RNA가 일차적으로 22-머 및 20-머 안티센스 sRNA를 생성하도록 가공된다고 가정하였다.

[0575] 상술된 데이터로부터의 중요하고 확정적인 결론은 hpGUS[G:U] RNA 분자가 sRNA를 생성하기 위해, 특히 다양한 단백질, 예컨대 Argonaute의 존재 하에 RNA 간섭의 매개체로 여겨지는 안티센스 sRNA의 생성을 위해, 하나 이상의 다이스 효소에 의해 가공된다는 것이었다. 관찰된 안티센스 sRNA의 생성은 센스 sRNA가 또한 생성됨을 시사하였지만, 실험은 센스 sRNA의 분해/불안정성 또는 사용된 탐침과의 불충분한 혼성화로 인한 센스 sRNA의 검출 부재 간을 구별하지 않았다. 이들 실험으로부터, 본 발명자들은 또한 이의 가공에 있어서 hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U] RNA 분자 간에 명확한 차이가 존재하는 것으로 결론지었다. 이는 분자들이 하나 이상의 다이스에 의해 상이하게 인식됨을 시사하였다.

[0576] 실시예 8. 변형 헤어핀 RNA를 발현하는 트랜스제닉 식물로부터의 sRNA의 분석

[0577] 또 다른 노던 블롯 혼성화 실험을 수행하여 hpGUS[G:U] 식물로부터의 안티센스 sRNA를 검출하고 이의 크기를 hpGUS[wt]로부터 생성된 것들의 크기와 비교하였다. 자가방사선허영을 도 18에 나타낸다. 이 때, hpGUS[wt]로부터의 2개의 주요 밴드에 비해 hpGUS[G:U]로부터의 2개의 안티센스 sRNA 밴드의 크기 차이가 보다 뚜렷하였다. 이는 도 18의 인접한 레인 9 및 10에서 밴드의 이동성을 비교함으로써 가장 잘 나타났다. 상기 결과는 2개의 헤어핀 RNA가 식물에서 하나 이상의 다이스에 의해 상이하게 가공됨을 확인시켜주었다.

[0578] 이를 추가 조사하기 위해, hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U]로부터의 작은 RNA 집단을 식물로부터 분리된 전체, 링커-중폭 가능한 sRNA의 심층 서열분석에 의해 분석하였다. 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역에 맵핑된 sRNA의 빈도를 결정하였다. 또한 이러한 sRNA의 길이 분포를 결정하였다. 이 결과는 hpGUS[wt] 작제물 대비 hpGUS[G:U] 작제물로부터의 22-머 안티센스 RNA의 빈도가 증가함을 나타내었다. 길이 22 nt의 sRNA의 비율 증가는 hpGUS[wt] 대비 다이스-2에 의한 hpGUS[G:U] 헤어핀 가공에서의 변화를 시사하였다.

[0579] 실시예 9. 식물에서 트랜스유전자의 DNA 메틸화 분석

[0580] hpGUS[wt]에 의해 부여되는 GUS 침묵화 정도의 변동성 및 안티센스 24-머 sRNA가 hpGUS[wt] 식물에서 검출되었

지만 hpGUS[G:U] 식물에서는 뚜렷하게 검출되지 않았다는 관찰은 본 발명자들로 하여금 2개 식물 집단이 표적 GUS 유전자의 DNA 메틸화의 수준에 있어서 상이했는지 여부를 질문하게 만들었다. 서열-특이적 24-머 sRNA는 식물에서의 역방위 반복 구조의 DNA 메틸화 촉진에 관여되는 것으로 여겨진다(Dong et al., 2011). 따라서 본 발명자들은 hpGUS 식물에서의 GUS 트랜스유전자, 특히 헤어핀 인코딩 유전자(침묵화 유전자)의 35S 프로모터 영역의 DNA 메틸화 수준을 평가하였다.

[0581] 이를 수행하기 위해, DNA-메틸화 의존적 엔도뉴클레아제 McrBC를 사용하였다. McrBC는 이중-가닥 DNA의 하나 또는 두 가닥 모두에서 메틸시토신(^mC) 염기를 함유하는 DNA를 절단하는 상업적으로 이용 가능한 엔도뉴클레아제이다(Stewart et al., 2000). McrBC는 형태 5' (G 또는 A)^mC 3', 바람직하게는 G^mC의 2개의 절반-부위로 구성되는 DNA 상의 부위를 인식한다. 이들 절반-부위는 수 백개의 염기쌍에 의해 분리될 수 있지만, 최적 분리는 55 bp 내지 약 100 bp이다. 두 가닥 상에 모두 이러한 연결된 G^mC 디뉴클레오티드를 갖는 이중-가닥 DNA가 최적 기질로서 작용한다. McrBC 활성은 메틸화되는 GC 디뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 다에 의존한다. 식물 DNA는 CG, CHG 또는 CHH 서열에서의 C에서 메틸화될 수 있으므로(여기서 H는 A, C 또는 T를 나타냄)(Zhang et al., 2018), 유전자-특이적 서열의 후속 PCR 증폭으로 McrBC를 사용하는 DNA의 소화를 사용하여 식물 게놈에서의 특정 DNA 서열에서 ^mC의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 상기 검정에서, 메틸화된 McrBC-소화 게놈 DNA의 PCR 증폭은 메틸화되지 않은 DNA 대비 감소된 양의 증폭 산물을 산출하지만, DNA가 메틸화되지 않은 경우 미처리 DNA와 동일한 양의 PCR 산물을 산출할 것이다.

[0582] 게놈 DNA를 표적 GUS 유전자에 부가하여 hpGUS[wt], hpGUS[G:U] 또는 hpGUS[1:4] 작제물을 함유하는 식물로부터 표준 방법에 의해 분리하였다(Draper and Scott, 1988). 정제된 DNA 샘플을 엔도뉴클레아제 활성을 위해 요구되는 Mg²⁺ 이온 및 GTP의 존재를 포함하여, 제조업체의 지침에 따라 McrBC(카탈로그 번호 M0272; New England Biolabs, Massachusetts)로 처리하였다. 요약하면, 대략 1 µg의 게놈 DNA를 30 µl 반응 부피에서 하룻밤 동안 McrBC로 소화시켰다. 소화된 DNA 샘플을 100 µl로 희석하고, 관심 영역을 하기와 같이 PCR-증폭하였다.

[0583] 처리 DNA 샘플을 하기 프라이머를 사용하여 PCR 반응에서 사용하였다. hpGUS[wt]에 대한 35S-GUS 접합 서열에 있어서: 순방향 프라이머(35S-F3), 5'-TGGCTCTACAAATGCCATC-3'(SEQ ID NO:60); 역방향 프라이머(GUSwt-R2), 5'-CARRAACTRTTCRCCTTCAC-3'(SEQ ID NO:61). hpGUS[G:U]에 대한 35S-GUS 접합 서열에 있어서: 순방향 프라이머(GUSgu-R2), 5'-CAAAACTATTACCCCTTCAC-3'(SEQ ID NO:62); 역방향 프라이머(GUS4m-R2), CACRAARTTACRCCTTTRAC(SEQ ID NO:63). 두 작제물 모두에 대한 35S 프로모터 서열에 있어서: 순방향 프라이머(35S-F2), 5'-GAGGATCTAACAGAACTCGC-3'(SEQ ID NO:64); 역방향 프라이머(35S-R1), 5'-CTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3'(SEQ ID NO:65). 각각의 경우, R=A 또는 G, Y=C 또는 T. PCR 반응을 하기 사이클링 조건: 94℃에서 1분 동안, 94℃에서 30초 동안, 55℃ 어닐링을 45초 동안, 68℃ 연장을 1분 동안 35사이클, 그리고 68℃에서 5분 동안 최종 연장으로 수행하였다. PCR 증폭 산물을 전기영동하고 밴드의 세기를 정량하였다.

[0584] 대표 결과를 도 19 및 20에 나타낸다. 전사 시작 부위를 포함하여 200 bp의 35S 프로모터 서열을 포함하는 35S-GUS 접합 영역에 있어서, 대부분의 hpGUS[wt] 식물은 유의미한 수준의 DNA 메틸화를 나타내었다. hpGUS[wt] 식물 집단 내에서, 더 높은 수준의 GUS 활성, 즉 더 적은 침묵화를 보유하는 개체 식물은 프로모터-GUS 센스 접합 영역의 더 많은 메틸화를 갖는 것으로 드러났다. 결과는 35S 프로모터 영역에 대한 것과 유사하였다. 대조적으로, 대부분의 hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 식물은 35S-GUS 접합부에서 더 약한 DNA 메틸화를 나타내었다. 본 발명자들은 상기 근위 프로모터 서열이 트랜스유전자의 발현을 위해 중요하며 상기 영역에서의 메틸화가 트랜스유전자의 전사 유전자 침묵화(TGS)를 통해 침묵화 작제물의 발현을 감소시킬 수 있을 것으로 고려하였다. 이는 "자가-침묵화"로 명명된다.

[0585] 실시예 6 내지 9에 관한 일반 논의

[0586] 트랜스유전자에서 역방위 반복 DNA 구조의 손상이 그 안정성을 증강시킴

[0587] hpGUS[wt] 및 hpGUS[2:10] 트랜스제닉 식물 집단은 둘 다 광범위한 표적 유전자 침묵화 정도를 나타내었다. 대조적으로, hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 식물을 함유하는 두 집단은 모두 여러 독립적 라인에서 상대적으로 균일한 GUS 침묵화를 나타내었고, 전자의 작제물에 의해서는 강력한 침묵화가 관찰되었고 후자의 작제물에 의해서는 상대적으로 더 약하지만 유전자 활성의 여전히 상당한 감소가 관찰되었다. [G:U] 및 [1:4] 작제물로부터의 헤어핀 RNA에서, 센스 및 안티센스 서열에서 약 25%의 뉴클레오티드는 200개의 뉴클레오티드 센스/안티센스 서열에 걸쳐 균일하게 분포된 G:U 염기쌍에 또는 서열 미스매치에 관여되었다. 센스 및 안티센스 서열 간 서열 일탈로 인

해, 센스 및 안티센스 "암" 간 DNA 작제물에서의 미스매치 또는 역방위 요청 구조는 그 역방위-반복 DNA 구조를 유의미하게 손상시키는 것으로 여겨졌다. 반복 DNA 구조는 다양한 유기체에서 DNA 메틸화 및 침묵화를 유인할 수 있다(Hsieh and Fire, 2000). hpGUS[2:10] 작제물은 또한 센스 및 안티센스 영역 간 미스매치로 이루어졌으나, 센스 및 안티센스 서열 간 각각의 2 bp 미스매치에는 8-bp 연속 매치가 측면에 있어서, 미스매치가 [G:U] 및 [1:4] 트랜스유전자에서만 큰 역방위 반복 DNA 구조를 손상시키지 못할 수 있다. 따라서 hpGUS[G:U] 및 hpRNA[1:4]에 의해 유도되는 GUS 침묵화의 균일성은 적어도 부분적으로 더 적은 메틸화를 일으키고 이에 따라 2개의 트랜스유전자의 자가-침묵화를 감소시키는 역방위-반복 DNA 구조의 손상에 기인했었을 수 있다. 센스 및 안티센스 DNA 영역 간 미스매치의 또 다른 이점은 박테리아가 완벽한 역방위 반복부를 결실시키거나 재배열하는 경향이 있으므로, 대장균에서의 역방위 반복부의 클로닝이 보조된다는 것이었다.

[0588] *hpRNA의 열역학적 안정성이 표적 유전자 침묵화 정도에 있어서 중요함*

[0589] 강력히 침묵화된 트랜스제닉 라인만 비교되는 경우, hpGUS[wt] 식물이 가장 큰 정도의 표적 유전자 하향조절을 가지며, 그 뒤는 hpGUS[G:U], hpGUS[2:10] 및 hpGUS[1:4] 순서였다. RNA배율 분석은 hpGUS[wt] 헤어핀 RNA 구조가 가장 낮은 자유 에너지, 즉 가장 큰 안정성을 가지며, hpGUS[G:U], hpGUS[2:10] 및 hpGUS[1:4] 헤어핀이 순서일 것으로 예측하였다. 본 발명자들은 헤어핀 RNA 구조가 안정할수록 유도할 수 있는 표적 유전자 침묵화 정도가 큰 것으로 간주하였다. 이는 또한 더 짧은 구조보다 더 긴 이중-가닥 RNA 구조를 선호하였다. 안정한 이중-가닥 RNA 형성은 효율적인 다이스에 가공을 위해 필요한 것으로 여겨졌다. 여기 기재된 실험 결과는 가장 간단한 미스매치 뉴클레오티드를 포함하는 작제물, 예컨대 hpGUS[1:4]에 비해 G:U 염기쌍 형성 작제물의 또 다른 중요한 장점을 시사하였다: 두 유형의 작제물은 모두 자가-침묵화를 감소시키는 손상된 역방위 반복 DNA 구조를 가졌지만, RNA 수준에서 G 및 U가 염기쌍을 형성하는 능력으로 인해 hpGUS[G:U] RNA가 더 안정하였다. 이중-가닥 RNA 구조에 G:U 염기쌍 및 일부 미스매치 뉴클레오티드를 모두 포함하지만 미스매치에서에 비해 G:U 염기쌍에 관여되는 뉴클레오티드가 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배만큼 상대적으로 더 적은, 2개 유형 변형의 조합도 유익한 것으로 간주된다.

[0590] *hpGUS[G:U] RNA가 다이스에 의해 효율적으로 가공되었음*

[0591] 이들 실험에서 답을 얻은 하나의 중요한 질문은 미스매치 또는 G:U 염기쌍 형성 hpRNA가 다이스에 의해 작은 RNA(sRNA)로 가공될 수 있는지 여부였다. hpGUS[G:U] 식물에서의 그리고 1:4 및 2:10 미스매치 hpRNA 식물에서의 강력한 침묵화는 이들 헤어핀 RNA 구조가 다이스에 의해 가공됨을 시사하였다. 이는 sRNA 노던 블롯 혼성화에 의해 [G:U] 분자에 대해 확인되었고, 이는 안티센스 sRNA를 쉽게 검출하였다. 또한, hpGUS[G:U] 식물에서의 GUS 침묵화 정도는 축적된 안티센스 sRNA의 양과 우수한 상관관계를 나타내었다. 각각으로부터 2개의(hpGUS[wt]에 대해서는 하나만) 선택된 라인의 작은 RNA 심층 서열분석은 hpGUS[G:U] 식물이 hpGUS[wt] 식물과 유사하게 풍부한 sRNA를 생성한 반면, hpGUS[1:4] 식물도 sRNA를, 그러나 훨씬 더 낮은 존재비로 생성함을 확인시켜주었다(도 21). hpGUS[1:4] 식물로부터의 더 낮은 수준의 sRNA는 상대적으로 낮은 효율의 GUS 침묵화와 일치하며 hpGUS[1:4] RNA에서의 dsRNA 줄기의 낮은 열역학적 안정성이 다이스 가공 효율을 감소시킴을 제시하였다. GUS 침묵화 정도가 hpGUS[wt] 작제물에 있어서 sRNA의 수준과 상대적으로 낮은 상관관계를 나타냄이 주지되었고, 일부 강력히 침묵화된 라인은 상대적으로 낮은 양의 sRNA를 함유하였다. 이는 일부 hpGUS[wt] 라인에서의 GUS 침묵화가 적어도 부분적으로 sRNA-유도 PTGS보다는 전사 침묵화에 기인함을 제시하였다. 본 발명자들은 유전자 서열, 예컨대 프로모터 영역의 메틸화에 관여되는 헤어핀-인코딩 유전자의 자가 침묵화가 변형 헤어핀 RNA 작제물, 특히 G:U 작제물을 사용하여 경감됨을 인식하였다.

[0592] *G:U 및 1:4 hpRNA 트랜스유전자가 근위 35S 프로모터 영역에서 감소된 DNA 메틸화를 나타냄*

[0593] McrBC 소화-PCR 분석은 전사 시작 부위(TSS) 근처의 240 bp 35S 서열에서의 DNA 메틸화 수준이 hpGUS[wt] 집단 대비 hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 트랜스제닉 집단에서 감소됨을 나타내었다. 상기 결과는 본 발명자들에게, 센스 서열에서의 C에서 T로의 변형(hpGUS[G:U]에서) 또는 25% 뉴클레오티드 미스매치(hpGUS[1:4]에서)로 인한, 완벽한 역방위 반복 구조의 손상이 hpRNA 트랜스유전자의 전사 자가-침묵화를 최소화함을 시사하였다. 이는 hpGUS[wt] 집단 대비 hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 집단에서 관찰된 GUS 유전자 침묵화의 균일성과 일치하였다. 본 발명자들은 hpGUS[G:U] 작제물이 적어도 센스 서열에서 감소된 수의 시토신 뉴클레오티드를 갖거나 심지어 이를 갖지 않으므로, 프로모터 메틸화, 이에 따른 전사-자가 침묵화의 감소에서 hpGUS[1:4] 작제물보다 더 이상 적이었으며, 이에 따라 프로모터로 확산될 수 있는 DNA 메틸화를 유인하지 않음을 인식하였다.

[0594] **실시예 10. 내인성 유전자를 표적화하는 G:U 염기쌍을 포함하는 헤어핀 RNA의 설계 및 평가**

[0595] EIN2 및 CHS RNA를 표적화하는 변형 헤어핀 RNA

[0596] G:U 변형 헤어핀 RNA가 상술된 바와 같이 통상적 헤어핀 RNA 대비 표적 유전자의 보다 일관되고 균일한 침묵화를 유도하는 것으로 드러났으므로, 본 발명자들은 개선된 설계가 내인성 유전자의 발현도 감소시킬지 여부를 평가하기를 원했다. 따라서 본 발명자들은 시도되는 침묵화를 위해 예시적인 표적 유전자로서 선택된 아라비도시스 탈리아나에서의 내인성 유전자인, *EIN2* 또는 *CHS* 유전자, 또는 둘 다를 표적화하는 몇몇 [G:U]-변형 헤어핀 RNA 작제물을 설계하고, 생성하고, 평가하였다. *EIN2* 유전자(SEQ ID NO:19)는 식물 신호전달 분자 에틸렌에 의해 조절되는 신호전달 경로에서의 중심 인자, 즉 조절 단백질인 에틸렌-비민감성 단백질 2(EIN2)를 인코딩하며, *CHS* 유전자(SEQ ID NO:20)는 아라비도시스 탈리아나에서의 종자껍질에서 안토시아닌 생성에 관여되는 효소 칼콘 신타아제(CHS)를 인코딩한다. *EIN2* 및 *CHS* 유전자를 모두 동시에 표적화하는 또 다른 G:U 변형 작제물을 생성하였고, 여기서는 *EIN2* 및 *CHS* 서열을 전사 융합시켜 단일 헤어핀 RNA를 생성하였다. 또한, *EIN2*, *CHS* 또는 *EIN2* 및 *CHS* 둘 다를 표적화하는 3개의 추가적인 작제물을 제조하였고 여기서 *GUS*를 표적화하는 변형 헤어핀에 대해 수행된 바와 같이 센스 서열에서만 아니라 센스 및 안티센스 서열 둘 다에서의 시티딘 염기를 티미딘 염기로 대체하였다(본원에서 G:U/U:G 작제물로 명명됨). 변형 헤어핀 RNA 작제물을 세포에 헤어핀 RNA를 제공하기 위해 유전자-전달 접근을 사용하여 내인성 *EIN2* 유전자 또는 *EIN2* 및 *CHS* 유전자의 발현을 감소시키는 이의 능력에 대해 평가하였다. 실험에서 대조군으로 사용된 통상적 헤어핀 RNA는 단독으로 *EIN2* 또는 *CHS* mRNA를 표적화하는 200개 염기쌍 길이의 이중-가닥 RNA 영역, 또는 단일 헤어핀 분자로서 함께 융합된 각각의 *EIN2* 및 *CHS* 유전자로부터의 200개 염기쌍을 포함하는 키메라 이중-가닥 RNA 영역을 가졌다. 융합된 RNA에서, *EIN2* 이중-가닥 부분은 헤어핀의 루프에 인접하였고 *CHS* 영역은 루프에 대해 원위에 있었다. 대조군 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역에서의 모든 염기쌍은 정규 염기쌍이었다.

[0597] 작제물 제조

[0598] 야생형 *EIN2*(SEQ ID NO:19) 및 *CHS* cDNA(SEQ ID NO:20)의 200 bp 영역에 걸친 DNA 단편을 각각 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 *EIN2*wt-F(SEQ ID NO:66) 및 *EIN2*wt-R(SEQ ID NO:67) 또는 *CHS*wt-F(SEQ ID NO:68) 및 *CHS*wt-R(SEQ ID NO:69)을 사용하여 아라비도시스 탈리아나 Col-0 cDNA로부터 PCR-증폭하였다. 단편을 *GUS* 헤어핀 작제물에 대해서와 마찬가지로 pGEMT-Easy 내로 삽입하였다(실시예 6). 각각 제한 효소 부위가 측면에 있는 200 bp 변형 센스 *EIN2*[G:U](SEQ ID NO:22) 및 *CHS*[G:U](SEQ ID NO:24) 단편 또는 200 bp 변형 안티센스 *EIN2*[G:U](SEQ ID NO:25) 및 변형 안티센스 *CHS*[G:U](SEQ ID NO:26) 단편을 포함하는 DNA 단편을 각각의 올리고뉴클레오타이드쌍, *EIN2*gu-F + *EIN2*gu-R, *CHS*gu-F + *CHS*gu-R, *asEIN2*gu-F + *asEIN2*gu-R, 및 *asCHS*gu-F + *asCHS*gu-R(SEQ ID NO:70~77)의 어닐링에 이어 LongAmp Taq 폴리머라제를 사용하여 3' 말단의 PCR 연장에 의해 조립하였다. 모든 G:U-변형 PCR 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 클로닝하고 의도한 뉴클레오타이드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다. *CHS*[wt]::*EIN2*[wt], *CHS*[G:U]::*EIN2*[G:U], 및 *asCHS*[G:U]::*asEIN2*[G:U] 융합 단편을 pGEM-T Easy 플라스미드에서의 공통 *XbaI* 부위에서 적절한 *CHS* 및 *EIN2* DNA 단편의 결합에 의해 제조하였다.

[0599] 35S::센스 단편::PDK 인트론::안티센스 단편::OCS-T 카세트를 hpGUS 작제물에 대해서와 유사한 방식으로 제조하였다. 본질적으로, 안티센스 단편을 *HindIII* 및 *BamHI*로의 소화에 의해 각각의 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 절제하고, *BamHI* 및 *HindIII* 부위 간에 pKannibal 내로 삽입하여 이들이 35S 프로모터에 대해 안티센스 배향이 되도록 했다. 이어서 센스 단편을 *XhoI* 및 *KpnI*을 사용하여 각각의 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 절제하고 적절한 안티센스-함유 클론의 동일한 부위 내로 삽입하였다. 그 후, pGEM-T Easy 플라스미드에서의 모든 카세트를 *NotI*로 절제하고 pART27 내로 삽입하여 식물 형질전환을 위한 최종 이원성 벡터를 형성하였다.

[0600] 치환된 뉴클레오타이드의 위치를 나타내는, 변형 센스[G:U] 및 안티센스[G:U] 뉴클레오타이드 서열과 대응하는 야생형 서열의 정렬을 도 22 내지 도 25에 나타낸다. 헤어핀 RNA에 대한 발현 카세트의 설계를 도 26에 도식적으로 나타낸다.

[0601] 헤어핀 RNA 형성의 예측된 자유 에너지를 FOLD 프로그램을 사용하여 추정하였다. 이들은 (kcal/mol) 기준으로, hpEIN2[wt], -453.5; hpEIN2[G:U], -328.1; hpCHS[wt], -507.7; hpCHS[G:U], -328.5; hpEIN2[G:U/U:G], -173.5; hpCHS[G:Y/U:G], -186.0; hpCHS::EIN2[wt], -916.4; hpCHS::EIN2[G:U], -630.9; hpCHS::EIN2[G:U/U:G], -333.8로 계산되었다.

[0602] 식물 형질전환

[0603] 모든 *EIN2*, *CHS* 및 키메라 *EIN2*/*CHS* 작제물을 사용해서 플로랄 딥 방법(Clough and Bent, 1998)을 사용하여 아라비도시스 탈리아나 품종 Col-0 식물을 형질전환하였다. 트랜스제닉 식물을 선택하기 위해, 아그로박테리움-침

지 꽃으로부터 수집한 종자를 염소 기체로 멸균화하고 50 mg/ℓ 카나마이신을 함유하는 MS 배지 상에 접종하였다. 모든 9개 작제물에 대해 여러 트랜스제닉 라인을 수득하였다(표 1). 이들 일차 형질전환체(T1 세대)를 토양으로 옮기고, 자가-수정시키고, 성숙하도록 성장시켰다. 이들 식물로부터 수집된 종자(T2 종자)를 사용해서 T2 식물을 확립하고 트랜스유전자에 대해 동종접합성인 라인에 대해 스크리닝하였다. 이들을 EIN2 및 CHS 침묵화 분석을 위해 사용하였다.

표 1

[0604]

Col-0 배경에서 수득된 트랜스제닉 식물의 요약

작제물	수득된 트랜스제닉 라인의 수
hpEIN2[wt]	46
hpCHS[wt]	34
hpEIN2[G:U]	23
hpCHS[G:U]	32
hpEIN2[G:U/U:G]	52
hpCHS[G:U/U:G]	13
hpCHS::EIN2[wt]	28
hpCHS::EIN2[G:U]	26
hpCHS::EIN2[G:U/U:G]	20

[0605]

EIN2 침묵화 정도 분석

[0606]

EIN2는 에틸렌 감지에 관여되는 수용체 단백질을 인코딩하는 아라비도시스 탈리아나에서의 유전자이다. 이 유전자는 종자의 발아 직후 묘목에서만 아니라 이후 식물 성장 및 발생에서 발현된다. EIN2 돌연변이체 묘목은 식물에서 에틸렌 합성의 중간체인 1-아미노사이클로프로판-1-카복실산(ACC)의 존재 하에 암소에서 발아되는 경우, 동종 야생형 묘목 대비 하배축 신장을 나타낸다. 따라서 트랜스제닉 식물에서의 EIN2 유전자 발현 및 침묵화 정도를 완전 암소에서 50 µg/ℓ의 ACC를 함유하는 MS 배지 상에서의 종자 발아 및 야생형 묘목 대비 이의 하배축 길이 측정에 의해 검정하였다. 하배축 길이는 측정하기 용이한 표현형이었고 EIN2 유전자 발현의 감소 정도의 우수한 표시인자여서, 상이한 수준의 EIN2 침묵화를 시사하였다. EIN2 유전자 발현이 침묵화된 식물은 야생형 묘목(짧은 하배축) 내지 무-돌연변이체 묘목(긴 하배축) 범위의 어느 위치에서, EIN2 침묵화 수준에 따라 다양한 정도의 하배축 신장을 가질 것으로 예상되었다. 각각의 작제물에 있어서 20개의 무작위 선택되고, 독립적으로 형질전환된 식물로부터의 종자를 검정하였다. hpCHS::EIN2[G:U] 작제물을 함유하는 20개 중 1개의 식물로부터의 종자는 발아하지 않았다. 하배축 길이에 대한 데이터를 도 27에 나타낸다.

[0607]

hpEIN2[wt] 라인은 상당한 범위의 EIN2 침묵화 정도를 나타내었고, 7개 라인(도 27에서의 식물 라인 2, 5, 9, 10, 12, 14, 16)은 명확히 야생형 대비 낮은 수준의 침묵화 또는 동일한 하배축 길이를 나타내며, 다른 13개 라인은 중등도 내지 강력한 EIN2 침묵화를 가졌다. 각각의 독립적 라인 내의 개체 식물은 하배축 길이의 차이에 의해 시사되는 바와 같이, 광범위한 EIN2 침묵화 정도를 나타내는 경향이 있었다. 대조적으로, hpEIN2[G:U] 작제물을 포함하는 2개 라인(도 27에서 식물 라인 5, 18)만 약한 EIN2 침묵화를 나타내었고, 나머지 18개는 균일하고, 강력한 EIN2 침묵화를 나타내었다. 또한, 각각의 18개 라인 내의 개체 식물은 hpEIN2[wt] 작제물로 형질전환된 식물에 비해 상대적으로 균일한 EIN2 침묵화를 갖는 것으로 드러났다. 본 발명자들은 G:U 변형 헤어핀 RNA 작제물이 내인성 RNA의 동일한 영역을 표적화하는 통상적 헤어핀 RNA에 비해 더 균일하고 더 예측 가능한, 내인성 유전자의 보다 일관되고 덜 가변적인 유전자 침묵화를 부여할 수 있는 것으로 결론지었다.

[0608]

트랜스제닉 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U] 집단은 또한 EIN2 침묵화 정도 및 트랜스유전자 카피수 간 상관관계가 상이하였다. 트랜스유전자 카피수는 자손 식물에서의 카나마이신 내성 마커 유전자에 대한 분리 비 - 3:1 비의 내성:감수성 묘목에 의해 시사되어 단일 유전자위 삽입을 시사한 반면, 훨씬 더 높은 비는 다중-유전자위 트랜스유전자 삽입을 시사하였다. hpEIN2[wt] 작제물로 형질전환된 몇몇 다중 카피수 라인은 낮은 수준의 EIN2 침묵화를 나타낸 반면, 이는 단일-카피 및 다중-카피 유전자위 라인이 모두 강력한 EIN2 침묵화를 나타낸 hpEIN2[G:U] 라인에 있어서는 해당되지 않았다.

[0609]

EIN2 유전자는 또한 CHS::EIN2 융합 헤어핀 RNA로 형질전환된 묘목에서 침묵화되었다. 단일 hpEIN2[G:U] 작제물을 함유하는 식물과 유사하게, hpCHS::EIN2[G:U] 묘목은 hpCHS::EIN2[wt] 묘목에 비해 독립적 라인에 걸쳐 보다 균일한 EIN2 침묵화를 나타내었다. 독립적 라인 내의 개체 식물 간 침묵화도 hpCHS::EIN2[wt] 라인에 비해

hpCHS::EIN2[G:U] 라인에 있어서 보다 균일한 것으로 드러났다. 동시에, *EIN2* 침묵화 정도는 hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U]로 형질전환된 식물 간 비교와 유사하게, hpCHS::EIN2[G:U] 식물에서보다 고도로 침묵화된 hpCHS::EIN2[wt] 식물에서 약간 더 강력하였다. 침묵화 정도의 비교는 융합 작제물이 단일 hpEIN2[G:U] 작제물보다 강력한 *EIN2* 침묵화를 유도하지 않음을 시사하였고, 실제로 융합 G:U 헤어핀 작제물이 단일 유전자-표적화 hpEIN2[G:U] 작제물에 비해 약간 더 약한 *EIN2* 침묵화를 유도하는 것으로 드러났다.

[0610] G:U/U:G 작제물로 형질전환된 식물을 조사할 때, 센스 및 안티센스 서열 둘 다의 시티딘(C) 뉴클레오티드가 티미딘(T) 뉴클레오티드로 변형된 경우, 야생형 식물 대비 분석된 모든 20개의 독립적 라인에 있어서 하배측 길이의 증가는 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다. 이는 hpEIN2[G:U/U:G] 및 hpCHS::EIN2[G:U/U:G] 작제물 모두에 있어서 관찰되었다. 이들 결과는 본 발명자들에게 약 46% 치환을 갖는 G:U/U:G 염기쌍 형성 헤어핀 RNA 작제물이 아마도 헤어핀 RNA의 염기쌍형성이 너무 많이 탈안정화되었기 때문에, 표적 유전자 침묵화의 유도에서 효과적이지 않았음을 시사하였다. 본 발명자들은 가능한 두 이유가 비효과에 기여했을 수 있는 것으로 고려하였다. 첫 번째로, 헤어핀 RNA의 *EIN2* 이중-가닥 영역은 센스 및 안티센스 서열 사이에 가능한 200개의 염기쌍 중 92개의 G:U 염기쌍을 가졌다. 두 번째로, 변형 안티센스 서열과 야생형 센스 서열 상보체의 정렬은 안티센스 서열에서 49개의 C에서 T로의 대체가 *EIN2* mRNA를 표적화하는 안티센스 서열의 효과를 감소시켰을 수 있음을 나타내었다. 본 발명자들은 상기 실험으로부터, 적어도 *EIN2* 표적 유전자에 있어서, 헤어핀 RNA에서 잘 관용되고 침묵화를 위해 여전히 충분한 효과를 유지할 수 있는 뉴클레오티드 치환의 수에 대한 상한이 존재한다고 결론지었다. 예를 들어, $92/200=46\%$ 치환은 너무 높은 백분율이었을 수 있다.

[0611] CHS 침묵화 정도의 분석

[0612] 트랜스제닉 식물을 조직 배양 배지 상에서 시험관내 성장시킨 전체 식물로부터 추출된 RNA 상에서 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR)에 의해 CHS 유전자 발현 수준에 대해 검정하였다. CHS mRNA에 대해 사용된 프라이머는 순방향 프라이머(CHS-200-F2), 5'-GACATGCCTGGTGCTGACTA-3'(SEQ ID NO:78); 역방향 프라이머(CHS-200-R2) 5'-CCTTAGCGATACGGAGGACA-3'(SEQ ID NO:79)이었다. 표준으로 사용된 참조 유전자 액틴2에 대해 사용된 프라이머는 순방향 프라이머(액틴2-For) 5'-TCCCTCAGCACATTCCAGCA-3'(SEQ ID NO:80) 및 역방향 프라이머(액틴2-Rev) 5'-GATCCCATTCATAAAACCCAG-3'(SEQ ID NO:81)이었다.

[0613] 데이터는 액틴2 유전자에 대한 참조 mRNA 대비 식물에서 축적된 CHS mRNA의 수준이 50% 내지 96% 범위로 감소함을 나타내었다(도 28).

[0614] CHS 활성이 완전히 부재한 아라비도시스 탈리아나 종자는 야생형 종자의 갈색 색상 대비 흐린 종자 껍질 색상을 갖는다. 따라서, 트랜스제닉 식물의 종자를 이의 종자껍질 색상에 대해 시각적으로 검사하였다. 종자 껍질 색상의 명백한 감소가 몇몇 식물로부터의 종자에서 관찰되었으나, 다른 식물에서는 이들 식물의 잎에서 CHS mRNA의 감소에도 불구하고 관찰되지 않았다. 그러나, 종자 껍질 색상 표현형은 CHS 활성이 식물의 성장 동안 발생 중인 종자 껍질에서 거의 완전히 제거되었을 때에만 나타나는 것으로 간주되었다. 또한, 35S 프로모터는 발생 중인 종자 껍질에서, 무 돌연변이체에서 나타난 흐린 종자 표현형을 제공하기 위한 수준의 CHS 활성 감소를 제공하기에 충분히 활성이 있지 않았을 수 있다. 시각적 종자 껍질 색상 표현형의 개선은 종자의 종자 껍질에서 더 활성이 있는 프로모터를 사용하여 획득될 수 있었다.

[0615] 아라비도시스 탈리아나에서 PDS 유전자의 발현 감소

[0616] 또 다른 아라비도시스 유전자를 예시적인 표적 유전자, 즉, 카로티노이드 생합성 동안 제타-카로틴으로의 피토크의 탈포화를 촉매작용하는 효소 피토크 탈포화효소를 인코딩하는 피토크 탈포화효소(PDS) 유전자로서 선택하였다. PDS의 침묵화는 아라비도시스 식물의 광-퇴색을 초래하는 것으로 예상되었고, 이는 육안으로 용이하게 관찰될 수 있다. G:U-변형 hpRNA 작제물을 이에 따라 제조하고, 450개의 뉴클레오티드 PDS mRNA 서열을 표적화하는 전형적인 hpRNA 작제물과 비교하여 시험하였다. 450개의 뉴클레오티드 PDS 서열은 82개의 시토신(C)을 함유하였고, 이를 티미딘(T)으로 대체하여 hpRNA hpPDS[G:U]의 dsRNA 영역에서 18.2%의 염기쌍이 G:U 염기쌍이 되게 하였다. hpPDS[G:U]를 인코딩하는 유전 작제물 및 hpPDS[WT]를 인코딩하는 대조군 유전 작제물을 아그로박테리움-매개 형질전환을 이용하여 아라비도시스 탈리아나 Col-0 생태형에 도입하였다.

[0617] hpPDS[WT] 작제물 및 hpPDS[G:U] 작제물의 경우, 100개 및 172개의 트랜스제닉 라인이 각각 확인되었다. 현재까지, 이들 라인 모두가 식물 성장의 이러한 초기 단계에서 두 트랜스제닉 집단 간에 분명한 차이 없이 카나마이신-내성 선택적 배지에서 출현한 어린 T1 묘목의 떡잎에서 광-퇴색을 나타냈다. 이는 두 작제물이 떡잎에서 PDS 침묵화를 유도하는 데 있어서 동일하게 효과적이었음을 시사하였다. 그러나, 일부 T1 식물은 더 이상 광-퇴색되

지 않고 녹색 또는 옅은 녹색으로 보이는 본엽을 발달시켜, PDS 침묵화가 본엽에서 해제되거나 약화되었음을 시사하였다. 녹색 본엽을 나타내는 트랜스제닉 라인의 비율은 hpPDS[G:U] 집단보다 hpPDS[WT] 집단의 경우에 훨씬 더 높았다. 트랜스제닉 식물을 강력한 PDS 침묵화(전체 식물에서 강력한 광-퇴색), 중등도 PDS 침묵화(옅은 녹색 또는 얼룩덜룩한 잎) 및 약한 PDS 침묵화(완전 녹색 또는 약간 얼룩덜룩한 잎)를 기준으로 세 가지 상이한 카테고리로 그룹화하였다. 약한 PDS 침묵화를 갖는 식물의 비율은 hpPDS[G:U] 라인의 경우 7%와 비교하여, hpPDS[WT] 라인의 경우 43%였다. 실제로, 대부분 완전 녹색 잎을 갖는 약하게 침묵화된 hpPDS[WT] 식물과 대조적으로, 약한 침묵화 그룹의 모든 hpPDS[G:U] 라인은 본엽에서 약간의 얼룩을 여전히 나타냈다. 이들 결과는 G:U-변형 hpRNA 작제물이 통상적인(완전 정규 염기쌍형성) hpPDS 작제물보다 독립적인 트랜스제닉 집단에 걸쳐 더 균일한 PDS 침묵화를 제공하였음을 지시하였고, 이는 상술된 GUS 및 EIN2 침묵화 검정으로부터의 결과와 일관되었다. 더욱 의미미하게는, PDS 침묵화 결과는 이전에 주지되지 않았던 식물에서 hpRNA 트랜스유전자-유도 유전자 침묵화의 발달적 가변성을 시사하였고, hpRNA 트랜스유전자 침묵화가 본엽보다는 떡잎에서 더 효율적이고 안정했다는 것을 제시하였다. 독립적인 라인에 걸친 균일한 유전자 침묵화에 따르면, PDS 침묵화 결과는 G:U-변형 hpRNA 트랜스유전자가 통상적인 hpRNA 작제물보다 발생학적으로 더욱 안정하여 보다 안정적이고 오래 지속되는 침묵화를 제공하였다는 것을 제시하였다.

[0618] **실시예 11. 헤어핀 RNA 작제물로부터의 sRNA 분석**

[0619] RNA 샘플 상에서 노던 블롯 혼성화를 수행하여 hpEIN2[G:U] 식물로부터 안티센스 sRNA를 검출하고, 이의 양 및 크기를 hpEIN2[wt]로부터 생성된 sRNA와 비교하였다. 탐침은 hpEIN2[wt] 작제물에서 200개 뉴클레오타이드 센스 서열에 대응하는 ³²P-표지 RNA 탐침이었고 저엄격성 조건 하에 혼성화를 수행하여 더 짧은(20개 내지 24개 뉴클레오타이드) 서열의 검출을 허용하였다. 탐침분석된 노던 블롯으로부터의 자가방사선촬영을 도 29에 나타낸다. 상기 실험은 hpEIN2[G:U] 헤어핀 RNA가 sRNA로 가공되며 축적 수준이 hpEIN2[wt] 라인의 수준에 비해 분석된 9개의 독립적으로 형질전환된 hpEIN2[G:U] 식물에 걸쳐 상대적으로 균일함을 나타내었다. GUS 헤어핀 RNA에 대한 비슷한 실험과 유사하게, hpEIN2[wt]로부터의 2개의 주요 밴드 대비 hpEIN2[G:U]로부터의 2개의 안티센스 sRNA 밴드의 이동성 차이가 상당히 뚜렷했다. 이는 도 28의 인접한 레인 10 및 11에서의 밴드 이동성을 비교하여 가장 잘 나타났다.

[0620] 이를 추가 조사하기 위해, hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]로부터의 작은 RNA 집단을 전체 식물로부터 단리된 총 sRNA 집단의 심층 서열분석에 의해 분석한다. hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]의 이중-가닥 영역에 맵핑된 각 집단의 비율을 결정하였다. 각 집단에서 약 1600만개의 판독으로부터, 약 50,000개 sRNA가 hpEIN2[wt] 이중-가닥 영역에 맵핑된 반면, 약 700개만 hpEIN2[G:U]에 맵핑되었다. 이는 훨씬 더 적은 수의 sRNA가 [G:U] 헤어핀으로부터 생성됨을 시사하였다. EIN2-특이적 22-머의 비율 증가도 관찰되었다.

[0621] 도 29는 전형적인(완전 정규 염기쌍 형성) 및 G:U-변형 hpRNA 라인 둘 모두가 siRNA의 두 개의 우세한 크기 분율을 축적했음을 나타냈다. 이전 보고와 일관되게, 전형적인 hpRNA 라인으로부터의 우세한 siRNA는 21-nt 및 24-nt sRNA 크기 마커에 유사하게 이동했다. 그러나, 둘 모두의 G:U 변형 트랜스유전자로부터 두 개의 우세한 siRNA 밴드는 겔에서 약간 더 빠르게 이동하여, 이들이 전형적인 hpRNA 트랜스유전자로부터의 것들보다 작은 크기, 또는 이와 상이한 말단 화학적 변형을 가졌음을 제시하였다.

[0622] 상이한 두 유형의 작제물들 간에 siRNA의 크기 프로파일이 상이할 수 있는 지 조사하기 위해, 작은 RNA를 하나의 hpGUS[WT] 라인 및 hpGUS[G:U], hpEIN2[WT] 및 hpEIN2[G:U]의 각각 두 라인으로부터 단리하고, Illumina 플랫폼을 이용함으로써 시퀀싱하여, 각 샘플에 대하여 약 1600만개 sRNA 판독을 얻었다. 두 개의 강하게 침묵화된 hpGUS[1:4] 라인으로부터의 샘플을 또한 시퀀싱하였다. 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역 및 헤어핀 RNA의 인트론 스페이스 영역에 맵핑된 sRNA의 수를 결정하였다. 또한, 전이성 siRNA를 검출하기 위해 표적 GUS mRNA 및 EIN2 mRNA에서 상류 및 하류 영역으로 siRNA를 맵핑하였다. 시퀀싱 데이터는 hpGUS[WT] 라인과 같이 hpGUS[G:U] 라인이 풍부한 siRNA를 생성하였고, 반면에 hpGUS[1:4] 라인이 훨씬 더 낮은 존재비이지만 siRNA를 또한 생성하였음을 확인시켜주었다. hpGUS[1:4] 라인으로부터의 더 낮은 수준의 siRNA는 hpGUS[1:4]에 의한 상대적으로 낮은 효율의 GUS 침묵화와 일치하며 종래의 헤어핀에 비한 hpGUS[1:4] RNA에서의 dsRNA 줄기의 낮은 열역학적 안정성이 다이스서 가공 효율을 감소시킴을 제시하였다. 모든 샘플이 우세한 크기 부류로서 21-nt sRNA를 나타내면서, 노던 블롯에서 밝혀진 안티센스 siRNA의 이동성에 있어서 분명한 변화에도 불구하고 전형적인 및 미스매치 hpRNA 라인 간에 siRNA의 크기 분포에 분명한 차이가 없었다. 전형적인 및 미스매치 hpGUS 라인 간의 22 nt 안티센스 siRNA의 비례 존재비에 약간의 미묘한 차이가 있었다: hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 라인은 hpGUS[WT] 라인보다 높은 비율의 22-nt 크기 부류를 나타냈다. 전형적인 및 미스매치 hpRNA 라인 둘 모두에 대한 시퀀싱 데이터의

뚜렷한 특징은 24-nt siRNA가 모든 샘플에서 21-nt siRNA보다 훨씬 더 낮은 존재비, 즉, 센스 24-nt siRNA의 경우 약 3배 내지 21배 미만 및 안티센스 24-nt siRNA의 경우 약 4배 내지 35배 미만을 나타냈다는 것이었다. 이는 비교적 동일한 양의 두 개의 우세한 크기 부류를 나타낸 노던 블롯 결과와는 현저히 상이했다. 또한, 흥미롭게도, hpEIN2[WT]-7 및 hpEIN2[G:U]-14/15 샘플은 노던 블롯에서 유사한 안티센스 siRNA 존재비를 나타냈지만, 시퀀싱 데이터에서 hpEIN2[G:U] 라인은 hpEIN2[WT]-7 라인(134,112개 판독)보다 훨씬 더 적은 수의 총 20 nt 내지 24 nt 안티센스 siRNA 판독(17,290개 및 29,211개)을 제공하였음이 주지되었다.

[0623] hpGUS[G:U] 라인과 hpEIN2[G:U] 라인 둘 모두의 경우, 거의 모든 센스 siRNA는 hpRNA의 G:U-변형 센스 서열과 매칭한 반면, 대부분의 안티센스 siRNA는 야생형 안티센스 서열을 가졌다. 이는 이들 센스 및 안티센스 siRNA의 대다수가 hpRNA 또는 표적 RNA 전사체로부터의 RDR-매개 증폭으로 인해서가 아니라 일차 hpRNA[G:U] 전사체로부터 직접 가공되었고, 이것이 그렇지 않으면 동일한 주형 서열의 센스 및 안티센스 siRNA 둘 모두를 생성할 것임을 시사하였다. 이와 일관되게, 단지 적은 수의 20 nt 내지 24 nt sRNA 판독(전이성 siRNA)이 hpRNA 트랜스유전자의 루프 영역(PDK 인트론) 또는 GUS 또는 EIN2 mRNA의 비표적화된 하류 영역에서 검출되었다. 그러나, 두 개의 hpGUS[1:4] 라인은 비교적 높은 비율의 야생형 센스 siRNA를 나타내어, hpGUS[1:4] 집단의 경우 비교적 드문 경우이지만, 이들 두 라인에서 강력한 SUS 침묵화가 RDR 증폭을 수반할 수 있음을 제시하였다. 실제로, hpGUS[1:4] 라인의 dsRNA 줄기보다 hpRNA 표적 영역 하류의 표적 유전자 서열에서 더 많은 양의 siRNA가 검출되어, 이들 라인에서 전이성 침묵화의 존재를 시사하였다.

[0624] 종합하면, sRNA 시퀀싱 데이터는 전형적인 및 미스매치 hpRNA 라인으로부터의 siRNA가, 22-nt 크기 부류를 제외하고, 유사한 크기 프로파일을 가졌음을 시사하였는데, 이는 노던 블롯에 의해 검출된 차등적 이동이 상이한 5'에서 3'로의 화학적 변형에 기인했음을 제시하는 것이다. 노던 블롯 결과와 시퀀싱 데이터 간의 상대 sRNA 존재비의 불일치(예를 들어, hpEIN2[WT] 대 hpEIN2[G:U]-유래 siRNA 및 21-nt 대 24-nt)는 상이한 siRNA 집단 및 크기 부류가 sRNA 라이브러리 제조 동안 상이한 클로닝 효율을 가질 수 있음을 암시하였다.

[0625] 식물 sRNA는 3' 말단 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 기를 갖는 것으로 알려져 있는데, 이는 sRNA를 안정화시키는 것으로 사료된다. 이러한 3' 메틸화는 sRNA 클로닝 효율을 감소시키는 3' 어댑터 결찰을 막는 것이 아니라 억제하는 것으로 이전에 밝혀진 바 있다(Ebhardt et al 2005). 따라서, hpRNA[WT] 및 hpRNA[G:U]-유래 siRNA는 β -제거 검정에서 소름 피아이오데이트와 함께 사용되었다. 상기 처리는 hpRNA[WT] 및 hpRNA[G:U]-유래 siRNA 둘 모두에 대하여 겔 이동성의 변화를 초래하지 않아서, 둘 모두의 siRNA 집단이 3' 말단에서 메틸화되었고 hpRNA[WT] 및 hpRNA[G:U]-유래 siRNA 간의 3' 화학적 변형에 차이가 없었음을 시사하였다.

[0626] 표준 sRNA 시퀀싱 프로토콜은 5' 어댑터 결찰을 가능하게 하는 5' 모노포스페이트를 갖는 sRNA를 기반으로 한다(Lau et al., 2001). 다이스-가공 sRNA는 5' 모노포스페이트를 갖는 것으로 가정되었지만, *C. 엘레강스*에서 다수 siRNA가 5' 말단에서의 디- 또는 트리-포스페이트를 지니고, 이것이 표준 sRNA 클로닝 절차에서 sRNA의 겔 이동성을 변경하고 sRNA 5' 어댑터 결찰을 막는 것으로 밝혀졌다(Pak and Fire 2007). 식물 sRNA가 또한 차등적 5' 포스포릴화를 갖는 지의 여부는 알려져 있지 않다. 따라서, 알칼리성 포스파타제로 총 RNA를 처리하고, 이어서 노던 블롯 혼성화에 의해 hpRNA[WT] 및 hpRNA[G:U]-유래 siRNA의 5' 포스포릴화 상태를 검사하였다. 이러한 처리는 모든 hpRNA-유래 sRNA의 경우 겔 이동성을 감소시켜, 5' 포스포릴화의 존재를 시사하였다. 그러나, hpRNA[G:U]-유래 siRNA는 포스파타제 처리 후 hpRNA[WT]-유래 siRNA보다 큰 이동성 변화를 나타내어, 겔 상의 동일한 위치에서 탈포스포릴화된 siRNA의 두 그룹의 이동을 일으켰다. 21 및 24-nt sRNA 크기 마커는 폴리뉴클레오타이드 키나제 반응을 이용하여 ^{32} P로 5' 말단에서 방사성 표지되었고, 따라서 모노포스포릴화된 5' 말단을 가질 것이다. 이는 크기 마커와 동일한 위치에서 이동한 hpRNA[WT]-유래 siRNA가 모노포스포릴화된 siRNA일 가능성이 있고, 반면에 더 빠르게 이동한 hpRNA[G:U]-유래 siRNA가 5' 말단에서 하나보다 많은 포스페이트를 가짐을 제시하였다. 따라서, 식물 세포에서 전형적인 및 G:U-변형 hpRNA 트랜스유전자로부터 생성된 siRNA는 상이하게 포스포릴화된 것으로 결론지어졌다.

[0627] 실시예 12. *EIN2* 침묵화된 식물의 DNA 메틸화 분석

[0628] GUS 및 EIN2 침묵화 결과는 모두 변형되지 않은 센스 서열을 갖는 hpRNA 작제물이 G:U 염기쌍을 제공하는 변형 센스 서열을 갖는 작제물에 비해 고도로 가변적인 수준의 표적 유전자 침묵화를 유도함을 시사하였다. 상술된 바와 같이, hpGUS[G:U] 작제물의 프로모터 영역은 hpGUS[wt] 작제물에 비해 더 적은 메틸화를 갖는 것으로 드러났다. DNA 메틸화를 평가하고 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U] 트랜스제닉 식물을 비교하기 위해, 각 집단으로부터의 12개 식물을 McrBC 방법을 사용하여 35S 프로모터 및 35S-프로모터-센스 EIN2 접합 영역에서 DNA 메틸화에 대해 분석하였다. 35S 프로모터 영역에 대해 사용된 프라이머: 순방향 프라이머(Top-35S-F2), 5'-

AGAAATYTTYGTAAATGGTGG-3'(SEQ ID NO:82), 역방향 프라이머(Top-35S-R2), 5'-TCATRRARATRTCATCAATCC-3'(SEQ ID NO:83). 35S 프로모터-센스 EIN2 접합 영역에 대해 사용된 프라이머: 순방향 프라이머(Link-35S-F2), 5'-YYATYATTGYGATAAAGGAAAGG-3'(SEQ ID NO:84) 및 역방향 프라이머(Link-EIN2-R2), 5'-TAATTRCCACCAARTCATACCC-3'(SEQ ID NO:85). 각각의 이들 프라이머 서열에서, Y=C 또는 T 및 R=A 또는 G이다.

[0629] DNA 메틸화 정도의 정량은 실시간 PCR 검정을 수행하여 결정하였다. 각각의 식물에 있어서, McrBC로의 게놈 DNA 처리 후 DNA 단편의 증폭을 McrBC로 게놈 DNA를 처리하지 않은 DNA 단편의 증폭의 몫을 계산하였다.

[0630] 거의 모든 hpEIN2[wt] 식물은 35S 프로모터, 특히 35S-EIN2 접합부에서 상당한 수준의 DNA 메틸화를 나타내었지만, 일부는 다른 것보다 더 나타내었다. 도 30 및 31에 나타난 바와 같이, 라인 1, 4, 7, 9, 11 및 12에 나타난 식물 라인은 모두 더 긴 하배축 길이에 의해 나타난 바와 같이 강력한 EIN2 침묵화를 나타내었다. 대조적으로, 라인 2, 3, 5, 6, 8, 및 10에 나타난 다른 6개 라인은 상대적으로 약한 EIN2 침묵화를 나타내어, 더 짧은 하배축을 생성하였다. 이들 더 약한-침묵화된 라인은 게놈 DNA가 McrBC로 사전-소화된 경우 훨씬 더 낮은 PCR 밴드 세기로 나타난 바와 같이 프로모터 및 접합 서열에서 더 많은 DNA 메틸화를 나타내었다. 정량적 실시간 PCR(qPCR) 검정은 이들 관찰을 확인시켜주었다(도 31). 모든 12개의 평가 라인은 35S 프로모터 영역 및 35S-센스 접합 영역("접합부")에서 모두 어느 정도의 DNA 메틸화를 나타내었다. 가장 큰 메틸화 정도, 즉 qPCR 검정에서 가장 낮은 몫은 hpEIN2[wt] 라인 2, 3, 5, 6, 8 및 10에 대한 것이었고, 하배축 길이로 측정된 바와 같은 침묵화의 감소된 정도와 완벽하게 연관되었다. 이들 결과는 일부 hpEIN2[wt] 라인에서 감소된 EIN2 침묵화가 증가된 프로모터 메틸화와 연관됨을 확인시켜주었다. EIN2에 대해 침묵화된 hpEIN2[wt] 식물 라인에서도, 특히 35S-센스 EIN2 접합 단편 영역에서, 여전히 상당한 수준의 DNA 메틸화가 존재하였다. 프로모터가 메틸화되는 경우, 이는 전사 침묵화를 유도하는 것으로 여겨진다. 여기에서와 같이, 침묵화 작제물의 경우, 이는 "자가-침묵화"의 한 형태이다.

[0631] hpEIN2[wt] 라인과는 대조적으로, hpEIN2[G:U] 라인은 35S 프로모터 및 35S-EIN2 접합부 모두에서 더 적은 DNA 메틸화를 나타내었다. 실제로 도 30에서 라인 1, 2, 3 및 7(도 31에서 라인 13, 14, 15 및 20)에 대응하는 이들 12개의 G:U 라인 중 4개는 McrBC-처리 및 미처리 샘플 간에 동일한 강도의 PCR 밴드로 나타내는 바와 같이 뚜렷한 DNA 메틸화를 갖지 않았다. 이들 증폭을 qPCR에 의해 정량하는 경우, 12개 라인 중 6개가 McrBC 처리로부터 단편의 감소를 거의 또는 전혀 나타내지 않았고 이에 따라 DNA 메틸화를 거의 또는 전혀 나타내지 않았다 - 도 31의 하부 패널, 라인 13, 14, 15, 18, 19 및 20을 참고한다. 이들 결과는 적어도 일부 라인에서, hpEIN2[G:U] 작제물에 의한 상대적으로 균일한 EIN2 침묵화가 hpEIN2[wt] 대비 유의미하게 더 적은 프로모터 메틸화, 그리고 이에 따라 더 적은 전사 자가-침묵화에 기인함을 시사하였다.

[0632] 이들 결론을 바이설파이트 서열분석을 이용한 트랜스제닉 식물 라인으로부터의 게놈 DNA의 분석에 의해 추가 확인하였다. 상기 검정은 바이설파이트로의 DNA 처리가 DNA 내의 메틸화되지 않은 시토신 염기를 우라실(U)로 전환시키지만, 5-메틸시토신 염기(C)는 영향받지 않는다는 점을 이용하였다. 바이설파이트 처리 후, 관심 DNA의 정의된 절편을 처리 DNA의 센스 가닥만 증폭되도록 하는 방식으로 PCR 반응에서 증폭하였다. 이어서 PCR 산물로 벌크 서열분석을 거쳐, DNA 절편에서 개별 시토신 염기의 메틸화 위치 및 정도를 드러내었다. 따라서, 검정은 DNA 절편의 메틸화 상태에 관한 단일-뉴클레오타이드 분해 정보를 산출하였다.

[0633] 도 31에서 hpEIN2[wt] 라인 1, 7 및 9 및 hpEIN2[G:U] 라인 13, 15 및 18에 대응하는, 각각의 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]에 있어서 가장 강한 수준의 EIN2 침묵화를 나타내는 3개의 식물 라인을 바이설파이트 서열분석에 의해 분석하였다. 이들 식물 라인은 가장 긴 하배축 길이를 나타내었고, 이에 따라 각 작제물에 있어서 20개 라인 중 가장 낮은 수준의 DNA 메틸화를 가질 것으로 예상되었다. 결과를 각각 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]에 대해서도 32 및 33에 나타낸다. 비교되는 경우, hpEIN2[wt] 식물의 35S 프로모터 영역 및 EIN2 센스 영역에서의 여러 시토신이 광범위하게 메틸화됨이 명확하였다. 뚜렷하게 대조되어, 3개의 hpEIN2[G:U] 식물 라인은 35S 프로모터 영역에서 훨씬 더 낮은 수준의 시토신 메틸화를 나타내었다.

[0634] **실시예 13. hpGUS[1:4] 작제물의 프로모터에서의 DNA 메틸화 수준**

[0635] hpGUS[1:4] 식물로부터 단리된 게놈 DNA를 상술된 바와 같은 McrBC 및 바이설파이트 방법을 사용하여 DNA 메틸화에 대해 분석한 경우, hpGUS[wt] 식물 대비 35S 프로모터 및 35S 프로모터-GUS 센스 서열 영역에 시토신 염기의 메틸화가 더 적다는 것이 유사하게 관찰되었다.

[0636] 실시예 10 내지 13에 관한 일반 논의

- [0637] *G:U* 염기쌍을 갖는 이중-가닥 RNA가 통상적 dsRNA보다 균일한 유전자 침묵화를 유도함
- [0638] GUS 작제물과 유사하게, hpEIN2[G:U] 및 hpCHS:EIN2[G:U]는 둘 다 통상적 헤어핀 RNA를 인코딩하는 각각의 hpRNA[wt] 작제물보다 일관되고 균일한 EIN2 침묵화를 유도하였다. 균일성은 여러 독립적 트랜스제닉 라인에 걸쳐서 뿐만 아니라 각각 동일한 트랜스제닉 삽입을 가진 트랜스제닉 라인 내의 동배 식물에 걸쳐서도 일어났다. 균일성에 부가하여, hpEIN2[G:U]에 의해 유도된 EIN2 침묵화 정도는 강력히 침묵화된 hpEIN2[wt] 라인의 침묵화 정도에 가까웠다. CHS 유전자 침묵화 분석은 hpCHS[G:U] 작제물이 CHS mRNA 수준을 50% 내지 97%만큼 감소시키는 데 효과적이었지만 매우 소수의 식물이 감소된 종자 껍질 색상에서 명확히 가시적인 표현형을 나타냄을 시사하였다. 종자 껍질 색상에서 더욱 가시적인 표현형을 보지 못하는 것에 대한 가능한 설명은 낮은 수준의 CHS 활성이라도 플라보노이드 색소를 생성하기 충분할 수 있다는 것이었다. 다른 가능한 설명은 35S 프로모터가 표현형을 생성하는 데 있어서 발생 중인 종자껍질에서 충분히 활성이 있지 않았거나 hpCHS[G:U] 작제물 서열이 EIN2 서열에 대해서는 43개(21.5%) 및 GUS 서열에 대해 52개(26%)의 시토신 치환만을 함유한 것에 비해, 65개의 시토신 치환(32.5%)을 함유했다는 것이었다. 또한, CHS 서열 내의 여러 이러한 시토신 염기는 2개 또는 3개 연속 시토신 세트에 일어나서, 이들 모두가 치환될 필요가 없다. 센스 가닥의 모든 시토신이 치환된 경우, 이는 hpEIN2[G:U] 및 hpGUS[G:U] RNA에서에 비해 hpCHS[G:U] RNA에서 더 많은 G:U 염기쌍을, 아마도 최적보다 많이 생성하였다. 이를 확인하기 위해, 약 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 시토신 염기가 치환되는, 다양한 시토신 치환을 함유하는 서열을 사용하여 또 다른 세트의 CHS 작제물을 제조한다. 이들 작제물을 평가하고 최적 수준을 결정한다.
- [0639] hpEIN2[G:U] 라인이 보다 균일한 수준의 siRNA를 발현함
- [0640] 상대적으로 균일한 EIN2 유전자 침묵화와 일관되게, hpEIN2[G:U] 라인은 독립적인 라인에 걸쳐 보다 균일한 수준으로 sRNA를 축적하였다. 이는 hpGUS 작제물을 이용하여 [G:U] 변형 hpRNA가 다이스에 의해 효율적으로 가공되고 효과적인 표적 유전자 침묵화를 유도할 수 있다는 결론을 확인시켜주었다.
- [0641] 융합 작제물이 유전자 침묵화도 제공함
- [0642] 실험에 CHS:EIN2 융합 작제물을 포함시킨 목적은 2개의 표적 유전자가 단일 헤어핀-인코딩 작제물로 침묵화될 수 있는지 여부를 평가하는 것이었다. GUS 실험은 자유 에너지 그리고 이에 따른 헤어핀 RNA의 안정성이 표적 유전자 침묵화 정도와 양의 연관성을 가짐을 제시하였다. 결과는 CHS:EIN2 융합 작제물이 두 유전자 모두의 침묵화를 일으키며 - CHS에 있어서는 적어도 mRNA 수준에서 일으킴을 나타내었다.
- [0643] 센스 및 안티센스 서열이 모두 C에서 T로 변형되어 염기쌍의 46%가 정규 염기쌍으로부터 G:U 염기쌍으로 전환된 2개의 hpRNA 작제물, hpEIN2[G:U/U:G] 및 hpCHS:EIN2[G:U/U:G]는 대부분의 트랜스제닉 식물에서 EIN2 침묵화를 약하게만 유도하거나 유도하지 않았다. 가능한 설명에는 i) 비효율적인 다이스 가공을 일으키는 너무 많은 G:U 염기쌍이 존재했거나, ii) 너무 많은 G:U 염기쌍을 포함하는 표적 mRNA에 대한 sRNA 결합이 효율적인 mRNA 절단을 일으키지 못했거나, 이들의 조합이 포함된다.
- [0644] *G:U* 염기쌍 형성 작제물에 의한 표적 유전자 침묵화의 균일성 증가가 프로모터 메틸화 감소와 연관됨
- [0645] McrBC-소화 PCR 및 바이설파이트 서열분석을 모두 사용하는 DNA 메틸화 분석은 모든 hpEIN2[wt] 식물 라인이 프로모터 영역에서 DNA 메틸화를 나타내며, 메틸화 정도가 EIN2 침묵화 수준과 음의 연관성을 가짐을 나타내었다. McrBC-소화 PCR에 의해 판단된 바와 같이, 3개의 가장 덜 메틸화된 라인조차도 모든 시토신이 메틸화된 것에 비해, 35S 프로모터에서 약 40% DNA 메틸화 수준을 나타내었다. 널리 퍼져있는 프로모터 메틸화는 인접한 프로모터 영역으로 퍼진 EIN2 반복 서열에서의 sRNA-유도 DNA 메틸화에 기인하는 것으로 여겨졌다. hpRNA[wt] 식물 라인과는 대조적으로, 여러 hpEIN2[G:U] 라인은 프로모터 메틸화를 거의 내지 전혀 나타내지 않았고, 분석된 대부분의 식물은 메틸화가 더 적은 시토신을 나타내었다. hpGUS 라인에 대해 논의된 바와 같이, 몇몇 요인이 감소된 메틸화에 기여할 수 있다: i) 역방위-반복 DNA 구조가 센스 서열에서 C 염기를 T 염기로 변화시킴으로써 손상되었고, ii) 센스 EIN2 서열에 시토신이 없어서 sRNA-유도 DNA 메틸화에 의해 메틸화될 수 없었고, iii) G:U 염기쌍을 가지는 dsRNA 영역의 구조 변화로 인한 24-머 RNA 생성 수준 감소가 일부 다이스에 의한 인식에 변화를 일으켜서 다이스 3 및/또는 다이스 4 활성 감소 및 상대적으로 더 큰 다이스 2 활성을 일으켰다. 따라서, hpEIN2[G:U] 트랜스유전자는 정상, 비-RNAi 트랜스유전자(예컨대 과발현 트랜스유전자)와 유사하게 거동할 수 있고, 일부 라인에서 관찰된 프로모터 메틸화는 hpRNA 트랜스유전자의 내재적인 역방위-반복 DNA 구조보다는 T-DNA 삽입 패턴에 기인하였다.
- [0646] 실시예 14. 또 다른 내인성 유전자의 발현을 감소시키기 위한 변형 헤어핀

- [0647] 다른 내인성 유전자를 표적화하는, 헤어핀 RNA 또는 ledRNA에 대한 변형 침묵화 RNA의 생성을 위한 유전 작제물을 설계하고 합성하였다. 이들에는 하기가 포함되었다.
- [0648] 아라비돕시스 탈리아나 및 브라시카 나푸스에서 *FANCM* 유전자는 DEAD/DEAH 박스 RNA 헬리카제 단백질, 접근 번호 및 NM_001333162 및 XM_018659358인, 판코니 빈혈 상보 그룹 M(Fanconi Anemia Complementation Group M (FANCM)) 단백질을 인코딩한다. 아라비돕시스 탈리아나의 *FANCM* 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:31에 제공하며, 브라시카 나푸스에 대한 서열을 SEQ ID NO:32에 제공한다.
- [0649] C가 T로 치환된 또는 치환되지 않은 헤어핀 RNA 그리고 아라비돕시스 탈리아나 및 브라시카 나푸스에서 *FANCM* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 발현하기 위한 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 아라비돕시스 탈리아나 유전자에서의 표적 영역을 SEQ ID NO:31의 뉴클레오타이드 675~1174(500개 뉴클레오타이드)로 선택하였다. 브라시카 나푸스 유전자에서의 표적 영역을 SEQ ID NO:32의 뉴클레오타이드 896~1395(500 bp)로 선택하였다. 야생형 센스 서열 또는 변형(G:U) 센스 서열을 사용하여, 헤어핀 RNA를 인코딩하는 작제물을 설계하고 조립하였다. hpFANCM-At[wt], hpFANCM-At[G:U], hpFANCM-Bn[wt] 및 hpFANCM-Bn[G:U] 작제물의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:33~36에 제공한다. G:U 작제물을 제조하기 위해, 센스 서열의 모든 시토신 염기를 티민 염기로 대체하였다 - 아라비돕시스 탈리아나 작제물에서 102/500(20.4% G:U 염기쌍 제공) 및 브라시카 나푸스 작제물에서 109/500(21.8% G:U 염기쌍). 브라시카 나푸스 G:U 변형 헤어핀의 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 17개 염기쌍이었고, 두 번째로 긴 신장부는 16개의 인접한 염기쌍이었다.
- [0650] 브라시카 나푸스에서의 *DDM1* 유전자는 DNA에서 시토신 염기를 메틸화하는 메틸트랜스퍼라제를 인코딩한다(Zhang et al., 2018). cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:37에서 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자에 대응한다.
- [0651] C가 T로 치환된 또는 치환되지 않은 헤어핀 RNA 그리고 브라시카 나푸스에서 *DDM1* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 발현하기 위한 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 브라시카 나푸스 유전자의 2개의 인접하지 않은 표적 영역 SEQ ID NO:37의 뉴클레오타이드 504~815 및 1885~2074를 선택하였고, 직접 연결하여 키메라 센스 서열을 제조하였다. 따라서 센스 서열의 총 길이는 502개 뉴클레오타이드였다. 야생형 센스 서열 또는 변형(G:U) 센스 서열을 사용하여, 헤어핀 RNA를 인코딩하는 작제물을 설계하고 조립하였다. hpDDM1-Bn[wt] 및 hpDDM1-Bn[G:U] 작제물의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:38~39에 제공한다. G:U 작제물을 제조하기 위해, 센스 서열의 시토신을 티민으로 대체하였다 - 브라시카 나푸스 작제물에서 106/502(21.1% G:U 염기쌍). G:U 변형 헤어핀의 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 20개 염기쌍이었고, 두 번째로 긴 신장부는 15개의 인접한 염기쌍이었다.
- [0652] 내인성 유전자를 표적화하는 또 다른 작제물에 있어서, 350개 뉴클레오타이드의 센스 서열 중 104개의 C 가운데 센스 서열에서 95개의 C가 T로 치환되어 헤어핀 RNA이 이중-가닥 영역에서 95/350=27.1% G:U 염기쌍을 제공하는, 헤어핀 RNA를 발현하도록 유전 작제물을 설계하였다. 즉, 센스 서열의 모든 C를 T로 대체하지는 않았다. 특히, 3개, 4개 또는 5개의 인접한 C가 센스 서열에서 연속으로 발생한 경우, 3개의 C 중 1개 또는 2개만, 또는 4개의 C 중 2개 또는 3개만, 또는 5개의 인접한 C 중 2개, 3개 또는 4개만 T로 대체하였다. 이는 이중-가닥 RNA 영역에서 보다 균일한 G:U 염기쌍 분포를 제공하였다. 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 15개 염기쌍이었고, 두 번째로 긴 신장부는 13개의 인접한 염기쌍이었다.
- [0653] 4개, 5개, 6개 또는 7개 뉴클레오타이드의 모든 블록에서 1개 또는 2개의 염기쌍이 C에서 T 치환으로 또는 A에서 G 치환으로 변형된 추가 작제물을 설계하였다. 야생형 센스 서열이 T 또는 G로 구성되는 8개 이상의 뉴클레오타이드 신장부를 가진 경우, 하나 이상의 뉴클레오타이드를 센스 가닥에서 치환하여 블록 내에 미스매치 뉴클레오타이드를 생성하거나 C에서 T로 또는 A에서 G로의 치환을 안티센스 가닥에서 제조하여 작제물로부터 전사되는 생성 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역에서 8개 이상의 인접한 정규 염기쌍의 이중-가닥 신장부를 배제하였다.
- [0654] **실시예 15. 동물 세포에서 유전자 발현을 감소시키기 위한 변형 헤어핀**
- [0655] G:U 염기쌍 형성 형태, ledRNA 형태 또는 두 변형의 조합의, 동물 세포에서의 변형 침묵화 RNA를 평가하기 위해, 증강된 녹색 형광 단백질(EGFP)을 인코딩하는 유전자를 모델 표적 유전자로서 하기 실험에서 사용하였다. EGFP에 대한 코딩 영역의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:40에 나타낸다. SEQ ID NO:40의 뉴클레오타이드 131~591에 대응하는, 460개 뉴클레오타이드의 표적 영역을 선택하였다.
- [0656] 발현을 위한 프로모터에 대해 5'에서 3' 순서로, EGFP 코딩 영역의 대응하는 영역(뉴클레오타이드 131~590)과 전체적으로 상보적인 460개 뉴클레오타이드의 안티센스 EGFP 서열, 부분적으로 GUS 코딩 영역으로부터 유래되는 312

개 뉴클레오티드(GUS ORF의 뉴클레오티드 802~1042에 대응함)의 루프 서열, 및 EGFP 코딩 영역의 뉴클레오티드 131~590과 서열이 동일한 460개 뉴클레오티드의 센스 EGFP 서열을 포함하는 헤어핀 RNA를 발현하는, hpEGFP[wt]로 명명된 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 헤어핀 RNA hpEGFP[wt]를 인코딩하는 DNA 서열(SEQ ID NO:41)에는 벡터 pCI(Promega Corporation) 내로의 클로닝을 위해 제공하는 5' 말단의 *NheI* 제한 효소 부위 및 3' 말단의 *SaII* 부위가 포함되었다. 상기 벡터는 포유류 세포 전달감염 실험에 적합하였으며 강력한 CMV 프로모터/인핸서로부터의 발현을 제공할 것이다. 작제물은 또한 *NheI* 부위 및 시험관내 전사를 제공하기 위한 안티센스 서열의 시작부 사이에 삽입된 T7 프로모터 서열을 가져서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 헤어핀 RNA를 생성하였다. 헤어핀 인코딩 카세트를 발현 벡터 pCI에서 *NheI*에서 *SaII* 부위 내로 삽입함으로써 RNA 코딩 영역을 CMV 프로모터 및 SV40-후기 폴리아데닐화/전사 종결 영역에 작동 가능하게 연결하였다.

[0657] 센스 서열에 157개의 C에서 T로의 치환을 가지고 안티센스 서열에 치환이 없는 대응하는 헤어핀 작제물을 설계하고 제조하여, hpEGFP[G:U]로 명명하였다(SEQ ID NO:42). EGFP 코딩 영역에서의 표적 영역은 뉴클레오티드 131~590이었다. C에서 T로의 치환 백분율 그리고 이에 따른 헤어핀 RNA의 줄기에서의 G:U 염기쌍은 $157/460 = 34.1\%$ 였다. 센스 및 안티센스 서열은 460개 뉴클레오티드로 길이가 동일하였다. 유전자 침묵화 분야에서, 긴 이중-가닥 RNA는 인터페론 활성화를 포함하는 세포 반응의 활성화 가능성으로 인해 일반적으로 배제된다.

[0658] 발현을 위한 프로모터에 대해 5'에서 3'으로, EGFP 코딩 서열의 뉴클레오티드 131~358과 전체적으로 상보적인 228개 뉴클레오티드의 안티센스 EGFP 서열, 150개 뉴클레오티드의 루프 서열, EGFP 코딩 영역(SEQ ID NO:40)의 뉴클레오티드 131~590과 서열이 동일한 460개 뉴클레오티드의 센스 EGFP 서열, 144개 뉴클레오티드의 루프 서열, 및 *NheI* 및 *SaII* 제한 부위가 측면에 있는, EGFP 코딩 서열의 뉴클레오티드 359~590과 전체적으로 상보적인 232개 뉴클레오티드의 안티센스 서열을 포함하는 ledRNA(SEQ ID NO:43)를 발현하는, ledEGFP[wt]로 명명된 ledRNA 작제물을 설계하고 제조하였다. 따라서 인코딩된 ledRNA는 도 1a에 나타난 유형이었다. 하나의 센스 서열 및 2개의 안티센스 서열 간 염기쌍 형성에 의해 자가-어닐링되는 경우, ledRNA 구조는 EGFP 표적 영역에 대응하는 460개 염기쌍의 이중-가닥 영역을 가졌으며, 2개의 안티센스 서열은 서로 직접 공유 연결되지 않지만 뉴클레오티드 358 및 359에 대응하는 말단 간에 "갭" 또는 "닉"을 가졌다. ledRNA 구조를 CMV 프로모터에서의 서열로부터 유래되는 5'-영역 및 3'-영역 그리고 SV40-후기 폴리아데닐화/전사 종결 영역을 포함하는 더 큰 RNA 전사체에 포매하였다.

[0659] ledEGFP[G:U](SEQ ID NO:44)로 명명된, 센스 서열에 162개의 C에서 T로의 치환을 가지며 안티센스 서열에는 치환을 갖지 않는 대응하는 ledRNA 작제물을 또한 설계하고 제조하였다. 각각의 경우에서, EGFP 코딩 영역에서의 표적 영역은 ATG 시작 코돈으로 시작되는 단백질 코딩 영역(SEQ ID NO:40) 대비 뉴클레오티드 131~590이었다. C에서 T로의 치환 백분율, 그리고 이에 따른 ledRNA 줄기에서의 G:U 염기쌍은 $162/460 = 35.2\%$ 였다.

[0660] hpEGFP[wt], hpEGFP[G:U], ledEGFP[wt] 및 ledEGFP[G:U] 침묵화 RNA를 인코딩하는 플라스미드를 세포 내로의 벡터의 전달감염에 의해 CHO, HeLa 및 VERO 세포에서 유전자 침묵화 활성화에 대해 평가하였다. 평가 플라스미드의 GFP 발현 플라스미드와의 공동-전달감염에 의해 검정을 수행하였다. 모든 검정을 3회씩 수행하였다. CHO 세포(차이니스 햄스터 난소 세포) 및 VERO 세포(아프리카 녹색 원숭이 신장 세포)를 웰 당 1×10^5 개 세포의 밀도로 24웰 플레이트 내로 씨드접종하였다. CHO 세포는 변형 MEM α (Sigma, USA) 중에 성장시키고, HeLa 세포 및 VERO 세포는 DMEM(Invitrogen, USA) 중에 성장시켰다. 두 기본 배지에 모두 10% 우태 혈청, 2 mM 글루타민, 10 mM Hepes, 1.5 g/l 나트륨 바이카보네이트, 0.01% 페니실린 및 0.01% 스트렙토마이신을 보충하였다. 세포를 5% CO₂로 37°C에서 성장시켰다. 이어서 세포를 리포펙타민 2000을 사용하여, 플라스미드 DNA, 또는 EGFP 침묵화에 대한 대조군으로서 siRNA로 웰 당 1 μ g으로 전달감염시켰다. 간략하게, 평가 siRNA 또는 플라스미드를 GFP 리포터 플라스미드(pGFP N1)와 조합한 후 1 μ l의 리포펙타민 2000과 혼합하였고, 둘 다 50 μ l OPTI-MEM(Invitrogen, USA) 중에 희석하고, 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서 복합체를 세포에 첨가하고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 배지를 교체하고 세포를 72시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로 세포를 유세포 측정하여 GFP 침묵화를 측정하였다. 간략하게, 분석할 세포를 트립신처리하고, PBSA 중에 세척하고, 200 μ l의 0.01% 나트륨 아지드 및 PBSA 중 2% FCS 중에 현탁하고, FACScalibur(Becton Dickinson) 유세포 측정계를 사용하여 분석하였다. 데이터 분석을 CELLQuest 소프트웨어(Becton Dickinson)를 사용하여 수행하고 평균 형광 세기(MFI)를 리포터 및 무관한(음성 대조군) shRNA를 갖는 대조군 세포의 백분율로서 보고하였다.

[0661] si22로 언급되는 항-GFP siRNA는 Qiagen(USA)에서 입수하였다. si22의 항-GFP siRNA 서열은 센스 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3' (SEQ ID NO:86) 및 안티센스 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG-3' (SEQ ID NO:87)이었다. pshGFP로 명명된 양성 대조군 유전 작제물을 주형으로서 마우스 U6 서열을 사용하여 1단계 PCR

반응을 통해 생성하였다. 순방향 프라이머는 5'-TTTGTAGTATATGTGCTGCCG-3' (SEQ ID NO:88)이었고 역방향 프라이머는 5'-CTCGAGTTCCAAAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCTTGAAGATGAAGTTCAGGGTCAGCCAAACAAGGCTTTTCTCCAA-3' (SEQ ID NO:89)이었다. 전장 발현 카세트를 포함하는 증폭 산물을 pGEM-T Easy 내로 절찰하였다. 무관한 shRNA 대조군 플라스미드를 또한 동일한 PCR 방법을 통해 작제하였다. 그 작제를 위해, 순방향 프라이머는 5'-TTTGTAGTATATGTGCTGCCG-3' (SEQ ID NO:90)이었고, 역방향 프라이머는 5'-ctcgagttccaaaaaataagtcgcagcagcagacaatctcttgaattgtactgctgcgacttatgaataccgcttctcctctgag-3' (SEQ ID NO:91)이었다.

[0662] 하나의 실험으로부터의 생성 데이터를 도 34에 나타낸다. EGFP 활성의 명확한 감소(RNA 침묵화)가 무관한 shRNA 대조군과 비교되는 경우 si22 및 pshGFP 양성 대조군 모두에 대해 VERO 세포 및 CHO 세포에서 모두 관찰되었다. 이들 양성 대조군은 잘 검증되어 있는 작은 dsRNA 분자(si22)이거나 포유류 세포에서 매우 강력한 침묵화 활성을 갖는 것으로 알려진 shRNA(pshGFP)를 인코딩하였다. 대조군 RNA 분자는 이중-가닥 영역에서 임의의 미스매치 뉴클레오티드 없이 정규 염기쌍만을 사용하여, 그리고 포유류 세포에 대해 일반적으로 사용되는 20개 내지 30개 염기쌍 길이 범위 내인, 각각 20개의 인접한 염기쌍 및 21개의 인접한 염기쌍의 이중-가닥 영역을 갖는다. 대조적으로, hpRNA 및 ledRNA 작제물은 긴 dsRNA 영역을 갖는 분자를 발현한다. 모든 4개의 작제물이 두 세포 유형에서 모두 상당한 정도까지 EGFP 발현을 특이적으로 침묵화하는 것으로 관찰되었다(도 34). G:U 치환의 포함은 CHO 세포에서 두 작제물 모두에 대한 침묵화의 현저한 개선을 제공하였다. VERO 세포에서, 침묵화의 현저한 개선은 ledEGFP[wt] 대비 ledEGFP[G:U] 작제물로만 관찰되었다.

[0663] HeLa(인간) 세포를 사용하여 전달감염 48시간 후 EGFP 활성을 검정하는 제2 실험에서, 유사한 결과가 수득되었다(도 35).

[0664] hpRNA 및 ledRNA 효과기 분자가 통상적인 20 bp 내지 30 bp 크기 범위보다 긴 이중-가닥 영역을 가졌으므로, 이들을 사용하여 포유류 세포에서 유전자 침묵화가 관찰됨을 주지하는 것이 중요하였다. 또한 G:U 염기쌍을 생성하기 위해 뉴클레오티드를 치환하는 변형은 이들 더 긴 dsRNA 분자의 유전자 침묵화 효과를 유의미하게 증강시켰음이 또한 명확하였다. 상기 효과는 이들 구조가 진핵 세포에서 관찰되는 miRNA의 전구체인 내인성 priRNA에 더 가깝게 유사하고, 이에 따라 더 긴 dsRNA를 RNA 유도 침묵화 복합체(RISC) 효과기 단백질 내로의 로딩을 위한 가공을 개선한다는 데 기인할 수 있다.

[0665] 실시예 16. 식물에서 DDM1 및 FANCM 유전자를 표적화하는 RNA 작제물

[0666] 본 발명자들은 신규한 유전 프로파일 및 다양성(유전적 획득)을 생성하고 식물에서 요망되는 수행능력 형질에 대해 탐색할 수 있는 속도를 증가시키기 위한 방식을 고려하였다. 고려한 하나의 방식은 식물의 유성 생식 동안 일어나는 재조합율을 증가시키는 방식을 찾는 것이었다. 식물 재배자는 수행능력 획득과 연관된 요망되는 유전 프로파일에 대해 탐색할 수 있는 상이한 유전(대립유전자) 조합을 생성하기 위해 재조합 이벤트에 의존한다. 그러나, 각 재배 단계에서 재조합 이벤트의 수는 탐색할 수 있는 가능한 유전 프로파일의 수에 비해 극히 적다. 또한, 이들 이벤트가 게놈에서 일어나는 경우 제어하는 요소가 잘 이해되어 있지 않다. 따라서 본 발명자들은 트랜스 제닉 접근을 통해 내인적으로 또는 외인적으로 전달되는 ledRNA가 식물에서 사용되어 재조합율을 변형하여 유전적 다양성의 신속한 증가를 허용하고 재배 집단 내에서 가능한 더 빠른 유전적 획득을 일으킬 수 있도록 할 수 있는지 여부를 고려하였다.

[0667] 식물의 에피게놈은 게놈을 조직화하고, 패키징하고, 안정화하는 연관 단백질 및 DNA에 대한 여러 상이한 화학적 변형에 의해 영향받는다. 이들 변형은 또한 재조합이 일어나는 위치를 조절하며, 조밀한 게놈 패키징은 재조합의 강력한 억제제이다(Yelina et al, 2012; Melamed-Bessudo et al., 2012). DDM1(DECREASED DNA METHYLATION 1)은 DNA의 메틸화 및 게놈 패키징을 조절하는 효소이다. 상기 유전자의 돌연변이는 재조합 이벤트의 위치를 변경할 수 있다(Yelina et al, 2012; Melamed-Bessudo et al., 2012).

[0668] 감수분열 동안 재조합 이벤트는 철저히 조절되며, 중기 1에서의 적절한 염색체 분리를 보장하기 위해 각 염색체 상에서는 1회 내지 2회 이벤트만 일어난다. 재조합 이벤트는 효소 SPO11을 통해 DNA의 이중 가닥 절단(DSB)을 통해 개시된다(Wijnker et al, 2008). 이는 염색체에 따라 수백 개의 DSB를 생성한다. 소수의 이러한 DSB는 교차를 일으키는 반면, 대부분은 재조합 이벤트가 일어날 수 있기 전에 DNA 보수 효소에 의해 보수된다. 또한 DSB가 교차로 발생하는 것을 억제하는 여러 음성적 조절인자가 존재한다. 본 발명자들에 의해 고려된 최초 접근에서, ledRNA 분자 또는 대조로서 통상적 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는 유전 작제물을 잠재적으로 재조합율에 영향을 미칠 수 있는 단백질 인자, 예컨대 FANCM(FANCONI ANEMIA COMPLEMENTATION GROUP M)을 인코딩하는 유전자를 표적화하는, 아라비돕시스 탈리아나 식물 내로 도입하였다.

- [0669] 아라비도시스 탈리아나의 *DDM1* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 AF143940으로 제공한다(Jeddeloh et al., 1999). *DDM1* 유전자 발현 감소는 DNA 메틸화를 감소시키고 아라비도시스 탈리아나에서의 교차 이벤트의 수 및 위치를 증가시키는 것으로 나타났다(Melamed-Bessudo and Levy, 2012).
- [0670] 브라시카 나푸스는 이질사배체 중이며 염색체 A7, A9, C7 및 C9 상에서 각각의 A 및 C 서브게놈 상에 2개의 *DDM1* 유전자를 가지고, 이에 따라 총 4개의 *DDM1* 유전자를 갖는다. 이들 유전자는 BnaA07g37430D-1, BnaC07g16550D-1, BnaA09g52610D-1 및 BnaC09g07810D-1로 명명된다. 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자 BnaA07g37430D-1의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 XR_001278527로 제공한다(SEQ ID NO:93). SEQ ID NO:93의 뉴클레오티드 650~959 및 2029~2218에 대응하는, 4개 유전자의 500개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA 작제물을 설계하고 제조하였다. hpRNA 및 ledRNA 작제물을 설계하기 위해 사용된 뉴클레오티드 영역은 유전자 간의 서열 보존에 기반하여, 브라시카 나푸스에 존재하는 모든 4개의 *DDM1* 유전자 BnaA07g37430D-1, BnaC07g16550D-1, BnaA09g52610D-1 및 BnaC09g07810D-1을 표적화하였다. hpRNA 작제물에서 요소의 순서는 Hellsgate 벡터로부터의 인트론-안티센스 서열-전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 포함하는 프로모터-센스 서열-루프 서열이었다. hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:94로 제공한다.
- [0671] 동일한 500개 뉴클레오티드 영역을 표적화하고 센스 서열의 97개 시토신 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 대체된 것을 제외하고 동일한 구조를 가지는 헤어핀 RNA를 인코딩하는 제2 헤어핀 RNA 작제물을 제조하였다. 키메라 DNA가 전사되고 G:U 치환 hpRNA가 자가-어닐링된 경우, 이는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한 dsRNA 영역 내 뉴클레오티드의 97/500 = 19.4%를 제공하였다. G:U-변형 hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:95로 제공한다. 또한, 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. ledRNA를 인코딩하는 상기 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:96으로 제공한다.
- [0672] 시험관내 전사에 의한 RNA의 생성을 위해, DNA 제조물을 코딩 영역 바로 뒤를 절단하는 제한 효소 *HincII*로 절단하고, RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하고, RNA를 정제한 후 수성 완충 용액 중에 농축하였다. LedRNA를 사용하여 브라시카 나푸스(유채) 떡잎에서 내인성 *DDM1* 전사체를 표적화하였다. 조직 배양 배지 상에서 무균 상태로 성장시킨 5일령 묘목의 떡잎을 조심스럽게 절제하고 2%(w/v) 수크로스를 포함하는 2 ml MS 액체 배지를 함유하는 페트리 디쉬에 배치하고, 113 μ g의 ledRNA 또는 100 μ l의 수성 완충 용액을 대조군으로 하였다. 처리를 위해 사용된 MS 액체 배지는 계면활성제 Silwett-77(60 ml 중 0.5 μ l)을 함유하였다. 페트리 디쉬를 온건히 진탕하며 진탕장치 상에서 인큐베이션하여, 떡잎을 ledRNA를 함유하는 용액 중에 침지시켰다. 샘플을 ledRNA의 적용 5시간 및 7시간 후에 수확하였다. 병렬 실험에서, 떡잎의 상부 표면을 10 μ g의 ledRNA 또는 완충 용액으로 코팅하고 습식 조직 페이퍼 상에서 인큐베이션하였다. 샘플을 ledRNA 적용 7시간 후에 수집하였다.
- [0673] 또한, 브라시카 나푸스의 생식 조직에서 *DDM1* 내인성 전사체를 표적화하기 위해, 유채꽃봉오리를 아그로박테리움 투마페시안스 균주 AGL1 세포 현탁액, 즉 살아있는 AGL1 세포의 분취물의 존재 하에 또는 부재 하에 ledRNA에 노출시켰다. AGL1 세포를 포함하는 또는 포함하지 않는 수성 완충 용액이 각각의 대조군으로 작용하였다. AGL1을 28°C에서 2일 동안 25 mg/ml 리팜피신을 함유하는 10 ml의 LB 액체 배지 중에 성장시켰다. 세포를 5분 동안 3000 rpm에서 원심분리에 의해 수확하였다. 세포 펠렛을 세척하고, 세포를 2 ml 액체 MS 배지 중에 재현탁하였다. 꽃봉오리를 62 μ g의 ledRNA 또는 62 μ g + 50 μ l의 AGL1 배양과 함께, 50 ml의 MS 액체 배지 중 0.5 μ l의 Silwett-77을 포함하는 2 ml의 MS 액체 배지를 함유하는 페트리 디쉬에서 인큐베이션하였다. 대조군으로서, 50 μ l의 완충 용액 또는 50 μ l의 완충 용액 + 50 μ l의 AGL1 배양을 사용하였다. 샘플을 7시간 동안 온건히 진탕하며 진탕장치 상에서 인큐베이션하였다. 각 처리를 위해 3개의 생물학적 반복물을 사용하였다.
- [0674] 처리 및 대조군 떡잎 및 꽃봉오리를 멸균 증류수 중에 2회 세척하고, 조직 페이퍼를 사용해서 표면의 물을 제거하고 액체 질소로 급속 냉동하였다. RNA를 처리군 및 대조군 조직으로부터 단리하고, DN아제로 처리하여 게놈 DNA를 제거하여 정량하였다. ledRNA-처리 샘플 및 이의 각각의 대조군으로부터의 동량의 총 RNA를 사용하여 제1가닥 cDNA를 합성하였다. 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 사용해서 *DDM1*의 발현을 분석하였다.
- [0675] ledRNA로 침지된 처리 떡잎에서, *DDM1* 전사체 존재비는 5시간째에 대략 83% 내지 86%만큼 감소하였고, 대조군 대비 7시간째에 91%가 감소하며 추가 감소하였다. 유사하게, 대조군 대비 *DDM1* mRNA 수준의 대략 78% 내지 85% 감소가 ledRNA로 코팅된 떡잎에서 관찰되었다. 아그로박테리움 세포의 부재 하 대조군 대비 ledRNA로 처리된 꽃봉오리에서는 *DDM1* mRNA 존재비의 차이가 검출되지 않았다. 그러나, *DDM1* 전사체 수준의 대략 60% 내지 75% 감소가 각각의 대조군 대비 아그로박테리움의 존재 하에 ledRNA로 처리된 꽃봉오리에서 관찰되었다. 아그로박테리움이 없는 대조군을 아그로박테리움을 가진 대조군과 비교한 경우 *DDM1* 전사체 수준에서 유의차가 검출되지 않

아 아그로박테리움 세포 자체가 *DDM1* 전사체의 감소를 유도하지 않음을 나타내었다. 종합하면, 이들 결과는 *ledRNA*가 떡잎 및 꽃봉오리에서 모두 내인성 *DDM1* 전사체 수준을 감소시킬 수 있는 반면, 살아있는 아그로박테리움 세포는 꽃봉오리로의 *ledRNA*의 진입을 촉진하는 것으로 드러남을 시사하였다. *ledRNA*의 이러한 접근 가능성은 또한 물리적 수단, 예컨대 꽃봉오리 외층의 피어싱, 원심분리 또는 진공 여과, 또는 이러한 방법의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0676] 소정 아라비도시스 탈리아나 돌연변이체, 예컨대 *zip4* 돌연변이체에는 감수분열 교차가 없어서, 염색체 상동체의 분리-오류를 유도하고 이에 따라 번식력을 감소시키며 야생형과 시각적으로 구별될 수 있는 더 짧은 장각(과실)을 야기하였다. *zip4* 돌연변이체의 표현형은 *FANCM* 유전자 발현을 감소시켜 역전될 수 있다.

[0677] 아라비도시스 탈리아나의 *FANCM* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 NM_001333162(SEQ ID NO:97)로 제공하였다. SEQ ID NO:97의 뉴클레오티드 853~1352에 대응하는, 유전자의 500개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA 작제물을 설계하고 제조하였다. 작제물에서 요소의 순서는 Hellsgate 벡터로부터의 인트론-안티센스 서열-전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 포함하는 프로모터-센스 서열-루프 서열이었다. hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:98로 제공한다. 센스 서열의 102개의 시토신 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 대체된 것을 제외하고 동일한 500개의 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 유사한 헤어핀 RNA를 인코딩하는 제2 헤어핀 RNA 작제물을 제조하였다. 키메라 DNA가 전사되고 생성 G:U 치환 hpRNA가 자가-어닐링한 경우, 이는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한 dsRNA 영역에서의 뉴클레오티드 102/500 = 20.4%를 제공하였다. G:U-변형 hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:99로 제공한다. 또한, 아라비도시스 탈리아나의 *FANCM* 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 *ledRNA*를 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. *ledRNA*를 인코딩하는 상기 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:100으로 제공한다.

[0678] 브라시카 나푸스는 BnaA05g18180D-1 및 BnaC05g27760D-1로 명명되는, 그 A 및 C 서브게놈 각각에 1개의 *FANCM* 유전자를 갖는다. 브라시카 나푸스의 하나의 *FANCM* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 XM_022719486.1; SEQ ID NO:101)로 제공한다. SEQ ID NO:101의 뉴클레오티드 2847~3349에 대응하는, 유전자의 503개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 설계하고 제조하였다. 작제물에서 요소의 순서는 Hellsgate 벡터로부터의 인트론-안티센스 서열-전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 포함하는 프로모터-센스 서열-루프 서열이었다. hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:102로 제공한다. 센스 서열의 107개의 시토신 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 대체된 것을 제외하고 동일한 503개의 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 유사한 헤어핀 RNA를 인코딩하는 제2 헤어핀 RNA 작제물을 제조하였다. 키메라 DNA가 전사되고 G:U 치환 hpRNA가 자가-어닐링한 경우, 이는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한 dsRNA 영역에서의 뉴클레오티드 107/500 = 21.4%를 제공하였다. G:U-변형 hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:103으로 제공한다. 또한, 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 *ledRNA*를 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. *ledRNA*를 인코딩하는 상기 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:104로 제공한다.

[0679] 시험관내 전사에 의한 RNA의 생성을 위해, DNA 제조물을 코딩 영역 바로 뒤를 절단하는 제한 효소 *HincII*로 절단하고, RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하고, RNA를 정제한 후 수성 완충 용액 중에 농축하였다. *ledRNA*를 아그로박테리움 투메파시엔스 AGL1과 함께 사용하여 아라비도시스 탈리아나의 *zip4* 돌연변이체의 감수분열-전사에서 *FANCM* 전사체를 표적화하였다. *zip4* 돌연변이체의 장각은 약화된 교차 형성으로 인해 야생형 장각에 비해 더 짧았고, 시각적으로 쉽게 관찰되며, 이에 따라 감소된 번식력을 유도하였다. *zip4* 돌연변이체에서의 *FANCM* 억제는 번식력을 복원하고 장각 길이를 복원하는 것으로 나타났다.

[0680] 감수분열 전 쌍을 함유하는 아라비도시스 탈리아나 *zip4* 개화를 각각의 경우, 계면활성제, 이 경우에는 Silwett-77의 존재 하에, AGL1 또는 대조군으로서 AGL1과 완충 용액을 함께 *FANCM*을 표적화하는 *ledRNA*와 접촉시켰다. 일단 종자 설정이 완료되면, 감수분열 전 쌍으로부터 발달한 장각을 절제하여 종자 수를 결정하였다. *ledRNA*-처리 샘플로부터의 15개 장각 중에서, 2개의 장각은 10개 종자를 나타내었고, 1개의 장각은 9개 종자를 가진 반면, 대조군 장각에서의 종자 수는 3개 내지 6개 범위였다. 이들 결과는 종자 수에서 관찰된 증가가 *ledRNA*에 의한 *FANCM* 전사체 수준의 억제에 기인하며, 이에 따라 감수분열 교차 수를 증가시키고 번식력을 증가시킴을 시사하였다.

[0681] **실시예 17. 진균 질병에 대한 내성을 위한 RNA 작제물**

[0682] 보리 및 밀의 *Mlo* 유전자를 표적화하는 *LedRNA*

- [0683] 곡류 식물의 진균 질병인 밀두균병은 보리에서 자낭균류 블루메리아 그라미니스 f. sp. 호르데이(*hordei*) 그리고 밀에서 관련 블루메리아 그라미니스 f. sp. 트리티시(*tritici*)에 의해 유도된다. 블루메리아 그라미니스는 진균이 식물로부터 영양분을 획득하기 위해 진균 및 숙주 세포 간 밀접한 상호작용이 관여되는, 번식을 위해 식물 숙주를 필요로 하는 흰가루병균목(Erysiphales)의 절대 생체영양성 진균 병원체이다(Glawe, 2008). 진균 자낭홀씨 또는 소병자홀씨가 표면과 접촉한 후, 진균은 처음에 잎, 엽초 또는 잎 이삭의 표피층을 감염시킨다. 감염 후 일정 시간 동안 잎은 초록색이고 활성이 있는 채 유지된 후, 분말성, 균사형 물질이 자라고 잎은 점차적으로 백화되어 죽어나간다. 질병이 진행됨에 따라, 진균 균사체는 진균의 유성 자실체인 작은 검은색 점들로 덮일 수 있다. 밀두균병 질병은 세계적으로 분포되어 있으며 저온, 다습 기후에서 가장 큰 손상을 일으킨다. 이 질병은 주로 결구의 수를 감소시킬 뿐만 아니라 속씨 크기 및 중량을 감소시켜 낱알 수율에 영향을 미친다. 현재, 질병 제어는 조건이 저온이고 습한 경우 빈번하게 적용되어야 하며 고가인 살진균제를 작물에 분무하거나, 내성 품종을 성장시키는 것에 의한다. 또한, 호주에서의 밀에서 밀두균병에 대해 살진균제 내성이 출현하였다.
- [0684] 보리 및 밀의 *Mlo* 유전자는 알려지지 않은 기전에 의해 블루메리아 그라미니스에 대한 감수성을 부여하는 Mlo 폴리펩타이드를 인코딩한다. 식물에 고유한 *Mlo* 유전자 패밀리에 의해 인코딩되는 여러, 밀접하게 관련된 MLO 단백질이 존재한다. 각각의 유전자는 형질막에 편재된 알려지지 않은 생화학적 활성을 갖는 7개의 막통과 도메인 단백질을 인코딩한다. 특히, 패밀리 내의 유일한 특이적 *Mlo* 유전자는 밀두균병 감수성 유전자로 작용할 수 있고 이들은 Mlo 단백질의 세포질 C-말단부 도메인 내에 보존된 모티프를 갖는 폴리펩타이드를 인코딩한다. Mlo 폴리펩타이드가 밀두균병 감수성 인자로 작용하는 기전은 알려지지 않았다. 천연 밀 *mlo* 돌연변이체의 발생은, 아마도 밀의 다배수체 성질로 인해, 보고된 바 없었다. 그러나, 인공적으로 생성된 *mlo* 돌연변이체는 질병에 대해 일부 내성을 나타내지만 종종 상당히 감소된 낱알 수율 또는 조기 잎 노화를 나타낸다(Wang et al., 2014; Acevedo-Garcia et al., 2017).
- [0685] 6배수체 밀은 각각 염색체 5AL, 4BL 및 4DL 상에 위치하는 *TaMlo-A1*, *TaMlo-B1* 및 *TaMlo-D1*로 명명된 Mlo 유전자의 3개 상동체를 갖는다(Elliott et al., 2002). 유전자에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 접근 번호: *TaMlo-A1*, AF361933 및 AX063298; *TaMlo-B1*, AF361932, AX063294 및 AF384145; 및 *TaMlo-D1*, AX063296으로 이용 가능하다. A, B 및 D 게놈 상 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 인코딩되는 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 각각 대략 95% 내지 97% 및 98% 동일하다. 모든 3개의 유전자는 식물이 성장하고 성숙함에 따라 발현 수준이 증가하며 식물의 잎에서 발현된다. 따라서 본 발명자들은 모든 3개 유전자의 발현을 감소시키고, 유전자 간의 서열 동일성 정도를 이용하고, 고도의 서열 보존을 갖는 유전자 영역을 표적화할 수 있는 ledRNA 작제물을 설계하고 제조하였다.
- [0686] 모든 3개의 *TaMlo-A1*, *TaMlo-B1* 및 *TaMlo-D1* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a).
- [0687] SEQ ID NO:136의 1403~1569에 융합된 뉴클레오티드 916~1248에 대응하는, *TaMlo* 표적 유전자의 500 bp 뉴클레오티드 서열을 선택하였다. 각각의 ledRNA의 dsRNA 영역은 500 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, 예를 들어 SEQ ID NO:136의 1403~1569에 융합된 뉴클레오티드 916~1248에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:137로 제공한다.
- [0688] ledRNA를 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 제조하고, 정제하고, 완충액 중에 현탁하였다. 잎 당 10 μ g의 ledRNA를 Zadoks 23 성장 단계에서 밀 식물에서의 잎 구역에 페인트 브러시를 사용해서 적용하였다. 대조군으로서, 일부 잎은 완충액만을 사용해서 모의-처리하였다. 처리 및 대조군 잎 샘플을 수확하고 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 상의 QPCR 검정은 3개 *TaMlo* mRNA의 조합인 *TaMlo* mRNA 수준이 95.7%만큼 감소됨을 나타내었다. Z73 성장 단계의 식물을 또한 처리하고 검정하였다. 이들은 대조군 잎 샘플 대비 QPCR에 의해 *TaMlo* 유전자 발현의 91% 감소를 나타내었다. 처리 잎 영역에서 관찰된 *TaMlo* 유전자 발현의 감소는 처리 구역에 특이적이었다 - 잎의 원위, 미처리 부분에서는 *TaMlo* mRNA 수준의 감소가 없었다.
- [0689] 보리 *mlo* 돌연변이체에서, 질병 방어-관련 유전자 변종의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다. 따라서, ledRNA-처리 밀 잎을 PR4, PR10, β -1,3-글루카나제, 키티나제, 게르민(germin) 및 ADP-리보실화 인자를 인코딩하는 방어 관련 유전자 수준에 대해 QPCR에 의해 검정하였다. 이들 유전자 중 어느 것도 대조군 잎 영역 대비 처리 잎 영역에서 발현 수준이 유의미하게 변경되지 않았다.
- [0690] *Mlo* 유전자 발현을 감소시켜 질병 내성을 증가시키는 ledRNA의 능력을 평가하기 위해, 밀두균병 진균의 포자를 잎의 처리 및 미처리 구역으로 적용한다. 잎을 밀 식물로부터 떼고, 이전과 같이 ledRNA로 처리하고, 배지(물 1

ℓ 당 50 mg 벤즈이미다졸 및 10 g 한천) 상에서 유지하여 빛 아래에서 잎의 노화를 방지하였다. 24시간 후, 잎에 밀두균병 포자를 접종하고 질병 진행을 5일 내지 24일 동안 추적하였다. 처리 잎은 백화 구역에 의해 둘러싸인 광범위한 균사체 성장을 나타낸, ledRNA를 수여받지 않은 대조군 잎에 비해, 진균 균사체 성장을 거의 내지 전혀 나타내지 않았고 잎 백화를 나타내지 않았다.

[0691] 추가 실험에서, 더 낮은 수준의 ledRNA를 적용하여 효과적인 ledRNA의 최소 수준을 확인했다. 200 ng/μl(잎 전체 당 2 μg)만큼 낮은 농도의 RNA 적용은 본 제형에서 밀두균병 병소의 유의미한 억제를 나타내어, 억제 RNA의 양이 진균 성장 및 발달의 억제를 계속 제공하면서 상당히 감소될 수 있다는 것을 제시하였다. 또한, 잎에 ledRNA 처리 후 1일, 2일, 4일, 7일, 및 14일에 접종하여 보호 효과가 얼마나 지속되는지를 확인한다. 내인성 유전자의 효과적인 침묵화는 처리 24 시간 후 첫 시점에서부터 내인성 유전자가 계속해서 91%의 발현 감소를 나타낼 때 처리 14 일 후 마지막 시점까지의 시간 경과 내내 관찰되었다. 전체 식물에 ledRNA 제조물을 또한 분무하고, 진균 질병 제제를 접종한 후 질병 내성에 대해 평가할 것이다.

[0692] 비티스 비니페라(*Vitis vinifera*)의 *VvMLO* 유전자를 표적화하는 *LedRNA*

[0693] 비티스 비니페라 및 비티스 슈도레티쿨라타의 *MLO* 유전자는 자낭균류 진균인 에리시페 네카토르(*Erysiphe necator*)에 의해 유도되는 진균 질병 밀두균병에 대한 감수성을 부여하는 *MLO* 폴리펩타이드를 인코딩한다. 에리시페 네카토르는 진균이 식물로부터 영양분을 획득하기 위해 진균 및 숙주 세포 간 밀접한 상호작용이 관여되는, 번식을 위해 식물 숙주를 필요로 하는 절대 생체영양성 진균 병원체이다. 그 전부가 식물에 고유하며 형질막에 편재된 알려지지 않은 생화학적 활성을 갖는 7개의 막통과 도메인 단백질을 인코딩하는 유전자 패밀리에 의해 인코딩되는 여러, 밀접하게 관련된 *MLO* 단백질이 존재한다. 특히, 패밀리 내의 유일한 특이적 *Mlo* 유전자는 밀두균병 감수성 유전자로 작용할 수 있고 이들은 *Mlo* 단백질의 세포질 C-말단부 도메인 내에 보존된 모티프를 갖는 폴리펩타이드를 인코딩한다. *MLO* 폴리펩타이드가 밀두균병 감수성 인자로 작용하는 기전은 알려지지 않았다.

[0694] 비티스 종의 3개의 상이한, 그러나 관련된 *MLO* 유전자, 즉 *VvMLO3*, *VvMLO4* 및 *VvMLO17*(문헌[Feechan et al., Functional Plant Biology, 2008, 35: 1255-1266]에 따른 명명법)를 표적화하는 *LedRNA* 작제물을 설계하고 하기과 같이 제조하였다. 첫 번째 작제물에 있어서, 예를 들어, SEQ ID NO:138의 뉴클레오티드 297~1156에 대응하는 *VvMLO3* 표적 유전자의 860개 뉴클레오티드 서열을 선택하였다. *VvMLO3*, *VvMLO4* 및 *VvMLO17* 유전자를 표적화하는 3개의 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). 각각의 ledRNA의 dsRNA 영역은 600 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, 예를 들어 SEQ ID NO:138의 뉴클레오티드 427~1156에 대응하였다. ledRNA 중 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:139로 제공한다.

[0695] ledRNA를 시험관내 전사에 의해 제조하고, 별도로 또는 모든 3개의 혼합물로서, 비티스 비니페라, 카베르네 소비뇽(Cabernet Sauvignon) 품종의 잎에 적용한다. 이후, 밀두균병 진균의 포자를 잎의 처리 및 미처리 구역에 적용한다. 정량적 RT-PCR을 이용하여 표적 mRNA의 수준 감소가 관찰되었다. 시간이 지남에 따라 질병 진행이 이어진다. *VvMlo3*, *VvMlo4* 또는 *VvMlo11*을 표적화하는 1 μg/ml의 ledRNA 용액의 적용으로부터 *VvMlo4*의 상당한 하향-조절이 관찰되었다.

[0696] 진균 유전자를 표적화하는 *LedRNA*

[0697] 에르고스테롤의 합성 및 진균의 생존 및 성장에 필요한 유전자인 진균 병원체 *리조크토니아 솔라니*의 *Cyp51* 유전자의 코딩 영역에 대항하여 *LedRNA* 작제물을 설계하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). 단일 ledRNA 작제물은 각각의 유전자로부터 350bp를 함유하는 ledRNA의 dsRNA 영역을 갖는 *R. 솔라니*로부터 2개의 유전자를 표적화하도록 고안되었다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, 예를 들어 SEQ ID NO:140의 뉴클레오티드 884~1233 및 SEQ ID NO: 141의 뉴클레오티드 174~523에 대응하였다. ledRNA 중 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:142로 제공한다. ledRNA를 시험관내 전사에 의해 제조하고, *R. 솔라니* 균사체의 접종원과 함께 배양물 100 μl 당 5 μg 농도로 배양 배지에 적용하였다. 600 nm에서 배양물의 광 밀도를 관독함으로써 진균의 성장을 시간 0(제로)에서 그 다음 주에 걸쳐 매일 측정하였다. *ledRsCyp51*을 함유하는 배양물에서 *R. 솔라니*의 성장은 RNA 완충제를 함유하는 대조 배양물 또는 *R. 솔라니*에서 대응하는 표적이 없는 대조 ledGFP보다 유의미하게 더 낮았다.

[0698] 또한, ledRNA-인코딩 작제물을 *피토프토라 신나모미* 단리물 94.48에서 CesA3 셀룰로스 신타제 유전자의 코딩 영역에 대항하여 설계하고 제조하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). ledRNA 작제물은 유전자의 코딩 영역로부터 500bp를 함유하는 ledRNA의 dsRNA 영역을 갖는 *피토프토라 신나모미*의 CesA3 유전자를 표적화하도록 고안되었다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, 예를 들어 SEQ ID NO:143의 뉴클레오티드 884~1233에 대응하였다. ledRNA 중 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:144로 제공한다. ledRNA를 시험관내로 전사하고, 배양물 100 μ l 당 3 μ g 비율로 배양 배지에 적용하였다. 모의 처리(단독의 RNA 완충액) 또는 ledGFP 처리 배양물에 비해 PcCesA3를 표적화하는 ledRNA를 갖는 배양물에서 방향적 균사 성장의 상당 손실이 관찰되었다. 방향적 성장의 손실 및 그에 따른 비정형 구근 성장 패턴은 세포벽 생합성이 중단된 세포의 암시였고, 따라서 PcCesA3 유전자의 침묵화와 일치했다.

[0699] **실시예 18. 식물에서 다른 유전자를 표적화하는 RNA 작제물**

[0700] 아라비도시스 탈리아나 및 니코티아나 벤타미아나의 Tor 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0701] 라파마이신 표적(*TOR*) 유전자는 진핵 세포에서 여러 세포 기능, 예를 들어 다양한 호르몬, 스트레스 및 영양분 이용 가능성에 대한 반응을 제어하는 세린-트레오닌 단백질 키나제 폴리펩타이드를 인코딩한다. 이는 성장을 위한 세포 자원을 최적화하기 위해 번역 기구를 조절하는 마스터 조절인자로 알려져 있다(Abraham, 2002). 적어도 동물 및 효모에서, TOR 폴리펩타이드는 항진균제 라파마이신에 의해 불활성화되어, 라파마이신 표적(Target of Rapamycin)이라는 그 명명이 얻어진다. 식물에서, TOR은 *TOR*에서 동종접합성 돌연변이체의 치사성에 의해 나타난 바와 같이, 발생 중인 종자에서의 배아 발생을 위해 필수적인 뿐만 아니라(Mahfouz et al., 2006), 세포 대사에 대한 성장 신호의 커플링에 관여된다. *TOR* 유전자 발현의 하향조절은 지방산 합성 증가를 일으켜서 식물 조직에서 증가된 지질 함량을 생성하는 것으로 여겨졌다.

[0702] cDNA 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열이 SEQ ID NO:105로 제공되는, 니코티아나 벤타미아나의 *TOR* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 설계하고 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). SEQ ID NO:105의 뉴클레오티드 2595~3197에 대응하는 표적 영역은 603 bp 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 603 bp 길이였다; dsRNA 영역의 안티센스 서열은 단속되지 않았고, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:105의 뉴클레오티드 2595~3197의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:106으로 제공한다. ledRNA 작제물을 인코딩하는 유전 작제물의 DNA 제조물을 코딩 영역 바로 뒤의 DNA를 절단하는 제한 효소 *MlyI*로 절단하고, RNA 폴리머라제 SP6으로 시험관내 전사하고, RNA를 정제한 후 수성 완충 용액 중에 농축하였다. ledRNA의 샘플을 니코티아나 벤타미아나 잎의 상부 표면으로 적용하였다. 2일 및 4일 후, 처리 잎 샘플을 수확하고, 건조하고, 총 지방산 함량을 정량적 기체 크로마토그래피(GC)에 의해 측정하였다. TOR ledRNA로 처리된 잎 샘플은 대조군(미처리) 샘플에서 관찰되는 2.5% 내지 3.0%(TFA 중량/건조 중량)의 총 지방산(TFA) 함량에서 ledRNA 처리 샘플에 있어서 3.5% 내지 4.0%로의 증가를 나타내었다. 이는 대조군 대비 TFA 함량의 17% 내지 60% 증가를 나타내어, *TOR* 유전자 발현이 ledRNA 처리 조직에서 감소되었음을 시사하였다.

[0703] 호르데움 불가레의 ALS 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0704] 아세트락테이트 신타아제(*ALS*) 유전자는 분기쇄 아미노산 류신, 발린 및 이소류신의 합성에서 첫 단계를 촉매하는, 식물 및 미생물에서 확인되는 효소(EC 2.2.1.6)를 인코딩한다. ALS 효소는 피루베이트의 아세트락테이트의 전환을 촉매한 후 다른 효소에 의해 분기쇄 아미노산으로 추가 전환시킨다. ALS의 억제제가 제초제, 예컨대 설펜올우레아, 이미다졸리논, 트리아졸로피리미딘, 피리미디닐 옥시벤조에이트 및 설펜올아미노 카보닐 트리아졸리논 클래스의 제초제로 사용된다.

[0705] ledRNA가 식물로의 RNA의 외인성 전달에 의해 *ALS* 유전자 발현을 감소시킬 수 있었는지 여부를 평가하기 위해, 보리, 호르데움 불가레에서 *ALS* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 호르데움 불가레 *ALS* 유전자 서열을 본원에서 SEQ ID NO:107(접근 번호 LT601589)로 제공한다. ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). SEQ ID NO:107의 뉴클레오티드 1333~1938에 대응하는 표적 영역은 606개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 606 bp 길이였다; dsRNA 영역의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:107의 뉴클레오티드 1333~1938의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:108로 제공한다. 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하

에 있었다.

- [0706] ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 ledRNA 코딩 영역 하류를 절단하는 제한 효소 *MlyI*로 절단하고, 전사 키트를 이용해서 지침에 따라 RNA 폴리머라제 SP6으로 시험관내 전사하였다. RNA를 보리 식물의 잎의 상부 표면 상에 적용하였다. RNA를 처리 잎 샘플로부터(24시간 후) 추출하였다. 정량적 역전사-PCR(QPCR) 검정을 RNA 샘플 상에서 수행하였다. 검정은 ALS mRNA 수준이 ledRNA 처리 조직에서 감소됨을 나타내었다. (총 RNA를 처리 및 미처리 식물에 대해 추출하고, DN아제 처리하고, 정량하고, 2 μ g을 프라이머 CTGCCAATCTCAGCTGGATC를 사용하여 역전사하였다. cDNA를 순방향 프라이머 TAAGGCTGACCTGTTGCTTGC 및 역방향 프라이머 CTGCCAATCTCAGCTGGATC를 사용하여 정량적 PCR에 대한 주형으로 사용하였다. ALS mRNA 발현을 호렌데움 칠렌세(*Horendium chilense*) 단리물 H1 라이코펜-사이클라제 유전자에 대해 정상화하였다. ALS 발현은 LED 처리 식물에서 82%만큼 감소하였다.
- [0707] 밀 및 보리의 *NCED1* 및 *NCED2* 유전자를 표적화하는 LedRNA
- [0708] 식물에서, 식물 호르몬 아브시스산(ABA)은 9-시스 크산토티올을 크산토티올로 절단하는 효소 9-시스 에폭시-카로티노이드 디옥시게나제(NCED)에 의해 촉매되는 합성 경로에서의 제1 전용 단계로 카로티노이드 전구체로부터 합성된다(Schwartz et al., 1997). 호르몬 ABA는 종자에서 휴지기를 촉진할 뿐만 아니라(Millar et al., 2006) 다른 공정, 예컨대 스트레스 반응에도 관여되는 것으로 알려져 있다. NCED 유전자의 발현 증가는 ABA 농도를 증가시키며 이에 따라 휴지기를 촉진하는 것으로 여겨졌다. 곡류, 예컨대 밀 및 보리에는, 별도의 상동성 유전자에 의해 인코딩되는, NCED1 및 NCED2로 명명된 2개의 NCED 동종효소가 존재한다.
- [0709] ABA의 분해를 위해, 효소 ABA-8-하이드록실라제(ABA8OH-2, CYP707A2로도 알려져 있음)는 그 대사에서 하나의 단계로서 ABA를 하이드록실화하여 휴지기 파괴 및 종자 발아를 일으킨다.
- [0710] 보리 호르데움 불가레에서 HvNCED1(접근 번호 AK361999, SEQ ID NO:109) 또는 HvNCED2(접근 번호 AB239298; SEQ ID NO:110)를 인코딩하는 유전자 및 밀에서 대응하는 상동성 유전자를 표적화하는 LedRNA 작제물을 보리 및 밀 식물에서의 트랜스제닉 발현을 위해 설계하였다. 이들 작제물은 밀 및 보리 *NCED1* 및 *NCED2* 유전자의 고도 보존 영역을 사용하였고, 밀 및 보리 뉴클레오티드 서열은 보존된 영역에서 약 97% 동일하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). SEQ ID NO:109의 뉴클레오티드 435-1035에 대응하는 표적 영역은 602개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 602 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이고, SEQ ID NO:110의 뉴클레오티드 435-1035에 대응한다. NCED1 및 NCED2 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:111 및 112로 제공한다.
- [0711] 유사한 방식으로, 밀 트리티쿰 애스티쿰 및 보리 호르데움 불가레의 ABA-OH-2 유전자(접근 번호 DQ145933, SEQ ID NO:113)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 제조하였다. SEQ ID NO:113의 뉴클레오티드 639-1238에 대응하는 표적 영역은 600개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 600 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:113의 뉴클레오티드 639-1238에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:114로 제공한다.
- [0712] ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 발생 중인 종자에서를 포함하여 대부분의 조직에서 구성적으로 발현되는 *Ubi* 유전자 프로모터의 제어 하에 발현 벡터 내로 삽입하였다. 발현 카세트를 절제하고 이원성 벡터 내로 삽입하였다. 이들을 사용하여 형질전환된 밀 식물을 생성하였다.
- [0713] 트랜스제닉 밀 식물을 성숙하도록 성장시키고, 이들로부터 종자를 수득하여 *NCED* 또는 *ABA-OH-2* 유전자의 발현 감소에 대해 그리고 감소된 유전자 발현에 대응하는 난알 휴지기에 있어서의 효과에 대해 분석한다. 변경된 휴지기 정도에 있어서 다양한 표현형이 예상된다. 변경된 표현형 정도를 조정하기 위해, 이중-가닥 RNA 영역에 G:U 염기쌍을 갖는 ledRNA, 특히 이중-가닥 영역에서 뉴클레오티드의 총수의 백분율로서, ledRNA의 이중-가닥 영역 뉴클레오티드의 15% 내지 25%가 G:U 염기쌍에 관여되는 ledRNA의 발현을 위해 변형 유전 작제물을 생성하였다.
- [0714] 아라비도시스 탈리아나의 *EIN2* 유전자를 표적화하는 LedRNA
- [0715] 실시예 10에 기재된 바와 같이, 아라비도시스 탈리아나의 *EIN2* 유전자는 에틸렌 인지에 관여되는 수용체 단백질을 인코딩한다. *EIN2* 돌연변이체 묘목은 ACC 상에서 발아된 경우, 야생형 묘목 대비 하배축 신장을 나타낸다. 유전자가 종자 발아 직후 묘목에서 발현되는 경우, 트랜스제닉 수단에 의한 ledRNA의 전달은 사전형성된 RNA의 외인성 전달 대비, *EIN2*의 하향조절 정도의 평가를 위해 가장 적합한 접근으로 간주되었다.

- [0716] 표적 유전자 mRNA의 400개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는, 아라비도시스 탈리아나의 *EIN2* 유전자를 표적화하는 *ledRNA* 작제물(SEQ ID NO:115)을 설계하였다. 아라비도시스 탈리아나 식물에서 *ledRNA* 를 발현하기 위해 35S 프로모터를 포함하는 벡터 내로 *ledRNA* 를 인코딩하는 서열(SEQ ID NO:116)을 삽입하여 작제물을 제조한다. QPCR에 의한 *EIN2* 유전자의 발현 감소에 대해 그리고 ACC의 존재 하에 하배축 길이를 검정을 위해 트랜스제닉 아라비도시스 탈리아나 식물을 생성하고 평가한다. *EIN2* 발현 수준의 감소 및 하배축 길이의 증가가 일부 트랜스제닉 라인 식물에서 관찰된다.
- [0717] 아라비도시스 탈리아나의 CHS 유전자를 표적화하는 *LedRNA*
- [0718] 식물에서 칼콘 신타아제(CHS) 유전자는 플라보노이드 생합성에서 첫 번째 전용 효소인, 4-쿠마로일-CoA 및 말로닐-CoA의 나링게닌 칼콘으로의 전환을 촉매하는 효소를 인코딩한다. 클라보노이드는 방어 기전 및 스트레스 반응성에 관여되는, 식물에서 주로 확인되는 유기 화합물의 하나의 클래스이다.
- [0719] 표적 유전자 mRNA의 338개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는, 아라비도시스 탈리아나의 *CHS* 유전자(SEQ ID NO:117)를 표적화하는 *ledRNA* 작제물을 설계하였다. 아라비도시스 탈리아나 식물에서 *ledRNA* 를 발현하기 위해 35S 프로모터를 포함하는 벡터 내로 *ledRNA* 를 인코딩하는 DNA 서열(SEQ ID NO:118)을 삽입하여 작제물을 제조한다. 트랜스제닉 아라비도시스 탈리아나 식물을 이원성 벡터에서 유전 작제물로의 형질전환에 의해 생성하고 QPCR에 의해 *CHS* 유전자의 발현 감소에 대해 그리고 플라보노이드 생성 감소에 대해 평가한다. *CHS* 발현 수준의 감소 및 플라보노이드의 수준 감소가 일부 트랜스제닉 라인 식물에서, 예를 들어 트랜스제닉 종자의 종자 껍질에서 관찰된다.
- [0720] 루피누스 앵구스티폴리우스의 *LanR* 유전자를 표적화하는 *LedRNA*
- [0721] 좁은-잎을 가진 루핀인 루피누스 앵구스티폴리우스 L.의 *LanR* 유전자는 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 의해 유도되는 바이러스 질병에 대한 내성을 부여하는, 담배 *N* 유전자와 서열이 관련되는 폴리펩타이드를 인코딩한다.
- [0722] 루피누스 앵구스티폴리우스의 *LanR* 유전자(접근 번호 XM_019604347, SEQ ID NO:119)를 표적화하는 *ledRNA* 분자를 생성하기 위한 키메라 DNA를 설계하고 제조하였다. 상술된 *ledRNA* 에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). *ledRNA* 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:120으로 제공한다. *ledRNA* 를 시험관내 전사에 의해 생성하고, 정제하고, 농축하였고, RNA의 분취물을 *LanR* 유전자를 함유하는 루피누스 앵구스티폴리우스 식물의 잎에 적용한다. 바이러스 샘플을 처리 및 미처리 식물에 적용하고, 질병 증상을 수일 후 비교하였다.
- [0723] 밀에 대한 춘화처리 반응성을 부여하는 *VRN2* 유전자를 표적화하는 *LedRNAi*
- [0724] 밀 ZCCT1 유전자(Genbank 접근 번호 AAS58481.1)의 상동체인 TGACv1_스캐폴드_374416_5AL, TGACv1_스캐폴드_320642_4BL 및 TGACv1_스캐폴드_342601_4DL에서 확인된 바와 같은 밀 VRN2A, VRN2B 및 VRN2D 후보 유전자를 *ledRNAi* 작제물의 설계를 위한 표적으로서 확인하였다. VRN2B 유전자의 309 bp 영역을 *LedTaVRN2* 로 명명되는 *ledRNAi* 작제물의 dsRNA 영역에 사용하였다. *Led RNAi* 를 T7 RNA 폴리머라제를 이용하여 시험관내 전사에 의해 생성하고, 물에 희석하였다. 4 °C에서 3 일 동안 발아를 위해 용액을 사용하여 밀 난알을 흡수팽윤시켰다. 춘화처리 민감성 밀 변종 CSIRO W7의 종자를 사용하였다. 처리된 종자를 토양에 심고, 생성된 식물을 무성 성장에서부터 꽃 발달로의 전이에 대하여 시간 경과에 따라 관찰하였다. 부트로부터의 이삭의 출현에 의해 지시되는 바와 같은 개화 시점, 및 개화 시점에 주경의 잎의 개수를 기록하였다. *LedTaVRN2* 과 인큐베이션된 종자로부터 유래된 식물은 단독의 완충액 또는 비-특이적 dsRNA 대조군과 인큐베이션된 종자로부터 유래된 식물보다 평균 적어도 17 일 이르게 개화하였다. 또한, *LedTaVRN2* 와 인큐베이션된 종자로부터 유래된 식물은 개화 시점에 주경에서 평균 2.3 개 더 적은 잎을 가져서, 잎 생성에 더 적은 노드가 제공되고 꽃/난알에 더 많은 노드가 제공되었음을 시사하였다.
- [0725] 실시예 19. 곤충 유전자를 표적화하는 RNA 작제물
- [0726] 도입
- [0727] 진디는 식물 수액의 섭취를 통해 직접적으로 그리고 일부 경우에는 식물에서 질병을 유도하는 다양한 바이러스 전파를 통해 간접적으로 식물에 실질적인 그리고 때때로 중증의 손상을 유도하는 수액-흡입 곤충이다. 일부 경우에서 Bt 독소가 섭식성 곤충으로부터 작물 식물을 보호하는 데 효과적이었던 반면, 이는 일반적으로 수액-흡입 곤충에 대해서는 효과적이지 아니었다. 내성 유전자를 함유하는 식물 품종의 사용은 진디를 방제하는 효과적인 방식일 수 있다. 그러나, 대부분의 내성 유전자가 소경 진디 종 또는 생물형에 고도로 특이적이고 유전적 또

는 후생적 변화를 통한 새로운 생물형의 신속한 진화에 기인하여 내성이 빈번하게 극복된다. 또한, 내성 유전자는 여러 작물에서 이용 불가능하거나 소정의 일반 진디 중, 예컨대 광범위한 숙주 종을 감염시키는 복숭아혹 진디에 대해서는 존재하지 않을 수 있다. 진디는 현재 주로 살충제의 빈번한 적용을 통해 제어되며 이는 진디에서의 살충제 내성을 야기했다. 예를 들어, 모든 다른 등록 살충제에 대한 내성을 획득하게 되었으므로, 작용 그룹의 하나의 살충 방식만 호주에서 복숭아혹 진디에 대해 효과적으로 남아있다.

[0728] RNAi-매개 유전자 침묵화는 소수의 연구에서 여러 진디 종에서 연구 도구로서 유용한 것으로 나타났으나(리뷰를 위해서는 문헌[Scott et al., 2013; Yu et al., 2016]을 참고), 식물을 진디 공격으로부터 효과적으로 보호하는 것으로 나타나지 않았다. 이들 연구에서, 진디 성장 및 발생, 감염 또는 섭취 공정에 관여되는 핵심 유전자를 표적화하는 dsRNA를 진디로의 직접적 주사를 통해 또는 dsRNA를 함유하는 인공 식이에 대한 진디의 섭취에 의해 전달하였다.

[0729] 변형 RNAi 분자, 예컨대 본원에서 기재되는 ledRNA 분자의 수액-흡입 곤충의 제어에 대한 가능성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 몇몇 이유로, 모델 수액-흡입 곤충으로서 복숭아혹 진디(마이주스 페르시케)를 선택하였다. 먼저, 복숭아혹 진디는 세계적으로 주요 난알 및 원에 작물을 포함하는 광범위한 숙주 식물 종을 감염시키는 잡식성 곤충이다. 두번째로, 복숭아혹 진디는 일부 강력한 바이러스, 예컨대 일부 유채 성장 지역에 고도로 손상을 입혀왔던 서부 사탕무 황화 바이러스(Beet Western Yellow Virus)의 전파에 관여된다. 상기 연구를 위해 2개의 진디 유전자를 하향조절을 위한 표적 유전자로 초기에 선택하였으며, 하나는 핵심 효소기 단백질(C002)을 인코딩하고 제2 유전자는 활성화 단백질 키나제 C의 수용체(Rack-1)를 인코딩한다. C002 단백질은 그 숙주 식물 상에서 진디 섭취를 위해 필수적인 진디 침샘 단백질이다(Mutti et al., 2006; Mutti et al., 2008). Rack1은 신호 전달 캐스케이드에 주로 관여되는 효소인 활성화된 단백질 키나제 C에 결합하는 세포내 수용체이다(McCahill et al., 2002; Seddas et al., 2004). MpC002는 진디 침샘에서 우선적으로 발현되며 MpRack1은 내장에서 우선적으로 발현된다. 이전 연구에서, 직접적 주사 또는 인공 식이 섭취를 통한 RNAi의 사용은 평가된 몇몇 진디 종의 사멸을 야기하였다(Pitino et al., 2011; Pitino and Hogenhout, 2012; Yu et al., 2016).

[0730] 물질 및 방법: 진디 배양 및 식물 물질

[0731] 복숭아혹 진디(마이주스 페르시케)를 서호주에서 수집하였다. 각각의 실험 전에, 진디를 곤충실에서 주변 광 하에 무 식물(라파누스 사티부스(*Raphanus sativus*) L.) 상에서 키웠다. 진디를 미세한 페인트브러시로 실험 인공 식이 우리로 옮겼다.

[0732] 진디 섭취를 위한 인공 식이 성분은 문헌[Dadd and Mittler (1966)]에 기재된 바와 동일하였다. 진디 인공 식이를 위해 사용된 장치는 1 cm 지름 및 1 cm 높이를 갖는 플라스틱 튜브를 사용하였다. ledRNA를 포함하거나 포함하지 않는 인공 진디 식이 100 μ l를 2층의 파라필름 사이에 밀봉하여 식이 사체트를 생성하였다. 그 사체트 상부에, 연신된 파라필름의 상층을 통해 스타일렛으로 구멍을 뚫어 진디가 주변으로 이동하고 식이를 섭취할 수 있도록 챔버를 놓았다. 미세한 페인트 브러시를 사용해서 8마리의 제1령 또는 제2령 약충을 진디 챔버로 온건하게 옮겼다. 실험은 20°C의 성장 캐비닛에서 수행하였다.

[0733] 하나의 실험에서 사용된 담배 및 무 잎을 22°C에서 16시간 명/8시간 암 주기 하에 토양에서 성장시킨 식물로부터 수집하였다. 절제된 무 잎을 수반하는 실험의 경우, 줄기의 단편(약 2 cm 길이)에 붙은 작은 무 잎(2~4cm²)을 절제하였다. 잎을 신선하게 유지하기 위해, 5 cm 직경의 페트리 디쉬에서 물 100 ml 당 1.5 g 박토 아가(Bacto Agar) 및 1.16 g 아쿠아졸(Aquasol)을 포함하는 배지에 줄기를 삽입하였다. 진디를 미세한 페인트 브러시를 이용하여 잎으로 옮겼다. 잎 및 진디가 있는 페트리 디쉬를 20°C에서 16 시간 명/8 시간 암 주기 하에 성장 캐비닛에서 유지시켰다.

[0734] 이중 가닥 RNA(dsRNA)를 표준 방법을 이용하여 하나 이상의 T7 프로모터 및 T7 RNA 폴리머라제를 포함하는 DNA 주형의 시험관내 RNA 전사에 의해 제조하였다.

[0735] MpC002 및 MpRack-1 유전자 및 LedRNA 작제물

[0736] 표적 유전자로 평가된 복숭아혹 진디 MpC002 및 MpRack-1 유전자는 문헌[Pitino et al. (2011; 2012)]에 기재된 바와 동일하였다. 두 유전자의 DNA 서열을 NCBI 웹사이트, MpC002(>MYZPE13164_0_v1.0_000024990.1 | 894 nt) 및 MpRack-1(>MYZPE13164_0_v1.0_000198310.1 | 960 nt)로부터 입수하였다. 두 유전자의 cDNA 서열을 본원에서 SEQ ID NO: 123 및 124로 제공한다. LedRNA 작제물을 이전 실시예에 기재된 바와 동일한 방식으로 설계하였다. 본원에서 SEQ ID NO:125 및 126으로 제공하는 ledRNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열을 전사 주형으로 사용하여 ledRNA를 합성하였다. MpC002 및 MpRack-1 유전자를 표적화하는 ledRNA 분자를 인코딩하는 벡터 DNA를 시

협관내 RNA 전사를 위한 플라스미드 DNA의 제조를 위해 대장균 균주 DH5 α 내로, 그리고 생체내(박테리아 내) 전사를 위해 대장균 균주 HT115 내로 도입하였다.

[0737] 진디 수행능력 감소에 대한 *ledRNA* 분자의 효능

[0738] *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자를 표적화하는 *ledRNA*가 진디 수행능력에 영향을 미쳤는지 여부를 조사하기 위해, 각각의 *ledRNA*를 실시예 1에 기재된 바와 같은 인공 식이 방식을 통해 진디에 전달하였다. 각각의 실험에서 10개의 생물학적 반복물을 설정하였다; 각각의 생물학적 반복물은 복숭아혹 진디의 8마리 제1령 내지 제2령 약충을 가졌다. 각 실험에서의 대조군은 동등한 농도의 무관한 *ledRNA*, 즉 *ledGFP*를 사용하였다.

[0739] 더 낮은 농도인 50 ng/ μ l의 각각의 *ledRNA* 분자로, *MpC002* 또는 *MpRack-1* *ledRNA*를 함유하는 인공 식이로부터의 섭취 후 진디 생존은 대조군 *ledGFP*와 유의미하게 상이하지 않았다. 그러나, *MpC002* 유전자를 표적화하는 *ledRNA*는 복숭아혹 진디의 번식률을 유의미하게 ($P < 0.05$) 감소시켰다(도 37a). 성체 진디 당 생성된 약충의 평균 수는 대조군 *ledRNA*를 갖는 대조군 식이 상에서 유지된 성체로부터 생성된 약충의 수에 비해 약 75%만큼 감소하였다. 더 높은 농도인 200 ng/ μ l에서, *MpC002* 또는 *MpRack-1*을 표적화하는 *ledRNA*는 성체 진디 사망률을 증가시켰다(도 37b). *MpC002* 또는 *MpRack-1* *ledRNA*를 포함하는 식이 상에서 진디 생존 감소가 또한 24시간 후 관찰되었고, 5일의 실험 기간에 걸쳐 계속되었다. 결과는 필수 진디 유전자를 표적화하는 *ledRNA*의 사용이 진디의 사망을 유도하고 진디 번식을 감소시킬 수 있음을 시사하였다. 각각의 *ledRNA*의 효능을 표적 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 분리되었으나 어닐링된 센스 및 안티센스 RNA 가닥으로 구성된 이중-가닥 RNA(dsRNAi)와 비교한다.

[0740] 진디에 의한 *ledRNA* 분자의 흡수

[0741] 진디 내부에서의 *ledRNA*의 흡수 및 분포를 추적하기 위해, *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자를 표적화하는 *ledRNA*를 실시예 1에 기재된 합성 공정 동안 Cy3(시아닌-염료 표지 뉴클레오티드 트리포스페이트)로 표지하였다. Cy3 표지화는 통상적인 dsRNA 분자의 생물학적 기능에 대해 효과를 갖지 않음이 보고되었고 이에 따라 형광에 의한 검출용 표지로서 사용될 수 있었다. 표지된 *ledRNA*를 섭취한 진디를 Leica EL 6000 마이크로시스템 기구를 사용하여 공초점 현미경을 사용해서 조사하였다. *MpC002* 또는 *MpRack-1*을 표적화하는 Cy3-표지 *ledRNA*는 인공 식이에 대한 섭취 수 시간 내에 진디 내장에서, 이후 생식계에서, 심지어 섭취 성체의 자손인 신생 약충에서도 검출 가능하였다. 결과는 소화계 기능 또는 생식을 위해 중추적인 진디 유전자가 섭취를 통해 *ledRNA* 분자에 대한 효과적인 표적일 수 있음을 시사하였다.

[0742] *LedRNA* 안정성

[0743] 식이에서 그리고 섭취 진디로부터 회수된 *ledRNA*의 안정성을 조사하기 위해, 표지된 *ledRNA* 분자를 함유하는 식이에 대한 섭취 후 인공 식이로부터 및 진디 단물로부터 RNA를 회수하였다. RNA 샘플을 겔 상에서 전기영동하고 형광 검출에 의해 조사하였다. 섭취 전 *ledMpC002* RNA는 아가로스 겔 상에서 약 700 bp의 단일 산물을 명확히 나타내었다. 인공 식이로부터 회수된 RNA는 100 bp 내지 700 bp 크기의 RNA 도말을 나타내어, 25일 동안 실온에서 식이에 노출된 후 일부 분해를 시사하였으나, 여전히 대부분 온전하였다. 진디 단물로부터 회수된 RNA는 350 bp 내지 700 bp의 RNA 범위에서 형광을 나타내었고, 역시 대부분 온전하였다. 일부 *ledRNA*의 분해에도 불구하고, 상당 비율의 *ledRNA* 분자가 상당한 시기 동안 인공 식이에서 그리고 또한 진디 단물에서 온전하게 유지될 수 있었다. *ledRNA* 분자의 이러한 안정성 정도는 *ledRNA*가 외인적으로 적용될 때 활성이 있도록 하고 활성을 유지할 수 있도록 할 것이다.

[0744] 식물 잎에 의한 표지 *ledRNA*의 흡광도

[0745] Cy3-표지 *ledMpC002* RNA가 잎 조직을 침투할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 이를 담배 잎의 상부 표면 상에 페인팅하였다. 10마이크로리터의 Cy3-표지 *ledMpC002*(1 μ g/ μ l 농도)를 2 cm 지름의 원으로 페인팅하고 적용 영역을 검은색 마커 펜으로 표시하였다. 525 nm의 여기에서 잎 형광 이미지를 Leica EL 6000 마이크로시스템 기기를 사용하여 5시간의 기간에 걸쳐 포착하고, 페인팅된 조직을 페인팅되지 않은 조직과 비교하였다. Cy3 표지는 적용 1시간 이내에 엽육 조직에서 명확히 검출 가능하였고, 이에 따라 잎 표면 상의 왁스성 큐티클층을 통해 명확히 침투하였다. 2시간째에 형광 수준이 증가하였고 5시간 시점까지 유지되었다. *ledRNA* 분자가 세포 내로 또는 세포의 핵 내로 들어갔는지 여부는 명확하지 않았다. 그러나, 수액-흡입 곤충이 식물 잎 및 줄기의 체관부 체 요소로부터 특이적으로 영양을 섭취하므로, 진디 유전자의 침묵화를 위해 식물 세포 내로의 RNA 수송이 요구되지는 않았다. 실험은 *ledRNA* 분자가 국소 적용을 통해 식물 조직에서 확인됨을 시사하였다.

[0746] 진디의 국소 *ledRNA* 흡수

[0747] 진디가 식물로부터 국소 적용된 *ledRNA*를 흡수할 수 있었는지 여부를 확인하기 위해 Cy3-표지 *ledGFP* RNA를 무 잎 상에 페인팅하였다. 10 마이크로리터의 각 Cy3-표지 *ledGFP*(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도)를 작은 절제된 무 잎($\sim 2\text{ cm}^2$) 상에 페인팅하였다. 대조군 잎을 동일한 양의 비표지 *ledGFP*로 페인팅하였다. 표지 및 대조군 무 잎을 각각 다양한 발생학적 단계의 8 마리의 진디로 감염시켰다. 잎 및 진디 형광의 이미지를 담배 잎에 대한 상술된 방법을 이용하여 포착하였다. 대조군 잎 및 진디에서 검출 가능한 형광은 없었지만, Cy3 표지 *ledGFP*로 페인팅된 잎은 매우 형광이었다. Cy3-표지 *ledRNA*를 갖는 잎의 섭취 후 24 시간 이내에, 진디는 몸 전체에서 강한 형광을 나타내며, 다른 신체 부위보다 내장 및 다리에서 더 두드러졌다. 실험은 진디가 국소 적용을 통해 식물로부터 *ledRNA* 분자를 흡수할 수 있었음을 시사하였다.

[0748] 추가 진디 *RNAi* 표적 유전자의 스크리닝

[0749] 더 많은 진디 표적 유전자를 확인하기 위해, 총 16개의 진디 유전자를 *RNAi* 표적으로서 이들의 적합성에 대하여 평가하였다. 선택된 후보 유전자는 진디 발달, 번식, 섭취 또는 해독에 관여했다. 표적 유전자 mRNA의 영역에 대응하는 센스 및 안티센스 서열을 포함함으로써 각 유전자를 표적화하는 통상적인 dsRNA(dsRNAi)를 식이 μl 당 2 μg RNA의 농도로 진디 인공 식이에 보충하였다. 진디 생존 및 번식율에 대한 영향을 이용하여 진디 *RNAi* 표적 유전자의 적합성을 결정하였다. 조사된 16개의 유전자 중, 9개의 유전자가 진디 생존 및/또는 번식율의 감소를 나타냈다. MpC002 및 MpRack-1 외에, 다른 적합한 표적 유전자는 다음 폴리펩티드 및 이들이 진디에서 갖는 기능의 유형을 인코딩하는 유전자였다: 튜블린(접근 번호 XM_022321900.1, 세포 구조), 인슐린-관련 펩타이드(XM_022313196.1, 배아 발달), V-형 ATP아제 E 서브유닛(XM_022312248.1, 에너지 대사), 겐 현치백(XM_022313819.1, 성장 및 발달), 탈피 촉발 호르몬(XM_022323100.1, 발달 - 탈피), 짧은 뉴로펩타이드 F(XM_022314068.1, 신경계) 및 류코키닌(XM_022308286.1, 수분 평형 및 먹이 섭취). 대부분의 유전자의 경우, *RNAi*의 영향은 생존에 대해서보다 진디 번식에 대해 더 확실하고 더 강한 것으로 보였다. 즉, 번식에 대한 효과가 더 컸다.

[0750] 진디에 대한 외인성 *RNAi*의 세대간 효과

[0751] *RNAi* 효과가 얼마나 오래 지속될 수 있었는지 조사하기 위해, 2 또는 3 령 발달 단계의 진디에게 10일 동안 MpC002, MpRack-1, MpGhb를 표적화하는 dsRNAi 또는 대조군 dsGFP가 보충된 인공 식이를 공급하였다. 생존한 진디를 이후 RNA 적용 없이 절제된 무 잎으로 옮겼다. 세 개의 유전자 모두의 경우, 6일까지, 생존한 진디 당 생성된 약충의 수는 대조군 dsGFP RNA 분자 또는 물이 공급된 진디에 대한 수보다 유의미하게 더 낮았다. MpC002 및 MpRack-1 dsRNA의 경우, 무 잎에 대한 더 낮은 번식율이 적어도 9일 동안 유지되었다. dsRNAi가 다음 세대에 영향을 주었는지 조사하기 위해, 무 잎에서 3일 이내에 태어나 RNA-함유 식이를 바로 섭취하지 않은 진디를 신선한 절제된 무 잎 상으로 이동시키고, 이들의 생존 및 생산율을 15일 동안 모니터링하였다. 생존율에는 유의미한 차이가 없었지만, MpC002, MpRack-1 또는 MpGh dsRNA가 있는 식이를 섭취한 모 진디로부터 태어난 진디는 모두 대조군 dsGFP 또는 물이 있는 식이를 섭취한 모 진디에 비해 유의미하게 더 적은 수의 진디를 생산하였다. 모 진디에 dsRNA 분자를 공급함으로써 야기되는 효과는 자손 진디에서 지속된 것으로 결론지어졌다.

[0752] 결론

[0753] 본 연구의 목표는 전세계에 걸친 문제인 수액-흡입 곤충 해충의 주요 그룹인 진디의 제어를 위해 *ledRNA* 설계를 사용하는 외인성 *RNAi*의 적용을 평가하고, 적합한 표적 유전자를 식별하는 것이다. 진디는 외인성 RNA를 가공하는 *RNAi* 기구를 보유하는 것으로 알려져 있다(Scott et al., 2013; Yu et al., 2016). 여기서는, MpC002 또는 MpRack-1 유전자를 표적화하는 *ledRNA* 분자를 함유하는 인공 식이를 통한 경구 전달이 진디 사망률을 유도하고 진디의 번식을 감소시킬 수 있었다. 분자를 하나의 유전자는 효과기 단백질 C002를 인코딩하며 다른 하나의 유전자는 복숭아혹 진디(마이주스 페르시케)의 섭취 및 발생을 위해 필수적인, 활성화 단백질 키나제 수용체(Rack-1)를 인코딩하는 2개의 상이한 표적 유전자에 대해 평가하였다. 50 ng/ μl 만큼 낮은 농도로 인공 식이에 첨가되는 경우, 이들 유전자를 표적화하는 *ledRNA* 분자는 진디 번식을 유의미하게 감소시켰다. 더 높은 농도인 200 ng/ μl 에서, *ledRNA*는 또한 진디 사망률을 증가시켰다. *ledRNA* 흡수를 Cy3 표지화를 사용하여 연구했을 때, *ledRNA* 분자는 인공 식이에 대한 흡수 수 시간 내에 진디 내장에서, 그리고 이후 생식계에서, 심지어 섭취 성체의 자손인 신생 약충에서 관찰되었다. 진디 번식에 대한 *ledRNA* 효과는 전형적인 dsRNA로의 결과에서 시사된 바와 같이 적어도 두 세대 동안 지속될 수 있다.

[0754] 또한 *ledRNA* 분자가 적어도 3.5주 동안 인공 식이에서 대부분 온전하게 유지되는 것으로 나타났다. 대부분 온전

한 ledRNA 분자는 진디의 배출 산물인 진디 단물에서도 확인되었다. 표지 ledRNA를 식물 잎 상으로 적용한 경우, 이는 진디가 영양을 섭취받는 체관부 내로 들어갈 수 있었으며 진디에서 검출될 수 있었다. 이들 결과는 함께, ledRNA가 식이를 통한 외인성 전달에 의한 것을 포함하여, 진디 및 다른 수액-흡입 곤충의 제어를 위해 사용될 가능성이 높음을 시사하여, 진디 및 다른 수액-흡입 곤충의 관리를 위한 실제적인 접근을 제공하였다. 이들 RNA 분자는 또한 진디 및 다른 수액-흡입 곤충을 제어하기 위해, 체관부 조직에서 RNA의 합성을 선호하는 프로모터를 사용하여, 트랜스제닉 식물에서 발현될 수 있다. 또한, 분자의 dsRNA 영역에서 10% 내지 30% G:U 염기쌍을 포함하는 ledRNA[G:U] 또는 헤어핀[G:U] RNA의 사용은 이들 분자를 인코딩하는 트랜스유전자의 감소된 자가-침묵화를 통해 이들 dsRNA 분자의 축적 수준의 증가를 기초로 할 때 훨씬 더 우수한 방제를 제공하는 것으로 예상된다.

[0755] **실시예 20. 다른 곤충 유전자를 표적화하는 RNA 작제물**

[0756] 곤충 해충의 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0757] 헬리코베르파 아르미게라는 목화씨 유충(cotton bollworm) 또는 옥수수 귀벌레(corn earworm)로도 알려져 있는, 나비목의 곤충 해충이다. 헬리코베르파 아르미게라의 유충은 여러 중요한 경작 작물을 포함하는 광범위한 식물 상에서 영양을 섭취하고 매년 수십 억 달러에 해당하는 상당한 작물 손상을 유도한다. 유충은 목화, 옥수수, 토마토, 병아리콩, 비둘기콩, 알팔파, 쌀, 수수 및 동부를 포함하는 광범위한 식물 중 상에서 영양을 섭취할 수 있는 다식성의 보편적 해충이다.

[0758] 헬리코베르파 아르미게라 ABC 트랜스포터 white 유전자(ABCwhite)를 곤충 유충에서 ledRNA 및 ledRNA(G:U) 작제물을 평가하기 위해 쉽게 검출되는 표현형을 가지는 표적 유전자로서 선택하였다. ABC 트랜스포터는 ATP 결합 카세트(ATP Binding Cassette) 트랜스포터 슈퍼패밀리에 속한다 - 예를 들어, 54개의 상이한 ABC 트랜스포터 유전자가 헬리코베르파 게놈에서 확인되었다. ABC 트랜스포터는 막을 통해 임의의 하나 이상의 광범위한 분자를 운반하는 막-결합 단백질을 인코딩한다. 이 단백질은 막을 통해 분자를 수송하기 위해 ATP 가수분해에 의해 방출되는 에너지를 사용한다. 일부 ABC 트랜스포터는 목화씨 유충, 헬리코베르파 아르미게라에서의 식물 이차 대사물질의 분해에 연루되었다(Khan et al., 2017). ABCwhite 단백질은 눈에서 오모발색단 및 프테리딘 경로 전구체를 색소 과립 내로 수송하며 녹아웃 돌연변이체는 흰색 눈을 나타낸다.

[0759] ABCwhite 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:127(접근 번호 KU754476)로 제공한다. ledRNA가 유충 식이에서 RNA의 외인성 전달에 의해 ABCwhite 유전자 발현을 감소시킬 수 있었는지를 평가하기 위해, 이 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). 표적 영역은 SEQ ID NO:127의 뉴클레오타이드 496~1097에 대응하는 603개 뉴클레오타이드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 603 bp길이였다; dsRNA 영역에서의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:127의 뉴클레오타이드 496~1097의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:128로 제공한다. 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0760] ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 ledRNA 코딩 영역의 하류를 절단하는 제한 효소 SnaBI로 소화시키고, 전사 키트를 이용해서 지침에 따라 RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하였다. RNA를 인공 식이에 첨가하고, 헬리코베르파 아르미게라 유충에 제공한다.

[0761] 이중-가닥 줄기에 G:U 염기쌍을 갖는 대응하는 ledRNA 작제물을 제조하고 정규모 염기쌍을 형성한 ledRNA와 비교한다.

[0762] 개미에서의 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0763] 일반적으로 아르헨티나 개미로 알려져 있는 리네피테마 휴밀레는 몇몇 대륙에 널리 퍼져있는 곤충 해충이다. 페로몬 생합성 활성화 뉴로펩타이드(PBAN) 뉴로펩타이드-유사(LOC105673224)를 인코딩하는 리네피테마 휴밀레 유전자를 페로몬에 의한 곤충 간 커뮤니케이션에 관여되는, 표적 유전자로서 선택하였다.

[0764] PBAN 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 SEQ ID NO:129(접근 번호 XM_012368710)로 제공한다. ledRNA가 미끼 형태로 식이에서 RNA의 외인성 전달에 의해 PBAN 유전자 발현을 감소시킬 수 있었는지 여부를 평가하기 위해, 이 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). 표적 영역은 SEQ ID NO:129의 뉴클레오타이드 136~675에 대응하는 540개 뉴클레오타이드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 540 bp길이였다; dsRNA 영역에서의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:129

의 뉴클레오티드 136~675의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:130으로 제공한다. 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0765] ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 ledRNA 코딩 영역의 하류를 절단하는 제한 효소 *Sna*BI로 소화시키고, 전사 키트를 이용해서 지침에 따라 RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하였다. RNA를 리네피테마 휴밀레 개미 내로의 경구 전달을 위해 옥수수 분말 상에 코팅한다.

[0766] 루실리아 쿠프리나의 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0767] 루실리아 쿠프리나는 보다 일반적으로 호주 양 금파리로 알려져 있는 곤충 해충이다. 이는 금파리과 (Calliphoridae)에 속하며, 곤충 쌍시목의 구성원이다. 5개의 표적 유전자, 즉 루실리아 쿠프리나의 V-유형 양성자 ATP아제 촉매성 서브유닛 A(접근 번호 XM_023443547), RN아제 1/2(접근 번호 XM_023448015), 키틴 신타아제(접근 번호 XM_023449557), 액디슨 수용체(EcR; 접근 번호 U75355) 및 감마-튜불린 1/1-유사(접근 번호 XM_023449717)를 인코딩하는 유전자를 ledRNA 작제물로의 평가를 위해 선택하였다. 각각의 유전 작제물을 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). 각각의 경우에서, 표적 영역은 약 600개 뉴클레오티드 길이였고 dsRNA 영역에서의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었다. *ATP아제-A* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:131로 제공한다. RN아제 1/2 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:132로 제공한다. 키틴 신타아제 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:133으로 제공한다. *EcR* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:134로 제공한다. 감마-튜불린 1/1-유사 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:135로 제공한다. 각각의 작제물에서, 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0768] **실시예 21. 안정적으로 형질전환된 식물에서 고수준으로 축적되는 트랜스유전자-유래 ledRNA**

[0769] GUS 리포터 유전자 또는 *아라비도시스 탈리아나* EIN2 유전자로부터 mRNA를 표적화하는 ledRNA 서열을 인코딩하는 DNA 단편을 합성하고 pART7로 클로닝하여 식물 세포에서의 발현을 위한 p35S:ledRNA:0cs3' 폴리아데닐화 영역/종결자 발현 카세트를 형성하였다. 그런 다음 단편을 *Not*I로 절제하고 pART27의 *Not*I 부위 내로 삽입하여 식물 형질전환을 위한 ledGUS 및 ledEIN2 벡터를 형성하였다. 563 bp dsRNA 줄기 및 1113 nt 루프를 갖는 긴 hpRNA를 생성하도록 설계된 기존 hpGUS 작제물 및 ledGUS 작제물을 *아그로박테리움*-매개 형질전환법에 의해 GUS-발현 *엘. 타바쿰* 라인 PPGH24로 개별적으로 도입하였다. 강력한 GUS 침묵화를 나타내거나 GUS 활성의 분명한 감소가 없거나 거의 없는 독립적 형질전환체로부터의 RNA 샘플을 노던 블롯 혼성화 검정에 사용하여 트랜스 유전자-인코딩 hpGUS 또는 ledGUS RNA를 검출하였다. 도 38에 나타난 바와 같이, ledGUS-형질전환 식물에서 hpGUS-형질전환 식물보다 강력한 GUS 침묵화를 나타내는 훨씬 더 강렬한 혼성화 신호가 검출되었다(도 38에서 "-"로 표시됨). 실제로, hpGUS RNA 샘플에 대한 대부분의 혼성화 신호는 대조군의 비형질전환 식물(WT)로부터의 RNA에 대해 또한 관찰된 비-특이적 배경 신호였다. 추측상 전장 ledRNA의 임의의 부분 가공으로 인해, ledGUS 라인에 대하여 여러 강렬한 혼성화 밴드가 관찰되었다.

[0770] ledGUS를 인코딩하는 유전자 작제물의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:5에 나타낸다. 뉴클레오티드 1 내지 17은 시험관내 RNA 합성을 위한 T7 RNA 폴리머라제 프로모터에 대응하고, 뉴클레오티드 18 내지 270은 GUS 안티센스 서열의 5' 절반에 대응하고, 뉴클레오티드 271 내지 430은 루프 1 서열에 대응하고, 뉴클레오티드 431 내지 933은 GUS 센스 서열에 대응하고, 뉴클레오티드 934 내지 1093은 루프 2 서열에 대응하고, 뉴클레오티드 1094 내지 1343은 GUS 안티센스 서열의 3' 절반에 대응한다.

[0771] 유사한 방식으로, ledEIN2 및 hpEIN2 작제물을 *아그로박테리움*-매개 형질전환에 의해 *Co1-0* 생태형의 *아라비도시스 탈리아나* 식물에 개별적으로 도입하였다. hpEIN2[wt] RNA를 인코딩하는 hpEIN2 작제물은 앞서 기재된 바와 같고, PDK 인트론에 의해 분리된 역방위 반복부 구성에서 200 bp 센스 및 안티센스 EIN2 서열을 함유하였다. ledEIN2를 인코딩하는 유전자 작제물의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:116에 나타낸다. 뉴클레오티드 37 내지 225는 EIN2 안티센스 서열의 5' 절반에 대응하고, 뉴클레오티드 226 내지 373은 루프 1 서열에 대응하고, 뉴클레오티드 374 내지 773은 EIN2 센스 서열에 대응하고, 뉴클레오티드 774 내지 893은 루프 2 서열에 대응하고, 뉴클레오티드 894 내지 1085는 EIN2 안티센스 서열의 3' 절반에 대응한다. 뉴클레오티드 37 내지 225(안티센스)는 뉴클레오티드 374 내지 573(센스)에 상보적이고, 뉴클레오티드 894 내지 1085(안티센스)는 뉴클레오티드 574 내지 773(센스)에 상보적이다.

- [0772] 일차 독립적 형질전환체로부터의 RNA 샘플을 노던 블롯 혼성화 분석에 사용하였다. 도 39에 나타난 바와 같이, ledEIN2 식물은 더 큰 RNA 분자에 대한 hpEIN2 식물보다 강렬한 혼성화 신호를 나타내어(도 39, 하부 패널), ledEIN2-유래 RNA가 hpEIN2-유래 RNA보다 큰 수준으로 축적되었음을 시사하였다. 20개 내지 25개 뉴클레오타이드 크기 범위의 가공된 RNA의 경우(siRNA), siRNA는 hpEIN2 식물에서 더 큰 존재비로 ledEIN2 식물에서 검출되었고(도 39, 하부 패널), siRNA의 양은 더 큰 RNA 분자의 존재비와 매우 상관 관계가 있었다. 이들 결과는 트랜스유전자-유래 ledRNA가 다이스에 의해 siRNA로 완전히는 아니지만 어느 정도 가공되었음을 시사하였다. 이는 또한 ledRNA 트랜스유전자가 대응하는 hpRNA 트랜스유전자보다 더 많은 siRNA를 생성하였음을 시사하였다.
- [0773] 이들 결과는 ledRNA 작제물이, 식물 세포에서 발현될 때, 대응하는 hpRNA 작제물보다 큰 수준의, 비가공된 및 가공된, 축적된 전사체를 야기했음을 시사하였다. 이는 ledRNA 분자의 안정성 증가에 대한 시사인 것으로 사료되었다.
- [0774] **실시예 22. 식물에서 원형 RNA의 효율적인 전구체인 헤어핀 RNA**
- [0775] 원형 RNA(circRNA)는 자유 5' 및 3' 말단 또는 3' 영역으로서 폴리아데닐화된 서열을 갖지 않는 공유 연결된 폐쇄된 원이다. 이들은 일반적으로 이들이 폴리캡타이드를 인코딩하지 않는다는 점에서 비-코딩이고, 따라서 번역되지 않는다. circRNA는 RN아제에 의한 소화, 특히 RN아제 R과 같은 엑소뉴클레아제에 비교적 내성이 있다. 바이러스 또는 바이로이드 기원의 또는 바이러스와 관련된 위성 RNA로서 circRNA는 식물 및 동물에서 오랫동안 관찰되어 왔다. 예를 들어, 식물에서 서브바이러스 RNA 병원체인 감자 갈죽병(Potato Spindle Tuber) 바이로이드는 대략 360 nt 크기의 원형 RNA 게놈을 갖는다. 식물에서, 이러한 위성 RNA는 흔히 헬퍼 바이러스의 존재에서 복제될 수 있다. 대조적으로, 바이로이드는 이들의 복제를 위해 내인성 식물 RNA 폴리머라제를 포함하는 숙주 기능에 전적으로 의존한다.
- [0776] 특수 설계된 생물정보학 툴과 함께 RNA 딥 시퀀싱 기법을 이용하여, 현재 수많은 circRNA가 식물 및 동물 게놈으로부터 확인되었다. 수천 개의 추정 circRNA는 조직-특이적 또는 생물적 및 비생물적 스트레스-반응성 발현 패턴을 나타내는 경향이 있는 *아라비도시스 탈리아나*, 쌀 및 대두를 포함하는 식물에서 확인되었지만, 식물에서 circRNA의 생물학적 기능(들)은 아직 입증되지 않았다. 다수의 추정 식물 circRNA의 조직-특이적 또는 스트레스 반응성 발현 패턴은 이들이 식물 발달 및 방어 반응에서 잠재적인 역할을 할 수 있음을 시사하지만, 이는 아직 입증되지 않았다.
- [0777] circRNA의 생물발생설에 대한 일치된 견해는 이들이 인트론 백-스플라이싱, 즉, 스플라이싱 기구 "백-스플라이스" 프리-mRNA에 의해 형성되고 스플라이싱된 엑손을 함께 공유 결합한다는 것이다. 따라서, 내인성 인트론 스플라이싱 기구는 circRNA 생물발생학의 현재 모델에 있어서 필수적이다. 이러한 생물발생학 모델은 주로 포유류 계에서의 연구에 기초하고, 여기서 대부분의 엑손 circRNA는 일치 GT/AG 인트론 경계 디뉴클레오타이드를 포함하는 정규 인트론 스플라이싱 신호를 함유하는 것으로 나타나 있다. 동물에서, 엑손 circRNA가 측면에 있는 인트론 영역은 흔히 전이성 인자 서열의 짧은 역방위 반복부를 함유하고, 이는 상보적 인트론 서열이 circRNA 형성을 촉진한다는 제시를 이끌어냈다. 실제로, 동물에서 circRNA를 발현하기 위한 벡터 시스템이 상보적 TE 반복부를 함유하는 스플라이싱 가능 인트론을 갖는 자연 발생 엑손-인트론 서열에 기초하여 개발되었다. 그러나, circRNA 형성에서 상보적 축적 서열의 역할은, 이러한 축적 인트론 서열을 갖는 확인된 엑손 circRNA의 비율이 *아라비도시스*에서 0.3% 내지 쌀에서 6.2%의 범위로 매우 낮기 때문에, 식물에서 여전히 불분명하다.
- [0778] 긴 헤어핀 RNA(hpRNA) 트랜스유전자는 식물에서 유전자 침묵화 또는 RNA 간섭을 유도하기 위해 널리 사용되어 왔다(Wesley et al., 2001). hpRNA 트랜스유전자 작제물은 전형적으로 센스 및 안티센스 서열을 분리하고 연결하는 이들 사이의 스페이서 서열과 함께 프로모터 서열을 기준으로 상보적 센스 및 안티센스 서열을 갖는 역방위 반복부로 구성된다. 스페이서는 또한 벡터 구성 동안 박테리아 세포의 DNA 플라스미드에서 역방위 반복부 구조를 안정화시킨다. 결과적으로, 전형적인 hpRNA 트랜스유전자로부터의 RNA 전사체는 염기쌍 센스 및 안티센스 서열의 이중-가닥(ds) 줄기 및 스페이서 서열에 대응하는 "루프"를 갖는 줄기-루프 구조를 형성하는 것으로 예상된다. 이러한 RNA 전사체는 또한 염기쌍 형성에 의해 어닐링하여 분자의 dsRNA 영역 또는 줄기 영역을 형성하는 센스 및 안티센스 영역의 능력때문에 자가-상보적 RNA로 지칭된다.
- [0779] *식물 세포에서 축적되고 RN아제 R에 내성이 있는 긴 hpRNA로부터의 루프 단편*
- [0780] 563 bp 센스 및 안티센스 서열 및 1113 bp 스페이서를 가지며, GUS mRNA를 표적화하는 긴 hpRNA를 인코딩하는 트랜스유전자를 제조하였다(도 40, GUShp1100). 93 bp 센스 및 안티센스 서열 및 93 bp 스페이서를 가지며, 동일한 GUS mRNA를 표적화하는 더 짧은 hpRNA를 인코딩하는 제2 트랜스유전자를 또한 제조하였다(GUShp93-1). 둘

모두의 작제물을 헤어핀 RNA의 전이성 발현을 위한 *니코티아나 벤타미아나* 잎 세포에 개별적으로 도입하고, 또한 안정적으로 통합되고 유전 가능한 트랜스유전자로서 발현을 위한 *아라비도시스 탈리아나* 식물을 형질전환시키는 데 사용하였다. 앞서 보고된 바와 같이, 둘 모두의 작제물은 식물 세포에서 도입되고 발현될 때 루프 서열에 대하여 예상된 크기의 별개의 RNA 단편을 생성하였다(도 41; 문헌[Wang et al., 2008]; 문헌[Shen et al., 2015]). 본 연구에서, 본 발명자들은 루프 서열이 원형 RNA로 전환되었는지 여부를 결정하고자 했다.

[0781] 더 짧은 hpRNA의 발현을 위한 35S 프로모터보다는 *아라비도시스* U6 프로모터를 갖는 제3 작제물을 제조하였다(GUShp93-2). 스페이서 서열로서 PDK 인트론을 포함한 제4 GUS hpRNA 작제물을 또한 제조하였다(도 40에서 GUShpPDK). 작제물은 헤어핀 RNA를 인코딩하였고, 여기서 인트론은 전사 후 스플라이싱되어 훨씬 더 짧은 루프 서열을 남기는 것으로 예상되었다. 이들 작제물을 또한 *니코티아나 벤타미아나* 잎에 도입하여 루프 서열이 검출될 수 있었는 지 여부 및 이들이 원형 RNA를 형성했는 지 여부를 검사하였다. 이들 작제물에서 dsRNA 줄기 및 루프 서열은 모두GUS 코딩 서열로부터 유래된 것이었고, 공지된 인트론 서열은 도입되지 않았다. 트랜스유전자 발현을 향상시키기 위해 바이러스 억제 단백질(VSP)로서 오이 모자이크 바이러스 2b 단백질을 인코딩하고 발현하는 유전 작제물과 함께, 표적 GUS-발현 작제물의 존재 또는 부재에서, *아그로박테리움-매개* 침윤을 이용하여 *니코티아나 벤타미아나* 잎에 개별적으로 작제물을 도입하였다. 노던 블롯 혼성화 검정을 이용하여 루프 단편의 축적 및 크기를 분석하였다. 대표적인 노던 블롯의 자가방사선촬영을 도 42에 나타낸다.

[0782] 도 42에 나타낸 바와 같이, GUShp1100의 긴 루프 단편은 앞서 보고된 바와 같이 *아그로박테리움-침윤* 샘플에서 용이하게 검출되었다(Shen et al., 2015). 이러한 루프 단편이 원형인지 시험하기 위해, RNA 샘플을 RN아제 R로 처리하고, 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동하였다. RN아제 R 처리에 20 μ l의 총 부피로 RN아제 R 완충액 및 물과 혼합된 10 μ g의 총 RNA(또는 50 ng의 시험관내 전사체)를 사용하였다. 혼합물을 3 분 동안 끓는 물에서 가열하고, 얼음 위에서 빠르게 냉각시킨 다음, 0.5 μ l의 RN아제 R을 첨가하고, 튜브를 37°C에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. 효소를 비활성화시키고, 잔류 RNA를 에탄올로의 침전에 의해 회수하였다. 겔 중 에티디움 브로마이드 염색 물질의 상당 감소에 의해 시사된 바와 같이, RN아제 R 처리에 의해 대부분의 RNA가 분해되었다(도 42, 하부 패널). 모든 RN아제 R 처리 검정에 의해서, 여러 리보솜 RNA 단편은 겔에서 육안상 남아 있어, RN아제 R에 대한 일부 RNA 종의 부분 내성을 시사하였다. RN아제 R-처리 샘플에서 총 RNA의 고갈에도 불구하고, 대략 1100 nt 루프 단편은, 미처리 샘플에 비해 양이 단지 약 24%만이 감소되어, 풍부하게 남아 있었다. 이는 루프 단편이 RN아제 R 소화에 비교적 내성이 있었고, 이에 따라 구조가 원형이었음을 시사하였다. 미처리 샘플에 비해 루프 RNA 양의 24% 감소는 상업적으로 입수된 RN아제 R 효소에서 엔도뉴클레아제 활성의 잔여량 또는 에탄올 침전 단계 동안 RN아제 R 소화후 RNA 회수의 감소에 기인하였다.

[0783] RN아제 R 처리 검정을 선형 RNA 대조군으로서 루프 서열에 대응하는 50 ng의 시험관내 전사 RNA를 포함시켜 반복하였다. 또한, RN아제 R 내성을 보다 엄격하게 시험하기 위해 hpGUS1100-침윤 *니코티아나 벤타미아나* RNA의 샘플을 2 라운드의 RN아제 R 처리로 처리하였다. 1회 RN아제 R 처리 후 GUShp1100-침윤 *니코티아나 벤타미아나* 잎으로부터의 루프 단편은 76%가 남은 반면, 선형 시험관내 전사체는 단지 약 8.5%만이 남은 것으로 관찰되었다. 2-배 RN아제 R 처리는 루프-유래 물질을 더 감소시켰지만, 이를 없애지는 않았다. 또한, 동일한 개수의 뉴클레오타이드를 갖는 선형 RNA 분자보다 더 느리게 겔 전기영동에서 이동하는 것으로 보고된 원형 RNA와 일관되게, 루프 서열에 대응하는 *니코티아나 벤타미아나* 샘플로부터의 RNA 밴드는 시험관내 전사체보다 겔 블롯에서 더 크게 나타난 것이 주지되었다. 이들 실험에 따라 약 1100 개 뉴클레오타이드의 루프 서열이 원형인 것으로 결론지어졌다.

[0784] GUShp93-1 및 GUShpPDK-침윤 *니코티아나 벤타미아나* RNA 샘플의 노던 블롯 혼성화 분석은 또한 루프 서열의 길이에 대응하는 크기의 RNA 분자를 검출하였다. GUShp93-1 및 GUShp93-2 작제물의 경우, U6 프로모터-유도 GUShp93-2는 35S 프로모터 유도 GUShp93-1보다 많은 루프 단편을 생성하여, U6 프로모터가 *니코티아나 벤타미아나* 잎 세포에서 35S 프로모터보다 강한 전사 활성을 갖거나, 분자가 다소 더 안정했음을 시사하였다.

[0785] GUShpPDK 작제물은 0.76 kb 크기의 스플라이싱 가능 PDK 인트론을 포함한 스페이서 서열을 가졌고, 이러한 작제물로부터의 일차 전사체는 이에 따라 대략 0.8 kb 루프를 함유하였다. 노던 블롯을 GUS 탐침을 제거하도록 처리하고, PDK 인트론 서열에 대항하여 전장 안티센스 탐침으로 재탐침시켰다. PDK 탐침은 모든 레인에 걸쳐 강렬한 밴드로 관찰된 미지 RNA 중에 강하게 혼성화되었다. RN아제 A 처리는 이러한 비-특이적 밴드를 감소시켰지만, 이를 완전히 없애지는 못했다. 그럼에도 불구하고, GUShpPDK-침윤 RNA 샘플에서 단편의 존재비가 비교적 약해 보이는 했지만, 예상된 크기의 PDK 인트론-특이적 밴드가 검출될 수 있는데, 아마도 그 이유는 인트론 서열이 대부분의 GUShpPDK 일차 전사체로부터 스플라이싱되었기 때문이다. PDK 루프 단편이 원형이었는지 검사하기 위

해, GUShpPDK-침윤 *니코티아나 벤타미아나* 잎의 RNA를 RN아제 R로 처리하였다. 비-특이적 혼성화 밴드는 RN아제 R 처리에 의해 거의 완전히 제거되었다. 대조적으로, 비-특이적 밴드로부터의 강한 신호로 인해 미처리 샘플과 비교하여 존재비가 용이하게 비교될 수는 없었지만, PDK 인트론 밴드는 RN아제 R 처리 후 쉽게 검출되었다. 종합하면, 이들 결과는 hpRNA 전사체가 원형 RNA 형성을 위한 효과적인 전구체였음을 시사하였고, 원형 RNA가 전체 루프 서열에 대응함을 제시하였다.

[0786] 안정적으로 형질전환된 *아라비도시스* 식물에서도 축적되는 RN아제 R-내성 루프 단편

[0787] hpGUS347 및 두 개의 hpGFP 작제물(도 40)을 사용하여 생태형 Col-0의 *아라비도시스 탈리아나* 식물 및 각 작제물에 대해 선택된 트랜스유전자를 발현하는 두 식물을 형질전환시켰다. miRNA 스폰지 기능을 시험하기 위해 miR165/166 결합 부위를 함유하도록 설계된 hpGFP 작제물을 위한 대조군으로서 hpGUS347 작제물을 이 실험에 사용하였다(실시예 24에서 논의됨). T2 세대의 트랜스제닉 식물을 hpGUS347 작제물로부터 생성된 RNA 분자의 축적, 특히, 루프 서열이 검출되는지 그리고 이들이 원형인지 여부에 대하여 분석하였다. 두 개의 hpGUS347 라인으로부터의 RN아제 R-처리와 미처리 RNA 샘플 둘 모두에서 hpGUS347 전사체의 루프에 대응하는 밴드가 검출되었다. *아그로박테리움*-침윤 *니코티아나 벤타미아나* 조직으로부터의 RNA 샘플에 대하여, 미처리 샘플과 비교하여 RN아제 R-처리 샘플에서 밴드 세기에 약간의 감소가 나타났지만, 대부분의 RNA 신호가 보유되었다. RT-qPCR 분석은, circRNA를 검출하도록 설계된 프라이머를 사용하여, 미처리 샘플에 비해 존재비가 약간 감소된 RN아제 R-처리 hpGUS347 샘플에서 circRNA의 존재를 확인시켜주었다. 이들 결과는 헤어핀 RNA를 생성하도록 발현된 안정적으로 통합된 hpRNA 트랜스유전자가 또한 루프 서열로부터 circRNA를 생성함을 시사하였다.

[0788] dsRNA 줄기-루프 접합부에서 절제되고 원형 RNA를 형성한 hpRNA 전사체의 루프

[0789] 루프 서열로부터 유래된 RNA 분자의 원형 성질을 추가로 확인하고 이들의 접합 서열을 특징화하기 위해, 추정 접합 서열을 증폭시킬 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 GUShp1100, GUShp93 및 GUShpPDK-침윤 샘플로부터 RT-PCR에 의해 루프 서열을 증폭시켰다. RT-PCR 산물을 이후 pGEM-T Easy 벡터로 클로닝하고, 시퀀싱하여, 접합부에서 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. 원형 RNA에서 루프 절제 및 접합의 뉴클레오타이드 위치는 다소 가변적이었는데, 5' 부위는 dsRNA 줄기의 3' 말단 내에 위치하고 3' 위치는 루프의 3' 말단 부근에 위치하지만, 5' 부위는 dsRNA 줄기의 3' 말단으로부터 10개 뉴클레오타이드에 위치한 G 뉴클레오타이드에 대한 분명한 선호성을 나타냈다. PDK 인트론 원형 RNA의 절제 및 접합 부위는 GUShp1100 및 GUShp93 RNA로부터의 패턴과 동일한 패턴을 따르고, 정규 인트론 스플라이싱 부위의 외부에 있었음이 주지되었다. 원형 RNA의 형성은 인트론 스플라이싱과 상관없이 줄기-루프 구조에 의해 결정된 것으로 결론지어졌다. 또한, 적어도 이 실시예에서는, 공유 연결이 절제된 서열의 5' 말단과 3' 말단 사이에서 형성되면서, 헤어핀 RNA가 dsRNA 줄기의 3' 말단 내의 5' 절단 및 루프 서열의 3' 말단 부근의 3' 절단에 의해 루프 서열을 방출하고 원형화하도록 가공된 것으로 결론지어졌다.

[0790] **실시예 23. 원형 RNA로 가공되지 않은 *사카로마이세스 세레비지애*에서 발현된 hpRNA**

[0791] 효모 종인 *사카로마이세스 세레비지애*는 진핵 유기체이고, 모든 진핵 생물과 마찬가지로 인트론 스플라이싱 기구를 지닌다. 현재, 원형 RNA 형성을 위한 일치 모델이 인트론 스플라이싱을 기반으로 함에 따라, 본 발명자들은 hpRNA가 식물 세포에서와 마찬가지로 *에스. 세레비지애*에서 원형 RNA를 형성할 수 있는지 조사하였다. hpRNA를 발현하도록 작제물을 생성하기 위해, GUShp1100의 역방위 반복 영역을 식물 발현 벡터로부터 절제하고, 효모 ADH1 프로모터의 제어 하에 효모 발현 벡터로 삽입하고(도 43), 생성된 유전 작제물을 *에스. 세레비지애* 세포에 도입하였다. 도 43에 나타난 바와 같이, 세 개의 각 독립적인 트랜스제닉 효모 균주로부터 추출된 RNA의 노던 블롯 혼성화 분석으로 GUShp1100 전사체에 대응하는 하나의 고분자량 밴드가 검출되었다. 이는 GUShp1100 전사체가 *에스. 세레비지애*에서 가공되지 않았지만 여전히 전장이었음을 시사하였다. 이를 확인하기 위해, *에스. 세레비지애*-발현 및 *니코티아나 벤타미아나*-발현 GUShp1100 전사체를 RN아제 R 처리에 대한 이의 반응에 대하여 비교하였다. 도 44에 나타난 바와 같이, *에스. 세레비지애*-발현 RNA는, RN아제 R 처리에 매우 민감하고 이에 따라 원형이 아닌 고분자량 밴드를 나타냈다. 즉, 효모 RNA 샘플은 *니코티아나 벤타미아나* 세포에서 생성된 바와 같이 루프 서열로부터 유래된 원형 분자를 나타내지 않았다. 결과는 *에스. 세레비지애*에서 발현된 GUShp1100 전사체가 가공되지 않고 여전히 전장이었음을 시사하였다. *에스. 세레비지애* RNA 밴드의 크기는, 추정상 시험관내 전사체가 아니라 *에스. 세레비지애*-발현 RNA에 존재한 5' 및 3' UTR 및 폴리(A) 서열로 인해, 시험관내 GUShp1100 전사체보다 겔 전기영동에 의해 더 크게 나타났다. 따라서, *에스. 세레비지애*에서 인트론 스플라이싱 기구의 존재는 식물 세포에서 발생하는 바와 같이 hpRNA 루프의 가공 및 원형 RNA의 형성을 가능하게 하기에 충분하지 않았다.

[0792] 유사한 방식으로, 유전 작제물 GUShp347을 *에스. 세레비지애*에 도입하고, 발현시켰다. 노던 블롯 혼성화 분석은

다시 hpRNA가, 적어도 루프 서열 또는 dsRNA 영역의 절단 없이, 전장을 나타내고 분명히 가공되지 않았음을 보여주었다.

[0793] 본 발명자들은 효모 *에스. 세레비지에* 및 이의 관련 출아 효모(다이어 효소를 갖지 않음)(Drinneberg et al., 2003)가 본원에 기재되는 변형 RNA 분자를 포함하여 전장 헤어핀 및 ledRNA의 생성을 위한 유기체로서 유리하다고 결론지었다. 이러한 전장 RNA는, 예를 들어, 곤충에 대한 국소 적용에 의해 유전자 활성을 침묵화하기 위해서, 비가공된 dsRNA가 요망되는 경우에 유용하다.

[0794] **실시예 24. miRNA 기능을 억제하는 효과적인 "스폰지"로서 기능할 수 있는 hpRNA 루프**

[0795] 동물에서 몇몇 원형 RNA는 특정 miRNA에 상보적이고 이에 의해 miRNA "스폰지"로 지칭되는 그러한 miRNA에 대한 결합 부위로서 작용하는 다중 서열을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 긴 hpRNA 작제물로부터 생성된 원형 RNA가 식물 세포에서 miRNA 스폰지로서 기능할 수 있는지의 여부를 시험하였다. 두 개의 GFP hpRNA 작제물을, 하나는 두 개의 *아라비도시스* miR165/166 결합 부위를 갖도록 서열이 변형된 점을 제외하고, 동일한 GUS 서열-유래 스페이서를 갖도록 설계하였다(도 40). 이러한 작제물 GFPhp[G:U]는 제2(대조군) 작제물 GFPhp[WT]과 동일한 안티센서 서열을 갖지만 모든 시토신 뉴클레오티드가 티민으로 대체된 변형 센스 서열로 되어 있는 역방향 반복 서열을 가졌다. 따라서, GFPhp[G:U]로부터의 전사체는 염기쌍의 약 25%가 G:U 염기쌍임을 제외하고 GFP 서열에 대응하는 dsRNA 영역을 형성할 것이다. 다른 작제물 GFPhp[WT]는 GFPhp[G:U]으로부터의 헤어핀과 동일한 길이의 완전 정규 염기쌍 형성 dsRNA 줄기를 갖는 헤어핀 rNA를 인코딩하였고, 대조군으로서 사용되었다(도 40). miR165/166 결합 부위 없이 스페이서를 함유하는 GUS hpRNA 작제물 GUShp347이 제2 대조군으로서 포함되었다.

[0796] 작제물을 사용하여 개별적으로 *아라비도시스 탈리아나*를 형질전환시키고, 각각 세 개의 작제물에 대하여 트랜스제닉 식물을 수득하였다. "트럼펫"으로의 잎의 독특한 접힘을 포함한, miR165/166의 감소와 관련된 표현형에 대하여 형질전환된 식물을 육안으로 검사하였다. 예상된 바와 같이, GUShp347 형질전환 식물은 miR165/166 억제와 관련된 표현형을 나타내지 않았다. 유사하게, GFPhp[WT]-형질전환 식물에서 분명한 표현형이 관찰되지 않았다. 대조적으로, 대부분의 GFPhp[G:U] 식물은 트럼펫 표현형을 포함한 miR165/166 억제의 표현형 암시를 다양한 수준으로 나타냈다.

[0797] hpRNA 발현의 축적을 검사하기 위해 약한, 중등도 및 강력한 내지 중증 표현형의 범위를 갖는 GFPhp[G:U] 형질전환 식물로부터 추출된 RNA에 대하여 노던 블롯 혼성화를 수행하였다. 사용된 탐침은 GUS mRNA에 대응하는 전장 안티센스 RNA였다. 탐침은 GUShp347 전사체의 센스 및 인접해 있는 루프와 822 bp 연속적인 서열 상보성을 가졌다. 탐침은 두 개의 miRNA 결합 서열이 측면에 있는 49 bp, 109 bp 및 70 bp 길이의 세 개의 비-인접 영역에서 GUS-유래 서열로서 총 228 bp의 루프 영역을 갖는 GFPhp 전사체보다 적은 서열 상보성을 가졌다. 도 45b에 나타난 바와 같이, 매우 풍부한 양의 GFP hpRNA 분자가 GFPhp[G:U] 식물에서 검출되었고, 노던 블롯에서 검출된 RNA 분자의 양은 표현형의 중증도와 양의 상관 관계를 가졌다. G:U 변형 hpRNA 트랜스유전자에 비해 비교적 낮은 전사 수준의 통상적인 hpRNA 트랜스유전자와 일관되게, GFPhp[WT] 식물은 노던 블롯 분석에서 겨우 검출 가능한 저수준의 hpRNA 분자 축적을 나타냈다. 즉, 상기 실시예에 나타난 바와 같이, hpRNA[G:U] 트랜스유전자는 대응하는 hpRNA[WT] 트랜스유전자에 비해 자가-침묵화에 덜 주어졌다.

[0798] RT-qPCR을 사용하여 루프 서열로부터 유래된 원형 RNA 분자의 축적을 정량화하였다. 결과는 전장 hpRNA 축적의 수준과 상관 관계가 있는 GFPhp[G:U] 트랜스제닉 식물에 다량의 circRNA가 존재했음을 나타내었다(도 45c). 20 nt 내지 25 nt 크기 범위의 작은 RNA를 검출하는 노던 블롯 혼성화 분석은 GFPhp[G:U] 식물에서 miR165/166의 하향-조절을 확인시켜주었다. 감소 정도는 hpRNA 및 circRNA의 양 및 표현형의 중증도와 상관 관계가 있었다. RT-qPCR을 이용한 miR165/166 표적 유전자의 발현 분석은 강한 miR165/166 하향-조절 및 중증 표현형을 나타낸 식물에서 miR165/166의 표적 유전자 억제가 완화되었음을 나타내었다. 종합하면, 이들 결과는 hpRNA 루프가 식물에서 miRNA 기능을 억제하는 특이적 miRNA 스폰지로서 사용될 수 있음을 나타내었다.

[0799] 본 발명자들은 또한 고수준의 폴리펩타이드를 생성하는 수단으로서 번역될 안정한 분자로서 식물 세포에서 고수준으로 생성된 원형 RNA의 용도를 구상했다. 캡-독립적 번역의 개시를 위해, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)가 이상적으로 사용된다. 다수의 IRES 서열이 확인되었다.

[0800] 당업자에게는 수많은 변이 및/또는 변형이 광의적으로 기재된 본 발명의 정신 또는 범위에서 벗어나지 않고 구체적인 구현예에 나타난 바와 같은 발명에 따라 제조될 수 있음이 이해될 것이다. 따라서 본 발명의 구현예는 제한적이 아니라 모든 측면에서 예시적인 것으로 간주되어야 한다.

- [0801] 본 출원은 그 개시가 본원에 참조로 포함되는, 2018년 8월 3일에 출원된 AU 2018902840, 2018년 8월 8일에 출원된 AU 2018902896, 2018년 9월 17일에 출원된 PCT/AU2018/051015 및 2019년 3월 20일에 출원된 AU 2019900941을 우선권으로 청구한다.
- [0802] 본원에서 논의되는/되거나 참조되는 모든 간행물은 이의 전문이 본원에 포함된다.
- [0803] 본 명세서에 포함된 문헌, 법령, 자료, 장치, 기사 등의 모든 논의는 단순히 본 발명의 맥락을 제공하려는 목적을 위한 것이다. 이것이 이들의 임의의 것 또는 전부가 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재한 본 발명에 관련된 분야에서의 공통 일반 지식이었다는 인정으로 간주되어서는 안 된다.
- [0804] 참고문헌
- [0805] Abraham (2002). Cell 111:9-12.
- [0806] Acevedo-Garcia et al., (2017). Plant Biotechnology Journal 15:367-378.
- [0807] Alvarez et al., (2000). Theor Appl Genet 100:319-327.
- [0808] Baumlein et al., (1991). Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
- [0809] Baumlein et al., (1992). Plant J. 2:233-239.
- [0810] Bhattacharyya et al., (1990) Cell 60:155-122.
- [0811] Brar et al., (1996) Biotech Genet. Eng Rev 13:167-79.
- [0812] Broothaerts et al., (2005). Nature 433:629-633.
- [0813] Broun et al., (1998). Plant J. 13:201-210.
- [0814] Buchanan-Wollaston, (1994) Plant physiology 105:839-846.
- [0815] Busk et al., (1997). Plant J. 11:1285-1295.
- [0816] Chen et al., (2005). Functional Plant Biology 32:671-681.
- [0817] Chikwamba et al., (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:11127-11132.
- [0818] Christou and Klee, (2004) Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons.
- [0819] Chung et al., (2006). BMC Genomics 7:120.
- [0820] Clough and Bent (1998). Plant J. 16:735-743.
- [0821] Corrado and Karali (2009). Biotechnol. Adv. 27:733-743.
- [0822] Courvalin et al., (1995). Life Sci. 318:1209-1212.
- [0823] Dadd and Mittler (1966). Experientia 22:832-833.
- [0824] Darji et al., (1997). Cell 91:765-775.
- [0825] Dong et al., (2011) Plant J. 68:633-45.
- [0826] Draper and Scott (1988). In: J. Draper et al., (Eds.), Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual, Alden Press, Oxford, pp. 199-236.
- [0827] Drinnenberg et al.. (2009) Science 326:544-550.
- [0828] Dunwell (2000). J Exp Botany 51Spec No:487-496.
- [0829] Ebhardt et al., (2005) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102:13398-13403.
- [0830] Ellerstrom et al., (1996). Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.
- [0831] Elliott et al., (2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15:1069-1077.

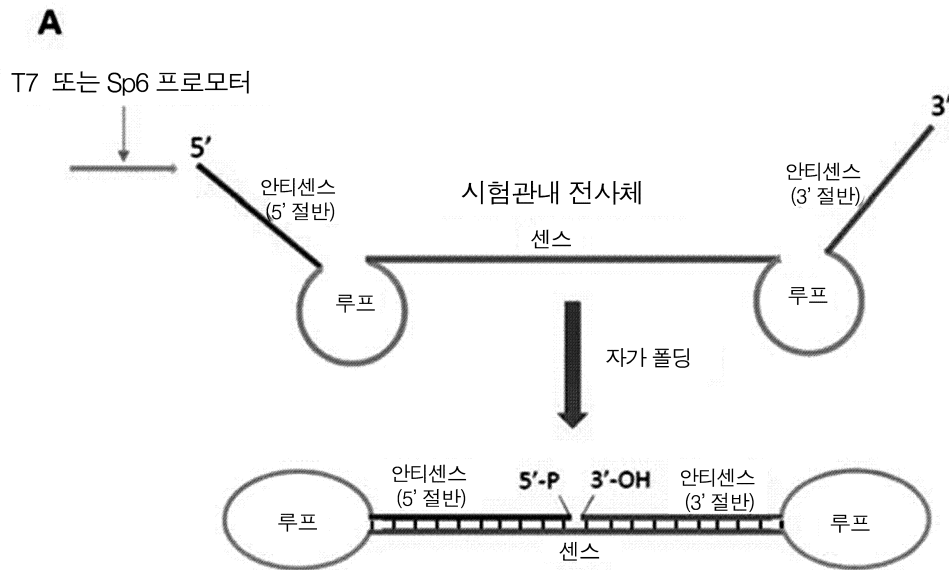
- [0832] Ellis et al., (1987). EMBO J 6:11-16.
- [0833] Feechan et al., Functional Plant Biology, 2008, 35: 1255-1266.
- [0834] Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).
- [0835] Gan (1995). Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence. PhD thesis. University of Wisconsin, Madison.
- [0836] Gan and Amasino (1995). Science 270:1986-1988.
- [0837] Glawe (2008). Ann. Rev. Phytopathol. 46:27-51.
- [0838] Gleave (1992). Plant Mol Biol 20: 1203-1207.
- [0839] Guo et al., (2016) Curr. Genom. 17: 476-489.
- [0840] Gupta et al., (1988) Plant Mol. Biol. 10:215-224.
- [0841] Helliwell and Waterhouse (2005). Methods in Enzymology 392:24-35.
- [0842] Hershey and Stoner, (1991) Plant Molecular Biol. 17:679-690.
- [0843] Hinchee et al., (1988). Biotechnology 6:915-922.
- [0844] Horvath et al., (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:1914-1919.
- [0845] Hsieh and Fire (2000) Annu Rev Genet 14:187-204.
- [0846] Jeddelloh, et al., (1999). Nat. Genet. 22:94-97.
- [0847] Jefferson et al., (1987). EMBO J 6:3901-3907.
- [0848] Jepson et al., (1994). Plant Mol. Biol. 26:1855-1866.
- [0849] Khan (2017). Sci Rep 7, 40025
- [0850] Kim et al., (2019) J. Gen. Plant Path. <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00865-7>
- [0851] Kishore and Somerville (1993). Curr Opin Biotechnol. 4:152-158.
- [0852] Koziel et al., (1996). Plant Mol. Biol. 32:393-405.
- [0853] Lacroix et al., (2008). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 15429-15434.
- [0854] Lau et al., (2001) Science 294:858-862.
- [0855] Li et al., (1996). FEBS Lett. 379:117-121.
- [0856] McCahill et al., (2002). Molecular Pharmacology 62:1261-1273.
- [0857] McCullough and Schuler (1997). Nucl Acids Res. 25:1071-1077.
- [0858] Mahfouz et al., (2006). Plant Cell 18:477-490.
- [0859] Matsuoka et al., (1994). Plant J. 6:311-319.
- [0860] Meier et al., (1997). FEBS Lett. 415:91-95.
- [0861] Melamed-Bessudo et al., (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(16):e981-988.
- [0862] Millar et al., (2006). Plant J. 45:942-954.
- [0863] Mutti et al., (2006). J Insect Sci 6:38.
- [0864] Mutti et al., (2008). Proceedings of the National Academy of Sciences 105:9965-9969.
- [0865] Olive et al., (1989) Plant Mol Biol 12:525-538.

- [0866] Padidam (2003). *Transgenic Res.* 12:101-109.
- [0867] Perrin et al., (2000). *Mol Breed* 6:345-352.
- [0868] Pitino et al., (2011). *PLoS ONE* 6, e25709.
- [0869] Pitino and Hogenhout (2012). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:130-139.
- [0870] Potenza et al., (2004). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:1-22.
- [0871] Powell et al., (1996). *Vaccines* 183, Abstract.
- [0872] Preiss et al., (1987). In: *Tailoring Genes for Crop Improvement* (Bruening et al., eds.), Plenum Press, S.133-152.
- [0873] Sambrook et al., (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [0874] Schaffner (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:2163-2167.
- [0875] Schwartz et al., (1997). *Science* 276:1872-1874.
- [0876] Scott et al., (2013). *Journal of Insect Physiology* 59:1212-1221.
- [0877] Seddas et al., (2004). *Virology* 325:399-412.
- [0878] Shen et al., (2015) *Frontiers in Plant Science* 6:281.
- [0879] Shiina et al., (1997). *Plant Physiol.* 115:477-483.
- [0880] Shure et al., (1983). *Cell* 35:225-233.
- [0881] Sizemore et al., (1995). *Science* 270:299-302.
- [0882] Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003).
- [0883] Smith et al., (2000). *Nature* 407:319-320.
- [0884] Stalker et al., (1988). *Science* 242: 419-423.
- [0885] Stewart et al., (2000). *J Mol Biol* 298:611-622.
- [0886] Tan et al., (2011). *Plant Physiol.* 156:1577-1588.
- [0887] Thillet et al., (1988). *J. Biol. Chem* 263:12500-12508.
- [0888] Timmons et al., (2001). *Gen* 263:103-112.
- [0889] Ulmasov et al., (1995). *Plant Physiol.* 108:919-927.
- [0890] Wang (1994) Isolation of phloem specific gene promoters for use in genetic engineering of insect resistance in rice. PhD thesis, University of Durham, UK.
- [0891] Wang et al., (1994) *Plant Molecular Biology* 24:159-170.
- [0892] Wang et al., (1998) *Acta Horticulturae* 461:401-407.
- [0893] Wang et al., (2008) *RNA* 14: 903-913. Wang et al., (2013). *PLoS Genet* 9, e1003865.
- [0894] Wang et al., (2014). *Nature Biotechnology* 32:9.
- [0895] Weiss (2003). *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95-106.
- [0896] Weissbach et al., (1988). In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif.
- [0897] Wijnker et al., (2008). *Trends in Plant Science* 13:640-646.
- [0898] Wesley et al. (2001) *Plant J.* 27:581-590.

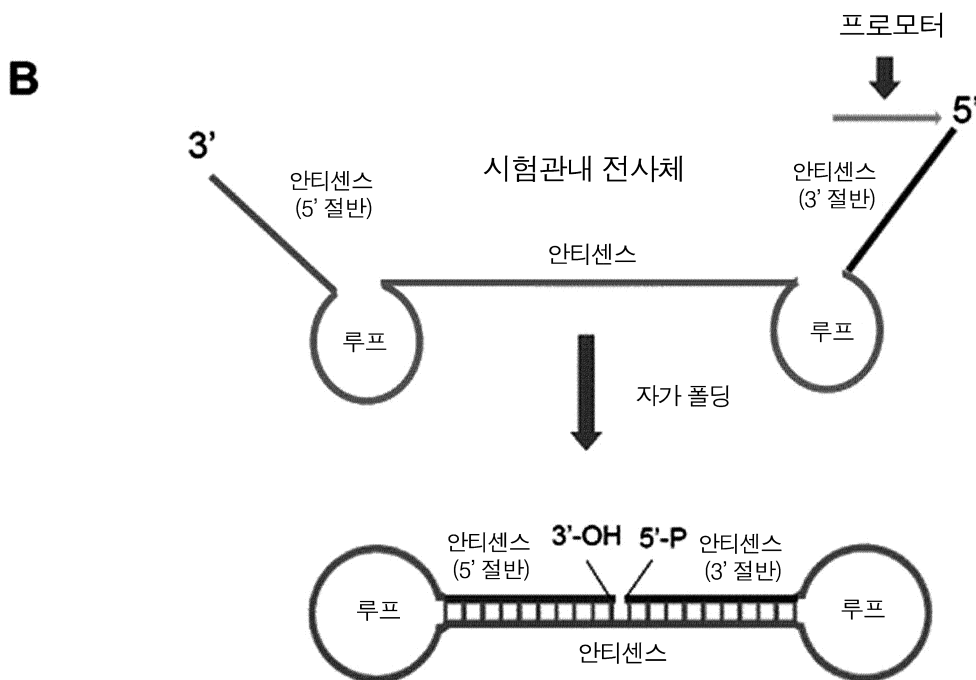
- [0899] Yang et al., (1994) Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England.
- [0900] Yang et al., (2003). Planta 216:597-603.
- [0901] Yelina et al., (2012). PLoS Genetics 8(8):e1002844. doi:10.1371/journal.pgen.1002844
- [0902] Yu et al., (2016). Pest Management Science 72:1090-1098.
- [0903] Zhang et al., (2018). Nat Rev Mol Cell Biol. 19:489-506.

도면

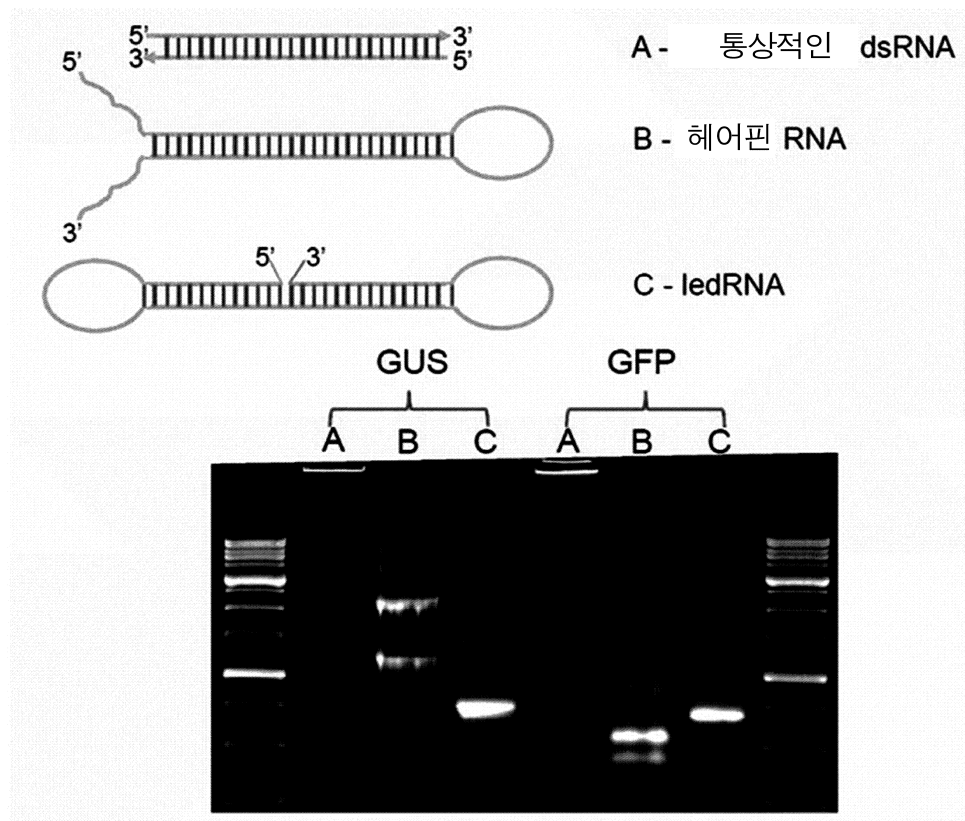
도면1a



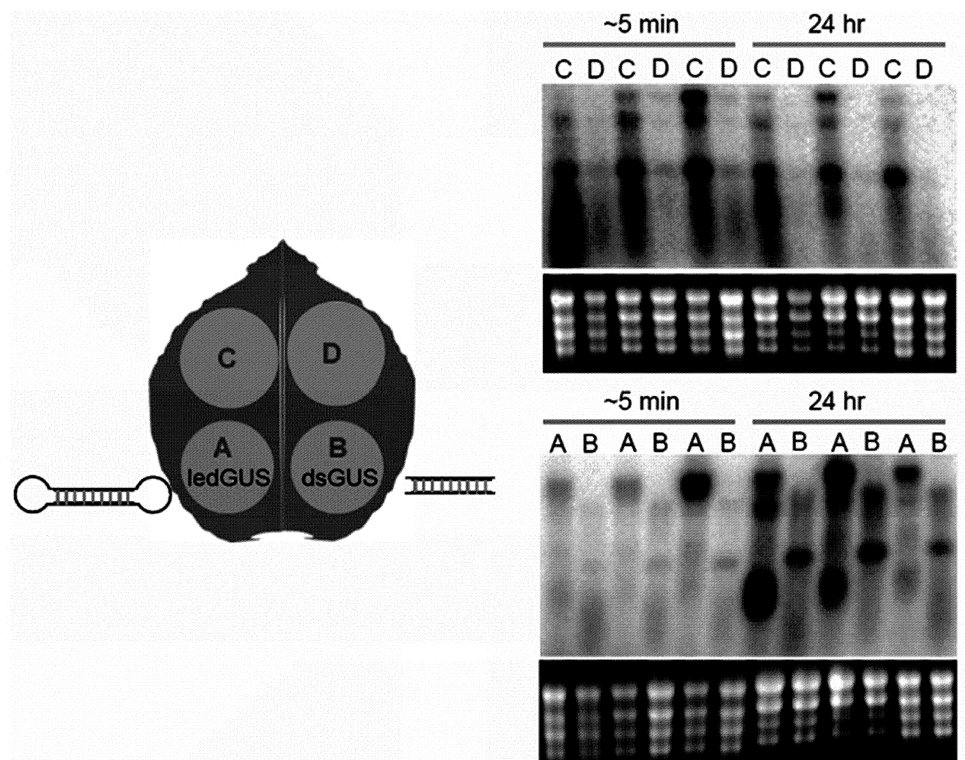
도면1b



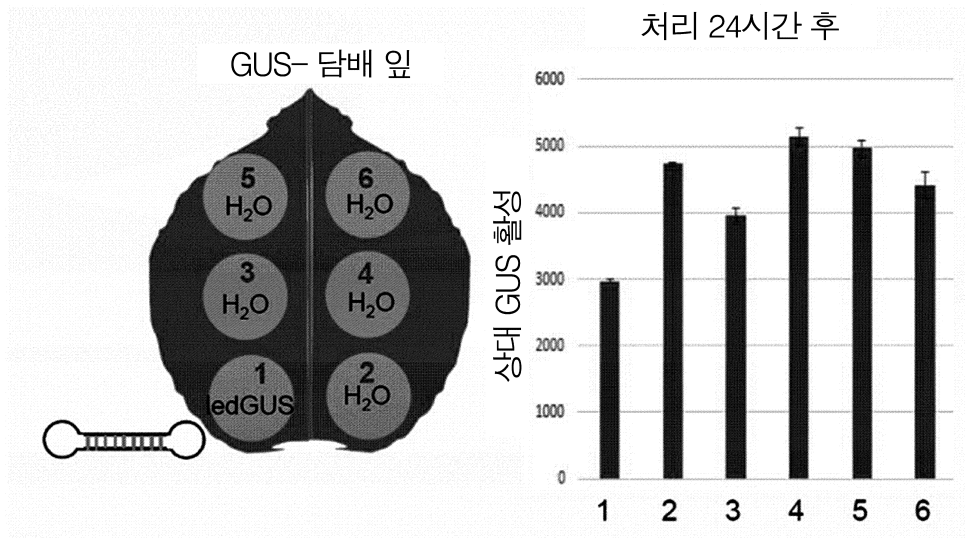
도면2



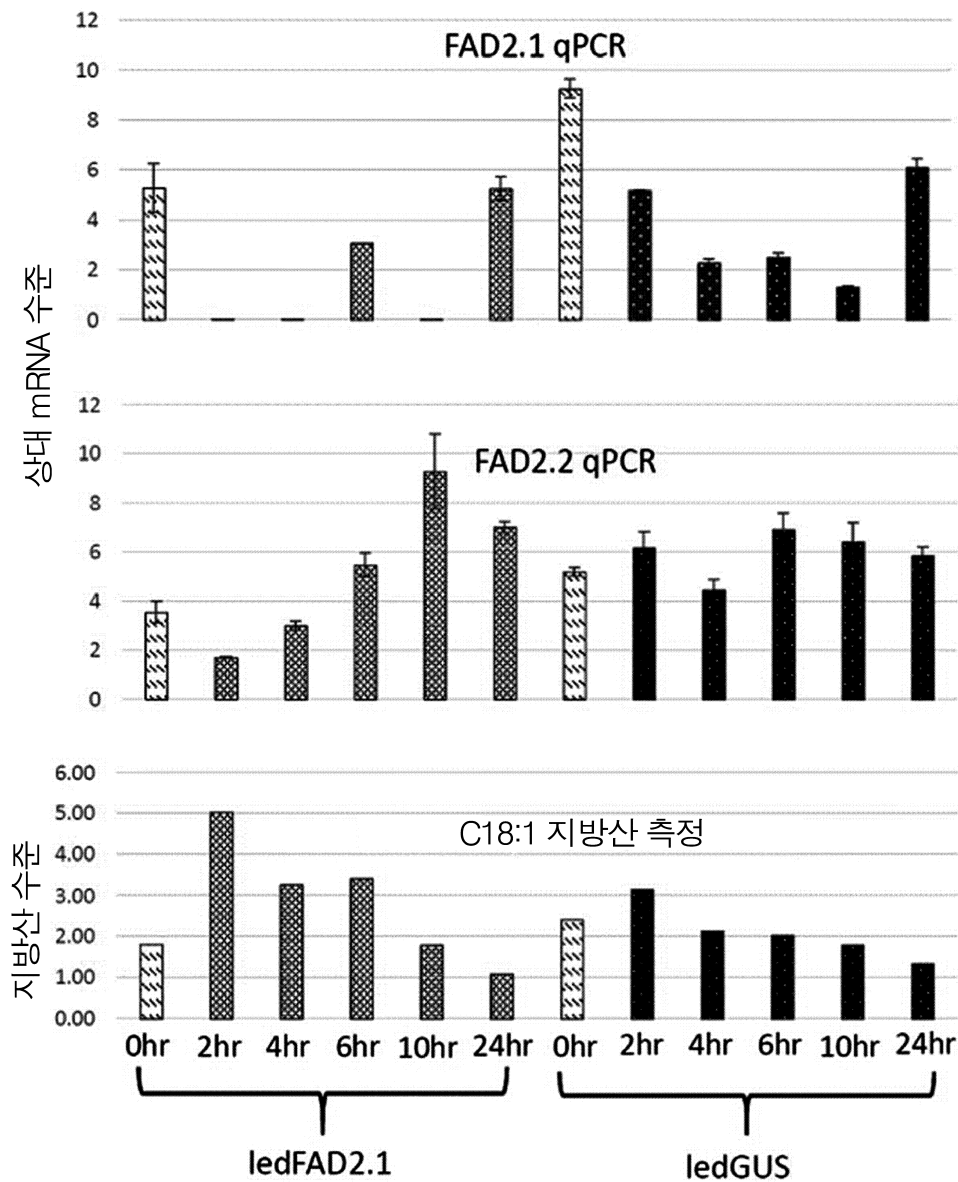
도면3



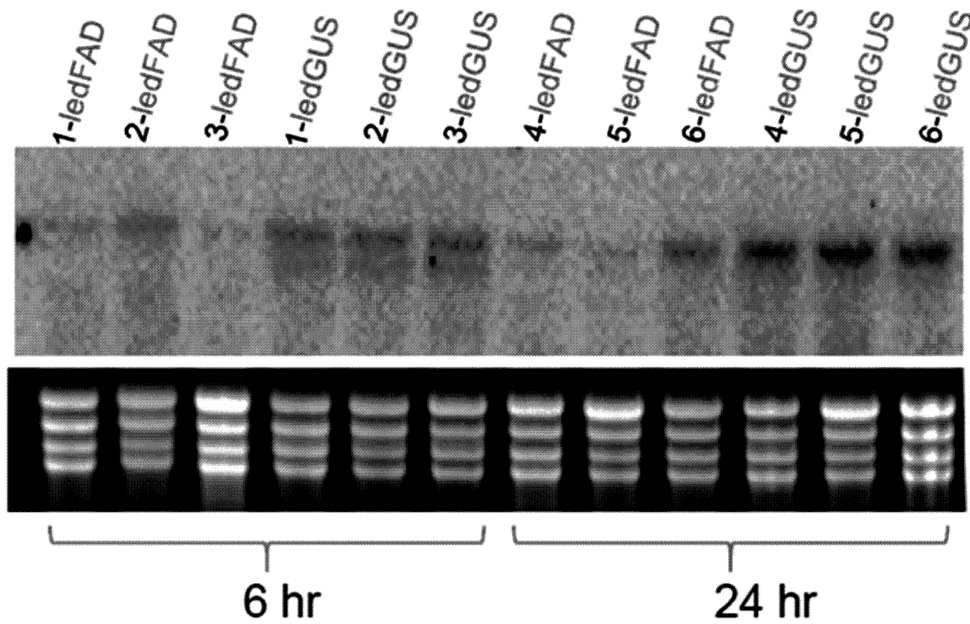
도면4



도면5



도면6



도면7

WT GUS ORF와 정렬

```

GUS      GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG 840
GUS-GU   -----TTGTGTTGGTATTGGTTAGTGGTAGTGAAGGTGAATAG 40
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GUS      TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC 900
GUS-GU   TTTTTGATTAATTATAAATTGTTTTATTTTATTGGTTTGGTTGTTATGAAGATGTGGAT 100
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GUS      TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG 960
GUS-GU   TTGTGTGGTAAAGGATTTGATAATGTGTTGATGGTGTATGATTATGTATTAATGGATTGG 160
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GUS      ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG 1020
GUS-GU   ATTGGGGTTAATTTTATTGTATTTTGTATTATTTTATG----- 200
          ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

도면8

```

GUS      GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG 840
GUS-4M   -----TCGGGTCCGCAACCGCTCACTGGGAGTCAAGCGCGTACAC 40
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GUS      TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC 900
GUS-4M   TTCGTGAATAAGCCTAACCGTTGTACATTAGTGGGTTTCGTCCTCAAGAACATGGGGAG 100
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GUS      TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG 960
GUS-4M   TTGGGTGCCAATGGAATCGTTAAGGTGGTGAAGGTCCACCACCTCGCTTTATGGTCTGC 160
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GUS      ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG 1020
GUS-4M   ATTCGGGGCAAGTCCAACCTACGTCGGATTCCCATACC----- 200
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

도면9

WT GUS ORF와 정렬

```

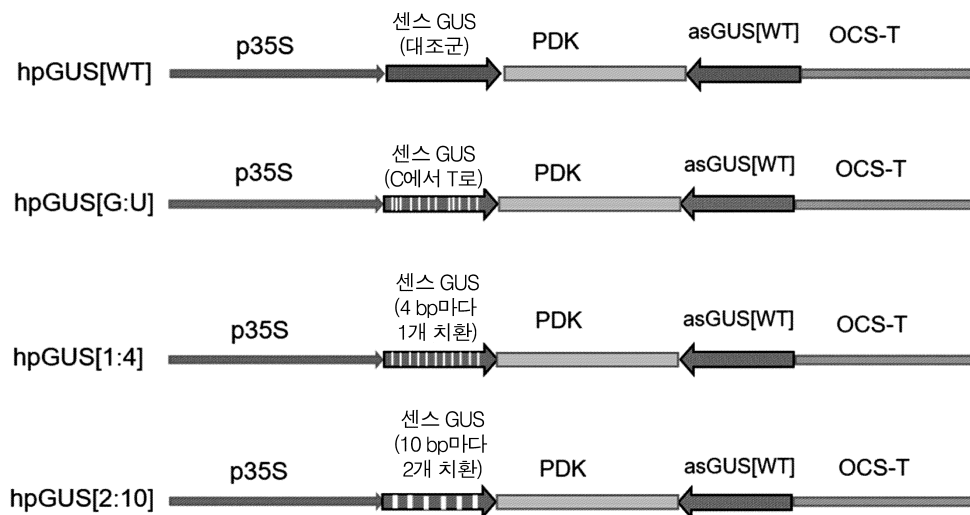
GUS          GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG 840
GUS-10M      -----TCGCGTCGCGATCCGGTCTCTGGCAGTGTGGGCGAACTC 40
                ***** :*****:*****:*****:*****:

GUS          TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC 900
GUS-10M      TTCCTGATATACCACAAAGGGTTCTACTAACTGGCTTACGTCGTCATCTAGATGCGGGT 100
                *****:***** *****:*****:*****:*****:*****:

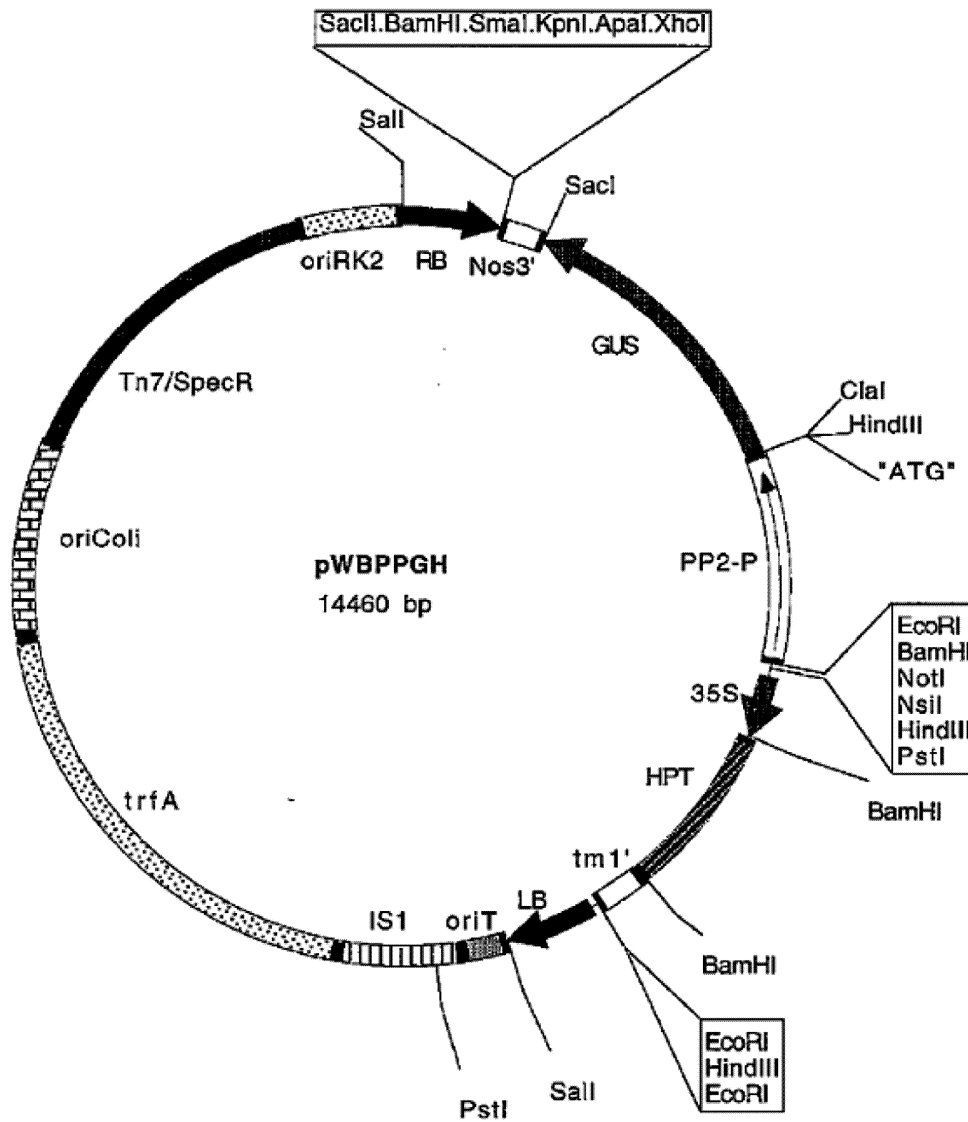
GUS          TTGCGTGGCAAAGGATTTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG 960
GUS-10M      TTGCGTGGGTAAGGATTCTCTTAACGTGCACATGGTGCAGCACCACGCAAAAATGGACTCC 160
                ***** :*****:*****:***** *****:*****

GUS          ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATACCCCTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG 1020
GUS-10M      ATTGGGGCGTACTCCTACGCTACCTCGCTATACCCTTAGC----- 200
                ***** :***** *****:*****
    
```

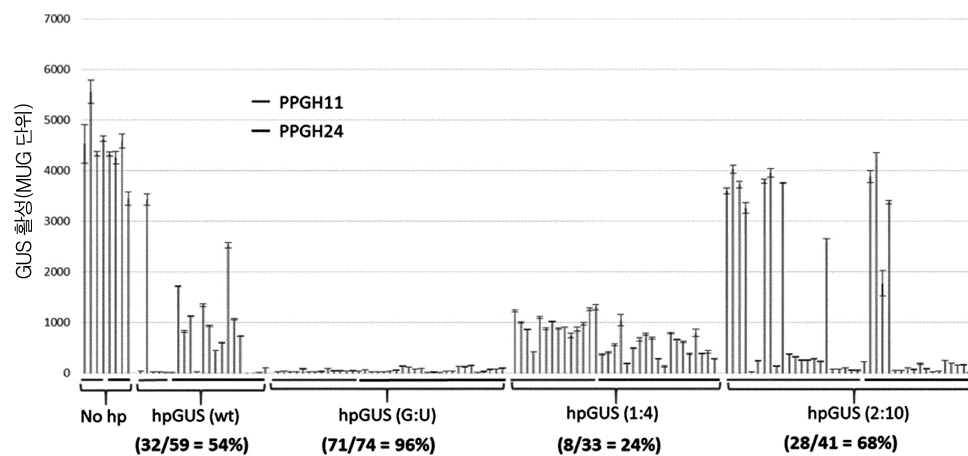
도면10



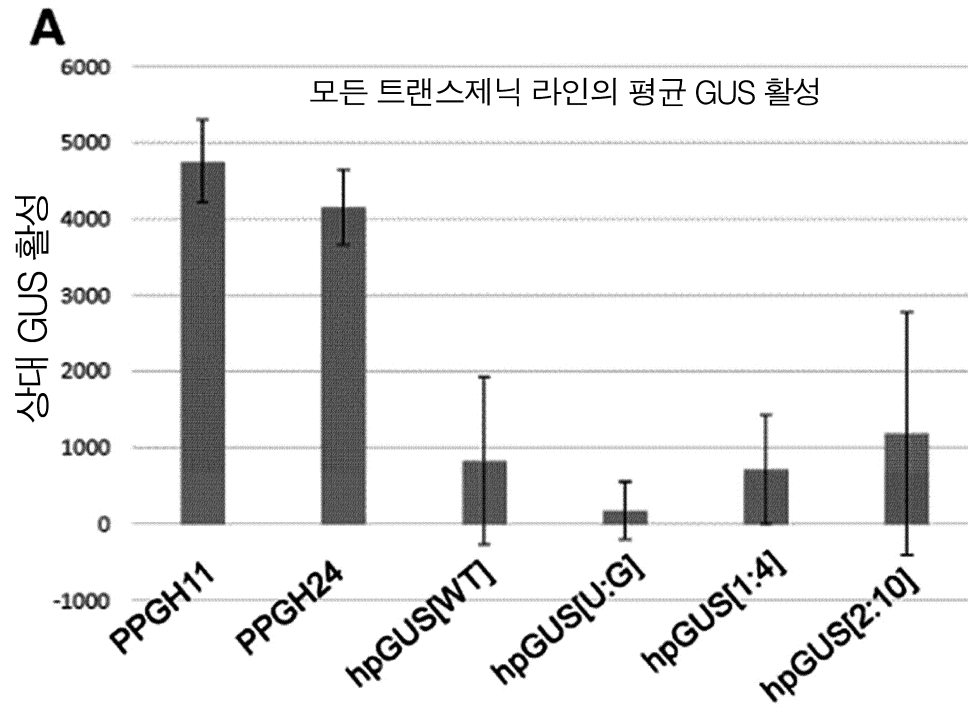
도면11



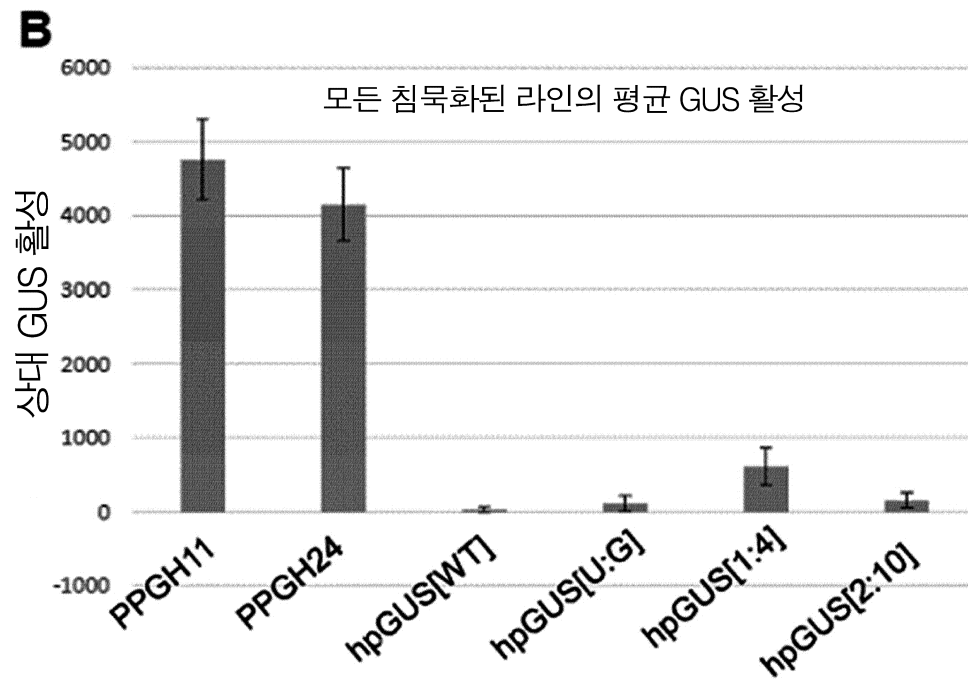
도면12



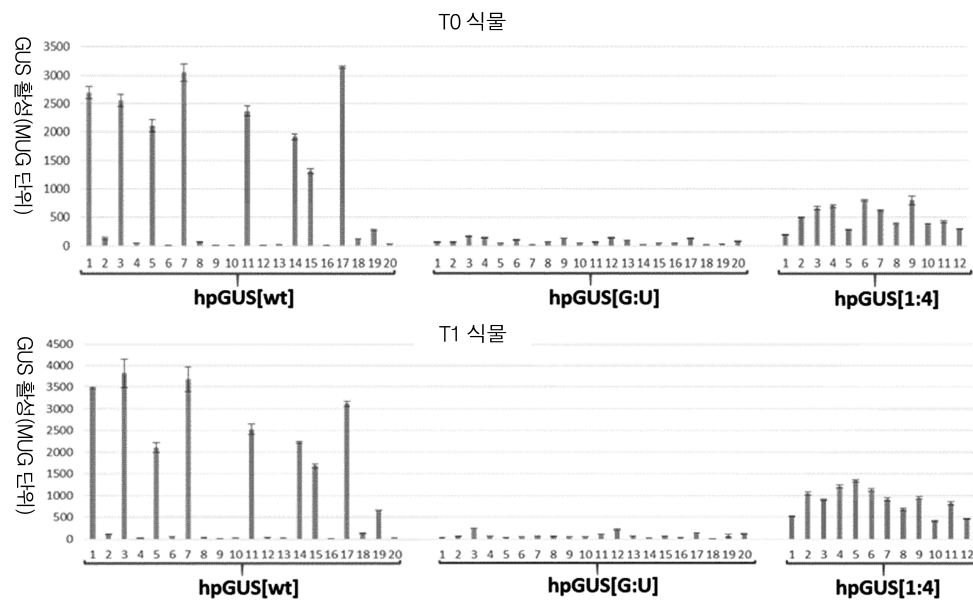
도면13a



도면13b

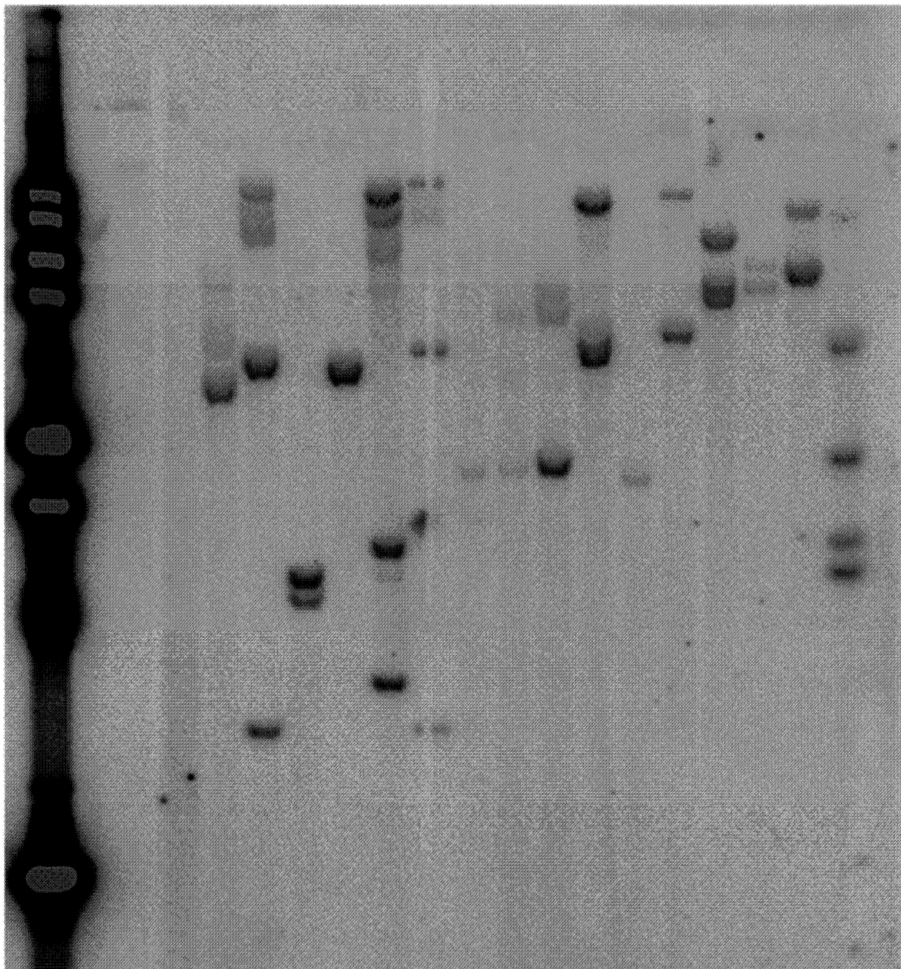


도면14

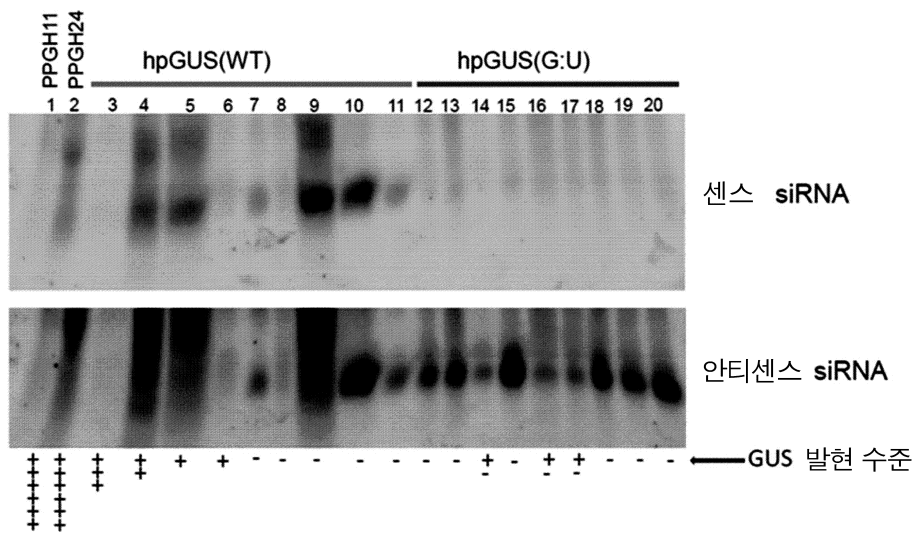


도면15

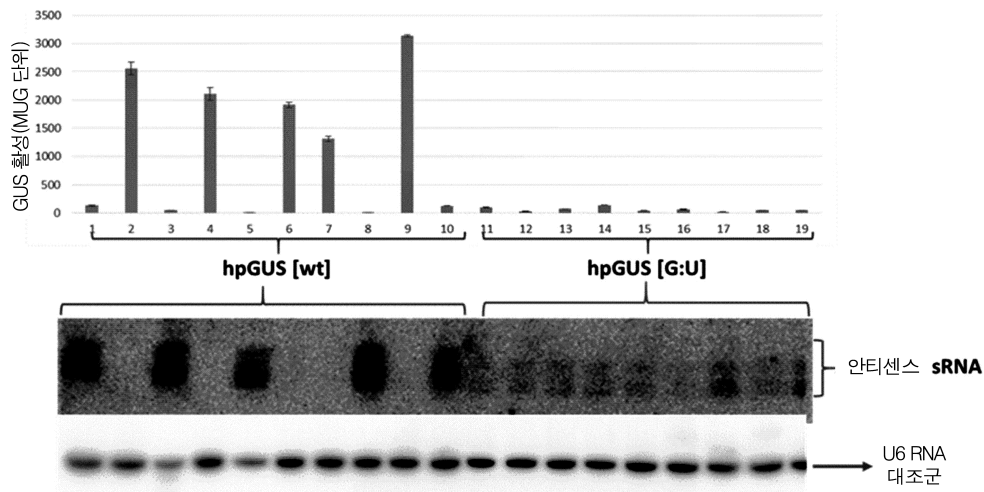
레인 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



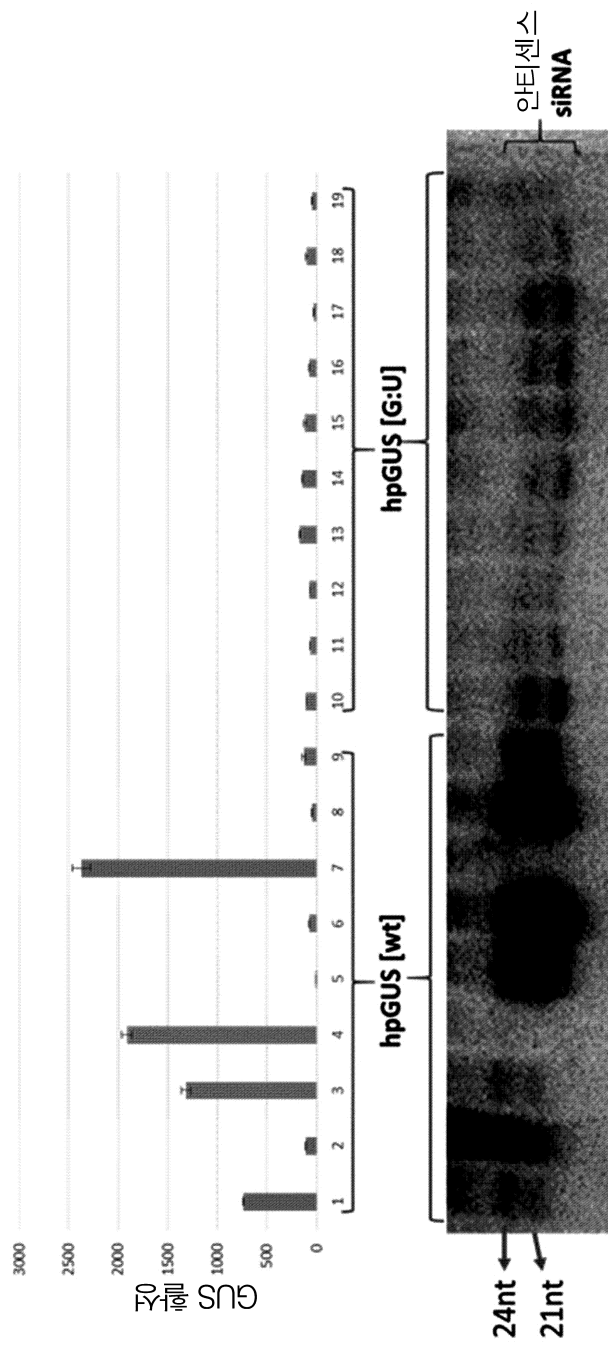
도면16



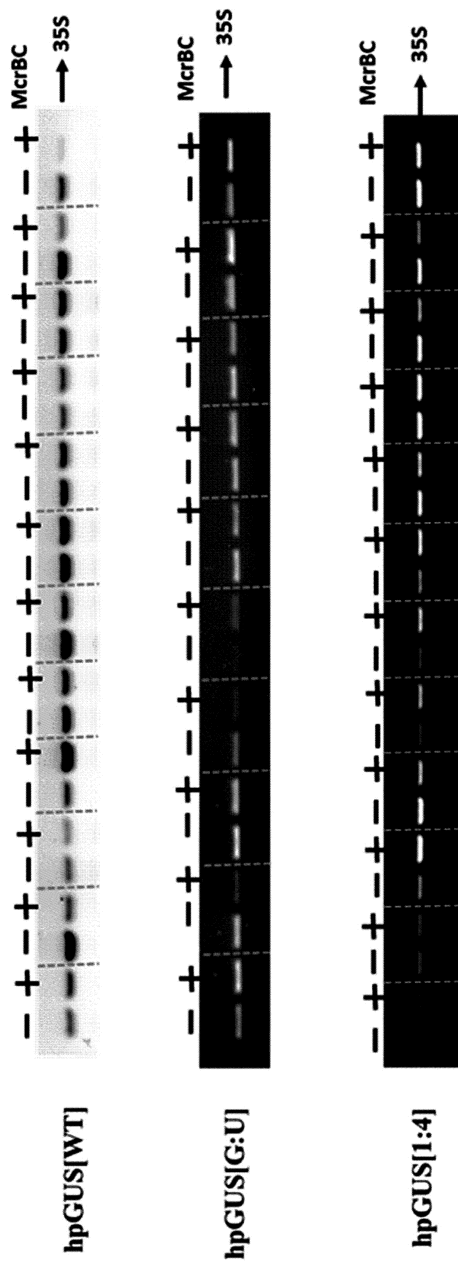
도면17



도면18

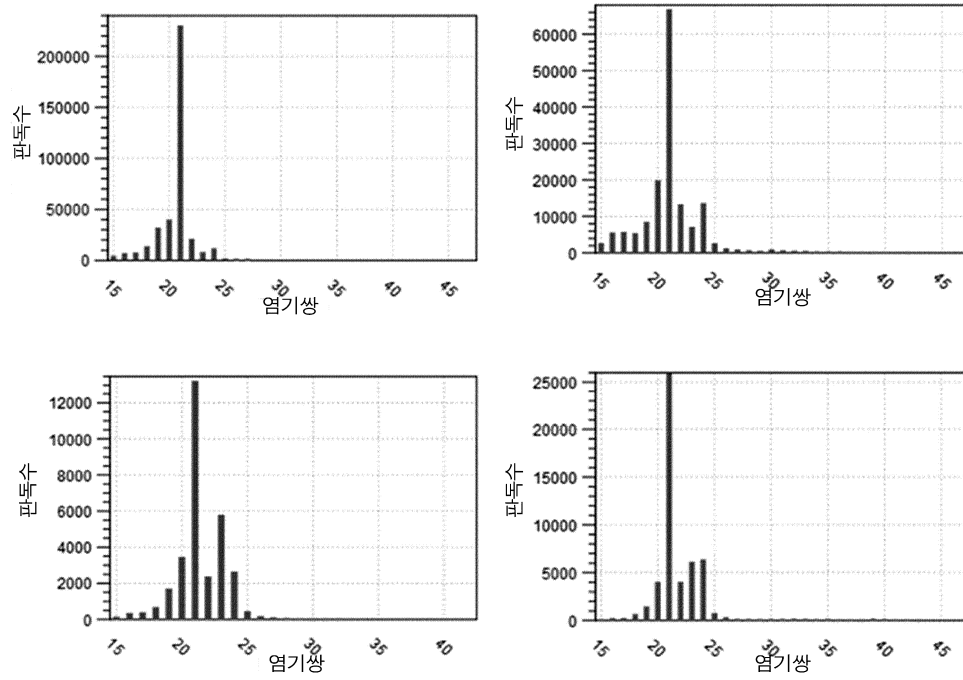


도면20



도면21a

A



도면23

```

CHS-GU          -----GTTGTTTGT
CHS-cDNA        TCCGTATCGCTAAGGATCTCGCCGAGAACAACTCGTGAGCACGTGCTCTGCTGCT
                  ***** ** *

CHS-GU          TTGAGATTATAGTTGTTATTTTGTGGTTTTTTTGATATTTATTTGATTTTTTGTG
CHS-cDNA        CTGAGATCACAGCCGTTACCTTCCGTGGTCCCTCTGACACCCACCTTGACTCCCTCGTCG
                  ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

CHS-GU          GTTAGGTTTTTTTAGTGATGGTGTGTTGTGATTTATTGTGGGGTTGGATTTTGATATAT
CHS-cDNA        GTCAGGCTCTTTTCACTGATGGCGCCGCCGCACTCATTTGTGGGGTCGGACCCCTGACACAT
                  ** *** * ***** * * * * * ***** ** * *** **

CHS-GU          TTGTTGGAGAGAAATTTATTTTGAGATGGTGTGTTGTTGTTAGATTATTTTTTAGATT
CHS-cDNA        CTGTCGGAGAGAAACCATCTTTGAGATGGTGTCTGCGGCTCAGACCATCCTTCCAGACT
                  *** ***** ** ***** ** * * ** * ** * ** *

CHS-GU          TTGATGGTGT-----
CHS-cDNA        CTGATGGTGCCATAGACGGACATTTGAGGGAAGTTGGTCTCACCTTCCATCTCCTCAAGG
                  *****
  
```

도면24

안티센스 EIN2 cDNA와 안티센스 EIN2-GU 정렬

```

As-EIN2-GU      -----AATGTTTATGTGAGTTGTAATA
asEIN2-cDNA     TCTTCATTGCAGATCTGAGCCAAAGTGTTCACAGTCACAACGCTTATGCGAGCTGCAACA
                  ** * ***** ** * ** *

As-EIN2-GU      TATTGGTATAAGATGGTGGTAAATGAAAAGTAGAGTAATTGTTATTAAGTTATATTG
asEIN2-cDNA     TATTGGCATAAGATGGCGGCAAAATTGAAAAGCAGAGTAATTGCCACCAAGTCATACCCG
                  ***** ***** ** ***** ***** * **** ** *

As-EIN2-GU      AAATGAGTATTTTTTTGATATTTGTAATTTATTTTTGGGATTAATATATTGATAGAA
asEIN2-cDNA     AAACGAGCACCTCCTTCGATATTTGCAACCCATTTCCTGGGATCAATATATCCGACAGAA
                  *** ** * * * ***** ** ***** ***** ** **

As-EIN2-GU      ATTAAGGATAGGAAGTAGAGTAGGAATTATTTTTGGATAAATTTAGTTGAGGTT--
asEIN2-cDNA     ACCAAAAGGACAGGAAGTAGAGCAGGAACCATTTCTCTGGATAAACCTAGCTGAGGTCTC
                  * ***** ***** ***** ** * ***** ** * *****
  
```

도면25

안티센스 CHS cDNA와 안티센스 CHS-GU 정렬

```

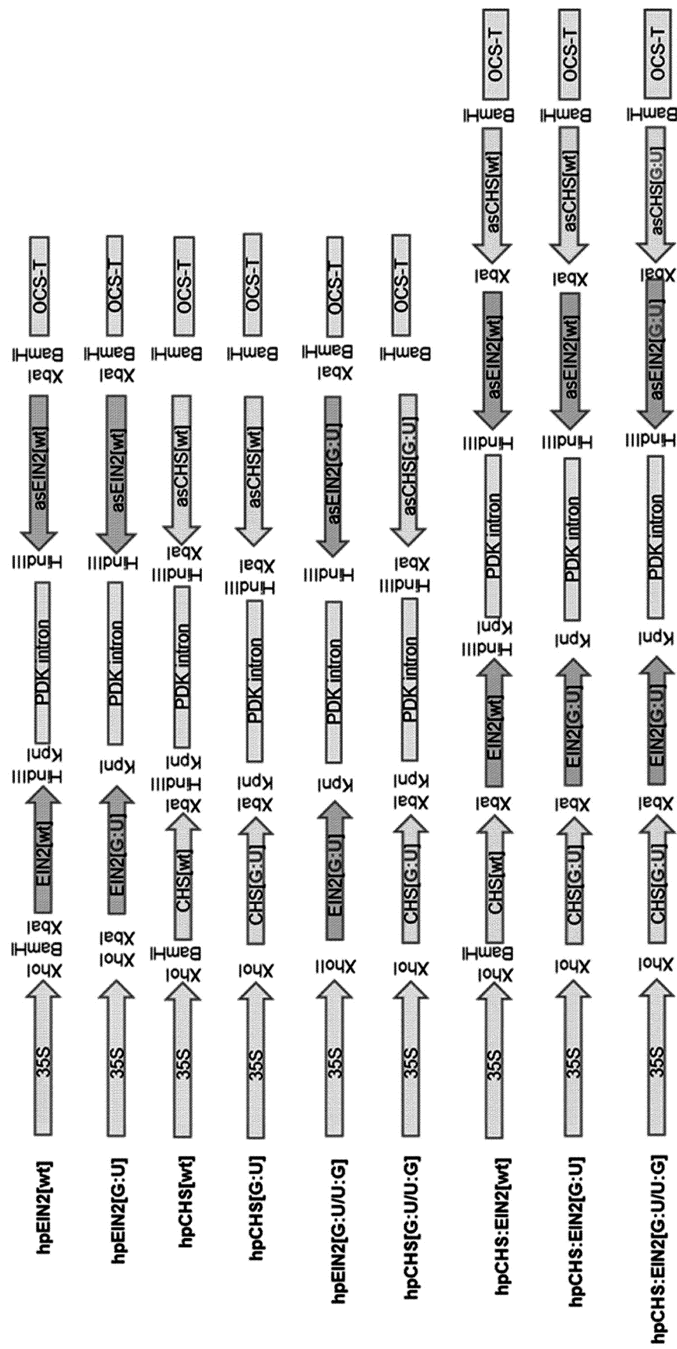
As-CHS-GU       -----GTATTATTAGAGTTTGGA
asCHS-cDNA      GATGGAAGGTGAGACCAACTTCCTCAATGTCCGTCTATGGCACCATCAGAGTCTGGAA
                  * * ** *****

As-CHS-GU       GGATGGTTTGAGTGGTAGATATTATTTTAAAGATGGGTTTTTTTGTAGATGTGTTAG
asCHS-cDNA      GGATGGTCTGAGCGGCAGACACCATCTCAAAGATGGGTTTCTCTCCGACAGATGTGTCAG
                  ***** ** * ** * * ***** * * ** *****

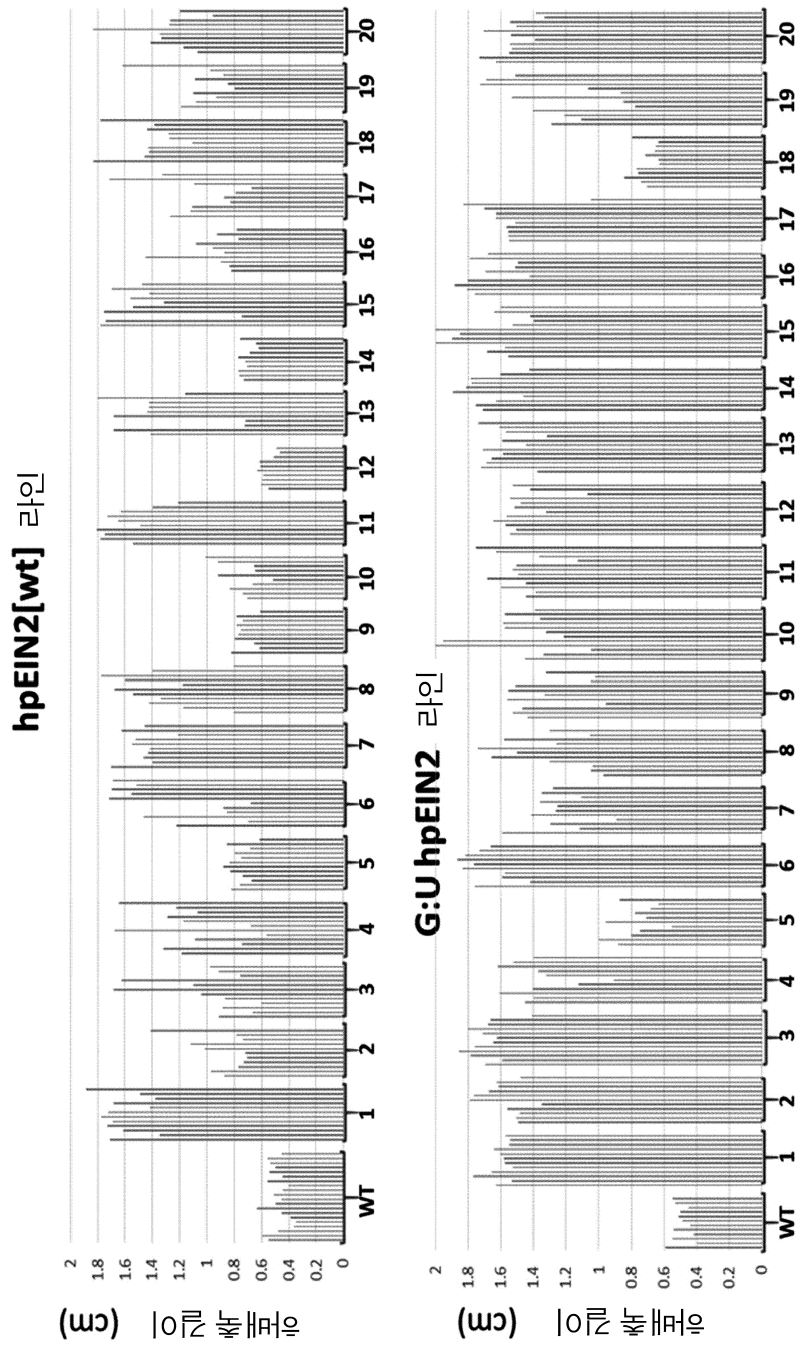
As-CHS-GU       GGTGTTGATTTTATAATGAGTGTGGTGGTGTATTATTGAAAAGAGTTTGATTGATGAGGG
asCHS-cDNA      GGTCCGACCCCAATGAGTGCAGCGCGCCCATCACTGAAAAGAGCCTGACCGACGAGGG
                  *** ** * ***** ** * * ***** ***** ** *

As-CHS-GU       AGTTAAGGTGGGTGTTAGAGGGATTATGGAAGGTAATGGTTGTGATTTAGAGTAGATAA
asCHS-cDNA      AGTCAAGGTGGGTGTGAGAGGGACCGGAAGGTAACGGCTGTGATCTCAGAGCAGACAA
                  *** ***** ***** * ***** ** ***** ** *
  
```

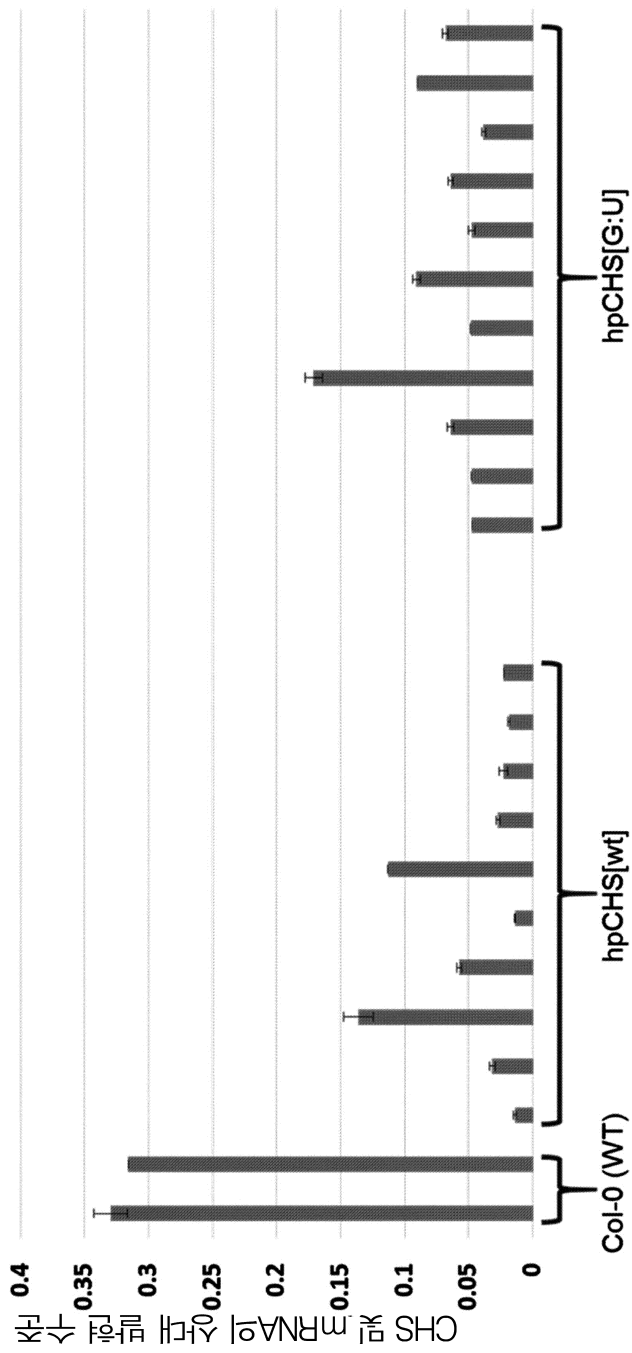
도면26



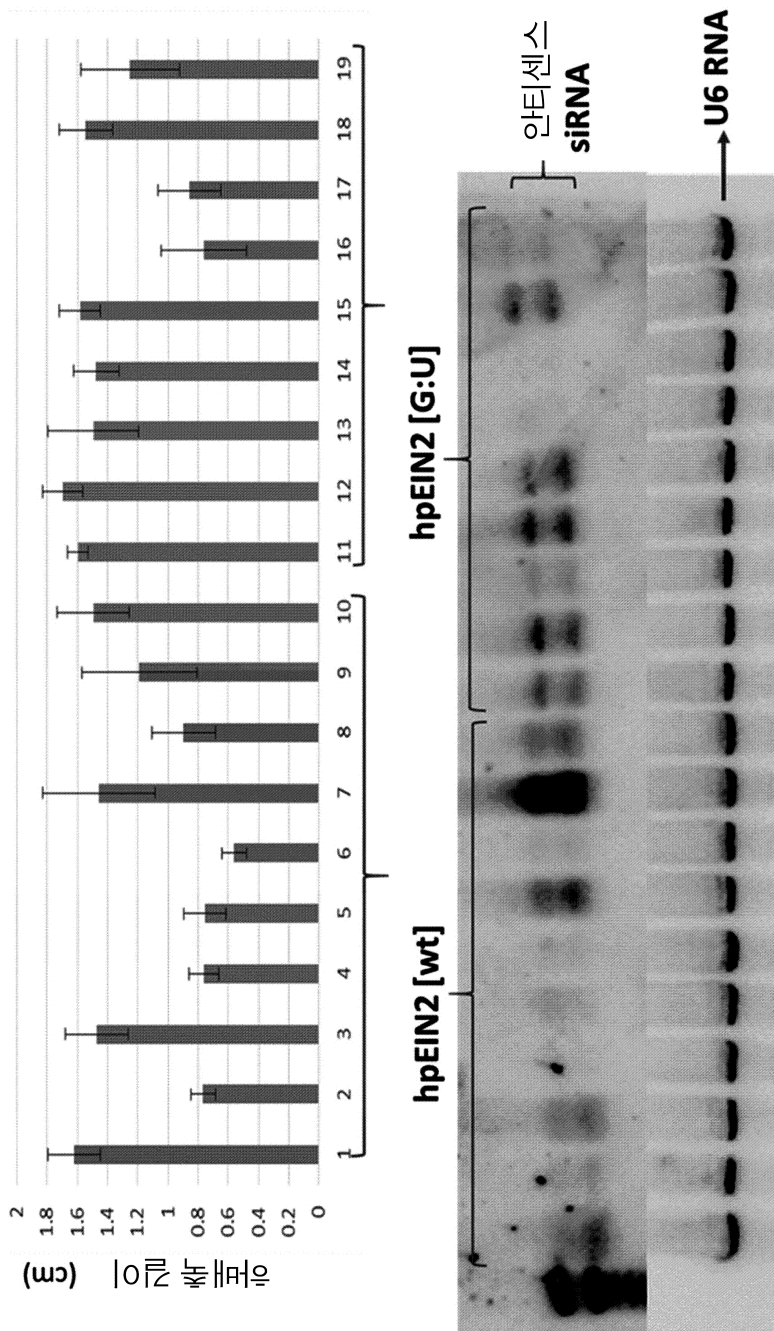
도면27



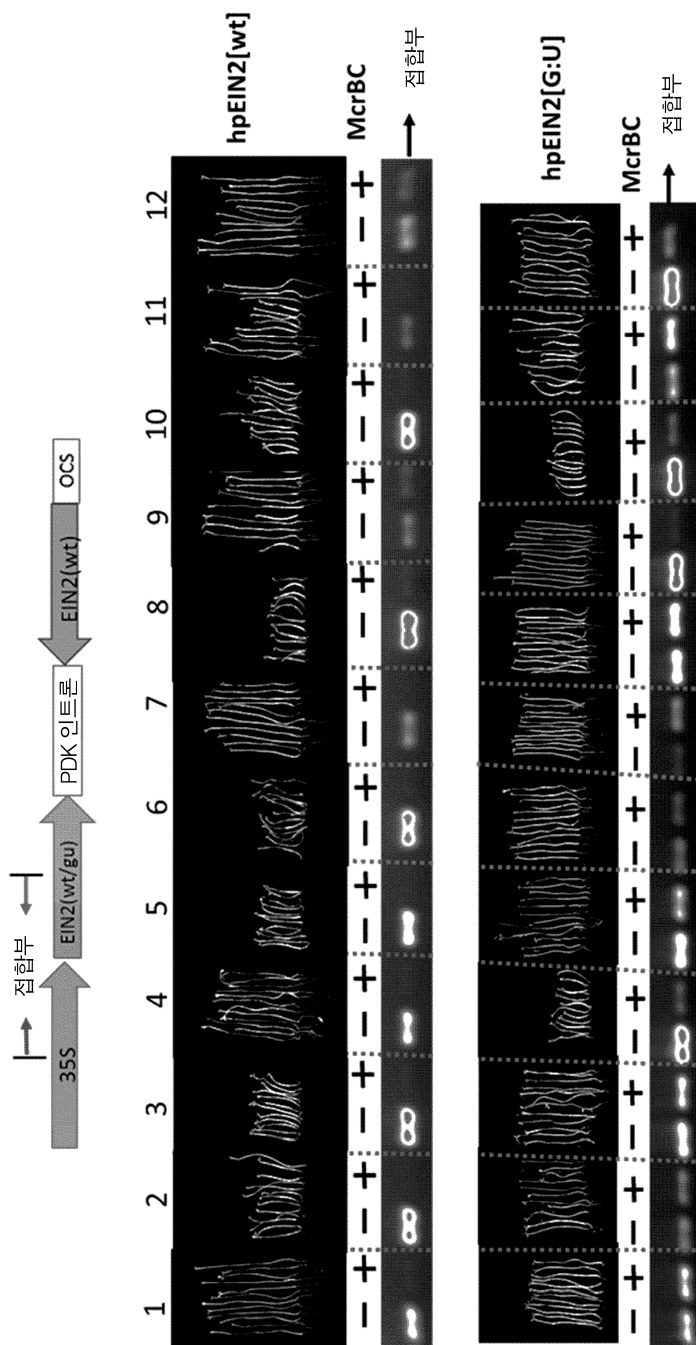
도면28



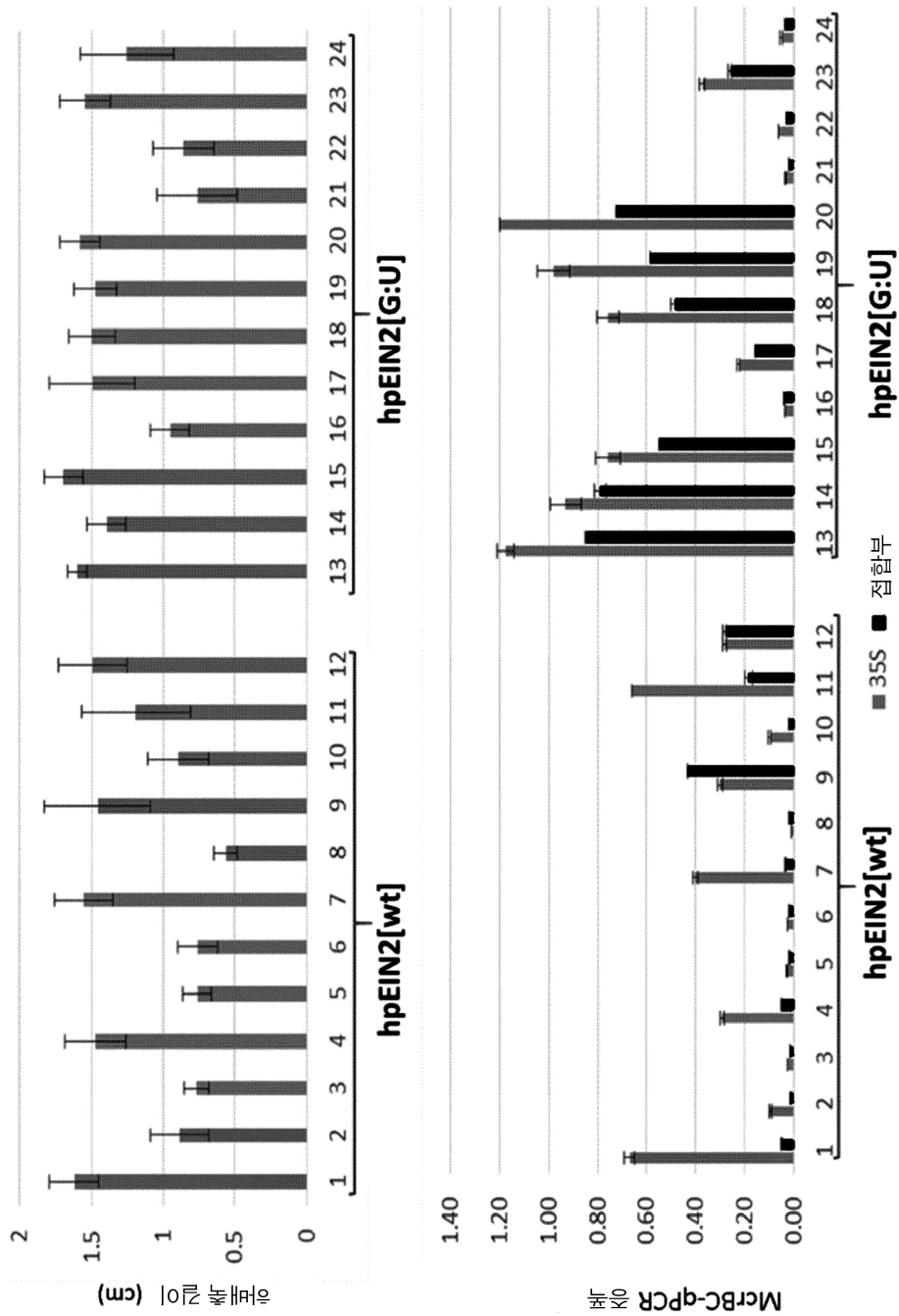
도면29



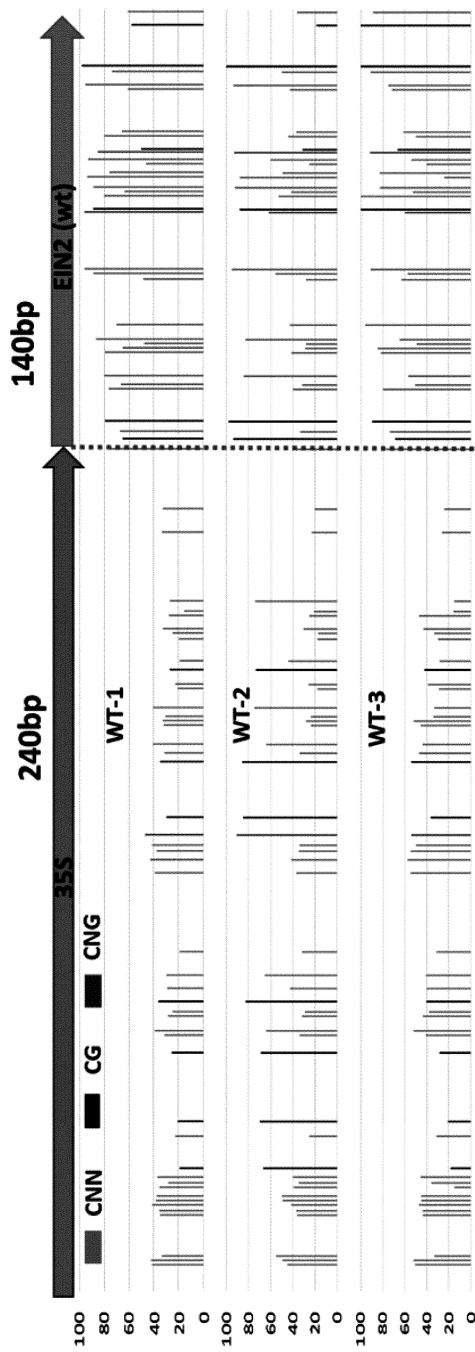
도면30



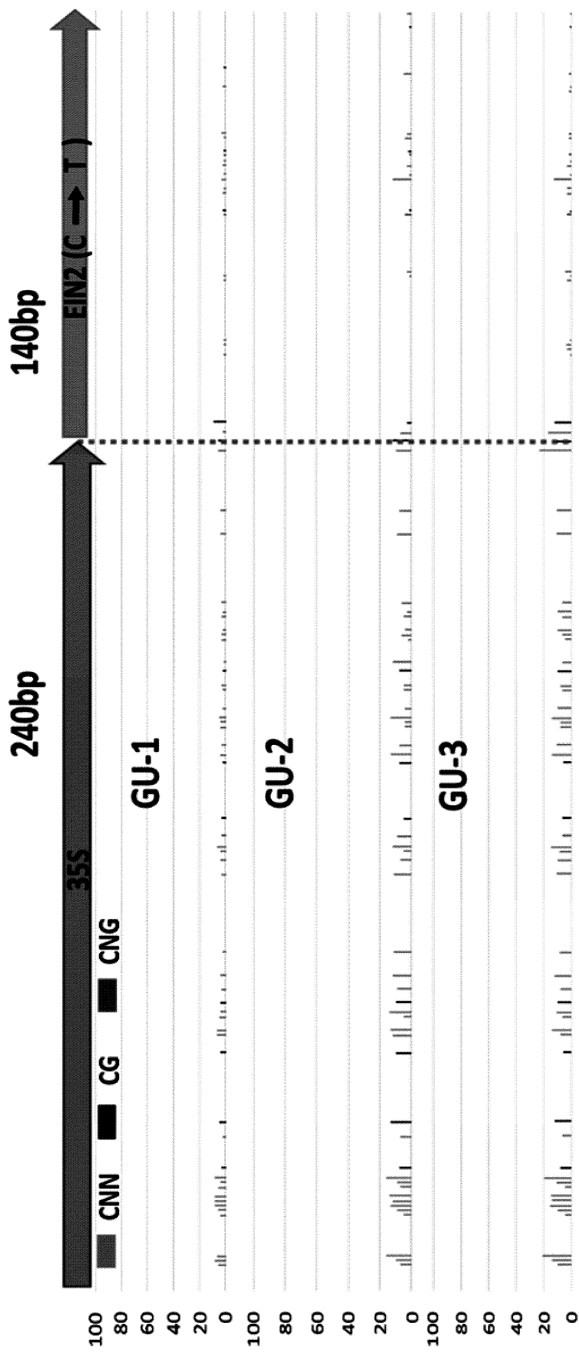
도면31



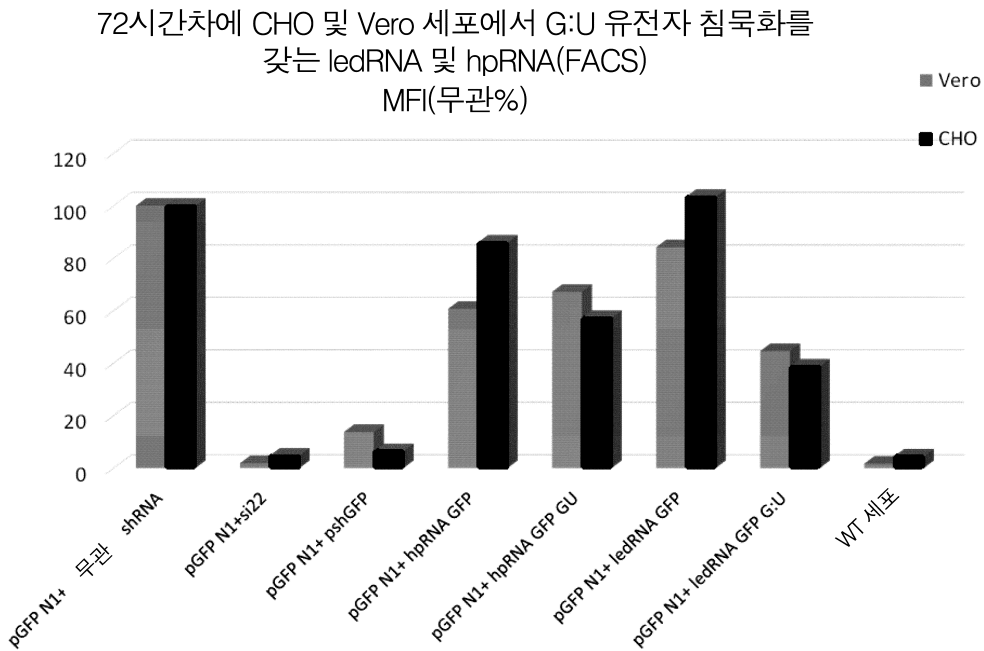
도면32



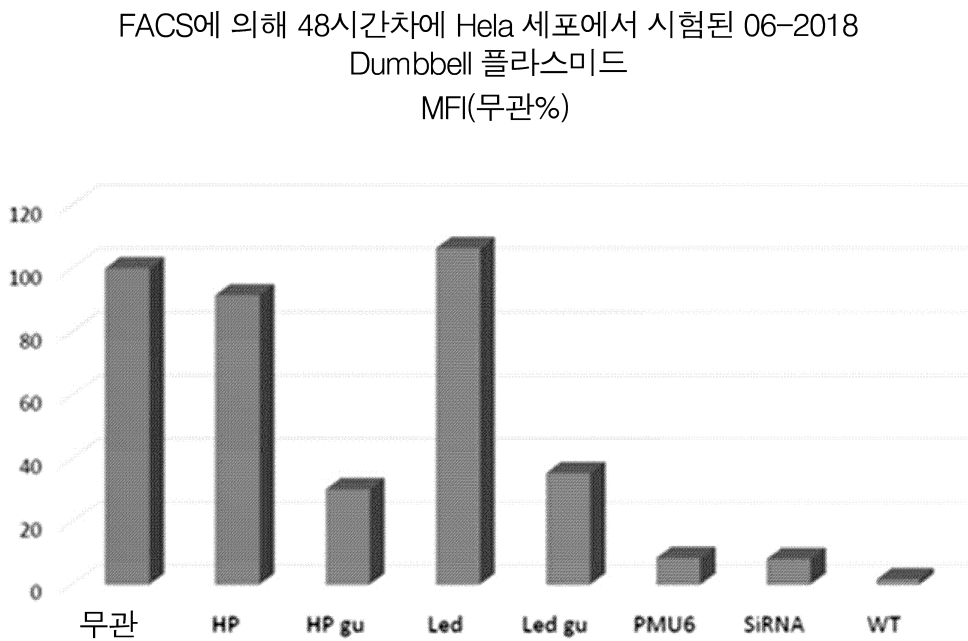
도면33



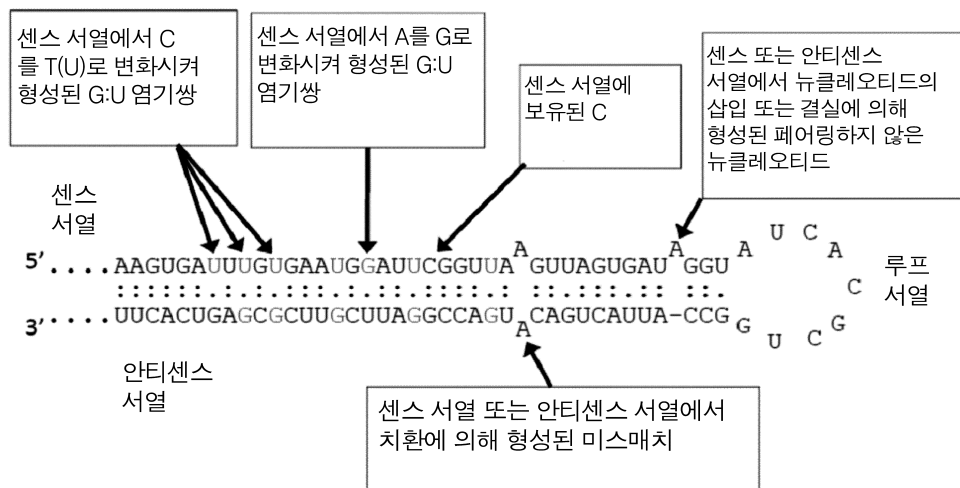
도면34



도면35

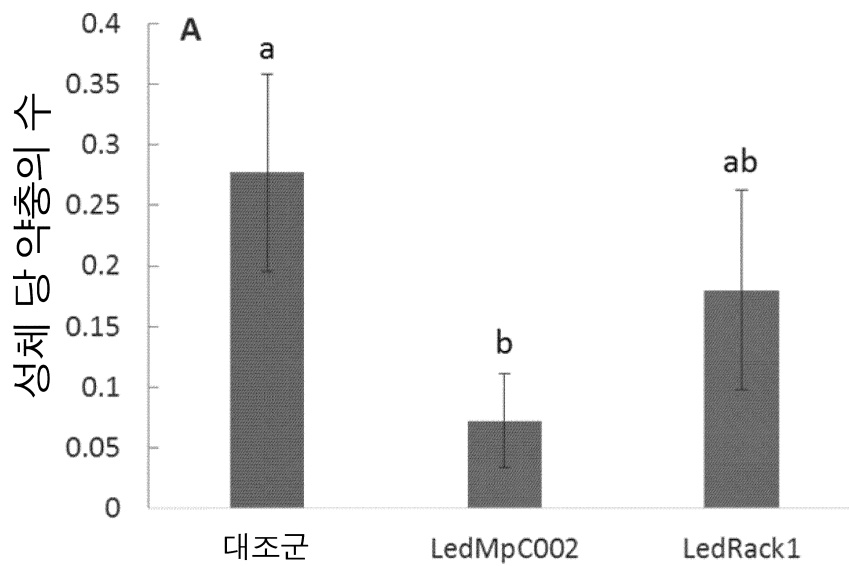


도면36



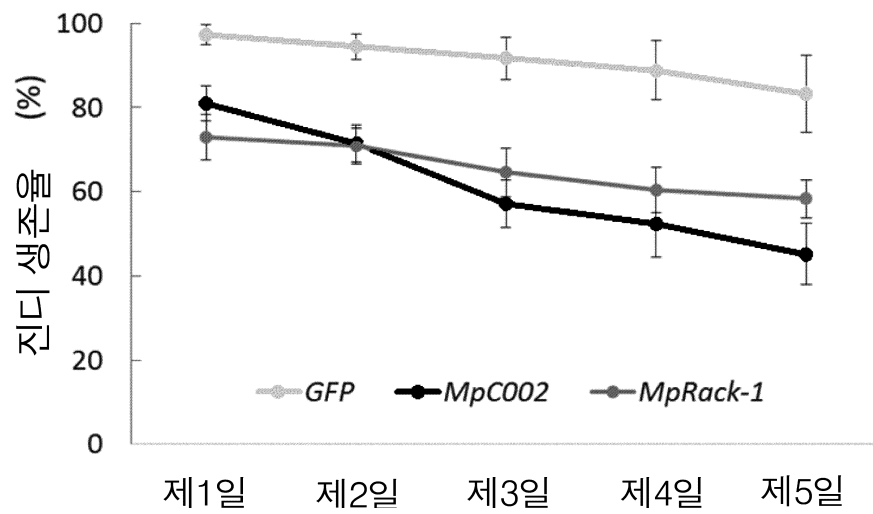
도면37a

A

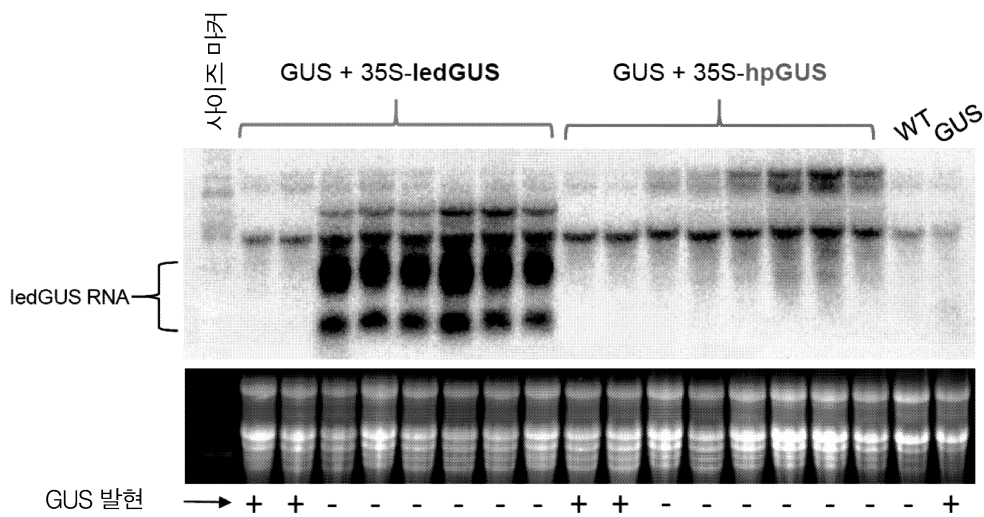


도면37b

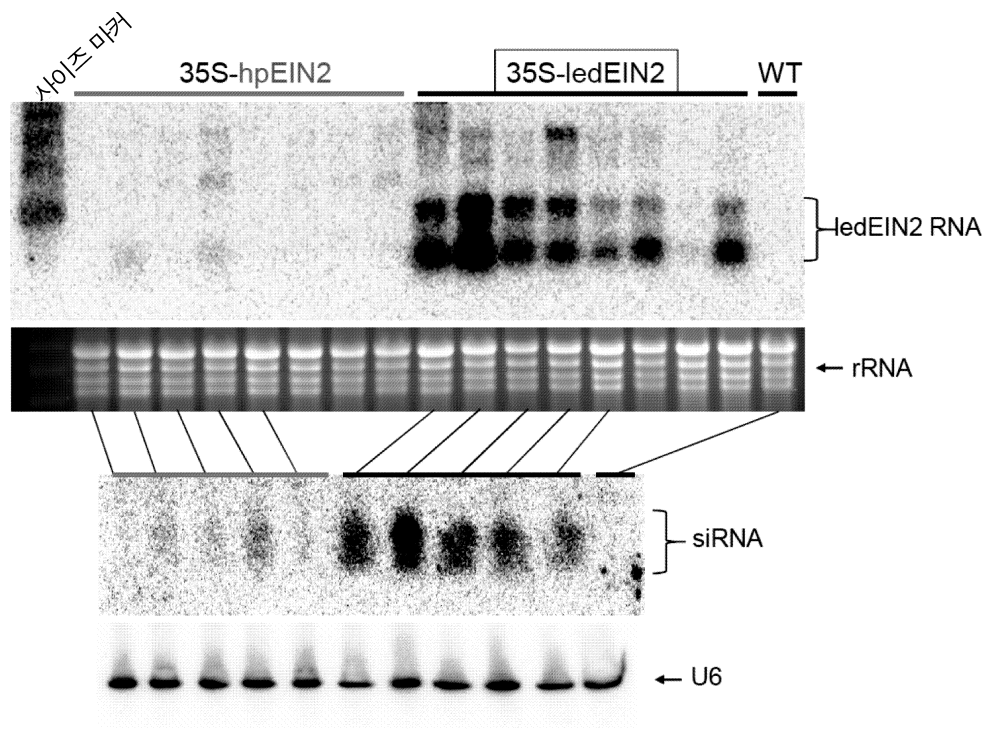
B



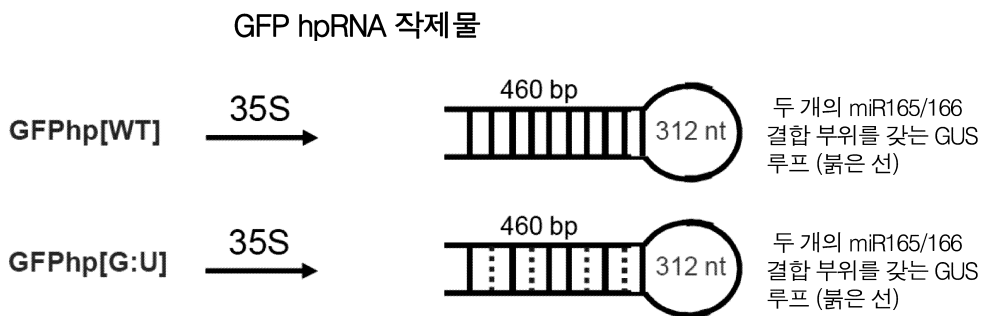
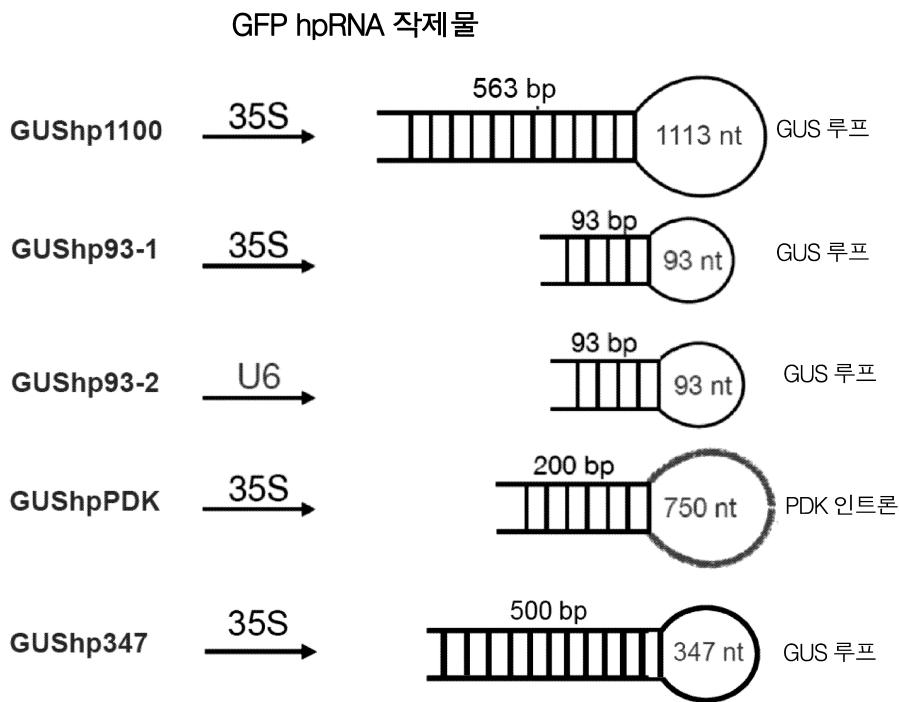
도면38



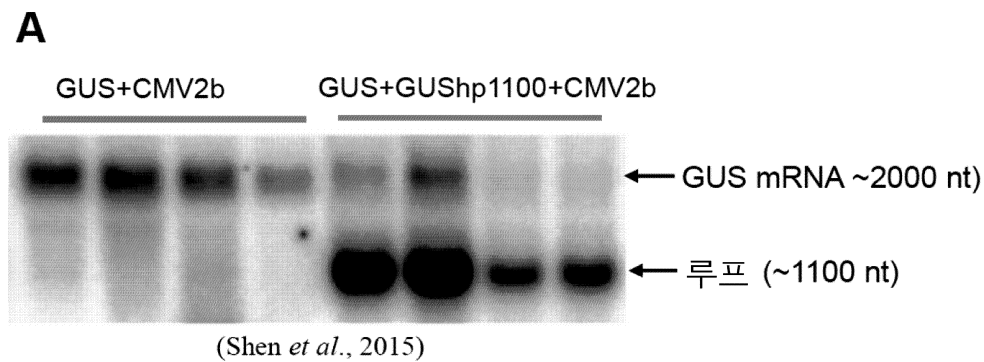
도면39



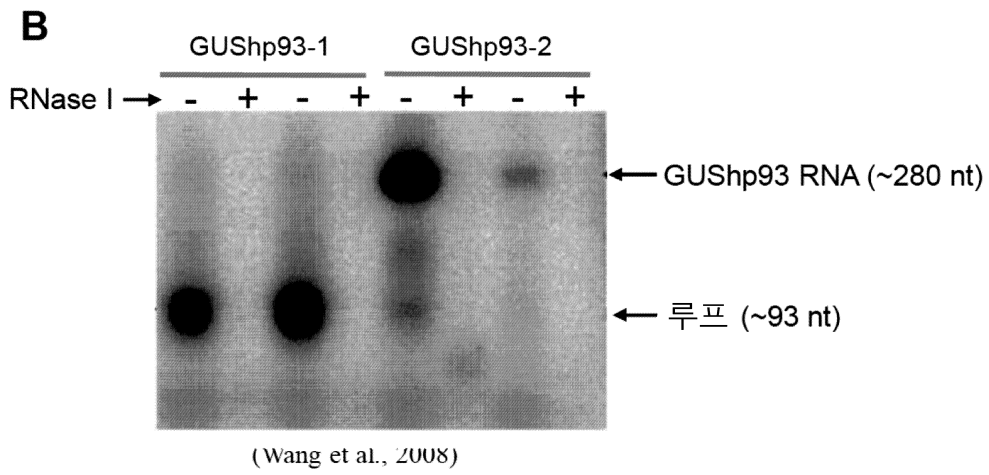
도면40



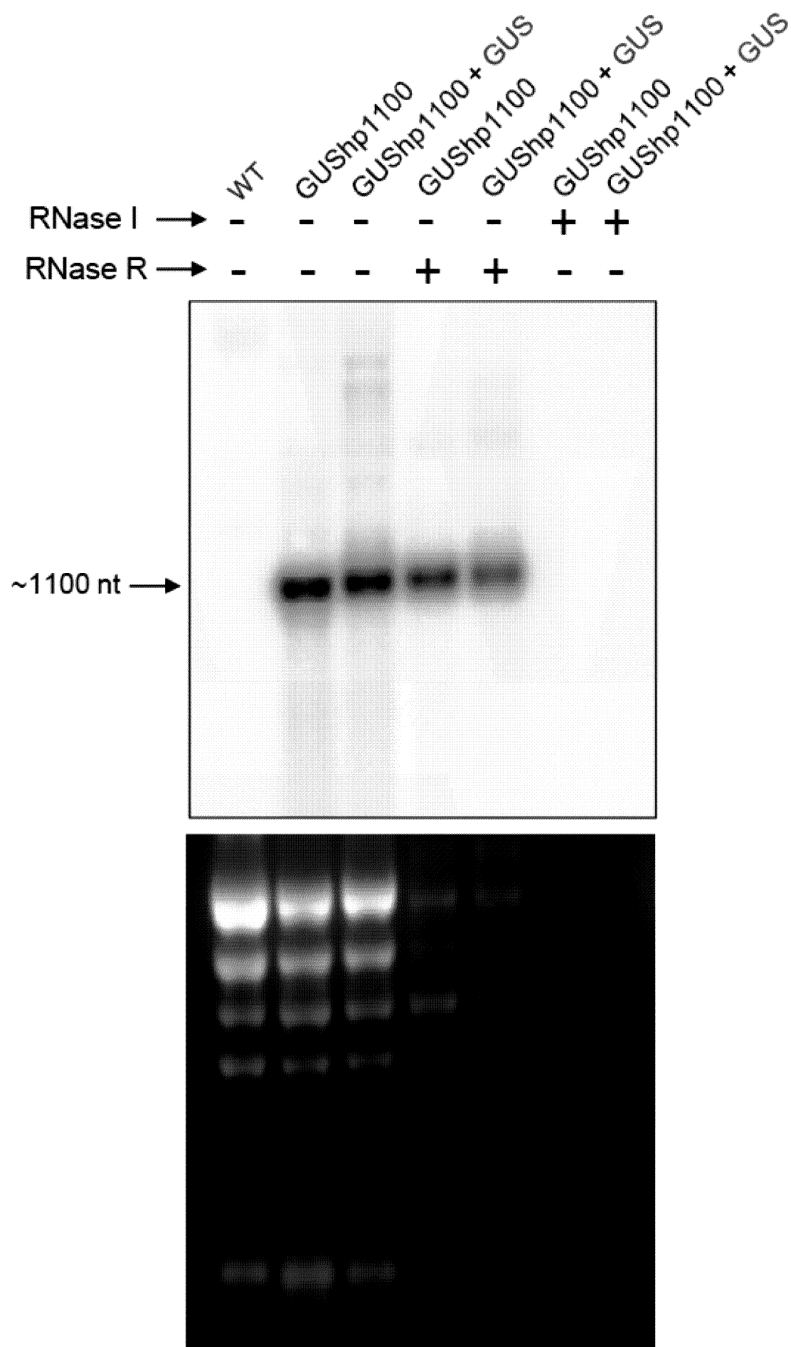
도면41a



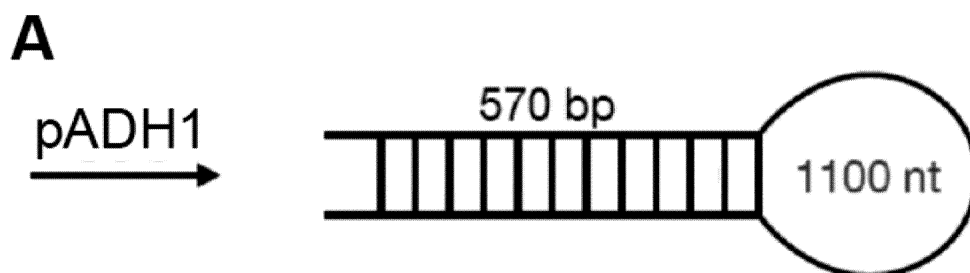
도면41b



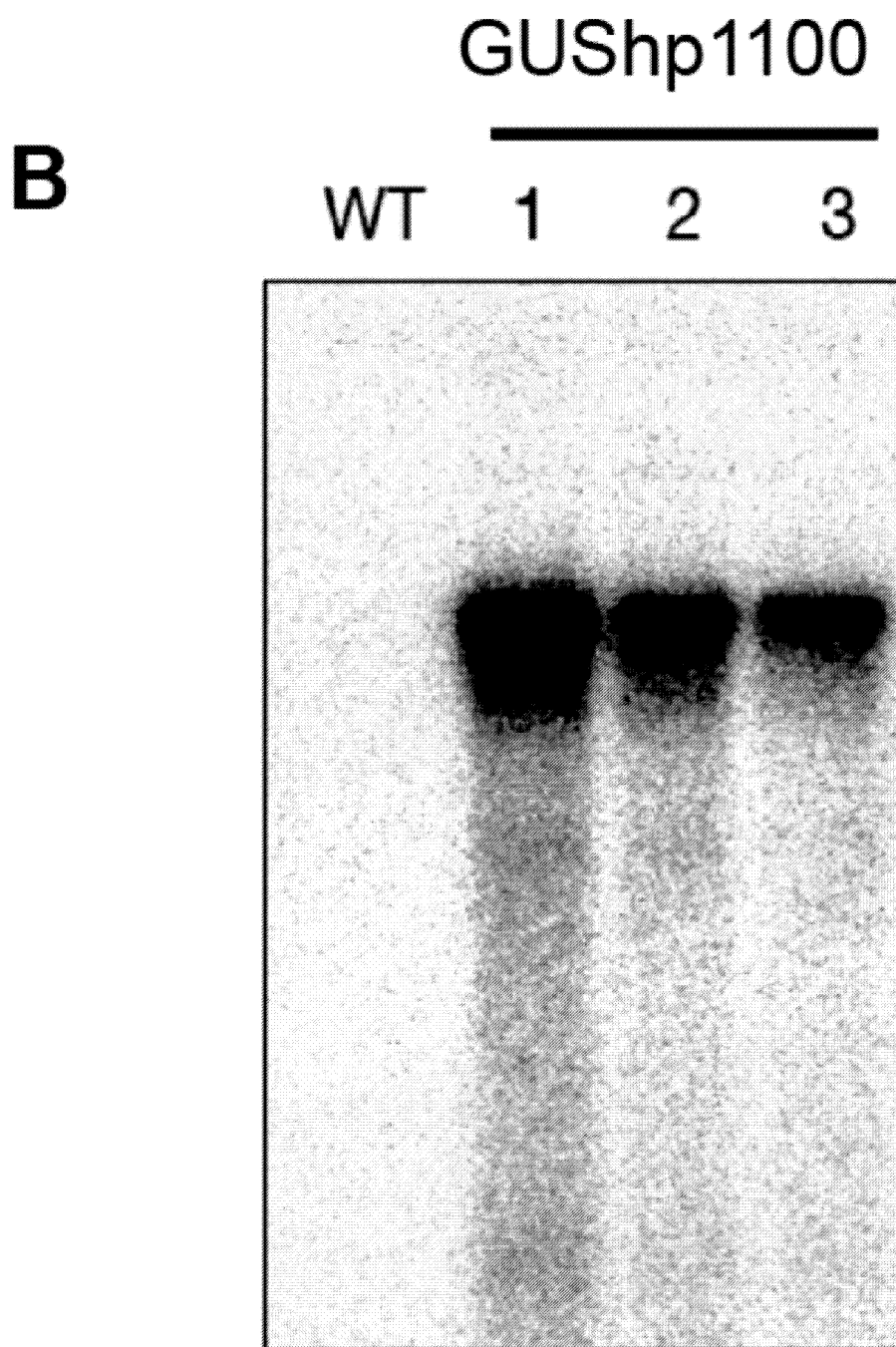
도면42



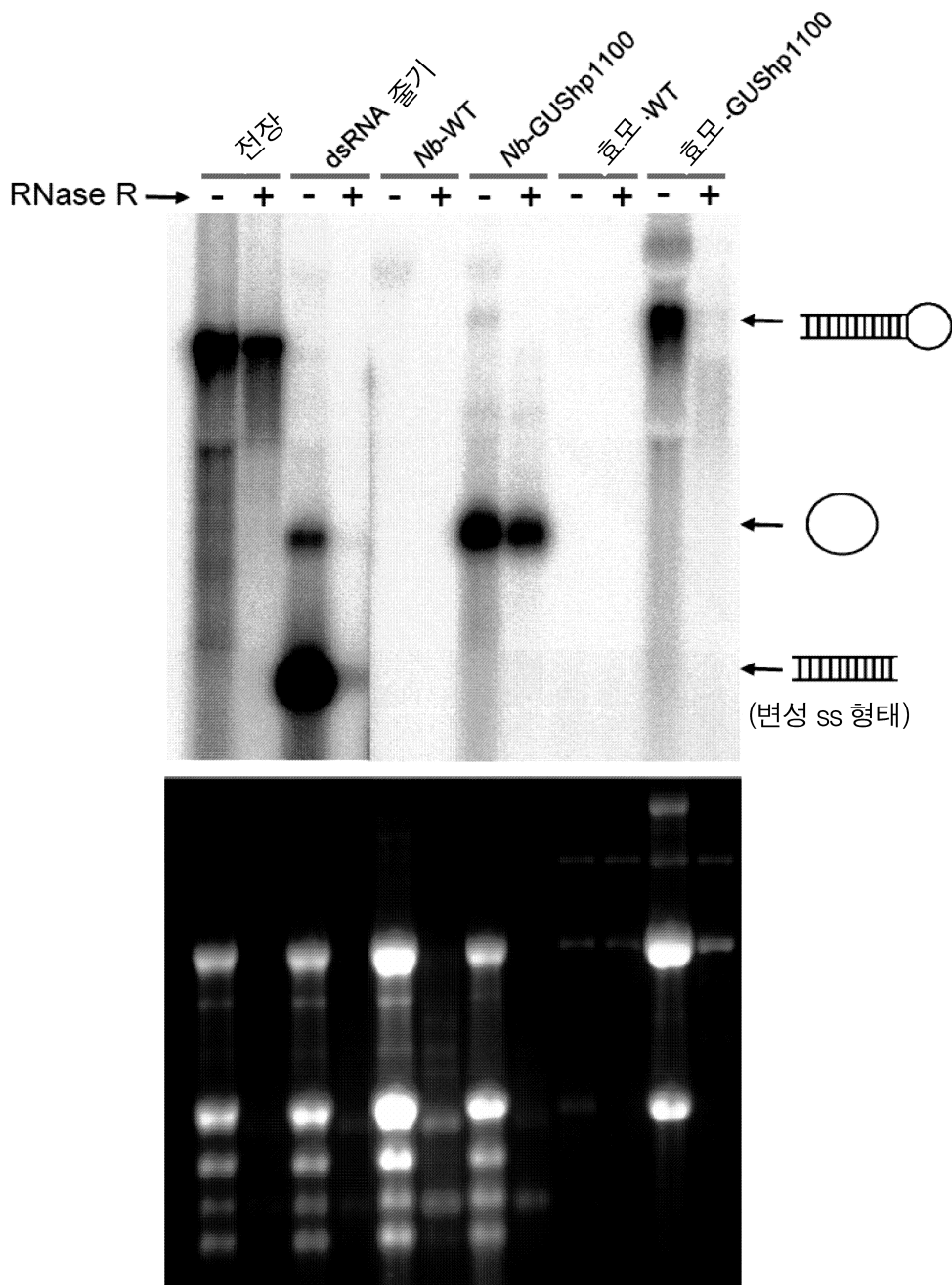
도면43a



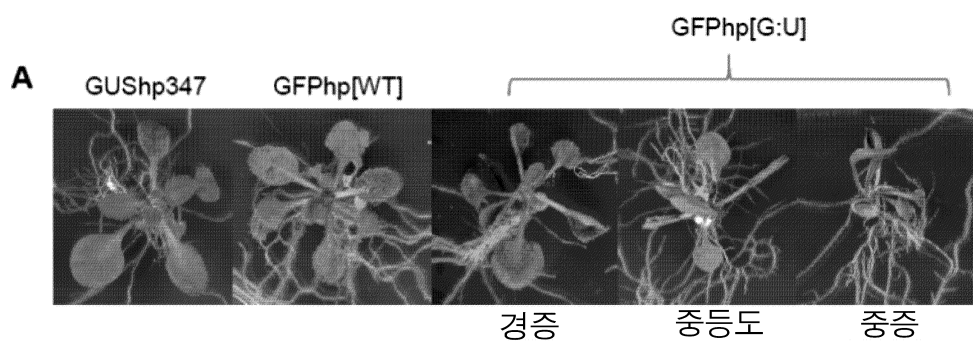
도면43b



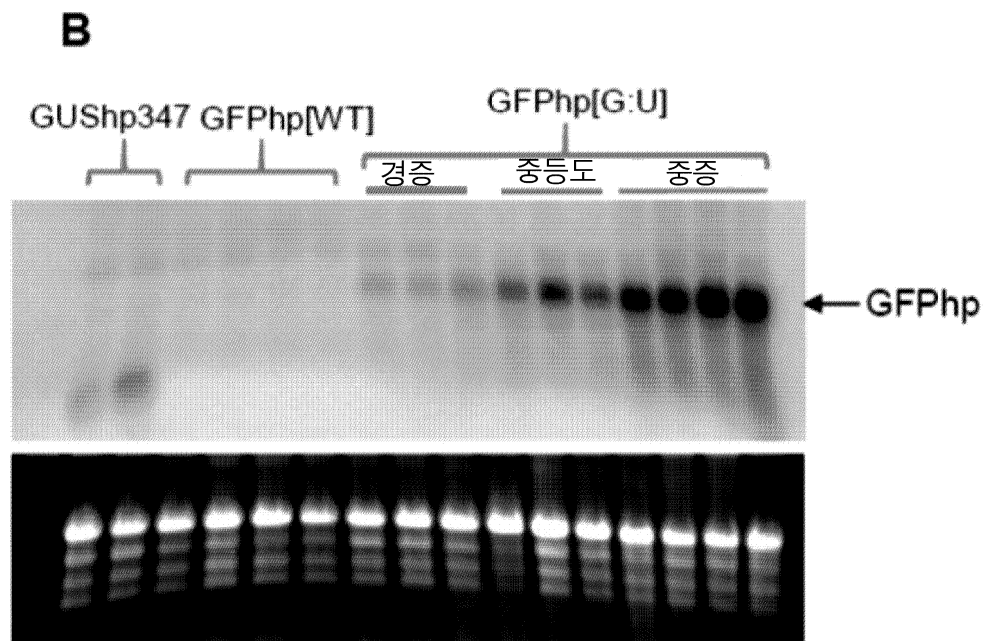
도면44



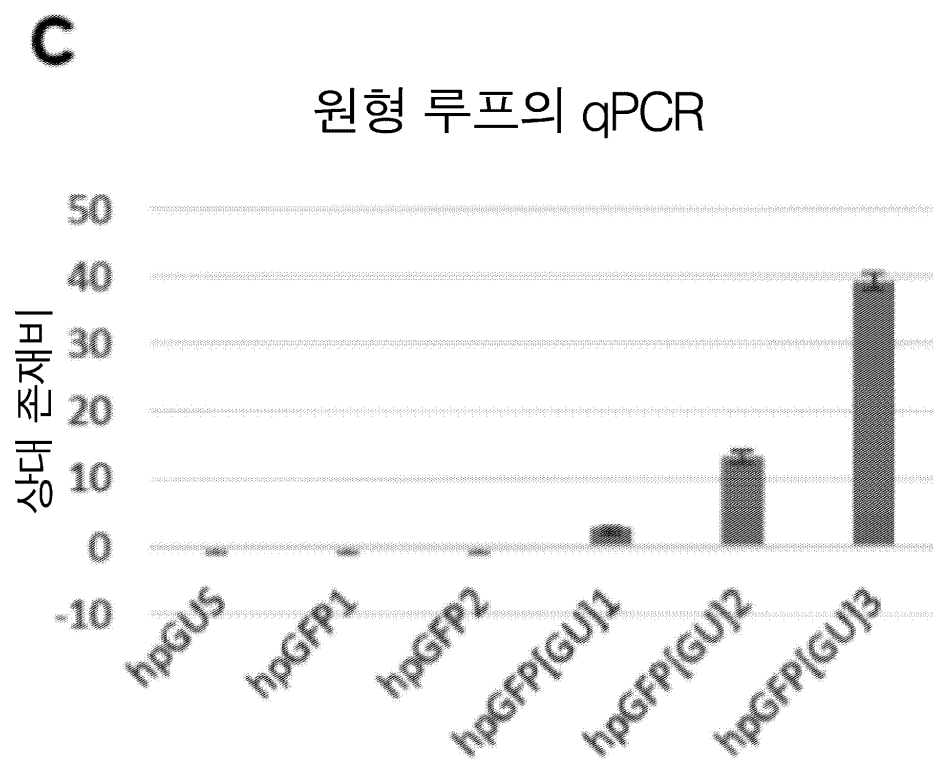
도면45a



도면45b



도면45c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research
Organisation

<120> RNA molecules comprising non-canonical base pairs

<130> 526425PCT
 <150> AU 2018902840
 <151> 2018-08-03
 <150> AU 2018902896
 <151> 2018-08-08
 <150> PCT/AU2018/051015
 <151> 2018-09-17
 <150> AU 2019900941
 <151> 2019-03-04
 <160> 144
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1229
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GFP ledRNA
 <400> 1

gggugucgcc cucgaacuuc accucggcgc gggucuugua guugccgucg uccuugaaga	60
agauggugcg cuccuggacg uagccuucgg gcauggcgga cuugaagaag ucgugcugcu	120
ucaugugguc gggguagcgg cugaagcacu gcacgccgua ggugaaggug gucacgaggg	180
ugggccaggg cagggcgagc uugccggugg ugcaugaagaa cuucaggguc agcuugccgu	240
agguggauc gccucgccc ucgccggaca cgcugaacuu guggccguuu acgucgccgu	300
ccagcugcag caggaugggc accaccccgg ugaacagcuc cucgcccug cucacuaugg	360
aucaacuagg gaucuccug aaguucauc gcaccaccgg caagcugccc gugccuggc	420
ccaccucgu gaccaccuuc accuacggcg ugcaugcuu cagccguac cccgaccaca	480
ugaagcagca cgacuucuc aaguccgcca ugcccgaagg cuacguccag gagcgacca	540
ucuucuucaa ggacgacggc aacuacaaga cccgcgccga ggugaaguuc gagggcgaca	600
cccuggugaa ccgcaucgag cugaagggca ucgacuuaa ggaggacggc aacaucgug	660
ggcacaagcu ggaguacaac uacaacagcc acaacgucua uaucauggcc gacaagcaga	720
agaacggcau caaggugaac uucaagauc gccacaacau cgaggacggc agcgugcagc	780
ucgccgacca cuaccagcag aacaccccca ucggcgacgg ccccgugcug cugccaagcu	840
uuaggugauc caagcuugau ccgggcuuaa cuuguacagc ucguccaugc cgagagugau	900

cccggcggcg gucacgaacu ccagcaggac caugugaucg cgcucucgu ugaggucuuu 960
 gcucaggggc gacugggugc ucagguagug guugucgggc agcagcacgg ggccgucgcc 1020
 gaugggggug uucugcuggu aguggucggc gagcugcacg cugccguccu cgauguugug 1080
 gcggaucuug aaguucaccu ugaugccguu cuucugcuug ucggccauga uauagacguu 1140
 guggcuguug uaguuguacu ccagcuugug cccaggaug uugccguccu ccuugaaguc 1200
 gaugcccuuc agcucgaugc gguucacca 1229

<210> 2

<211> 1326

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS 1edRNA

<400> 2

gggaacagac gcgugguuac agucuugcgc gacaugcguc accacgguga uaucguccac 60
 ccagguguuc ggcguggugu agagcauuac gcugcgauug auuccggcau aguuuaagaa 120
 aucauggaag uaagacugcu uuuucuugcc guuuucgucg guaaucacca uucccgcgcg 180
 gauagucugc caguucaguu cguuguucac acaaaggug auacguacac uuuucccggc 240
 aaauacauac ggcgugacau cggcuucaa uggcguauag ccgcccugau gcuccaucac 300
 uuccgauua uugaccaca cuuugccgua augagugacc gcaucgaaac gcagcacgau 360
 acgcuggccu gccaaccuu ucgguauaaa gacuucgcgc ugauaccaga cgugccguau 420

guuauugccg ggaaaagugu acguaucacc guuuguguga acaacgaacu gaacuggcag 480
 acuauccgc cggaauuggu gauuaccgac gaaaacggca agaaaaagca gucuuacuuc 540
 cauguuuu uuaacuaugc cggaauccau cgcagcguaa ugcucuacac cagccgaac 600
 accugggugg acgauaucac cguggugacg caugucgcgc aagacuguaa ccacgcgucu 660
 guuccgacu ggcagguggu ggccaauggu gaugucagcg uugaacugcg ugaugcggau 720
 caacaggugg uugcaacugg acaaggcacu agcgggacuu ugcaaguggu gaauccgcac 780
 cucuggcaac cgggugaagg uuaucucuau gaacugugcg ucacagcaa aagccagaca 840

gagugugaua ucuaccgcgc ucgcgucggc auccggucag uggcagugaa gggccaacag 900
 uuccgauua accacaaacc guucuacuuu acuggcuuug gucgucauga agauggcgac 960
 uuacuggca aaggauucga uaacgucgug auggugcacg accacgcauu aauggacugg 1020
 auuggggcca acuccuaccg uaccucgcau uaccuuuacg cugaagagau gcucgaugug 1080
 guuaucagg aacuguuggc ccuucacugc cacugaccgg augccgacgc gaagcgggua 1140
 gauaucacac ucugucuggc uuuuggcugu gacgcacagu ucauagagau aaccuucacc 1200

cgguugccag agguccggau ucaccacuug caaagucccg cuagugccuu guccaguugc	1260
aaccaccugu ugauccgcau cacgcaguuc aacgcugaca ucaccauugg ccaccaccug	1320
ccaguc	1326
<210> 3	
<211> 1485	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FAD2.1 ledRNA	
<400> 3	
gaagaucugu agccucucgc ggucauugua gauugggccg uaagggucau agugacaugc	60
aaagcgauca uaaugucggc cagaaacauu gaaagccaag uacaaaggcc agccaagagu	120
aaggguaguc gaaagugaaa uaaccgggcc ugguggauug uucaaguacu uggaauacca	180
uccgaguugu gauuucggcu uaggcacaaa aaccucaucg cgcucgagug agccaguguu	240
ggaguggugg cgacgaugac uauuuuucca agagaaguag ggcaccauca gagcagagug	300
gaggauaagc ccgacagugu caucaacca cugguaguca cuaaaggcau gguggccaca	360
uucgucgca auaacccaaa uaccagugca aacacaacc ugacaaauc aguaauagg	420
ccaugcaagg uagcaaucc aggcacucug cucugauggu gcccuacuuc ucuuggaaa	480
auagucaucg ucgccaccac uccaacacug gcucacucga gcgcgaugag guuuuuguc	540
cuaagccgaa aucacaacuc ggaugguauu ccaaguacuu gaacaaucca ccaggccggg	600
uuuuuucacu uacgaucacc cuuacucuug gcuggccuuu guacuuggcu uucaauuuu	660
cuggccgaca uuaugaucgc uuugcauguc acuaugacc uuacggccca aucuacaug	720
accgcgagag gcuacagauc uuccuuucug augcuggagu uauuggagcu gguuauucac	780
uauaucguau ugccuuggua aaaggguuag cuuggcucgu guguauguau ggcguaccac	840
uccuaaucgu gaacggcuuc cuugucuuga ucacuuuuu gcagcacacu caccgucac	900
ugccucacua cgauucaucc gaaugggauu ggcuaagggg agcuuuggca accgucgaca	960
gagacuauug cauucuaac aaggucucc acaacacac cgauacucac guaguccacc	1020
aucuguucuc gaccaugcca cacucuagag ugaugcuuca uuuuucca cauagauaca	1080
cucuuuugcu uccuccaca uugccuugaa aaccgggggu ccgucaauu gguaguaguc	1140
uccgaguaau ggcugacug cuuuuuguc cuccauugca uuguagugug gcauggucga	1200
gaacagaugg uggacuacgu gaguacggg gauguuggg aagaccuugu uuagaaugcc	1260
auagucucug ucgacgguug ccaaagcucc ccuagccaa ucccauucg augaaucgua	1320

gugaggcaau gacgggugag ugugcugcaa auaagugauc aagacaagga agccguucac 1380
 gauuaggagu gguacgccau acauacacac gagccaagcu agccuuuuu ccaaggcaau 1440
 acgauauagu agauaaccag cuccaauaac uccagcauca gaaag 1485

<210> 4

<211> 1258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA construct encoding GFP ledRNA

<400> 4

taatacgact cactataggg tgtcgccctc gaacttcacc tcggcgcggg tctttagtt 60
 gccgtcgcc ttgaagaaga tggcgctc ctggacgtag ccttcgggca tggcggactt 120
 gaagaagtcg tgctgcttca tgtggtcggg gtagcggtg aagcactgca cgccgtaggt 180
 gaaggtggtc acgagggtgg gccagggcac gggcagcttg ccggtggtgc agatgaactt 240
 cagggtcagc ttgccgtagg tggcatcgcc ctgcctcgc ccggacacgc tgaacttggt 300
 gccgtttacg tcgccgtcca gctcgaccag gatgggcacc accccggtga acagctcctc 360

gcccttgctc actatggatc aactagggat cccctgaag ttcattgca ccaccggcaa 420
 gtgcccgtg ccttgccca ccctcgtgac caccttcacc tacggcgtgc agtgcttcag 480
 ccgtacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta 540
 cgtccaggag cgcacatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt 600
 gaagttcag ggcgacacc tggtaaccg catcgagctg aaggcgatgc acttcaagga 660
 ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 720
 catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgc acaacatcga 780

ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac accccatcg gcgacggccc 840
 cgtgctgctg ccaagcttta ggtgatccaa gcttgatccg ggctttactt gtacagctcg 900
 tccatgccga gagtgatccc ggccggcgtc acgaactcca gcaggacat gtgatcgcg 960
 ttctcgttgg ggtctttgct cagggcggac tgggtgctca ggtagtggtt gtcgggcagc 1020
 agcacggggc cgtcgccgat ggggtgttc tgctggtagt ggtcggcgag ctgcacgtg 1080
 ccgtctcga tgtgtggcg gatcttgaag ttcacattga tgccgttctt ctgcttgctg 1140
 gccatgatat agacgttggt gctgtttag ttgtactcca gcttggtccc caggatgttg 1200

ccgtctcct tgaagtcgat gcccttcagc tcgatcggt tcaccattgt cgggatac 1258

<210> 5

<211> 1346

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA construct encoding Gus ledRNA

<400> 5

taatacgaact cactataggg aacagacgcg tggttacagt cttgcgcgac atgcgtcacc	60
acggtgatat cgiccaccca ggtgttcggc gtggtgtaga gcattacgt gcgatggatt	120
ccggcatagt taaagaaatc atggaagtaa gactgctttt tcttgccgtt ttcgtcggta	180
atcaccattc ccggcgggat agtctgccag ttcagtctgt tgttcacaca aacggtgata	240
cgtacacttt tcccggcaat aacatacggc gtgacatcgg cttcaaatgg cgtatagccg	300
ccctgatgct ccatcattc ctgattattg acccacactt tgccgtaatg agtgaccgca	360
tcgaaacgca gcacgatacg ctggcctgcc caacctttcg gtataaagac ttcgcgctga	420
taccagacgt gccgtatgtt attgccggga aaagtgtacg taccaccgtt tgtgtgaaca	480
acgaactgaa ctggcagact atcccgccgg gaattggtgat taccgacgaa aacggcaaga	540
aaaagcagtc ttacttccat gatttcttta actatgccgg aatccatcgc agcgtaatgc	600
tctacaccac gccgaacacc tgggtggacg atatcaccgt ggtgacgcat gtcgcgcaag	660
actgtaacca cgcgtctgtt cccgactggc aggtgggtggc caatggtgat gtcagcgttg	720
aactgcgtga tgcggatcaa caggtgggtg caactggaca aggcactagc gggactttgc	780
aagtggtgaa tccgcacctc tggcaaccgg gtgaaggtaa tctctatgaa ctgtgcgtca	840
cagccaaaag ccagacagag tgtgatattt acccgcttcg cgtcggcatc cggtcagtgg	900
cagtgaaggg ccaacagttc ctgattaacc acaaacgtt ctactttact ggctttggtc	960
gtcatgaaga tgcggactta cgtggcaaag gattcgataa cgtgctgatg gtgcacgacc	1020
acgcattaat ggactggatt ggggccaact cctaccgtac ctgcattac cttacgctg	1080
aagagatgct cgatgtggtt aatcaggaac tgttggccct tcactgccac tgaccggatg	1140
ccgacgcgaa gcggttagat atcacactct gtctggettt tggtgtgtac gcacagtcca	1200
tagagataac cttcaccggg ttgccagagg tgcggattca ccacttgcaa agtcccgcta	1260
gtgccttgtc cagttgcaac cacctgttga tccgcacac gcagtccaac gctgacatca	1320
ccattggcca ccacctgcca gtcaac	1346

<210> 6

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA construct encoding FAD2.1 ledRNA

<400> 6

atttaggtga cactatagaa gatctgtagc ctctcgcggt cattgtagat tgggccgtaa 60

gggtcatagt gacatgcaaa gcgatcataa tgcggccag aaacattgaa agccaagtac 120

aaaggccagc caagagtaag ggtgatcgta agtgaaataa cccggcctgg tggattgttc 180

aagtacttgg aataccatcc gagttgtgat ttcggcttag gcacaaaaac ctcatcgcg 240

tcgagtgagc cagtgttgga gtgggtggcg cgatgactat attccaaga gaagtagggc 300

accatcagag cagagtggag gataagcccg acagtgtcat caaccactg gtagtcacta 360

aaggcatggt ggccacattc gtgcgcaata acccaaatac cagtgcacaa acaacctga 420

caaatccagt aaataggcca tgcaaggtag caatcctagg cactctgctc tgatggtgcc 480

ctactttctt tggaatata gtcacgtcg ccaccactcc aacctggct cactcgagcg 540

cgatgaggtt ttgtgccta agccgaaatc acaactcgga tggattcca agtacttgaa 600

caatccacca ggccgggtta ttccacttac gatcacctt actcttggct ggcctttgta 660

cttggctttc aatgtttctg gccgacatta tgatcgctt gcatgtcact atgacctta 720

cggcccaatc tacaatgacc gcgagaggct acagatcttc ctttctgatg ctggagtat 780

tggagctggt tatctactat atcgattgc cttggtaaaa gggctagctt ggctcgtgtg 840

tatgtatggc gtaccactcc taatcgtgaa cggcttcctt gtcttgatca cttatttga 900

gcacactcac ccgtcattgc ctactacga ttcacccgaa tgggattggc taaggggagc 960

tttggcaacc gtcgacagag actatggcat tctaaacaag gtcttcaca acatcaccga 1020

tactcacgta gtccaccatc tgttctcgac catgccacac tctagagtga tgcttcatct 1080

ttctcccat agatacactc ttttcttcc ctccacattg ccttgaaaac cggggttccg 1140

tcaaattggt agtagtctcc gagtaatggc ttgactgctt ttgttgctc cattgcattg 1200

tagtgtggca tggtcgagaa cagatgggtg actacgtgag tatcggtgat gttgtggaag 1260

accttgttta gaatgccata gtctctgtcg acggttgcca aagctccct tagccaatcc 1320

cattcggatg aatcgtagtg aggcaatgac gggtagtgt gctgcaaata agtgatcaag 1380

acaaggaagc cgttcacgat taggagtggc acgccataca tacacacgag ccaagctagc 1440

ccttttacca aggcaatacg atatagtaga taaccagctc caataactcc agcatcagaa 1500

agcccgggac tc 1512

<210> 7

<211> 732

<212> DNA

<213> Aequorea victoria

<400> 7

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca cttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca ccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatac actctcggca tggacgagct gtacaagtaa	720
agcccggatac tc	732

<210> 8

<211> 1855

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

atggtccgtc ctgtagaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca	60
ttcagtcgtg atcgcaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacia	120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagc tttacgatac agttcgccga tgcagatatt	180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca	240
ggccagcgta tcgtgctgctg tttcgtatcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat	300
aatcaggaag tgatggagca tcaggcgccg tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg	360
tatgttattg ccgggaaaaa tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg	420
cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac	480
ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgacgcg taatgctcta caccagccg	540
aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg	600
tctgttcccc actggcaggt ggtggccaat ggtgatgtca gcgttgaact gcgtgatgcg	660

gatcaacagg tggttgcaac tggacaaggc actagcggga ctttgcaagt ggtgaatccg	720
cacctctggc aaccgggtga aggttatctc tatgaactgt gcgtcacagc caaaagccag	780
acagagtgtg atatctaccc gcttcgcgtc ggcatccggt cagtggcagt gaagggccaa	840
cagttctctga ttaaccacaa accgttctac ttactggct ttggctgtca tgaagatgcg	900
gacttacgtg gcaaaggatt cgataacgtg ctgatgggtgc acgaccacgc attaatggac	960
tggattgggg ccaactccta ccgtacctcg cattaccctt acgtgaaga gatgctcgac	1020
tgggcagatg aacatggcat cgtgggtgatt gatgaaactg ctgctgtcgg ctttaacctc	1080
tcttttaggca ttggtttcga agcgggcaac aagccgaaag aactgtacag cgaagaggca	1140
gtcaacgggg aaactcagca agcgcaactta caggcgatta aagagctgat agcgctgac	1200
aaaaaccacc caagcgtggt gatgtggagt attgccaacg aaccggatac ccgtccgcaa	1260
gtgcacggga atatttcgcc actggcggaa gcaacgcgtg aactcgaccc gacgcgtccg	1320
atcacctcgc tcaatgtaat gttctgcgac gctcacaccg ataccatcag cgatctcttt	1380
gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatatgtc aaagcggcga ttggaacg	1440
gcagagaagg tactggaaaa agaacttctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt	1500
atcatcaccg aatacggcgt ggatacgtta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg	1560
tggagtgaag agtatcagtg tgcattggctg gatatgtatc accgcgtctt tgatcgcgtc	1620
agcgccgtcg tcggtgaaca ggtatggaat ttgcgcgatt ttgcgacctc gcaaggcata	1680
ttgcgcgttg gcggtaacaa gaaagggatc ttactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg	1740
gcttttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcaggga	1800
ggcaacaat gaatcaacaa ctctcctggc gcaccatcgt cggctacagc ctcgg	1855
<210> 9	
<211> 1152	
<212> DNA	
<213> Nicotiana benthamiana	
<400> 9	
atgggagctg gtggtaatat gtctcttgta accagcaaga ctggcgaaaa gaagaatcct	60
cttgaaggagg taccaacctc aaagcctcct ttcacagtgt gtgatataca gaaggccatc	120
ccacctcact gccttcagcg gtctctcggt cgttcgttct cctatgttgt gtatgacctt	180
ttactgggtg ccgtcttcta ctacattgcc accatttact tccacctcct cccgtcccca	240
tattgtctacc ttgcatggcc tattttactgg atttgtcagg gttgtgtttg cactggtatt	300
tgggttattg cgcacgaatg tggccacat gcctttagtg actaccagtg ggttgatgac	360

actgtcgggc ttatcctcca ctctgctctg atgggtgccct acttctcttg gaaatatagt 420
catcgtcgcc accactccaa cactggctca ctcgagcgcg atgaggtttt tgtgcctaag 480
ccgaaatcac aactcggatg gtattccaag tacttgaaca atccaccagg ccgggttatt 540
tcacttacga tcaccttac tcttggtctg cttttgtact tggctttcaa tgtttctggc 600
cgacattatg atcgctttgc atgtcactat gaccttacg gcccaatcta caatgaccgc 660
gagaggctac agatcttctt tctgatgct ggagttattg gagctggtta tctactatat 720

cgtattgcct tggtaaaagg gctagcttgg ctctgtgtga tgtatggcgt accactccta 780
atcgtgaacg gcttcttctt cttgatcact tatitgcagc acactcaccc gtcattgcct 840
cactacgatt catccgaatg ggattggcta aggggagctt tggcaaccgt cgacagagac 900
tatggcattc taaacaaggt cttccacaac atcaccgata ctacgtagt ccaccatctg 960
ttctcgacca tgccacacta caatgcaatg gaggaacaa aagcagtcaa gccattactc 1020
ggagactact accaatttga cggaaccccg gttttcaagg caatgtggag ggaagcaaaa 1080
gagtgtatct atgtggagaa agatgaagca tcacaaggca aaggigtgtt ctggtacaaa 1140

aacaaattct ga 1152

<210> 10

<211> 225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for constructs encoding hairpin RNA molecules
targeting the GUS mRNA

<400> 10

cctcgaggat cctcgctcgc gcatccggtc agtggcagtg aaggcgcaac agttcctgat 60
taaccacaaa ccgttctact ttactggctt tggtcgtcat gaagatgcgg acttgcgtgg 120
caaaggattc gataacgtgc tgatggtgca cgaccagca ttaatggact ggattggggc 180
caactcctac cgtacctcgc attaccctta cgaagcttgg taccc 225

<210> 11

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for the construct encoding the hairpin RNA
molecule hpGUS[G:U]

<400> 11

ccctcgagtt gtgttggat ttggttatgt gtagtgaagg gtgaatagtt ttgattaat 60
tataaattgt tttattttat tggttttggt tgttatgaag atgtggattt gtgtggtaaa 120
ggatttgata atgtgttgat ggtgtatgat tatgtattaa tggattggat tggggttaat 180
ttttattgta ttttgtatta tttttatggg tacccc 216

<210> 12

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for constructs encoding the hairpin RNA molecule
hpGUS[1:4]

<400> 12

ccctcgagtc ggggccgcaa ccgctcactg ggagtcaagc gcgtacactt cgtgaataag 60
cactaacggt tgtacattag tgggtttcgt cctcaagaac atggggagtt gggtgccaat 120
ggaatcgta aggtggtgaa ggtccaccac ctgcgtttat tggctgcat tcggggcaag 180
tccaacccta cgtcggattt cccataccgg tacccc 216

<210> 13

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for constructs encoding the hairpin RNA molecule
hpGUS[2:10]

<400> 13

ccctcgagtc gcgtcgcgat ccggtctctg gcagtgttgg gcgaactctt cctgatatac 60
caciaagggt tctactaac tggcttacgt cgcatctag atgcggtgtt gcgtgggtaa 120
ggattcctta acgtgcacat ggtgcagcac cacgcaaaaa tggactccat tggggcgta 180
tcctacgcta cctcgctata cccttagcgg tacccc 216

<210> 14

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of nucleotides 781-1020 of the protein coding region

of the GUS gene

<400> 14

gagtgtgata tctacccgct tcgctcggc atccggtcag tggcagtga gggcgaacag	60
ttcttgatta accacaaacc gttctacttt actggctttg gtcgtcatga agatgcggac	120
ttgcgtggca aaggattcga taacgtgctg atgggtgcacg accacgcatt aatggactgg	180
attggggcca actcctaccg tacctcgcat tacccttacg ctgaagagat gctcgactgg	240

<210> 15

<211> 463

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[wt] RNA

<400> 15

ggauccugc gucggcaucc ggucaguggc agugaagggc gaacaguucc ugauuaacca	60
caaaccguuc uacuuuacug gcuuuggucg ucaugaagau gcggaacuugc guggcaaagg	120
auucgauaac gucgugaugg ugcacgacca cgcauuuaug gacuggauug gggccaacuc	180
cuaccguacc ucgcauuacc cuuacgaagc uugguacccc agcuuguugg gaagcugggu	240
ucgaaaucga uaagcuucgu aaggguuaug cgagguacgg uaggaguugg ccccaaucca	300
guccauuaau gcguggucgu gcaccaucag cacguuaucg aauccuuugc cacgcaaguc	360
cgcaucuua ugacgaccaa agccaguaaa guagaacggg uugugguuua ucaggaacug	420
uucgcccuc acugccacug accggaugcc gacgcgagga ucc	463

<210> 16

<211> 457

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[G:U] RNA

<400> 16

cucgaguugu guugguauuu gguuaguggu agugaagggu gaauaguuuu ugauuaauua	60
uaauuuguuu uauuuuauug guuuugguug uuaugaagau guggauuugu gugguaaagg	120
auuugauaa uuguugaugg uguaugauua uguauuaaag gauuggauug ggguaauuuu	180
uuauuguauu uuguauuaau uuuaugggua cccagcuug uugggaagcu gguucgaaa	240
ucgauaagcu ucguaagggu aaugcgaggu acgguaggag uggccccaa uccaguccau	300
uaaugcgugg ucgugcacca ucagcacguu aucgaauccu uugccacgca aguccgcauc	360
uucaugacga ccaaagccag uaaaguagaa cgguuugugg uuaaucagga acuguucgcc	420

cuucacugcc acugaccgga ugccgacgcg aggaucc 457

<210> 17

<211> 457

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[1:4] RNA

<400> 17

cucgagucgg guccgcaacc gcucacuggg agucaagcgc guacacuucg ugaauaagca 60

cuaacggguug uacauuagug gguuucgucc ucaagaacau ggggaguugg gugccaaugg 120

aaucguuaag guggugaagg uccaccaccu cgcuuuauug gucugcauuc ggggcaaguc 180

caaccuacg ucggauuucc cauaccgua cccagcuug uugggaagcu gggguucgaaa 240

ucgauaagcu ucguaagggu aaugcgaggu acgguaggag uggccccaa uccaguccau 300

uaaugcgugg ucgugcacca ucagcacguu aucgaaucuu uggccacgca aguccgcauc 360

uucaugacga ccaaagccag uaaaguagaa cgguuugugg uaaucagga acuguucgcc 420

cuucacugcc acugaccgga ugccgacgcg aggaucc 457

<210> 18

<211> 457

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[2:10] RNA

<400> 18

cucgagucgc gucgcaucc ggucucuggc aguguugggc gaacucuucc ugauauacca 60

caaagggguuc uacuaaacug gcuuacgucg ucaucuagau gcggguugc guggguaagg 120

auuccuuaac gugcacaugg ugcagacca cgcaaaaug gacuccauug gggcguauc 180

cuacgcuaacc ucgcuauacc cuuagcggua cccagcuug uugggaagcu gggguucgaaa 240

ucgauaagcu ucguaagggu aaugcgaggu acgguaggag uggccccaa uccaguccau 300

uaaugcgugg ucgugcacca ucagcacguu aucgaaucuu uggccacgca aguccgcauc 360

uucaugacga ccaaagccag uaaaguagaa cgguuugugg uaaucagga acuguucgcc 420

cuucacugcc acugaccgga ugccgacgcg aggaucc 457

<210> 19

<211> 4851

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

atctctctct ttcgatggaa ctgagctctt tctctctttc ctctctcttt ctctctctat	60
ctctatctct cgtagcttga taagagtttc tctcttttga agatccgttt ctctctctct	120
cactgagact attgttgta ggtcaacttg cgatcatggc gatttcgaag gtctgaagct	180
gatttcgaat ggtttgaga tatccgtagt ggttaagcat atggaagtct atgttctgct	240
cttggttgct ctgttagggc ttcctccatt tggaccaact tagctgaatg ttgtatgac	300
tctctccttg aagcagcaaa taagaagaag gtctggtcct taacttaaca tctggttact	360
agaggaaact tcagctatta ttaggtaaag aaagactgta cagagtgtga taacaagtaa	420
gcgttagagt ggctttgttt gcctcgggta tagaagaacc gactgattcg ttgttgtgtg	480
ttagctttgg agggaatcag atttcgcgag ggaaggtgtt ttagatcaaa tctgtgaatt	540
ttactcaact gaggccttta gtgaaccacg actgtagagt tgaccttgaa tcctactctg	600
agtaattata ttatcagata gatttaggat ggaagctgaa attgtgaatg tgagacctca	660
gctagggttt atccagagaa tggttcctgc tctacttctt gtctttttgg tttctgtcgg	720
atataattgat cccgggaaat ggggtgcaaa tatcgaagga ggtgctcgtt tcgggtatga	780
cttggtggca attactctgc ttttcaattt tgccgccatc ttatgccaat atgttcagac	840
tcgcataagc gttgtgactg gtaaacactt ggctcagatc tgcaatgaag aatatgacaa	900
gtggacgtgc atgttcttgg gcattcaggc ggagttctca gcaattctgc tcgaccttac	960
catggttgtg ggagttgcgc atgcacttaa cttttgttt ggggtggagt tatccactgg	1020
agtgtttttg gccgccatgg atgcgttttt atttctgtt ttcgcctctt tccttgaaaa	1080
tggtatggca aatacagtat ccatttactc tgcaggcctg gtattacttc tctatgtatc	1140
tggcgtcttg ctgagtcagt ctgagatecc actctctatg aatggagtgt taactcggtt	1200
aatggagag agcgcatcgc cactgatggg tcttcttggc gcaagcatcg tccctcacia	1260
tttttatatc cattcttatt ttgctgggga aagtacatct tcgtctgatg tcgacaagag	1320
cagcttgtgt caagaccatt tgttcgcat ctttggtgtc ttcagcggac tgtcacttgt	1380
aaattatgta ttgatgaatg cagcagctaa tgtgtttcac agtactggcc ttgtgttact	1440
gacttttcac gatgccttgt cactaatgga gcaggatatt atgagtcgc tcattccagt	1500
ggctcttttg atgctcttgt tcttctctag tcaaattacc gcactagctt gggctttcgg	1560
tggagaggtc gtcttgcacg acttctctgaa gatagaaata cccgcttggc ttcactgtgc	1620
tacaatcaga attcttgcag ttgctcctgc gctttattgt gtatggacat ctggtgcaga	1680
cggaatatac cagtactta tattcaccca ggtcttgggtg gcaatgatgc ttccttgctc	1740

ggtaataaccg cttttccgca ttgcttcgtc gagacaaatc atgggtgtcc ataaaatccc	1800
tcaggttggc gagttcctcg cacttacaac gtttttggga tttctggggg tgaatgttgt	1860
ttttgttgtt gagatggtat ttgggagcag tgactgggct ggtggtttga gatggaatac	1920
cgtgatgggc acctcgattc agtacaccac tctgcttgta tcgtcatgtg catccttatg	1980
cctgatactc tggctggcag ccacgccgct gaaatctgcg agtaacagag cggaagctca	2040
aatatggaac atggatgctc aaaatgcttt atcttatcca tctgttcaag aagaggaaat	2100
tgaagaaca gaaacaagga ggaacgaaga cgaatcaata gtgcggttgg aaagcagggt	2160
aaaggatcag ttggatacta cgtctgttac tagctcggtc tatgatttgc cagagaacat	2220
tctaattgacg gatcaagaaa tccgttcgag cctccagag gaaagagagt tggatgtaaa	2280
gtactctacc tctcaagtta gtagtcttaa ggaagactct gatgtaaagg aacagtctgt	2340
attgcagtca acagtggtta atgaggtcag tgataaggat ctgattgttg aaacaaagat	2400
ggcgaaaatt gaaccaatga gtccgttgga gaagattgtt agcatggaga ataacagcaa	2460
gtttattgaa aaggatgttg aaggggtttc atgggaaaca gaagaagcta ccaaagctgc	2520
tcctacaagc aactttactg tcggatctga tggctcctct tcattccgca gcttaagtgg	2580
ggaaggggga agtgggactg gaagcctttc acggttgcaa ggtttgggac gtgctgcccc	2640
gagacactta tctgcgatcc ttgatgaatt ttggggacat ttatatgatt ttcattgggca	2700
attggttgct gaagccaggg caaagaaact agatcagctg tttggcactg atcaaaagtc	2760
agcctcttct atgaaagcag attcgttttg aaaagacatt agcagtggat attgcatgtc	2820
accaactgcg aagggaatgg attcacagat gacttcaagt ttatatgatt cactgaagca	2880
gcagaggaca ccgggaagta tcgattcggt gtatggatta caaagagggt cgtcaccgtc	2940
accgttggtc aaccgtatgc agatgttggg tgcatatggt aacaccacta ataataataa	3000
tgcttacgaa ttgagtgaga gaagatactc tagcctgcgt gctccatcat cttcagaggg	3060
ttgggaacac caacaaccag ctacagttca cggataccag atgaagtc atgtagacaa	3120
tttggcaaaa gaaaggcttg aagccttaca atcccgtgga gagatcccga catcgagatc	3180
tatggcgctt ggiacattga gctatacaca gcaacttgct ttagccttga aacagaagtc	3240
ccagaatggt ctaaccctg gaccagctcc tgggtttgag aattttgctg ggtctagaag	3300
catatcgca caatctgaaa gatcttatta cgggtgtcca tcttctggca atactgatac	3360
tgttggcgca gcagttagcca atgagaaaaa atatagtagc atgccagata tctcaggatt	3420
gtctatgtcc gcaaggaaca tgcatttacc aaacaacaag agtggatact gggatccgtc	3480
aagtggagga ggagggtatg gtgcgtctta tggtcggtta agcaatgaat catcgttata	3540

ttctaatttg gggtcacggg tgggagtacc ctgcacttat gatgacattt ctcaatcaag	3600
aggaggctac agagatgcct acagtttgcc acagagtga acaacaggga ccggatcgct	3660
ttggtccaga cagccctttg agcagtttgg tgtagcggag aggaatggtg ctgttggatga	3720
ggagctcagg aatagatcga atccgatcaa tatagacaac aacgcttctt ctaatgttga	3780
tgcagaggct aagcttcttc agtcgttcag gcactgtatt cttaaactta ttaaacttga	3840
aggatccgag tggttgtttg gacaaagcga tggagttgat gaagaactga ttgaccgggt	3900
agctgcacga gagaagtta tctatgaagc tgaagctcga gaaataaacc aggtgggtca	3960
catgggggag ccactaattt catcggttcc taactgtgga gatggttgcg ttggagagc	4020
tgatttgatt gtgagctttg gagtttggig cattcacctg gtccttgact tgtctctcat	4080
ggagagtcgg cctgagcttt ggggaaagta cacttacgtt ctcaaccgcc tacaggaggt	4140
gattgatccg gcgttctcaa agctcgggac accaatgaca ccgtgctttt gccttcagat	4200
tccagcgagc caccagagag cgagtcggac ttcagctaac ggaatgttac ctccggctgc	4260
aaaaccggct aaaggcaaat gcacaaccgc agtcacactt cttgatctaa tcaaagacgt	4320
tgaaatggca atctcttgta gaaaaggccg aaccggtaca gctgcaggtg atgtggcttt	4380
cccaaagggg aaagagaatt tggcttcggt ttgaagcgg tataaacgtc ggttatcgaa	4440
taaaccagta ggtatgaatc aggatggacc cggttcaaga aaaaactga ctgcgtacgg	4500
atcattgggt tgaagaagaa gaacatttg agaaatctca tgatcaaagt gacgtcgaga	4560
gggaagccga agaatacaaa ctctcgcttt tgattgctcc tctgcttcgt taattgtgta	4620
ttaagaaaag aagaaaaaaa atggattttt gttgcttcag aatttttcgc tcttttttc	4680
ttaatttgggt tgtaatgtta tgtttatata catatatcat catcatagga ccatagctac	4740
aaaccgaatc cggtttgtgt aattctatgc ggaatcataa agaaatcgtc ggtttgaaat	4800
gttaaatctc ctaaaccgga tctctgcacg tagctgacac atcgacgta g	4851
<210> 20	
<211> 1703	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 20	
gttgcaaata tataaatcaa tcaaaagatt taaaaccac cattcaatct tggtaagtaa	60
cgaaaaaaa gggaagcaag aagaaccaca gaaaaggggg ctaacaacta gacacgtaga	120
tcttcatctg cccgtccatc taacctacca cactctcacc ttctttttcc cgtgtcagtt	180
tgttatataa gctctcactc tccgtatata ttccaaatac acctaaacttg tttagtacac	240

aacagcaaca tcaaactcta ataaacccaa gttggtgtat actataatgg tgatggctgg 300
 tgctttcttct ttggatgaga tcagacaggc tcagagagct gatggacctg caggcatctt 360

 ggctattggc actgctaacc ctgagaacca tgtgtctcag gcggagtatc ctgactacta 420
 ctccgcatac accaacagtg aacacatgac cgacctcaag gagaagttca agcgcatgtg 480
 cgacaagtgc acaattcgga aacgtcacat gcatctgacg gaggaattcc tcaaggaaaa 540
 cccacacatg tgtgtcttaca ttggtccttc tctggacacc agacaggaca tcgtggtggt 600
 cgaagtcctt aagctaggca aagaagcggc agtgaaggcc atcaaggagt ggggccagcc 660
 caagtcaaag atcactcatg tcgtcttctg cactacctcc ggctgcgaca tgcctggtgc 720
 tgactaccag ctcaccaagc ttcttggctc ccgtccttcc gtcaagcgtc tcatgatgta 780

 ccagcaaggt tgcttcgccc gcggtactgt cctccgtatc gctaaggatc tcgccgagaa 840
 caatcgtgga gcacgtgtcc tcgttgtctg ctctgagatc acagccgtta ccttcctggt 900
 tccctctgac acccaccttg actccctcgt cggtcaggct cttttcagtg atggcccgcc 960
 cgcactcatt gtggggtcgg accctgacac atctgtcggg gagaaacca tctttgagat 1020
 ggtgtctgcc gtcagacca tccttcagga ctctgatggt gccatagacg gacatttgag 1080
 ggaagttggt ctcaccttcc atctcctcaa ggatgttccc ggctcatct ccaagaacat 1140
 tgtgaagagt ctagacgaag cgtttaaac tttggggata agtgactgga actccctctt 1200

 ctggatagcc caccctggag gtccagcgat cctagaccag gtggagataa agctaggact 1260
 aaaggaagag aagatgaggg cgacacgtca cgtgttgagc gagtatggaa acatgtcgag 1320
 cgcgtgcgtt ctcttcatac tagacgagat gaggaggaag tcagctaagg atggtgtggc 1380
 cagcacagga gaagggttgg agtggggtgt cttgtttggt ttcggaccag gtctcactgt 1440
 tgagacagtc gtcttcaca gcgttcctct ctaaacagaa cgcttgcctt ctatctgcct 1500
 acctacctac gcaaaacttt aatcctgtct tatgttttat ataataat cattatatgt 1560
 ttacgaata attaaggaag aattcatttg atgtgatatg tgatatgtgc tggacaggtc 1620

 tattcgactg tttttgtact ctcttttttg tgccttttta caatattaaa tctatgggtc 1680
 ttgaatgaca tcaaatcttt gtt 1703

 <210> 21
 <211> 229
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 21
 cctcgaggat cctctagacc tcagctaggg tttatccaga gaatggttcc tgctctactt 60

cctgtccttt tggtttctgt cggatatatt gatcccggga aatgggttgc aaatatcgaa 120
ggaggtgctc gtttcgggta tgacttggtg gcaattactc tgcttttcaa ttttgccgcc 180
atcttatgcc aatatgttgc agctcgcata agcgttaagc ttggtaccc 229

<210> 22

<211> 218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment comprising the 200nt sense sequence of EIN2

<400> 22

cctcgagtct agattttagt tagggtttat ttagagaatg gttttgttt tttttttgt 60
ttttttggtt tttgttgat atattgattt tgggaaatgg gttgtaaata ttgaaggagg 120
tgtttgtttt gggatgatt tggtagtaat tttttgttt ttttaatttg ttgttatttt 180
atgttaatat gtttagttt gtataagtgt tggtagcc 218

<210> 23

<211> 230

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

cctcgaggat ccgttgtctg ctctgagatc acagccgtta ccttccgtgg tccctctgac 60
accaccttg actccctcgt cggtcaggct cttttcagt atggcgccgc cgcactcatt 120
gtggggtcgg accctgacac atctgtcgga gagaaacca tctttgagat ggtgtctgcc 180
gtcagacca tccctccaga ctctgatggt gctctagaag cttggtaccc 230

<210> 24

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment comprising the 200nt sense sequence of CHS

<400> 24

cctcgagggt gtttgttttg agattatagt tgtattttt tgtggttttt ttgatattta 60

ttttgatttt tttgttggtt aggttttttt tagtgatggt gttgttgtat ttattgtggg 120
gttggaattt gatataattg ttggagagaa atttattttt gagatggtgt ttgttgttta 180
gattattttt ttagattttg atggtgtcta gaggtaccc 219

<210> 25
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fragment comprising the 200nt antisense sequence of EIN2
 <400> 25
 caagcttaat gtttatgtga gttgtaatat attggtataa gatggtggta aaattgaaaa 60
 gtagagtaat tgttattaag ttatatattga aatgagtatt ttttttgata ttgtgaattt 120

 attttttggg attaatatat ttgatagaaa ttaaaaggat aggaagtaga gtaggaatta 180
 ttttttggat aaattttagt tgaggttcta gaggatccc 219
 <210> 26
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fragment comprising the 200nt antisense sequence of CHS
 <400> 26
 caagcttcta gagtattatt agagtttgga aggatggttt gagtggtaga tattatttta 60
 aagatgggtt ttttttggat agatgtgtta gggtttgatt ttataatgag tgtgggtgtg 120
 ttattattga aaagagtttg attgatgagg gagttaaggt ggggtttaga gggattatgg 180

 aaggtaatgg ttgtgatttt agagtagata atggatccc 219
 <210> 27
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 27
 agtaattata ttatcagata gatttaggat ggaagctgaa attgtgaatg tgagacctca 60
 gctagggttt atccagagaa tggttcctgc tctacttct gtccttttgg tttctgtcgg 120
 atatattgat cccgggaaat gggttgcaaa tatcgaagga ggtgctcgtt tcgggtatga 180
 cttggtggca attactctgc ttttcaattt tgccgccatc ttatgccaat atgttgcagc 240
 tcgcataagc gttgtgactg gtaaacactt ggctcagatc tgcaatgaag aatatgacaa 300

 <210> 28
 <211> 300

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 28

tccgtatcgc taaggatctc gccgagaaca atcgtggagc acgtgtcctc gttgtctgct	60
ctgagatcac agccgttacc ttccgtggtc cctctgacac ccaccttgac tccctcgtcg	120
gtcaggtctt tttcagtgat ggccgcccgc cactcattgt ggggtcggac cctgacacat	180
ctgtcggaga gaaacccatc tttgagatgg tgtctgccgc tcagaccatc cttccagact	240
ctgatggtgc catagacgga catttgaggg aagttggtct caccttccat ctctcaagg	300

<210> 29

<211> 240

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

tcttcattgc agatctgagc caagtgttta ccagtcacaa cgcttatgcg agctgcaaca	60
tattggcata agatggcggc aaaattgaaa agcagagtaa ttgccaccaa gtcatacccg	120
aaacgagcac ctcttcgat atttgaacc catttcccg gatcaatata tccgacagaa	180
acaaaaagga caggaagtag agcaggaacc attctctgga taaaccctag ctgaggtctc	240

<210> 30

<211> 300

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

gatggaaggt gagaccaact tccctcaa at gtcggtctat ggcacatca gagtctggaa	60
ggatggtctg agcggcagac accatctcaa agatggggtt ctctccgaca gatgtgtcag	120

ggtcggaccc cacaatgagt gggcgggcgc catcactgaa aagagcctga ccgacgagg	180
agtcaaggtg ggtgtcagag ggaccacgga aggtaacggc tgtgatctca gagcagacaa	240
cgaggacacg tgctccacga ttgttctcgg cgagatcctt agcgatacgg aggacagtac	300

<210> 31

<211> 4035

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 31

atgggatcta gggttccaat agaaaccatc gaagaagacg gcgaattcga ttgggaagca	60
---	----

gcagtc aaag aaatcgactt ggcttgtctt aaaaccacaa acgcttcttc ttcctcgtca 120
tccatttca ctcttttggc taatccacca attacggcaa atctcactaa gccacctgcg 180

aagagacaat ctactctcga taaattcatc ggacagaaccg aacataaacc ggagaatcat 240
caagttgttt ccgagtgtgg tgttaacgat aacgataata gtcctttagt tgggattgat 300
cctgaggcag ctaaaacttg gatttatcca gtgaatggga gtgttccttt aagagattat 360
cagtttgcta taacgaagac tgctttgttt tcgaatacat tgggtggcttt gcctacggga 420
cttggtaaaa cgcttatagc tgcggttggt atgtataatt acttcagatg gtttcacaa 480
ggtaaaatag tatttgcggc gccttctagg cctcttgtga tgcagcagat tgaggcgtgt 540
cataatattg ttggaatacc acaagaatgg acgattgact tgacgggtca gacatgtcct 600

tcgaaaagag cttttttgtg gaaaagcaaa cgggttttct ttgtcactcc acaagtgtta 660
gagaaggata tacagtccag aacatgtctt actaactact tggtttgctt ggtgatcgac 720
gaggcacatc gagctttagg gaattattct tattgtgttg tagttcgtga gttgatggcg 780
gtaccgatac agctgagaat actggctctt actgcaactc ctggatcaaa gacacaggcc 840
atccagggta tcattgataa ttgacagata tccacacttg aatatcgaaa tgagagtgc 900
catgatgttt gcccttatgt ccacgacaga aaattagaag tcatcgaggt tcccttgggt 960
caagatgcag atgatgtatc gaaacgcctg tttcatgtta tacgtccata tgcagtcagg 1020

cttaaaaact ttgggggtta tctaaataga gatatacaaa ctttaagtcc acacgaagta 1080
cttatggcaa gggataagtt tcgtcaagca cctctaccag gccttccca tgtaatcac 1140
ggagatgtag aatcttgcct tgcagctctt atcactcttt atcatattcg taagctcctt 1200
tctagtcatg gaataagacc agcgtatgag atgctagaag agaaattgaa agaaggccca 1260
tttgctaggt tgatgagtaa gaatgaagat attagatga cgaagctttt gatgcagcaa 1320
aggttgtcac atggagcacc aagcccaaaa ttgtcgaaga tgttagaaat actggttgat 1380
catttcaaag tgaaagatcc gaagacatca cgggtcatta ttttctcaa tttcagagga 1440

agcgtaaag acataatgaa cgcattaagt aatattggag atatgggtcaa agcaactgag 1500
tttattggtc aaagttcagg taagacattg aaaggccagt cgcaaaaaat tcagcaggct 1560
gttttgaga aatttagagc tgggggggttc aatgttattg tcgcaacatc tattggtgaa 1620
gaaggcttgg atatcatgga agttgacctt gttatatgtt ttgatgctaa tgtatctcct 1680
ctgaggatga ttcaacggat gggaagaact ggaaggaaaa ataatggtcg agttgtagtt 1740
cttgcttgtg aaggatcaga aaagaacagc tatatgcgaa agcaagcaag tggacgggct 1800

attaaaaaac acatgcggaa tggaggaaca aatagtttta attttcatcc tagtccaagg	1860
atgattcccc atgtttataa gccagaagtt cagcatgttg agttttcaat caagcaattc	1920
gttccacgtg gaaagaaact acaagaggag tatgccactg agactccagc tttccagaaa	1980
aagcttacac ctgcagagac gcatatgctc gctaagtatt acaacaaccc cgatgaggaa	2040
aagttgagag tgtccttaat tgcgttcctt cacttccaga cattgccatc caaggtgcac	2100
aaagtaatgc attcacgtca aacaggcatg ttaattgacg ctatgcagca cttgcaagag	2160
ccaacttttt cagaacagag taaaagcttc ttcactgagt ttcgagctcc tttgggtgaa	2220
agagaagagc ttgatacagg tctgaggggtt actaatgac caaaagatct acactctgtc	2280
cgatgatttg aagtcaacac atcacagaga aaggcaaaac aagttgaatc tcccacaagc	2340
accttagaga caacagagaa ggattacgaa gaatcttcac ccacacaccg ttatcttttc	2400
agttcagaat gtgcatccgt tgatactctg gggaacgtct tcgtaatgcc agttcctctt	2460
ttattctttc ctaatgttct ggagtcagac aatagcctc tgcctaaaac agaaaaaca	2520
cattcttgcc ggaatacatc tcacattgac ttagttccag tagatacttc ggaaaaacat	2580
cggcaagata atatctcatg caagttaaag gaaagattct cgccagacgg tgccagcgag	2640
acactagaga ctcatagcct tgtgaaaagg aactccacca gaggtagtga agatgatgta	2700
gcgaattctg ttggagaaat tgtgttatca tcggatgaag atgactgtga gggattggag	2760
cttagtccac ggctcactaa cttcatcaag agcggcattg ttccagagtc acctgtctat	2820
gaccaagggg aagcgaacag agaagaagat cttgaatttc ctcagctttc ttcacccatg	2880
aggttcagta acgaattggc aggagagtct tctttccctg agagaaaggt tcagcataag	2940
tgcaacgatt ataacattgt gtctacaacc actgaattga gaactcctca gaaggaggta	3000
ggtttggcca acggaacaga atgcttggct gtttctccta ttcctgagga ttggagaact	3060
cccttggcga atctgacaaa cacaacagc agcgctcgca aagattggcg ggtgagttct	3120
ggagaaaagt tagaaactct tcgacagcct cgcaagtga agagactacg tagacttggg	3180
gattgtctga gtgctgtaaa ggagaattat cctgggtatta cagaggcaga ccatatcaga	3240
tctcgttctc gcggtaaaaa gcacattaga ggtaagaaga agatgatcat ggatgatgat	3300
gtccaagtct tcattgacga ggaagctgag gtctcttcgg gagcagagat gtcggctgat	3360
gagaacgaag atgtgactgg cgattcattt gaagatagtt tcatagatga cggaacaatg	3420
cctacagcaa atactcaagc cgagcttggt aaagttgaca tgatggctgt ttacaggcgt	3480
tctcttctca gccagtcacc attaccggcg agatttcgtg atttagccgc atcaagtctg	3540

agtccttatt ctgctggacc cttgacgaga ataatgaga gcagaagcga ctcagataaa 3600
 tcattgtctt ctcttcgaac accaaaaaca acaactctg agtcaaacca agatgcaatg 3660
 atgataggaa acctttcggg agtacaaatc tcgtcagata gccggaaaag gaaatttagc 3720
 ttatgcaact cggcgaatgc ccccgtaggt aacttagaaa gcaagtttgc agctcatgca 3780
 caagccacgg agaaggaaag ccatgaaggc gtgagaagca atgcagggtgc gttagagtag 3840
 aatgatgatg atgatgatgc attctttgcg aacttagact ttgatgcaat ggaagcacia 3900
 gccacattgt tattgtcgaa acagagatcc gaagcaaaag agaaagaaga cgcaacggtt 3960

 atacctaact caggcatgca gagaagtgt ggtatggaga aagatgcacc atcttttgat 4020
 ctgggtctgt ggtga 4035
 <210> 32
 <211> 2310
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 32

 atgtcaaatg aaaataaaaa tataaaaact aaatttcac ctagttcaag gatgattccc 60
 catgtttata agccagaagt tcagcatgtt aagttttcga tcgagcaatt cattccacgt 120
 ggaaagaagc tacaagatga gcctgccact gagactccag ctttcaagaa aaagcttaca 180
 ccggaagaga tggatatgct cgccaagtat ttcaaacca acgaggaaaa gtggagagtt 240

 tccttgattg ctttcctca cttccaaaca ttgccatcca aagtgcacia agtaatgcat 300
 tcacgccaaa caagcatatt aattgatgct atgcagcatc tgcaagagac aactttgaca 360
 gagcaaagta aaagtttctt cattaagtat ggagctcctt tggctgaaag agatgagctt 420
 gacgcaggtc tgagggttgg tgatgatccg aaagatttac cctcttccga tgatttggat 480
 gtcaacacat cacagagaaa ggcaaaacaa attttagaat ctcccacaag cacattagag 540
 actacagaga aggtatttga agcatcttca ccacacact gttatctttt cagttcagaa 600
 tgtgcgtccg ttgatactct ggggaaggtc tttgtattgc cggttctctc ctcattctct 660

 tctaattgtac cagggtcaga ctgcgtggga agagaaaaag aactttcttc cccgaataag 720
 tcccacactg acgttgttcc gatagatagt tctcaaaac atcggaaga taatatttca 780
 tgcaagttaa agcaaggatt cttgccagat tgtgccaacg agactttgga gtcccaaagc 840
 cttttgaaaa ggcactccac cgatgtaggt aaaggagata tagagaattg tgctggagaa 900
 attatgatat catcgatga agaagacgac tgtgaggatt tggagcttag tccaaggctc 960
 actaacttca tcaagagtgg cggtgttcca gattcacctg tctatgacca agttgcatac 1020

gaagcaaaca gagaagaaga ccttgatctt ccacacacga gtttaactaa tgaattggca 1080

gaagagccat cgacacctga gaaaaagggt cacattgctt ctacggccaa tgaattcaga 1140

actcctcaga aggaagaaga tttagccaac gaaacagaaa gcttcgctgt ttctccaatg 1200

cctgaggagt ggagaactcc cttggcgaat atcaccaacg caagcagcag cgctagcaaa 1260

gattggcgcg tgagttcggg agaaaagtca gaaactcttc gacagcctcg caagtgaag 1320

agacttcgta gacttggaga ttgctcgagt gctgtgaagg agaataatcc tggatttga 1380

aagacagacc atatcagatc tcgttctcgc agtgtaaaga acataagagg taaaatgatt 1440

ctgtatttcc ttttgctctg tgttcaaggc aagaagaaga tacgcgcgga taataatgct 1500

agaatcttca ttgaagcggg agctgaggig tcttcggaat cagaaatgtc ggttgatgag 1560

aacgtagatt tgaccagcga ttcatttgaa gatagcttca tagatgacgg tacaatgcct 1620

acagcaaata ctcaagccga gtgtgctaaa gttgacatga tggccgttta caggtatata 1680

tcgaatcaaa acaagtcttt cttctactat gatttactaa gaatcataag ctatggtttc 1740

cacagacgtt ctctactcag ccaatcacca ttaccggcaa gatttcgtga ttagctgca 1800

tcaagtcga gtctttatc ttctggcttc ttgaagacaa taaatgagag cagaagcgac 1860

tcagataaat cattgtcttc tcttagaacc ccacaaacaa cgaacaacga gtcaacaag 1920

gatgcaatgg ccacaggaga ctttccggtg gcacaaatct caacagacag ccggaagagg 1980

aaattcagct tatgcaactc agcgaatgtc ccagtgatta acttggaaaa caagtttgaa 2040

gctcatgcac aagccacgga gaaggaaagc catgaaggtc cgagaagcaa tgcaggtgca 2100

tcacagtaca aggatgagga tgaagatgat gatgcattct acgcgacact ggactttgat 2160

gccatggaag cgcatgacgac attgctattg tcgaaacaaa ggtcagaaac gaaaacaaaa 2220

gaagatgcat cggtgaaacc tcatttgggc aatcagagga atgatggttt gccgaaggat 2280

gggccatctt ttgatcttgg tttgtggtga 2310

<210> 33

<211> 1822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-At[wt]

<400> 33

ggctcgagaa ccgaattcta atacgactca ctatagggtc aggaacatgt cttactaact 60

acttggtttg cttgggtgatc gacgaggcac atcgagcttt agggaattat tcttattgtg 120

ttgtagtctg tgagttgatg gcggtaccga tacagctgag aatactggct cttactgcaa 180

ctcctggatc aaagacacag gccatccagg gtatcattga taatttgcag atatccacac 240
 ttgaatatcg aaatgagagt gaccatgatg ttggccctta tgtccccgac agaaaattag 300
 aagtcacga gggtcccttg ggtcaagatg cagatgatgt atcgaaacgc ctgtttcatg 360

ttatacgtcc atatgcagtc aggcttaaaa actttggggt taatctaaat agagatatac 420
 aaactttaag tccacacgaa gtacttatgg caagggataa gtttcgtcaa gcacctctac 480
 caggccttcc ccatgtaaat cacggagatg tagaatcttg ctttgcagct cttatcaggt 540
 aaggaaataa ttattttctt ttttcctttt agtataaaat agttaagtga tgtaatttag 600
 tatgattata ataatatagt tgttataatt gtgaaaaaat aatttataaa tatattgttt 660
 acataaaca catagtaatg taaaaaata tgacaagtga tgtgtaagac gaagaagata 720
 aaagttgaga gtaagtatat tatttttaat gaatttgatc gaacatgtaa gatgatatac 780

tagcattaat atttgtttta atcataatag taattctagc tggtttgatg aattaaatat 840
 caatgataaa atactatagt aaaaataaga ataaataaat taaaataata tttttttatg 900
 attaatagtt tattatataa ttaaataatct ataccattac taaatatttt agtttaaaag 960
 ttaataaata ttttgttaga aattccaatc tgccttgaat ttatcaataa acaaaatatt 1020
 aaataacaag ctaaagtaac aaataatatc aaactaatag aaacagtaat ctaatgtaac 1080
 aaaacataat ctaatgctaa tataacaaag cgcaagatct atcattttat atagtattat 1140
 tttcaatcaa cattcttatt aatttctaaa taatacttgt agttttatta acttctaaat 1200

ggattgacta ttaattaaat gaattagtcg aacatgaata aacaaggtaa catgatagat 1260
 catgtcattg tgttatcatt gatcttacct ttggattgat tacagttgat aagagctgca 1320
 aagcaagatt ctacatctcc gtgatttaca tggggaaggc ctggttagagg tgcttgacga 1380
 aacttatccc ttgccataag tacttcgtgt ggacttaaag tttgtatata tctattttaga 1440
 ttaaccccaa agtttttaag cctgactgca tatggacgta taacatgaaa caggcgtttc 1500
 gatacatcat ctgcatcttg acccaaggga acctcgatga cttctaattt tctgtcgggg 1560
 acataagggc aaacatcatg gtcactctca ttctgatatt caagtgtgga tatctgcaaa 1620

ttatcaatga taccctggat ggccgtgtgc tttgatccag gagttgcagt aagagccagt 1680
 attctcagct gtatcggtag cgccatcaac tcacgaacta caacacaata agaataattc 1740
 cctaaagctc gatgtgcctc gtcgatcacc aagcaaacca agtagttagt aagacatgtt 1800
 cctgaccccg ggatccaage tt 1822

<210> 34
 <211> 1822
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-At[G:U]

<400> 34

```

ggctcgagaa ccgaattcta atacgactca ctataggggt aggaatatgt tttattaatt      60
atttggtttg tttggtgatt gatgaggat attgagtttt agggaattat ttttattgtg      120

ttgtagtttg tgagttgatg gtggtattga tatagttgag aatattgggt tttattgtaa      180
tttttggtt aaagatatag gttatttagg gtattattga taattttag atatttatat      240
ttgaatattg aaatgagagt gattatgatg tttgttttta tgtttttgat agaaaattag      300
aagttattga ggttttttg ggtaaatg tagatgatgt attgaaatgt ttgttttatg      360
ttatatgttt atatgtagt aggtttaaaa attttgggt taatttaaat agagatatat      420
aaattttaag tttatatgaa gtatttatgg taagggataa gttttgttaa gtattttat      480
taggtttttt ttatgtaaat tatggagatg tagaattttg tttttagtt tttattaggt      540

aaggaaataa ttattttctt ttttccttt agtataaaat agttaagtga tgttaattag      600
tatgattata ataatatagt tgttataatt gtgaaaaaat aatttataaa tatattgttt      660
acataacaa catagtaatg taaaaaata tgacaagtga tgtgtaagac gaagaagata      720
aaagttgaga gtaagtatat tatttttaat gaatttgatc gaacatgtaa gatgatatac      780
tagcattaat atttgtttta atcataatag taattctagc tggtttgatg aattaaatat      840
caatgataaa atactatagt aaaaataaga ataaataaat taaaataata ttttttatg      900
attaatagtt tattatataa ttaaatatct ataccattac taaatatttt agtttaaaag      960

ttaataaata ttttgtttag aattccaatc tgcttgtaat ttatcaataa acaaaatatt      1020
aaataacaag ctaaagtaac aaataatatc aaactaatag aaacagtaat ctaatgtaac      1080
aaaacataat ctaatgtaa tataacaaag cgcaagatct atcattttat atagtattat      1140
tttcaatcaa cattcttatt aatttctaaa taatacttgt agttttatta acttctaaat      1200
ggattgacta ttaattaaat gaattagtcg aacatgaata aacaaggtaa catgatagat      1260
catgtcattg tgttatcatt gatcttacct ttggattgat tacagttgat aagagctgca      1320
aagcaagatt ctacatctcc gtgatttaca tggggaaggc ctgglagagg tgcttgacga      1380

aacttatecc ttgccataag tacttcgtgt ggacttaaag tttgtataac tctattttaga      1440
ttaaccccaa agtttttaag cctgactgca tatggacgta taacatgaaa caggcgtttc      1500
gatacatcat ctgcatcttg acccaaggga acctcgatga cttctaattt tctgtcgggg      1560
acataagggc aaacatcatg gtcactctca tttcgatatt caagtgtgga tatctgcaaa      1620
ttatcaatga taccctggat ggcctgtgtc tttgatccag gagttgcagt aagagccagt      1680

```

attctcagct gttatcggtac cgccatcaac tcacgaacta caacacaata agaataattc 1740

cctaaagctc gatgtgcctc gtcgatcacc aagcaaacca agtagttagt aagacatgtt 1800

cctgaccccg ggtccaage tt 1822

<210> 35

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-Bn[wt]

<400> 35

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggagaaat tatgatatca tcggatgaag 60

aagacgactg ttaggatttg gagcttagtc caaggctcac taacttcac aagagtggcg 120

ttgttcaga ttcacctgtc tatgaccaag ttgcatacga agcaaacaga gaagaagacc 180

ttgatcttcc acacacgagt ttaactaatg aattggcaga agagccatcg acacctgaga 240

aaaaggttca cattgcttct acggccaatg aattcagaac cccaacgaag gaagaagatt 300

tagccaacga aacagaaagc ttcgtgttt ctccaatgcc tgaggagtgg agaactcctt 360

tggcgaatat caccaacgca agcagcagcg ctagcaaaga ttggcgcgtg agttcgggag 420

aaaagtcaga aactcttga cagcctcgca agttgaagag acttcgtaga cttggagatt 480

gctcgagtgc tgaagagg aataatcctg gtattgcaa gacagaccat atcgtaagga 540

aataattatt ttcttttttc ctttttagtat aaaatagtta agtgatgtta attagtatga 600

ttataataat atagtgttta taattgtgaa aaaataattt ataaatatat tgtttacata 660

aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt 720

tgagagtaag tatattatit ttaatgaatt tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca 780

ttaatatitg ttttaatcat aatagtaatt cttagctggtt tgatgaatta aatatcaatg 840

ataaaatact atagtaaaaa taagaataaa taaattaaaa taatatitit ttatgattaa 900

tagtttatta tataattaaa tatctatacc attactaaat attttagttt aaaagttaat 960

aaatatititg ttagaaattc caatctgctt gtaatttata aataaataaa atattaaata 1020

acaagctaaa gtaacaaata atatcaaaact aatagaacaa gtaatctaata gtaacaaaac 1080

ataatctaata gctaataata caaagcgcaa gatctatcat tttatatagt attattitca 1140

atcaacattc ttattaatit ctaaataata cttgtagttt tattaacttc taaatggatt 1200

gactattaat taaatgaatt agtcgaacat gaataaataa ggtaacatga tagatcatgt 1260

cattgtgtta tcattgatct tacatttgga ttgattacag gatatggtct gtccttgcaa 1320

taccaggatt attctccttc acagcactcg agcaatctcc aagtctacga agtctcttca 1380
 acttgcgagg ctgtcgaaga gtttctgact tttctccga actcacgcgc caatctttgc 1440
 tagcgtgct gcttgcgttg gtgatattcg ccaagggagt tctccactcc tcaggcattg 1500
 gagaaacagc gaagctttct gtttcgttgg ctaaactctc ttccttcgtt ggggttctga 1560

attcattggc cgtagaagca atgtgaacct tttctcagg tgtcgatggc tcttctgcca 1620
 attcattagt taaactcgtg tgtggaagat caaggtcttc ttctctgttt gcttcgtatg 1680
 caacttggtc atagacaggt gaatctggaa caacgccact cttgatgaag ttagtgagcc 1740
 ttggactaag ctccaaatcc tcacagtcgt cttcttcacg cgatgatac ataatttctc 1800
 tctagaaagg atccccggg 1818

<210> 36
 <211> 1818
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hpFANCM-Bn[G:U]
 <400> 36

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggagaaat tatgatatta ttggatgaag 60

aagatgattg tgtggatttg gagtttagtt taaggtttat taattttatt aagagtgggtg 120
 ttgttttaga tttatttggt tatgattaag ttgtatatga agtaaatagt gaagaagatt 180
 ttgatttttt atatatgagt ttaattaatg aattggtaga agagtatttg atatttgaga 240
 aaaaggttta tattgttttt atggttaatg aatttagaat tttaatgaag gaagaagatt 300
 tagttaatga aatagaaagt tttgttggtt ttttaatggt tgaggagtgg agaatttttt 360
 tggatgaatat tattaatgta agtagtagtg ttagtaaaga ttggtgtgtg agtttgggag 420
 aaaagttaga aattttttga tagttttgta agttgaagag atttttaga tttggagatt 480

gtttgagtgt tgtgaaggag aataattttg gtattgtaaa gatagattat attgtaagga 540
 aataattatt ttcttttttc ctttttagtat aaaatagtta agtgatgtta attagtatga 600
 ttataataat atagtgtgta taattgtgaa aaaataattt ataaatatat tgtttacata 660
 aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt 720
 tgagagtaag tatatttttt ttaatgaatt tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca 780
 ttaatatattg ttttaatcat aatagtaatt ctagctgggt tgatgaatta aatatcaatg 840
 ataaaatact atagtaaaaa taagaataaa taaattaaaa taatattttt ttatgattaa 900

tagtttatta tataattaaa tatctatacc attactaaat attttagttt aaaagttaat 960

aaatatatttg ttagaaattc caatctgcctt gtaattttatc aataaacaaa atattaaata	1020
acaagctaaa gtaacaaata atatcaaaact aatagaacaa gtaatctaata gtaacaaaac	1080
ataatctaata gctaataataa caaagcgcaa gatctatcat tttatatagt attattttca	1140
atcaacattc ttattaattt ctaaataata cttgtagttt tattaaacttc taaatggatt	1200
gactattaat taaatgaatt agtcgaacat gaataaaciaa ggtaacatga tagatcatgt	1260
catttgttta tcattgatct tacatttgga ttgattacag gatatggtct gtctttgcaa	1320
taccaggatt attctccttc acagcactcg agcaatctcc aagtctacga agtctcttca	1380
acttgcgagg ctgtcgaaga gtttctgact tttctccga actcacgcgc caatctttgc	1440
tagcgtgct gcttgcgttg gtgatattcg ccaagggagt tctccactcc tcaggcattg	1500
gagaaacagc gaagctttct gtttcgttgg ctaaactcttc ttccttcgtt ggggttctga	1560
attcattggc cgtagaagca atgtgaacct ttttctcagg tgtcgatggc tcttctgcca	1620
attcattagt taaactcgtg tgtggaagat caaggtcttc tttctgttt gcttcgtatg	1680
caacttggtc atagacaggt gaatctggaa caacgccact cttgatgaag ttagtgagcc	1740
ttggactaag ctccaaatcc tcacagtcgt cttcttcate cgatgatac ataatttctc	1800
tctagaaagg atccccggg	1818
<210> 37	
<211> 2274	
<212> DNA	
<213> Brassica napus	
<400> 37	
atggttagtc tgcgtccac agaaaacact ccggcttcgg aaatggccag cgacggcaaa	60
acggagaaaag atggctccgg cgactcacc acttctgttc tcagcgatga ggaaaactgt	120
gaagagaaaa ctgctactgt tgctgtagag gaagagatac ttctagccaa gaatggagat	180
tcgtctctta tctctgagcg catggctcag gaagaagagc agcttctcaa aatccgggaa	240
gatgaagaga ttgctaaacg tgctgctggc tctggtgaag ctctgatct gaatgatact	300
cagtttacta aacttgatga gctcttgacc caaaccagc tctactctga gtttctcctt	360
gagaaaaatgg aggatatac caaaaatggg atagaaggtg agacccaaaa ggccgagcct	420
gagcctgagc ctgagccga gaagaaaggc cgtggacgta aaagaaaggc tgctcctcag	480
ggcgacagta tgaaggctaa gaaagctgtt gctgctatga tttcaagatc caaagaaggc	540
cgtgaatctg ccgactcaga tctgacagag gaagaaagag tcatgaaaga gcagggtgaa	600
cttgttcttc tttgactgg cggaagttta aagtcttate agctcaaagg tgtcaaatgg	660

ctgatatcat tgtggcaaaa tggtttgaat ggaatttttag ctgatcaaat gggctcttga 720
aagacaattc aaaccattgg ttctctatca cacctcaaag gaaatgggtt ggatgggtcca 780
tatctagtca ttgccccact ctctactctt tcaaactgga tgaatgagat cgctaggttc 840
acgccttcca ttaatgcaat catttaccat ggagataaga aagaaaggga tgagctcagg 900
aagaggcaca tgcccagaac tgttgggtccg aagttcccta tagtcataac ttcttatgag 960
gttgctatga atgatgctaa aaagaatctg cggcactatc catggaaata tgttgtgatt 1020
gatgagggtc acagggttga aaaccacaag tgtaactgc tgagggagct aagatacttg 1080

aatatggaga acaaacttct gctgacagga acacctctgc aaaataattt gtctgagctt 1140
tggtcactgt tgaattttat tctgcctgac atctttgcat cacatgacga atttgaatca 1200
tggtttgatt ttcttgaaa gaataataat gaagcaacta aggaagaagg agaagagaaa 1260
agaagagctc aagtgttgc gaaacttcat aatatactac gacctttcat cctccggaga 1320
atgaaatgtg atgttgagct ctcacttccc cggaaaaaag agattatcat ctatgctaca 1380
atgacggacc atcagaagaa gtccaggaa catcttgtga accacacctt ggaagcacac 1440
attagagatg atactgtccg aggtcatggc ttgaaggga agcttaacaa tcttgcattt 1500

caacttcgaa agaactgcaa ccatcctgac ctctttgtgg ggcaactaga tggtcatat 1560
ctctaccac ctttggaaga cattgtggga cagtgcggt aattccgctt attggagaga 1620
ttgcttggtc ggttatttgc caaaaatcac agagtctta tcttctcca gtggacaaaa 1680
atactggaca ttatggatta ctacttcagt gagaagggtt ttgaggtttg ccgaatcgac 1740
ggtagtgtga aactagaaga aaggagaaga cagatccaag aattcaatga tgagaagagc 1800
aactgcagga tatttcttct cagtaccaga gccggaggac tcggaattaa tcttactgct 1860
gcagatacat gcatcctcta cgatagcgat tggaaccctc aatggactt gcaagccatg 1920

gacagatgcc acagaattgg tcagacaaaa cctgttcatg ttacaggtt tgcgacggt 1980
cagtcaatag agggccgagt tctgaaacga gcatacagta agcttaagct ggaacatgtg 2040
gttattggca aggggcagtt tcatcaagaa cgtgccaagt cttcaacacc gttagaggaa 2100
gatgacatac tggcgttgct taaggacgac gaaaatgctg aagataaact gatacaaac 2160
gacataagcg aggaggatct tgacagggtg cttgaccgta gtgatctgat gattacctta 2220
ccggcgaga ctcaagcaca tgaagctttt ccagtgaagg gtccgggttg ggaa 2274

<210> 38
<211> 1824
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> hpDDM1-Bn[wt]

<400> 38

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggagctgt tgctgctatg atttcaagat	60
ccaaagaagg ccgtgaatct gccgactcag atctgacaga ggaagaaaga gtcataaatg	120
agcagggtga acttggttctt cttctgactg gcggaaagt aaagtcctat cagctcaaag	180
gtgtcaaagt gctgataatc ttgtggcaaa atggtttgaa tggaatttta gctgatcaaa	240
tgggtcttgg aaagacaatt caaaccattg gtttcctatc accccaacaa ggaaatgggt	300
tggatggtcc atatctagtc attgccccac tctctactct ttcaaaagcg attggaaccc	360
tcaaattggac ttgcaagcca tggacagatg ccacagaatt ggtcagacaa aacctgttca	420
tgtttacagg ctgacgacgg ctacgtcaat agagggccga gttctgaaac gagcatacag	480
taagcttaag ctggaacatg tggttattgg caaggggcag ttcatcaag aacgtggtaa	540
ggaaataatt attttctttt ttcttttag tataaatag ttaagtatg ttaattagta	600
tgattataat aatatagttg ttataattgt gaaaaataa ttataaata tattgtttac	660
ataacaaca tagtaatgta aaaaaatatg acaagtatg tgtaagacga agaagataaa	720
agttgagagt aagtatatta ttttaatatg atttgatcga acatgtaaga tgatatata	780
gcattaatat ttgttttaat cataatagta attctagctg gtttgatgaa ttaaatatca	840
atgataaaat actatagtaa aaataagaat aaataaatta aaataatatt tttttatgat	900
taatagttaa ttatataatt aaatatctat accattacta aatatatttag tttaaaagtt	960
aataaatatt ttgttagaaa ttccaatctg ctgtgaattt atcaataaac aaaatattaa	1020
ataacaagct aaagtaacaa ataatatcaa actaatagaa acagtaattt aatgtaacaa	1080
aacataatct aatgctaata taacaaagcg caagatctat catittatat agtattattt	1140
tcaatcaaca ttcttattaa ttcttaata atactttag ttttattaac ttctaaatgg	1200
attgactatt aattaaatga attagtcgaa catgaataaa caaggtaaca tgatagatca	1260
tgctattgtg ttatcattga tcttacattt ggattgatta cagtcacgtt ctgtatgaaa	1320
ctgccccctg ccaataacca catgttccag cttaagctta ctgtatgctc gtttcagaac	1380
tcggccctct attgactgag ccgtcgcaag cctgtaacaa tgaacagggt ttgtctgacc	1440
aattctgtgg catctgtcca tggcttgcaa gtccatttga gggttccaat cgcttttgaa	1500
agagtagaga gtggggcaat gactagatat ggaccatcca acccatttcc ttgttgggt	1560
gataggaaac caatggtttg aattgtcttt ccaagaccca ttgatcagc taaaattcca	1620
ttcaaacat ttgtccacaa tgatatcagc catttgacac ctttgagctg ataagacttt	1680
aactttccgc cagtcagaag aggaacaagt tcaccctgct ctttcatgac tctttcttcc	1740

tctgtcagat ctgagtcggc agattcacgg cttcttttgg atcttgaaat catagcagca	1800
acagcttcta gaaaggatcc cggg	1824
<210> 39	
<211> 1823	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hpDDM1-Bn[G:U]	
<400> 39	
ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggttgttg ttgttatgat ttttaagattt	60
aaagaagggt gtgaatttgt tgatttagat ttgatagagg aagaaagagt tatgaatgag	120
taggggtgaat ttgttttttt ttgtatttgt ggaaagttaa agttttatta gtttaaaggt	180
gttaaatggt tgatattatt gtggtaaaat ggtttgaatg gaattttagt tgattaaatg	240
ggttttggaa agataattta aattatttgt tttttattat attttaaagg aaatgggttg	300
gatggtttat atttagttat tgttttattt tttatttttt taaaagtgat tggaattttt	360
aaatggattt gtaagttagt gatagatgtt atagaattgg ttagataaaa ttgttttatg	420
tttatagggt tgtgatgggt tagttaatag aggggttagt ttgaaatga gtatatagta	480
agtttaagtt ggaatatgtg gttattggta aggggttagt ttattaagaa tgtgtggtaa	540
ggaaataatt attttctttt ttccttttag tataaaatag ttaagttagt ttaattagta	600
tgattataat aatatagttg ttataattgt gaaaaataa tttataaata tattgtttac	660
ataacaaca tagtaatgta aaaaaatag acaagtgatg tgtaagacga agaagataaa	720
agttgagagt aagtatatta ttttaaatga atttgatcga acatgtaaga tgatatacta	780
gcattaatat ttgttttaat cataatagta attctagctg gtttgatgaa ttaaatatca	840
atgataaaat actatagtaa aaataagaat aaataaatta aaataatatt tttttatgat	900
taatagttta ttatataatt aaatatctat accattacta aatattttag tttaaaagtt	960
aataaatatt ttgttagaaa ttccaatctg cttgtaattt atcaataaac aaaatatata	1020
ataacaagct aaagtaacaa ataatatcaa actaatagaa acagtaatct aatgtaacaa	1080
aacataatct aatgctaata taacaaagcg caagatctat cattttatat agtattattt	1140
tcaatcaaca ttcttattaa tttctaataa atactttag ttttattaac ttctaagtgg	1200
attgactatt aattaaatga attagtcgaa catgaataaa caaggtaaca tgatagatca	1260
tgtcatttgt ttatcattga tcttacattt ggattgatta cagtcacgtt cttgatgaaa	1320
ctgccccctg ccaataacca catgttccag cttaagctta ctgtatgctc gtttcagaac	1380

tcggccctct attgactgag ccgtcgcaag cctgtaaaca tgaacagggt ttgtctgacc 1440

aattctgtgg catctgtcca tggcttgcaa gtccatttga gggttccaat cgcttttgaa 1500

agagtagaga gtggggcaat gactagatat ggaccatcca acccatttcc ttgttggggt 1560

gataggaaac caatggtttg aattgtcttt ccaagacca tttgatcagc taaaattcca 1620

ttcaaacat tttgccaca tgatatcagc catttgacac ctttgagctg ataagacttt 1680

aactttccgc cagtcagaag aggaacaagt tcaccctgct ctttcatgac tctttcttcc 1740

tctgtcagat ctgagtcggc agattcacgg ccttctttgg atcttgaaat catagcagca 1800

acagttctag aaaggatccc ggg 1823

<210> 40

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP

<400> 40

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaage tgcccgtgcc ctggeccacc 180

ctcgtgacca ccttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcagcact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gigaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

<210> 41

<211> 1262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEGFP[wt]

<400> 41

gctagcta at acgactcact atagggcagc agcacggggc cgtcgccgat ggggggtgttc 60
tgctgtagt ggtcggcgag ctgcacgctg ccgtcctcga tgttgtggcg gatcttgaag 120
ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgtcg gccatgatgt atacgtttgtg gctgttgaag 180
ttgtactcca gcttgtgccc caggatgttg ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc 240
tcgatcgggt tcaccagggt gtgcacctcg aacttcacct cggcgagggt ctgttagttg 300
ccgtcgtcct tgaagaagat ggtgcgctcc tggacgtagc cttcgggcat ggcggacttg 360
aagaagtcgt gctgcttcat gtggtcgggg tagcggctga agcactgcac gccgtaagcg 420

aaggtggta ctagtgtggg ccagggcacg ggcagcttgc cgggtggta gatgaacttc 480
agggctctaga ccgcgtcggc atccggctcag tggcagtgaa gggcgaacag ttcttgatta 540
gggggatgaa gctacctggt ccgaaccaca aaccgttcta ctttactggc ttgtgtcgtc 600
atgaagatgc ggacttgcgt ggcaaaggat tcgataacgt gctgatgggt cacgaccacg 660
cattaatgga ctttaccttt taatggggaa tgaagctacc tggccgaac tcctaccgta 720
cctcgcatta cccttacgt gaagagatgc tcgactgggc agatgaacat ggcatcgat 780
ttaggtgaca ctatagccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccttgg 840

cccacactag tgaccacctt cgtttacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 900
atgaagcagc acgacttctt caagtcggc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 960
atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 1020
accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 1080
gggcacaagc tggagtacaa cttcaacagc cacaacgtat acatcatggc cgacaagcag 1140
aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 1200
ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcgcgacg gccccgtgtc gctgccgtcg 1260

ac 1262

<210> 42

<211> 1262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEGFP[G:U]

<400> 42

gctagcta at acgactcact atagggcagc agcacggggc cgtcgccgat ggggggtgttc 60
tgctgtagt ggtcggcgag ctgcacgctg ccgtcctcga tgttgtggcg gatcttgaag 120
ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgtcg gccatgatgt atacgtttgtg gctgttgaag 180

ttgtactcca gcttgtgccc caggatgttg ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc	240
tcgatgcggt tcaccagggt gtcgccctcg aacttcacct cggcgcgggt cttgtagttg	300
ccgtcgtcct tgaagaagat ggtgcgctcc tggacgtagc cttcgggcat ggcggacttg	360
aagaagtcgt gctgcttcat gtggtcgggg tagcggctga agcactgcac gccgtaagcg	420
aaggtgtgca ctagtgtggg ccagggcacg ggcagcttgc cgggtgtgca gatgaacttc	480
agggtctaga ccgcgtcggc atccggtcag tggcagtga ggcgaacag ttcctgatta	540
gggggatgaa gctacctggt ccgaaccaca aaccgttcta ctttactggc tttggtcgtc	600
atgaagatgc ggacttgcgt ggcaaaggat tcgataacgt gctgatgtg caccaccacg	660
cattaatgga ctttaccttt taatggggaa tgaagctacc tggtcggaac tcctaccgta	720
cctcgcatta cccttacgct gaagagatgc tcgactgggc agatgaacat ggcacgtat	780
ttaggtgaca ctatagcctt gaagtttatt tgtattattg gtaagttgtt tgtgttttg	840
tttatattag tgattatatt tgtttatggt gtgtagtgtt ttagttgtta ttttgattat	900
atgaagtagt atgatttttt taagtttgtt atgtttgaag gttatgttta ggagtgtatt	960
atTTTTTTT aggatgatgg taattataag atttgtgttg aggtgaagtt tgagggtgat	1020
atTTTggtga attgtattga gttgaagggt attgatttta aggaggatgg taatatTTTg	1080
gggtataagt tggagtataa ttttaatagt tataatgtat atattatggt tgataagtag	1140
aagaatggta ttaaggtgaa ttttaagatt tgttataata ttgaggatgg tagtgtgtag	1200
tttgttgatt attattagta gaatatTTTT attggtgatg gttttgtgtt gttgtgtcgc	1260
ac	1262
<210> 43	
<211> 1259	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ledEGFP[wt]	
<400> 43	
gctagcta at acgactcact atagggtgtc gccctcgaac ttcacctcgg cgcgggtctt	60
gtagtgtccc tcgtccttga agaagatggt gcgtccttgg acgtagcctt cgggcatggc	120
ggacttgaag aagtcgtgct gcttcatgtg gtcggggtag cggtgaagc actgcacgcc	180
gtaggtgaag gtggtcacga ggggtggcca gggcacgggc agcttgccgg tgggtcagat	240
gaacttcagg gtctagaccg cgtcggcatc cggtcagtgg cagtgaaggg cgaacagttc	300
ctgattaggg ggatgaagct acctggtccg aaccacaaac cgttctactt tactggcttt	360

ggtcgtcatg aagatgcgga cttgcgtggc aaaggattcg accctgaagt tcatctgcac 420
 caccggcaag ctgccccgtc cctggccac cctcgtgacc accttcacct acggcgtgca 480
 gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccaatgcc 540
 cgaaggctac gtccaggagc gcacatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg 600

 cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 660
 cttaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag taaactaca acagccacaa 720
 cgtctatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 780
 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg 840
 cgacggcccc gtctgtctgc ctaacgtgct gatggtgcac gaccacgcat taatggactt 900
 taccttttaa tggggaatga agctacctgg tccgaactcc taccgtacct cgcattaccc 960
 ttacgtgaa gagatgctcg actgggcaga tgaacatggc atcgtggcag cagcacgggg 1020

 ccgtcgcga tgggggtgtt ctgctggtag tggcggcga gctgcacgct gccgtcctcg 1080
 atgttgtggc ggatcttgaa gttcaccttg atgccgttct tctgcttgtc ggccatgata 1140
 tagacgttgt ggctgttgta gttgtactcc agcttgtgcc ccaggatgtt gccgtcctcc 1200
 ttgaagtga tgccttcag ctcatgctgg ttcaccattg tcgggataca ctctcgac 1259

 <210> 44
 <211> 1259
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ledEGFP[G:U]
 <400> 44

 gctagctaat acgactcact atagggtgtc gccctcgaac ttcacctcgg cgcgggtctt 60
 gtagttgccg tcgtccttga agaagatggt gcgctcctgg acgtagcctt cgggcatggc 120

 ggacttgaag aagtcgtgct gttcatgtg gtcggggtag cggctgaagc actgcacgcc 180
 gtaggtgaag gtggtcacga ggggtggcca gggcacgggc agcttgccgg tgggtcagat 240
 gaacttcagg gtctagaccg cgtcggcatc cggtcagtgg cagtgaaggg cgaacagttc 300
 ctgattaggg ggatgaagct acctgggtccg aaccacaaac cgttctactt tactggcttt 360
 ggtcgtcatg aagatgcgga cttgcgtggc aaaggattcg attttgaagt ttatttgtat 420
 tattggtaag ttgtttgtgt ttgtgtttat ttttgtgatt atttttattt atgggtgtga 480
 gtgttttagt tgttattttg attatatgaa gtagtatgat ttttttaagt ttgttatgtt 540

 tgaaggttat gtttaggagt gtattatttt ttttaaggat gatggtaatt ataagatttg 600

tgttgagtg aagtttgagg gtgatatttt gggaattgt attgagttga agggatttga 660
 ttttaaggag gatggtaata ttttggggta taagttggag tataattata atagttataa 720
 tgtttatatt atggttgata agtagaagaa tggatattaag gtgaatttta agatttgta 780
 taatatttag gatggtagtg tgtagtttgt tgattattat tagtagaata tttttattgg 840
 tgatggtttt gtgtgttgt ttaacgtgct gatgggtcac gaccacgcat taatggactt 900
 taccttttaa tggggaatga agctacctgg tccgaactcc taccgtacct cgcattaccc 960

ttacgtgaa gagatgctcg actgggcaga tgaacatggc atcgtggcag cagcacgggg 1020
 ccgtcgcga tgggggtgtt ctgctggttag tggcggcga gctgcacgt gccgtcctcg 1080
 atgttgtggc ggatcttgaa gttcaccttg atccgttct tctgcttgc ggccatgata 1140
 tagacgttgt ggctgttgta gttgtactcc agcttgtgcc ccaggatgtt gccgtcctcc 1200
 ttgaagtga tgccttcag ctcatgctgg ttcaccattg tcgggataca ctctcgac 1259

<210> 45

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpGUS[G:U]

<400> 45

ttgtgttgtt atttggttag tggtagtgaa gggtagaatg tttttgatta attataaatt 60

gttttatttt attggttttg gttgttatga agatgtggat ttgtgttgta aaggatttga 120
 taatgtgttg atgggtgatg attatgtatt aatggattgg attggggta atttttattg 180
 tattttgtat tatttttatg 200

<210> 46

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpGUS[1:4]

<400> 46

tcgggtccgc aaccgctcac tgggagtcaa gcgcgtacac ttcgtgaata agcactaacg 60
 gttgtacatt agtgggtttc gtcctcaaga acatggggag ttgggtgcca atggaatcgt 120
 taaggtggtg aaggtccacc acctcgcttt attggtctgc attcggggca agtccaaccc 180

tacgtcggat ttcccatacc 200

<210> 47

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpGUS[2:10]

<400> 47

tcgcgtcgcg atccggtctc tggcagtgtt ggcgaactc ttcctgatat accacaaagg	60
gttctactaa actggcttac gtcgtcatct agatgcggtg ttgcgtgggt aaggattcct	120
taacgtgcac atggtgcagc accacgcaaa aatggactcc attggggcgt actcctacgc	180
tacctcgcta tacccttagc	200

<210> 48

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEIN2[G:U]

<400> 48

gatttttagtt agggtttatt tagagaatgg tttttgtttt attttttgtt tttttggttt	60
ttgtttgata tattgatttt gggaaatggg ttgtaaatat tgaaggaggt gtttgttttg	120
ggatatgattt ggtggttaatt attttgtttt ttaattttgt tgttatttta tgtaaatatg	180
ttgtagtttg tataagtgtt	200

<210> 49

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpCHS[G:U]

<400> 49

gttgtttgtt ttgagattat agttgttatt ttttgtgggt tttttgatat ttattttgat	60
ttttttgttg gttaggtttt ttttagtgat ggtgttgttg tatttattgt ggggttggat	120
tttgatatat ttgttggaga gaaatttatt tttgagatgg tgtttgttgt ttagattatt	180
tttttagatt ttgatgggtg	200

<210> 50

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEIN2[G:U/U:G]

<400> 50

aatgtttatg tgagttgtaa tatattggta taagatgggtg gtaaaattga aaagtagagt 60

aattgttatt aagttatatt tgaaatgagt attttttttg atatttgtaa tttatttttt 120

gggattaata tatttgatag aaattaaaag gataggaagt agagtaggaa ttattttttg 180

gataaatttt agttgaggtt 200

<210> 51

<211> 199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpCHS[G:U/U:G]

<400> 51

gtattattag agtttggaag gatggtttga gtggtagata ttattttaaa gatgggtttt 60

tttttgatag atgtgttagg gtttgatttt ataatgagtg tgggtggtgtt attattgaaa 120

agagtttgat tgatgaggga gtttaaggtgg gtgttagagg gattatggaa ggtaatggtt 180

gtgatttttag agtagataa 199

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-WT-F

<400> 52

cctcgaggat cctcgcgctcg gcatccggtc 30

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-WT-R

<400> 53

gggtaccaag cttcgtaagg gtaatgag gta 33

<210> 54

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-GU-F

<400> 54

ccctcgagtt gtgttggat tttggttagtg gtagtgaagg gtgaatagtt ttgattaat 60

tataaattgt tttattttat tggttttggt tgttatgaag atgtggattt gtgtggta 118

<210> 55

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-GU-R

<400> 55

ggggtaccca taaaaataat acaaaatata ataaaaatta accccaatcc aatccattaa 60

tacataatca tacacatca acacattatc aaatccttta ccacacaaat ccacatct 118

<210> 56

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-4M-F

<400> 56

ccctcgagtc gggtcgcaa ccgctcactg ggagtcaagc gcgtacactt cgtgaataag 60

cactaacggt tgtacattag tgggtttcgt cctcaagaac atggggagtt gggtgcca 118

<

210> 57

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-4M-R

<400> 57

ggggtaccgg tatgggaaat ccgacgtagg gttggacttg ccccgaatgc agaccaataa 60

agcgaggttg tggacctta ccaccttaac gattccattg gcacccaact ccccatgt 118

<210> 58

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-10M-F

<400> 58

ccctcgagtc gcgtcgcat ccggtctctg gcagtgttgg gcgaactctt cctgatatac 60

cacaaagggt tctactaaac tggcttacgt cgtcatctag atgcggtgtt gcgtgggt 118

<

210> 59

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-10M-R

<400> 59

ggggtaccgc taagggtata gcgaggtagc gtaggagtag gccccaatgg agtccatctt 60

tcggtgggtgc tgcacatgt gcacgttaag gaatccttac ccacgcaaca ccgcatct 118

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer (35S-F3)

<400> 60

tggctcctac aaatgccatc 20

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer (GUSwt-R2)

<220><221> R

<222> (3)..(4)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (9)..(9)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (13)..(13)

<223> A or G

<400> 61
 carraactrt tcrcccttca c 21
 <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer (GUSgu-R2)
 <400> 62
 caaaaactat tcacccttca c 21
 <210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer (GUS4m-R2)
 <220><221> R
 <222> (4)..(4)
 <223> A or G
 <220><221> R
 <222> (7)..(7)
 <223> A or G
 <220><221> R
 <222> (9)..(9)
 <223> A or G
 <220><221> R
 <222> (13)..(13)
 <223> A or G
 <220><221> R
 <222> (15)..(15)
 <223> A or G
 <220><221> R
 <222> (19)..(19)
 <223> A or G
 <400> 63
 cacraartrt acrcctttra c 21

<210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer (35S-F2)
 <400> 64
 gaggatctaa cagaactcgc 20
 <210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer (35S-R1)
 <400> 65
 ctctccaaat gaaatgaact tcc 23
 <210> 66
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EIN2wt-F
 <400> 66
 cctcgaggat cctctagacc tcagctaggg ttatc 36
 <210> 67
 <211>
 > 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EIN2wt-R
 <400> 67
 gggtagcaag cttaacgctt atgcgagctg caa 33
 <210> 68
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHSwt-F

<400> 68
cctcgaggat ccgttgtctg ctctgagatc ac 32

<210> 69
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CHSwt-R
<400> 69
gggtaccaag cttctagagc accatcagag tctggaag 38

<210> 70
<211> 119
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EIN2gu-F
<400> 70
cctcgagtct agatttttagt tagggtttat ttagagaatg gtttttgttt tattttttgt 60
ttttttggtt ttgtttggat atattgattt tgggaaatgg gttgtaaata ttgaaggag 119

<210> 71
<211> 119
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EIN2gu-R
<400> 71
gggtaccaac acttatacaa actacaacat attaacataa aataacaaca aaattaaaaa 60
acaaaataat taccaccaa tcatacccaa aacaaacacc tccttcaata ttacaacc 119

<
210> 72
<211> 119
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CHSgu-F
<400> 72
cctcgagggt gtttgttttg agattatagt tgttattttt tgtggttttt ttgatattta 60
ttttgatattt ttgtttgggt aggttttttt tagtgatggg gttgttgtat ttattgtgg 119

<210> 73

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHSgu-R

<400> 73

gggtacctct agacaccatc aaaatctaaa aaaataatct aaacaacaaa caccatctca 60

aaaataaatt tctctccaac aaatatatca aaatccaacc ccacaataaa tacaacaac 119

<210>

> 74

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asEIN2gu-F

<400> 74

caagcttaat gtttatgtga gttgtaatat attggtataa gatggtggta aaattgaaaa 60

gtagagtaat tgttattaag ttatatattga aatgagtatt ttttttgata tttgtaattt 120

<210> 75

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asEIN2gu-R

<400> 75

gggatcctct agaacctcaa ctaaaattta tccaaaaaat aattcctact ctacttccta 60

tccttttaat ttctatcaaa tatattaatc ccaaaaaata aattacaaat atcaaaaaaa 120

<

210> 76

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asCHSgu-F

<400> 76

caagcttcta gagtattatt agagtttgga aggatggttt gagtggtaga tattatttta 60

aagatgggtt tttttttgat agatgtgtta gggtttgatt ttataatgag tgtgggtgtg 120

<210> 77

<211> 120
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> asCHSgu-R
 <400> 77
 gg gatccatt atctactcta aaatcacaa cttaccttc cataatccct ctaacaccca 60
 ccttaactcc ctcatcaatc aaactctttt caataataac accaccacac tcattataaa 120

<210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHS-200-F2
 <400> 78
 gacatgcctg gtgctgacta 20

<210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHS-200-R2
 <400> 79
 ccttagcgat acggaggaca 20

<210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Actin2-For
 <400> 80
 tccctcagca cattccagca 20

<210> 81
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Actin2-Rev

<400> 81

gatcccatc ataaaacccc ag

22

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Top-35S-F2

<220><221> Y

<222> (8)..(8)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (11)..(11)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (14)..(14)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (17)..(17)

<223> C or T

<400> 82

agaaaatytt ygtyaayatg gtgg

24

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Top-35S-R2

<220><221> R

<222> (4)..(4)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (6)..(7)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (9)..(9)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (12)..(12)

<223> A or G

<400> 83

tcartrrara trtcacatca atcc

24

<210> 84

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Link-35S-F2

<220><221> Y

<222> (1)..(2)

<223>

C or T

<220><221> Y

<222> (5)..(5)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (10)..(10)

<223> C or T

<400> 84

yyatyattgy gataaaggaa agg

23

<210> 85

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Link-EIN2-R2

<220><221> R

<222> (6)..(6)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (14)..(14)

<223> A or G

<400> 85

taatttccac caartcatac cc 22

<210> 86

<211> 22

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense si22

<400> 86

gcaagcugac ccugaaguuc au 22

<210> 87

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense si22

<400> 87

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 88

ttttagtata tgtgctgccg 20

<210> 89

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 89

ctcgagttcc aaaaaagctg accctgaagt tcattctctt tgaagatgaa cttcagggtc 60

agccaaacaa ggcttttctc caa 83

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 90

ttttagtata tgtgctgccg 20

<210> 91

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> reverse primer

<400> 91

ctcgagttcc aaaaaataa gtcgcagcag tacaatctct tgaattgtac tgctgcgact 60

tatgaatacc gcttcctcct gag 83

<210> 92

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dsRNA molecules

<400> 92

aagugauuug ugaauaggauu cgguuaaguu agugauaggu aucacgcugg ccauuacuga 60

caugaccgga uucguucgag agucacuu 88

<210> 93

<211> 2653

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 93

agaaaaatcg aaaaatgtga cagtgcgtct ttccacttaa taccctcggt ttgaatttgc 60

tctcggaaag cgtctgagag agtggtcggg gatttctccc gccgcttggg gttttttccg 120

ttaccggaat atccttctcc tccgatgggt agtctgcgct ccacagaaaa cactccgggt 180

tcggaaatgg ccagcgacgg caaaacggag aaagatggct ccggcgactc acccacttct 240

gttctcagcg atgaggaaaa ctgtgaagag aaaactgcta ctgttgctgt agaggaagag 300

atacttctag ccaagaatgg agattcgtct cttatctctg aggccatggc tcaggaagaa 360

gagcagcttc tcaaaatccg ggaagatgaa gagattgcta aacgtgctgc tggctctggt 420

gaagctcctg atctgaatga tactcagttt actaaacttg atgagctctt gacccaaacc	480
cagctctact ctgagtttct ccttgagaaa atggaggata tcacaaaaa tgggatagaa	540
ggtgagacc aaaaggccga gcctgagcct gagcctgagc ccgagaagaa aggccgtgga	600
cgtaaaagaa aggctgctcc tcagggcgac agtatgaagg ctaagaaagc tgttgctgct	660
atgatttcaa gatccaaaga aggccgtgaa tctgccgact cagatctgac agaggaagaa	720
agagtcatga aagagcaggg tgaacttggt cctcttctga ctggcggaaa gttaaagtct	780
tatcagctca aagggtgtcaa atggctgata tcattgtggc aaaatgggtt gaatggaatt	840
ttagctgac aaatgggtct tggaaagaca attcaaacca ttggtttctt atcacacctc	900
aaaggaaatg ggttggatgg tccatatcta gtcattgccc cactctctac tctttcaaac	960
tggatgaatg agatcgctag gttcacgcct tccattaatg caatcattta ccatggagat	1020
aagaaagaaa gggatgagct caggaagagg cacatgcccc gaactgttgg tccgaagttc	1080
cctatagtca taactttcta tgaggttgct atgaatgatg ctaaaaagaa tctgcggcac	1140
tatccatgga aatatgttgt gattgatgag ggtcacaggt tgaaaaacca caagtgtaaa	1200
ctgctgaggg agctaagata cttgaatatg gagaacaaac ttctgctgcc aggaacacct	1260
ctgcaaaata atttgtctga gcttcgggtca ctgttgaatt ttattctgcc tgacatcttt	1320
gcatcacatg acgaatttga atcatggttt gatTTTTctt gaaagaataa taatgaagca	1380
actaaggaag aaggagaaga gaaaagaaga gctcaagtgg ttgcgaaact tcataatata	1440
ctacgacctt tcatcctccg gagaatgaaa tgtgatgttg agctctcact tccccgaaa	1500
aaagagatta tcatctatgc tacaatgacg gaccatcaga agaagttcca ggaacatctt	1560
gtgaaccaca ccttggaaagc acacattaga gatgatactg tccgaggtca tggcttgaag	1620
ggaaagctta acaatcttgc tattcaactt cgaaagaact gcaacatcc tgaccttctt	1680
gtggggcaac tagatggctc atatctctac ccacctttgg aagacattgt gggacagtgc	1740
ggtaaattcc gcttattgga gagattgctt gttcggttat ttgccaaaa tcacagagtc	1800
cttatcttct ccagtgagc aaaaatactg gacattatgg attactactt cagtgagaag	1860
gggtttgagg ttgcccgaat cgacggtagt gtgaaactag aagaaaggag aagacagatc	1920
caagaattca atgatgagaa gagcaactgc aggataattc ttctcagtag cagagccgga	1980
ggactcggaa ttaattctac tgctgcagat acatgcatcc tctacgtag cgattggaac	2040
cctcaaatgg acttgaagc catggacaga tgccacagaa ttggtcagac aaaacctgtt	2100
catgtttaca ggcttgcgac ggctcagtca atagagggcc gagttctgaa acgagcatac	2160
agtaagctta agctggaaca tgtgtgttatt ggcaaggggc agtttcatca agaactgtcc	2220
aagtcttcaa caccgttaga ggaagatgac atactggcgt tgcttaagga cgacgaaat	2280

gctgaagata aactgataca aaccgacata agcgaggagg atcttgacag ggtgcttgac 2340
 cgtagtgtac tgatgattac cttaccgggc gagactcaag cacatgaagc ttttccagtg 2400
 aagggtccgg gttgggaagt ggtctcgtct agctcagctg gagggatgct gtcttccctc 2460
 aacagttaga accactcttt gcaaaaccac ttcggtgtgt ttttttttcc ggaacataac 2520

cggttacttt tgctgtctac tcggaagttt taacttgaaa ccttggaac atctgatgaa 2580
 aacaattgcg gatattatgt tattagacta tttatttatg ccttttgaaa ttggcagta 2640
 attttttagt taa 2653

<210> 94

<211> 1773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct targeting
 a DDM1 gene of B. napus

<400> 94

gggagctgtt gctgctatga tttcaagatc caaagaaggc cgtgaatctg ccgactcaga 60
 tctgacagag gaagaaagag tcatgaatga gcagggtgaa cttgttcctc ttctgactgg 120

cggaaagtta aagtcttacc agctcaaagg tgtcaaatgg ctgatcatcat tgtggcaaaa 180
 tggtttgaat ggaatttttag ctgatcaaat ggttcttggg aagacaattc aaaccattgg 240
 tttcctatca cccaacaag gaaatgggtt ggatgggtcca tatctagtca ttgccccact 300
 ctctactctt tcaaaagcga ttggaaccct caaatggact tgcaagccat ggacagatgc 360
 cacagaattg gtcagacaaa acctgttcat gtttacaggc ttgcgacggc tcagtcaata 420
 gagggccgag ttctgaaacg agcatacagt aagcttaagc tggaacatgt ggttattggc 480
 aaggggcagt ttcatcaaga acgtggtaag gaaataatta ttttcttttt tccttttagt 540

ataaaatagt taagtgtgt taattagtat gattataata atatagttgt tataattgtg 600
 aaaaaataat ttataaatat attgtttaca taaacaacat agtaatgtaa aaaaatatga 660
 caagtgtatg gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 720
 ttgtatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaatc ataatagtaa 780
 ttctagctgg ttgatgaat taaatatcaa tgataaaata ctatagtaaa aataagaata 840
 aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 900
 ccattactaa atatttttagt ttaaaagtta ataaatattt tgttagaaat tccaatctgc 960

ttgtaattta tcaataaaca aaatattaaa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 1020

ctaataaaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 1080
aagatctatc attttatata gtattatttt caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 1140
tacttgtagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 1200
atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcatttgtt tatcattgat cttacatttg 1260
gattgattac agtcacgttc ttgatgaaac tgccccttgc caataaccac atgttccagc 1320
ttaagcttac tgtatgctcg tttcagaact cggccctcta ttgactgagc cgtcgcaagc 1380

ctgtaaacat gaacagggtt tgtctgacca attctgtggc atctgtccat ggcttgcaag 1440
tccatttgag ggttccaatc gcttttgaag gagtagagag tggggcaatg actagatatg 1500
gaccatccaa cccatttctt tgttgggttg ataggaaacc aatgggttga attgtctttc 1560
caagacccat ttgatcagct aaaattccat tcaaacatt ttgccacaat gatatcagcc 1620
atttgacacc tttagctga taagacttta actttccgcc agtcagaaga ggaacaagtt 1680
caccctgctc tticatgact ctttcttctt ctgtcagatc tgagtcggca gattcacggc 1740
cttctttgga tcttgaaatc atagcagcaa cag 1773

<210> 95

<211> 1773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct with G:U
basepairs, targeting a DDM1 gene of B. napus

<400> 95

gggttggtgt tggtatgatt ttaagattta aagaagggtg tgaatttgtt gatttagatt 60
tgatagagga agaaagagtt atgaatgagt aggggtgaatt tgtttttttt ttgattggtg 120
gaaagttaaa gttttattag tttaaagggtg ttaaatgggt gatattattg tggtaaaatg 180
gtttgaatgg aatttttagt gattaaatgg gttttggaaa gataatttaa attattggtt 240

ttttattata ttttaaagga aatgggttgg atgggtttata tttagttatt gttttatttt 300
ttattttttt aaaagtgatt ggaattttta aatggatttg taagttagtg atagatgtta 360
tagaattggt tagataaaat ttgtttatgt ttataggttt gtgatggttt agttaataga 420
gggttgagtt ttgaaatgag tatatagtaa gtttaagttg gaatatgtgg ttattggtta 480
ggggtagttt tattaagaat gtgtggtaag gaaataatta ttttcttttt tccttttagt 540
ataaaatagt taagttaggt taattagttt gattataata atatagttgt tataattgtg 600
aaaaaataat ttataaatat attgtttaca taaacaacat agtaatgtaa aaaaatatga 660

caagtgatgt gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 720
 ttgatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaatc ataatagtaa 780
 ttctagctgg ttgatgaat taaatatcaa tgataaaata ctatagtaaa aataagaata 840
 aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 900
 ccattactaa atattttagt ttaaaagtta ataaatattt tgtagaaat tccaatctgc 960
 ttgtaattta tcaataaaca aaatatataa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 1020
 ctaatagaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 1080

aagatctatc attttatata gtattatttt caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 1140
 tacttgtagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 1200
 atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcatttgtt tatcattgat ctacatttg 1260
 gattgattac agtcacgttc ttgatgaaac tgcccttgc caataaccac atgttcacgc 1320
 ttaagcttac tgiatgctcg ttccagaact cggccctcta ttgactgagc cgtcgcaagc 1380
 ctgtaaacat gaacagggtt tgtctgacca attctgtggc atctgtccat ggcttgcaag 1440
 tccatttgag ggttccaac gcttttgaag gagtagagag tggggcaatg actagatatg 1500

gaccatccaa cccatttctt tgttgggttg ataggaaacc aatggtttga attgtctttc 1560
 caagacccat ttgatcagct aaaattccat tcaaaccatt ttgccacaat gatatcagcc 1620
 atttgacacc tttagctga taagacttta actttccgcc agtcagaaga ggaacaagtt 1680
 caccctgctc ttcatgact ctttcttctt ctgtcagatc tgagtcggca gattcacggc 1740
 cttcttttga tcttgaaatc atagcagcaa cag 1773

<210> 96

<211> 1260

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting a DDM1 gene

of B. napus

<400> 96

ggggtgatag gaaaccaatg gtttgaattg tctttccaag acccatttga tcagctaaaa 60
 ttccattcaa accattttgc cacaatgata tcagccattt gacaccttg agctgataag 120
 actttaactt tccgccagtc agaagaggaa caagttcacc ctgctctttc atgactcttt 180
 ctctctctgt cagatctgag tcggcagatt cacggccttc tttggatctt gaaatcatag 240
 cagcaacagc tttcttagcc ttcatactgt cgccttgagg agcagccttt cttttacgtc 300
 caccgccttt ctctcgggc tcaggctcag gctcaggctc ggccttttgg gtctcacctt 360

ctatccatt tttggtgata gctgttgctg ctatgatttc aagatccaaa gaaggccgtg 420

aatctgccga ctcagatctg acagaggaag aaagagtcac gaatgagcag ggtgaacttg 480

ttctcttctt gactggcgga aagttaaagt cttatcagct caaagggtgc aaatggctga 540

tatcattgtg gcaaaatggt ttgaatggaa ttttagctga tcaaatgggt cttggaaaga 600

caattcaaac cattggtttc ctatcacccc aacaaggaaa tgggttggat ggtccatata 660

tagtcattgc ccactctct actctttcaa aagcgattgg aacctcaaa tggacttgca 720

agccatggac agatgccaca gaattgggtca gacaaaacct gttcatgttt acaggcttgc 780

gacggctcag tcaatagagg gccgagttct gaaacgagca tacagtaagc ttaagctgga 840

acatgtggtt atiggcaagg ggcagtttca tcaagaacgt cactacggtc aagcacccctg 900

tcaagatcct cctcgcttat gtcggtttgt atcagtttat cttcagcatt ttcgtcgtcc 960

ttaagcaacg ccagtatgtc atcttctctt aacggtgttg aagacttggc acgttcttga 1020

tgaaactgcc ccttgccaat aaccacatgt tccagcttaa gcttactgta tgctcgtttc 1080

agaactcggc cctctattga ctgagccgtc gcaagcctgt aaacatgaac aggttttgc 1140

tgaccaatgc tgtggcatct gtccatggct tgcaagtcca tttgagggtt ccaatcgctt 1200

ttgaaagagt agagagtggg gcaatgacta gatatggacc atccaacca tttccttgtt 1260

<210> 97

<211> 4421

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 97

tcttccaaaa tttccccgcc attctctgtg tctcttcgtc taagggtttc ttccaaagaa 60

cgacgacaaa accactgaac ctaaaatccg aaatccaaaa gattcatgag aaaaaatcgt 120

taaagagtac caatttcaga aagttacatt cttacagaga acaagtaatt cccagaaat 180

gggatctagg gttccaatag aaaccatcga agaagacggc gaattcgatt gggaagcagc 240

agtcaaagaa atcgacttgg cttgtcttaa aaccacaaac gcttcttctt cttcgtcatc 300

ccatttcact cctttggcta atccaccaat tacggcaaat ctactaagc cacctgcgaa 360

gagacaatct actctcgata aattcatcgg cagaaccgaa cataaaccgg agaatcatca 420

agttgtttcc gagtgtgggtg ttaacgataa cgataatagt cctttagtgt ggattgatcc 480

tgaggcagct aaaacttga tttatccagt gaatgggagt gttcctttaa gagattatca 540

gtttgtata acgaagactg ctttgttttc gaatacatgt gtggttttgc ctacgggact 600

tggtaaaacg cttatagctg cgggtgttat gtataattac ttcagatggt ttccacaagg 660

taaaatagta tttagcgcg cttctaggcc tcttgtgatg cagcagattg aggcgtgtca	720
taatatgtgt ggaataccac aagaatggac gattgacttg acgggtcaga catgtccttc	780
gaaaagagct tttttgtgga aaagcaaacg ggttttcttt gtcactccac aagtgttaga	840
gaaggatata cagtcaggaa catgtcttac taactacttg gtttgcttgg tgatcgacga	900
ggcacatcga gcttttaggga attattctta ttgtgttgta gttcgtgagt tgatggcggg	960
accgatacag ctgagaatac tggctcttac tgcaactcct ggatcaaaga cacaggccat	1020
ccagggtatc attgataatt tgcagataac cacacttgaa tatcgaaatg agagtgacca	1080
tgatgtttgc ctttatgtcc acgacagaaa attagaagtc atcgaggttc ctttgggtca	1140
agatgcagat gatgtatcga aacgcctgtt tcatgttata cgtccatatg cagtcaggct	1200
taaaaacttt ggggttaatc taaatagaga tatacaaact ttaagtcac acgaagtact	1260
tatggcaagg gataagtttc gtcaagcacc tctaccaggc cttccccatg taaatcacgg	1320
agatgtagaa tcttgctttg cagctcttat cactctttat catattcgta agctcctttc	1380
tagtcatgga ataagaccag cgtatgagat gctagaagag aaattgaaag aagggccatt	1440
tgctaggttg atgagtaaga atgaagatat taggatgacg aagcttttga tgcagcaaag	1500
gttgtcatat ggagcaccaa gcccataatt gtgcaagatg ttagaaatc tggttgatca	1560
tttcaaagtg aaagatccga agacatcacg ggtcattatt ttctcaaatt tcagaggaag	1620
cgtaagagac ataatgaacg cattaagtaa tattggagat atggtcaaag caactgagtt	1680
tatttggtcaa agttcaggta agacattgaa aggccagtcg caaaaaattc agcagcgtgt	1740
tttggagaaa tttagagctg ggggggttcaa tgttatgtc gcaacatcta ttgggtgaaga	1800
aggcttggat atcatggaag ttgacctagt tatatgttt gatgctaag tatctcctct	1860
gaggatgatt caacggatgg gaagaactgg aaggaaaaat aatggtcgag ttgtagtctt	1920
tgcttgtgaa ggatcagaaa agaacagcta tatgcgaaag caagcaagtg gacgggctat	1980
taaaaaacac atgcggaatg gaggaacaaa tagttttaat ttctaccta gtccaaggat	2040
gattcccat gtttataagc cagaagttca gcatgttgag ttttcaatca agcaattcgt	2100
tccacgtgga aagaaactac aagaggagta tgccactgag actccagctt tccagaaaaa	2160
gcttacacct gcagagacgc atatgctcgc taagtattac aacaaccccg atgaggaaaa	2220
gttgagagtg tcttaattg cgttccctca ctccagaca ttgccatcca aggtgcacaa	2280
agtaatgcat tcacgtcaaa caggcatgtt aattgacgt atgcagcact tgcaagagcc	2340
aactttttca gaacagagta aaagcttctt cactgagttt cgagctcctt tgggtgaaag	2400

agaagagctt gatacaggtc tgagggttac taatgatcca aaagatctac actctgtccg 2460

tgatttggaa gtcaacacat cacagagaaa ggcaaaacaa gttgaatctc ccacaagcac 2520

cttagagaca acagagaagg attacgaaga atcttcaccc acacaccgtt atcttttcag 2580

ttcagaatgt gcatccgttg atactctggg gaacgtcttc gtaatgccag ttcctctttt 2640

attctttcct aatgttctgg agtcagacaa tacgcctctg cctaaaacag aaaaacaaca 2700

ttcttgccgg aatacatctc acattgactt agttccagta gatacttcgg aaaaacatcg 2760

gcaagataat atctcatgca agttaaagga aagattctcg ccagacggtg ccagcgagac 2820

actagagact catagccttg tgaaaaggaa ctccaccaga gtaggtgaag atgatgtagc 2880

gaattctgtt ggagaaattg tgttatcatc ggatgaagat gactgtgagg gattggagct 2940

tagtccacgg ctactaact tcatcaagag cggcattgtt ccagagtcac ctgtctatga 3000

ccaaggggaa gcgaacagag aagaagatct tgaatttctt cagctttctt cacccatgag 3060

gttcagtaac gaattggcag gagagtcttc tttccctgag agaaaggttc agcataagtg 3120

caacgattat aacatttgtt ctacaaccac tgaattgaga actcctcaga aggaggtagg 3180

tttggccaac ggaacagaat gcttggctgt ttctcctatt cctgaggatt ggagaactcc 3240

cttggcgaat ctgacaaaca caaacagcag cgctcgcaaa gattggcggg tgagtcttgg 3300

agaaaagtta gaaactcttc gacagcctcg caagttgaag agactacgta gacttggaga 3360

ttgctcgagt gcigtaaagg agaattatcc tggattaca gaggcagacc atatcagatc 3420

tcgttctcgc ggtaaaaagc acattagagg taagaagaag atgatcatgg atgatgatgt 3480

ccaagtcttc attgacgagg aagctgaggt ctcttcggga gcagagatgt cggctgatga 3540

gaacgaagat gtgactggcg attcatttga agatagtctc atagatgacg gaacaatgcc 3600

tacagcaaat actcaagccg agtctggtta agttgacatg atggctgttt acaggcgttc 3660

tcttctcagc cagtcacat taccggcgag atttcgtgat ttagccgcat caagtctgag 3720

tccttattct gctggaccct tgacgagaat aatgagagc agaagcgact cagataaatc 3780

attgtcttct cttcgaacac caaaaacaac aaactctgag tcaaaccaag atgcaatgat 3840

gataggaaac ctttcggtag taaaaatctc gtcagatagc cggaaaagga aatttagctt 3900

atgcaactcg gcgaatgccc ccgtgattaa cttagaaagc aagtttgagc ctcatgcaca 3960

agccacggag aaggaaaagc atgaaggcgt gagaagcaat gcaggtgcgt tagagtacaa 4020

tgatgatgat gatgatgcat tctttgcgac actagacttt gatgcaatgg aagcacaagc 4080

cacattgtta ttgtcgaac agagatccga agcaaaagag aaagaagacg caacggttat 4140

acctaatacca ggcatgcaga gaagtgatgg tatggagaaa gatgcacat cttttgatct 4200
 tggctctgtgg tgattcttct ttcatacgaa gataactaagt tatgtatata gattgacaaa 4260
 ggagacagta gagcataggc atttgatgt atgttttgtg tattaagttt aggtatatcc 4320
 tattgaagta cagtgcctaa ggcagtgcac atgggttaaat caaggttaat gcctcaattc 4380
 gttgaaccct ttaagtaatg acacaaatat gactacatcg g 4421

<210> 98

<211> 1771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct targeting

a FANCM gene of *A. thaliana*

<400> 98

gggtcaggaa catgtcttac taactacttg gtttgcttgg tgatcgacga ggcacatcga 60
 gcttttagga attattctta ttgtgttgta gtctgtgagt tgatggcggt accgatacag 120
 ctgagaatac tggctcttac tgcaactcct ggatcaaaga cacaggccat ccagggtatc 180
 attgataatt tgcagatc cacttgaa ttcgaaatg agagtacga tgatgtttgc 240
 ccttatgtcc ccgacagaaa attagaagtc atcgaggttc ccttgggtca agatgcagat 300
 gatgtatcga aacgcctgtt tcatgttata cgtccatag cagtcaggct taaaaacttt 360
 ggggttaatc taaatagaga tatacaaact ttaagtccac acgaagtact tatggcaagg 420

gataagtttc gtcaagcacc tctaccaggc cttcccatg taaatcacgg agatgtagaa 480
 tcttgctttg cagctcttat caggtaagga aataattatt tcttttttc ctttttagtat 540
 aaaatagtta agtgaatgta attagtatga ttataataat atagttgtta taattgtgaa 600
 aaaataatct ataaatatat tgtttacata aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca 660
 agtgaatgtg aagacgaaga agataaaagt tgagagtaag tatattatct ttaatgaatt 720
 tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca ttaatatctg ttttaatcat aatagtaatt 780
 ctagctgggt tgatgaatta aatatcaatg ataaaatact atagtaaaa taagaataaa 840

taaattaaaa taatattttt ttatgattaa tagtttatta tataattaaa tatctatacc 900
 attactaaat attttagttt aaaagttaat aaatatcttg ttagaaattc caatctgctt 960
 gtaatttata aataacaaa atattaaata acaagctaaa gtaacaaata atatcaaact 1020
 aatagaacaa gtaatctaata gtaacaaaac ataacttaata gctaataata caaagcgcaa 1080
 gatctatcat tttatatagt attattttca atcaacattc ttattaattt cttaaataata 1140
 cttgtagttt tattaacttc taaatggatt gactattaat taaatgaatt agtcgaacat 1200

gaataaaca ggtaacatga tagatcatgt cattgtgtta tcattgatct tacatttgga 1260

ttgattacag ttgataagag ctgcaaagca agattctaca tctccgtgat ttacatgggg 1320

aaggcctggt agaggtgctt gacgaaactt atcccttgcc ataagtaactt cgtgtggact 1380

taaagtttgt atatctctat ttagattaac cccaaagttt ttaagcctga ctgcatatgg 1440

acgtataaca tgaacacagc gtttcgatac atcatctgca tcttgacca agggaacctc 1500

gatgacttct aattttctgt cggggacata agggcaaaca tcatggtcac tctcatttcg 1560

atattcaagt gtggatatct gcaaattatc aatgataccc tggatggcct gtgtctttga 1620

tccaggagtt gcagtaagag ccagtattct cagctgtatc ggtaccgcca tcaactcacg 1680

aactacaaca caataagaat aattccctaa agctcgatgt gcctcgtcga tcaccaagca 1740

aaccaagtag ttagtaagac atgttcctga c 1771

<210> 99

<211> 1771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct with G:U basepairs, targeting a FANCM gene of *A. thaliana*

<400> 99

gggttaggaa tatgttttat taattatttg gtttgtttgg tgattgatga ggtatatga 60

gttttaggga attattttta ttgtgttgta gtttgtgagt tgatgggtgtt attgatatag 120

ttgagaatat tggtttttat tgtaattttt ggattaaaga tataggttat ttagggattt 180

attgataatt ttagatattt tatatttgaa tattgaaatg agagtigatta tgatgtttgt 240

ttttatgttt ttgatagaaa attagaagtt attgaggttt ttttgggtta agatgtagat 300

gatgtattga aatgtttgtt ttatgttata tgtttatatg tagttaggtt taaaaatttt 360

ggggtttaatt taaatagaga tatataaatt ttaagtttat atgaagtatt tatggtaagg 420

gataagtttt gtttaagtatt tttattaggt tttttttatg taaattatgg agatgtagaa 480

ttttgttttg tagtttttat taggtaagga aataattatt ttcctttttc ctttttagtat 540

aaaatagtta agtgatgta attagtatga ttataataat atagtgtgta taattgtgaa 600

aaaataattt ataaatatat tgtttacata aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca 660

agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt tgagagtaag tatattattt ttaatgaatt 720

tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca ttaatatattg ttttaatcat aatagtaatt 780

ctagctgggtt tgatgaatta aatatcaatg ataaaact atagtaaaaa taagaataaa 840

taaattaaaa taatatTTTT ttatgattaa tagtttatta tataattaaa tatctataacc 900
attactaaat attttagttt aaaagttaat aaatattttg ttagaaattc caatctgctt 960

gtaatttatac aataaacaaa atattaaata acaagctaaa gtaacaaata atatcaaact 1020
aatagaaaca gtaatctaata gtaacaaaac ataatactaata gctaataataa caaagcgcaa 1080
gatctatcat tttatatagt attattttca atcaacattc ttattaatTTT cttaaataata 1140
ctttagtattt tattaacttc taaatggatt gactattaat taaatgaatt agtcgaacat 1200
gaataaaca ggtaacatga tagatcatgt cattgtgtta tcattgatct tacatttggga 1260
ttgattacag ttgataagag ctgcaaagca agattctaca tctccgtgat ttacatgggg 1320
aaggcctggt agaggtgctt gacgaaactt atcccttgcc ataagtactt cgtgtggact 1380

taaagtttgt atatctctat ttagattaac cccaaagttt ttaagcctga ctgcatatgg 1440
acgtataaca tgaacagcgt gtttcgatac atcatctgca tcttgacca agggaacctc 1500
gatgacttct aattttctgt cggggacata agggcaaaca tcattggcac tctcatttcg 1560
atattcaagt gtggatatct gcaaattatc aatgataccc tggatggcct gtgtctttga 1620
tccaggagtt gcagtaagag ccagtattct cagctgtatc ggtaccgcca tcaactcacg 1680
aactacaaca caataagaat aattccctaa agctcgatgt gcctcgctga tcaccaagca 1740
aaccaagtag ttagtaagac atgttctga c 1771

<210> 100

<211> 1259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting a FANCM gene
of *A. thaliana*

<400> 100

gggacataag ggcaaacatc atggtcactc tcatttcgat attcaagtgt ggatatctgc 60
aaattatcaa tgataccctg gatggcctgt gtctttgatc caggagttgc agtaagagcc 120
agtattctca gctgtatcgg taccgccatc aactcacgaa ctacaacaca ataagaataa 180
ttccctaag ctcgatgtgc ctcgtcgatc accaagcaaa ccaagtagtt agtaagacat 240
gttcttgact gtatatcctt ctctaact tgtggagtga caaagaaaac ccgtttgctt 300

ttccacaaaa aagctctttt cgaaggacat gtctgacccg tcaagtcaat cgtccattct 360
tgtgggtatc caacaatatg tcaggaacat gtcttactaa ctacttggtt tgcttgggtga 420
tcgacgaggc acatcgagct ttagggaatt attcttattg tgtttagatt cgtgagttga 480

tggcgggtacc gatacagctg agaatactgg ctcttactgc aactcctgga tcaaagacac 540
 aggccatcca gggtatcatt gataatttgc agatatccac acttgaatat cgaaatgaga 600
 gtgacatga tgtttgccct tatgtccccc acagaaaatt agaagtcac gaggttccct 660
 tgggtcaaga tgcagatgat gtatcgaaac gcctgtttca tgttatacgt ccataatgcag 720

 tcaggcttaa aaactttggg gttaatctaa atagagatat acaaacttta agtccacacg 780
 aagtacttat ggcaagggat aagtttcgtc aagcacctct accaggcctt ccccatgtaa 840
 atcacggaga tgiagaatct tgctttgcag ctcttatcat tcgtcaccct aatatcttca 900
 ttcttactca tcaacctage aaatggccct tctttcaatt tctcttctag catctcatac 960
 gctggcttta ttccatgact agaaaggagc ttacgaatat gataaagagt gataagagct 1020
 gcaaagcaag attctacatc tccgtgattt acatggggaa ggccctggtag aggtgcttga 1080
 cgaaacttat cccttgccat aagtacttcg tgtggactta aagtttgtat atctctatct 1140

 agattaaccc caaagttttt aagcctgact gcatatggac gtataacatg aaacaggcgt 1200
 ttcgatacat catctgcac ttagaccaag ggaacctcga tgacttctaa ttttctgtc 1259
 <210> 101
 <211> 4228
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 101

 tccaaaattg gttttgccc ccaatgtggc ttggcgagg gtttcttcca caaaacccca 60
 ctcaacctaa aatctgattc ggcgagaaac gctgtctact tatctcacgc gaaaagaaag 120
 gcgtagatcc accctaaact aaaacagagc atcaagtga atgggacccg agtttccgat 180
 cgaactcgtt gaagaagaag atggattcga ttgggaagca gcagtcagag aaatcgactt 240

 ggcttgcctc aaatccttaa acccttcttc ttcttcttcg accatttca ccaacggcaa 300
 tggcactaaa cctgctaaaa gacaatctac tcttgatcga ttcacgcaa gagccgacca 360
 caagcctect cctccgtatc ctectgttgt ttccgacccg agtttcgagt gtggtactaa 420
 cgacaacact ccagcgtcgg ggattgatcc tgagacagct aaaacttgga tttatccaat 480
 gaacgttctc ctaagagatt atcagtttgc tataacgaag actgctttgt tttcaaacac 540
 attagtgtct ttaccaacag gccttggtaa aacgctcata gctgcagttg taatgtataa 600
 ttacttcaga tggtttccac aaggtaaaat tgtctttgcc gcaccttcta ggcctcttgt 660

 gatgcagcag attgaggcct gccataatat cgtggggata ccacaagaat ggacgattga 720
 cttgacgggt cagacttgcc cttccaaaag agcttctctg tggaaaacca aaagggtttt 780

cttcgtcact ccacaagttc ttgagaagga tatacagtca ggaacgtgtg ttaccaactg	840
cttggtttgc ttggtgatcg acgaggcaca tcgagcttta gggaattatt cttatttgtt	900
tgtagtctgt gatttgatgg cagtaccagt gcagttgaga atattggctc ttactgcaac	960
tcctggatca aagacacagg ccatacaggg tatccttgat aatttgcaga tatcaacact	1020
tgaatatcga aacgagagt accatgatgt ctgcccttat gtccacgaca gaaaagtaga	1080
actaatcgag gtcccttgg gtaaagatgc agatgaggta tctaaacgcc tattagatgt	1140
tatacgtcca tatgctgtca ggcttaaaaa ttccggggtc attctaagca gggattatca	1200
aactttgagt ccacacgaat tactttatggc aaggataag ttctgtgaag cacctgtacc	1260
aggcattccc catataagtc acggagatgt agaattctgc ttgcagctc ttatcacgt	1320
ttatcacatt cgcaagcttc ttctagtca tggataaagg ccagcgtatg agatgcttga	1380
agaaaaactt caggaagggc catttgctag gttgatgagt aagaatgaag atattaggat	1440
gacgaagctt ttgatgcagc aaaggttgc gaacggagca ccaagcccga aattgtccaa	1500
gatgttgag attctagtgt atcactacaa aataaaagat ccgaggacat cacgggtcat	1560
tattttctcg aatttcagag gaagcgtaag agacataatg gacgcattaa gtaatatga	1620
agatgttgtc aaagcaactg agttttattgg tcaaagttca ggtaagacac tgaagggaca	1680
gtcgcaaaaa gttcagcaag ctgttctgga gaaatttaga tctggtgggt ttaatgttat	1740
tgttgcaaca tctatcgcg aagaaggctt ggatatcatg gaagtcgact tagtttatg	1800
ttttgatgct aatgtatccc ctctgaggat gatccaacgc atgggaagaa ctggaaggaa	1860
aaataatggc cgagttgtag ttcttgcttg tgaaggatct gaaaagaata gctatatgcg	1920
aaagaaagca aatggccaag ccattaaaaa acacatgcgg aatggaggaa tgaatagttt	1980
taattttcat ctagtccaa ggatgattcc ccatgtttat aagccagaag ttcagcatgt	2040
taagttttcg atcgagcaat tcattccacg tggaaagaag ctacaagatg agcctgccac	2100
tgagactcca gctttcaaga aaaagcttac accggaagag atggatatgc tcgccaagta	2160
tttcaaaccc aacgaggaaa agtggagagt ttcttgatt gctttccctc acttccaaac	2220
attgccatcc aaagtgcaca aagtaatgca ttcacgcaa acaagcatat taattgatgc	2280
tatgcagcat ctgcaagaga caacttgac agagcaaagt aaaagtttct tcattaagta	2340
tggagctect ttggctgaaa gagatgagct tgacgcaggt ctgagggttg gtgatgatcc	2400
gaaaggtaaa ttiagtctca atgatttga tggcaacaca tcacagagaa aggcaaaaca	2460
aattttagaa tctcccacaa gcacattaga gactacagag aaggatttcg aagcatcttc	2520
accacacac tgttatcttt tcagttcaga atgtgcgtcc gttgatactc tggggaaggt	2580
ctttgtattg ccggttctc tctattctc ttctaagtta ccagggtcag actgcgtggg	2640

aagagaaaaa gaacttttctt ccccgaaataa gtcccacact gacgttggtc cgatagatag 2700
ttcctcaaaa catcggcaag ataatatctt atgcaagtta aagcaaggat tcttgccaga 2760

ttgtgccaac gagactttgg agtcccaaaag ccttttgaaa aggcaactcca ccgatgtagg 2820
taaaggagat atagagaatt gtgctggaga aattatgata tcatcggatg aagaagacga 2880
ctgtgaggat ttggagctta gtccaaggct cactaacttc atcaagagtg gcgttggttc 2940
agattcacct gtctatgacc aaggagtgtc atacgaagca aacagagaag aagaccttga 3000
tcttcacccc acgagtttaa ctaatgaatt ggcaagaag ccatcgacac ctgagaaaaa 3060
ggttcacatt gcttctacgg ccaatgaatt cagaactcct cagaaggaag aagatttagc 3120
caacgaaaca gaaagcttcg ctgtttctcc aatgcctgag gattggagaa ctcccttggc 3180

gaataacacc aacgcaagca gcagcgctag caaagattgg cgcgtgagtt cgggagaaaa 3240
gtcagaaact ctctgacagc ctgcgaagtt gaagagactt cgtagacttg gagattgctc 3300
gagtgtctgtg aaggagaata atcctgggtat tgcaaaagaca gaccatatca gatctcggtc 3360
tcgcagtgtg aagaacataa gaggcaagaa gaagatacgc gcggataata atgctagaat 3420
cttcattgaa gcggaagctg aggtgtcttc ggaatcagaa atgtcggttg atgagaacgt 3480
agatttgacc agcgattcat ttgaagatag ctcatagat gacggtacaa tgcctacagc 3540
aaataactcaa gccgagtgtg ctaaagtga catgatggcc gtttacagac gttctctact 3600

cagccaatca ccattaccgg caagatttctg tgatgtagct gcatcaagtc cgagtcctta 3660
ttcttctggt ctcttgaaga caataaatga gagcagaagc gactcagata aatcattgtc 3720
ttctcttaga accccacaaa caacgaacaa cgagtcaaac aaggatgcag tggccacagg 3780
agactttttg gtagcacaaa tctcaacaga cagccggaag aggaatttca gcttatgcaa 3840
ctcagcgaat gtccagtgga ttaacttgga aaacaagttt gaagctcatg cacaagccac 3900
ggagaaggaa agccatgaag gtccgagaag caatgcaggt gcatcacagt acaaggatga 3960
ggatgaagat gatgatgcat tctacgcgac actggacttt gatgccatgg aagcgcatgc 4020

gacattgcta ttgtcgaac aaaggtcaga aacgaaaaca aaagaagatg catcggtgaa 4080
acctcatttg ggcaatcaga ggaatgatgg ttgcccgaag gatgggcat cttttgatct 4140
tggtttgtgg tgattattct cctattaagt taaagtgtat aaaggttgac atttgatgt 4200
atgttttgtg tatttagttt gtgtcata 4228

<210> 102
<211> 1769
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct targeting
a FANCM gene of *B. napus*

<400> 102

```

gggagaaatt atgatatcat cggatgaaga agacgactgt gtggatttgg agcttagtcc      60

aaggctcact aacttcatca agagtggcgt tgttccagat tcacctgtct atgaccaagt      120
tgcatacgaa gcaaacagtg aagaagacct tgatcttcca cacacgagtt taactaatga      180
attggcagaa gagccatcga cacctgagaa aaaggttcac attgcttcta cggccaatga      240
attcagaacc ccaacgaagg aagaagattt agccaacgaa acagaaagct tcgctgtttc      300
tccaatgcct gaggagtgga gaactccctt ggcgaatata accaacgcaa gcagcagcgc      360
tagcaaagat tggcgcgtga gttcgggaga aaagtcagaa actcttcgac agcctcgcaa      420
gttgaagaga cttcgtagac ttggagattg ctcgagtgtc gtgaaggaga ataatcctgg      480

tattgcaaag acagaccata tcgtaaggaa ataattatit tcttttttcc ttttagtata      540
aaatagttaa gtgatgttaa ttagtatgat tataataata tagttgttat aattgtgaaa      600
aaataattta taaatatatt gtttacataa acaacatagt aatgtaaaaa aatatgacaa      660
gtgatgtgta agacgaagaa gataaaagt gtgagtaagt atattatit taaatgaatt      720
gatcgaacat gtaagatgat atactagcat taatattgt tttaatcata atagtaattc      780
tagctggttt gatgaattaa atatcaatga taaaatacta tagtaaaaat aagaataaat      840
aaattaaaat aatatttttt tatgattaat agttttatt ataataaat atctatacca      900

ttactaaata ttttagttta aaagttaata aatattttgt tagaaattcc aatctgcttg      960
taatttatca ataaacaaaa tattaaataa caagctaaag taacaaataa tatcaacta      1020
atagaacag taatctaag taacaaaaca taatctaag ctaatataac aaagcgcaag      1080
atctatcatt ttatatagta ttattttcaa tcaacattct tattaatttc taaataatac      1140
ttgtagtttt attaacitct aaatggattg actattaatt aaatgaatta gtcgaacatg      1200
aataaacaag gtaacatgat agatcatgtc attgtgttat cattgatctt acatttgat      1260
tgattacagg atatggtctg tctttgcaat accaggatta ttctccttca cagcactcga      1320

gcaatctcca agtctacgaa gtctcttcaa cttgcgaggc tgtcgaagag tttctgactt      1380
ttctcccga ctcacgcgcc aatctttgct agcgtgctg cttgcgttgg tgatatcgcc      1440
caagggagtt ctccactcct caggcattgg agaaacagcg aagctttctg tttcgttggc      1500
taaactttct tccttcgttg gggttctgaa ttcatggcc gtagaagcaa tgtgaacctt      1560
ttctcaggt gtcgatggct cttctgccaa ttcatagtt aaactcgtgt gtggaagatc      1620
aaggctttct tctctgtttg cttcgtatgc aacttggtca tagacaggtg aatctggaac      1680

```

aacgccactc ttgatgaagt tagtgagcct tggactaagc tccaaatcct cacagtcgtc 1740

ttcttcatcc gatgatatca taatttctc 1769

<210> 103

<211> 1769

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct with G:U basepairs, targeting a FANCM gene of B. napus

<400> 103

gggagaaatt atgatattat tggatgaaga agatgattgt gtggatttgg agtttagttt 60

aaggtttatt aattttatta agagtgggtgt tgttttagat ttatttgttt atgattaagt 120

tgtatatgaa gtaaatagtg aagaagattt tgatttttta tatatgagtt taattaatga 180

attggtagaa gagttattga tatttgagaa aaaggtttat attgttttta tggttaatga 240

atttagaatt ttaatgaagg aagaagattt agttaatgaa atagaaagt ttgtttgttt 300

tttaattgtt gaggagtga gaattttttt ggtgaatatt attaattgaa gtagtagtgt 360

tagtaaagat tgggtgtgta gtttgggaga aaagttagaa attttttgat agttttgtaa 420

gttgaagaga tttttagat ttggagattg ttgagtggt gtgaaggaga ataattttgg 480

tattgtaaag atagattata ttgtaaggaa ataattattt tctttttcc ttttagtata 540

aaatagttaa gtgatgttaa ttagtatgat tataataata tagttgttat aattgtgaaa 600

aaataattta taaatatatt gtttacataa acaacatagt aatgtaaaaa aatatgacaa 660

gtgatgtgta agacgaagaa gataaaagt gagagtaagt atattatttt taatgaattt 720

gatcgaacat gtaagatgat atactagcat taatatttgt tttaatcata atagtaattc 780

tagctggttt gatgaattaa atatcaatga taaaatacta tagtaaaaat aagaataaat 840

aaattaaaat aatatttttt tatgattaat agtttattat ataattaaat atctatacca 900

ttactaaata ttttagttta aaagttaata aatattttgt tagaaattcc aatctgcttg 960

taatttatca ataaacaaaa tattaataa caagctaaag taacaaataa tatcaaacta 1020

atagaaacag taatctaag taacaaaaca taatctaag ctaatataac aaagcgcaag 1080

atctatcatt ttatatagta ttattttcaa tcaacattct tattaatttc taaataatac 1140

ttgtagtttt attaatctct aaatggattg actattaatt aatgaatta gtcgaacatg 1200

aataaacaag gtaacatgat agatcatgtc attgtgttat cattgatctt acatttggat 1260

tgattacagg atatggctctg tctttgcaat accaggatta ttctccttca cagcactcga 1320

gcaatctcca agtctacgaa gtctcttcaa cttgcgaggc tgtcgaagag tttctgactt 1380
 ttctcccgaa ctcacgcgcc aatctttgct agcgtgctg cttgcgttgg tgatattcgc 1440

caaggagatt ctccactcct caggcattgg agaaacagcg aagctttctg tttcgttggc 1500
 taaatcttct tccttcgttg gggttctgaa ttcattggcc gtagaagcaa tgtgaacctt 1560
 tttctcaggt gtcgatggct cttctgccaa ttcattagtt aaactcgtgt gtggaagatc 1620
 aaggtcttct tctctgtttg cttcgtatgc aacttggtea tagacaggatg aatctggaac 1680
 aacgccactc ttgatgaagt tagtgagcct tggactaagc tccaaatcct cacagtcgtc 1740
 ttcttcatcc gatgatatca taatttctc 1769

<210> 104
 <211> 1259
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting a FANCM gene
 of B. napus

<400> 104

gggttctgaa ttcattggcc gtagaagcaa tgtgaacctt tttctcaggt gtcgatggct 60
 cttctgccaa ttcattagtt aaactcgtgt gtggaagatc aaggtcttct tctctgtttg 120
 cttcgtatgc aacttggtea tagacaggatg aatctggaac aacgccactc ttgatgaagt 180
 tagtgagcct tggactaagc tccaaatcct cacagtcgtc ttcttcatcc gatgatatca 240
 taatttctcc agcacaattc tctatatctc ctttacctac atcgggtggag tgccttttca 300
 aaaggctttg ggactccaaa gtctcgttgg cacaatctgg caagaatcct tgctttaact 360

tgcatgaaat attatcttgg agaaattatg atatcatcgg atgaagaaga cgactgtgtg 420
 gatttggagc ttagtccaag gctcactaac ttcataaga gtggcgttgt tccagattca 480
 cctgtctatg accaagttgc atacgaagca aacagtgaag aagaccttga tcttcacac 540
 acgagtttaa ctaatgaatt ggcagaagag ccatcgacac ctgagaaaaa ggttcacatt 600
 gcttctacgg ccaatgaatt cagaacccca acgaaggaag aagatttagc caacgaaca 660
 gaaagcttcg ctgtttctcc aatgcctgag gagggtgagaa ctccttggc gaatatcacc 720
 aacgcaagca gcagcgttag caaagattgg cgcgtgagtt cgggagaaaa gtcagaaact 780

cttcgacagc ctcgcaagtt gaagagactt cgtagacttg gagattgctc gaggctgtg 840
 aaggagaata atcctggatg tgcaaagaca gaccatatcc agcttccgct tcaatgaaga 900
 ttctagcatt attatccgcg cgtatcttct tcttgccttg aacacagagc aaaaggaaat 960

acagaatcat tttaacctctt atgttcttta cactgcgaga acgagatctg atatggtctg 1020
tctttgcaat accaggatta ttctccttca cagcactcga gcaatctcca agtctacgaa 1080
gtctcttcaa cttgcgagge tgtcgaagag ttcttgactt ttctcccgaa ctcacgcgcc 1140
aatctttgct agcgctgctg cttgcgttgg tgatattcgc caaggagatt ctccactcct 1200

caggcattgg agaaacagcg aagctttctg ttctgttggc taaatcttct tccttcgtt 1259
<210> 105
<211> 7074
<212> DNA
<213> Nicotiana benthamiana
<400> 105

atgcgagctg tttttgaaac aaagcgtgat cgtgaaatct tggtccttgc tagtaaagtt 60
ctgggtcacc tagctagatc tggcgggtgca atgactgcag atgaagtgga acgtcagata 120
aaagttgcac taggatggct tcgtgggtgaa agaattgagt atcgtttctt tgctgctgtc 180
ttaatatga aggaaatggc ggaaaaatgct tcaactgttt tcaatgttca tgtgccggac 240
tttgtggagg ttgtttgggt tgctctgaag gatccaacat tggctgttcg agagaaggct 300

gttgaggcat tgcgtgcctg ccttcgcgtt attgaaaagc gcgagacacg atggcgtgtt 360
cagtgttatt ataagatgtt tgaggctacc caagatggat tgaccagaac tgcgcctgtt 420
catagtatac atggctccct tctcgcagtg ggagagctgc taaggaatac aggagagttc 480
atgatgtcaa gatacagggg ggttgcagaa attgttataa gatacttgga gcaccgagat 540
cgcttagttc ggctcagcat aacttctcta ctctctcgaa ttgctcattt cctgcgtgat 600
cgattttgta ctaactactt aacgatatgc atgaatcata tacttcatgt ccttaaaata 660
cctgcagaac gtgccagtgg gttcattgct cttggggaga tggctggtgc tctggatggt 720

gaactcatta actatttggc gacaataacc tctcacttgc gtgatgcgat tgctccccgt 780
agaggcagge cctcatttga ggctctggca tgtgttggaa atattgctaa agcaatggga 840
cctgcaatgg agcctcatgt tcgtgggtctc ttggatgcta tgttttctgc tgggctttcc 900
ctgacactag tggaagcctt ggagcaaata actgaaagca ttccatcttt gttgccgacc 960
attcaagatc ggcttcttga atgtatttca gcaattctct ccagatctaa tcatgcactc 1020
tcaagacaat caactgctat gagtcgagga catattgcaa cagttacccc ccaagtacca 1080
gaactgagtg gtctgcact agttcaactt gctttgcaga ctcttgctcg ttttaatttc 1140

aagggccatg atcttcttga gtttgcaagg gactctgttg ttgtgtattt agaagatgag 1200
gatggagcta cacgaaaaga tgctgcgcta tgttgctgca aactagtagc aaattctttc 1260

ttggcgatat ctctaccca gtttagtcct agtagaatca atcgtgccag tggaaagcga	1320
cgctgacttg ttgaagagat tgtgcaaaaa ctctcatcgc ctgctgttgc cgacgtgat	1380
gttactgttc ggcattcaat tttttcttct ctgtatgctg atggaggatt cgatgagttt	1440
ctagctcagg ctgatatgtt gacagctata ttggccactt taaatgatga ggattttgaa	1500
gttcgtgact atgcaatttc actagctggt agactatctg aaaagaatcc agcatatgtt	1560
cttcagcac ttcgtcgcca tcttattcag ctgttaactt acctagagca aagtgcagat	1620
aataaatgta aagaagagag tgcaaaagta ttgggttgct tgattcgcaa ttgtgaacga	1680
ttagtcttct catacattgc tcccatcac aaggtcttg ttgcgaaact ctgtgaaggc	1740
acaggagtca atgcgaatag tggcattatt agtggagtgc tagtgactgt tggagatctt	1800
gccagagtgg gtggctttgc catgcggcag tatatttcag aacttatgcc attaatcgtt	1860
gaagctctac tggatggggc agctgccacc aaacgtgaag tggccgttcc aacacttggt	1920
caagttgtac agagtacagg atatgtcata actccataca atgagtatcc tcagttgctt	1980
ggtttactct tgaactgct caatggtgaa ctggcttggt caaccagaag agaggttttg	2040
aaggttctcg gcatcatggg tgcattagat ccccatgtgc acaagcgcaa tcagcaaagc	2100
ttacccgga cccatggta agttaccggt gtgactggtg atcctggtca acatatcaga	2160
tcaatggatg aattgcctat ggatctttgg cctcctttg caacatctga agattattat	2220
tccactgttg ctatcaactc actcatgcgg atactcaggg atccatctct gtcaagttac	2280
caccagaaag tggttggatc tcttatgttt attttcaagt ccatgggcct tggctgtgtc	2340
ccttatttgc ctaaggtttt gcctgatctc tttcacattg tacgaacatg tgaggatggt	2400
ctaaaagaat ttataacatg gaagcttga accttggtat ctattgtccg ccagcacatc	2460
cgtaagtatc tgccagagtt actctctctg atatcagaaa tatggtcatc tttcagcttg	2520
cctgttgcta acagacctgt tcacattgct cctattttgc atctcgtgga gcaactttgc	2580
ttggctctca acgatgaatt tagaaagtac ctgtctgata tacttccctg ctgtattcaa	2640
gttcttactg atgcagagag gtttagtgac tacacatacg ttattcctat tctccacaca	2700
cttgaagttt ttggtgggac attagatgag catatgcac tgcttcttcc tgcacttatt	2760
cggttgttta aattggatgc ttcagtagaa gtaagacgcg gtgcaatcaa aactctcaca	2820
agattgatac ctctgttgca ggtcactgga cacatatctt ctcttggtgca tcaattgaag	2880
cttgtcttgg acgggaacaa agaagagctc aggaaggatg ctgttgatgc actttgttgt	2940
ctagctcatg ctcttgaga ggacttcacc atttttattc attctattca caagcttatg	3000
gttaaacata ggctgcagca caaggaattt gaagaaatcc gaggacgact ggaaaaacgt	3060
gagccactga ttttggggag caccgcagct cagagattaa atcggcggtt cccagttgag	3120

gtcatcagt atcctttgag tgatggagag aatgagcact acgaggttgg gacggacatg 3180
cataagcagc ttaaaagcca tcaggttaat gatggttagat tgcgtaccgc tggtagaggct 3240

tctcaacgaa gcactaaaga ggattgggca gattggatga ggcatttcag cattgaactt 3300
ctgaaagaat cacctagtc agcattgcga acttgtgcaa gactcgctca actgcagcct 3360
tttgttgggc gagagtgttt tgctgcaggt tttgttagct gctggtcaca acttaatgag 3420
gctagtcaaa ggagctagt acgtagtcta gaaatggcat tttcgtctcc aaatatccct 3480
cctgaaattc ttgctacact tctgaacttg gcggagtta tggaacacga tgagagaccc 3540
cttctattg ataccgtct gcttgggtgct ctgcgagaga agtgtcgagc atttgcaaag 3600
gccctacact acaaggaaat ggaatttgaa ggcgacttt caaataggag ggatgcaaat 3660

cctgttgctg tagttgaagc tctaaccat ataaataatc aattacatca acatagggca 3720
gctgttggaa tattaacata tgctcagcag catttggggg ttcaattgaa ggagtcatgg 3780
tacgagaaat tgcaacgctg ggatgatgct cttaaagcat aacttgctaa ggcgtcacia 3840
gcttcgagtc cacatcttgc tttggatgct actttagggc gtatgcgatg ccttgctgct 3900
ctagctcggt gggaggagct taacaatctt tgtaaggaat actggacacc agctgagcca 3960
gcagctcgac tggaaatggc accaatggct gctagtgcgg cctggaacat gggtagtggt 4020
gatcagatgg cagagtatgt ttctcggtt gatgatggtg atgaaacaa actgcgagtc 4080

ttgggaaata ccgctgccag tggcgatgga agtagtaatg gcaccttttt cagggtgtt 4140
cttctagttc ggcgagggaa gtacgatgaa gcacgtgaat atgttgaaag agcaaggaaa 4200
tgtttggcga ccgagctcgc tgcaactggtt ctgagagct atgaacgtgc ttacagcaac 4260
atggtccgtg ttacagcgtt ttctgaattt gaagaggtga ttgaatactg tactcttctt 4320
atgggaaacc ctgttgctga aggaagaaga gctcttgttc gcaatatgtg gaatgagcgc 4380
ataaagggtt caaaaagaaa tggttaggtt tggcaagtac ttttagctgt gagggcactt 4440
gtattgcctc ctacagaaga cattgaaaca tggatcaaat ttgcatcact ttgccggaag 4500

aatggcagaa ttagccaagc tagatctaca ttggttaaac ttttacagtt cgatccagaa 4560
tcaactcctg caactgtgct gtatcatggt cccctcagg tgatgctagc atacttaaag 4620
taccaatggt cacttggcga ggatcataag cgaaaggaag cctttgctag gttgcaggac 4680
cttgccatgg acctctcaag aacagcagct ctcaaccag tattgcagaa tggattagtt 4740
gcttcttctg gtgtgccact tgttctcgt gtatatctca gactcggcac ttggaagtgg 4800
gcactttctc ctggtttgga tgatgattct attcaagaaa ttcttagtgc atttacaat 4860

gctactcact gtgcaacgaa gtggggaaaag gcatggcata cctgggcact tttcaatacc 4920

gcagtgatgt ctcatcac tctgagaggt ttgccaata ttgcttcaca gtttggtgtt 4980

gtgcccgtaa ctggttatit tcaactctata gcatgccggag cacatgctaa ggggtgtgat 5040

gatagtttac aggataattct tegtcttctt actttgttgt tcaacatgg agctacttcg 5100

gatgtccaaa tggcattgca gaaaggattc actcatgtta acatcaacac atggttggtt 5160

gttttacctc agattattgc acggatacat tcaataaacc atgctgtcag agaactgata 5220

caatccttgc tagtgcgaat tggacagag catccacagg ctcttatgta tccgcttctt 5280

gtggcatgta agtcaattag caatttgcgc agagctgcgg ctcaagaagt ggttgataaa 5340

gtagacagc acagcggcgt actcgttgat caggcccaac ttgctcaaa ggagcttacc 5400

agggttgcaa tactgtggca tgaaatgtgg catgaggcac tggaagaggc cagccgttta 5460

tattttggcg aacacaacat tgagggcatg ctgaaggtgt tagagcctct gcatgaaatg 5520

cttgaggaag gagcgtatg gaacaatacc actataaagg agaaagcatt catccaggca 5580

taccgtcttg agttgttga ggcgtatgaa tgttgtatga agtatcggag aactggtaaa 5640

gatgctgaat taacgcaggc ttgggatctc tattatcatg tattcaggcg gatagataag 5700

cagcttcaaa cactcacaac cctggatttg cagtctgttt ccccgagtt actggagtgt 5760

cgaaatttgg agctagctgt tcttggaaact tatatagcag atgcaccagt ggtgacaatt 5820

gcatcatttg caccacaact tgttgtaatt acatccaaac aacggcctcg aaaattgaca 5880

atccatggga gtgatggaga agactatgct tttttgctca aagggcacga agatctacgc 5940

caagatgaac gtgtcatgca gttgttttgt ctggttaata ctttgctcga gaattcaaga 6000

aagactgcag agaaagattt atcaattcaa cgatatgctg tcattccatt gtcccctaat 6060

agtggactga taggatgggt tccaaattgc gacacctgc accagcttat tcgagaatat 6120

agggatgccc ggaagatcac cctaaatcaa gacataaat tgatgctgag ttttgcaccg 6180

gattatgata atttgccact tattgctaag gtggaggtgt ttgaatatgc ttgcaaaat 6240

acagaaggga atgacttacc aagggttctt tggtaaaga gtcgtacttc tgaagtctgg 6300

ctggacagaa gaacaaatta tacaagaagt ttggctgtca tgagtatggt tggataccta 6360

cttggctctg gtgatcgaca tcctagtaac ctcatgcttc accgatacag tgggaagatt 6420

ctgcatattg actttggaga ttgctttgaa gcttcaatga atcgggagaa gtttcagag 6480

aaggttccct ttcgactcac tagaatgctt gtaaaagcaa tggagggttag tggatatagag 6540

ggaaatttcc ggtcaacatg tgagaatgta atgcaagttc tccgactgca taaagatagt 6600

gttatggcta tgatggaggc ctttgttcac gatccactta taaattggcg tcttttcaac 6660
 ttcaatgaag ttccgcaaat gtccgcactt gccagtgcac atgtccctcc tgttgtgaac 6720
 agtgaggaat cttcttcaaa tagagagctt cttcagccac aaaggggtgc aaggagagaga 6780
 gaactgcttc aggcgggtcaa tcaattaggt gatgccaatg aggttctaaa tgaacgtgct 6840
 gtggctgtta tggtcgaat gagtaataaa ctacacaggac gtgattttgc tgctacttct 6900
 acatctgcga gctctctaca acatgcactg gaccacagta cgtaatttc tggagagacg 6960
 cgtgaagctg atcatggttt atcagtgaat ctacaagtcc aaaaacttat tcaacaagcg 7020

tcgtctcatg aaaatctttg ccaaaattat gttgggtggt gtccattttg gtag 7074

<210> 106

<211> 1513

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a TOR gene of
 N. benthamiana

<400> 106

tgaatttagg tgacactata gaacaaagaa gagctcagga aggatgctgt tgatgcactt 60
 tgttgtctag ctcatgctct tggagaggac ttaccatttt ttattcattc tattcacaag 120
 cttatggtta aacataggct gcagcacaag gaatttgaag aaatccgagg acgactggaa 180
 aaacgtgagc cactgatttt ggggagcacc gcagctcaga gattaaatcg gcggttccca 240

gttgaggta tcagtgatcc tttagtgat ggagagaatg agcactacga ggttgggacg 300
 gacatgcata agcagcttaa aagccatcag gttaaatgat gtagattgag taccgtggt 360
 gaggcttctc aacgaagcac taaagaggat tgggcagagt ggatgaggca tttcagcatt 420
 gaacttctga aagaatcacc tagtccagca ttgcgaactt ttaagctgct tatgcatgtc 480
 cgtcccaacc tcgtagtgtc cattctctcc atcactcaaa ggatcactga tgacctcaac 540
 tgggaaccgc cgatttaate tctgagctgc ggtgtctccc aaaatcagtg gctcacgttt 600
 ttccagtcgt cctcggattt cttcaaattc cttgtgctgc agcctatgtt taaccataag 660

cttgtgaata gaatgaataa aaatggtgaa gtcctctcca agagcatgag ctagacaaca 720
 aagtgcata acagcatcct tcctgagctc ttctttgttc ccgtccaaga caagcttcaa 780
 gtgatgcaca agagaagata tgtgtccagt gacctgcaca cgaggtatca atcttgtgag 840
 agttttgatt gcaccgcgtc ttacttctac tgaagcatcc aatttaaaca accgaataag 900
 tgcaggaaga agcagatgca tatgtctatc taatgtccca ccaaaaactt caagtgtgtg 960
 gagaatagga ataacgtatg tgtagtcact aaacctctct gcatcagtaa gaacttgaat 1020

acagcaggga agtataatcag caaggtactt tctaaattca cacatccgta agtatctgcc 1080

agagtactc tctctgatat cagaaatatg gtcacttttc agcttgccctg ttgctaacag 1140

acctgttcac attgtctcta ttttgcactc cgtggagcaa ctttgcttgg ctctcaacga 1200

tgaatttaga aagtlacctg ctgatatact tcctgctgt attcaagttc ttactgatgc 1260

agagaggttt agtgactaca catacgttat tcctattctc cacacacttg aagtttttgg 1320

tgggacatta gatgagcata tgcactctgt tcttctgca cttattcggt tgtttaaatt 1380

ggatgcttca gtagaagtaa gacgcggtgc aatcaaaact ctcaacagat tgataacctg 1440

tgtgcaggtc actggacaca tatcttctct tgtgcatcac ttgaagcttg tcttggacgg 1500

cccgggactc gaa 1513

<210> 107

<211> 1941

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 107

atggccgcag ccacctccgc cgccgtcgca ttctcgggcg ccgcgcgcgc cgccgcggcc 60

ttaccaagc ccgccctcca tctctcccg cgccaccagc ccgcctcgcg ccgcgcgctc 120

ccgccccgcg tctcagggtg ctgcgccgcg tccccgcg ccaccacggc cgcgctccc 180

cccactctc tccggccgtg ggggccctcc gagccccgca agggcgccga catcctcgtc 240

gaggcgctcg agcgctgcgg catcgctgac gtcttcgctt accccggcgg cgcgccatg 300

gagatccacc aggcgctcac gcgctcgccc gtcatacca accacctctt ccgccacgag 360

cagggggagg cgctcgagc gtccgggtac gcacgcgct ccggccgcgt cggcgctgctc 420

gtcgccacct ccggccccgg ggccaccaac ctgctctccg cgctcgccga cgctctctc 480

gactccatcc ccatggtcgc catcacgggc caggtccac gccgatgat cggcacggac 540

gcgttccagg agacgccat agtggaggtc acgcgctcca tcaccaagca caactacctg 600

gtccttgacg tggaggacat ccccgcgctc atccaggaag ccttcttctt cgcgctctct 660

ggccgcccgg ggcctgtgct ggttgatatc cccaaggaca tccagcagca gatggccgtg 720

cctgtttggg acacgccgat gagtttgcca gggtacatcg ccgcctgcc caagccacca 780

tctactgaat cgcttgagca ggtctctgct ctggttggcg aggcacggcg cccgattctg 840

tatgttgggt gcggctgctg tgcactggc gaggagtgc gccgcttgt tgagctcact 900

ggaattccag ttacaactac tctgatgggc cttggcaact tccccagtga cgaccactg 960

tcactgcga tgcttgggat gcatggtacc gtgtatgcaa attatgcagt agataaggct 1020

gacctgttgc ttgcatttgg tgtgcggttt gatgatcgcg tgactgggaa aattgaggct 1080
 ttgcaagca ggtccaagat tgtgcacatt gacattgatc cagctgagat tggcaagaac 1140

aagcagccac atgtctccat ttgtgcagat gttaagcttg ctttacaggg gttgaatggt 1200
 ctattaagtg gcagcaaagc acaacagggt ctagattttg gtccatggca caaggagtgtg 1260
 gatcagcaga agaggagatt tctcttagga tacaagactt ttggtgaggc aatcccaccg 1320
 cagtatgcta tccaggctact ggatgagctg acaaaagggg aggcgattat tgccacaggt 1380
 gttgggcagc atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acgtcagtgg 1440
 ctgtcttcgt ctggtttggg ggcaatggga ttgggttgc cagctgcagc tggcgcttct 1500
 gtggccaacc cagggtgtcac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac 1560

attcaggagt tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggatgat gatattgaac 1620
 aaccagcacc tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttaacaaggc caaccgggcg 1680
 cacacatacc ttggcaacc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt 1740
 gctaaaggat tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacaaaga agagtgaagt cagtgcagct 1800
 atcaagaaga tgcttagagc cccagggccg tacctgtctg atatcattgt cccgcatcag 1860
 gagcacgtgc tgcctatgat cccaagcggg ggtgctttca aggacatgat catggagggt 1920
 gatggcagga cctcgtatta a 1941

<210> 108

<211> 1505

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA targeting the ALS gene of barley
 (H. vulgare)

<400> 108

agatttaggt gacactatag aatggtggtg cagtgggagg ataggtttta caaggccaac 60
 cgggcgcaca cataccttgg caaccagaa aatgagagt agatatatcc agattttgtg 120
 acgattgcta aaggattcaa cgttccggca gttcgtgtga caaagaagag tgaagtcagt 180
 gcagctatca agaagatgct tgagaccca gggccgtacc tgctggatat cattgtcccg 240
 catcaggagc acgtgctgcc tatgatccca aacggtggtg ctttaagga catgatcatg 300

gagggtgatg gcaggacctc gtattaatct gaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg 360
 acatgcgcaa tcagcatgat gcctgcgtgt tgtatcaact actaggggtt cgactgtgaa 420
 ccatgcgttt ttctagtitta cttgtttcat tcatataaga ggtcctgcc tcaccctcca 480

tgatcatgtc ctigaaagca ccaccgtttg ggatcatagg cagcacgtgc tcctgatgcg 540
 ggacaatgat atccagcagg tacggccctg gggcttcaag catcttcttg atagctgcac 600
 tgacttcaact cttctttgtc acacgaactg ccggaacgtt gaatccttta gcaatcgtea 660
 caaaatctgg atatatctca ctctcatitt ctgggttgcc aaggtatgtg tgcgcccgtt 720

tggccttgta aaacctatcc tccactgca ccaccattcc caggctgtgg ttgttcaata 780
 tcatcacctt cactgggagg ttctcaatac ggatcaacgc caactcctga atgttcatga 840
 ggaaactacc atccccatca atgtcaacaa ctgtgacacc tgggttgcc acagaagcgc 900
 cagctgcagc tggcaaccca aatccattg ccccaaac agacgaagac agccactgac 960
 gtggccgctt gtaagtgtaa tactgagccg cccacatctg atgtgacca acacctgtgg 1020
 caataatgc ctcccccttt gtcagctcat ccagtacctg aatggcttat taagtggcag 1080
 caaagcacia cagggtctag attttgggtcc atggcacaag gatttggatc agcagaagag 1140

ggagtttcct ctaggatata agacttttgg tgaggcaatc ccaccgcagt atgtatcca 1200
 ggtactggat gagctgacaa aaggggaggc gattattgcc acagggttg ggcagcatca 1260
 gatgtggcg gctcagtatt acattataa gcggccacgt cagtggctgt cttcgtctgg 1320
 tttgggggca atgggatttg ggttgccagc tgcagctggc gcttctgtgg ccaaccagg 1380
 tgtcacagtt gttgacattg atggggatgg tagtttctc atgaacattc aggagtggc 1440
 gttgatccgt attgagaacc tcccagtga ggtgatgata ttgaacaacc agcacctggc 1500
 ccggg 1505

<210> 109

<211> 1824

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 109

atgcagactc tgtcggcgca gccctcgc tctctcttt cgatacagcg ccaccatggg 60
 cgccgacgcg gccccggctc cgctcgggtt gctccccg cgcccgccgc ggctgccgc 120
 acgtccacca gcacggcccc ctgcggcg tacgtctcgt cgccgtccac gaggaagggtg 180
 cccgggtacg agcagtcgtc gccgctgcc attgcctgc cgcaagca ggggagcagc 240
 ggccggcgagg gcgagcagag cctcaacttc ttccagcgcg cgccggccgc ggctctgac 300
 gcgttcgagg aggggttcat caacaatgtc ctggagcggc cccacgcgt gccgcgcacg 360

gccgaccgg ccgtgcagat cgccggcaac ttgcgcccg tcggcgagca gcccccggtg 420
 cgccctca cggctctcgg ccgcatcccg ccttcatca acggcgtcta gcccccaac 480

ggcgccaacc cctgcttcga gcccacggcc ggccaccacc tcttcgacgg cgacggcatg 540
 gtccacgcca tccgcatccg aaacggcgcc gccgagtcct acgctgccc cttaccgag 600
 accgccccgc tctcccagga gcgcgccgcg gggaggcccc tcttcctaa gaccatcggc 660
 gagctccacg gccactctgg catcgcgagg ctggccctct tctacgcgcg cggcgctgc 720
 ggctcgtcg acccgctcca cggcactggt gttgccaacg ccggcctcgt ctacttaac 780

ggcgcctcc tcgcatgtc cgaggacgac ctcccgtacc aggtccgct caccgccggt 840
 ggcgacctcg agaccgtcgg ccgctacgac ttcgacggcc agctcgactg cgccatgac 900
 gcgcacccca agctcgacce tgtctccggc gagctcttcg cgctcagcta cgatgtcatc 960
 aagaagccgt acctcaagta cttctacttc cagcccgacg gcaccaagtc cgccgacgtc 1020
 gagatcgagc tcgaccagcc caccatgac cagcacttcg ccatcaccga gaacttcgtc 1080
 gtgctgccc accaccagat ggtgttcaag ctcgccgaga tgttcgcgg cggtcgcgg 1140
 gtgatgctcg acaaggagaa gacctccgc ttcggcgtcc tcccaaagta cgccaaggac 1200

tcgtcggaga tgatgtgggt ggacgtgccg gactgcttct gttccacct ctggaactcg 1260
 tgggaggagc cggagacgga cgaggtggtg gtgatcggct cctgcacgac cccgcagac 1320
 tccatcttca acgacacgga cgaccacctc gagagcgtgc tcaccgagat ccggctcaac 1380
 acgcgcaccg gcgagtcac gcggcgggcc atcctgccgc tggagagcca ggtgaacctc 1440
 gaggtcggca tggatgaacc caacatgctg ggccggaaga cgaggtacgc ctacctggcc 1500
 gtggccgagc cgtggcccaa ggtgtccggg ttcgccaagg tggacctggt gaccggcgag 1560
 ctgaccaagt tcgagtacgg cgagggccgg ttcggcggcg agccgtgctt cgtgcccatg 1620

gacggcgagc acgcgcgcc cgccgcccag gacgacggct acgtgctctc cttcgtgcgc 1680
 gacgaggacg ccggcacatc cgagctcctg gtgctcaacg ccgccgacat gcggctcgag 1740
 gccacgtgc agctgccgc cgggtcccc tatggcttcc acggcacatt catcgcgac 1800
 gccgacctcg acgcccagca ctaa 1824

<210> 110
 <211> 1779
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 110

atgcagacac tcacagctc cagctcggtc tcctccatac agcggcaccg gccgcacccc 60
 gcgggccgcc ggtccagctc ggtcaccttc tccgcccgcg ccgtcagctc cgcgccgcgc 120

gcgccggcac cgtcccgtt cgtgcgcggc gccgacgcgg cgcgcccaa gcccctcatt 180

gccgtcccca agccgccgcg cgtggagagg caggagaaga agctcaactt cttccagcgc 240
 gccgcggtca cggcgctcga cgcgttcgag gaaggatttg tggccaacgt gctcgagcgc 300
 ccgcacggcc tctccaggac ggtcgacccc gcggtgcaga tcgccggcaa cttcgcgctt 360
 gtcggggaga cactctctgt gcaggcgctg cccgtgaccg accgcatccc cccgttcac 420
 aacggcgtgt acgcccga cggcgccaac ccgcacttcg acccgcgcgc cgggcaccac 480
 ctgttcgacg gcgacggcat ggtgcacgct ctgcgcatcc gcaacggcgt cgccgagacc 540

 tacgcctccc gcttcaccga gacggagcgc ctgcagcagg agcgcgcgct ggggcgcccc 600
 atgttcccca aggccattgg tgagctccat ggccactctg ggatcgcgcg cttgtctctg 660
 ttctacgcgc gcgcggcctg cggcctcatc gacccctcgc gcggcaccgg cgtggccaac 720
 gccggcctgg tctacttcaa cggccacctc ctgcctatgt ccgaggacga catcccgtac 780
 cagtcgcgcg tcaccgacga cggcgacctc cagaccgtcg gccgctacga cttcgacggg 840
 cagctcgagt gccccatgat cgcgcacccc aaactcgacc ccgccaccgg ggagctccac 900
 gcgctcagct acgacgtcat caagaagcct tacctgaagt acttctactt cgcggccgac 960

 ggcaccaagt cgcccgacgt cgagatcccg ctggaccagc ccaccatgat ccacgacttc 1020
 gccatcaccg agaattacgt ggtcgtgccc gaccaccagg tgggtttcaa gctgcaggag 1080
 atgctgcgcg gcggctcgcc cgtggtgctc gacaaggaga agacgtcccg cttcggcgtg 1140
 ctgcccgaagt gcgcgccga cgcgtcggag atggtgtggg tggacgtgcc ggactgcttc 1200
 tgcttcacc tctggaacgc gtgggaggag gaggagaccg acgaggtggt ggtgatcggc 1260
 tcctgcatga cccccccga ctccatcttc aacgagtcgg acgagtcct cgagagcgtg 1320
 ctcacggaga tccgcctcaa caccgcacc ggcgagtcca cgcggcgccc catcctggcg 1380

 ctgtcagagc aggtgaacct ggagtcggc atggtgaact ccaacctgct gggccgcaag 1440
 acgcggtacg cctacctggc cgtggccgag ccgtggccca aggtgtccgg cttcgccaag 1500
 gtcgacctgg ccacggcgca gctcacaaa ttcgagtacg gcgagggccg gttcgcggc 1560
 gagccctgct tcgtgccat ggaccggcc acgtcccgcg gcgaggacga cgggtacatt 1620
 ctacattcg tgcacgacga ggccggcg acgtcggagc tgctggtggt caatgccgc 1680
 gacatcggcg tggaggcgac catccagctg ccgtcccgcg tgccatacgg gttccacggc 1740
 accttcatca ccggcaagga gctcgaatcc caggcctga 1779

<210> 111

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the NCED1
genes of barley *Hordeum vulgare* and wheat *Triticum aestivum*

<400> 111

taatacgaact cactataggg tcgacgaggc cgcaggcgcc gcgcgcgtag aagaggcca	60
gcctcgcgat gccagatgg ccgtggagct cgcgatggt cttaggaag acgggcctcc	120
ccgcggcgcg ctctgggag aggcggggcg tctcggtaga gcggcaggcg taggactcgg	180
cggcgccgtt tcggatgcgg atggcgtgga ccatgccgtc gccgtcgaag aggtggtggc	240
cggccgtggg ctgaagcag gggttggcg cgttgcgggc gtagacgcc ttgatgaagg	300
gcgggatgcg gccggagacc gtgagggcg gcacggggg ctgctgcgc acggggcgga	360
agttgccggc gatctgcac gccgggtcgg ccgtgcgcgg cagcgcgtgg ggccgtcca	420
ggacattgtt gatgaacccc tctcgaacg cgtcgagctc cggccgcac ccgcccttca	480
tcaacggcgt ctacgccgc aacggcgcca acccctgctt cgagcccac gccggccacc	540
acctcttca cggcgacggc atggtccac ccatccgat ccgaaacgg gccgcccagt	600
cctacgcctg ccgcttcacc gagaccgcc gcctctccca ggagcgcgc gcggggaggc	660
ccgtcttccc taagaccatc ggcgagctc acggccactc tggcatcgc aggttgccc	720
tcttctacgc gcggcgccc tgcggcctcg tcgaccgta ccacggcact ggtgttgcca	780
acgccggcct cgtctacttc aacggcgccc tctcgccat gtcgaggac gacctccgt	840
accaggtccg cgtcaccgcc ggtggcgacc tcgagaccgt cggccgtac gacttcgacg	900
gccagctcga ctgcgccatg atcgcgcacc ccaagctcga ccctgtctcc ggcgagctct	960
tcgcgtcag ctacgatgtc atcaagaagc cgtacctcaa gtacttctac ttcacccccg	1020
acggcaccaa gtccgccgac gtcgagatcg agctcgacga agcgggaggt cttctccttg	1080
tcgagcatca ccggcgagcc gccgcggaac atctcggcga gcttgaacac catctggtgg	1140
tcgggcacga cgacgaagtt ctcggtgatg gcgaagtcgt ggatcatggt gggtggtcg	1200
agctcgatct cgacgtcgcc ggacttggtg ccgtcggcg tgaagtagaa gtacttgagg	1260
tacggcttct tgatgacatc gtagctgagc gcgaagagct cgccggagac aggttcgagc	1320
ttggggtgcg cgatcatggc gcagtcgagc tggccgtcga agtcgtagcg gccgacggtc	1380
tcgaggtcgc caccggcggt gacgcggacc tggtagggga ggtcgctctc ggacatggcg	1440
aggaggcggc cgttgaagta gacgaggccg gcgttggaac caccagtgc gtggtacgta	1500

<210> 112

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the NCED2 genes of barley *Hordeum vulgare* and wheat *Triticum aestivum*

<400> 112

taatacgact cactataggg ttggcgccgt tgcgggcgta cacgccgttg atgaacgggg	60
ggatgcggtc ggtcacgggc agcgctgca caggaggtgt ctccccgaca ggcgcgaagt	120
tgccggcgat ctgcaccgcg gggtcgaccg tcttgagag gccgtgcggg cgctcgagca	180
cgttgccac aaatccttcc tcgaacgcgt cgagcgccgt gaccgcggcg cgctggaaga	240
agttgagctt ctctcctgc ctctccacgg cgggcggctt ggggacggca atgaggggct	300
tggcgggcgc cgctcggcg ccgcgcacga accgggacgg tgccggcgcg gcggcgcgcg	360
agctgacggc gcgggcggag aaggtgaccg agctggaccg gcggcccgcg gggcgcggcc	420
ggcgcgctg tatggaggag accgagctgg acgctgtcga cgcgcgccc gccaaagccc	480
tcattgccgt cccaagccg cccgccgtgg agaggcagga gaagaagctc aacttcttcc	540
agcgcgccgc ggtcacggcg ctgcacgcgt tcgaggaagg atttgtggcc aacgtgctcg	600
agcggccgca cggcctctcc aggacggctc accccgcggg gcagatcgcc ggcaacttcg	660
cgctgtcgg ggagacacct cctgtgcagg cgctgccgt gaccgaccgc atcccccgct	720
tcataacagg cgtgtacgcc cgcaacggcg ccaaccgta cttcgacccc gtcgccgggc	780
accacctgtt cgacggcgac ggcatgggtc acgctctcgc catccgaac ggcgtcgccg	840
agacctacgc ctcccgcttc accgagacgg agcgctgca gcaggagcgc gcgtggggc	900
gcccgatgtt cccaaggcc attggtgagc tccatggcca ctctgggatc gcgcgccttg	960
ctctgttcta cgcgcgcgcg gcctgcggcc tcacgaccc ctgcgcggc accggcgtag	1020
ccaacgccg cctggtctac ttcaacggcc acctctccc cggcggcggg gtcgagtttg	1080
gggtgcgcga tcattgggca ctcgagctgc ccgtcgaagt cgtagcggcc gacggctctg	1140
aggtcgccgt cgtcggtag gcggacgtgg tacgggatgt cgtcctcgga catggcgagg	1200
aggtggccgt tgaagtagac caggccggcg ttggccacgc cggcgcgcg cgagggtcg	1260
atgaggccgc agcccgcgcg cgctagaac agagcaaggc gcgcgatccc agagtggcca	1320
tggagctcac caatggcctt ggggaacatc gggcgcccca gcgcgcgctc ctgctgcagg	1380
cgctccgtct cggcgaagcg ggaggcgtag gtctcgcgga cgccgttgcg gatgcgcaga	1440
gcgtgcacca tgccgtcgcc gtcgaacagg tggcggcgcg cgacggggtc gaagtacgta	1500

<210> 113

<211> 1521

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 113

atggccttct tctcctcct gtgcatactc gtctctgtgg ccatcgtgtc ctacgcccac	60
cacgcaatcc ggcggaggcg ccagggtctg gctcatggcc gtcatgagca ggccgacctc	120
aagctgcccc ccggctccat gggcctgcct tacgtcggcg agacctgca gctctactcc	180
caggacccca gcgtcttctt ctctccaag cagaagcggg acggcgagat cttcaagacg	240
cacctcttgg ggtgccccgtg cgtgatgctg gcgagcccg aggcggcgcg cttcgtgctg	300
gtgtcggggg cccacctctt caagccgacg taccgcgga gcaaggagcg cctcatcggc	360
ccgtcggcgc tcttcttcca ccaggcgac taccacctcc gcctccgccc gctcgtccag	420
ggccccgtcg gccccaggc cctgcgcaag ctggtgccgg acatcgaggc cgccgttcgc	480
tccacgtctg ccgcctgggc ggacggcgac gtcgccagca ctttccacgc catgaagagg	540
ctctcgttcg acgtcggcat cgtgacgatc ttggcgggc ggctggacga gcggcggaag	600
gaggagctca ggcggaacta cgccgtcgtg gagaaaggct acaactcctt ccccaacagc	660
ttccccggga cgctatacta caaggcgatc caggcgaggc ggcggtgtaa cgcggtgctg	720
agcgacgtcg tgcacgagcg tagggagcgg ggcgagcacg gcgacgacct cctcggtgc	780
ctcatcggtt cgcgggccgg cggcgacgac gccgacgacg agggcgcgct gctgacggac	840
gagcaggctg ccgacaact catcgccgtg ctgttcgcgg cgcaggacac gacggccagc	900
gtgctcacct ggatcgtcaa gtacctccac gaccgcccga agctgctcga ggccgtcagg	960
gcggagcacg cggcgatcca cgaggccaac gacggcgga ggcgccgct gacatggcg	1020
cagacgagga gcatgacgt gacgcacagg gtgattttgg agagcctaag gatggccagc	1080
atcatctcct tcacgttcag ggaggccgtg gccgacgtgg agtacaaagg gtttcttacc	1140
cccaaggggt ggaaggtgat gccgtcttc aggaacatcc atcacagccc ggactacttc	1200
caggatccac acaagttcga ccttcgcga ttcaaggtgg cgccgccc gaacaccttc	1260
acscgttcg ggagcggggt gcacgcgtg ccggggaacg agctggccaa gctcgagatg	1320
ctggtgctca tccaccacct ggtcaccggc tacagggtgg aggttggttg atcgagcgac	1380
gacgtcgagt acagccatt cccgttccc cgccatggcc tgctcgccag ggtacggcga	1440
gatgacggcg tctgcgagg taggaagggg tgcccactg atgaagatga caactacgac	1500
gacgacgaag tgatagtgtg a	1521

<210> 114

<211> 1506

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the ABA-OH-2
genes of barley *Hordeum vulgare* and wheat *Triticum aestivum*

<400> 114

taatacagact cactataggg cggtcgtgga ggtacttgac gatccaggtg agcacgctgg	60
ccgtcgtgtc ctgcgccgag aacagcacgc cgtatgacgtt gtcggcgacc tgctcgtccg	120
tcagcagcgc gccctcgtcg tcggcgtcgt cgcgcccgcc cgcgaccgc atgaggcagc	180
cgaggaggtc gtcgccgtgc tcgccccgct ccctacgctc gtgcacgacg tcgtcagca	240
cgccgttcag ccgccgcctc gcctggatcg cctttagta tagcgtccc gggaagctgt	300
tggggaagga gtttagcct ttctccacga cggcgtagtt ccgcctgagc tcctccttc	360
gccgctcgtc cagccgcccc ccgaagatcg tcacgatgcc gacgtcgaac gagagcctct	420
tcatggcgtg gaaagtgtcg gcgacgtcgc cgtccgccta caactccttc cccaacagct	480
tccccgggac gctatactac aaggcgatcc aggcgaggcg gcggtgaac ggcgtgctga	540
gcgacgtcgt gcacgagcgt agggagcggg gcgagcacgg cgacgacctc ctggtgctgc	600
tcatgcggtc gcgggccggc ggcgacgacg ccgacgacga gggcgcgctg ctgacggacg	660
agcaggtcgc cgacaacgtc atcggcgtgc tgttcgcggc gcaggacacg acggccagcg	720
tgctcacctg gatcgtcaag tacctccacg accgccgta gctgctcag gccgtcaggg	780
cggagcacgc ggcgatccac gaggccaacg acggcgggag gcggccgctg acatgggcgc	840
agacgaggag catgacgtcg acgcacaggg tgattttga gagcctaagg atggccagca	900
tcatctcctt cagcttcagg gaggccgtgg ccgacgtgga gtacaaaggg tttcttacc	960
ccaaggggtg gaaggtgatg ccgctcttca ggaacatcca tcacagccc gactacttc	1020
aggatccaca caagttcgac ctttcgcat tcaaggtcgc tcgatccaac aacctccac	1080
ctgtagccgg tgaccaggtg gtggatgagc accagcatct cgagcttggc cagctcgttc	1140
cccgggcacg cgtgcacccc gctcccgaac ggagtgaagg tgttcggccg cggcgccacc	1200
ttgaatcgcg aagggtcgaa cttgtgtgga tcctggaagt agtccgggtg gtgatgatg	1260
ttctgaaga gcggcatcac cttccacccc ttggggataa gaaacccttt gtactccacg	1320
tcggccacgg cctccctgaa cgtgaaggag atgatgctgg ccaccttag gctctccaaa	1380
atcacctgt gcgtcagcgt catgtcctc gtctgcgcc atgtcagcgg ccgcctccc	1440
ccgtcgttgg cctcgtggat cgccgcgtgc tccgccctga cggcctcgag cagctacgta	1500

ggtacc 1506

<210> 115

<211> 3885

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 115

atggaagctg aaattgtgaa tgtgagacct cagctagggt ttatccagag aatggttcct 60
gctctacttc ctgtcctttt ggtttctgtc ggatatattg atcccgggaa atgggttgca 120
aatatcgaag gaggtgctcg tttcgggtat gacttgggtg caattactct gcttttcaat 180
tttgccgcca tcttatgcca atatgttgca gctcgcataa gcgttgtgac tggtaaacac 240
ttggctcaga tctgcaatga agaataatgac aagtggacgt gcatgttctt gggcattcag 300
gcggagtctt cagcaattct gctcgacctt accatggttg tgggagttgc gcatgcactt 360

aaccttttgt ttgggttgga gttatccact ggagtgtttt tggccgccat ggatgcgttt 420
ttatttcttg ttttcgcctc tttccttgaa aatggtatgg caaatacagt atccatttac 480
tctgcaggcc tggattactt tctctatgta tctggcgtct tgctgagtca gctgagatc 540
ccactctcta tgaatggagt gttaactcgg ttaaatggag agagcgcatt cgcactgatg 600
ggtcttcttg gcgcaagcat cgteccctac aatttttata tccattctta ttttgcctgg 660
gaaagtacat cttcgtctga tgtcgacaag agcagcttgt gtcaagacca tttgttcgcc 720
atctttggtg tcttcagcgg actgtcactt gtaaattatg tattgatgaa tgcagcagct 780

aatgtgtttc acagtactgg ccttgttgga ctgacttttc acgatgcctt gtcactaatg 840
gagcaggat ttatgagtc gctcattcca gtggtctttt tgatgctctt gttcttctct 900
agtcaaatga ccgcactagc ttgggctttc ggtggagagg tcgtcctgca tgacttcttg 960
aagatagaaa taccgcttg gcttcacgt gctacaatca gaattcttgc agttgctcct 1020
gcgctttatt gtgtatggac atctgggtgca gacggaatat accagttact tatattcacc 1080
caggtcttgg tggcaatgat gcttccttgc tcggttaatac cgcttttccg cattgcttcg 1140
tcgagacaaa tcatgggtgt ccataaaatc cctcaggttg gcgagttcct cgcacttaca 1200

acgttttttg gatttctggg gttgaatgtt gttttgttg ttgagatggt atttgggagc 1260
agtgactggg ctggtggttt gagatggaat accgtgatgg gcacctcgat tcagtacacc 1320
actctgcttg tatcgtcatg tgcattctta tgctgatac tctggctggc agccacgccg 1380
ctgaaatctg cgagtaacag agcgggaagct caaatatgga acatggatgc tcaaaatgct 1440
ttatcttacc catctgttca agaagaggaa attgaaagaa cagaacaag gaggaacgaa 1500

gacgaatcaa tagtgcggtt ggaaagcagg gtaaaggatc agttggatac tacgtctgtt 1560
actagctcgg tctatgattt gccagagaac attctaata ga cggatcaaga aatccgttcg 1620

agccctccag aggaaagaga gttggatgta aagtactcta cctctcaagt tagtagtctt 1680
aaggaagact ctgatgtaaa ggaacagtct gtattgcagt caacagtggc taatgaggtc 1740
agtataagg atctgattgt tgaacaaaag atggcgaaaa ttgaaccaat gagtccgtg 1800
gagaagattg ttagcatgga gaataacagc aagtttattg aaaaggatgt tgaaggggtt 1860
tcatgggaaa cagaagaagc taccaaagct gctcctacaa gcaactttac tgcggatct 1920
gatggctctc cttcattccg cagcttaagt ggggaagggg gaagtgggac tggaaacctt 1980
tcacggttgc aaggtttggg acgtgctgcc cggagacact tatctcgat ccttgatgaa 2040

ttttggggac atttataatg ttttcatggg caattggttg ctgaagccag ggcaaagaaa 2100
ctagatcagc tgtttggcac tgatcaaaag tcagcctctt ctatgaaagc agattcgttt 2160
ggaaaagaca ttagcagtgg atattgcatg tcaccaactg cgaagggaat ggattcacag 2220
atgacttcaa gtttataatg ttactgaag cagcagagga caccgggaag tatcgattcg 2280
ttgtatggat tacaaagagg ttctgcaccg tcaccgttgg tcaaccgtat gcagatgttg 2340
ggtgcatatg gtaacaccac taataataat aatgcttacg aattgagtga gagaagatac 2400
tctagcctgc gtgctccatc atcttcagag ggttgggaac accaacaacc agctacagtt 2460

cacggatacc agatgaagtc atatgtagac aatttgcaa aagaaaggct tgaagcctta 2520
caatcccgtg gagagatccc gacatcgaga tctatggcgc ttggtacatt gagctataca 2580
cagcaacttg ctttagcctt gaaacagaag tcccagaatg gtctaacccc tggaccagct 2640
cctgggtttg agaattttgc tgggtctaga agcatatcgc gacaatctga aagatcttat 2700
tacgtgttgc catcttctgg caatactgat actgttggcg cagcagtagc caatgagaaa 2760
aaatatagta gcatgccaga tatctcagga ttgtctatgt ccgcaaggaa catgcattta 2820
ccaaacaaca agagtggata ctgggatccg tcaagtggag gaggagggtg tgggtcgtct 2880

tatggtcggt taagcaatga atcatcgta tattctaatt tggggtcacg ggtgggagta 2940
ccctcgactt atgatgacat ttctcaatca agaggaggct acagagatgc ctacagtttg 3000
ccacagagtg caacaacagg gaccggatcg ctttgggtcca gacagccctt tgagcagttt 3060
ggtgtagcgg agaggaatgg tgctgttggg gaggagctca ggaatagatc gaatccgatc 3120
aatatagaca acaacgcttc ttctaagtgt gatgcagagg ctaagcttct tcagtcgttc 3180
aggcactgta ttctaaagct tattaaactt gaaggatccg agtggttgtt tggacaaagc 3240

gatggagttg atgaagaact gattgaccgg gtagctgcac gagagaagtt tatctatgaa 3300

gctgaagctc gagaaataaa ccaggtgggt cacatggggg agccactaat ttcacggtt 3360

cctaactgtg gagatggttg cgtttgaga gctgatttga ttgtgagctt tggagtttgg 3420

tgcattcacc gtgtccttga cttgtctctc atggagagtc ggcctgagct ttggggaaag 3480

tacacttacg ttctcaaccg cctacaggga gtgattgac cggcgttctc aaagctgcgg 3540

acaccaatga caccgtgctt ttgccttcag attccagcga gccaccagag agcgagtccg 3600

acttcagcta acggaatgtt acctccggct gcaaaaccgg ctaaaggcaa atgcacaacc 3660

gcagtcacac ttcttgatct aatcaaagac gttgaaatgg caatctcttg tagaaaaggc 3720

cgaaccggta cagctgcagg tgatgtggct ttcccaaagg ggaaagagaa ttggcttcg 3780

gttttgaagc ggtataaacg tcggttatcg aataaaccag taggtatgaa tcaggatgga 3840

cccgttcaa gaaaaaacgt gactgcgtac ggatcattgg gttga 3885

<210> 116

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the EIN2 gene
of *A. thaliana*

<400> 116

taatacgact cactataggg agctgcaaca tattggcata agatggcggc aaaattgaaa 60

agcagagtaa ttgccaccaa gtcatacccg aaacgagcac ctcttcgat atttgcaacc 120

catttcccg gatcaatata tccgacagaa accaaaagga caggaagtag agcaggaacc 180

attctctgga taaacctag ctgaggtctc acattcaca tttcagcttc catcctaaat 240

ctatctgata atataattac tcagagtagg attcaaggta aactctacag tcgtggttca 300

ctaaaagcct cagttgagta aaattcacag atttgatcta aaacacctga atgtgagacc 360

tcagctaggg ttatccaga gaatggttcc tgcctactt cctgtcctt ttggtttctgt 420

cggatatatt gatccccgga aatgggttgc aaatatcgaa ggaggtgctc gtttcgggta 480

tgacttggtg gcaattactc tcttttcaa ttttccgcc atcttatgcc aatatgttgc 540

agctccaac agcgttgtga ctggtaaaca cttggctcag atctgcaatg aagaatatga 600

caagtggacg tgcatgttct tgggcattca ggcggagtgc tcagcaattc tgctcgacct 660

taccatggtt gtgggagtgt cgcagcact taacctttt tttgggttgg agttatccac 720

tggagtgttt ttggccgcca tggatgcgag tgggatctca gactgactca gcaagacgcc 780

agatacatag agaagtaata ccaggcctgc agagtaaag gatactgtat ttgccataacc 840
atlttcaagg aaagaggcga aaacaggaaa taaaaacgca tccatggcgg ccaaaaacac 900
tccagtggat aactccaccc caaacaaaag gttaaagtca tgcgcaactc ccacaacat 960

ggtaaggtcg agcagaattg ctgagaactc cgcttgaatg cccaagaaca tgcacgtcca 1020
cttgtcatat tcttcattgc agatctgagc caagtgttta ccagtcacaa cgctgttgac 1080

<210> 117
<211> 1188
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 117

atggtgatgg ctggtgcttc tcttttggat gagatcagac aggctcagag agctgatgga 60
cctgcaggca tcttggctat tggcactgct aacctgaga accatgtgct tcaggcggag 120
tactctgact actacttccg catcaccaac agtgaacaca tgaccgacct caaggagaag 180
ttcaagcgca tgtgcgacaa gtcgacaatt cggaaacgtc acatgcatct gacggaggaa 240

tctctcaagg aaaaccacac catgtgtgct tacatggctc cttctctgga caccagacag 300
gacatcgtgg tggtcgaagt ccctaagcta ggcaaagaag cggcagtgaa ggccatcaag 360
gagtggggcc agcccaagtc aaagatcact catgtcgtct tctgcactac ctccggcgtc 420
gacatgcctg gtgtgacta ccagctcacc aagcttcttg gtctccgtcc ttcctgaag 480
cgtctcatga tgtaccagca aggttgcttc gccggcggtc ctgtcctccg tategctaag 540
gatctcgccg agaacaatcg tggagcacgt gtctcgttg tctgtctga gatcacagcc 600
gttaccttcc gtggtccctc tgacaccac cttgactccc tegtgggtca ggctcttttc 660

agtgatggcg ccgccgact catttggtggg tcggaccctg acacatctgt cggagagaaa 720
cccatctttg agatgggtgc tgccgctcag accatccttc cagactctga tgggtgccata 780
gacggacatt tgagggaagt tggcttcacc ttccatctcc tcaaggatgt tcccggcctc 840
atctccaaga acatttgtga gactctagac gaagcggtta aacctttggg gataagtga 900
tggaactccc tcttctggat agcccacct ggagggtccag cgatcctaga ccagggtggag 960
ataaagctag gactaaagga agagaagatg agggcgacac gtcacgtgtt gagcgagtat 1020
ggaaacatgt cgagcgctg cgttctcttc atactagacg agatgaggag gaagtcagct 1080

aaggatgggtg tggccacgac aggagaaggg ttggagtggg gtgtcttgtt tggtttcgga 1140
ccagggtctca ctgttgagac agtcgtcttg cacagcgttc ctctctaa 1188

<210> 118

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the CHS gene
of *A. thaliana*

<400> 118

taatacgact cactataggg gccacacat ccttagctga cttcctcctc atctcgtcta	60
glatgaagag aacgcacgcg ctcgacatgt ttccatactc gctcaacacg tgacgtgtcg	120
ccctcatctt ctcttcttt agtcctagct ttatctccac ctggcttagg atcgctggac	180
ctccaggggtg ggctatccag aagagggagt tccagtcact tatcccaaa ggtttaaacg	240
cttcgtctag actcttcaca atgttcttgg agatgaggcc gggaacatcc ttgaggagat	300
ggaaggtgag accaacttcc ctcaaatgtc cgtctatggc accatcagac tggaactccc	360
tcttctggat agccccacct ggaggtccag cgatcctaga ccaggtggag ataaagctag	420
gactaaagga agagaagatg agggcgacac gtcacgtgtt gagcgagtat ggaaacatgt	480
cgagcgcgtg cgttctcttc atactagacg agatgaggag gaagtcagct aaggatgggtg	540
tggccccgac aggagaaggg ttggagtggg gtgtcttgtt tggtttcgga ccaggtctca	600
ctgttgagac agtcgtcttg cacagcgttc ctctctaaac agaacgcttg cttctatct	660
gcctacctac ctacgcaaaa cttaatcct gtcttatgtt ttatataata taatcattat	720
atgtttacgc aataattaag gaagaatgac atttccaaac aaagatttga tgtcattcaa	780
gacccataga ttaatatattg taaaaagaca caaaaaagag agtacaaaaa cagtcgaata	840
gacctgtcca gcacatatca catatcacat caaatgcatt cttccttaat tattgcgtaa	900
acataaatg attatattat ataaaacata agacaggatt aaagttttgc gtaggtaggt	960
aggcagatag aaggcaagcg ttctgttttag agaggaacgc tgtgcaagac gactgtctca	1020
acagtgagac ctggtcgaa accaaacaag acacccact ccaacccttc tctgtcaac	1080

<210> 119

<211> 3456

<212> DNA

<213> *Lupinus angustifolius*

<400> 119

atgttgactc ttcaaccac acatgagtca agtagtcaat accctctca tacacttata	60
gctgagacct gtcactttga ttatctgtac tatactaata aaagtctct aattatgtca	120
cttgagaat catccctgca atggaaatac catgttttct tgagtttttag gggaggtgac	180

acccgcttaa gcttactaa tcacttatat gctgcgttgg tgcgaaaagg aatcattact 240
 ttccgagatg acaacaact tcacaaagga gatgccattt ctcaacatct gcatcaatca 300

 atccaacagt ctctagctgc cattgttgtt atctcggaga actatgcttc ttccacttgg 360
 tgtttggatg agctaaaact aattcttgaa tcgagaatag atgtttttcc agtcttttat 420
 ggtgtcactc ctctgatgt tcgataccag aaaaatagtt ttgctgaggc tttcaataaa 480
 catgttgtaa gatttgaaca agatgaagag aaagtgc aaa aatggagaga ttgcttgaaa 540
 gaagttgctg atttttctgg atgggagtcc aaggacatgg ctgaagcaga actcattgaa 600
 gatgttattg aaaaggtatg gataaaacta caacaaaaat tgccatccta caatgaagga 660
 gtggttggat ttgattcaag ggtgaagaaa atgatttcac ttttaagcat aggatcacia 720

 gatattcggg ttatcgggat atgggggatg gctggaactg gaaaaacaat tcttgctaga 780
 gtaatctacg aaacaataag tagccaattt gagattaaat gtttccttct taatgttaga 840
 gaggtttctc aaacatctga tggatttgtt tccttacaaa gaaaacttct ttctaccctt 900
 aagataagca acctagaaat tgatgatttg tatgatggaa agaagaaaat tatgaacctt 960
 ttgtgcaaca aaagtgttct tcttgcctt gatgacatta gtcatttaag tcagctagag 1020
 aatttggtta aaactaaagg ttggtttggt ccatgcagca gaggataat aacaacaaa 1080
 gatatgcact tactagtatc acatgggtcg tgtgagaagt atgagatgag aatcttaaat 1140

 gaaagttctt ctttcaact cttcagccag aaagcattca gaagagataa acctccagag 1200
 ggttatttag aaataactaa aagtatggc aaatatgctg gaggtcttcc ttggcactt 1260
 aaagtgttgg gttcttttgt ttgtggaaga agtctcagtc agtggaaagga tgctttggat 1320
 aagataaaac aagtctgcc gaaagacatt tgaacacac taataatagg ttatgatgga 1380
 ctagaagatg cagaaaagac tttgttttta gatattgctt tcttctttac aggacggtcg 1440
 aaaattgaag tgatacaggt attggcagat tgtggcctta atccaacaat tggataaagt 1500
 cttcttattg aaagatctct agtaagttgt tgtggaggaa ttttggaaat gcatgattta 1560

 cttcaagaaa tgggtagaaa tattgtatat caagaatctc cggtatgatc aagcagacgc 1620
 agtaggttat gctctttaga agatattaac cgagtattca gaaaaaaca gggaaccaat 1680
 atcattcaag gaatagtctt gaaatcaagt gacctatgtg aagcatattg gcatcctgaa 1740
 gccttctcaa aaatggataa tcttagagta ctcatcattt tgtgtgattt gcacctccc 1800
 ctcggcctca aatgtctctc tagttcatta aaacttcttg aatggaaggg atatcctttg 1860
 gaatatctac catttggcct gcaactgcta gaacttgctt acttgaaaat gcattgcagc 1920

aaacttaaac aactttggaa tggaactcaa attttcagag agctaaaatc aattgatctc 1980

agtgattcca gagatctaata tcaaactcca gatattttctg aggttccatg tcttgagagt 2040

ttagttttga aaggttgtaa aaaccttggt gaggttcac aatctgttgc aaagcacaag 2100

aatgttgcta tactagacct ggaagggtgc atcagtccta agaccctgcc aagaaaattg 2160

gagatgaatg ctttggaaaa gtccattctc tccggctgct cacaatttaa aaaccttccc 2220

gaatttgggg agagtatgga atgtctatct atgcttaatt taagagattg cacaagtctt 2280

gtttctcttc cacagagtgt tcgaacatg aaatccttta gagatctcaa tatccatggt 2340

tgctcaaaat tgtttaagct gacaaacaat tcaaatgaaa ataatgtcgt ggaagaaatt 2400

gatgagactg aaacaggtag gagagaagtg cattcatcat ggagcttttc tctccttact 2460

gagaaagtgt ttgatttcgt aaagtatcca gttagcatgg actcgaagtt gccttctctc 2520

tcaagtttcc ctcggttgaa gaaattagat atgggcaact gtaatctcag tgatggacca 2580

attatagatc atattggaca tttaacatca ctggaagtgt tatatttagc tgggaacaac 2640

tttggtgacc ttacagcaag cattggtaac ctttctcggc tacaacgcct tggtttatat 2700

aatgccgaa gacttaggac attgcctgag ctccaccca gtgtatgcca gttacttatg 2760

aacgactgca ctcaactgga acctatgtta ttgacacac aaataatattt gaaaatattt 2820

gaggcaaata gatggagcct gacacgcgaa ttgtggttcc tgattccagg gagtgaatc 2880

ccagcatggt ttgagcatca agattatttt agcctgaaac caagtttagc gcctttcgat 2940

tatcacgagg agtatgcttt tattgtttca acaatagtaa acatccctga ctattgcctt 3000

tcaagtgatt ggataggaat tattgtatgc tttttactgg aaagtgggtt aaaggcagac 3060

ctacacagac atattcgtag aagtcgggtc acgatcggat ggtcttttaa agatcccgat 3120

gcagaaacgg ttaccctctt acgcttact aaacgtcgtt ggacacattt caaaggcaat 3180

cacctattga ttactacttt tggaagtgat catagaatat acaagcacta cttaacttgt 3240

ggcaaaagca aagtgaatt gatattttgt ggtgagaata ttgcaagtg cgggaagcta 3300

aagctgaaaa actgtgggat ccgtgtgatt tgtaaggaag atggtgtatc gcgtagaggc 3360

gaggaaacga gtgaagtga ggtgccttcc acttcagttg aatctgatgt tcacaacaa 3420

tcacgaataa ctgaaattac agatgaatat gaataa 3456

<210> 120

<211> 1280

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the L.

angustifolius N-like gene

<400> 120

taatacgact cactataggg tatcgaacat cagaaggagt gacaccataa aagactggaa 60

aaacatctat tctcgattca agaattagtt ttagctcatc caaacaccaa gtggaagagt 120

atttccattg cagggatgat tctccaagt acataattag agaactttga ttagtatagt 180

acagataatc aaagtgacag gtctcagcta taagtgtatg aggagggtat tgactacttg 240

actcatgtgt gggttgaaga gtcaacatat agcttcacgg atcccacagt ttttcagctt 300

tagcttcccc cacttgcaaa tattctcacc aaaaaatc aattgcactt tgcttttgcc 360

acaagttaag tagtgcttgt atattctatg atcacctgt tgactcttca acccacacat 420

gagtcaagta gtcaataccc tctcataca cttatagctg agacctgtca ctttgattat 480

ctgtactata ctaatcaaag ttctctaatt atgtcacttg gagaatcatc cctgcaatgg 540

aaatactctt ccacttggtg tttggatgag ctaaaactaa ttcttgaatc gagaatagat 600

gtttttccag tcttttatgg tgtcactcct tctgatgttc gatacccgta gttttgctga 660

ggctttcaat aaacatgttg taagatttga acaagatgaa gagaaagtgc agtttgagca 720

tcaagattat ttagcctga aaccaagttt agcgcctttc gattatcacg aggagtatgc 780

ttttattgtt tcaacaatag taaacatccc tgactattgc ctttcaagt attggatagg 840

aattattgta tgctttttac tggaaagtgg tttaaaggca gacctacaca gacatatcc 900

aaaagtagta atcaataggt gattgccttt gaaatgtgtc caacgacgtt tagtgaagcg 960

taaggggtaa accgtttctg catcgggatc tttaaaagac catccgatcg tgaccggact 1020

tctacgaata tgctgtgta ggtctgcctt taaaccactt tccagtaaaa agcatacaat 1080

aattcctatc caatcacttg aaaggcaata gtcagggatg tttactattg ttgaaacaat 1140

aaaagcatac tctcgtgat aatcgaaagg cgtataactt ggtttcaggc taaaataatc 1200

ttgatgctca aactgcactt tctcttcac ttttcaaact cttacaacat gtttattgaa 1260

agcctcagca aaactacgta 1280

<210> 121

<211> 1527

<212> DNA

<213> Vitis pseudoreticulata

<400> 121

atggctggcg acgaggagac gacgacgacg gcagcaacac ttgaaacaac gtccacttgg 60

gctgttgcct ctgtttgctt tattttgatt gcactctcca tacttattga gcatgcctc 120

catctcttag ccaagtactt caacaagaag cggaggagggt ctctcattca tgctcttaac 180
aacgtcaaat cggagttgat gctcttgggg ttctgtctctt tgttgctgac tgtgtgccaa 240
aagtatattg cgaagatttg tatcccaagg agcgtagggtg aaacttttct tccctgcaag 300
accttgacag aaagtgttc agaagaagaa accaaatgcg aagagcaggg aaagatgtct 360

ttgctgtcta gacaaggcgt ggaggaacta caatacttaa ttttctgtct ggccttcttc 420
cattccctct actgcgtcct cacattcggt cttgggatgg ccaagatgaa gaaatgggag 480
tcctgggagg cagaacaag aacactggaa tatcagtta caaatgatcc acggaggttc 540
aggtcatcc atcagacatc atttggaag caacatctga gatattggag tgagcatcag 600
atacttcgtt ggccggcttg ttttattcgg cagtctctatc catccgtctc caaagtggat 660
tacttgactc ttagacatgg gtccattatg gccattttg cagaaggaag caactatgac 720
ttccaaaagt atataaaaag agctttggaa aaagactttg gagtgggtgtt gggaggaagt 780

ttctgggttt ggagtttctc catgcttttt gtgttcttca atgctcaagt attttacaac 840
tatttatggc taccctttat tccattggtg atgctgttgt tggttggaac aaagctacag 900
ggcattataa ctaagatgtg cttagatagc catgataaag ctctcgttgt tagaggaact 960
ttgcttgtca ggcccagtg tcaattcttc tggtttggaa aaccggaatt gctcctacat 1020
cttatgcact ttatattgtt tcagaactct tttcaactgg cgttctttac atggacttgg 1080
tacaaatttg gattcagatc atgcttccat gatacaactg aggatatcgt cataaggctt 1140
gtcatgggtg tgtagtaca actcctttgt ggctacgtga cactgcctct gtatgcctg 1200

gtcacgcaga tggggacatc aatgaggaca attgtcttta ctgagggagt cgttgaaggt 1260
ctgaacagat ggagaaggaa agccaagaaa aacatagcac gcaggaacaa cactcagct 1320
cgtccctccc tggatgcttc actcgacaat tcacttctt ttaacactct ggatacttct 1380
ttctctgtag acctcgatca gccatcatca gatgctggtt atttgactgt tgaaatatca 1440
gatgaagaga cgttcgctac taaacggcca gaaccgctc agaagtggg atcttttgag 1500
ggtttcgact cgtgcaaaac atcataa 1527

<210> 122

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a first ledRNA construct targeting a Vitis

MLO gene

<400> 122

taatacgact cactataggg tagccataaa tagttgtaaa atacttgagc attgaagaac	60
acaaaaagca tggagaaact ccaaaccag aaacttcctc ccaccaccac tccaaagtct	120
ttttccaaag ctctttttat atacttttgg aagtcatagt tgcttccttc tgcaaaatgg	180
gccataatga acccatgtct aagagtcaag taatccactt tggagacgga tggatagaac	240
tgctgaataa aacaaaccgg ccaacgaagt atccgatgct cactccaata tctcagatgt	300
tgctttccaa atgatgtctg atggatgagc gtgaacctcc gtggatcatt tgtaaacga	360
tattccagtg ttcttgtttc tgccctccag gactccatt tcttcattt ggccatccca	420
agaccgaatg tgaggacgca gtagagcaca tcatgttgaa agcaacatct gagatattgg	480
agtgagcatc ggatacttcg ttggccggtt tgttttattc agcagttcta tccatccgtc	540
tccaaagtgg attacttgac tcttagacat gggttcatta tggccattt tgcagaagga	600
agcaactatg acttccaaaa gtatataaaa agagctttgg aaaaagactt tggagtgggtg	660
gtgggaggaa gtttctgggt ttggagtttc tccatgcttt ttgtgttctt caatgctcaa	720
gtattttaca actatttatg gctacccgta attccattgg tgatgctgtt gttggttgga	780
acaaagctac agggcattat aactaagatg tgcctagata gccatgataa agctctcgtt	840
gttagaggaa ctttgcttgt caggcccagt gatcacttct tctggtttgg aaaaccggaa	900
ttgtcctac atcttatgca ctttatattg tttcagaact cttttcaact ggcgttcttt	960
acatggactt ggtacaaatt tggattcaga tcatgcttcc atgatacaac tgaggatatac	1020
gtcataaggc ttgtcatggg tgtgttatgg ctttccttct ccatctgttc agaccttcaa	1080
cgactccctc agtaaagaca attgtcctca ttgatgtccc catctgcgtg accagggcat	1140
acagaggcag tgtcacgtag ccacaaagga gttgtactaa cacacccatg acaagcctta	1200
tgacgatata ctcagttgta tcatggaagc atgatctgaa tccaaatttg taccaagtcc	1260
atgtaaagaa cgccagtga aaagagttct gaacaatat aaagtgcata agatgtagga	1320
gcaattccgg ttttccaaac cagaagaagt gatcactggg cctgacaagc aaagttcctc	1380
taacaacgag agctttatca tggctatcta ggcacatctt agttataatg ccctgtagct	1440
ttgttccaac caacaacagc atcaccaatg gaattacgta	1480
<210> 123	
<211> 894	
<212> DNA	
<213> Myzus persicae	
<400> 123	
atgttcaaac acttgtgcaa taccgtttca caaagtataa aacctagtag ttttttatca	60

aaagtttgtt caaacaata tctcgtcgtg ccgtaccgga tagcgatttt taacaacatg 120
ggaagttaca aattgtacct ggccgtcatg gcaatagctg tcatagctgc agttcaggaa 180
attagtgtca aggttcagac ttccgaacag gacgatgac aggaaggata ttacgatgat 240
gagggaggag tgaacgataa tcaggagagaa gagaacgata atcaggagaa agagaacgat 300
aatcaggag aagagaacga taatcaggga gaagagaagg aagaagtttc cgaaccagag 360
atggagcacc atcagtgcga agaatacaaa tcgaagatct ggaacgatgc atttagcaac 420
ccgaaggcta tgaacctgat gaaactgacg tttatacag ctaaggaatt gggtccaac 480

gaagtgtgct cggacacgac ccgggcctta tttacttcg tcgatgtgat ggccaccagc 540
ccgtacgccc acttctcgtt aggtatgttt aacaagatgg tggcgtttat tttagaggag 600
gtggacacga catcggacaa atttaaagag acgaagcagg tggcgcaccg tatctcgaaa 660
actccagaga tccgtgacta tatcaggaac tcggccgcca agaccgtcga ctgtctcaag 720
gaaccaaga ttagagcacg actgttcaga gtgatgaaag ccttcgagag tctgataaaa 780
ccaaacgaaa acgaagcatt aatcaaacag aagattaagg ggtaaccaa tgctcccgtc 840
aagttagcca aggtgacct gaaaacggtt ggacgtttct ttagacattt ttaa 894

<210> 124

<211> 960

<212> DNA

<213> *Myzus persicae*

<400> 124

atgactgaga caatgcaact ccgtgggtacc cttcgtgggc ataatggttg ggttacgcag 60
atcgccacca atccgatcca cactgacatg attctgtctt gttcacgaga caagaccttg 120
attgtttggg atctgacacg tgatgagctc aactatggta tcccaagaa acgtttgtac 180
ggacattcgc acttcgtcag cgacgtcgtt ctttcacag atggtaacta cgctctttcc 240
ggttcttggg ataagactct tcgtctgtgg gatttgctg ctggacgtac cactcgtcgt 300
tttgaagacc acaccaagga tgtattgagc gttgccttct ctgtgacaa ccgtcaaacc 360

gtttctggaa gtcgggacaa gactatcaag ttgtggaata ctttggctga gtgcaatac 420
actattcagg atgatggaca tagcgattgg gtatcatgtg tacggttctc tcctaatac 480
cataacccaa tcattgtgag tgctggttg gacaaggttg tcaaggtatg gaacttaact 540
aactgccga tcaagaccaa ccattatgga cacactggat acctaacac cgttactgtt 600
tcacatgatg gttctttgtg tgcttcagga ggaaaagatt gcaaagctat gttatgggat 660
cttaatgacg gcaaacactt gcacacactg gaccataacg atatcattga agctttgtgc 720

tttagcccca accgttactg gttgtgcgct gcatttggac catcaatcaa aatttgggat 780

ttggaagca aagaaatggt tgaggaactt cgcccagaag ttgtatctca atcacagaat 840

agcaataccg aaccaccag atgtctgtca cttgcatggt caactgatgg acaaacattg 900

tttgctggat actcagacaa taacattaga gtttggcaag tgtctgtcag tgctcgttaa 960

<210> 125

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric construct encoding the ledRNA targeting M.persicae C002
gene

<400> 125

gaattcta atcagactcact atagggtgct ccatctctgg ttcggaaact tcttccttct 60

cttctccctg attatcggtc tcttctccct gattatcggt ctcttctccc tgattatcgt 120

tctcttctcc ctgattatcg ttcactcttc cctcatcacc gtaatatcct tctgatcat 180

cgctcctgtt ggaagtctga accttgcaac taatttcttg aactgcagct atgacagcta 240

ttgccatgac ggccaggtag aatttgtaac ttcccatggt gttaaaaatc gctatccggt 300

acggcagcag gagatatttg ttgaacaaa cttttgataa aaaactacta ggttttatac 360

tttgtgaaac ggtattgcac aagtgtttga acataagaga gttggaagtt acaaattgta 420

cctggccgtc atggcaatag ctgtcatagc tgcagttcag gaaattagtt gcaaggttca 480

gacttccgaa caggacgatg atcaggaagg atattacgat gatgaggag gagtgaacga 540

taatcaggga gaagagaacg ataatcaggg agaagagaac gataatcagg gagaagagaa 600

cgataatcag ggagaagaga aggaagaagt ttccgaacca gagatggagc acccaacagt 660

gcgaagaata caaatcgaag atctggaacg atgcatttag caaccgaag gctatgaacc 720

tgatgaaact gacgtttaat acagctaagg aattgggctc caacgaagtg tgctcggaca 780

cgaccggggc cttatttaac ttcgtcgatg tgatggccac cagcccgtag gccacttct 840

cgctaggtat gttaacaag atggtggcgt ttattttgag ggaggtggac acgacatcgg 900

acaatctgaa cagtcgtgct ctaatcttgg gttccttgag caagtggacg gtcttggcgg 960

ccgagttcct gatatagtc cggatctctg gagttttcga gatacgggag accacctgct 1020

tcgtctcttt aaatttgctc gatgtcgtgt ccacctccct caaaataaac gccaccatct 1080

tggttaaacat acctagcag aagtgggctg acgggctggt ggccatcaca tcgacgaagt 1140

taaataaggc ccgggtcgtg tccgagcaca ctctgttga gcccaattcc ttagctgtat 1200

taaacgtcag tticcatcagg tticatagcct tcgggttgct aaatgcatcg ttccagatct 1260
 tcgatttgta ttcttcgcac tgtaacaag cttagcatat ccatgataac tgtagttttt 1320
 ttctctgaaa gagcggccgc cctagcataa ccccgcgggg cctcttcggg ggtctcgcgg 1380

ggttttttgc tgaaaggatc c 1401

<210> 126

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric construct encoding the ledRNA targeting M.persicae
 Rack-1 gene

<400> 126

gaattctaac acgactcact atagggttat ggatattagg agagaaccgt acacatgata 60
 cccaatcgct atgtccatca tctgaatag tgtatttgca ctacagccaa gtattccaca 120
 acttgatagt cttgtccgca cttccagaaa cgatttgacg gttgtcagca gagaaggcaa 180
 cgctcaatac atccttggtg tggctttcaa aacgacgagt ggtacgtcca gcagccaaat 240

cccacagacg aagagtccta tcccaagaac cggaaagagc gtagttacca tctgatgaaa 300
 gaacgacgtc gctgacgaag tgcaaatgtc cgtacaaacg tttcttgggg ataccatagt 360
 tgagtcctac acgtgtcaga tcccaacaa tcaaggctct gtcgccgttc ttgggataag 420
 actcttcgtc tgtgggattt ggctgctgga cgtaccactc gtcgttttga agaccacacc 480
 aaggatgtat tgagcgttgc cttctctgct gacaaccgtc aaatcgtttc tgggaagtcgg 540
 gacaagacta tcaagttgtg gaatactttg gctgagtgc aatacactat tcaggatgat 600
 ggacatagcg attgggtatc atgtgtacgg ttctctccta atatccataa cccaaccatt 660

gtgagtgtg gttgggacaa ggttgtcaag gtatggaact taactaactg ccgcatcaag 720
 accaaccatt atggacacac tggatactt aacaccgtta ctgtttcacc tgatggttct 780
 ttgtgtgctt caggaggaaa agattgcaaa gctatgttat gggatcttaa tgacggcaaa 840
 cacttgaca cactggacca taacgataac attgaagctt tgtgctttag cccaaccgt 900
 tacacagaca tctgggtggt tcggtattgc tattctgtga ttgagataca acttctgggc 960
 gaagttcctc aaccatttct ttgctttcca aatcccaaat ttgattgat ggtccaaatg 1020
 cagcgcaaa ccagtaacgg ttggggctaa agcacaagc ttcaatgata tcgttatggt 1080

ccagtgtgtg caagtgtttg ccgtcattaa gatccataa catagctttg caatcttttc 1140
 ctctgaagc acacaaagaa ccatcaggta aacagtaac ggtgttaagg tatccagtgt 1200

gtccataatg gttggtcttg atgcggcagt tagttaagtt ccataccttg acaaccttgt 1260
 cccaaccagc actcacaatg gttaacccgg gtagcatatc catgatatct gttagttttt 1320
 ttcttgaaag agcggccgcc ctagcataac cccgcggggc ctcttcgggg gtctcgcggg 1380
 gttttttgct gaaaggatcc c 1401

<210> 127
 <211> 2396
 <212> DNA
 <213> Helicoverpa armigera

<400> 127

agacattgat tagtgagctc caaactccgt acgtacgttc ttagtttagt ttgttcgttc 60
 gtattgtcgc agtcacatcg ctccggtgcc cgcttcgaca tttcccgcca aaagtgacgt 120
 aacatatccg tgatctgtgt gaatatgtca gtgacttttt taaattaatt ttttaatagc 180
 aaaattgtga tcgaaggaat ttttacaaga tgacggctgg gaatgaagag catgagcctc 240
 taattacatc gtctgtcgac aatcagcgtg tggcctacag taattcacca ccggtatgacc 300
 gcacaccaga atcttcttcc ccacgcggca gtggcggaga agtaacgcta gccataccat 360
 cacaccgcaa ctatggagcc atcggaggcg tggagaaggt cacatacacc tgggcagaca 420

tcaatgcctt tgctactgaa tccaggtcta ggtcccgaag gatttggaac ttctggaagc 480
 cctccgccag tggcatgttc cagcaaagga aacagtgtt gaggaatgta aatggagccg 540
 cctaccagg cgaactgtc gccatcatgg gatcctccgg tgccgggaag accacactcc 600
 tcaacactct gaccttcgc actccaagcg ggtgtgtgtc cagtggcact cgagcactga 660
 acggccagcc tgctaccct gaggcgttat cagcactgtc tgcgtatgtt cagcagcagg 720
 atctgttcat tggcacgtg actgtgaagg agcatttagt attccaggt atggtgcgga 780
 tggaccgaca tataccgtat gcgcagcgca tgaggagagt tcaagaggtt attactgagt 840

tggcgctaac aaaatgccag aacacagtga taggcatccc tgggcggctg aagggtatct 900
 ccggcgggga gatgaagagg ctgtccttcg ccagcgaggt gctcacggat ccaccgtca 960
 tgttctgcga tgaaccacc tctggactcg attcttttat ggcgcagaat gttatacagg 1020
 tactgaaagg tctgcacaa aaaggcaaga cagtctatg cacgatccac cagccgtctt 1080
 cggagctgta cgcgatgttc gataagctgc tcacatggc agacgggaag gtcgccttcc 1140
 tcggctcccc tgatcaggct aatgatttct ttaaagacct aggagcagcg tgtcctccta 1200
 actacaacc agcggaccac ttcaccaac tcctggcggg agtgccgggc agggaggaga 1260

ccacgcgcac cactatcgat actgtctgca cggcattcgc gcgtctgag gtcggctgca 1320

agattgctgc agaagctgaa aatgcactct actttgagcg caagatatcg cagggtctggg 1380
 cggaccggcg gtggtctgaa gccacggcta tccgcgcgcg ccgctcgccg tacaaggcgt 1440
 cgtggtgcgc gcagtccgc gcggtgctgt ggcgctcgtg gctgtccgtc actaaggagc 1500
 ccatgctcat caaagtgcgc ttcctacaga ctattatggt atcgatcctg atcggcgtga 1560
 tctacttcgg gcagcacctg gaccaggacg gcgtgatgaa catcaacggc gccatcttca 1620
 tgttccctac caacatgacc ttccagaaca tcttcgctgt tattaacgta ttctgctcag 1680

aactgccaat attcatacga gaacaccact ccgggatgta tcgagctgac gtgtacttcc 1740
 tatcgaagac gttagccgaa gcacctgtgt tcgccaccat accacttgtg ttcaccacca 1800
 tagcatacta catgataggc ctgaaccctg aacctaaagc gttctttata gcgtccggtt 1860
 tggctgccct gattactaac gttgctacgt cgtttggcta cctgatatcg tgtgccagca 1920
 acagcgtgag catggcagcg tcagtgggac ctcccatcat catcccttc atgttgttcg 1980
 gaggtctctt cctcaacact ggctccgtac caccatacct gggctggata tcgtacctgt 2040
 cctggttcca ctacggcaac gaagcgctgc tggtaacca gtggtctgga gtggaaacca 2100

tcgcctgcac ccgggagaac ttcacctgtc ccgcctctgg gcaggctcgc ttggatactc 2160
 ttagcttttc tgaggatgac ttcacaatgg acgtggtgaa catgataccta cttttcatcg 2220
 gcttcagatt tttggcgtat ctgcctctct tgtaccgcgc tcgccgaggc aagtgagtct 2280
 taggtacaaa atgctgcgag aatgggccaat atgaaggaag aatgttgaat aaatagtgt 2340
 attatttagg atgtaaggag tcaatggaga ttgataaat aaaacaattt ataccg 2396

<210> 128

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a ABC

transporter white gene of Helicoverpa armigera

<400> 128

taatacgact cactataggg tataatgtcgg tccatccgca ccatagcctg gaatactaaa 60
 tgctccttca cagtcagcgt gccaatgaac agatcctgct gctgaacata cgcagacagt 120
 gctgataacg cctcaggggt agcaggctgg ccgttcagtg ctcgagtgcc actggacagc 180
 accccgcttg gagtgcggaa ggtcagagtg ttgaggagtg tggctttccc ggcaccggag 240
 gatccatga tggcgagcag ttgcctggg taggcgctc catttacatt cctcaacaac 300
 tgtttccttt gctggaacat gccactggcg gagggcttcc agaagttcca aatccttcgg 360

gacctagacc tggattcagt agcaaaggca ttgatgtctg cccaggtgta tgtgaccttc 420
tccacgcctc cgatggctcc atagtgttc cagcaaagga aacagttgtt gaggaatgta 480
aatggagccg cctaccagg cgaactgtc gccatcatgg gatcctccgg tgccgggaag 540
accacactcc tcaacactct gaccttccgc actccaagcg ggggtgctgc cagtggcact 600
cgagcactga acggccagcc tgctaccct gaggcgttat cagcactgtc tgcgtatgtt 660
cagcagcagg atctgttcat tggcacgtg actgtgaagg agcatttagt attccaggct 720
atggtgcgga tggaccgaca tatacccgta tgcgcagcgc atgaggagag ttcaagaggt 780

tattactgag ttggcgctaa caaatgcc aacacagt ataggcatcc ctgggcggct 840
gaagggtatc tccggcgggg agatgaagag gctgtccttc gccagcgagg tgctcacgga 900
tccaccgtc atgttctgcg atgaaccac ctctggactc gattcttita tggcgagaa 960
tgttatagac gtactgaaag gtctcgaca aaaaggcaag acagtctat gcacgatcca 1020
ccagccgtct tggagctgt acgcgatgat gaagtgggcc gctgggttgt agttaggagg 1080
acacgtgct ctaggtctt taaagaaatc attagcctga tcaggggagc cgaggaaggc 1140
gaccttccc tctgcatga tgagcagctt atcgaacatc gcgtacagct ccgaagacgg 1200

ctggtggatc gtgcatacga ctgtcttgcc tttttgtgcg agacctttca gtacctgtat 1260
aacattctgc gccataaaag aatcgagtcc agaggtgggt tcatcgaga acatgagcgg 1320
tggatccgtg agcacctcgc tggcgaagga cagcctcttc atctccccgc cggagatacc 1380
cttcagccgc ccagggatgc ctatcactgt gttctggcat tttgttagcg ccaactcagt 1440
aataacctct tgaactctcc tcatgcgtg cgcatacgta 1480

<210> 129

<211> 811

<212> DNA

<213> Linepithema humile

<400> 129

agagagaacg atgaggacaa tgagatggaa aaaacaacaa cgtcccaacg tcccttcgac 60

gacgccattc caccagccct ataaaacccc gaggatcatc ggcgccccaa cattactcgg 120
tcagagtctc gaggaacgcc gtgtccgaga tgatcatcac caggaaccgc atcaaccgcg 180
caactcta at ctgcgttctg gcgtcgtggc tttgcttggc gtctcgct tccgccgaat 240
acgaatcgcg ggagatgtcg aacggcggac cgggcgtcga cgcctcgtgc atcgagggca 300
agtgcataaa gcgcaccgcc acgcaggatg ctaccgccag catgtggttc ggcccgcgtt 360
tggaagacg gcgcagatcg gacgagaagc aggaagtga ttccgagata caggctctgg 420

cggaagcctt ggatagcggg cgtttgccc tatttgccat tccagctaac gacaagagac 480

aaccgactca atttacaccg cgactggggc gaggatcaga cgaggaccta tcctcctacg 540

gagacgcgat tgagaggaac gagatcgacg atcgatatatt acccggtta ttcgcgccgc 600

gtttaggacg acgaattcct tggtcaccgt cgccgagact tggacgcaa ttacgcagca 660

ttttgcgaaa aatgtaggcg ccgtcgaaag attattatca aaagttacaa atgaagagtg 720

atctcgtaga cctgcgcgtg aagatgaaat aacaactaaa attatagcac tattaagaca 780

taaagaaata aagtactgat gtttatttgi a 811

<210> 130

<211> 1360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a PBAN gene in Argentine ants

<400> 130

taatacgact cactataggg aattcattc ctgcttctcg tccgatctgc gccgtcttcc 60

caaacgcggg ccgaaccaca tgctggcggg agcatcctgc gtggcgggtg gcttcatgca 120

cttgccctcg atgcacgagg cgctcgacgc cggtccgccc ttcgacatct cccgcgattc 180

glattcggcg gaagcgcgag acgccaagca aagccacgac gccagaacgc agattagagt 240

tgcgcggttg atcgggttcc tggatgatgat catctcggac acggcgttcc tcgagactct 300

gaccgagtaa tgttgggacg ccgatgatcc tcgggggttt atagggtgg tggaatggcg 360

tcgtcgaagg gacgttggga cgttgttgtt ttttccatct cattgtctc atcgttcacg 420

ccgtgtccga gatgatcatc accaggaacc gcatcaaccg cgcaactcta atctgcgttc 480

tggcgtcgtg gctttgcttg gcgtctcgcg ctccgccga atacgaatcg cgggagatgt 540

cgaacggcgg accgggcgtc gacgcctcgt gcatcgaggg caagtgcag aagcgcaccg 600

ccacgcagga tgetaccgcc agcatgtggt tcggcccgcg tttgggaaga cggcgcagat 660

cggacgagaa gcaggaagtg aattcccgta atacaggctc tggcgggaagc cttggatagc 720

gggcgtttgg ccctatttgc cattccagct aacgacaaga gacaaccgac tcaatttaca 780

ccgcgactgg ggcgaggatc agacaggac ctatcctcct acggagacgc gattgagagg 840

aacgagatcg acgatcgtat attaccgcg ttattcgcgc cgcgtttagg acgacgaatt 900

ccttgggtcac cgtgcgcgag acttggacgc caattacgca gcattttgcg aaaaatgaaa 960

catcagtact ttatttcttt atgtcttaat agtgcataaa ttttagttgt tatttcatct 1020

tcacgcgcag gtctacgaga tcactcttca ttgttaactt ttgataataa tctttcgacg	1080
gcgcctacat ttttcgcaaa atgtctcgta attggcgctcc aagtctcggc gacggtgacc	1140
aaggaattcg tcgtctctaaa cgcggcgcga ataacgcggg taatatacga tcgtcgatct	1200
cgttcctctc aatcgctct ccgtaggagg ataggctctc gtcigatcct cgccccagtc	1260
gcggtgtaaa ttgagtcggt tgtctcttgt cgttagctgg aatggcaaat agggccaaac	1320
gcccgtatc caaggttcc gccagagcct gtattacgta	1360
<210> 131	
<211> 1480	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene	
encoding V-type proton ATPase catalytic subunit A of <i>L. cuprina</i>	
<400> 131	
taatacgact cactataggg aagttcttgt catagaaatc atccaaagca cgcattgtatt	60
tggagtagga aatcaaccaa ttgatggagg ggaaatgttt acgttgggcc aatttcttgt	120
ccaaacccca gaacacttgt acgataccca aagtggcaga agtaacggga tcagagaaat	180
caccaccagg aggagatata gcaccgacaa tggaaacgga accttcacgt tcagggttac	240
ccaaacactt gacacgacca gcacgttcgt agaaggaggc caaacgggca cccaagtagg	300
ctgggtaacc ggaatcgga ggcatttcag ccaaacgacc agaaatttca cgaagagctt	360
cggcccaacg ggaggtagaa tcagccatca tagatacgtt gtaaccata tcacggaagt	420
attcagacaa ggtaataccg gtataaacga ttccggttac ccagcctact tgggtgcccc	480
tttggcctcc ttctacgaac gtgctggtcg tgtcaagtgt ttgggtaacc ctgaacgtga	540
aggttccgtt tccattgtcg gtgctgtatc tctcctgggt ggtgatttct ctgatccgt	600
tacttctgcc actttgggta tcgtacaagt gttctgggggt ttggacaaga aattggccca	660
acgtaaacat ttcccccca tcaattggtt gatttcttac tccaaataca tgcgtgcttt	720
ggatgatttc tatgacaaga acttcccgtt attcgtacca ttgcgtacca aggtcaagga	780
aatcttgcaa gaagaagaag atttgtccga aattgtacaa ttggtcggta aggttcatt	840
ggccgaaact gacaagatca ctttgaagt cgccaaattg ctttaaggacg atttcttgca	900
acagaactcc tactcatcat acgacagatt ctgccccttc tacaagagtg tgggtatgtt	960
gaagaacatc attgccttct acgacttggc tcgtcactcc gtcgaaatca ccgtcaatc	1020
tgaaaacaaa atcacctgga atgtcattct gaaagcctgt tgtaaatctt cgtgtaattg	1080

ttcaaagtca gccttgatct tggcttcacc gtccttaacg ggatccttga atttcatgga 1140
agacaattgg tacataatgt tacccatagc ttcacggatg acattccagg tgattttgtt 1200
ttcagattga gcggtggatt cgacggagtg acgagccaag tcgtagaagg caatgatgtt 1260
cttcaacata cccacactct tgtagaaggg gcagaatctg tcgtatgatg agtaggagtt 1320

ctgttgcaag aaatcgctct taagcaattt ggcgacttcc aaggtagatct tgtcagtttc 1380
ggccaatgaa gccttaccga ccaattgtac aatttcggac aaatcttctt cttcttgcaa 1440
gatttccttg accttgggtac gcaatgggtac gaattacgta 1480

<210> 132
<211> 1480
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene
encoding RNase 1/2 of L. cuprina
<400> 132

taatacgact cactataggg aataatttgt ggtagacata gcgggttact tcctcatgtt 60
cgttaaagca gacctgggtat tgtctcatga aacgggaaga tgacaattca aaaccaacat 120

tgacgagagt agtgccacca ttgcagctgc tgcccgactt cttagctaca aaagcaggcc 180
aactggtgca aacaagactg ggcagggagt gctgaacacc attgacttta aaagtgggtc 240
cactaacaca ggtagcgata tgggtcttgc ctgataaagg atgagcaaag ccactgggtac 300
aatggatctc aatattcttg ccagcagcca catcaattct tccagtatca gaaaaagggt 360
agagttcagt agtgccaggt ttgatataca agggttgttt agccttaaga ccaccgcgaa 420
tgggtatgga acaaccacca ctgcgtggaa tattgagatc cattgtacca gtggctttgc 480
tcacacctta tcaggcaaga cccatatcgc tacctgtgtt agtggcacca cttttaaagt 540

caatggtgtt cagcactccc tgcccagtct tgtttgcacc agttggcctg cttttgtagc 600
taagaagtcg ggcagcagct gcaatgggtg cactactctc gtcaatgttg gttttgaatt 660
gtcatcttcc cgtttcatga gacaatacca ggtctgcttt aacgaacatg aggaagtaac 720
ccgctatgtc taccacaaat tattcccgta cccaacagcg tgccacttcc ctattcatta 780
atgcagctcc ccagtggcaa gttttcaatg ccggtaatg ggctcgtgta gaggatgggtg 840
tacgcgcctg ggtgtccaaa aataaaatca atgttcgatg ctataccggt gtttatgggtg 900
tcaccactct acccaacaaa gagggacgtg agactcctct atatttgtct cgtgatgcca 960

ataataatgg ttigtattcct gttcccaaata tatacttccg tgtgggttata caacctgcca 1020

ccaataaggg tattgttttc gttgggtgtca caggcataag aataaccagc agtgatatca 1080
 gttttcttcc aactaatata gttaacctta tctactgacat ctttgcaaat aatatagtcc 1140
 tttttgattt gttccaaagt caaatgggga ttgttgacac caacgaaaac aataccctta 1200
 ttggtggcag gttgtataac cacacggaag tataatttgg gaacaggaat caaaccatta 1260
 ttattggcat cacgagacaa atatagagga gtctcacgtc cctctttgtt gggtagagtg 1320
 gtgacaccat aaacaccggt atagcatcga acattgattt ttttttga caccagggcg 1380

cgtacacat cctctacag agcccaatta ccggcattga aaacttgcca ctggggagct 1440
 gcattaatga ataggaaagt ggcacgctgt tgggtacgta 1480

<210> 133

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene
 encoding chitin synthase of *L. cuprina*

<400> 133

taatacgact cactataggg tggcttgatt ttatattaa caccatacac ctcaaatgca 60
 gctttttcaa tgcgtgtaat caatatTTTT acatattcat tgagaggagg atttttcgga 120
 ttctccacat atttttcatc cagtataaag gcatcatcaa agaaaatatt agctaaaatg 180

taaaaaaaaag aaaacttaat tgatagatac tcttcattcc aatccacaat tcgtctatTT 240
 aatgttatac attgttcaac caaaaaacca caataccacg gacaaatgaa cagtttttcg 300
 gtgggtaaat ttttatcatt ttttgacgc catatatgat ttgttatcca caattgtgac 360
 agccaccaca acaacatat ccaaagataa tctttagcga ccacattaaa aaaactccat 420
 gtatcgtgac cgaagcccag tgacgttgat aaaaatttac ccaccgaaaa actgttcatt 480
 tgtccgtggt attgtggttt tttggttgaa caatgtataa cattaaatag acgaattgtg 540
 gattggaatg aagagtatct atcaattaag ttttcttttt ttacatttt agctaattatt 600

ttctttgatg atgcctttat actggatgaa aaatatgtgg agaatccgaa aaatcctcct 660
 ctcaatgaat atgtaaaaat attgattacc agcattgaaa aagctgcatt tgaggtgtat 720
 ggtgttaata taaaaatcaa gccacccgta aaaattgaaa caccttatgg cggtcgtttg 780
 gtgtggacac tgcctggtcg ctcaaagatg attgcccatt taaaaacaa agataaaata 840
 cgacataaga aacgtggtc acaggttatg tacatgtact atttgttggg ttttcgtata 900
 atggaattgg aatcagtatc ggccaagcgt aaggcagtga tagcagaaaa tacatttttg 960

ctggctcttg atggtgatat tgactttcaa ccgaggcag tgcaactgtt aatagaccgt 1020

atgaaggcca tagatgaatt aggtgctagc caggactaca taaaacacaa ccaataacat 1080

gctctgttgc tttttgcaac caatgacctt tagcgtattc gaagatttga taccaaacca 1140

tagggcctct accaactgga tgaatagac cacaggcagc acctaatca tctatggcct 1200

tcatacggtc tattaacagt tgcactgcct gcggttgaaa gtcaatatca ccatcaagag 1260

ccagcaaaaa tgtatcttct gctatcactg ccttacgctt ggccgatact gattccaatt 1320

ccattatagc aaaacccaac aaatagtaca tglacataac ctgtgaccag cgtttcttat 1380

gtcgtatctt atctttgttt tttaaatggg caatcatctt tgagcgacca ggcagtgtcc 1440

acaccaaacg accgccataa ggtgtttcaa tttttacgta 1480

<210> 134

<211> 1481

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene encoding ecdysone receptor (EcR) of *L. cuprina*

<400> 134

taatacagct cactataggg tgaaagatca tcacgacctg atgatatgga attagctgat 60

tcagatctgg gtgtatgatg catcatacta ctgttattca tatgatgatg gtgatgatga 120

tttaatccat tactgatgat actgtgaatg ccaatatagg catgaataac ttggccattt 180

tgtgaggcct gtaacgagtt taactgttgg gcattgctaa cgatattggg accatttaata 240

ttgaccgata agccaccacc accgccgcca ataccatgt ggccatttgt gtggtgggaa 300

ctgctattac tgtgattact gttgctgttg tgggtgaaat gatttggtgt gtgattgtga 360

ttattcactt gactgccacc accaccacc agaccattga gtgaagtcac accgggtaca 420

ccaccaccac ctccacctcc tccaacaaat cacagtaata gcagtccca ccacacaaat 480

ggccacatgg gtattggcgg cggtgggtgt ggcttatcgg tcaatattaa tggteccaat 540

atcgtagca atgccaaca gttaaactcg ttacaggcct cacaatatgg ccaagttatt 600

catgccaata ttggcattca cagtatcatc agtaatggat taaatcatca tcaccatcat 660

catatgaata acagtagtat gatgcatcat acaccagat ctgaatcagc taattccata 720

tcatcaggtc gtgatgatct ttacccgta tccacaaat cacccttga gtggttcgaa 780

acacttgtgt tccatttgtg gagaccgcgc cagtggaaaa cattatgggg tctacagttg 840

tgagggttgt aaaggttct tcaaacgtac cgtacgaag gacttgacat atgcttgcg 900

tgaggacaga aattgcatta tagataaacg acaaagaaat cgttgccagt attgtcgta 960
 tcaaaagtgt ttagcttggt gcatgaaacg cgaagcggc caagaggac gacaacgtgg 1020

 tactcggtgt gctaacgcta gagctgcctt ttgctcggct tcaatgatgc gttctatagt 1080
 gagatcacgt aatgaactgc tgggtttaaa gtcttctccg ccagcaccaa ccacattgct 1140
 taccaccaa ccacctctc caccaccgcc agcaccagca gctctagcgt tagcagcacg 1200
 agtaccacgt tgtcgttctt cttggaccgc ttgcggttgc atgccacaag ctaaacactt 1260
 ttgataacga caatactggc aacgatttct ttgtcgttta tctataatgc aatttctgtc 1320
 ctacagcaa gcatatgtca agtccttgcg tacggtacgt ttgaagaacc ctttacaacc 1380
 ctcaaacgt tagaccccat aatgttttcc actggcgcgg tctccacaaa tggaacacaa 1440

 ggttttcgaa ccactaaggg ggtgatttgg tggatacgt g 1481
 <210> 135
 <211> 1481
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene
 encoding gamma-tubulin 1/1-like of L. cuprina
 <400> 135
 taatacgact cactataggg aaaacgctgt aggtttgtat aagtttctta ggaaaacgat 60
 cagacaaacg ttccataata taagagccca tgccggaacc agtaccaccg gctatagaat 120
 ggcatagaac aaatccctcc aaggaaatcac tgccatctgc ctacgatca ataattgcaa 180

 aaatttctc ttgtaatttt tcaccttgac tatagccgga agcccaattg ttgccggcac 240
 caccaccatg tttagacaag taaacatttt cgggattata taacttggca taggggtgaac 300
 tcataatggt gtgtataact cgcggtcca aatccaaaag tacggcacgt ggtatatagt 360
 gatcatgtc agcctgataa aagaatacat ctttgcgac tactccatct gtagcaaat 420
 cctctaacac tcactaggt gaaatgctat acacaccatt atgagttcac cctatgcaa 480
 gttatataat cccgaaaatg ttacttgtc taaacatggt ggtgggtgccg gcaacaattg 540
 ggcttcggc tatagtcaag gtgaaaaatt acaagaggaa atttttgaca ttattgatcg 600

 tgaggcagat ggcagtgatt ccttgagggt atttgttcta tgccattcta tagccgttg 660
 tactggttcc ggcattgggt cttatattat ggaacgtttg tctgatcgtt ttcctaagaa 720
 acttatacaa acctacagcg ttttccgta ccacaacct acgttatcct tcatatatga 780
 ataataattt gataggattg acggcacctt tgatacctac ccccaatta cttttctaa 840

tgaccggtta tactcctcta actacagata gtgatcccaa tttgaatata cgcaaaacta	900
cggtagtaga tgttatgaga cgttttattgc aacccaaaaa tatgatgggt tcacggggtc	960
cggataaagc aaatattcat tgttatattt ccatattaaa tattatacag ggtgaagtag	1020
atcccaactca agtccacaaa tctctactga ttggccatca ttaggcccga aactttatga	1080
ttacttttga tatatggaga acttctggac aaggctactt gtatactggc cggaccccag	1140
ggatgaatt gagctaattt gcgttcacgt atacgttgta gagattttgt gacttgagtg	1200
ggatctactt caccctglat aatatttaat atggaaatat aacaatgaat atttgcttta	1260
tccggacccg atgaaaccat catatTTTTG ggttgcaata aacgtctcat aacatctagt	1320
accgtagttt tgcgtatatt caaatTGGGA tcactatctg tagttagagg agtataaccg	1380
gtcattagaa aatgtaattg gggggtaggt atcaaagggt cgtcaatcc tatcaaatta	1440
ttattcatat atgaaggata acgtagggtt gtggtacgta g	1481
<210> 136	
<211> 1605	
<212> DNA	
<213> Triticum aestivum	
<400> 136	
atggcaaagg acgacgggta cccccggcg cggacgtgc cggagacgcc gtcctgggcg	60
gtggcgctgg tcttcgccgt catgatcatc gtctccgtcc tcctggagca cgcgctccac	120
aagctcgcc attggttcca caagcggcac aagaacgcgc tggcggaggc gctggagaag	180
atgaaggcgg agctgatgct ggtgggattc atctcgctgc tgctcgccgt cacgcaggac	240
ccaatctccg ggatatgcat ctcccagaag gccgccagca tcatgcgccc ctgcaagggtg	300
gaaccgggtt cgtcaagag caagtacaag gactactact gcgcaaaga gggcaagggtg	360
gcgctcatgt ccacgggcag cctgcaccag ctccacatat tcatcttcgt gctagccgtc	420
ttccatgtca cctacagcgt catcatcatg gctctaagcc gtctcaagat gagaacatgg	480
aagaaatggg agacagagac cgcttccttg gaataccagt tcgcaaatga tcctgcgcgg	540
ttccgcttca cgcaccagac gtcgttcgtg aagcggcacc tgggcctgtc cagcaccccc	600
ggcgtcatg ggggtgtggc cttcttcagg cagtcttca ggtcggtcac caaggtggac	660
tacctcatct tgagggcagg ctctcatcaac gcgcacttgt cgcagaacag caagttcgac	720
ttccacaagt acatcaagag gtccatggag gacgacttca aagtcgtcgt tggcatcagc	780
ctcccgtgt gggctgtggc gatctcacc ctcttccttg atatcgacgg gatcggcaca	840
ctcacctggg tttctttcat cctctcatc atcctcttgt gtgttgaac caagctagag	900

atgatcatca tggagatggc cctggagatc caggaccggt cgagcgtcat caagggggca 960
cccgtggtcg agcccagcaa caagtctctc tggttccacc gccccgactg ggtcctcttc 1020
ttcatacacc tgacgtgtt ccagaacgcg ttccagatgg cacatttcgt gtggacagtg 1080
gccacgcccc gcttgaagga ctgcttccat atgaacatcg ggctgagcat catgaaggtc 1140

gtgctggggc tggctctcca gttcctgtgc agctacatca cttccccct ctacgcgcta 1200
gtcacacaga tgggatcaaa catgaagagg tccatctttg acgagcagac agccaaggcg 1260
ctgaccaact ggcggaacac ggccaaggag aagaagaagg tccgagacac ggacatgctg 1320
atggcgagca tgatcggcga cgcaacaccc agccgaggca cgtccccgat gcctagccgg 1380
ggctcatcgc cgggtcacct gcttcagaag ggcatgggac ggtctgacga tccccagagc 1440
gcaccgacct cgccaaggac catggaggag gctagggaca tgtaccggt tgtggtggcg 1500
catctgtac acagactaaa tctgtgtgac aggcggaggt cggctctctc atcagccctc 1560

gatgccgaca tccccagcgc agatttttcc ttcagccagg gatga 1605

<210> 137
<211> 1277
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting Mlo from
Triticum aestivum

<400> 137

taatacgaact cactataggg tgcccccttg atgacgtcg accggtcctg gatctccagg 60
gccatctcca tgatgatcat ctctagcttg gttccaacac acaagaggat gatgagaggg 120
atgaaagaaa ccaggtgag tgtgccgatc ccgtcgatat caaggaagag ggtgaggatc 180
gccacagccc acagcgggag gctgatgcca acgacgactt tgaagtcgtc ctccatggac 240

ctcttgatgt acttgaggaa gtcgaacttg ctgttatgcg acaaatgcgc gttgatgaag 300
cctgccctca aggtgaggta gtccaccttg gtgaccgacc tgaagaactg cctgaagaag 360
gccaccacc atctgacgcc gggggtgctg gagaggggtt cgacttcac aagtacatca 420
agaggtccat ggaggacgac ttcaaagtcg tcgttggcat cagcctcccg ctgtgggctg 480
tgcgatcct caccctcttc ctgatatcg acgggatcgg cactcacc tgggtttctt 540
tcatccctct catcatctc ttgtgtgttg gaaccaagct agagatgatc atcatggaga 600
tggccctgga gatccaggac cggctgagcg tcatcaaggg ggcacccgac gtcgagccca 660

gcaacaagtt ctcttggttc caccgccccg actgggtcct cttcttcata cacctgacgc 720

tgttccagaa gtcacacaga tgggatcaaa catgaagagg tccatcttcg acgagcagac	780
agccaaggcg ctgaccaact ggcggaacac ggccaaggag aagaagaagg tccgagacac	840
ggacatgctg atggcgcaga tgatcggcga cgcgacgccc agccgaggca cgtccccac	900
cacaaccggg tacatgtccc tagcctcttc catggtcctt ggcgaggctg gtgcgctctg	960
gggatcgtca gaccgtccca tgcccttctg aagcagggtc accggcgatg agccccggct	1020
aggcatcggg gacgtgcctc ggctgggctg cgcgtcgccg atcatctgcg ccatcagcat	1080
gtccgtgtct cggaccttct tcttctcctt ggccgtgttc cgccagttag tcagcgctt	1140
ggctgtctgc tcgtcgaaga tggacctctt catgtttgat cccatctgtg tgacttctgg	1200
aacagcgtca ggtgtatgaa gaagaggacc cagtcggggc ggtggaacca gaagaacttg	1260
ttgctgggct cgacgtc	1277
<210> 138	
<211> 1527	
<212> DNA	
<213> Vitis pseudoreticulata	
<400> 138	
atggctggcg acgaggagac gacgacgacg gcagcaacac ttgaacaac gtccacttgg	60
gctgttgccct ctgtttgctt tattttgatt gcactctcca tacttattga gcatgccctc	120
catctcttag ccaagtactt caacaagaag cggaggagggt ctctcattca tgctcttaac	180
aacgtcaaat cggagttgat gctcttgggg ttcgtctctt tgttgctgac tgtgtgccaa	240
aagtatattg cgaagatttg tatcccaagg agcgtagggt aaacttttct tccctgcaag	300
accttgacag aaagtgattc agaagaagaa accaaatgcg aagagcaggg aaagatgtct	360
ttgtgtctta gacaaggcgt ggaggaacta caatacttaa ttttcgtgct ggccctcttc	420
cattccctct acitgctcct cacattcgggt ctgggatgg ccaagatgaa gaaatgggag	480
tcctgggagg cagaaacaag aacactggaa tatcagtta caaatgatcc acggaggttc	540
aggctcatcc atcagacatc atttggaaag caacatctga gatattggag tgagcatcag	600
atacttcgtt ggccggcttg ttttattcgg cagttctatc catccgtctc caaagtggat	660
tacttgactc ttagacatgg gttcattatg gcccatcttg cagaaggaag caactatgac	720
ttccaaaagt atataaaaag agctttggaa aaagactttg gagtgggtgt gggaggaagt	780
ttctgggttt ggagtttctc catgcttttt gtgttcttca atgctcaagt attttacaac	840
tatttatggc taccctttat tccattggtg atgctgttgt tggttggaac aaagctacag	900
ggcattataa ctaagatgtg cttagatagc catgataaag ctctcgttgt tagaggaact	960

ttgcttgta ggccagtg tcaattcttc tggtttgaa aaccggaatt gctcctacat 1020
 cttatgcact ttatattgtt tcagaactct ttccaactgg cgttctttac atggacttgg 1080
 tacaaatttg gattcagatc atgcttccat gatacaactg aggatatcgt cataaggctt 1140
 gtcacgggtg tgtagtaga actcctttgt ggctacgtga cactgcctct gtatgcctg 1200
 gtcacgcaga tggggacatc aatgaggaca attgtcttta ctgaggaggt cgttgaaggt 1260
 ctgaacagat ggagaaggaa agccaagaaa aacatagcac gcaggaacaa ccaactcagct 1320
 cgtccctccc tggatgcttc actcgacaat tcaccttctt ttaacactct ggatacttct 1380

ttctctgtag acctcgatca gccatcatca gatgctggtt atttgactgt tgaaatatca 1440
 gatgaagaga cggctgctac taaacggcca gaaccgcgtc agaagtggg atcttttgag 1500
 ggtttcgact cgtgcaaac atcataa 1527

<210> 139
 <211> 1480
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a Vitis MLO
 gene
 <400> 139

taatacgact cactatagg tagccataaa tagttgtaa atacttgagc attgaagaac 60
 acaaaaagca tggagaaact ccaaacccag aaacttctc ccaccaccac tccaaagtct 120

ttttccaaag ctctttttat atacttttgg aagtcatagt tgcttccttc tgcaaaatgg 180
 gccataatga acccatgtct aagagtcaag taatccactt tggagacgga tggatagaac 240
 tgctgaataa acaaaaccgg ccaacgaagt atccgatgct cactccaata tctcagatgt 300
 tgctttccaa atgatgtctg atggatgagc gtgaacctcc gtggatcatt tgtaactga 360
 tattccagt ttctgttttc tgctcccgag gactccatt tcttcattt ggccatccca 420
 agaccgaatg tgaggacgca gtagagcaca tcatttggaa agcaacatct gagatatgg 480
 agtgagcatc ggatacttcg ttggccggtt tgttttattc agcagttcta tccatccgtc 540

tccaaagtgg attacttgac tcttagacat gggttcatta tggccattt tgcagaagga 600
 agcaactatg acttccaaaa gtatataaaa agagcttttg aaaaagactt tggagtgggtg 660
 gtgggaggaa gtttctgggt ttggagtctc tccatgcttt ttgtgttctt caatgctcaa 720
 gtattttaca actatttatg gctaccgta attccattgg tgatgctgtt gttggttgg 780
 acaaagctac agggcattat aactaagatg tgcttagata gccatgataa agctctcgtt 840
 gttagaggaa ctttgcttgt caggccaggt gatcattct tctggttttg aaaaccggaa 900

ttgtcctac atcttatgca ctttatattg tttcagaact cttttcaact ggcgttcttt 960

acatggactt ggtacaaatt tggattcaga tcatgcttcc atgatacaac tgaggatatac 1020

gtcataaggg ttgtcatggg tgtgttatgg ctttcccttct ccatctgttc agaccttcaa 1080

cgactccctc agtaaagaca attgtcctca ttgatgtccc catctgcgtg accagggcat 1140

acagaggcag tgtcacgtag ccacaaagga gttgtactaa cacacccatg acaagcctta 1200

tgacgatatac ctcatgttga tcatggaagc atgatctgaa tccaaatttg taccaagtec 1260

atgtaaagaa cgccagttag aaagagttct gaaacaatat aaagtcata agatgttaga 1320

gcaattccgg ttttccaaac cagaagaagt gatcactggg cctgacaagc aaagttcctc 1380

taacaacgag agctttatca tggctatctc ggcacatctt agttataatg ccctgtagct 1440

ttgttccaac caacaacagc atcaccaatg gaattacgta 1480

<210> 140

<211> 1531

<212> DNA

<213> Rhizoctonia solani

<400> 140

cattccatcg ctgctacagt tgataccccg cgacgcgtcc ttaccgcctc ttgtgttcca 60

ctgggttcca attattggct ccgctatcgc gtacgggtgat gacctcttg catttctctt 120

ttcgtgccgc gaaaagtacg gcgacctgtt caccttcgtt cttctcggcc gcaaaatgac 180

cgtcgcgttg ggcccaaagg gtagtaattt taccctggga ggaaaacttt cccaagtctc 240

agccgaggaa gcctacaccc acctiaccac tccagtcttt ggcaaggatg ttgtctatga 300

cgtccgaac catgtactca tggagcaaaa gaagtttgtc aagttcggac ttaccaccga 360

gaacttccga gcctacgtcg atatgatcgt agacgagacc gtgaacaacc tcattcgtaa 420

ggagctctcc ccigaaaact gccacgcga ctcccagggc tgggggtgct tccatgcatt 480

caaaaagctg gccgagctca cgattctcac cgctcgcgc acgtgcaag gcaacgaagt 540

tcgtccaac cttgacaaaa gcttcgcaga attgtatcag gacctgatg gcggcttcac 600

ccctatcaac ttctcttcc ccaaccttcc gctccctagt tactggcgtc gagaccgtgc 660

tcaaaagaag atgagcgact tttacgtgaa cattattgag aaacgtaagg cacagagtca 720

aggggatgag catgatata ttgtctcttt gttgaatcag acctacaaag atggccgcgc 780

gtcagcgac cgtgaggtag ctcatatcat gattgcactc ctcatggccg gtcagcacac 840

tagttctgca acttcttctt ggacgcttct tcacctgcc gatcgccctg atattgccga 900

gaaattgtac gaggaacaag tcaaagtctt tggtaatgcc gatggttcga tgcgccctt 960

gaactacgag gaggttgaagg atttgccagt actgagcgca gttatccgtg agaccttgcg	1020
catgcatccg cctatccaca gtatcatgcg caaatgcatt aacgatatgg ttgttccggc	1080
gtccctggct gccccaccg gcaaggctaa cgagggccga acctacgttg ttcccaaggg	1140
ccactatctt ctggcatctc ccgccgttgc acaagtcgac cctcgtgtat ggcgtgacgc	1200
cgacaagtgg gatcctctgc gctggttggg cccaacggga gctgctgctc aggccggttc	1260
tttgtacaac gacgagcacg gtgaaacggt tgactatggt tggggtgccg ttagtaaggg	1320
taccgagagc cctatcagc catttgggtgc tggtaggcat aggtgcattg gtgaacaatt	1380
cgaaatata caactcggcg ccatTTTgtc tactataatc cggaacatgg agatgcgtat	1440
cgaaaagcac gtTcctgacc acaattacca tactatgac gtCctgccta aagatccctg	1500
tggtatcagg ttcaagctcc gcaccaaggc g	1531
<210> 141	
<211> 1617	
<212> DNA	
<213> Rhizoctonia solani	
<400> 141	
atgaaccagt tcgcatcttg cccatggctc gaatctgcca ccttcattcc ttTactgggc	60
gtttcatgcg tgatcttgat ggccacctgt gcgtgcatcc tttTaatgt catcgcccaa	120
ttggttatac cccctgatcc gtcattgcca cctcaggttt tctacgttct accgtatatt	180
ggctcggcca ttgaatacgg taaggatcca ataggtttct tatcatctgg caggagaaag	240
tatggggacg tttttacctt cgTtctcttg ggacgccgag tgaccgtcgc gcttggtccc	300
aagggaagta atttcgtcct tgggggaaag ttgtcacagg tctcgccga agaagcgtac	360
acacacttga ctacacctgt ctTcggcaag ggcgtgattt tcgatgttcc aaatcatgtc	420
tttatggaac agaagaagt catcaaatcc ggcctcaca ctgaaaatct acgcgcctac	480
gtgaacatga tatccgagga gactaccaca ttctgaata aagacttggc tgatactgt	540
cgtggaaagg aatgggggag gtttcatgta cttgacactc tggctgggct tacgatcctg	600
accgcctcga ggacgtcca aggcagagaa gtgcggtcgt ctctggataa gacctttct	660
caggtttata aggatttTga tgggggattc acaccttga accttatgtt cgccaatctc	720
cctctgcccc gtTactggag gagggaccgt gctcaacgga aaatgagcga tttttatgtg	780
gacattatca ggaatcgcca agaggaacat cgggattctg aacatgacat gatctctgca	840
ttagcatcga gagagtacaa ggacggttct cctctaggcg accgcgagat cgctcacttg	900
atgatagcct tactcatggc tgggcagcac accagctctt cgaccggttc ttgggcattg	960

ctacacttag ccgatcgccc agatgttgta aaacaactac ttgcagagca agaagaagtg 1020

cttggtaacg aagatggaaa cttacgacct ctaaccttcg agggcctcca aaaactcccc 1080

gttctcaact cggttattcg cgaaacttta cgtattcatt cgccattca tagtatcatg 1140

cgcaaatgca tagacgatat tggtgtcccg gctactctcg cctccccaag ttcggactcg 1200

acttacatcg taccaaaagg acattttctc ctgcctctc cggctcactc gcaagtcgac 1260

ccagacgttt gggtcagcgc gagcgaatgg gaccactcac gatggctaga tccaaacgga 1320

gtggccgctc aagccgagtc actctacctg ggtgaccaag gtgaaaaagt cgactatggg 1380

tggggtgtgg taagcaaagg gaccgagagc cataccagc cattcgggtc tggaaggcat 1440

cgatgtatcg gtgagaagtt cgcttatgta caacttggga cgattctgtc gactgttgtg 1500

agaacaattg agatgggggt ggactcgggt gttccggcgc acaactatca taccatgatt 1560

gttcagccga aggagccctg catgattcag ttcaggttcc gggataggca aaggag 1617

<210> 142

<211> 1823

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of a chimeric DNA encoding a ledRNA construct
targeting a gene encoding Cyp51

<400> 142

aagaattcta atacgactca ctatagggtc caaccagcgc agaggatccc acttgtcggc 60

gtcacgcat acacgagggc cgacttgtgc aacggcggga gatgccagaa gatagtggcc 120

cttggaaca acgtagggtc ggccctcgtt agccttgccg gtgggggcag ccagggacgc 180

cggaacaacc atatcgttaa tgcatttcg catgatactg tggataggcg gatgcatgcg 240

caaggctca cggataactg cgctcagtac tggcaaatcc ttcaactcct cgtagttaa 300

ggggcgcac gaaccatcgg cattacaaa gactttgact tgttcctcgt acaatttctc 360

ggcaatatca gggcgatcgg cgaggtgaag aagcgtccag gaagaagttg cagaactagt 420

gtgctgaccg gccatgagga gtgcaatcat gatatgagct acctcacggt cgctgagcgc 480

gcgccatct ttttaggtct gattcaacaa agcagcgcgc tgatattgcc gagaaattgt 540

acgaggaaca agtcaaagtc tttgtaatg ccgatggttc gatgcgcgcc ttgaactacg 600

aggagttgaa ggatttgcca gtactgagcg cagttatccg tgagaccttg cgcatgcac 660

cgctatcca cagtatcatg cgcaaatgca ttaacgatat ggttggtccg gcgtccctgg 720

ctgccccac cggcaaggct aacgagggcc gaacctacgt tgttccaag ggccactatc 780

ttctggcatc tcccgccgtt gcacaagtcg accctcgtgt atggcgtgac gccgacaagt 840
 gggatcctct gcgctgggtg gaccgtata ttggctcggc cattgaatac ggtaaggatc 900
 caataggttt cttatcatct ggcaggagaa agtatgggga cgtttttacc ttcgttctct 960
 tgggacgccg agtgaccgtc gcgcttggtc ccaagggaag taatttcgtc cttgggggaa 1020
 agttgtcaca ggtctcggcc gaagaagcgt acacacactt gactacacct gtcttcggca 1080

agggcgtgat ttctgatgtt ccaaatcatg tctttatgga acagaagaag ttcatcaaat 1140
 ccggcctcac aactgaaaat ctacgcgcct acgtgaacat gatatccgag gagactacca 1200
 cattcctgaa taaagctgag aaaaggtctt atccagagac gaccgcactt ctctgccttg 1260
 gagcgtcctc gaggcgggtc ggatcgtaag cccagccaga gtgtcaagta catgaaacct 1320
 cccccattcc ttccacgac aggtatcagc caagtcttta ttcaggaatg tggtagtctc 1380
 ctcgatatac atgttcacgt aggcgcgtag attttcagtt gtgaggccgg atttgatgaa 1440
 ctcttctgt tccataaaga catgatttgg aacatcgaag atcacgcctt tgccgaagac 1500

aggtgtagtc aagtgtgtgt acgttcttc gcccgagacc tgtgacaact ttccccaag 1560
 gacgaaatta ctcccttgg gaccaagcgc gacggtcact cggcgtccca agagaacgaa 1620
 ggtaaaaacg tcccatact ttctcctgcc agatgataag aaacctattg gatccttacc 1680
 gtattcaatg gccgagccaa tatacgtagg taccgggta gcatatccat gatatctgtt 1740
 agtttttttc ctgaaagagc ggccgcccta gcataacccc gcggggcctc ttcgggggtc 1800
 tcgcggggtt ttttgcgtgaa aga 1823

<210> 143

<211> 3554

<212> DNA

<213> Phytophthora cinnamomi

<400> 143

atggggctca ccggcgctgg catcatcgcc tccgtcgtgg gcacacctgg cggcgtgtcg 60
 ctgtcctgcg gcggctggtc gtcgtgtcc ctccgctc gctcgtcttt cgtgacgacg 120
 cagttcctct cggccttcgc catgtactg ccgcactgac catcactct gctccaattc 180
 tgaaacgagg gcgcactatt ggggtgtcgt tcggttctaa ttttgaacg ttccagacac 240
 taatttgatt ttccgtgtt gtgatattcc acctcagggg attcgtggtc gccttcaccg 300
 ccatctcgtc gctgacaagc accaacgagt ggatcgccgt ggcgccggc gccggcgctg 360
 gcttcgtgat cgcctcctc gtgggcttca tgacggtctt cgcccgctac atcctgatcc 420

tcgtcacagg cggcatcatc gcctgctacc tgctgctcgt ggacgcgtac gacggcgtga 480

aactcttccc gtcagacaay cagctggcgc gccaggagt tctcatcgcc ttcattgatca 540
tcttcgagct cgtgtgctgc tctgtctcca agacgtcgga gctggagaac caccgcttca 600
agtacatcat ctctcggcc atcacggcgc gctggatggc ctccgacggc gtgtcccgcc 660
tcatcgactc gacggctgtt ctgtcggacg tggcctacac ctccatccag gacggcggct 720
cggccgcgct caagggcatc gacagcagcg cgcagacgct catgttctc atctggggcg 780
ccgtcttctg ggtcggcggc ctcaaccagc tctccatgcg ctggggactc atgtgctaca 840

accgcttggg tgcgcacgcc cagctcggcc ccgtcgagga gcagatgccg gagctgcccc 900
cgggcgccac gctgcctgcc cagaccatga acgagcgcgt gcgcctcgtg tgcgagaact 960
gtttcgccac ggtgcccagc ggcacggcct tctgtaccga gtgtggtgag gcaatgccct 1020
cggacgacgc cgacccgaac gtcagcatct cgcaggcgca gatcccgctg gtcacgatga 1080
acaacaagtc tcaagtcccc gaccgtggc agcaggtgcc gcaccgcacg tacctcagca 1140
cgacgtcgtt tgtcgacccc aagcacgcca aggagggcgg cgtgagcatg aaggacaaca 1200
gccgcagcat ccgttcatg gactcgggtg tgcagggccc cgacggcaag atgagccagt 1260

acaacgactc gatcgccggc gtgcgcaact attacgagcc ttcattccgg tegtctgcca 1320
tgtcgaccta ctcgatcgcc aaccgcgcgc ctgagcccggt tgacacgccc aacatccgca 1380
agtacaagat gtctggtagt ggcatgttcc acgtcttcta ctccggtacg gctgccaccg 1440
gtatcttctg gctgtactac ttgactacga tgtaccgca gcagtacttc tgcgaccacg 1500
ccgccccac gcttccctgc agtgagctgc ccagcagcga gatttcgggc tgctacagtt 1560
caacggtcaa ctccgactcc tcttcggcgc agggttactg catcaagaac gtgccgttca 1620
tgtctgggt catgtacgcg atgatgatct ttacgaggtt cctcaactac ttcctaggtc 1680

tgctgttcaa ctccagtatg tggcgtccga ttcgtcgtgg cggccgttac atgaacgact 1740
tcaaaccgcc tatcccgaaa gagcagtggc cgaccgtcga catcttctg tgtcactaca 1800
tggaacctgt gacggactcc atggctacgc tgaagaactg tcttgcgatg cagtaccctc 1860
cggagctgct gcacattttc atccttgatg atggttacgc caagtctgtg tgggacgcca 1920
acaaccactt caaggttacg gtcaacacca aggtgattga gatttgtggt gacctgcgtg 1980
gcgacgtcgc tgcacatcg cagagcgcgc tggcggccc tgtgcaggac gatcagtcgc 2040
tgaagacgtg gcgtcgccag cacagctctg tgcgtgagct ccgcaaagag ggaagcaagg 2100

gcgtgcagcg tgcgactgt gctgttggtt cactgtcgga cgactacgac taccgtgacc 2160
gcggtatccc gcgtgtgact ttcattcggtc gcatgaagcc cgaaacgcac cactccaagg 2220
ctggtaacat caacaacgcc ctcttcaacg aaggtgccga tggcaagtac ttgctgattc 2280
tggataatga tatgaagccg caccgaagi tcttgcttgc cgtgtcgccg ttcttttct 2340

cggaggcgga ggctgtggac ggcggaggcc gccagtacag tgacgacatt tcctggaacc 2400
aggtgtcgta cgtgcagact cctcagtact tcgaggacac gccccagctg accatcatgg 2460
gagaccctgt tggacacaag aacaccattt tcttcgacgc tgtacagtgt ggtcgtgatg 2520

gtttcgactc ggcagctttc gccggtacca acgccgtttt ccgtcgccag gctttcgact 2580
ccatcggtgg cattcagtae ggtaccaga cggagatgc ctacacgggt aacgtgctgc 2640
acacttctgg ctgggactcg gtgtacttcc gcaaggattt cgagggtgat gccaaggacc 2700
gcattcgtct gtgcgaaggt gccgtgcccc aaacggtcgc tgctgccatg ggtcagaaga 2760
agcgttgggc caagggtgcc gtgcagattc tgctcatgaa gaatgagagc gaggtcgacc 2820
cggactggcg tccgccgct gtgcctgcc cggaccgaa gccggcgctt gcgttccgc 2880
gcaagatgtt ctctacgac tcggtgctct acccgttcgg ttccattccc gctctgtgtt 2940

acgtggcgat cgtatttac tacctgtgta cgggtgacgc tccatctac gctcgtgta 3000
ccaagttcct gtactcttc ttgccgtga cgttctgccg ttgggtactc aacctgctgg 3060
ccaaccgcgc cgtcgacaac aacgatgtgt ggcgtgcca gcagacctgg ttctcttct 3120
ccttcatcac gatgatggct attgtggagg ctattcaggc gcgtgtgacg ggcaaagaca 3180
agtcgtgggc caacacgggt gccggtcaga agacgtcgtg gacagagatc cccaacgtgc 3240
tcttcttctt cacgtgctc tttagtcaac tgggtggcgt gattcggttc tttagtacg 3300
agaacgccac gaaccctgg aactacgtgt ctgctatgtt cttcggttc ttcgtgatga 3360

gtcagttcta ccccatggtc aagatgagta tcacggagta ctgtggttg gaccacacgg 3420
ccgcgacctt tacggccaac gtgttcggct cgtgctggt ggtgtacatc gtggtgttcg 3480
tgcagctgtg gcaggtctac tacgagggca acctgcagac ggcccagggt acatcaggtt 3540
ccacttcgtc ttag 3554

<210> 144

<211> 1409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of a chimeric DNA encoding a ledRNA construct
targeting a gene encoding CesA3

<400> 144

aagaattcta atacgactca ctatagggtc ggcgtcgtcc gagggcattg cctcaccaca 60

ctcggtacag aaggccgtgc cgctgggcac cgtggcgaaa cagttctcgc acacgaggcg 120

cacgcgtcgc ttcatggctc gggcaggcag cgtggcgccc gtgggcagct cggcatctg 180

ctcctcgacg gggccgagct gggcgtgcgc accaacgcgg ttgtagcaca tgagtcccca	240
gcgcatggag agctggttga ggccgccgac cacgaagacg gcgccccaga tgaggaacat	300
gagcgtctgc gcgctgctgt cgatgccctt gagcgcggcc gagccgccgt cctggatgga	360
ggtgtaggcc acgtccgaca gaacagccgt cgagtcgatg aggcgtcgtg gtcggcggcc	420
tcaaccagct ctccatgcgc tggggactca tgtgctacaa ccgcgttggg gcgcacgccc	480
agctcggccc cgtcgaggag cagatgccgg agctgccac gggcgccacg ctgcctgccc	540
agaccatgaa cgagcgcgtg cgctcgtgt gcgagaactg tttcgccacg gtgcccagcg	600
gcacggcctt ctgtaccgag tgtgtgagg caatgccctc ggacgacgcc gaccctacg	660
tcagcatctc gcaggcgag atgccgtcgg tcacgatgaa caacaagtct caagtccccg	720
accgctggca gcaggtgccg caccgcacgt acctcagcac gacgtcgtt gtcgaccca	780
agcacccaa ggagggcggt gtgagcatga aggacaacag ccgcagcatc cgcttcatgg	840
actcgggtgt gcagggcccc gacggcaaga tgagccagta caacgactcg atcgccggcg	900
tgcgacagc tggaacatgc cactaccaga catcttgtag ttgcggatgt tggcggtgtc	960
aacgggctca gggcgcggt tggcgatcga gtaggtcgac atggcgaacg accggaatga	1020
aggctcgtaa tagttgcga cgccggcgat cgagtcgttg tactggctca tcttgccgtc	1080
ggggccctgc acaccgagt ccatgaagcg gatgctcgg ctgttgctct tcatgtcac	1140
gccgcccctc ttggcgtgt tggggtcgac aaacgacgtc gtgctgaggt acgtgcggtg	1200
cggcacctgc tgccagcgt cgggcacttg agacttggtg ttcacgtga ccgacggcat	1260
ctgcgcctgc gagatgctga cgtacgtagg taccgggta gcataccat gatatctgtt	1320
agtttttttc ctgaaagagc ggccgcccta gcataacccc gcggggcctc ttcgggggtc	1380
tcgcggggtt ttttgctgaa agaagctta	1409