

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 053

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-452**
(22) Přihlášeno: **29.11.2001**
(30) Právo přednosti:
01.12.2000 EP 00126325
30.03.2001 WO PCT/US200110188
30.03.2001 US 60/279661
(40) Zveřejněno: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)
(47) Uděleno: **16.10.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku:
27.11.2019
(Věstník č. 48/2019)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2001/013968**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/044321**

(56) Relevantní dokumenty:

YANG D. et al.: „Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos,” *Current Biology*, vol. 10, no. 19, září 2000, str. 1191 - 1200, ISSN 0960-9822; KENNERDELL J. R. et al.: „Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA,” *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 8, srpen 2000, str. 896 - 898, ISSN 1087-0156; BASS B. L. et al.: „Double-stranded RNA as a template for gene silencing,” *Cell*, vol. 101, no. 3, duben 2000, str. 235 - 238, ISSN 0092-8674; ZAMORE P. D. et al.: „RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals,” *Cell*, vol. 101, no. 1, březen 2000, str. 25 - 33, ISSN 0092-8674; HAMMOND S. M. et al.: „An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells,” *Nature*, vol. 404, no. 6775, březen 2000, str. 293 - 296, ISSN 0028-0836; TUSCHL T. et al.: „Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro,” *Genes & Development*, vol. 13, no. 24, 1999, str. 3191-3197, ISSN 0890-9369.
WO 0 044 895.

(73) Majitel patentu:
**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.,
München, DE
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR
MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL), Heidelberg,
DE**

řídící siRNA. Dále se popisuje důkaz, že směr zpracování dsRNA stanoví, zda připravený komplex siRNA štěpí pozitivní nebo negativní cílovou RNA.

(72) Původce:
**Thomas Tuschl, Göttingen, DE
Sayda Elbashir, Göttingen, DE
Winfried Lendeckel, Hohengandem, DE
Wilm Matthias, Heidelberg, DE
Reinhard Lührmann, Marburg-Michelbach, DE**

(74) Zástupce:
**KOREJZOVA LEGAL v.o.s., JUDr. Petra Sauvage
de Brantes, advokátka, Korunní 810/104, 101 00
Praha 10, Vinohrady**

(54) Název vynálezu:

**Izolovaná molekula dvouřetězcové RNA,
způsob její výroby a její použití**

(57) Anotace:

Dvouřetězcová RNA (dsRNA) vyvolává sekvenčně specifické post-trankripční zhášení genu u mnoha organismů způsobem, který je znám jako RNA interference (RNAi). Za použití in vivo systému organismu *Drosophila* se ukázalo, že krátké fragmenty RNA obsahující 19 až 23 nukleotidů jsou sekvenčně specifickými mediátory RNAi. Krátké interferující RNA (siRNA) vznikly zpracováním dlouhých dsRNA reakcí podobné reakci Rnazy III. Chemicky syntetizované duplexy siRNA s přesahujícími 3'-konci zprostředkovávají účinné štěpení cílové RNA v lyzátu a místa štěpení se nacházejí blízko centra oblasti pokryté

Izolovaná molekula dvouřetězcové RNA, způsob její výroby a její použití

Oblast techniky

Popisují se sekvence a strukturální rysy molekul dvouřetězcové RNA ((ds)RNA) nutných pro zprostředkování cílově specifických úprav nukleové kyseliny, jako je interference RNA a/nebo metylace DNA.

Dosavadní stav techniky

Termín "interference RNA" (RNAi) vznikl po objevu, kdy zavedení dsRNA do nematod *C. elegans* injekcí vede ke specifickému zhášení genů, jejichž sekvence vykazuje vysokou homologii se sekvencí zavedené dsRNA (popisuje se v publikaci Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811). RNAi bylo možné následně pozorovat u hmyzu, žab (popisuje se v publikaci Oelgeschlager, M., Larrin, J., Geissert, D., and De- Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757–763) a jiných zvířat, která zahrnují myši (popisuje se v publikaci Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. and Schutz, R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147–4156, Wianny, F., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70–75) a je pravděpodobné, že také existuje u člověka. RNAi je také úzce spojena s posttranskripčním mechanismem geny zhášející (PTGS) ko-suprese v případě rostlin a hub (popisuje se v publikaci Catalanotto, C, Azzalin, G., Macino., and Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245, Cogoni and Macino, G. (1999). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a Number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 657–662, Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S. Angell, S., and Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543–553, Ketting, R., and Plasterk., R. H. (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296–298, Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Joutte, D., Lacombe, A. JM., Nokic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A., and Vaucheret, H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 Gnes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533–542, Smardon, A., Spoerke, J., Stacey, S., Klein, M., Mackin, N., and Maine, E. (2000). EGO-1 is related to RNA directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 10, 169–178) a některé složky systému RNAi jsou také nezbytné pro posttranskripční zhášení ko-supresi (popisuje se v publikaci Catalanotto, C, Azzalin, G., Macino., and Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245, Cogoni and Macino, G. (1999). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a Number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 657–662, Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M. P., and Vileneuve, A. M. (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Dev.* 14, 1578–1583, Ketting, R., and Plasterk., R. H. (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296–298). Předmětná věc se také popisuje v publikaci Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235–238, Boshier, J. M. and Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* 2, E31–36, Fire, A. (1999). RNA-tiggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358–363, Plasterk, R. H. and Ketting, R. F. (2000). The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 562–567, Sharp, P. A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes. & Dev.* 13, 139–141, Sijen, T., and Kooter, J. M. (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22, 520–531) a také v celém vydání *Plant Molecular Biology*, vol. 43, issue 2/3, (2000).

- V rostlinách, vedle PTGS, zavedené geny mohou také vést k transkripčnímu zhášení genů prostřednictvím metylace DNA cytozinů řízené pomocí RNA (popisuje se v publikaci Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant. Mol. Biol.* 43, 203–220).
- 5 Genomové cíle obsahující 30 párů bází, jsou v případě rostlin metylovány způsobem řízeným RNA (popisuje se v publikaci Pelissier, T., and Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed methylation. *RNA*. 6, 55–65). K metylaci DNA také dochází u zvířat.
- 10 Přírozenou funkcí RNAi a ko-suprese je ochrana genomu proti invazi mobilních genetických elementů, jako jsou retrotranspozóny a viry, které produkují v hostitelské buňce, v případě jejich aktivace, aberující RNA nebo dsRNA (popisuje se v publikaci Jensen, S., Gassama, M. P., and Heidmann, T. (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat. Genet.* 21, 209–212, Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G., and Plasterk, R. H. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RnaseD. *Cell* 99, 133–141, Ratcliff, F.G., MacFarlane, S. A., and Baulcombe, D. C. (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207–1216, Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The *erdc-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123–132). Specifická degradace mRNA brání replikaci transpozonu a viru, ačkoli některé viry jsou schopny obejít nebo zabránit uvedenému postupu exprese proteinů, které potlačují PTGS (popisuje se v publikaci Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., and Ding, S. W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672–1680, Voinnet, O., Lederec, C., and Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157–167).

Dvouřetězcová RNA způsobuje specifickou degradaci homologních RNA pouze v oblasti shodné s dsRNA (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Zpracováním dsRNA vznikají fragmenty RNA obsahující 21 až 23 nukleotidů a místa štěpení cílové RNA jsou obvykle umístěna ve vzdálenosti 21 až 23 nukleotidů. To naznačuje, že fragmenty obsahující 21 až 23 nukleotidů (nt) jsou řídicí RNA pro rozeznávání cíle (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Tyto krátké RNA se také detekovaly v extraktech připravených z buněk *Schneider 2* organismu *D. melanogaster*, které dříve než se lyzovaly, se transfekovaly dsRNA (popisuje se v publikaci Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296). Avšak frakce, které vykazují nukleázovou aktivitu specifickou pro sekvenci, také obsahovaly velkou část reziduální dsRNA. Úloha fragmentů obsahujících 21 až 23 nukleotidů při řízení štěpení mRNA je dále podpořena pozorováním, že tyto fragmenty izolované ze zpracované dsRNA jsou schopny v určitém rozsahu zprostředkovat specifickou degradaci mRNA (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Molekuly RNA podobné velikosti se také hromadí ve tkáni rostlin, která vykazuje PTGS (popisuje se v publikaci Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small anti-sense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 86, 950–952).

50 Za účelem dalšího zkoumání mechanismu RNAi se použil zavedený in vitro systém organismu *Drosophila* (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benschler, F., and Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658–11668, Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent

cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25–33). Ukázalo se, že krátké RNA vykazující 21 a 22 nukleotidů, když tvoří páry bází z přesahujícími 3'-konci, působí jako řídicí RNA při degradaci mRNA, která je sekvenčně specifická. Krátké dsRNA obsahující 30 párů bází nejsou schopny zprostředkovat RNAi v tomto systému, protože už nejsou zpracovány na RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů. Dále se definovala místa štěpení cílové RNA, pokud jde o krátké interferující RNA (siRNA) vykazující 21 a 22 nukleotidů, a potvrdilo se, že směr zpracování dsRNA stanoví, zda produkovaný endonukleázový komplex siRNP štěpí 3', 5' řetězec RNA nebo 5',3' řetězec RNA. siRNA může také být důležitým nástrojem transkripčních úprav, jako je například zhasínání savčích genů metylací DNA.

Další experimenty v lidských buněčných kulturách (buňky Helia) vykazují, že molekuly dvouřetězcové RNA, které s výhodou obsahují 19 až 25 nukleotidů, vykazují aktivitu RNAi. Na rozdíl od výsledků získaných v případě organismu Drosophila, jsou také molekuly dvouřetězcové RNA vykazující délku 24 a 25 nukleotidů v těchto buňkách účinné při RNAi.

Podstata vynálezu

Předmětnou věcí vynálezu jsou nová činidla schopná zprostředkovat cílově specifickou interferenci RNA nebo jiné cílově specifické úpravy nukleové kyseliny, jako je metylace DNA. Uvedená činidla vykazují ve srovnání s činidly předchozího stavu techniky zlepšenou účinnost a bezpečnost.

Podstatu vynálezu tvoří izolovaná molekula dvouřetězcové RNA, kde každý řetězec obsahuje 19 až 23 nukleotidů, přičemž alespoň jeden řetězec má na 3'-konci přesah obsahující 1 až 3 nukleotidů a molekula RNA je schopna cílově specifické RNA interference.

Je výhodné, aby alespoň jeden řetězec měl přesah na 3'-konci tvořený 1 až 5 nukleotidy, výhodněji 1 až 3 nukleotidy a nejvýhodněji 2 nukleotidy. Ostatní řetězce mohou být zakončeny tupým koncem nebo mají na 3'-konci přesah tvořený až 6 nukleotidy. V případě, že oba řetězce dsRNA vykazují přesně 21 nebo 22 nukleotidů, je možné pozorovat interferenci RNA v případě, že oba konce jsou tupé (přesah obsahuje 0 nukleotidů). Molekulou RNA je s výhodou syntetická molekula RNA, která v podstatě neobsahuje žádné nečistoty, které se vyskytují v buněčných extraktech, jako jsou například extrakty vytvořené z embryí organismu Drosophila. Molekula RNA s výhodou v podstatě neobsahuje žádné cílově nespecifické nečistoty, zvláště molekuly cílově nespecifické RNA, například nečistoty vyskytující se v buněčných extraktech.

Vynález dále popisuje použití izolovaných dvouřetězcových molekul RNA, kde každý řetězec RNA vykazuje délku 19 až 25 nukleotidů, při zprostředkování cílově specifických úprav nukleové kyseliny, zvláště RNAi v savčích buňkách, zvláště pak v lidských buňkách.

Překvapivě se zjistilo, že molekuly syntetické krátké dvouřetězcové RNA s přesahem na 3'-konci jsou sekvenčně specifickými mediátory RNAi a zprostředkovávají účinné štěpení cílové RNA, kde místo štěpení se nachází blízko centra oblasti pokryté řídicí krátkou RNA.

Je výhodné, aby každý řetězec molekuly RNA měl délku 20 až 22 nukleotidů (nebo v případě savčích buněk 20 až 25 nukleotidů), kde délka každého řetězce může být stejná nebo rozdílná. Je výhodné, aby délka přesahu na 3'-konci byla 1 až 3 nukleotidy, kde délka přesahu může být v případě každého řetězce stejná nebo odlišná. Řetězce RNA s výhodou obsahují na 3'-konci hydroxylové skupiny. 5'-konec s výhodou obsahuje fosfátovou, difosfátovou, trifosfátovou nebo hydroxylovou skupinu. Nejúčinnější dsRNA se skládají ze dvou řetězců, které obsahují 21 nukleotidů, jenž se párují tak, že 1 až 3 nukleotidy, zvláště pak 2 nukleotidy přesahů na 3'-konci, jsou přítomny na obou koncích dsRNA.

Štěpící reakce cílové RNA řízená siRNA je vysoce sekvenčně specifická. Ne ve všech polohách siRNA přispívá stejně k rozeznání cíle. Nejvíce rozhodující je –nesprávné párování v centru duplexu siRNA, které v podstatě eliminuje štěpení cílové RNA. Naopak nukleotid 3'–konce řetězce siRNA (například v poloze 21), který je komplementární s jednořetězcovou cílovou RNA, nepřispívá ke specifitě rozeznávání cíle. Dále sekvence nepárovaných dvou nukleotidů přesahu 3'–konce řetězce siRNA se stejnou polaritou, jako vykazuje cílová RNA, není rozhodující pro štěpení cílové RNA, protože rozeznání cíle řídí pouze 5',3'řetězec siRNA. Tak v případě nukleotidů jednořetězcového přesahu je nutné, aby se pouze předposlední nukleotid 5',3'řetězce siRNA (například poloha 20) pároval s cílovým 3',5'řetězcem mRNA.

Překvapivě molekuly dvouřetězcové RNA podle vynálezu vykazují vysokou in vivo stabilitu v séru nebo v růstovém médiu, které je vhodné pro kultivaci buněk. Za účelem dále zvýšit stabilitu, se mohou přesahy na 3'–konci stabilizovat proti degradaci. Mohou se například vybrat tak, aby obsahovaly purinové nukleotidy, zvláště adenosin nebo guanosin. V jiném provedení vynálezu se toleruje substituce pyrimidinových nukleotidů upravenými analogy, například substituce 2 nukleotidů uridin v přesahu 3'–konce 2'–deoxytymidinem, a neovlivňuje účinnost interference RNA. Nepřítomnost 2–hydroxyly podstatně zesiluje rezistenci přesahu vůči nukleázám obsaženým v kultivačním médiu.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu molekula RNA může obsahovat alespoň jeden upravený nukleotidový analog. Nukleotidové analogy se mohou vyskytovat v polohách, kde cílově specifická aktivita, například aktivita zprostředkovaná RNAi, není podstatně ovlivněna, například v oblasti 5'–konce a/nebo 3'–konce molekuly dvouřetězcové RNA. Přesahy se mohou zvláště stabilizovat začleněním upravených nukleotidových analogů.

Výhodné nukleotidové analogy se vybraly z ribonukleotidů s upravenou cukernou složkou nebo kostrou. Je nutné poznamenat, že ribonukleotidy s upravenou jadernou bází, to jsou ribonukleotidy obsahující místo přirozeně se vyskytujících jaderných bází umělé báze, jako jsou uridiny nebo cytosiny upravené v poloze 5, například 5–(2–amino)propyluridin, 5–bromouridin, adenosiny a guanosiny upravené v poloze 8, například 8–bromoguanosin, deáza–nukleotidů, například 7–deáza–adenosin. Vhodné jsou také 0–alkylované nukleotidy a N–alkylované nukleotidy, například N₆–metyladenosin. Ve výhodných ribonukleotidech s upravenou cukernou složkou je 2'–hydroxyl nahrazen členem skupiny zahrnující vodík, OR, R, halogen, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ nebo CN, kde symbol R je alkyl obsahující jeden až šest uhlíků, alkenyl nebo alkynyl a halogenem je fluór, chlór, bróm nebo jód. Ve výhodných ribonukleotidech s upravenou kostrou je fosfoesterová skupina spojující sousední ribonukleotidy nahrazena upravenou skupinou například fosfothioátovou skupinou. Je nutné poznamenat, že shora v textu uvedené úpravy je možné kombinovat.

Sekvence molekuly dvouřetězcové RNA podle vynálezu musí vykazovat dostatečnou shodu s cílovou molekulou nukleové kyseliny, aby zprostředkovala cílově specifickou RNAi a/nebo metylaci DNA. Sekvence s výhodou vykazuje shodu alespoň 50 %, zvláště pak alespoň 70 %, s požadovanou cílovou molekulou ve dvouřetězcové části molekuly RNA. Výhodnější je, když shoda je alespoň 85 % a nejvýhodnější je, když existuje 100 % shoda s dvouřetězcovou částí molekuly RNA. Shoda molekuly dvouřetězcové RNA s předem určenou cílovou molekulou nukleové kyseliny, například s molekulou cílové mRNA, se může stanovit následujícím výpočtem:

$$I = \frac{n}{L} \times 100$$

kde symbol I je shoda vyjádřená v procentech, symbol n je počet shodných nukleotidů v části dvouřetězcové dsRNA a cílové nukleové kyselině a symbol L je délka sekvence přesahu dvouřetězcové části dsRNA a cílové nukleové kyseliny.

V jiném případě identita molekuly dvouřetězcové RNA s cílovou sekvencí se může také definovat zahrnutím přesahu 3'-konce, zvláště přesahu, který obsahuje 1 až 3 nukleotidy. V tomto případě shoda sekvence je s výhodou alespoň 50 %, výhodněji alespoň 70 % a nejvýhodněji alespoň 85 % s cílovou sekvencí. Nukleotidy z přesahu 3'-konce a až dva nukleotidy z 5'-konce a/nebo 3'-konce dvojitého řetězce se mohou upravovat, aniž dojde k podstatné ztrátě aktivity.

Molekula dvouřetězcové RNA podle vynálezu se může připravit způsobem zahrnujícím:

(a) syntézu dvou řetězců RNA, kdy každý zahrnuje 19 až 25 nukleotidů, například 19 až 23 nukleotidů, kde uvedené řetězce RNA jsou schopny tvořit molekulu dvouřetězcové RNA, kde alespoň jeden řetězec má na 3'-konci přesah tvořený 1 až 5 nukleotidy,

(b) kombinování syntetizovaných řetězců RNA za podmínek, kdy se tvoří molekula dvouřetězcové RNA, která je schopna zprostředkovat cílově specifické úpravy nukleové kyseliny, zvláště RNA interferenci a/nebo metylaci DNA.

Způsoby syntézy molekul RNA jsou dobře známy v oboru. Zvláště se uplatňují metody chemické syntézy popsané v publikaci Verma, S., and Eckstein, F. (1999). Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annu. rev. Biochem.* 67, 99–134.

Jednořetězcová RNA se může také připravit enzymatickou transkripcí ze syntetických templátových DNA a z DNA plazmidů izolovaných z rekombinantních bakterií. V typickém případě se používají fagové RNA polymerázy, jako je RNA polymeráza T7, T3 nebo SP6 (popisuje se v publikaci Milligan, J. F., and Uhlenbeck, O. C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51–62).

Další předmětná věc vynálezu popisuje způsob zprostředkování cílově specifických úprav nukleové kyseliny, zvláště RNA interference a/nebo metylace DNA, v buňce nebo v organismu. Uvedený způsob zahrnuje:

(a) kontakt buňky a organismu s molekulou dvouřetězcové RNA podle vynálezu za podmínek, kde se mohou objevit cílově specifické úpravy nukleové kyseliny a

(b) zprostředkování cílově specifické úpravy cílové nukleové kyseliny, která má část sekvence v podstatě odpovídající uvedené sekvenci RNA, ovlivněné dvouřetězcovou RNA.

Kontakt popsaný v odstavci (a) zahrnuje zavedení molekuly dvouřetězcové RNA do cílové buňky, například izolované cílové buňky, do buněčné kultury, do jednobuněčného mikroorganismu nebo do cílové buňky nebo do velkého množství cílových buněk vícebuněčného organismu. Je výhodné, aby zaváděcí krok zahrnoval zavedení zprostředkované nosičem, například pomocí lipozomálních nosičů nebo injekcí.

Způsob podle vynálezu se může použít za účelem stanovení funkce genu v buňce nebo v organismu nebo dokonce při úpravě funkce genu v buňce nebo v organismu, který je schopen zprostředkovat RNA interferenci. Buňka zahrnuje s výhodou eukaryontní buňku nebo buněčnou linii, jako například rostlinnou nebo zvířecí buňku, jako je savčí buňka, například zárodečná buňka. Dále se může použít například víceúčelová kmenová buňka, nádorová buňka, jako je například buňka teratokarcinomu, nebo buňka infikována virem. Organismem je s výhodou eukaryontní organismus, například rostlina nebo zvíře, jako je savec, zvláště pak člověk.

Cílový gen, vůči kterému je molekula RNA podle vynálezu řízena, může být spojován s patologickým stavem. Genem může být gen spojovaný s patogenem, například virový gen, gen spojovaný s nádorem nebo gen spojovaný s autoimunitním onemocněním. Cílovým genem může

také být heterologní gen exprimovaný v rekombinantní buňce nebo geneticky pozměněný organismus. Stanovením nebo úpravou, zvláště pak inhibicí, funkce takového genu a je možné dosáhnout hodnotné informace a terapeutických účinků v oblasti zemědělství nebo medicíny nebo veterinární medicíny.

5

Dvouřetězcová RNA se obvykle aplikovala jako farmaceutický prostředek. Aplikaci je možné provést známými způsoby, kdy se nukleová kyselina zavede do požadované cílové buňky in vitro nebo in vivo. Běžně používané metody transferu genu používají fosforečnan vápenatý, DEAE-dextran, elektroporaci a mikroinjekce a virové metody (popisuje se v publikaci Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) *Virology* 52, 456, McCutchan, J. H. and Pagano, J. S. (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351, Chu, G. et al., (1987), *Nucl. Acids Res.* 15, 1311, Fraley, R. et al. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10431, Capecchi, M. R. (1980), *cell* 22, 479). Pro zavedení DNA do buněk se dále mohou použít kationické liposomy (popisuje se v publikaci Felgner, P. L. et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 7413). Běžně dostupné přípravky kationických lipidů jsou například Tfx 50 (od firmy Promega) nebo Lipofectamin2000 (od firmy Life Technologies).

10

15

Vynález dále popisuje farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní činidlo alespoň jednu molekulu dvouřetězcové RNA, jak se popisuje shora v textu, a farmaceutický nosič. Prostředek je možné použít při diagnostických a terapeutických aplikacích v lidské nebo veterinární medicíně.

20

V případě diagnostické a terapeutické aplikace může být prostředek ve formě roztoku, například roztok, který se zavádí injekcí, ve formě krému, masti, tablet, suspenze a podobně. Prostředek je možné aplikovat libovolným vhodným způsobem, například injekcí, orálně, povrchově, nasálně, rektálně atd. Nosičem může být libovolný vhodný farmaceutický nosič. Je výhodné použít nosič, který je schopný zvýšit účinnost vstupu molekul RNA do cílových buněk. Vhodné příklady takových nosičů jsou liposomy, zvláště kationické liposomy. Zvláště výhodný způsob aplikace je injekce.

25

Další výhodnou aplikací RNAi je funkční analýza eukaryotních buněk nebo eukaryotního organismu, kterým není člověk, s výhodou savčích buněk nebo savců a nejvýhodněji lidských buněk, například buněčné linie, jako je HeLa nebo 293, nebo hlodavců, například krys a myši. Specifický genotyp cílové buňky, například v buněčné kultuře nebo v cílovém organismu, vzniklý na základě zhasnutí genů, je možné získat transfekcí vhodných molekul dvouřetězcové RNA, které jsou homologní s předem stanoveným cílovým genem nebo s molekulou DNA, která kóduje vhodnou molekulu dvouřetězcové RNA. Překvapivě se zjistilo, že přítomnost molekul krátké dvouřetězcové RNA nevede k interferonové odezvě ze strany hostitelské buňky nebo organismu.

30

35

Předmětnou věcí podle vynálezu je eukaryotní buňka nebo eukaryotní organismus, kterým není člověk, vykazující fenotyp vzniklý na základě zhasnutí cílového genu. Uvedený fenotyp zahrnuje alespoň částečně deficitní expresi alespoň jednoho endogenního cílového genu, kde uvedená buňka nebo organismus se transfekuje alespoň jednou molekulou dvouřetězcové RNA schopnou inhibovat expresi alespoň jednoho endogenního cílového genu nebo je možná transfekce DNA kódující alespoň jednu molekulu dvouřetězcové RNA schopné inhibovat expresi alespoň jednoho endogenního cílového genu. Je nutné poznamenat, že vynález umožňuje cílově specifickou deaktivaci několika různých endogenních genů na základě specifity RNAi.

40

45

Fenotypy buněk nebo organismu, kterým není člověk, zvláště pak lidských buněk nebo savců, kterým není člověk, způsobené deaktivací specifických genů, se mohou použít v analytických postupech, jako je například funkční a/nebo fenotypická analýza komplexních fyziologických postupů, jako je analýza profilů exprese genů a/nebo proteomů. Je možné například připravit fenotypy deaktivovaných lidských genů v buněčných kulturách, o nichž se předpokládá, že jsou pravděpodobně regulátory alternativních procesů sestřihu. Mezi tyto geny zvláště patří rodina faktorů sestřihu SR, jako například ASF/SF2, SC35, SRp20, SRp40 nebo SRp55. Může se zkoumat účinek proteinů SR na profily mRNA předem stanovených alternativně sestřižených

50

55

genů, jako je CD44. Analýza se přednostně provádí metodou za použití čipů založených na oligonukleotidech.

Použitím technologie založené na deaktivaci genů pomocí RNAi je možné inhibovat expresi endogenního cílového genu v cílové buňce nebo organismu. Endogenní gen může být doplněn exogenní cílovou nukleovou kyselinou kódující cílový protein nebo jeho variantu nebo jeho mutovanou formu, například gen nebo cDNA, která může fúzovat s další sekvencí nukleové kyseliny kódující detekovatelný peptid nebo polypeptid, například afinitní značení, zvláště pak vícenásobné afinitní značení. Varianty nebo mutované formy cílového genu se liší od endogenního cílového genu tím, že kódují genový produkt, který se liší od produktu endogenního genu substitucí, inzercí a/nebo delecí jedné nebo více aminokyselin. Varianty nebo mutované formy mohou vykazovat stejnou biologickou aktivitu jako endogenní cílový gen. Na druhou stranu varianta nebo mutovaný cílový gen mohou také mít biologickou aktivitu, která se liší od biologické aktivity endogenního cílového genu, například částečně deletovanou aktivitu, zcela deletovanou aktivitu, zesílenou aktivitu atd.

Komplementace je možné dosáhnout společnou expresí polypeptidu kódovaného exogenní nukleovou kyselinou, například fúzní protein obsahující cílový protein a afinitní značení a molekulu dvouřetězcové RNA vhodnou pro deaktivaci endogenního genu v cílové buňce. Tato společná exprese se provede použitím vhodného expresivního vektoru, který exprimuje polypeptid kódovaný exogenní nukleovou kyselinou, například cílový protein upravený značkou a molekulu dvouřetězcové RNA. V jiném případě lze použít kombinování expresivních vektorů. Proteiny a proteinové komplexy, které se nově syntetizují v cílové buňce, budou obsahovat exogenní produkt genu, například upravený fúzní protein. Za účelem zabránit potlačení exprese exogenního produktu genu duplexovou molekulou RNAi, je možné změnit nukleotidovou sekvenci kódující exogenní nukleovou kyselinu na úrovni DNA (může dojít k mutacím na úrovni aminokyselin nebo k ní dojít nemusí) v té části, která je homologní s molekulou dvouřetězcové RNA. V jiném případě endogenní cílový gen se může doplnit odpovídající nukleotidovou sekvencí z jiných živočišných druhů, například z myši.

Výhodné aplikace pro buňku nebo organismus podle vynálezu je analýza profilů exprese genů a/nebo proteomů. Ve zvláště výhodném provedení vynálezu se provádí analýza varianty nebo mutované formy jednoho nebo více cílových proteinů, kde uvedená varianta nebo mutovaná forma jsou znovu zavedeny do buňky nebo organismu exogenní cílovou nukleovou kyselinou, jak se popisuje shora v textu. Kombinace deaktivace endogenního genu a částečné aktivace použitím mutovaného, například částečně deletovaného exogenního cíle, je výhodná ve srovnání s použitím buňky s deaktivovanými geny. Tato metoda je zvláště vhodná při identifikaci funkčních oblastí cílového proteinu. Ve výhodném provedení vynálezu se provádí porovnání například profilů exprese genů a/nebo proteomů a/nebo fenotypické charakteristiky alespoň dvou buněk nebo organismů. Tyto organismy se vybraly ze skupiny zahrnující:

- (i) kontrolní buňku nebo organismus bez inhibice cílového genu,
- (ii) buňku nebo organismus s inhibicí cílového genu a
- (iii) buňku nebo organismus s inhibicí cílového genu plus komplementací cílového genu pomocí exogenní cílové nukleové kyseliny.

Způsob a buňka podle vynálezu jsou také vhodné při identifikaci a/nebo charakterizaci farmakologických činidel, například při identifikaci nových farmakologických činidel ze skupiny testovaných látek, a/nebo mechanismů charakterizujících působení a/nebo vedlejší účinky známých farmaceutických činidel.

Vynález dále popisuje systém vhodný pro stanovení a/nebo charakterizaci farmaceutických činidel, které působí na alespoň jeden cílový protein. Uvedený systém zahrnuje:

(a) eukaryotní buňku nebo organismus, kterým není člověk, schopný exprimovat alespoň jeden endogenní cílový gen kódující uvedený cílový protein,

5 (b) alespoň jednu molekulu dvouřetězcové RNA schopnou inhibovat expresi uvedeného alespoň jednoho endogenního cílového genu a

(c) testovanou látku nebo skupinu testovaných látek, kde jsou identifikovány a/nebo charakterizovány farmakologické vlastnosti uvedené testované látky nebo skupiny testovaných látek.

10 Systém popsany shora v textu s výhodou obsahuje:

(a) alespoň jednu exogenní cílovou nukleovou kyselinu kódující cílový protein nebo jeho variantu nebo jeho mutovanou formu, kde uvedená exogenní cílová nukleová kyselina se liší od endogenního cílového genu na úrovni nukleové kyseliny tak, že exprese exogenní cílové nukleové kyseliny je podstatně méně inhibována molekulou dvouřetězcové RNA než exprese endogenního cílového genu.

20 Způsob komplementace RNA s deaktivovanými geny je možné použít pro preparativní účely, například afinitní čištění proteinů nebo proteinových komplexů z eukaryotních buněk, zvláště savčích buněk a lidských buněk. V tomto provedení vynálezu exogenní cílová nukleová kyselina s výhodou kóduje cílový protein, který fúzuje s afinitním značením.

25 Preparativní metodu je možné použít při čištění proteinových komplexů s vysokou molekulovou hmotností, které s výhodou vykazují molekulovou hmotnost vyšší nebo rovnou 150 000 a výhodněji vyšší nebo rovnou 500 000 a které mohou obsahovat nukleové kyseliny, jako je RNA. Specifické příklady jsou heterotrimerické proteinové komplexy obsahující proteiny částic U4/U6 snRNP s molekulovou hmotností 20 000, 60 000 a 90 000, faktor sestřihu SF3b pocházející z 17S U2 snRNP obsahující 5 proteinů o molekulové hmotnosti 14 000, 49 000, 120 000, 145 000 a 30 155 000 a částice 25S U4/U6/U5 tri–snRNP obsahující molekuly snRNA U4, U5 a U6 a přibližně 30 proteinů, které vykazují molekulovou hmotnost přibližně 1 700 000 000.

Tato metoda je vhodná pro funkční analýzu proteomu v savčích buňkách, zvláště v lidských buňkách.

35

Objasnění výkresů

40 Na obrázku č. 1 je zobrazena dvouřetězcová RNA obsahující 38 párů bází, která může zprostředkovat RNAi.

45 A) Grafické zobrazení dsRNA používané k cílení mRNA Pp–luc. Připravily se tři série dsRNA s tupými konci překrývající rozmezí 29 až 504 párů bází. Poloha prvního nukleotidu 3',5'řetězce dsRNA se stanoví ve vztahu ke startovacímu kodonu mRNA PP–luc (p1).

50 B) Zobrazení testu RNA interference (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D. , Lehmann, R. , Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double–stranded RNA in vitro. Genes & Dev. 13, 3191–3197) . Poměr aktivity cílového Pp–luc ku aktivitě kontrolního Rr–luc se normalizoval vůči kontrolnímu pufru (plný sloupec). Dvouřetězcové RNA (v koncentraci 5 nM) se předem inkubovaly v lyzátu organismu Drosophila po dobu 15 minut při teplotě 25 °C a pak se přidaly mRNA Pp–luc s čepičkou 7–metyl–guanosin a Rr–luc (v koncentraci přibližně 50 pM). Inkubace pokračovala další hodinu a pak proběhla analýza duálním luciferázovým testem (od firmy Promega). Data jsou průměrné hodnoty alespoň ze čtyř nezávislých experimentů ± standardní odchylka.

55

Na obrázku č. 2 je zobrazena dsRNA obsahující 29 párů bází, která se dále nezpracovává na fragmenty obsahující 21 až 23 nukleotidů a časový průběh tvorby 21 až 23–méru při zpracování dsRNA (v koncentraci 5 nM) vnitřně značených pomocí ^{32}P . Uvádí se délka a zdroj dsRNA. Marker velikosti RNA (M) se nanese do levé dráhy a označuje se velikost fragmentů. Dvojitě pruhy v čase 0 jsou způsobeny neúplně denaturovanou dsRNA.

Na obrázku č. 3 je zobrazeno, že krátké dsRNA štěpí cílovou mRNA pouze jednou.

(A) Denaturační gelové elektroforézy stabilně štěpených produktů připravených inkubací po dobu 1 hodiny 35'řetězce nebo 5',3'řetězce RNA s čepičkou značenou ^{32}P v koncentraci 10 nM s 10 nM dsRNA sérií p133 lyzátu organismu *Drosophila*. Markery délky se vytvořily částečným štěpením za použití nukleázy T1 a částečnou alkalickou hydrolýzou (OH) cílové RNA značená čepičkou. Oblasti cílené dsRNA jsou indikovány jako černé pruhy na obou stranách obrázku. Je také zobrazen mezerník obsahující 20 až 23 nukleotidů mezi převládajícími místy štěpení v případě dsRNA obsahující 111 párů bází. Horizontální šipka označuje nespecifické štěpení způsobené RNAi.

(B) Poloha míst štěpení na 3',5' řetězci a 5',3'řetězci cílové RNA. Sekvence 3',5'řetězce cílové RNA obsahující 177 nukleotidů s čepičkou a 5',3'řetězce cílové RNA obsahující 180 nukleotidů s čepičkou jsou reprezentovány v antiparalelní orientaci tak, že komplementární sekvence stojí proti sobě. Oblast cílená různými dsRNA je označena barevnými sloupci umístěnými mezi cílovou sekvencí 3',5' a 5',3' řetězců. Místa štěpení jsou označeny kroužky. Velký kruh znamená silné štěpení, malý kroužek znamená slabé štěpení. Fosfátová skupina značená ^{32}P je označena hvězdičkou.

Na obrázku č. 4 je zobrazena tvorba fragmentů RNA tvořených 21 a 22 nukleotidy mechanismem podobným štěpení Rnázou III.

(A) Sekvence RNA obsahující 21 nukleotidů po zpracování dsRNA. Fragmenty RNA obsahující přibližně 21 nukleotidů vytvořené zpracováním dsRNA se přímo klonovaly a sekvenovaly. Oligoribonukleotidy pocházející z pozitivního řetězce dsRNA jsou značeny jako modré linky. Oligoribonukleotidy pocházející z negativního řetězce jsou značeny jako červené linky. Silné linky se používají, jestliže ve více kloněch jsou přítomny stejné sekvence, přičemž čísla na pravé straně obrázku značí frekvenci výskytu. Místa štěpení cílové RNA zprostředkovaná pomocí dsRNA jsou značena jako oranžové kroužky. Velké kroužky značí místa pro silné štěpení, malé kroužky značí místa pro slabé štěpení (zobrazeno na obrázku č. 3B). Kroužky nad 3',5' řetězcem označovaly místa štěpení v 3',5'řetězce a kroužky na druhé straně dsRNA označují místa štěpení 5',3'řetězce. Až pět dalších nukleotidů se identifikovalo ve fragmentech obsahujících přibližně 21 nukleotidů získaných z 3'konce dsRNA. Tyto nukleotidy jsou náhodnou kombinací převážně zbytků C, G, nebo A a přidaly se s velkou pravděpodobností během T7 transkripce řetězce, které se skládají z dsRNA.

(B) Na obrázku je zobrazena dvourozměrná analýza TLC složení nukleotidů RNA obsahujících přibližně 21 nukleotidů. mRNA obsahující 21 nukleotidů se vytvořila inkubací dsRNA Pp– luc o velikosti 504 párů bází značená radioaktivně v lyzátu organismu *Drosophila*, dále se čistila na gelu a pak se štěpila na mononukleotidy nukleázou P1 (horní řádek) nebo ribonukleázou T2 (spodní řádek). Dvouřetězcová RNA se radioaktivně značila uvnitř transkripce za přítomnosti jednoho z uvedených α - ^{32}P nukleosidtrifosfátů. Radioaktivita se detekovala zobrazením na základě detekce fosforu. Nukleosid–5'–monofosfáty, nukleosid–3'–monofosfáty, nukleosid–5',3'–difosfáty a anorganický fosfát jsou značeny jako pN, Np, pNp a pi. Černé kruhy označují body, které absorbují UV záření z neradioaktivních nosičových nukleotidů. 3', 5'–bis–fosfáty (červený kruh) se identifikovaly společnou migrací s radioaktivně značenými standardy připravenými 5'–fosforylací nukleosid–3'–monofosfátů s polynukleotidovou kinázou T4 a γ - ^{32}P –ATP.

Na obrázku č. 5 je znázorněno štěpení cílové RNA zprostředkované RNA obsahující 21 a 22 nukleotidy.

(A) Obrázek zobrazuje kontrolní dsRNA obsahující 52 párů bází a syntetickou dsRNA obsahující 21 a 22 nukleotidů. 3',5' řetězec obsahující 21 a 22 nukleotidů interferující RNA (siRNA) je označen modře, 5',3' řetězec je označen červeně. Sekvence siRNA se získaly klonováním fragmentů dsRNA o velikosti 52 a 111 párů bází (zobrazeno na obrázku č. 4A) s výjimkou 5',3' řetězce duplexu 5, který obsahuje 22 nukleotidů. SiRNA v duplexu 6 a 7 vznikají pouze reakcí při zpracování dsRNA o velikosti 111 párů bází. Dva nukleotidy přesahu 3' konce označené zeleně jsou přítomny v sekvenci syntetického 5',3' řetězce duplexů 1 a 3. Oba řetězce kontrolní dsRNA obsahující 52 párů bází se připravily transkripcí in vitro a frakce transkriptů mohou obsahovat navíc nukleotidy na 3'-konci, které nejsou obsaženy v templátu. Místa štěpení cílové RNA řízená duplexy siRNA jsou značena jako oranžové kroužky (legenda k obrázku č. 4A) a jsou určeny v polohách zobrazených na obrázku č. 5.

(B) Poloha míst štěpení na pozitivní a negativní cílové RNA. Cílové sekvence RNA jsou ty popsány na obrázku č. 3B. Kontrolní dsRNA obsahující 52 párů bází (10 nM) nebo duplexy RNA 1 až 7 obsahující 21 a 22 nukleotidů (v koncentraci 100 nM) se inkubovaly s cílovou RNA po dobu 2,5 hodiny při teplotě 25 °C v lyzátu organismu *Drosophila*. Stabilní produkty štěpení na 5'-konci se oddělily na gelu. Místa štěpení jsou uvedena na obrázku č. 5A. Oblast cílená dsRNA obsahující 52 párů bází nebo 3', 5' (s) nebo 5',3' (as) řetězce jsou označeny černými sloupci na jedné straně gelu. Místa štěpení jsou všechna umístěna v oblasti, která je shodná s dsRNA. Za účelem přesného stanovení míst štěpení 3',5' řetězce se použil méně koncentrovaný gel.

Obrázek č. 6: Dlouhé přesahy na 3'-konci krátké dsRNA inhibují RNAi.

(A) Obrázek zobrazuje konstrukce dsRNA obsahující 52 párů bází. Extenze 3'-konce 3',5' a 5',3' řetězce jsou označeny modře a červeně. Pozorovaná místa štěpení na cílové RNA jsou označena jako oranžové kroužky, podobně jako na obrázku č. 4A a byly stanoveny stejně, jak je zobrazeno na obrázku č. 6B.

(B) Obrázek zobrazuje polohu míst štěpení na 3',5' a 5',3' řetězci cílové RNA. Cílové sekvence RNA jsou stejné, jako se popisuje na obrázku č. 3B. Dvouřetězcová RNA (10 nM) se inkubovala s cílovou RNA po dobu 2,5 hodiny při teplotě 25 °C v lyzátu organismu *Drosophila*. Hlavní místa štěpení jsou označena horizontální šipkou a také jsou uvedeny na obrázku 6A. Oblast cílená dsRNA obsahující 52 párů bází je značena černými tlustými čarami na obou stranách gelu.

Obrázek č. 7 zobrazuje navržený model RNAi.

Předpokládá se, že RNAi začíná zpracováním dsRNA (3',5' řetězec je značen černě a 5',3' řetězec je značen červeně) na převládající krátké interferující RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů (siRNA). Nukleotidy krátkého přesahu 3'-konce, jestliže jsou přítomny v dsRNA, mohou být výhodné pro zpracování krátkých dsRNA. Proteiny zpracovávající dsRNA, které je nutné charakterizovat, jsou znázorněny jako zelené a modré ovály a jsou uspořádány v dsRNA asymetricky. V našem modelu tuto skutečnost znázorňuje navázání hypotetického modrého proteinu nebo oblasti proteinu na řetězec siRNA ve směru od 3' konce k 5' konci, zatímco hypotetický zelený protein nebo oblast proteinu se vždy váže na opačný řetězec siRNA. Tyto proteiny nebo sada zůstává spojena s duplexem siRNA a chrání jeho orientaci, jak se stanoví směrem zpracování dsRNA. Pouze sekvence siRNA spojená s modrým proteinem je schopna řídit štěpení cílové RNA. Endonukleázový komplex se popisuje jako malý interferující ribonukleoproteinový komplex nebo siRNP. Předpokládá se, že endonukleázy, které štěpí dsRNA mohou také štěpit cílovou RNA, pravděpodobně dočasným nahrazením pasivního řetězce siRNA, kterého nelze použít při rozeznávání cíle. Cílová RNA se pak štěpí v centru oblasti rozeznávané siRNA komplementární s uvedenou sekvencí.

Na obrázku č. 8 jsou zobrazeny konstrukce reportéru a duplexy siRNA.

(A) Na obrázku jsou zobrazeny oblasti reportního genu luciferázy světlušek (Pp-luc) a *Renilla reniformis* (Rr-luc) z plazmidů pGL2-Control, pGL3-Control a pRL-TK (od firmy Promega).
 5 Označeny jsou regulační elementy SV40, promotor thymidinové kinázy HSV a dva introny (čáry). Sekvence luciferázy GL3 je s 95 % shodná s GL2, ale oblast RL je zcela odlišná. Expres luciferázy z pGL2 je v transfekovaných savčích buňkách přibližně desetkrát menší než v případě luciferázy z pGL3. Oblast cílená duplexy siRNA je značena jako černá linka pod kódující oblastí genů luciferázy.

10 (B) Na obrázku jsou zobrazeny (horní) sekvence 3', 5' a 5', 3' řetězce (spodní) duplexů siRNA cílené na GL2, GL3 a RL luciferázy. Duplexy siRNA GL2 a GL3 se liší substitucí pouze 3 jednotlivých nukleotidů (v šedivém rámečku). Jako nespecifická kontrola se syntetizoval duplex s obrácenou sekvencí GL2 (invGL2). Přesah 3'konce obsahující 2 nukleotidy 2'-deoxytymidin je
 15 označen jako TT. uGL2 je podobná GL2 siRNA, ale obsahuje ribo-uridinové přesahy 3'-konce.

Na obrázku č. 9 je zobrazena interference RNA pomocí duplexů siRNA. Poměry cílové kontrolní luciferázy se normalizovaly vůči kontrolnímu pufru (sloupce označené bu a černé sloupce). Šedé
 20 sloupce značí poměry (Pp-luc) GL2 organismu *Photinus pyralis* nebo luciferáza GL3 *Renilla reniformis* (Rr-luc) (levá osa). Bílé sloupce indikují poměr RL ku GL2 ku GL3 (pravá osa). Panely a, c, e, g, a i popisují experimenty provedené v kombinaci plazmidu pGL2-Control a reportního plazmidu pRL-TK. Panely b, d, f, h, a i popisují experimenty provedené kombinací
 plazmidu pGL3-Control a reportního plazmidu pRL-TK. Buněčná linie používaná v případě
 25 experimentu interference je označena na vrcholu každého grafu. Poměry Pp-luc/Rr-luc v případě kontroly tvořené pufrem (bu) kolísá mezi 0,5 a 10 v případě pGL/pRL a mezi 0,03 a 1 v případě pGL/pRL před normalizací a mezi různými testovanými buněčnými liniemi. Vynesená data jsou průměrné hodnoty tří nezávislých experimentů $\pm$ standardní odchylka.

Na obrázku č. 10 jsou zobrazeny účinky siRNA obsahující 21 nukleotidu, dsRNA obsahující 50 a
 30 500 párů bází na expresi luciferázy v buňkách HeLa.

Přesná délka dsRNA je uvedena pod sloupci. Panely a, c a e popisují experimenty uskutečněné s
 plazmidem pGL2-Control a reportním plazmidem pRL-TK. Panely b, d a f popisují experimenty
 35 uskutečněné s plazmidem pGL2-Control a reportním plazmidem pRL-TK. Data jsou průměrné hodnoty dvou nezávislých experimentů $\pm$ standardní odchylka. Grafy (a), (b) zobrazují absolutní expresi Pp-luc, vynesenou v libovolných jednotkách luminiscence. Graf (c), (d) znázorňuje expresi vynesenou v libovolných jednotkách luminiscence. Graf (e), (f) znázorňuje poměr
 normalizovaného cíle ku kontrolní luciferáze. Poměry aktivity luciferázy v případě duplexů
 40 siRNA se normalizoval vůči kontrolnímu pufru (bu, černý sloupec). Poměry luminiscence v případě dsRNA obsahující 50 nebo 500 párů bází se normalizovaly vůči poměrům pozorovaným v případě dsRNA, která zahrnuje 50 a 500 bp, z humanizovaného GFP (hG, černé sloupce). Mělo by se poznamenat, že všechny rozdíly v sekvencích mezi dsRNA obsahující 49 a 484 párů bází cílící GL2 a GL3 nejsou dostatečné k propůjčení specifity mezi cíli GL2 a GL3 (v segmentu
 45 obsahujícím 49 párů bází se shoduje 43 nukleotidů, 239 nukleotidů se shoduje v segmentu obsahujícím 484 párů bází).

Obrázek č. 11 znázorňuje různé přesahy 3'-konce duplexů siRNA obsahující 21 nukleotidů.

(A) Návrh strategie experimentu. Obrázek znázorňuje polyadenylovanou cílovou mRNA s
 50 čepičkou a relativní polohy v 3',5' a 5',3'řetězci siRNA. Připravilo se osm sérií duplexů podle osmi různých 5',3' řetězců. Sekvence siRNA a počet přesahujících nukleotidů se měnil v krocích po jednom nukleotidu.

(B) Obrázek znázorňuje normalizovanou relativní luminiscenci cílové luciferázy (*Photinus pyralis*, Pp-luc) vůči kontrolní luciferáze (*Renilla reniformis*, Rr-luc) v lyzátu embryí organismu

D. melanogaster v přítomnosti 5 nM dsRNA s tupými konci. Poměry luminiscence stanovené v přítomnosti dsRNA se normalizovaly vůči poměru získanému pro kontrolní pufr (bu, černý sloupec). Normalizované poměry menší než 1 indikují specifickou interferenci. Obrázky (c) až (j) znázorňují poměry normalizované interference osmi sérií duplexů siRNA obsahujících 21 nukleotidů. Sekvence duplexů siRNA je znázorněna shora v textu ve sloupcových grafech. Každý panel ukazuje poměr interference v případě sady duplexů tvořených daným 5',3'řetězcem siRNA a pěti různými 3',5'řetězci siRNA. Počet přesahujících nukleotidů (přesahy na 3'-konci, pozitivní čísla, přesahy na 5'-konci, negativní čísla) jsou označeny na ose x. Vynesená data jsou průměrem alespoň 3 nezávislých experimentů. Chyby reprezentují standardní odchylky.

Obrázek č. 12 znázorňuje variace délky 3',5'řetězce duplexů siRNA.

Obrázek (A) znázorňuje experiment. Tři 5',3'řetězce obsahující 21 nukleotidů se párují s osmi 3',5'řetězci siRNA. V případě siRNA se změnila délka jejich 3'-konce. Přesah 3'-konce 5',3'řetězce siRNA tvoří 1 nukleotid (B), 2 nukleotidy (C) nebo 3 nukleotidy (D), zatímco přesah 3',5'řetězce siRNA se mění v případě každé série. Jsou označeny sekvenční duplexy siRNA a odpovídající poměry interference.

Obrázek č. 13 znázorňuje variace délky duplexů siRNA s chráněnými přesahy 3'-konce obsahující 2 nukleotidy.

Obrázek (A) znázorňuje experiment. Duplex siRNA obsahující 21 nukleotidů vykazuje shodnou sekvenci se sekvencí zobrazenou na obrázku č. 11H nebo 12C. Duplexy siRNA se prodloužily na 3'-konci 3',5'řetězce siRNA (B) nebo na 5'-konci 3',5'řetězce siRNA (C).

Obrázek č. 14 znázorňuje substituci 2'-hydroxylových skupin ribózových zbytků siRNA.

2'-hydroxylové skupiny (OH) v řetězcích duplexů siRNA se nahradily 2'-deoxyskupinou označenou (d) nebo 2'-O-metylovou skupinou označenou (Me). 2'-deoxysubstituce 2 a 4 nukleotidů na 3'-koncích jsou označeny jako 2-nt d respektive 4-nt d. Zbytek uridinu je nahrazen 2'-deoxytymidinem.

Obrázek č. 15 zobrazuje mapování štěpení 3',5' a 5',3'řetězců cílové RNA duplexy siRNA obsahujícími 21 nukleotidů s přesahy na 3'-konci obsahujícími 2 nukleotidy.

(A) Grafické znázornění 3',5' a 5',3'řetězců RNA a duplexů siRNA s čepičkou značenou ^{32}P (hvězdička). Poloha štěpení 3',5' a 5',3'řetězců cílové RNA je označena trojúhelníky nad a pod duplexy siRNA.

(B) Mapování míst štěpení cílové RNA. Po dvou hodinách inkubace 10 nM cílové nukleové kyseliny se 100 nM duplexem siRNA v lyzátu embryí organismu D. melanogaster se substrát značený na 5'-konci čepičkou a produkty štěpení na 5'-konci rozdělily v sekvenačních gelech. Markery délky se vytvořily částečným štěpením za použití RNázy T1 (T1) a částečnou alkalickou hydrolýzou (OH⁻) cílové RNA. Tlusté čáry na levé straně znázorňují oblast krytou řetězcem siRNA 1 a 5 se stejnou orientací jako je cíl.

Obrázek č. 16 znázorňuje 5'-konec řídicí siRNA, který definuje polohu štěpení cílové RNA.

Obrázky (A), (B) znázorňují strategii experimentu. 5',3'řetězec siRNA byl stejný jako ve všech duplexech siRNA, ale počet nukleotidů v 3',5' řetězci kolísal mezi 18 až 25 podle změn 3'-konce (A) nebo mezi 18 až 23 nukleotidy při změnách 5'-konce (B). Poloha štěpení na 3',5' a 5',3'řetězcích cílové RNA je označena trojúhelníky nad a pod duplexy siRNA. Obrázek (C) a (D) zobrazuje analýzu štěpení cílové RNA za použití 3',5' (horní panel) nebo 5',3' řetězce (spodní panel) cílové RNA značené čepičkou. Jsou zobrazeny pouze produkty štěpení na 5'-konci značené čepičkou. Jsou označeny sekvenční duplexy a délka 3',5' řetězců siRNA je uvedena v

horní části panelu. Kontrolní dráha značená čárkami v panelu (C) ukazuje cílovou RNA inkubovanou v nepřítomnosti siRNA. Použité markery jsou ty popsané na obrázku č. 15. Šipky ve spodní části panelu D ukazují místa štěpení cílové RNA, které se liší o jeden nukleotid.

- 5 Obrázek č. 17 zobrazuje variace sekvence přesahu 3'-konce duplexů siRNA. Přesah na 3'-konci tvořený 2 nukleotidy (NN, v šedé barvě) se změnil sekvencí a uspořádáním, jak je uvedeno (T, 2'-deoxytymidin, dG, 2'-deoxyguanosin, hvězdička, duplex siRNA divokého typu). Normalizované poměry interferencí se stanovily způsobem popsaným na obrázku č. 11. Sekvence divokého typu je stejná, jako je znázorněno na obrázku č. 14.

10

Obrázek č. 18 znázorňuje sekvenční specifitu rozeznávání cíle. Sekvence nesprávně párovaných duplexů siRNA, upravených segmentů sekvence nebo jednotlivých nukleotidů jsou podtrženy šedou barvou. Referenční duplex (ref) a duplexy siRNA 1 až 7 obsahují 2'-deoxytymidinové přesahy v délce 2 nukleotidů. Účinnost deaktivace referenčního duplexu upraveného tymidinem je srovnatelná se sekvencí divokého typu (obrázek č. 17). Normalizované poměry interference jsou stejné jako ty uvedené na obrázku č. 11.

15

Obrázek č. 19 znázorňuje variace délky duplexů siRNA se zachovanými přesahy na 3'-konci obsahujícími 2 nukleotidy.

20

Duplexy siRNA se prodloužily ve směru 3'-konce 3', 5'konce siRNA (A) nebo ve směru 5'-konce 3',5'řetězce siRNA (B). Označeny jsou sekvence duplexu siRNA a poměry interference. V případě buněk HeLa SS6 se duplexy siRNA (v množství 0,84 µg) cílených na luciferázu GL2 transfekovaly spolu s plazmidy pGL2-Control a pRL-TK. Za účelem porovnání se označily aktivity RNAi in vitro duplexů siRNA testovaných v lyzátu organismu *D. melanogaster*.

25

Příklady uskutečnění vynálezu

- 30 Příklad 1: Interference RNA zprostředkovaná malými syntetickými RNA

1.1. Experimentální postupy

1.1.1 RNAi in vitro

35

RNAi in vitro a příprava lyzátů se provedly postupem popsaným dříve v textu (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999) . Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197, Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Důležité je použití čerstvě rozpuštěné kreatinové kinázy (od firmy Roche) pro optimální regeneraci ATP. Testy translace RNAi (Obrázek č. 1) se provedly s dsRNA v koncentraci 5 nM. Prodloužila se doba pre-inkubace na 15 minut, probíhá při teplotě 25 °C a pak se přidala in vitro transkribovaná, polyadenylovaná mRNA Pp-luc s čepičkou a reportní mRNA Rr-luc. Inkubace pokračovala po dobu jedné hodiny a analyzovalo se relativní množství proteinu Pp-luc a Rr-luc za použití duálního luciferázového testu (od firmy Promega) a luminometru Monolight 3010C (PharMingen).

40

45

1.1.2 Syntéza RNA

50

Za účelem in vitro transkripce RNA z PCR templátů, které nesou promotorové sekvence T7 nebo SP6 (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (1998). Selection in vitro of novel ribozymes from a partially randomized U2 and U6 snRNA library. *EMBO J.* 17, 2637–2650) se použily standardní postupy. Syntetická RNA se připravila použitím fosforamiditů

expediční RNA (od firmy Proligo). Oligonukleotidový 3'adaptér se syntetizoval za použití dimetoxytrityl–1,4–benzendimetanolsukcinylinopropyl–CPG.

5 Z oligoribonukleotidů se odstranila ochrana ve 3 ml 32% směsi amoniak/etanol (v poměru 3/1) po dobu 4 hodin při teplotě 55 °C (expediční RNA) nebo po dobu 16 hodin při teplotě 55 °C (chimérické oligonukleotidy 3'a 5'adaptorové DNA/RNA) a pak se odstranil silyl a provedla se izolace na gelu, jak se popisuje v publikaci Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benseler, F., and Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658–11668. Transkripty RNA pro
10 přípravu dsRNA zahrnující dlouhé přesahy 3'–konce se vytvořily z PCR templátu, který obsahoval promotor T7 ve směru 3'–5' a promotor SP6 ve směru 5'–3'. Templáty transkripce pro 3',5' a 5',3'řetězce cílové RNA se amplifikovaly za použití 5'–primeru GCGTAATACGACTCACTATAG AACAAATTGCTTTTACAG (podtržený promotor T7) a 3'–primeru ATTTAGGTGACACTATAGGCATAAAGAATTGAAGA (podtržený promotor SP6) a
15 linearizovaný plazmid Pp–luc (sekvence pGEM–luc) se použil jako templát (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double–stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197). 3',5'řetězec RNA přepsaný pomocí T7 obsahoval 177 nukleotidů se sekvencí Pp–luc mezi pozicemi 113 a 273 vztaheno ke startovacímu kodonu a pak následuje 17 nukleotidů doplňku
20 sekvence promotoru SP6 na 3'–konci. Transkripty pro přípravu dsRNA s tupým koncem se připravily transkripcí ze dvou různých produktů PCR, které obsahují pouze jedinou promotorovou sekvenci.

Teplotní hybridizace dsRNA se provedla za použití extrakce směsí fenol/chloroform. Ekvimolární koncentrace 3',5' řetězce a 5',3' řetězce RNA (50 nM až 10 μM v závislosti na délce a dostupném množství) v 0,3 M NaOAc (pH 6) se inkubovaly po dobu 30 sekund při teplotě 90 °C a pak se extrahovala při teplotě místnosti se stejným objemem směsi fenol/chloroform a pak následuje extrakce chloroformem, aby se odstranil zbytkový fenol. Výsledná RNA se srážela
25 přidáním 2,5 až 3 objemů etanolu. Pelet se rozpustil v lyzačním pufru (100 mM KCl, 30 ml HEPES–KOH, pH 7,4, 2 mM Mg(OAc)₂ a kvalita dsRNA se ověřila standardní elektroforézou na agarózovém gelu v 1x koncentrovaném pufru TAE. Dvouřetězcová RNA obsahující 52 párů bází s přesahy 3'–konců, které obsahují 17 a 20 nukleotidů (obrázek č. 6) se teplotně hybridizovaly inkubací po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C. Směs se pak rychle ochladila na teplotu 70 °C a
30 nechala se pomalu chladnout na teplotu místnosti po dobu 3 hodin (50 μl reakci pro teplotní hybridizaci, řetězec v koncentraci 1 μM, 300 mM NaCl, 10 mM Tris–HCl, pH 7,5). Dvouřetězcová RNA se pak extrahovala ve směsi fenol/chloroform, srážela se etanolem a rozpustila se v lyzačním pufru.

Transkripce RNA, která je vnitřně radioaktivně značená pomocí ³²P a používá se pro přípravu dsRNA (obrázky č. 2 a 4), se provedly za použití 1mM ATP, CTP, GTP, 0,1 nebo 0,2 mM UTP a
40 0,2 až 0,3 μM ³²P–UTP (3000 Ci/mmol) nebo příslušného poměru vhodného pro radioaktivně značený nukleosidtrifosfát jiný než UTP. Značení cílových RNA čepičkou se uskutečnilo způsobem popsaným shora v textu. Pak se cílová RNA čistila na gelu.

45 1.1.3 Mapování míst štěpení

Standardní reakce RNA se provedly pre–inkubací 10 nM dsRNA po dobu 15 minut. Pak následuje přidání 10 nM cílové RNA značené čepičkou. Reakce se zastavila po uplynutí dalších 2
50 hodin (obrázek č. 2A) nebo 2,5 hodin inkubace (obrázek č. 5B a 6B) s porteinázou K (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double–stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197). Vzorky se pak analyzovaly na 8% nebo 10% sekvenačním gelu. Duplexy syntetické RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů se použily v konečné koncentraci 100 nM (zobrazeno na obrázku č. 5B).

55

1.1.4 Klonování RNA obsahující přibližně 21 nukleotidů

RNA obsahující 21 nukleotidů se připravila inkubací radioaktivně značené dsRNA v lyzátu organismu *Drosophila* v nepřítomnosti cílové RNA (objem reakční směsi je 200 μ l, doba inkubace 1 hodina, 50 nM dsP111 nebo 100 nM dsP52 nebo dsP39). Reakční směs se následně ošetřila proteinázou K (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197) a produkty zpracování dsRNA se oddělily na denaturačním 15% polyakrylamidovém gelu. Vyřízl se pruh zahrnující rozmezí velikostí alespoň 18 až 24 nukleotidů, eluoval se do 0,3 M NaCl v zkumavce potažené silikonem při teplotě 4 °C přes noc. RNA se získala srážením etanolem a defosforylovala se (objem reakční směsi je 30 μ l, doba inkubace je 30 minut, teplota reakce je 50 °C a použilo se 10 jednotek alkalické fosfatázy od firmy Roche). Reakce se zastavila extrakcí směsí fenol/chloroform a RNA se pak srážela etanolem. Oligonukleotid 3'adaptoru (pUUUaaccgcaccccttcx: velká písmena, RNA; malá písmena, DNA; p, fosfát; x, 4-hydroxymetylbenzyl) se pak ligoval do defosforylované RNA obsahující přibližně 21 nukleotidů (objem reakční směsi je 20 μ l, trvání reakce je 30 minut, teplota reakce je 37 °C, použil se 3'adaptér v koncentraci 5 μ M, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM ATP, 0,1 mg/ml acetylované BSA, 15 % DMSO, 25 jednotek RNA ligázy T4 (od firmy Amersham-Pharmacia) (popisuje se v publikaci Pan, T. and Uhlenbeck, O. C. (1992). In vitro selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb²⁺. *Biochemistry* 31, 3887–3895). Ligační reakce se zastavila přidáním stejného objemu směsi 8 M močoviny/50 mM EDTA a nanesla se přímo do 15% gelu. Výtěžek ligace byl vyšší než 50 %. Produkt ligace se získal z gelu a jeho 5'-konec se fosforyloval (objem reakce je 20 μ l, reakční doba je 30 minut, reakční teplota je 37 °C, použil se 2mM ATP, 5 jednotek T4 polynukleotidové kinázy, NEB). Fosforylační reakce se zastavila extrakcí směsí fenol/chloroform a RNA se získala srážením v etanolu. 5'adaptér (tactaatacgactcactAAA: velká písmena RNA; malá písmena, DNA) se ligoval do fosforylovaného ligačního produktu, jak se popisuje shora v textu. Nový ligační produkt se čistil na gelu a eluoval se z proužků gelu v přítomnosti primeru pro reverzní transkripci (GACTAGCTGGAATTCAAGGATGCGGTAAA: výrazněné je místo rozeznávané restrikčním enzymem Eco RI) užívaného jako nosič. Po reverzní transkripci (objem reakční směsi je 15 μ l, reakční doba je 30 minut, reakční teplota je 42 °C, použilo se 150 jednotek reverzní transkriptázy Superscript II od firmy Life Technologies) následuje PCR používající jako 5' primer sekvenci CAGCCAACGGAATTCATACGACTCACTAAA (zvýrazněné je místo rozeznávané restrikčním enzymem Eco RI) a 3'RT primer. Produkt PCR se čistil extrakcí směsí fenol/chloroform a pak se srážel etanolem. Produkt PCR se pak štěpil restrikčním enzymem Eco RI (NEB), za použití T4 DNA ligázy vznikaly konkatamery (ve vysoké koncentraci, NEB). Konkátamery v rozmezí velikostí 200 až 800 párů bází se oddělily na agarózovém gelu s nízkou teplotou tání. Z gelu se získaly standardní metodou roztavení gelu a fenolovou extrakcí a srážely se etanolem. Nespárované konce se vyplnily inkubací s Taq polymerázou za standardních podmínek po dobu 15 minut při teplotě 72 °C a produkt DNA se přímo ligoval do vektoru pCR2.1-TOPO za použití klonovací sady TOPO TA (Invitrogen). Kolonie se hodnotily za použití PCR a M13-20 a M13 reverzních sekvenčních příměrů. Produkty PCR se přímo sekvenovaly (sekvenování se provedlo na zakázku v instituci Sequence Laboratories Gottingen GmbH, Německo). Jeden klon v průměru obsahoval 4 až 5 21-merných sekvencí.

1.1.5 Analýza 2D-TLC

Štěpení nukleázou P1 radioaktivně značené na gelu izolované siRNA a analýza 2D-TLC se provedla způsobem popsáným v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33. Štěpení nukleázou T2 se provedlo v reakčním objemu 10 μ l při teplotě 50 °C po dobu 3 hodiny v 10 mM acetátu sodném (hodnota pH je 4,5) za použití tRNA v koncentraci 2 μ g/ μ l a 30 jednotek ribonukleázy T2 (od firmy Life Technologies). Migrace neradioaktivně značených standardů se stanovila stíněním UV záření. Identita nukleosid-3',5'-difosfátů se potvrdila společnou migrací produktů štěpených T2 se standardy

připravenými 5'-³²P-fosforylací běžných nukleosid-3'-monofosfátů za použití γ -³²P-ATP a polynukleotidové kinázy T4 (data nejsou uvedena).

1.2 Výsledky a diskuze

1.2.1 Požadavky délky při zpracování dsRNA na fragmenty RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů

Lyzáty připravené ze syncytiálních embryí organismu *D. melanogaster* umožňují RNAi in vitro a poskytují nový nástroj biochemické analýzy mechanismu RNAi (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33 a Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197). Analýza in vitro a in vivo požadavků na délku dsRNA pro RNAi ukázala, že krátké dsRNA (kratší než 150 párů bází) jsou méně účinné než delší dsRNA při degradaci cílové mRNA (popisuje se v publikaci Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference, *gene* 252, 95–105, Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296, Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14687–14692 a Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197). Důvody snížené účinnosti při redukci mRNA nejsou známy. Proto se testovaly přesné požadavky na délku dsRNA při degradaci cílové RNA za optimalizovaných podmínek v lyzátu organismu *Drosophila* (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Syntetizovalo se několik sérií dsRNA a směřují se proti reportní RNA luciferáze světlušek (Pp-luc). Specifické potlačení exprese cílové RNA se sledovalo duálním luciferázovým testem (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197) (zobrazeno na obrázku č. 1A a 1B). Detekovala se specifická inhibice exprese cílové RNA v případě dsRNA, která obsahuje 38 párů bází. Dvouřetězcová RNA obsahující 29 až 36 párů bází není v tomto procesu účinná. Účinek nezávisí na cílové poloze a stupni inhibice exprese mRNA Pp-luc vztaheném k délce dsRNA. To znamená, že dlouhá dsRNA je účinnější ve srovnání s krátkou dsRNA.

Naznačuje se, že fragmenty RNA obsahující 21 až 23 nukleotidů vytvořené zpracováním dsRNA jsou mediátory interference RNA a ko-suprese (popisuje se v publikaci Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small anti-sense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 86, 950–952, Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296 a Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Proto se analyzovala rychlost tvorby fragmentů obsahující 21 až 23 nukleotidů pro sadu dsRNA, které obsahují 501 až 29 párů bází. Tvorba fragmentů obsahujících 21 až 23 nukleotidů v lyzátu organismu *Drosophila* (zobrazeno na obrázku č. 2) byla snadno detekovatelná v případě dsRNA obsahující 30 až 501 párů bází, ale byla podstatně prodloužena v případě dsRNA obsahující 29 párů bází. Toto pozorování odpovídá úloze fragmentů obsahujících 21 až 23 nukleotidů při řízení štěpení mRNA a poskytuje vysvětlení nedostatečné RNAi v případě dsRNA obsahující 30 párů bází. Závislost tvorby 21 až 23-méru na délce, pravděpodobně odráží biologicky relevantní řídicí mechanismus prevence nežádoucí aktivace RNAi krátkými intramolekulárními strukturami založeným na párování bází normální buněčné RNA.

1.2.2 Dvouřetězcová RNA obsahující 39 párů bází zprostředkovává štěpení cílové RNA v jediném místě

- Přidání dsRNA a cílové RNA, která obsahuje na svém 5'-konci čepičku, do lyzátu organismu *Drosophila* vede ke sekvenčně specifické degradaci cílové RNA (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197). Cílová mRNA se štěpí pouze v oblasti identity s dsRNA. Řada cílových míst štěpení se oddělilo fragmenty obsahujícími 21 až 23 nukleotidů (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Očekávalo se, že počet míst štěpení v případě dané dsRNA zhruba odpovídá délce dsRNA děleno 21. Mapovaly se cílová místa štěpení na pozitivní a negativní cílové RNA, která je radioaktivně značena na čepičce (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33) (zobrazeno na obrázcích 3A a 3B). Stabilní produkty štěpení na 5'-konci se oddělily na sekvenčním gelu a polohy míst štěpení se určily porovnáním s žebříčkem vzniklým částečným štěpením RNázou T1 a alkalickou hydrolýzou cílové RNA.
- V souladu s předchozím pozorováním (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33) všechna místa štěpení cílové RNA se nacházejí v oblasti identity s dsRNA. 3',5' nebo 5',3'řetězec cílové nukleové kyseliny se štěpil pouze jednou pomocí dsRNA, která obsahuje 39 párů bází. Každé místo štěpení se nachází 10 nukleotidů od 5'konce oblasti, kterou překrývá dsRNA (zobrazeno na obrázku č. 3B). Dvouřetězcová RNA obsahující 52 párů bází, která sdílí stejný 5'-konec s dsRNA obsahující 39 párů bází, produkuje vedle dvou míst slabšího štěpení, která leží 21 a 24 nukleotidů downstream od prvního místa, stejné místo štěpení na 3',5'řetězci cíle lokalizované v poloze 10 nukleotidů vzdálené od 5'-konce oblasti shodné s dsRNA. Nesmyslný cíl se štěpil pouze jednou opět v místě vzdáleném 10 nukleotidů od 5'-konce oblasti pokryté dsRNA. Mapování míst štěpení v případě dsRNA obsahující 38 až 49 párů bází je zobrazeno na obrázku č. 1 a ukazuje, že první a převládající místo štěpení se také nachází 7 až 10 nukleotidů downstream od oblasti pokryté dsRNA (data nejsou zobrazena). To naznačuje, že místo štěpení cílové RNA je stanoveno koncem dsRNA a je možné předpokládat, že zpracování 21 až 23-měru začíná od konců duplexu.

- Místa štěpení 3',5' a 5',3' řetězců cíle v případě dsRNA obsahující 111 párů bází jsou daleko častější, než se očekávalo, a většina z nich se vyskytuje v blocích oddělených 20 až 23 nukleotidy (zobrazeno na obrázku č. 3A a 3B). V případě kratší dsRNA první místo štěpení na 3',5'řetězci cíle je 10 nukleotidů od 5'-konce oblasti pokryté dsRNA a první místo štěpení na 5',3' řetězci cíle se nachází 9 nukleotidů od 5'-konce oblasti pokryté dsRNA. Není jasné, co způsobuje toto nepravidelné štěpení. Jednou možností vysvětlení je, že delší dsRNA se zpracovává ne pouze od konce, ale také od prostředku, nebo existují některé determinanty specifity zpracování dsRNA, které nejsou zcela známy. Dříve se také zmiňovaly některé nepravidelnosti obsahující 21 až 23 nukleotidů (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Aby se lépe porozumělo molekulárním základům zpracování dsRNA a rozeznávání cílové RNA, analyzovaly se sekvence fragmentů obsahující 21 až 23 nukleotidů zpracováním dsRNA obsahující 39, 52 a 111 párů bází v lyzátu organismu *Drosophila*.

1.2.3 Dvouřetězcová RNA se zpracovává za vzniku RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů mechanismem podobným štěpení RNázou III

Za účelem charakterizovat fragmenty RNA obsahující 21 až 23 nukleotidů se testovaly 5' a 3'-konce fragmentů RNA. Oxidace jodistanem RNA izolovaných gelem obsahující 21 až 23 nukleotidů následovaná β -eliminací indikovala přítomnost terminálních 2' a 3'-hydroxylových skupin. 21 až 23-mery také odpovídají na aplikaci alkalické fosfatázy, což indikuje přítomnost fosfátové skupiny na 5'-konci. Přítomnost fosfátu na 5'-konci a hydroxylu na 3'-konci naznačuje, že dsRNA by mohla být zpracovávána enzymatickou aktivitou podobnou RNáze III organismu *E. coli* (popisuje se v publikaci Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. In the enzymes, vol 15, part B, P. D. Boyer ed. (New York: Academic Press), pp. 485–499, Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonuclease. FEMS Microbiol. Rev. 23, 371–390, Robertson, H. D. (1990). Escherichia coli ribonuclease III. Methods Enzymol. 181, 189–202, Robertson, H. D. (1982). Escherichia coli ribonuclease III cleavage sites. Cell 30, 669–672).

Řízené klonování fragmentů RNA obsahující 21 až 23 nukleotidů se provedlo ligací nukleotidu 3' a 5'adaptoru k izolovaným 21 až 23-měrům za použití T4 RNA ligázy. Ligační produkty se reverzně přepsaly, amplifikovaly se pomocí PCR, konkatamerizovaly se, klonovaly se a sekvenovaly se. Sekvenovalo se více jak 220 RNA, které se získaly zpracováním dsRNA obsahujících 39, 53 a 111 párů bází (zobrazeno na obrázku č. 4A). Zjistilo se, že rozložení délek je následující: 1 % 18 nukleotidů, 5 % 19 nukleotidů, 12 % 20 nukleotidů, 45 % 21 nukleotidů, 28 % 22 nukleotidů, 6 % 23 nukleotidů a 2 % 24 nukleotidů. Analýza sekvence 5'-terminálních nukleotidů zpracovávaných fragmentů ukázala, že oligonukleotidy s 5' guanosinem jsou zastoupeny méně často. Tento trend s největší pravděpodobností způsobuje RNA ligáza T4, která potlačuje 5' fosforylovaný guanosin, jako donorový oligonukleotid. Na 3'-konci se nepozoroval žádný podstatný trend, co se týká zastoupení sekvencí. Řada fragmentů obsahujících přibližně 21 nukleotidů získaných z 3'-konců pozitivního nebo negativního řetězce duplexů zahrnují 3' nukleotidy, které se získaly adicí nukleotidů během syntézy RNA za použití RNA polymerázy T7. Také se klonoval podstatný počet endogenních RNA organismu *Drosophila* obsahující přibližně 21 nukleotidů, některé z nich pochází z retrotranspozonů LTR a z transpozonů, které nejsou z LTR (data nejsou zobrazena). To odpovídá možné úloze RNAi při deaktivaci transpozonů.

RNA obsahující 21 nukleotidů se objevují v klustrovaných skupinách (zobrazeno na obrázku č. 4A), které překrývají celé sekvence dsRNA. Reakce zjevně štěpí dsRNA, přičemž zanechává uspořádané 3'-konce, což je další charakteristika štěpení RNázou III. V případě dsRNA o velikosti 39 párů bází se našli dva bloky RNA obsahující přibližně 21 nukleotidů z každého řetězce skládajícího se z dsRNA zahrnující překrývající se 3'-konce. Jestliže fragmenty obsahující přibližně 21 nukleotidů byly přítomny jako jednořetězcové řídicí RNA v komplexu, který zprostředkovává degradaci mRNA, je možné předpokládat, že existují alespoň dvě cílená místa štěpení. Což není tento případ. To naznačuje, že RNA obsahující přibližně 21 nukleotidů může být přítomna ve formě dvouřetězcové RNA v endonukleázovém komplexu, ale pouze jeden z řetězců se může použít pro rozeznávání a štěpení cílové RNA. Použití pouze jednoho z řetězců obsahujícího 21 nukleotidů pro cílené štěpení může být jednoduše určeno orientací, ve které je duplex obsahující 21 nukleotidů vázán k nukleázovému komplexu. Tato orientace je definována směrem, ve kterém se zpracovává původní dsRNA.

Klustery obsahující 21-mery pro dsRNA obsahující 52 párů bází a 111 párů bází jsou méně dobře definované, když se porovnávají s dsRNA obsahujícími 39 párů bází. Clustery jsou rozprostřeny do oblasti obsahující 25 až 30 nukleotidů, které s největší pravděpodobností reprezentují několik odlišných subpopulací duplexů obsahujících přibližně 21 nukleotidů, a proto řídí štěpení v několika místech, které leží blízko sebe. Tyto oblasti štěpení jsou stále odděleny intervaly 20 až 23 nukleotidů. Pravidla určující, jak je možné zpracovat běžnou dsRNA na fragmenty obsahující 21 nukleotidů, nejsou ještě známa, ale už se pozorovalo, že místa štěpení obsahující přibližně 21 až 23 nukleotidů je možné změnit za použití uridinů (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25–33). Specifita štěpení dsRNA pomocí RNázy III organismu *E. coli* se jeví být

hlavně řízena antideterminanty. To znamená, že jsou vyloučeny některé specifické páry bází v daných polohách vztažených k místu štěpení (popisuje se v publikaci Zhang, K., and Nicholson, A. W. (1997). Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13437–13441).

5

Aby se testovalo, zda ve zpracovaných fragmentech RNA obsahujících přibližně 21 nukleotidů jsou přítomny úpravy cukerné složky, báze nebo čepičky, inkubovaly se radioaktivně značené dsRNA Pp-luc obsahující 505 párů bází v lyzátu po dobu jedné hodiny, izolovaly se produkty obsahující přibližně 21 nukleotidů a štěpily se nukleázou P1 nebo T2 na mononukleotidy. Směs nukleotidů se pak analyzovala chromatografií 2D na tenké vrstvě (zobrazeno na obrázku č. 4B). Jak se ukázalo, na základě štěpení pomocí P1 nebo T2, nebyl upraven žádný ze čtyř přirozených ribonukleotidů. Dříve se analyzovala přeměna adenosinu na inozin ve fragmentech obsahujících přibližně 21 nukleotidů (po 2 hodinách inkubace) a detekoval se malý rozsah deaminace (menší než 0,7 %) (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Kratší inkubace v lyzátu (1 hodina) redukovala tuto inosinovou frakci na sotva detekovatelnou hladinu. RNáza T2, která štěpí 3'-konec fosfodiesterové vazby, produkovala nukleosid-3'-fosfát a nukleosid-3',5'-difosfát, čímž se indikuje přítomnost monofosfátu na 5'-konci. Detekovaly se všechny čtyři nukleosid-3',5'-difosfáty a naznačuje se, že internukleotidová vazba byla štěpena s malou nebo žádnou sekvenční specifikou. Lze shrnout, že fragmenty obsahující přibližně 21 nukleotidů nejsou upraveny a vytvořily se z dsRNA tak, že 5'-monofosfáty a 3'-hydroxyly byly přítomny na 5'-konci.

15

20

25

1.2.4 Štěpení cílové RNA zprostředkované syntetickými RNA, které obsahují 21 a 22 nukleotidů

25

Analýza produktů zpracování dsRNA ukazuje, že fragmenty obsahující přibližně 21 nukleotidů jsou vytvořeny reakcí se všemi charakteristikami štěpení RNázou III (popisuje se v publikaci Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. In the enzymes, vol 15, part B, P. D. Boyer ed. (New York: Academic Press), pp. 485–499, Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonuclease. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371–390, Robertson, H. D. (1990).

30

Escherichia coli ribonuclease III. *Methods Enzymol.* 181, 189–202, Robertson, H. D. (1982). *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell* 30, 669–672). RNáza III štěpí oba řetězce dsRNA, přičemž vznikají dva přesahy na 3' koncích obsahující přibližně 2 nukleotidy. Chemicky se syntetizovaly RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů, jejichž sekvence je shodná s některým z klonovaných fragmentů obsahující přibližně 21 nukleotidů a testovala jejich schopnost zprostředkovat degradaci cílové RNA (zobrazeno na obrázcích č. 5A a 5B). Duplexy RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů se inkubovaly v koncentracích 100 nM v lyzátu v desetkrát vyšších koncentracích než kontrolní dsRNA obsahující 52 párů bází. Za uvedených podmínek štěpení cílové RNA je snadno detekovatelné. Snížení koncentrace duplexů obsahujících 21 a 22 nukleotidů ze 100 nM na 10 nM stále způsobuje štěpení cílové RNA. Zvýšením koncentrace duplexů ze 100 nM na 1000 nM však dále nezvyšuje štěpení cíle, což je pravděpodobně způsobeno omezením proteinového faktoru v lyzátu.

35

40

Na rozdíl od dsRNA obsahující 29 nebo 30 párů bází, které nezprostředkovávají RNAi, dsRNA obsahující 21 a 22 nukleotidů s přesahem na 3'-koncích, jenž obsahují 2 až 4 nukleotidy, zprostředkovávají účinnou degradaci cílové RNA (duplexy 1, 3, 4, 6, zobrazeno na obrázku č. 5A a 5B). U dvouřetězcové RNA obsahující 21 nebo 22 nukleotidů s tupými konci (duplexy 2, 5 a 7, zobrazeno na obrázcích 5A a 5B) se redukovala její schopnost degradovat cíl a ukazuje se, že přesahující 3'-konce jsou důležité při rekonstituci komplexu RNA–proteinová nukleáza. Jednořetězcové přesahy mohou být nutné k dosažení navázání s vysokou afinitou duplexu, který obsahuje přibližně 21 nukleotidů, na složky proteinu. Fosfát na 5'-konci, ačkoliv je přítomen po zpracování dsRNA, není nutný pro zprostředkování štěpení cílové RNA a krátké syntetické RNA ho neobsahují.

55

Syntetické duplexy obsahující 21 a 22 nukleotidů, které řídí štěpení pozitivního stejně jako negativního cíle v oblasti pokryté krátkým duplexem. To je důležitý výsledek zvažující, že dsRNA obsahující 39 párů bází, která tvoří dva páry klustrů fragmentů obsahující přibližně 21 nukleotidů (zobrazeno na obrázku č. 2), štěpí 3',5' nebo 5',3' řetězec cíle pouze jednou nebo dvakrát. Tento výsledek se dá interpretovat tak, že pouze jeden ze dvou řetězců přítomný v duplexu obsahujícím 21 nukleotidů je schopen řídit štěpení cílové RNA a orientace duplexu obsahujícího přibližně 21 nukleotidů v nukleázovém komplexu se stanoví počátečním směrem zpracování dsRNA. Prezentace už správně zpracovaného duplexu obsahujícího přibližně 21 nukleotidů systému *in vitro* však neumožní tvorbu aktivního nukleázového komplexu specifického pro sekvenci se dvěma možnými orientacemi symetrického duplexu RNA. To vede ke štěpení 3',5' řetězce stejně jako 5',3' řetězce cíle v oblasti identity s duplexem RNA obsahujícím 21 nukleotidů.

Místo štěpení cíle se nachází 11 nebo 12 nukleotidů downstream od prvního nukleotidu, který je komplementární s řídící sekvencí obsahující 21 nebo 22 nukleotidů. To znamená že místo štěpení je blízko středu oblasti pokryté RNA obsahující 21 nebo 22 nukleotidů (zobrazeno na obrázcích č. 4A a 4B). Nahrazení 3',5' řetězce duplexu obsahujícího 22 nukleotidů dvěma nukleotidy (porovnání duplexů 1 a 3 na obrázku č. 5A) nahradilo místo štěpení pouze 5',3' řetězce dvěma nukleotidy. Nahrazení 3',5' a 5',3' řetězce dvěma nukleotidy posunulo obě místa štěpení o dva nukleotidy (porovnání duplexů 1 a 4). Předpokládá se, že bude možné navrhnout pár RNA obsahující 21 nebo 22 nukleotidů, aby štěpily cílovou RNA skoro v libovolné dané poloze.

Specifita štěpení cílové RNA řízeného RNA, která obsahuje 21 a 22 nukleotidů, se jeví být vysoká, protože se neobjevilo žádné jiné místo štěpení (zobrazeno na obrázku č. 5B). Mělo by se však poznamenat, že nukleotidy přítomné v přesahu 3'-konce duplexu RNA obsahujícím 21 a 22 nukleotidů mohou přispívat k rozeznávání substrátu méně než nukleotidy vyskytující se blízko místa štěpení. Tato skutečnost je založena na pozorování, že nukleotid blíže 3'-konce v přesahu na 3'-konci aktivních duplexů 1 nebo 3 (zobrazeno na obrázku č. 5A) není komplementární s cílem. Nyní je možné provést velmi snadno detailní analýzu specifity RNA za použití syntetických RNA obsahujících 21 a 22 nukleotidů.

Na základě důkazu, že syntetické RNA obsahující 21 a 22 nukleotidů s přesahujícími 3'konci zprostředkovávají interferenci RNA, se navrhl název RNA, které obsahují přibližně 21 nukleotidů, a to "krátké interferující RNA" nebo "siRNA" a pro komplex RNA–protein "krátká interferující ribonukleoproteinová částice" nebo siRNP.

1.2.5 Přesahy 3'-konce obsahující 20 nukleotidů v krátkých dsRNA inhibují RNAi

Ukázalo se, že zpracování krátkých dsRNA s tupým koncem se začíná na koncích. Během naší studie závislosti dsRNA při RNAi na délce se také provedla analýza dsRNA s přesahy na 3'-koncích, které obsahují 17 až 20 nukleotidů a zjistilo se, že jejich aktivita je nižší ve srovnání s dsRNA s tupými konci. Inhibiční účinek dlouhých 3'-konců se už popsal v případě dsRNA obsahujících až 100 párů bází, ale je méně dramatický v případě delších dsRNA. Účinek není způsoben nesprávným uspořádáním dsRNA, což se zjistilo na základě gelové analýzy (data nejsou uvedena). Testovalo se, zda inhibiční účinky dlouhých přesahujících 3'-konců by se mohly použít, jako nástroj při přímém zpracování dsRNA na pouze jeden ze dvou konců krátkého RNA duplexu.

Syntetizovaly se čtyři kombinace modelu dsRNA obsahující 52 párů bází s tupými konci, prodloužení 3'-konce pouze pozitivního řetězce, prodloužení 3'-konce pouze negativního řetězce a prodloužení 3'-konce obou řetězců, a po inkubaci v lyzátu se mapovala místa štěpení cílové RNA (zobrazeno na obrázku č. 6A a 6B). Když se prodloužil 3'-konec 5',3' řetězce duplexu, z 3',5' řetězce cíle se ztratilo první a převládající místo štěpení 3',5' řetězce cíle a naopak, když se prodloužil 3'-konec 3',5' řetězce duplexu ztratilo se silné štěpící místo 5',3' řetězce. Prodloužení 3'-konců obou řetězců vede k deaktivaci dsRNA obsahující 52 párů bází. Jedno vysvětlení

deaktivace dsRNA prodloužením 3'konce na přibližně 20 nukleotidů je existence proteinů, které se váží na jednořetězcovou RNA a které mohou interferovat s jedním z faktorů zpracování dsRNA na 3'–konci. Stejný výsledek se získal i v našem modelu, kde pouze jeden z řetězců duplexu siRNA v siRNP je schopen řídit štěpení cílové RNA. Orientace řetězce, který řídí štěpení RNA, se definuje směrem reakce zpracování dsRNA. Je pravděpodobné, že přítomnost upravených 3'–konců může umožnit uspořádání komplexu. Zablokování 3'–konce 3',5' řetězce umožní pouze zpracování dsRNA od protilehlého 3'–konce 5',3' řetězce. To naopak tvoří komplexy siRNP, ve kterých pouze 5',3'řetězec duplexu siRNA je schopen řídit štěpení 3',5' řetězce cílové RNA. Stejně to probíhá v opačné situaci.

Slabší inhibiční účinek dlouhého prodloužení 3'–konce v případě delších dsRNA (obsahují 500 párů bází nebo více, data nejsou uvedena) naznačuje, že dlouhá dsRNA může také obsahovat vnitřní signály zpracování dsRNA nebo se mohou zpracovat součinně na základě spojení více faktorů štěpení.

1.2.6 Model štěpení mRNA řízeného dsRNA

Na základě nových biochemických poznatků se vytvořil nový model znázorňující způsob cílení dsRNA na mRNA za účelem destrukce (zobrazeno na obrázku č. 7). Dvouřetězcová RNA se nejdříve zpracuje na krátké duplexy RNA s převládající délkou 21 a 22 nukleotidů a s upravenými 3'–konci. Tento způsob odpovídá reakci podobné působení RNázy III (popisuje se v publikaci Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. In the enzymes, vol 15, part B, P. D. Boyer ed. (New York: Academic Press), pp. 485–499, Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonuclease. FEMS Microbiol. Rev. 23, 371–390, Robertson, H. D. (1990). Escherichia coli ribonuclease III. Methods Enzymol. 181, 189–202, Robertson, H. D. (1982). Escherichia coli ribonuclease III cleavage sites. Cell 30, 669–672). Na základě délky fragmentů zpracované RNA, které obsahují 21 až 23 nukleotidů, se spekuluje, že aktivita podobná RNáze III se podílí na RNAi (popisuje se v publikaci Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235–238, Bosher, J. M. and Labouesse, M. (2000)). Tuto hypotézu dále podporuje skutečnost, že přítomnost 5'–fosfátů a 3 hydroxylů na koncích siRNA je možné také pozorovat u reakčních produktů RNázy III (popisuje se v publikaci Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. In the enzymes, vol 15, part B, P. D. Boyer ed. (New York: Academic Press), pp. 485–499, Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonuclease. FEMS Microbiol. Rev. 23, 371–390, Robertson, H. D. (1990). Escherichia coli ribonuclease III. Methods Enzymol.

181, 189–202). Ukázalo se, že bakteriální RNáza III a její eukaryontní homology Rntlp v organismu *S. cerevisiae* a PacIp v organismu *S. pombe* fungují při zpracování ribozomální RNA stejně dobře jako snRNA a snoRNA (popisuje se například v publikaci Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. (2000). Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* Rnase III. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3142–3147).

Pouze málo je známo o biochemii homologů RNázy III pocházející z rostlin, zvířat nebo člověka. Stanovily se dvě rodiny enzymů RNázy III převážně sekvenční analýzou za použití databáze nebo klonováním cDNA. První rodina RNáz III je reprezentována proteinem drosha organismu *D. melanogaster*, který obsahuje 1 327 aminokyselin (přístupové číslo AF116572). C–konec je tvořen se dvou oblastí RNáz III a jedné oblasti vázající se na dsRNA, přičemž funkce N–konce není známa. Blízké homology je také možné najít u organismu *C. elegans* (přístupové číslo AF160248) a u člověka (přístupové číslo AF189011) (popisuje se v publikaci Filippov, V., Solov'yev, V., Filippova, M., and Gill, S. S. (2000). A novel type of Rnase III family proteins in eukaryotes. Gene 245, 213–221, Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., and Crooke, S. T. (2000). Human Rnase III is a 160 kDa Protein Involved in Preribosomal RNA Processing. J. Biol. Chem. 275, 17171–17177). Lidská RNáza III podobná proteinu drosha se klonovala a charakterizovala (popisuje se v publikaci Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., and Crooke, S. T. (2000). Human Rnase III is a 160 kDa Protein Involved in Preribosomal RNA Processing. J. Biol. Chem. 275, 17171–17177). Gen se exprimuje

v lidských tkáních a buněčných liniích a protein se nachází v jádru a jadérku buněk. Na základě výsledků získaných ve studii nesmyslné inhibice, je možné naznačit úlohu tohoto proteinu při zpracování rRNA. Druhá třída je reprezentována genem K12H4.8 organismu *C. elegans* (přístupové číslo S44849) kódující protein obsahující 1 822 aminokyselin. Tento protein obsahuje

5 motiv helikázy N-konce RNA, po kterém následují 2 katalytické oblasti RNázy III a motiv vhodný pro navázání dsRNA, což odpovídá rodině RNázy III drosha. V organizmech, jako je *S. pombe* (přístupové číslo Q09884), *A. thaliana* (přístupové číslo AF187317), *D. melanogaster* (přístupové číslo AE003740) a člověka (AB028449) existují blízké homology (popisuje se v publikaci Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S. S. (2000). A novel type of Rnase

10 III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213–221, Jacobsen, S. E., Running, M. P., and M., M. E. (1999). Disruption of an RNA helicase/Rnase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126, 5231–5243, Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawwa, S., and Hamaguchi, M. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase.

15 *Biochim. Biophys. Acta* 31, 1–2). Komplex K12H4.8 RNáza III/helikáza je pravděpodobný kandidát, který se podílí na RNAi.

Genetické testování organismu *C. elegans* identifikovalo *rde-1* a *rde-4* jako podstatné při aktivaci RNAi, aniž dojde k účinku na mobilizaci nebo potlačení transpozónu (popisuje se v publikaci Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M. P., and Vileneuve, A. M. (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Dev.* 14, 1578–1583, Ketting, R., and Plasterk, R. H. (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296–298, Grishok, A., Tabara, H., and Mello, C. C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494–497,

20 Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123–132). Tyto skutečnosti vedou k vyslovení hypotézy, že tyto geny jsou důležité při zpracování dsRNA, ale nepodílejí se na degradaci cílové mRNA. Funkce obou genů není známa. Produkt genu *rde-1* je členem rodiny proteinů podobných králičímu proteinu eIF2C (popisuje se v publikaci Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing

25 in *C. elegans*. *Cell* 99, 123–132) a sekvence genu *rde-4* není ještě popsána. Biochemická charakterizace těchto proteinů by měla odhalit jejich molekulární funkci.

Zpracování duplexů siRNA začíná od konců obou dsRNA s tupými konci nebo dsRNA s krátkými přesahy na 3'-konci (1 až 5 nukleotidů) a probíhá v krocích přibližně 21 až 23 nukleotidů. Dlouhé upravené 3'-konce (obsahující 20 nukleotidů) krátkých dsRNA potlačují RNAi, pravděpodobně prostřednictvím interakce s proteiny, které se váží na jednořetězcovou RNA. Potlačení RNAi jednořetězcovou oblastí, která lemuje krátkou dsRNA, a nedostatečná

35 tvorba siRNA z krátkých dsRNA obsahující 30 párů bází může vysvětlit, proč strukturované oblasti, které se často vyskytují v mRNA, nevedou k aktivaci RNAi.

Předpokládá se, že proteiny zpracovávající dsRNA nebo jejich sada zůstávají spojeny s duplexem siRNA i po zpracování. Orientace duplexu siRNA vůči uvedeným proteinům určuje, který z

45 komplementárních řetězců funguje při řízení degradace cílové RNA. Chemicky syntetizované duplexy siRNA řídí štěpení 3',5' stejně jako 5',3'řetězce cílové RNA, protože jsou schopny se spojit s komponenty proteinů v jedné ze dvou možných orientací.

Zjištění, že syntetické duplexy siRNA obsahující 21 a 22 nukleotidů se mohou použít při účinné degradaci mRNA poskytuje nový nástroj pro sekvenčně specifickou regulaci exprese genu při studiu funkce genů a biochemických studiích. siRNA může být účinná v savčích systémech, kde se dlouhá dsRNA nemůže použít k aktivaci odezvy PKR (popisuje se v publikaci Clemens, M. J. (1997). PKR—a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 945–949). Jako takové tyto duplexy siRNA reprezentují nová terapeutická činidla, která jsou

50 alternativou k nesmyslným nebo ribozymovým terapeutickým činidlům.

Příklad 2: Interference RNA v lidských tkáňových kulturách

2.1 Způsoby

2.1.1 Příprava RNA

RNA obsahující 21 nukleotidů se chemicky syntetizovaly za použití fosforamiditů expediční RNA a tymidinového fosforamiditu (od firmy Proligo, Německo). Ze syntetických oligonukleotidů se odstranily ochranné skupiny a oligonukleotidy se čistily na gelu (popisuje se v příkladu 1), pak následuje čištění pomocí kazety Pack C18 (Waters, Milford, MA, USA) (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benseler, F., and Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658–11668). Sekvence siRNA cílící luciferázu GL2 (přístupové číslo X65324) a GL3 (přístupové číslo U47296) odpovídaly kódujícími oblastem 153 až 173 vztaženo k prvnímu nukleotidu startovacího kodonu, siRNA cílící RL (přístupové číslo AF025846) odpovídá oblasti 119 až 129 po startovacím kodonu. Delší RNA se přepsaly RNA polymerázou T7 z produktů PCR, pak následuje čištění na gelu a Sep-Pak. Dvouřetězcové RNA GL2 nebo GL3 obsahující 40 a 484 párů bází odpovídalo poloze 113 až 161, respektive 113 až 596, které se vztahují k počátku translace. Dvouřetězcová RNA RL obsahující 50 a 501 párů bází odpovídá poloze 118 až 167, respektive 118 až 618. Templáty PCR vhodné pro syntézu dsRNA cílené na humanizovaný GFP (hG) se amplifikovaly z pAD3 (popisuje se v publikaci Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A. & Gerace, L. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CMR1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J. Cell Biol.* 141, 863–874), kde dsRNA hG obsahující 50 a 501 párů bází odpovídá poloze 118 až 167, respektive poloze 118 až 618, vztaženo ke startovacímu kodonu.

V případě teplotní hybridizace siRNA se jednotlivé řetězce v koncentraci 20 μM inkubovaly v hybridizačním pufru (100 mM acetát draselný, 30 mM HEPES–KOH při hodnotě pH 7,4, 2 mM acetát draselný) po dobu jedné minuty při teplotě 90 $^{\circ}\text{C}$, pak následuje inkubace po dobu 1 hodiny při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$. V případě dsRNA obsahující 50 a 500 párů bází se inkubace při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ prodloužila přes noc a koncentrace řetězce v hybridizační reakci byla 8,4 μM a 0,84 μM .

2.1.2 Buněčná kultura

Buňky S2 se pomnožily v Schneiderově kultivačním médiu vhodném pro kultivaci organismu *Drosophila* (Life Technologies) doplněném 10 % FBS, penicilinem v koncentraci 100 jednotek/ml a streptomycinem v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$. Buňky 293, NIH/3T3, HeLaS3, COS–7 se nechaly růst při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ v Dulbeccově upraveném Eagle kultivačním médiu doplněném 10 % FBS, penicilinem v koncentraci 100 jednotek v 1 mililitru a streptomycinem v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Buňky se pravidelně pasážovaly, aby se udržely v exponenciální fázi růstu. 24 hodin před transfekcí se buňky z 80 % konfluentní ošetřily trypsinem a ředily se v poměru 1:5 čerstvým kultivačním médiem bez antibiotik (1 až 3 $\times 10^5$ buněk/ml) a přenesly se na destičky obsahující 24 prohlubní (500 $\mu\text{l/ml}$). V případě buněk S2 se nepoužil trypsin. Transfekce se provedla činidlem Lipofectamin 2000 (od firmy Life Technology) postupem podle výrobce vhodným pro adherentní buněčné linie. Do jedné prohlubně se přidal 1 μg pGL2–Control (od firmy Promega) nebo pGL3–Control (od firmy Promega), 0,1 μg pRL–TK (od firmy Promega) a 0,28 μg duplexu siRNA nebo dsRNA, které tvoří lipozomy. Konečný objem směsi v jedné prohlubni je 600 μl . Buňky se po transfekci inkubovaly 20 hodin. Expres luciferázy se následně sledovala duálním luciferázovým testem (Promega). Účinnost transfekce v případě savčí buněčné linie ko–transfekované 1,1 μg pAD3 kódující hGFP a 0,28 μg invGL2 inGL2 siRNA se stanovila fluorescenční mikroskopií a byla 70 až 90 %. Reportní plazmidy se amplifikovaly v buňkách XL–1 Blue (Stratagene) a čistily se za použití Qiagen EndoFree Maxi Plasmid Kit.

2.2 Výsledky a diskuze

Za účelem testování, zda siRNA jsou také schopny zprostředkovat RNAi v tkáňových kulturách, se syntetizovaly duplexy siRNA obsahující 21 nukleotidů a symetrické přesahy na 3'-konci, které obsahují 2 nukleotidy. Duplexy jsou řízeny proti reportním genům pocházejícím z *Renilla reniformis* a dvěma sekvenčním variantám luciferázy světlušek (*Photinus pyralis*, GL2 a GL3) (zobrazeno na obrázku č. 8a, b). Duplexy siRNA se transfekovaly společně s kombinacemi reportních plazmidů pGL2/pRL nebo Pgl3/pRL do buněk *Schneider S2* organismu *D. melanogaster* nebo do savčích buněk za použití kationických lipozomů. Aktivita luciferázy se stanovila 20 hodin po transfekci. Ve všech testovaných buněčných liniích se pozorovala specifická redukce exprese reportních genů v přítomnosti příbuzných duplexů siRNA (zobrazeno na obrázku č. 9a až j). Absolutní síla exprese luciferázy zůstává překvapivě neměnná, což indikuje nepřítomnost nežádoucích vedlejších účinků způsobených duplexy RNA obsahujícími 21 nukleotidů (zobrazeno na obrázku č. 10a až d v případě buněk HeLa). V případě buněk S2 organismu *D. melanogaster* (zobrazeno na obrázku č. 9a, b) byla specifická inhibice luciferáz úplná. V savčích buňkách, kde exprese reportních genů byla 50 až 100násobně silnější, specifická suprese nebyla kompletní (zobrazeno na obrázku č. 9c až j). Exprese GL2 se redukovala 3krát až 12krát, exprese GL3 se redukovala 9krát až 25krát a exprese RL se redukovala 1krát až 3krát, jako odezva na příbuznou siRNA. V případě buněk 293 bylo cílení RL luciferázy pomocí siRNA RL neúčinné, ačkoli cíle GL2 a GL3 specificky odpovídaly (zobrazeno na obrázku č. 9i, j). Skutečnost, že nedochází k redukci exprese RL v buňkách 293, může být způsobena jejich 5–ti až 20–ti násobně silnější expresí ve srovnání s libovolnou jinou testovanou buněčnou linií a/nebo limitovanou přístupností cílové sekvence způsobenou sekundární strukturou RNA nebo asociovanými proteiny. Specifické cílení luciferázy GL2 a GL3 příbuznými duplexy siRNA indikuje, že RNAi také funguje v buňkách 293.

Přesah na 3'-konci ve všech duplexech siRNA obsahující 2 nukleotidy s výjimkou uGL2, se skládal z 2'-deoxytymidinu. Substituce uridinu thymidinem v přesahu 3'-konce byla dobře tolerována v in vitro systému organismu *D. melanogaster* a sekvence přesahu není pro rozeznávání cíle rozhodující. Vybral se tymidinový přesah, protože se předpokládá, že zesiluje rezistenci siRNA proti nukleázám obsaženým v kultivačním médiu určeném pro tkáňové kultury a v transfekovaných buňkách. siRNA GL2 upravené tymidinem byly v testovaných buněčných liniích o trochu silnější ve srovnání s neupravenými siRNA uGL2 (zobrazeno na obrázku č. 9a, c, e, g, i). Další úpravy nukleotidů obsažených v přesahu na 3'-konci mohou být výhodné při zavedení a stabilitě duplexů siRNA.

V ko-transfekčních experimentech se použily duplexy siRNA v koncentraci 25 nM s ohledem na konečný objem kultivačního média vhodného pro tkáňové kultury (zobrazeno na obrázku č. 9,10). Zvyšující se koncentrace siRNA až na hodnotu 100 nM nezesílila specifické účinky deaktivace, ale ovlivnila účinnost transfekce způsobenou kompeticí lipozomového pouzdrí mezi plazmidovou DNA a siRNA (data nejsou uvedena). Snížení koncentrace siRNA na hodnotu 1,5 nM nesnížila specifický účinek zhasínání (data nejsou uvedena), dokonce ani v případě, kdy siRNA byla pouze 2krát až 20krát koncentrovaná ve srovnání s plazmidovou DNA. To ukazuje, že siRNA jsou velmi silná reakční činidla pro zprostředkování zhasení genu a že siRNA jsou účinné v koncentraci, které jsou o několik řádů nižší, než jsou koncentrace aplikované u běžných experimentů, při kterých dochází k nesmyslnému cílení genů nebo cílení ribozymových genů.

Za účelem sledování účinku delších dsRNA na savčí buňky, se připravily dsRNA příbuzné reportním genům obsahující 50 a 500 párů bází. Jako nespecifické kontroly se použily dsRNA z humanizovaného Gfp (hG) (popisuje se v publikaci Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A. & Gerace, L. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CMR1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. J. Cell Biol. 141, 863–874). V případě, že se dsRNA ko-transfekovaly ve shodném množství (nikoliv koncentracích) s duplexy siRNA, exprese reportního genu se silně a nespecificky snížila. Tento účinek se ilustroval jako příklad v buňkách HeLa (zobrazeno na obrázku 10 a až d). Absolutní luciferázové aktivity se nespecificky snížily desetkrát až dvacetkrát

pomocí dsRNA obsahující 50 párů bází a 20 až 200krát ko-transfekcí dsRNA obsahující 500 párů bází. Podobné nespecifické účinky se pozorovaly v případě buněk COS-7 a NIH/3T3. V případě buněk 293 se pozorovala 10–ti násobná až 20–ti násobná redukce pouze v případě dsRNA obsahující 500 párů bází. Nespecifické snížení exprese reportního genu pomocí dsRNA obsahující více jak 30 párů bází se očekává jako část interferonové odezvy.

Navzdory silnému nespecifickému zvýšení exprese reportního genu, je možné opakovatelně detekovat další sekvenčně specifickou deaktivaci zprostředkovanou dsRNA. Specifické účinky deaktivace jsou zjevné pouze, když se relativní aktivity reportního genu normalizovaly s kontrolami dsRNA hG (zobrazeno na obrázku č. 10e až f). Ve třech dalších testovaných savčích buněčných liniích se pozorovalo dvojnásobné až desetinásobné snížení odezvy na příbuznou dsRNA (data nejsou uvedena). Specifické deaktivací účinky dsRNA (obsahující 356 až 1 662 párů bází) byly už zmiňovány v případě buněk CHO-K1, ale množství dsRNA nutné pro detekci dvojnásobné až čtyřnásobné redukce bylo přibližně dvacetkrát vyšší než v našich experimentech (popisuje se v publikaci Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y. & Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Letters* 479, 79–82). Také buňky CHO-K1 nevykazují silnou interferonovou odezvu. V jiné publikaci se popisuje testování RNAi v buňkách 293, NIH/3T3 a BHK-21 za použití reportních kombinací luciferáza/lac a dsRNA specifické pro lacZ obsahující 829 párů bází nebo dsRNA nespecifické pro GFP obsahující 717 párů bází (popisuje se v publikaci Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference, *gene* 252, 95–105, Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000)). Selhání detekce RNAi může být v tomto případě způsobeno méně citlivým testem luciferáza/lacZ a rozdílem délky cílové a kontrolní dsRNA. Uvedené výsledky ukazují, že účinek deaktivace není lehké detekovat, jestliže interferonový systém se aktivuje dsRNA, která obsahuje více jak 30 párů bází.

Poprvé se prokázala deaktivace genu v savčích buňkách zprostředkovaná siRNA. Použití krátkých siRNA je velkým příslibem pro deaktivaci funkce genu v lidských tkáňových kulturách a pro vývoj genově specifických terapeutických činidel.

Příklad 3: Specifická inhibice genové exprese interferencí RNA

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Příprava RNA a test RNAi

Chemickou syntézu RNA, hybridizaci a testy RNAi založené na luciferáze je možné provést způsobem popsaným v příkladech 1 nebo 2 nebo v dříve zmiňovaných publikacích Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197 a Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33. Všechny duplexy siRNA jsou směřovány proti luciferáze světlušek a sekvence mRNA luciferázy se získaly z pGEM-luc (GenBank, přístupové číslo X65316), jak se popisuje v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197. Duplexy siRNA se inkubovaly v reakční směsi pro RNAi *D. melanogaster*/translaci po dobu 15 minut a pak se přidala mRNA. Testy RNAi založené na translaci se provedly alespoň třikrát.

Za účelem mapování štěpení pozitivní cílové RNA se vytvořil transkript obsahující 177 nukleotidů odpovídající sekvenci luciferázy světlušek mezi polohami 113 až 273 vztaženo k startovacímu kodonu, pak následuje doplněk obsahující 17 nukleotidů sekvence promotoru SP6. Za účelem mapování štěpení 5',3' řetězce cílové RNA se vytvoří transkript obsahující 166 nukleotidů z templátu, který se amplifikoval podle sekvence plazmidu použitím PCR pomocí

5'primeru TAATACGACTCACTATAGAGCCCATATCGTTTCATA (podtržen promotor T7) a 3'-primeru AGAGGATGGAACCGCTGG. Cílová sekvenec odpovídá doplňku sekvenec luciferázy světlušek mezi polohami 50 až 215 vztaženo vůči startovacímu kodonu. Guanylyl transferázové značení se provedlo způsobem, který se popisuje v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25–33. Za účelem mapování štěpení cílové RNA se duplex siRNA v koncentraci 100 nM inkuboval s cílovou RNA v koncentraci 5 až 10 nM v lyzátu embryí organismu *D. Melanogaster* za standardních podmínek (popisuje se v publikaci Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25–33) po dobu 2 hodiny při teplotě 25 °C. Reakce se zastavila přidáním 8 objemů pufru proteinázy K (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2% (hmotnost/objem) dodecylsulfátu sodného). Přidala se proteináza K (rozpuštěná ve vodě, od firmy E.M. Merck) tak, aby její konečná koncentrace byla 0,6 mg/ml. Reakční směs se inkubovala po dobu 15 minut při teplotě 65 °C, extrahovala se směsí fenol/chloroform/-isoamylalkohol (v poměru 25:24:1) a srážela se třemi objemy etanolu. Vzorky se nanasly na 6% sekvenční gely. Standardy délky se získaly částečným štěpením RNázou T1 a částečnou bazickou hydrolýzou pozitivních nebo negativních RNA značených čepičkou.

3.2 Výsledky

3.2.1 Variace přesahu 3'-konce v duplexech siRNA obsahujících 21 nukleotidů

Jak se popisuje shora v textu 2 nebo 3 nepárované nukleotidy na 3'-konci duplexů siRNA jsou účinnější při degradaci cílové RNA ve srovnání s duplexy s tupými konci. Za účelem uskutečnění obsáhlejší analýzy funkce terminálních nukleotidů se syntetizovalo pět pozitivních siRNA obsahujících 21 nukleotidů, každý je vyjádřen jedním nukleotidem vztaženým k cílové RNA, a 8 negativních siRNA obsahujících 21 nukleotidů, každý je vyjádřen jedním nukleotidem vztaženým k cíli (zobrazeno na obrázku č. 11A). Kombinováním 3',5'a 5',3' řetězců siRNA se vytvořilo osm sérií duplexů siRNA se syntetickými přesahujícími konci, které pokrývají rozmezí 7 nukleotidů přesahu na 31konci a 4 nukleotidy přesahu na 5'-konci. Interference duplexů siRNA se měřila použitím duálního luciferázového testu (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes & Dev. 13, 3191–3197, Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25–33). Duplexy siRNA jsou určeny pro RNA luciferázy světlušek a jako vnitřní kontrola se použila mRNA *Renilla reniformis*. Poměr luminiscence cílové a kontrolní luciferázové aktivity se stanovil na základě přítomnosti duplexu siRNA a normalizoval se vůči poměru pozorovanému za nepřítomnosti dsRNA. Za účelem srovnání jsou poměry interference dlouhých dsRNA (obsahují 39 až 504 párů bází) zobrazeny na obrázku č. 11B. Interferenční poměry se stanovily v koncentracích 5 nM v případě dlouhých dsRNA (zobrazeno na obrázku č. 11A) a v koncentraci 100 nM v případě duplexů siRNA (popisuje se na obrázku č. 11c až j). Koncentrace siRNA 100 nM se vybrala, protože úplné zpracování dsRNA obsahující 504 párů bází v koncentraci 5 nM povede k vytvoření 120 nM duplexů siRNA.

Schopnost duplexů siRNA obsahujících 21 nukleotidů zprostředkovat RNAi závisí na počtu přesahujících nukleotidů nebo vytvořených párů bází. Duplexy se čtyřmi až šesti přesahujícími nukleotidy 3'-konce nejsou schopny zprostředkovat RNAi (zobrazeno na obrázku č. 11c až f) na rozdíl od duplexů se dvěma nebo více nukleotidy přesahu 5'-konce (zobrazeno na obrázku č. 11g až j). Duplexy s přesahy 3'-konce obsahující 2 nukleotidy byly při zprostředkování interference RNA nejúčinnější, ačkoliv účinnost zhášení genu je také závislá na sekvenci. V případě rozdílných duplexů si RNA s přesahy na 3'-konci obsahující 2 nukleotidy se pozoroval až 12-ti násobný rozdíl (porovnání je zobrazeno na obrázku č. 11d až h). Duplexy s tupými konci obsahující 1 nukleotid v přesahu 5'-konce nebo 1 až 3 nukleotidy v přesahu 3'-konce, byly v

některých případech funkční. V případě duplexu siRNA se 7 nukleotidy v přesahu 3'-konce se pozoroval malý deaktivční účinek (zobrazeno na obrázku č. 11c), což může být způsobeno antisense účinkem dlouhého přesahu 3'-konce, spíše než RNAi. Porovnání účinnosti RNAi mezi dlouhou dsRNA (obrázek č. 11B) a nejúčinnějšími duplexy siRNA obsahujícími 21 nukleotidů (zobrazeno na obrázku č. 11e, g, h) indikuje, že jediný duplex siRNA v koncentraci 100 nM může být stejně účinný jako dsRNA obsahující 504 párů bází v koncentraci 5 nM.

3.2.2 Variace délky 3',5'řetězce siRNA párovanou s invariantou 5',3'řetězce siRNA obsahující 21 nukleotidů

Za účelem zkoumat účinek délky siRNA na RNAi, se připravily 3 série duplexů siRNA kombinováním tří 5',3' řetězců obsahující 21 nukleotidů s osmi 3',5' řetězci obsahující 18 až 25 nukleotidů. Přesah 3'-konce 5',3'řetězce siRNA se fixoval na počtu 1, 2, nebo 3 nukleotidy v každé sérii duplexů siRNA, zatímco 3',5' řetězec siRNA na jejím 3'-konci se měnil (zobrazeno na obrázku č. 12A). Nezávisle na délce 3',5'řetězce siRNA se zjistilo, že duplexy s 2 nukleotidy v přesahu 3'-konce 5',3'řetězce siRNA (zobrazeno na obrázku č. 12c) jsou více aktivní než duplexy obsahující 1 nebo 3 nukleotidy v přesahu 3'-konce (zobrazeno na obrázku č. 12b, d). V prvních sériích, které obsahují 1 nukleotid v přesahu 3'-konce 5',3'řetězce siRNA, duplexy s 3',5'řetězcem siRNA obsahující 21 a 22 nukleotidů nesoucí 1 a 2 nukleotidy v přesahu 3'-konce 3',5'řetězce siRNA, byly nejvíce aktivní. Duplexy s 3',5'řetězcem siRNA obsahující 19 až 25 nukleotidů jsou také schopny zprostředkovat RNAi, ale v menším rozsahu. Podobně ve druhých sériích se dvěma nukleotidy v přesahu 5',3'řetězce siRNA duplex siRNA obsahující 21 nukleotidů s přesahem 3'-konce obsahujícím 2 nukleotidy byl nejvíce aktivní a libovolná jiná kombinace pozitivní siRNA obsahující 18 až 25 nukleotidů byla dostatečně aktivní. V posledních sériích se 3 nukleotidy v přesahu 3'-konce 5',3'řetězce siRNA byl pouze duplex 3',5'řetězce siRNA obsahující 20 nukleotidů a 2 nukleotidy v přesahu 3'-konce schopen zeslabit expresi cílové RNA. Výsledky ukazují, že délky siRNA stejně jako délka přesahu 3'-konce jsou důležité a že duplexy siRNA obsahující 21 nukleotidů s 2 nukleotidy v přesahu 3'-konce jsou optimální pro RNAi.

3.2.3 Variace délky duplexů siRNA s konstantním přesahem 3'-konce obsahující 2 nukleotidy

Testoval se účinek současných změn délky obou řetězců siRNA udržováním symetrických přesahů 3'-konce obsahující 2 nukleotidy (zobrazeno na obrázku č. 13A). Připravily se dvě série duplexů siRNA, které zahrnují duplex siRNA obsahující 21 nukleotidů zobrazených na obrázku č. 11H. Délka duplexů kolísá mezi 20 až 25 páry bází. Segment páru bází se prodlužuje na svém 3'-konci 3',5'řetězce siRNA (zobrazeno na obrázku č. 13B) nebo na 3'-konci 5',3'řetězce siRNA (zobrazeno na obrázku č. 13c). Duplexy obsahující 20 až 23 párů bází způsobily specifickou represi cílové luciferázové aktivity, ale duplex siRNA obsahující 21 nukleotidů byl alespoň 8krát účinnější než libovolný jiný duplex. Duplexy siRNA obsahující 24 a 25 nukleotidů nezpůsobují žádnou interferenci. Sekvenčně specifické účinky byly mizivé, protože variace obou konců duplexu vykazovaly podobné účinky.

3.2.4 Duplexy siRNA upravené 2'-deoxyskupinou a 2'-O-metylovou skupinou

Za účelem hodnocení důležitosti zbytků ribózy siRNA při RNAi se testovaly duplexy s siRNA obsahující 21 nukleotidů a 2 nukleotidy v přesahu 3'-konce s řetězci upravenými 2'-deoxyskupinou nebo 2' -O-metylovou skupinou (zobrazeno na obrázku č. 14). Substituce 2 nukleotidů přesahů 3'-konce 2'-deoxynukleotidy neměla žádný účinek, a dokonce nahrazením dvou dalších ribonukleotidů, které sousedí s přesahy v párované oblasti vznikly podstatně aktivní siRNA. Osm ze 42 nukleotidů duplexu siRNA se nahradilo zbytky DNA, aniž došlo ke ztrátě aktivity. Úplná substituce jednoho nebo obou řetězců siRNA zbytků s 2'-deoxyskupinou eliminovala RNAi stejně jako substituce zbytků s 2'-O-metylovou skupinou.

3.2.5 Definice míst štěpení cílové RNA

Polohy štěpení cílové RNA v případě duplexů siRNA obsahujících 22 nukleotidů a 21 nukleotidů/22 nukleotidů byly už dříve stanoveny. Zjistilo se, že poloha štěpení cílové RNA se
 5 nachází ve středu oblasti pokryté duplexem siRNA, což je 11 nebo 12 nukleotidů downstream od prvního nukleotidu, který je komplementární s řídicí sekvencí siRNA obsahující 21 nebo 22 nukleotidů. Pět rozdílných duplexů siRNA obsahujících 21 nukleotidů s přesahem na 3'-konci obsahujícím 2 nukleotidy (zobrazeno na obrázku č. 15A) se inkubovalo s 3', 5' nebo 5',3' řetězcem cílové RNA značenou na 5'-konci čepičkou v lyzátu organismu *D. melanogaster*
 10 (popisuje se v publikaci Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191–3197, Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33). Produkty štěpení na 5'-konci se rozdělily na sekvenčním gelu (zobrazeno na obrázku č. 15B). Množství štěpeného 3',5'řetězce cílové RNA koreluje s účinností duplexů siRNA stanovenou v testu založeném na translaci a duplexy siRNA 1, 2 a 4 (zobrazeno na obrázku č. 15B a 11H, G, E) štěpí cílovou RNA rychleji než duplexy 3 a 5 (zobrazeno na obrázku č. 15B a 11F, D). Součet radioaktivity produktu štěpení na 5'-konci a vstupující cílové RNA nebyl konstantní a produkty štěpení 5'-konce se nehromadily. Produkty štěpení uvolněné z komplexu
 20 siRNA–endonukleáza se rychle degradují, což je způsobeno koncem poly(A) čepičky na 5'-konci.

Místa štěpení pro 3',5' a 5',3' řetězec cílové RNA se nachází ve středu oblasti pokryté duplexy siRNA. Místa štěpení každého cíle produkovaného 5 různými duplexy se liší jedním
 25 nukleotidem. Cíle se štěpily přesně 11 nukleotidů downstream cílové polohy komplementární s nukleotidem na 3'-konci sekvencně komplementární řídicí siRNA (zobrazeno na obrázku č. 15A, B).

Za účelem stanovit, zda 5'nebo 3'-konec řídicích siRNA udává měřítko pro štěpení cílové RNA, se navrhla strategie experimentů zobrazených na obrázku č. 16A a B. 5',3'řetězec siRNA obsahující 21 nukleotidů, které se pro účely této studie neměnily, se párovaly s 3',5' řetězcem siRNA, které se upravovaly na svém 5' nebo 3'-konci. Poloha štěpení 3',5' a 5',3'řetězce cílové RNA se stanovila způsobem popsáným shora v textu. Změny na 3'-konci 3',5'řetězce siRNA se sledovaly v případě 1 nukleotidu přesahu na 5'-konci až 6 nukleotidů přesahu na 3'-konci
 35 neovlivnily polohu štěpení 3',5' ani 5',3'řetězce cílové RNA (zobrazeno na obrázku č. 16C). Změny na 5'-konci 3',5'řetězce siRNA neovlivňují štěpení 3',5'řetězce cílové RNA (zobrazeno na obrázku č. 16D, horní část), což se očekávalo, protože 5',3'řetězec siRNA zůstal beze změn. Štěpení 5',3'řetězce cílové RNA bylo ovlivněno a silně závisí na 5'-konci 3',5'řetězce siRNA (zobrazeno na obrázku č. 16D, spodní panel). 3',5'řetězec cíle se štěpil pouze, když 3',5'řetězec siRNA obsahoval 20 nebo 21 nukleotidů, přičemž poloha štěpení se liší jedním nukleotidem, což naznačuje, že 5'-konec sady siRNA rozeznávající cíl je měřítkem pro štěpení cílové RNA. Poloha štěpení se nachází mezi nukleotidem 10 a 11, kdy se počítá ve směru upstream od cílového nukleotidu, který tvoří pár s posledním nukleotidem na 5'-konci řídicí siRNA (zobrazeno také na obrázku č. 15A).

3.2.6 Účinky sekvence a substituce 2'-deoxyskupiny v přesahu 3'-konce

Dva nukleotidy přesahu 3'-konce jsou výhodné pro fungování siRNA. Zkoumalo se, zda sekvence přesahujících nukleotidů se podílí na rozeznávání cíle nebo zda je pouze rysem nutným
 50 pro rekonstituci endonukleázového komplexu (RISC nebo siRNP). Syntetizovaly se 3',5'řetězec a 5',3'řetězec siRNA s přesahy AA, CC, GG, UU a UG na 3'-konci a zahrnovaly úpravy TdG a TT 2'-deoxyskupinou. siRNA divokého typu obsahoval AA v přesahu 3'-konce 3',5' řetězce a UG v přesahu 3'-konce 5',3'řetězce (AA/UG). Všechny duplexy siRNA jsou v testu interference funkční a zeslabují expresi cíle alespoň 5krát (zobrazeno na obrázku č. 17). Nejúčinnější duplexy
 55 siRNA, které redukovaly cílovou expresi více jak desetkrát obsahovaly sekvenci typu NN/UG,

NN/UU, NN/TdG a NN/TT (N, libovolný nukleotid). Duplexy siRNA s přesahem 3'-konce 5',3'řetězce siRNA AA, CC nebo GG byly 2krát až 4krát méně aktivní ve srovnání se sekvencí divokého typu UG nebo s mutantem UU. Toto snížení účinnosti RNAi je pravděpodobně způsobeno účastí předposledního nukleotidu na 3'-konci v sekvenčně specifickém rozeznávání cíle, přičemž 3'-terminální nukleotid se změnil z G na U bez jakéhokoliv účinku.

Změny v sekvenci přesahu 3'-konce v 3',5'řetězci siRNA neukázaly žádné účinky v závislosti na sekvenci, což se očekávalo, protože 3',5'řetězec siRNA se nesmí podílet na rozpoznávání 3', 5' řetězce cílové mRNA.

3.2.7 Sekvenční specifita rozeznávání cíle

Za účelem testovat sekvenční specifitu rozeznávání cíle se zavedly změny sekvence do párovaných segmentů duplexů siRNA a stanovila se účinnost deaktivace. Změny sekvence se zavedly obrácením krátkých segmentů v délce 3 nebo 4 nukleotidů nebo jako bodové mutace (zobrazeno na obrázku č. 18). Změny sekvencí v jednom řetězci siRNA se kompenzují v komplementárním řetězci siRNA, aby se zabránilo porušení párování bází struktury duplexu siRNA. Sekvence všech přesahů 3'-konců s 2 nukleotidy byla TT (T, 2'-deoxytymidin), což snižuje náklady na syntézu. Referenční duplex siRNA obsahující sekvenci TT/TT působí srovnatelně při RNAi s duplexem siRNA divokého typu se sekvencí AA/UG (zobrazeno na obrázku č. 17). Schopnost zprostředkovat destrukci reportní mRNA se kvantifikovala použitím luminiscenčního testu založeného na translaci. Duplexy siRNA se segmenty s obrácenou sekvencí vykazovaly dramaticky sníženou schopnost cílit reportní gen luciferázy světlušek (zobrazeno na obrázku č. 18). Změny sekvence lokalizované mezi 3'-koncem a středem 5',3'řetězce siRNA zcela ruší rozeznávání cílové sekvence, ale mutace blízko 5'-konci 5',3'řetězce siRNA vykazují nízký stupeň deaktivace. Transverze páru bází A/U lokalizovaných přímo proti předpokládanému místu štěpení cílové RNA nebo o jeden nukleotid dále od předpokládaného místa brání štěpení cílové RNA, což ukazuje, že jediná mutace v centru duplexu siRNA potlačuje nesprávné párování cílů.

3.3 Diskuze

siRNA jsou dostupná reakční činidla pro deaktivaci exprese genu, ne pouze v hmyzích buňkách, ale také v savčích buňkách, s velkým potenciálem pro terapeutické aplikace. Systematicky jsme analyzovali strukturní determinanty duplexů siRNA nutné k podpoře účinné degradace cílové RNA v lyzátu embryí organismu *D. melanogaster*, což poskytuje pravidla pro vytvoření nejsilnějších duplexů siRNA. Správný duplex siRNA je schopen deaktivovat expresi genu s účinností srovnatelnou s dsRNA obsahující 500 párů bází, přičemž se používá srovnatelné množství celkové RNA.

3.4 Použití siRNA

Duplexy siRNA účinné při deaktivaci jsou s výhodou složeny z 3',5' řetězce siRNA obsahujícího 21 nukleotidů a měly by se vybrat tak, aby tvořily dvoušroubovici obsahující 19 párů bází s přesahem na 3'-koncích obsahujícími 2 nukleotidy. 2'-deoxy substituce 2 nukleotidů přesahujících ribonukleotidů na 3'-konci neovlivňuje RNAi, ale pomáhá snižovat náklady syntézy RNA a může zesilovat rezistenci duplexů siRNA vůči RNázám. Rozsáhlejší úpravy 2'-deoxyskupinou nebo 2'-O-metylovou skupinou však snižují schopnost siRNA zprostředkovat RNAi pravděpodobně interferenci proteinem, se kterým se spojuje za účelem vytvoření siRNAP.

Rozeznání cíle je vysoce sekvenčně specifický proces zprostředkovaný siRNA komplementární s cílem. Nukleotid na samém 3'-konci řídící siRNA se nepodílí na specifitě rozeznávání cíle, zatímco předposlední nukleotid přesahu 3'-konce ovlivňuje štěpení cílové RNA a nesprávné párování zeslabuje RNAi 2krát až 4krát. 5'-konec řídící siRNA ve srovnání s 3'-koncem se jeví být více permissivní pro nesprávné rozeznávání cílové RNA. Nukleotidy v centru siRNA

lokalizované na druhé straně místa štěpení cílové RNA jsou důležitými determinanty specifity, a dokonce změna jediného nukleotidu snižuje RNAi na nedetekovatelnou úroveň. To naznačuje, že duplexy siRNA jsou schopny potlačit mutanty nebo polymorfní alely v experimentech cílení genů, což se může stát důležitým rysem při vývoji terapeutických činidel.

3',5' a 5',3'řetězce siRNA, když jsou spojeny se složkami proteinu endonukleázového komplexu, mají odlišnou úlohu.

Relativní orientace duplexu siRNA v tomto komplexu definuje, který řetězec je možné použít při rozeznávání cíle. Syntetické duplexy siRNA vykazují dvojčetnou symetrii s ohledem na dvoušroubovicovou strukturu, ale nikoli s ohledem na sekvenci. Spojení duplexů siRNA s proteiny RNAi v lyzátu organismu *D. melanogaster* vede k vytvoření dvou asymetrických komplexů. V takovém hypotetickém komplexu je chirální prostředí odlišné pro 3',5' a 5',3'řetězec siRNA vzhledem k jejich funkci. Předpověď obvykle neplatí v případě palindromických sekvencí siRNA nebo v případě proteinů RNAi, které se mohou spojovat jako homodiméry. Aby se minimalizovaly sekvenční účinky, které mohou ovlivnit poměr siRNP cílicí 3',5' a 5',3' řetězec, navrhuje se použití sekvencí siRNA se shodnými sekvencemi přesahů 3'-konce. Doporučujeme upravit sekvenci přesahu 3',5' řetězce siRNA na sekvenci přesahu 3'-konce 5',3'řetězce siRNA, protože 3',5' řetězec siRNA nemá v typických deaktivčních experimentech cíl. Asymetrie při rekonstituci siRNP může být (částečně) odpovědná za variace v účinnosti RNAi pozorované pro různé duplexy siRNA obsahující 21 nukleotidů s přesahy na 3-koncích obsahující 2 nukleotidy (zobrazeno na obrázku č. 14). V jiném případě nukleotidová sekvence v cílovém místě a/nebo přístupnost struktury cílové RNA může být zodpovědná za kolísání účinnosti v případě duplexů siRNA.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná molekula dvouřetězcové RNA, kde každý řetězec RNA má délku 19 až 25 nukleotidů, a alespoň jeden řetězec má 3'-koncový přesah, který má délku 1 až 5 nukleotidů, kde tato molekula RNA je schopná cílově specifické interference RNA.

2. Molekula RNA podle nároku 1, kde 3'-koncový přesah má délku 1 až 3 nukleotidy.

3. Molekula RNA podle kteréhokoli z nároků 1 a 2, kde 3'-koncový přesah je stabilizován proti degradaci.

4. Molekula RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, která obsahuje alespoň jeden modifikovaný nukleotidový analog.

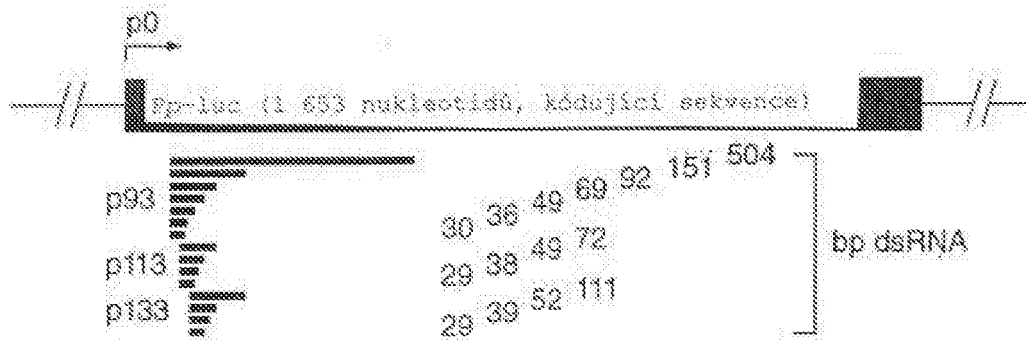
5. Molekula RNA podle nároku 4, kde modifikovaný nukleotidový analog je zvolen z ribonukleotidů s modifikovanou cukernou složkou nebo s modifikovanou kostrou.

6. Molekula RNA podle nároku 4 nebo 5, kde nukleotidový analog je ribonukleotid s modifikovanou cukernou složkou, kde 2'-OH skupina je nahrazena skupinou vybranou ze skupiny, zahrnující vodík, OR, R, halogen, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ nebo CN, kde R znamená alkyl, alkenyl nebo alkynyl o 1 až 6 atomech uhlíku a halogenem je fluor, chlor, brom nebo jod, nebo kde nukleotidový analog je ribonukleotid s modifikovanou kostrou obsahující fosfothioátovou skupinu.

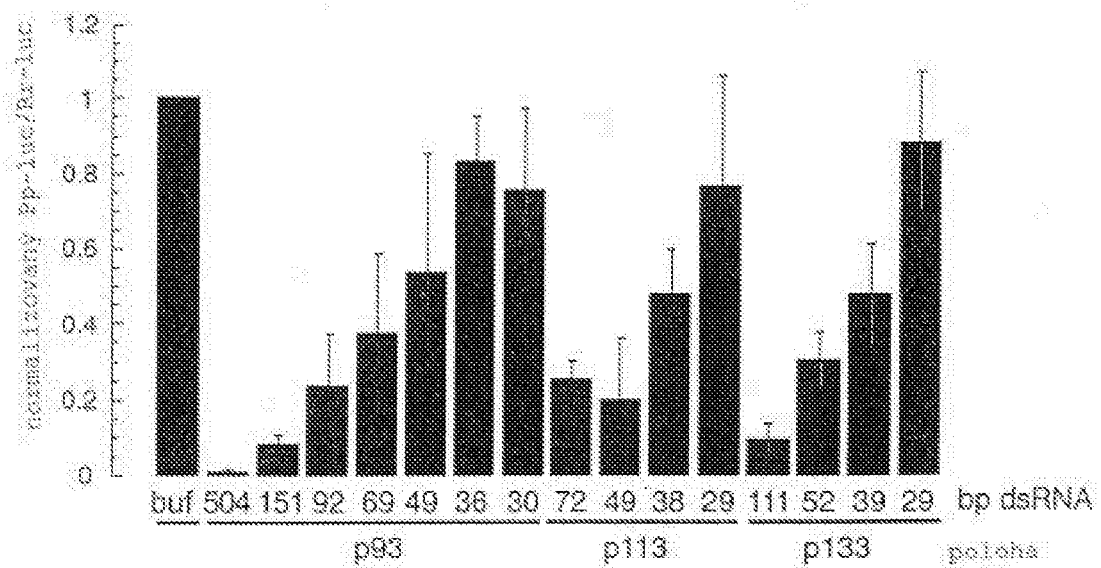
7. Molekula RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, jejíž sekvence má shodu alespoň 70 % s předem určenou cílovou molekulou mRNA.

8. Způsob přípravy molekuly dvouřetězcové RNA podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:
- (a) syntetizují se dva řetězce RNA, z nichž každý má délku 19 až 25 nukleotidů, přičemž tyto řetězce RNA jsou schopné vytvořit molekulu dvouřetězcové RNA,
 - (b) syntetizované řetězce RNA se kombinují za podmínek, kdy vzniká molekula dvouřetězcové RNA, která je schopná cílově specifické interference RNA.
9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že řetězce RNA se syntetizují chemicky nebo se řetězce RNA syntetizují enzymaticky.
10. Způsob in vitro zprostředkování cílově specifické interference RNA v eukaryotické buňce, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:
- (a) buňka se uvede do kontaktu s molekulou dvouřetězcové RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 za podmínek, při nichž může dojít k cílově specifické interferenci RNA a
 - (b) zprostředkuje se cílově specifická modifikace nukleové kyseliny provedená touto dvou řetězcovou RNA na cílové nukleové kyselině, která má část sekvence v podstatě odpovídající této dvouřetězcové RNA.
11. Použití způsobu in vitro podle nároku 10 pro stanovení funkce genu v buňce nebo pro modulaci funkce genu v buňce.
12. Použití podle nároku 11, při němž je tento gen spojen s patologickým stavem.
13. Dvouřetězcová molekula RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 pro použití jako léčivo pro modulaci funkce genu spojeného s patogenem, jako virového genu; nebo genu spojeného s nádorem; nebo genu spojeného s autoimunitním onemocněním.
14. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že jako svou účinnou složku obsahuje alespoň jednu molekulu dvouřetězcové RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 a farmaceutický nosič, přičemž molekula dvouřetězcové RNA je syntetická molekula RNA, a přičemž prostředek je prostý kontaminantů, vyskytujících se v buněčných extraktech.
15. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že jako svou účinnou složku obsahuje alespoň jednu molekulu dvouřetězcové RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 a farmaceutický nosič, přičemž molekula dvouřetězcové RNA je syntetická molekula RNA, a přičemž prostředek je prostý cílově nespecifických kontaminantů.
16. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že jako svou účinnou složku obsahuje alespoň jednu molekulu dvouřetězcové RNA podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 a farmaceutický nosič, přičemž prostředek je prostý cílově nespecifických molekul RNA.
17. Farmaceutický prostředek podle nároků 14, 15 nebo 16 pro diagnostická použití nebo pro léčebná použití.

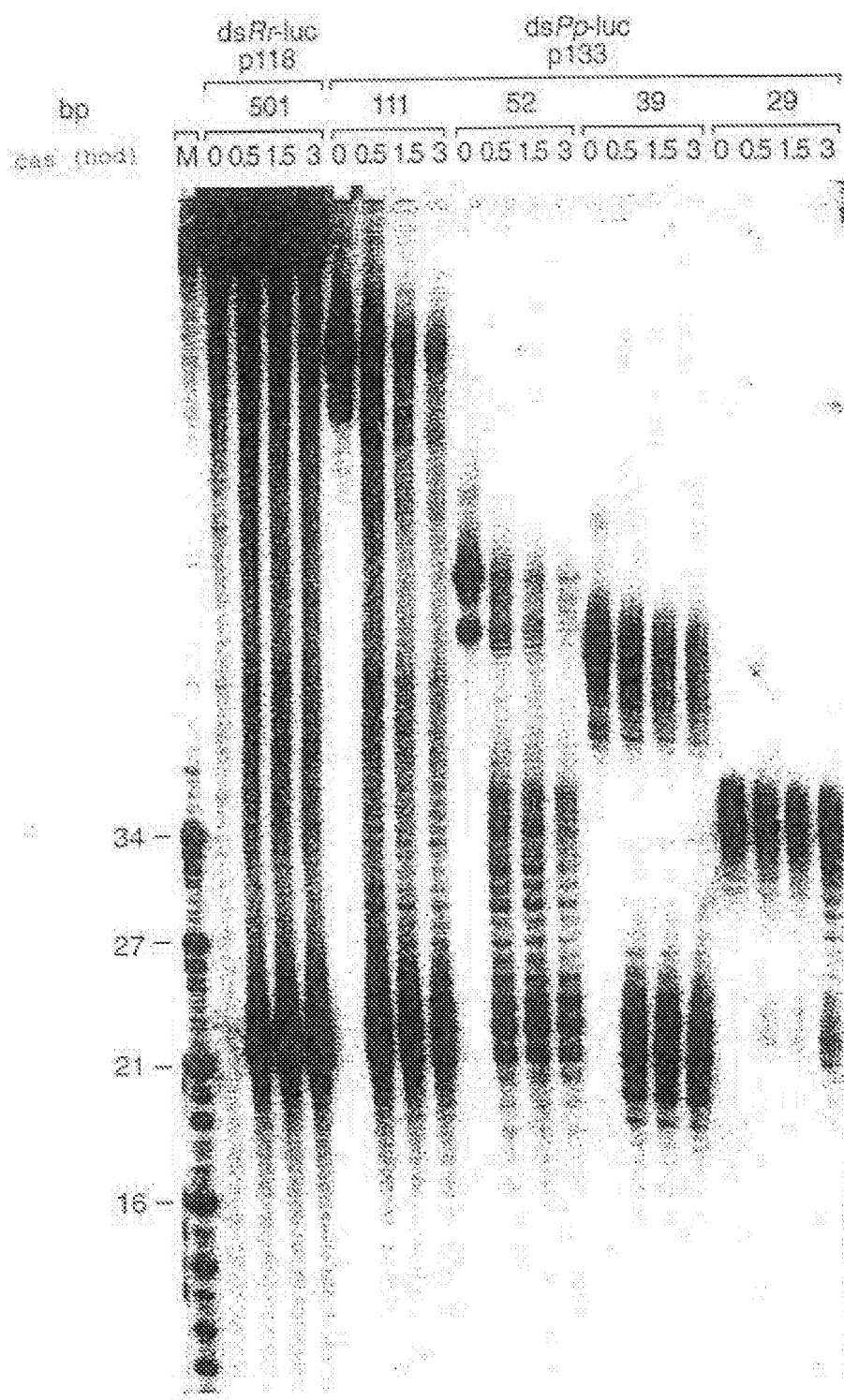
23 výkresů



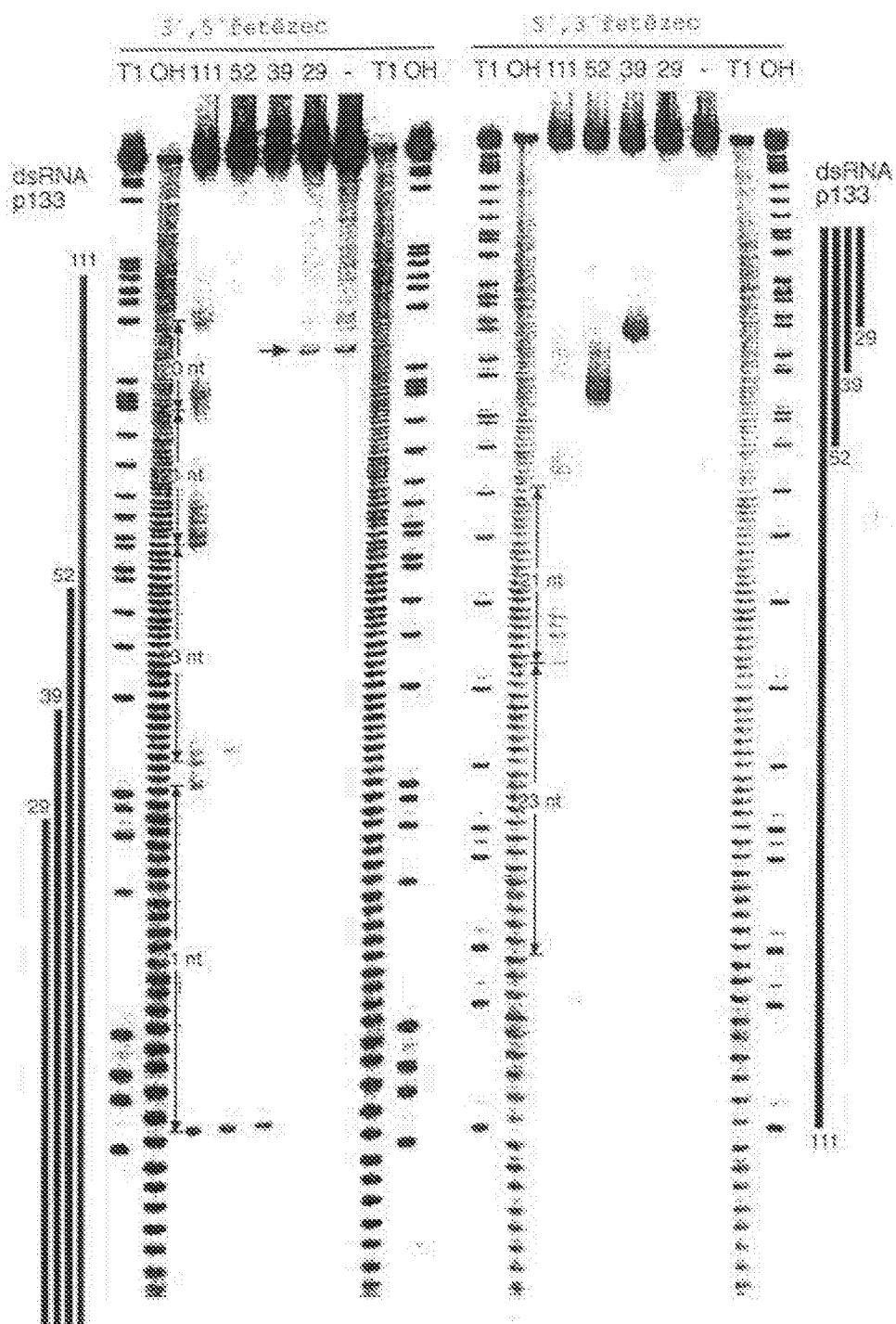
Obr. 1A



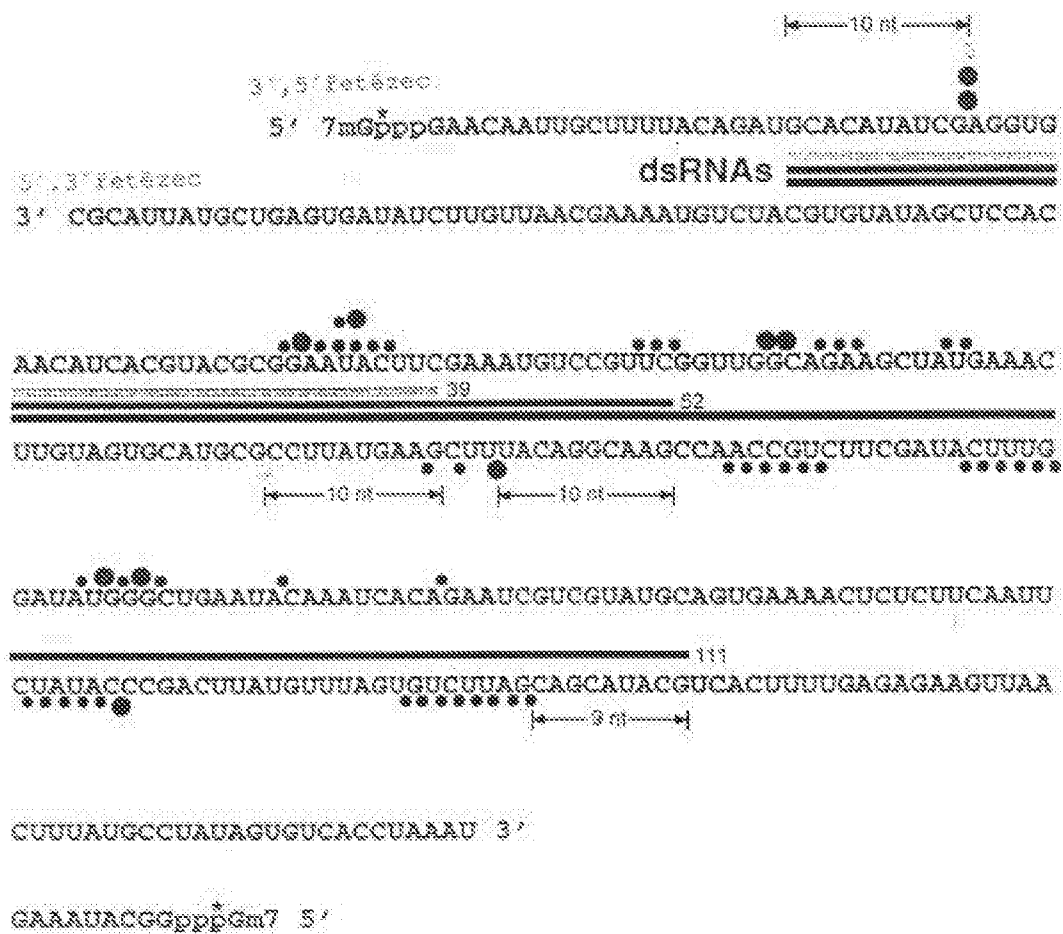
Obr. 1B



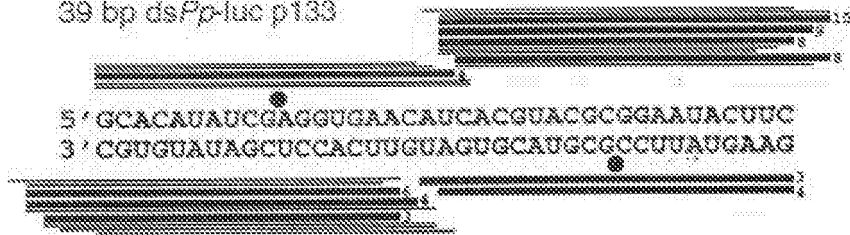
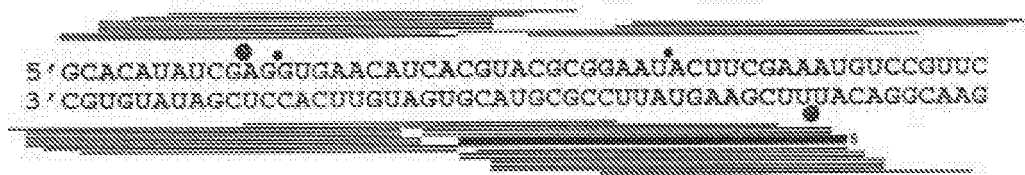
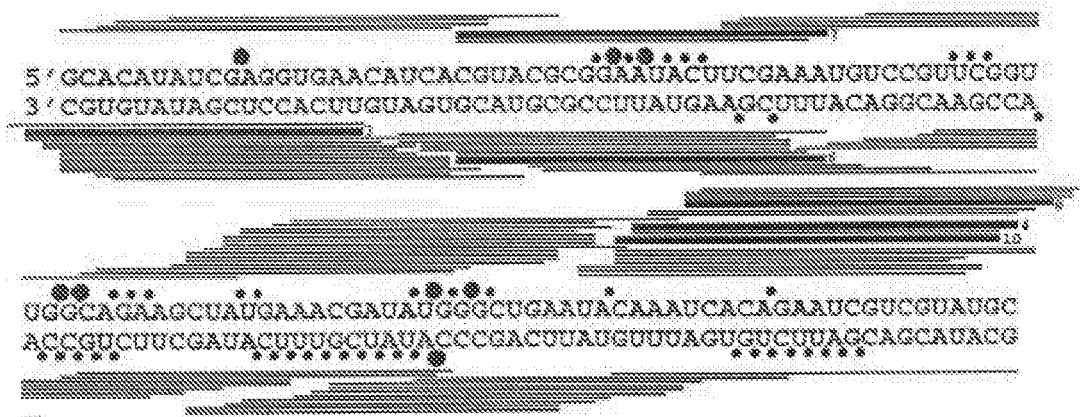
Obr. 2



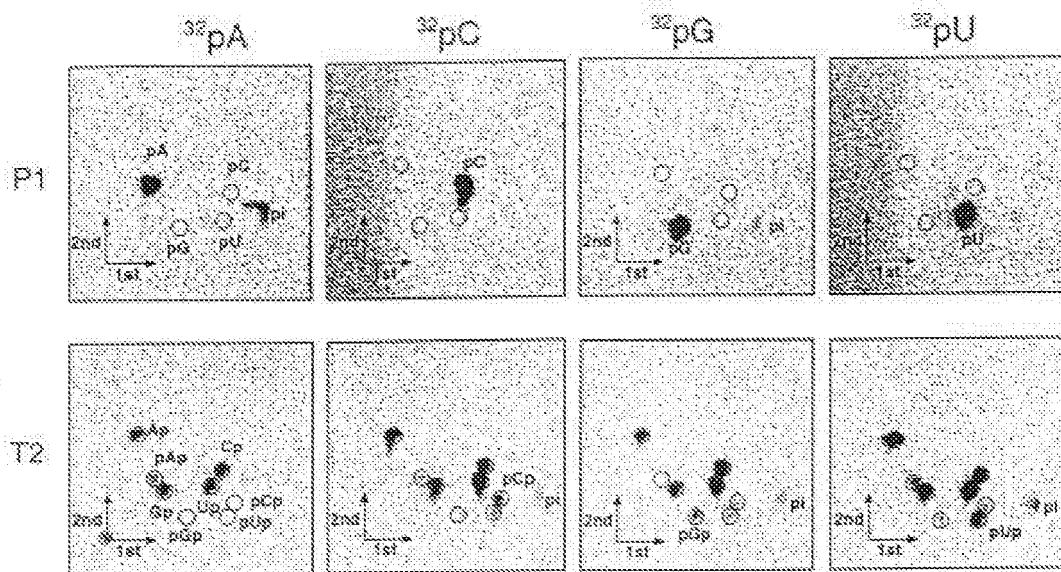
Obr. 3A



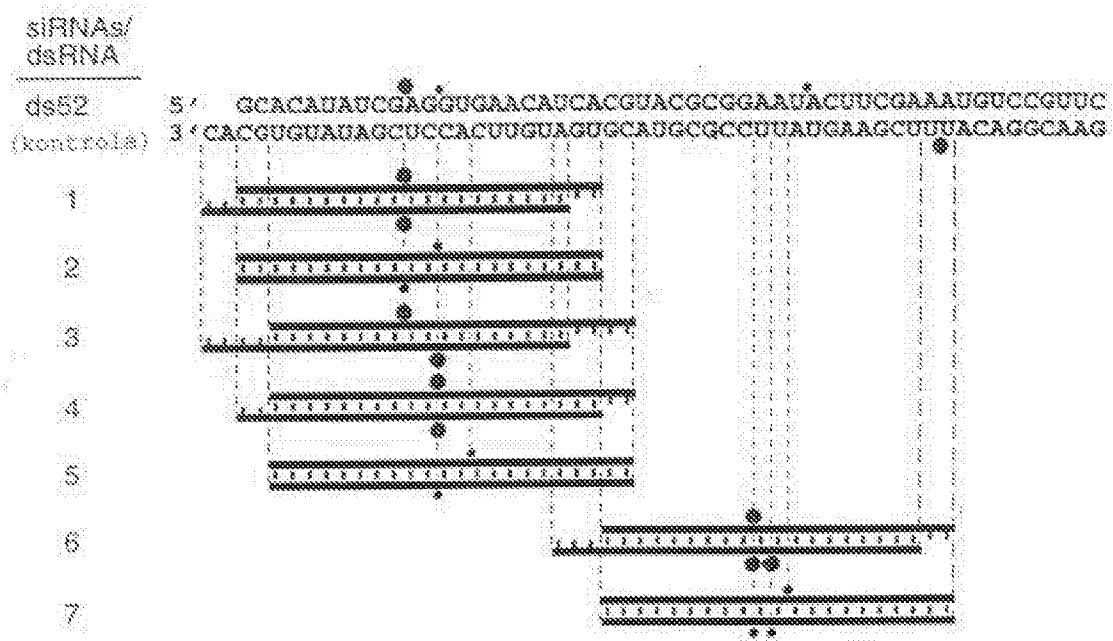
Obr. 3B

39 bp ds*Pp*-luc p13352 bp ds*Pp*-luc p133111 bp ds*Pp*-luc p133

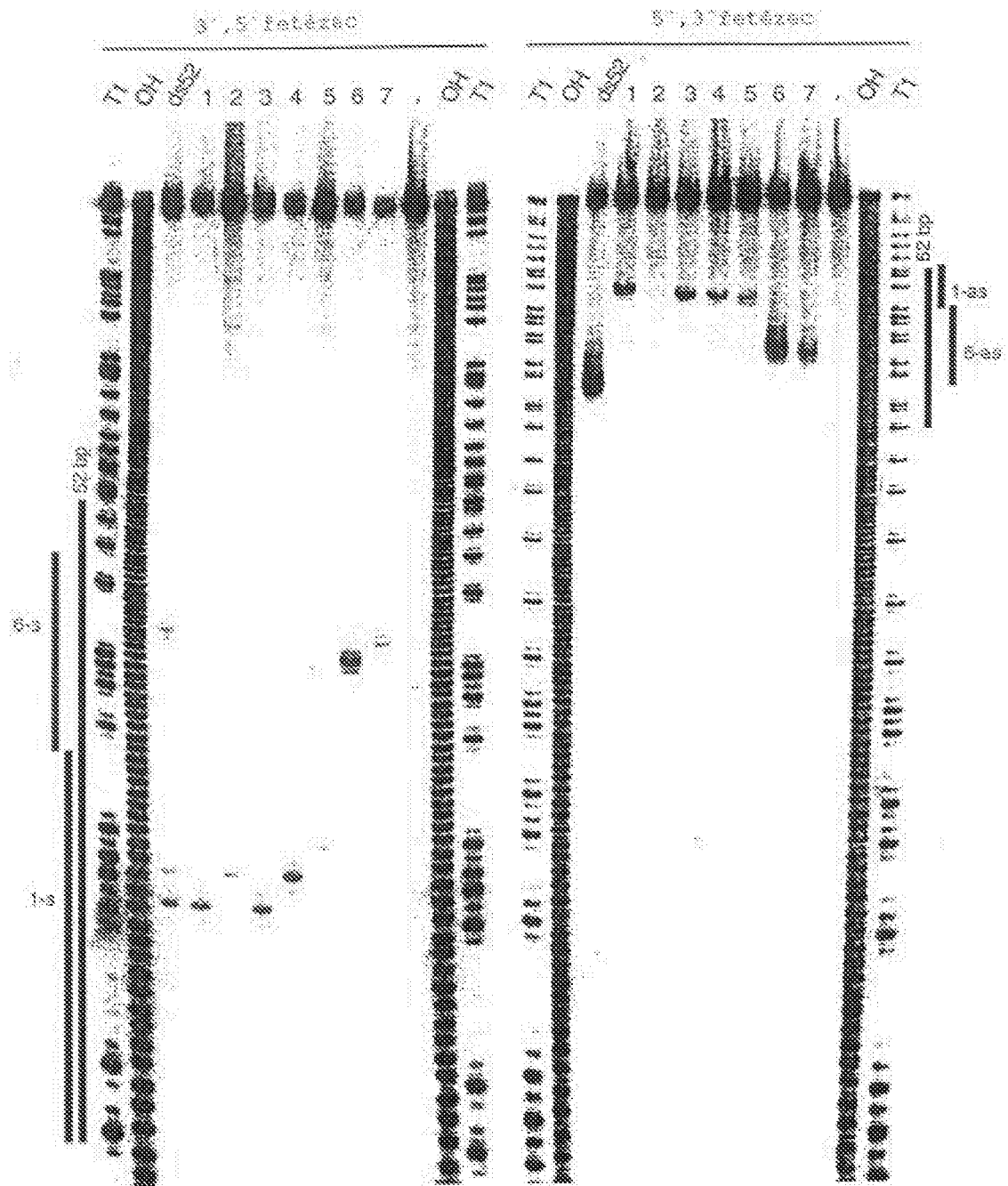
Obr. 4A



Obr. 4B

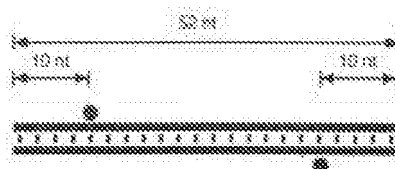


Obr. 5A

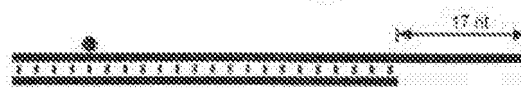


Obr. 5B

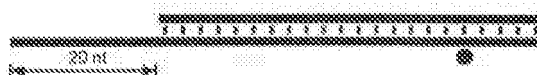
ds52



ds52-s3'



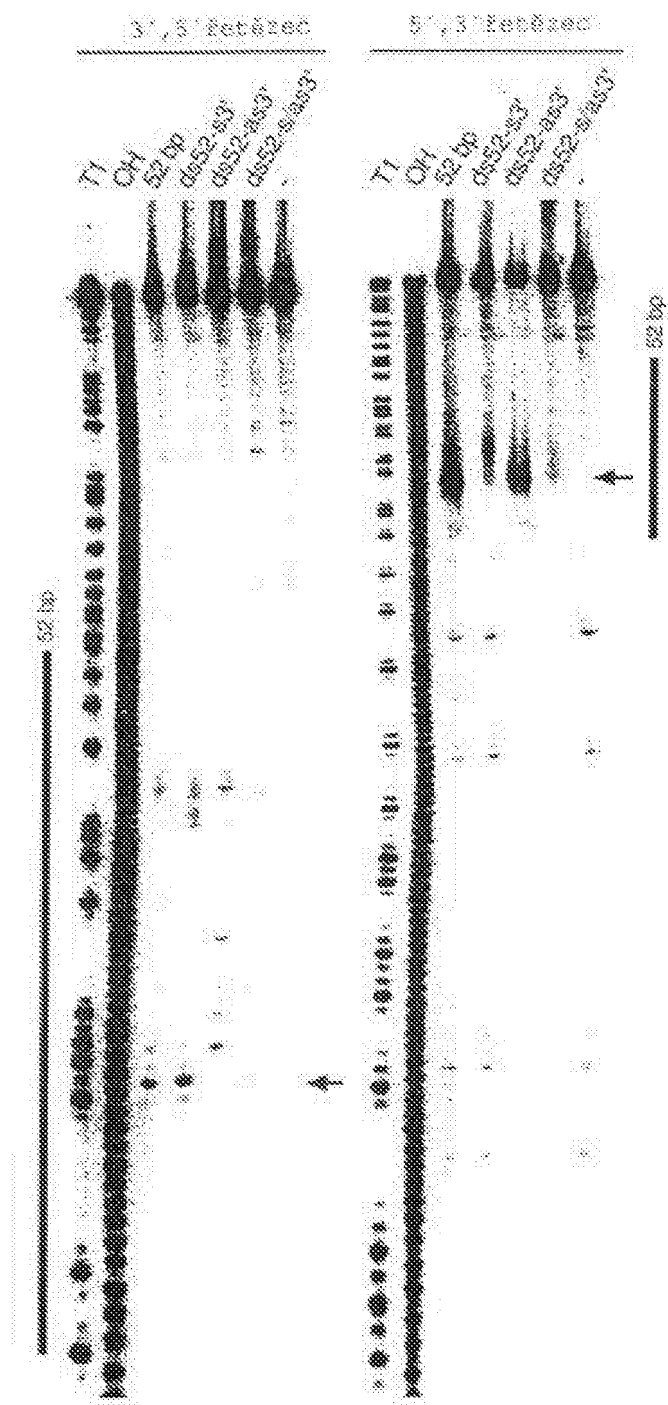
ds52-as3'



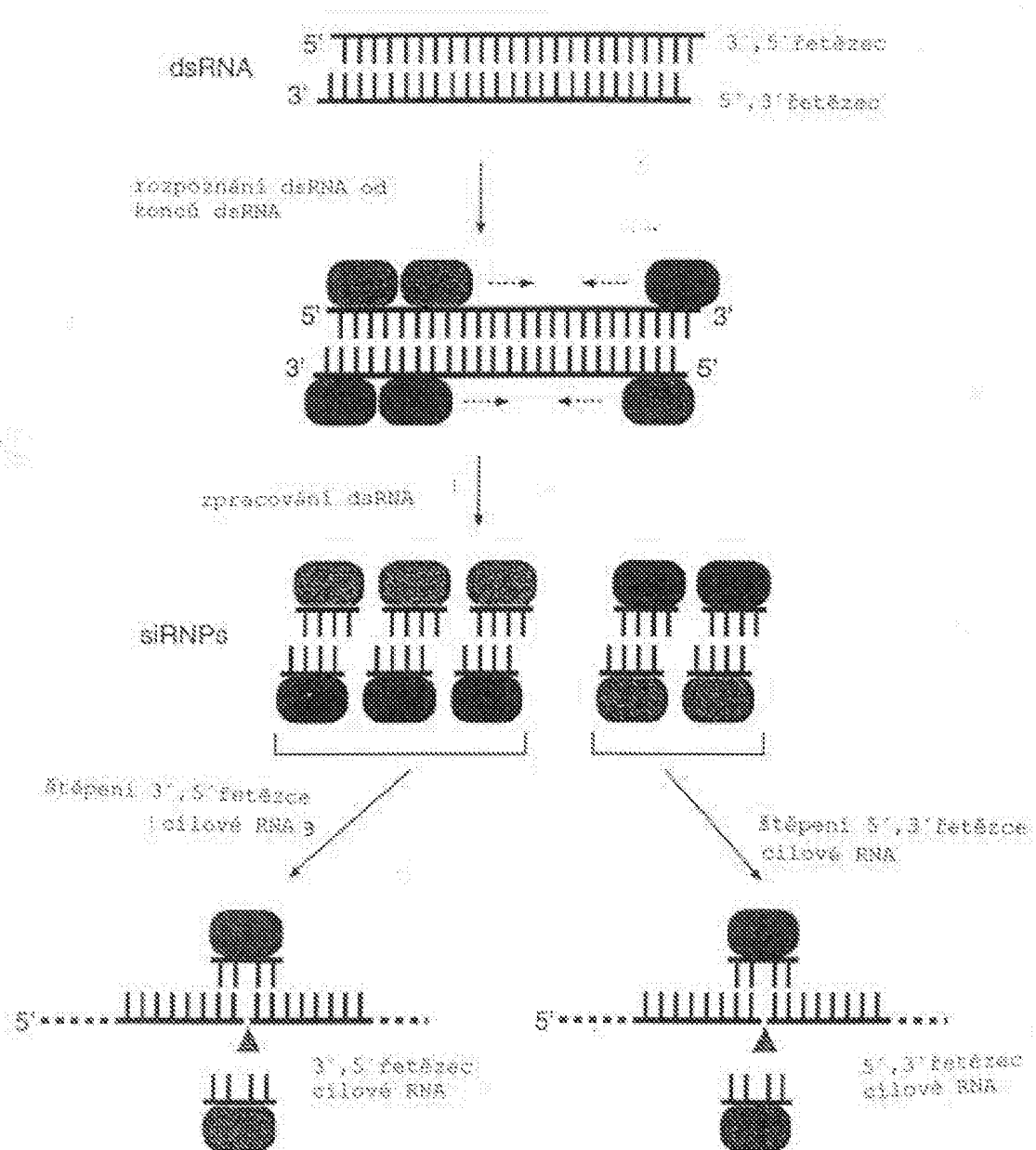
ds52-s/as3'



Obr. 6A

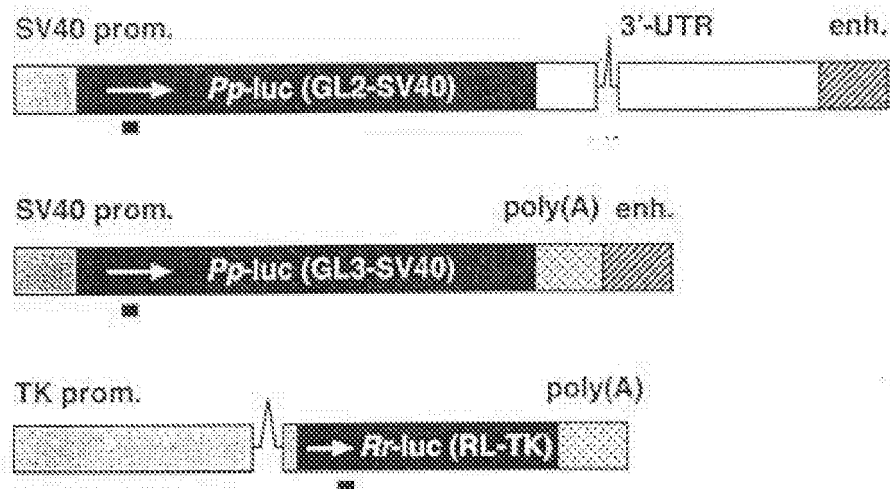


Obr. 6B



Obr. 7

a

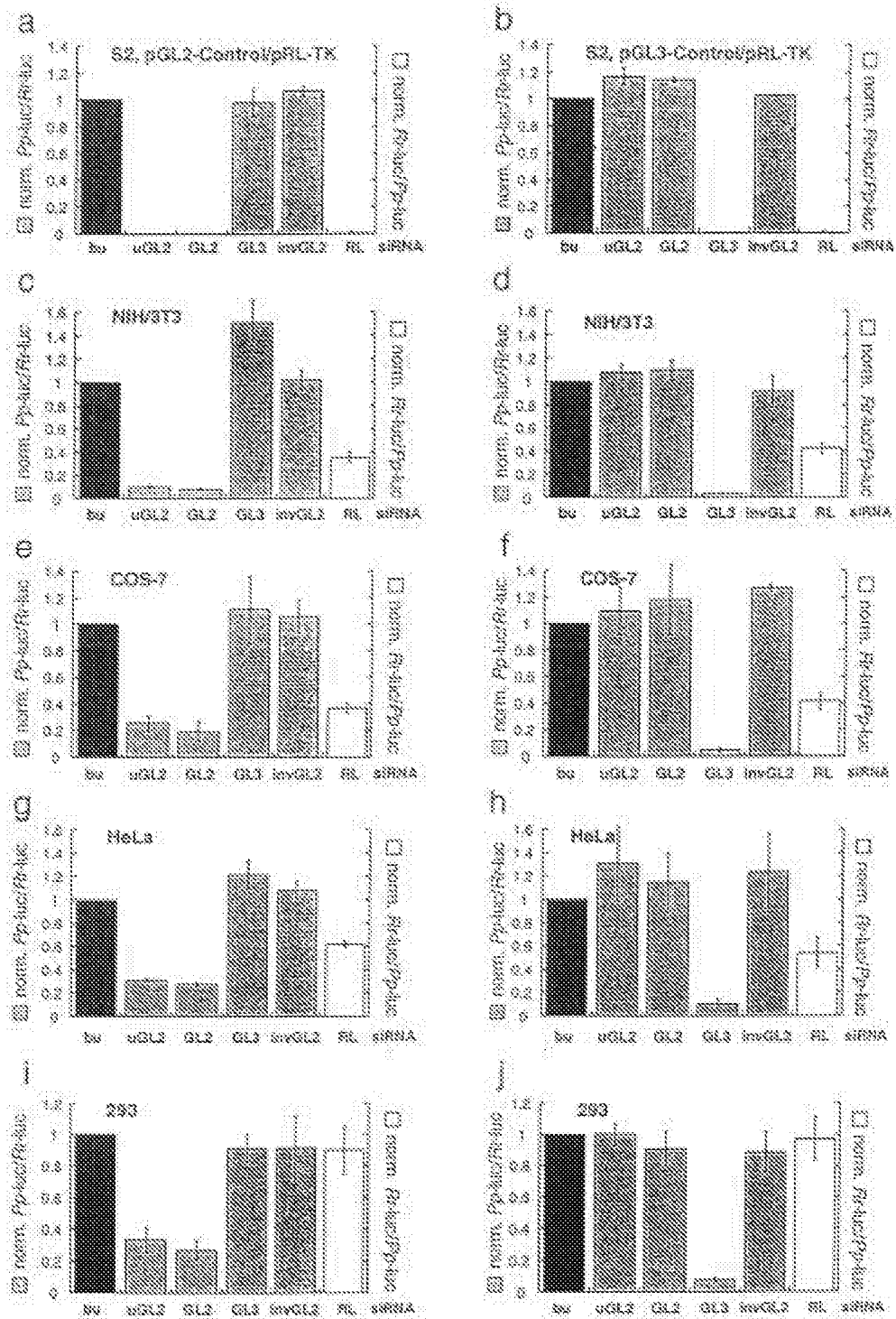


b

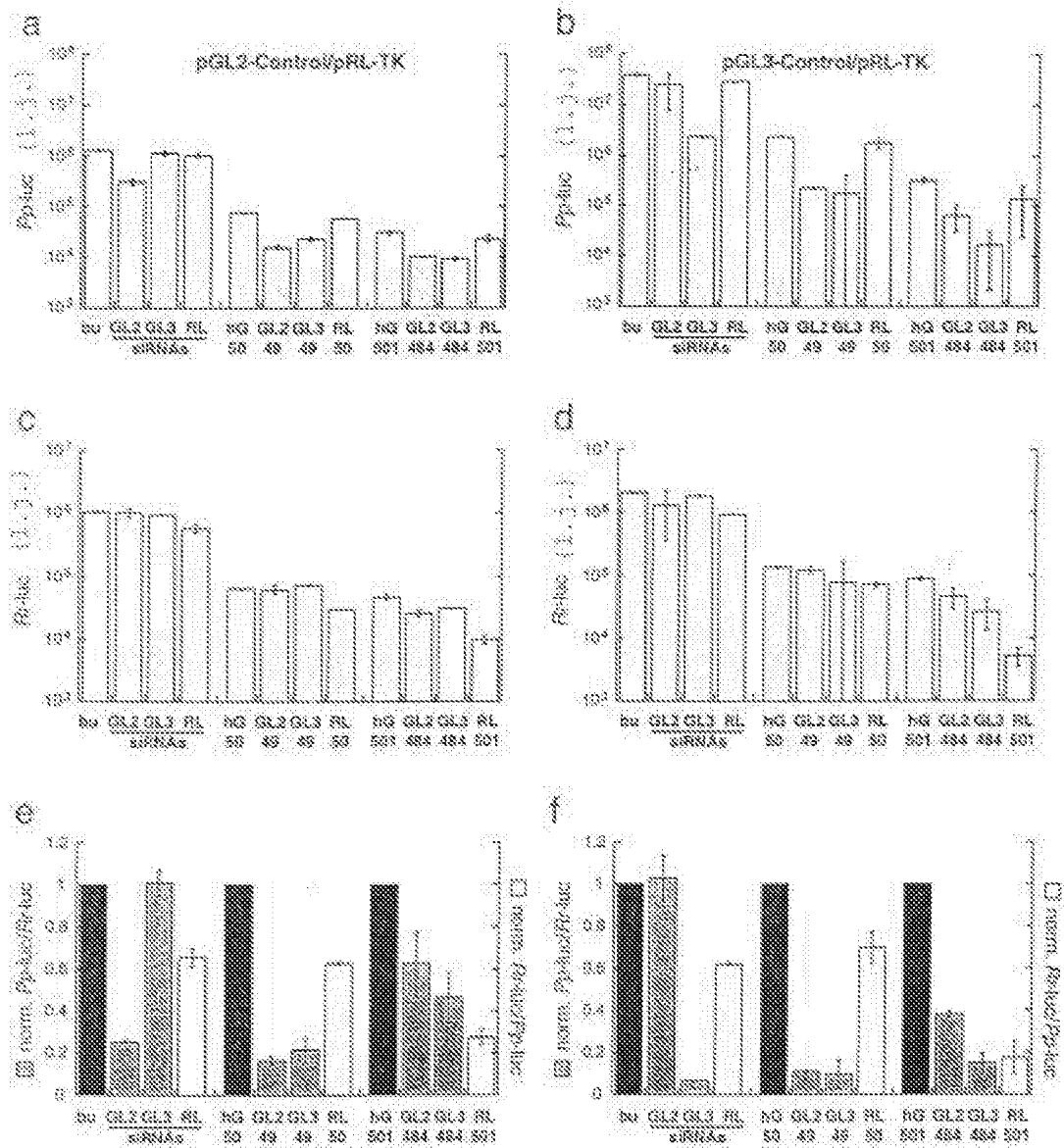
siRNA
duplex

uGL2	5' CGUACCGCGAAUACUUCGAUU UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL2	5' CGUACCGCGAAUACUUCGATT TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL3	5' CUUACCGCAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUUAUGAAGCU 5'
invGL2	5' AGCUUCAUAAGCGCGAUGCTT TTUCGAAGUAUUCGCGUACG 5'
RL	5' AAACAUGCAGAAAUGCUUUTT TTUUUGUACGUCUUUACGAC 5'

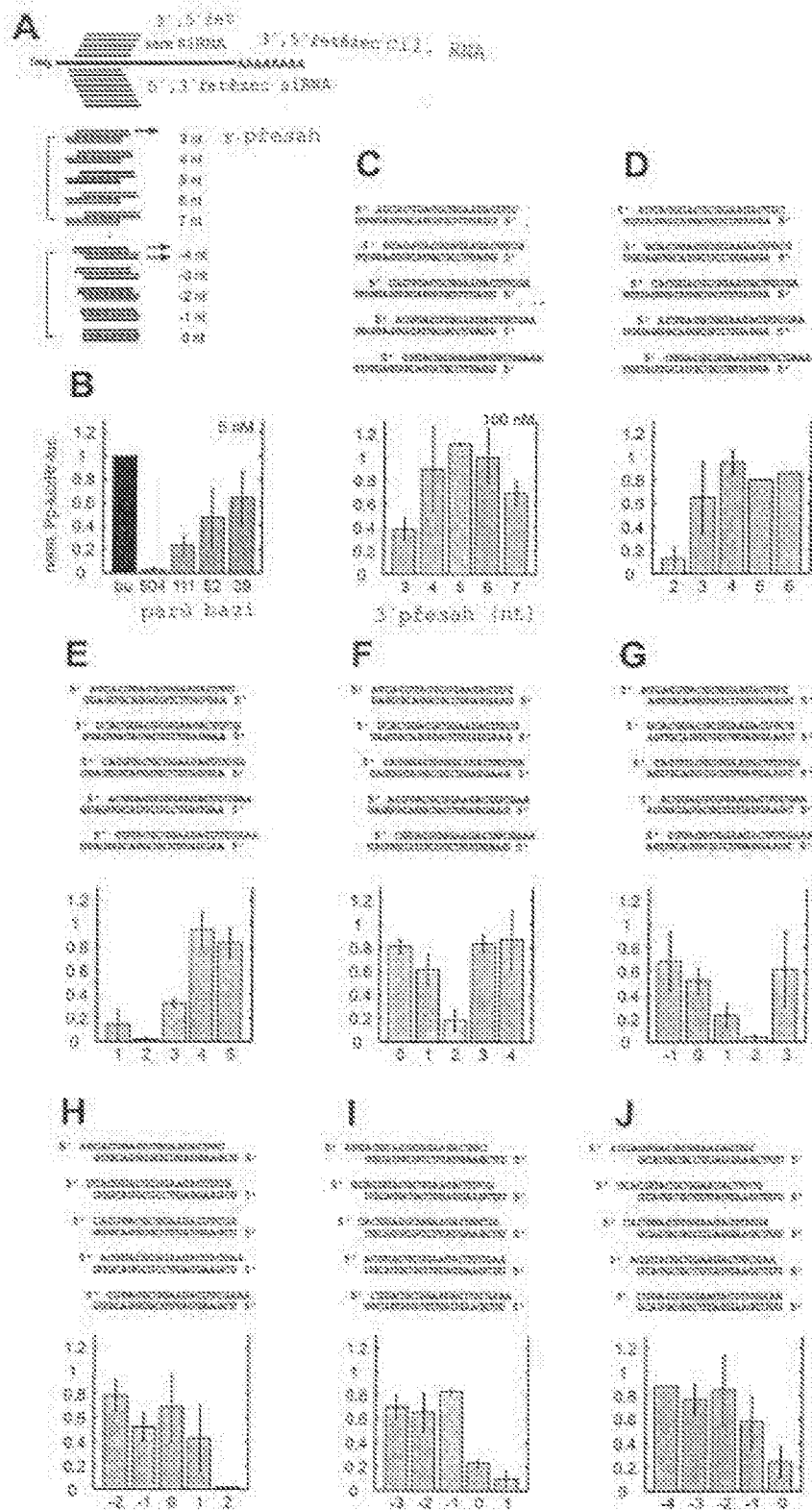
Obr. 8



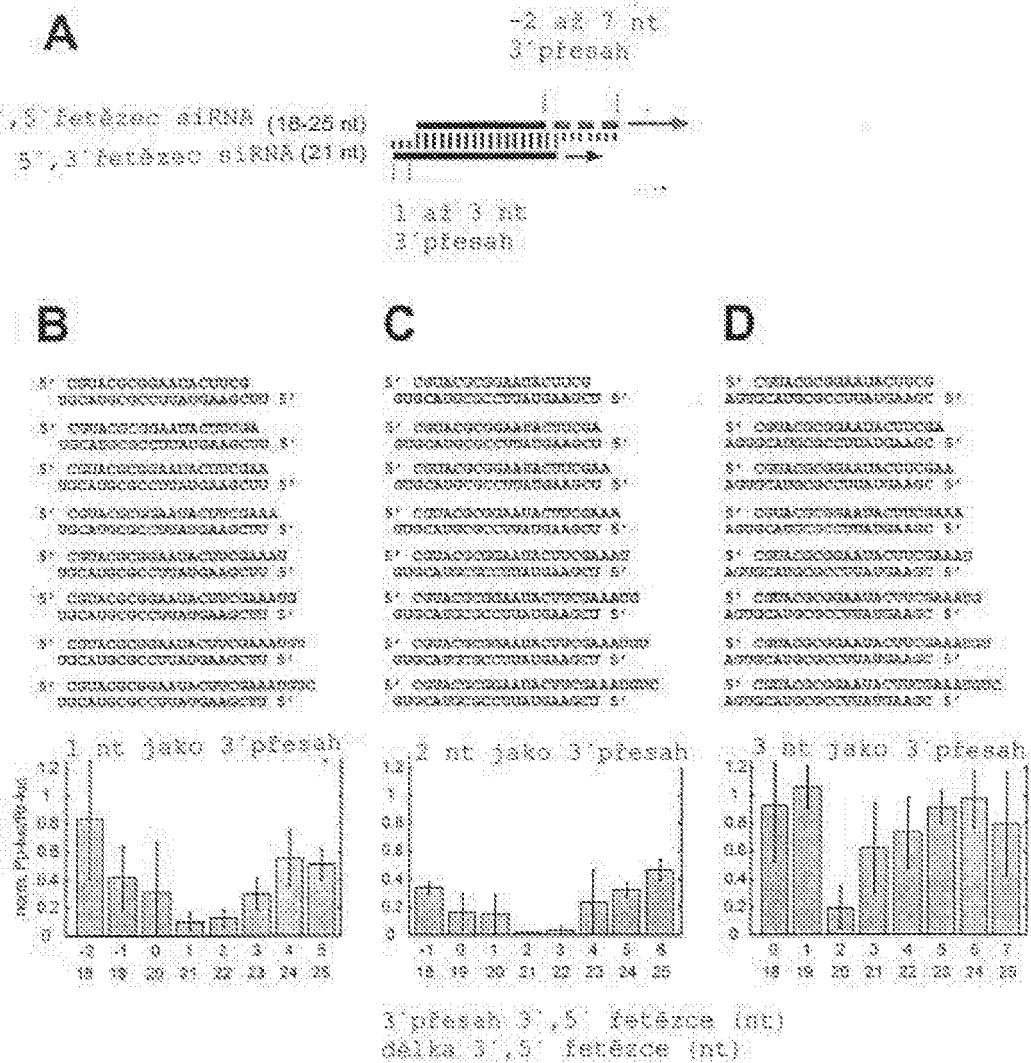
Obr. 9



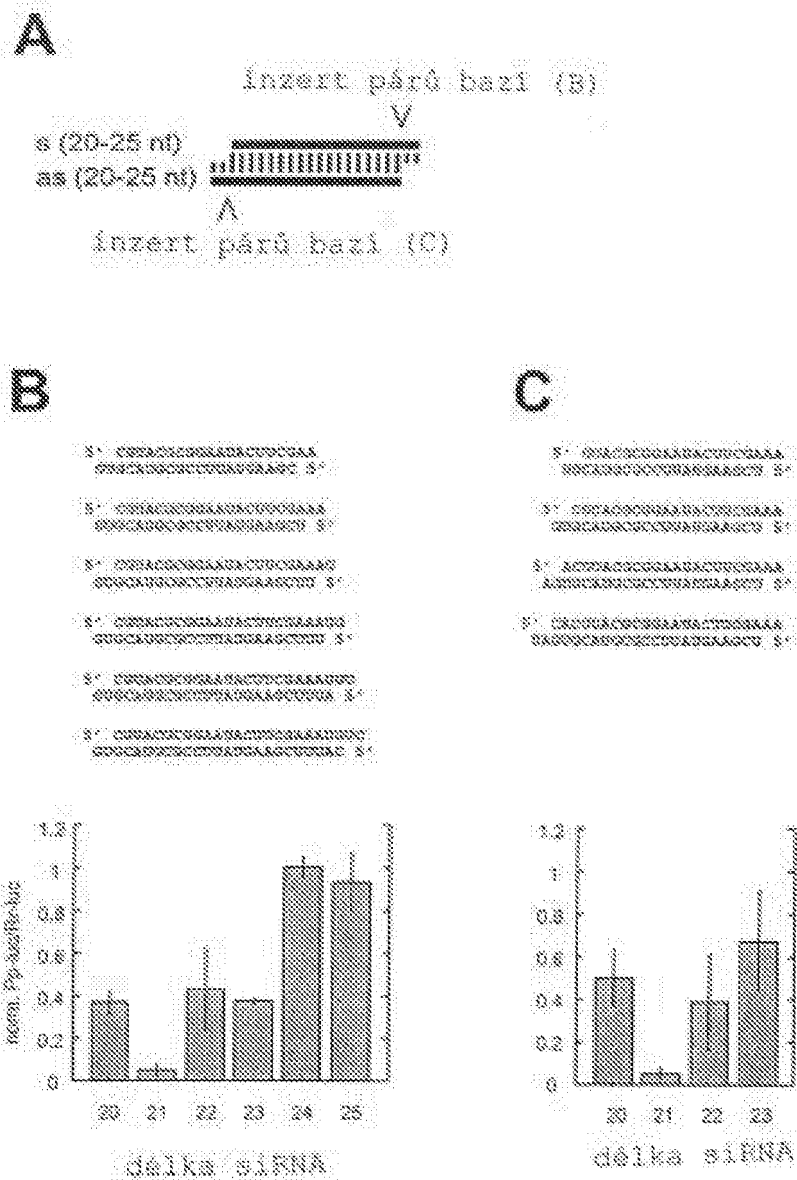
Obr. 10



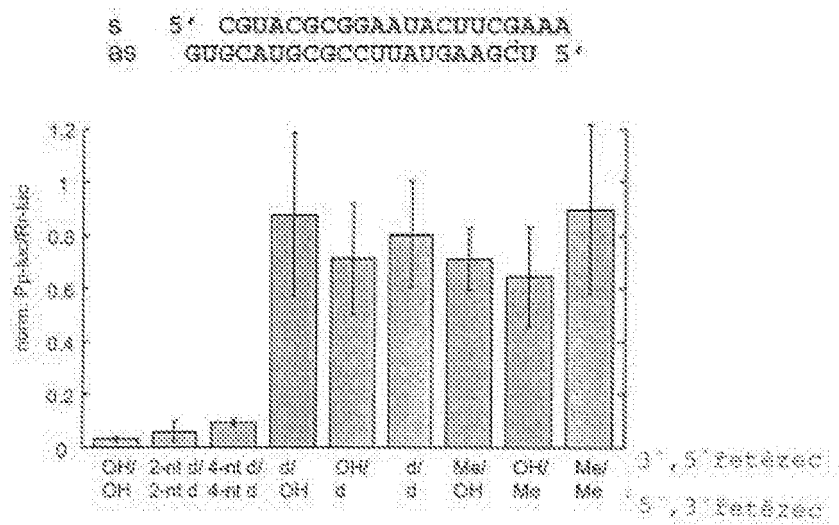
Obr. 11



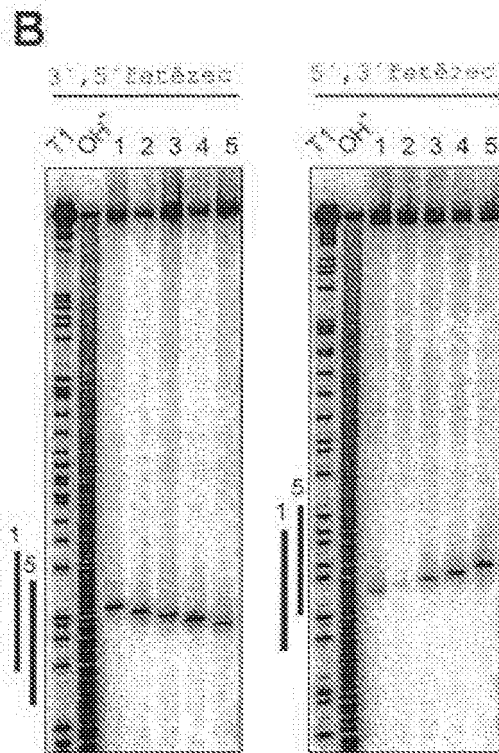
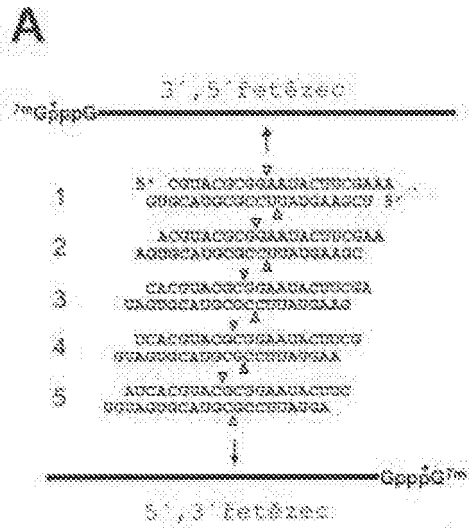
Obr. 12



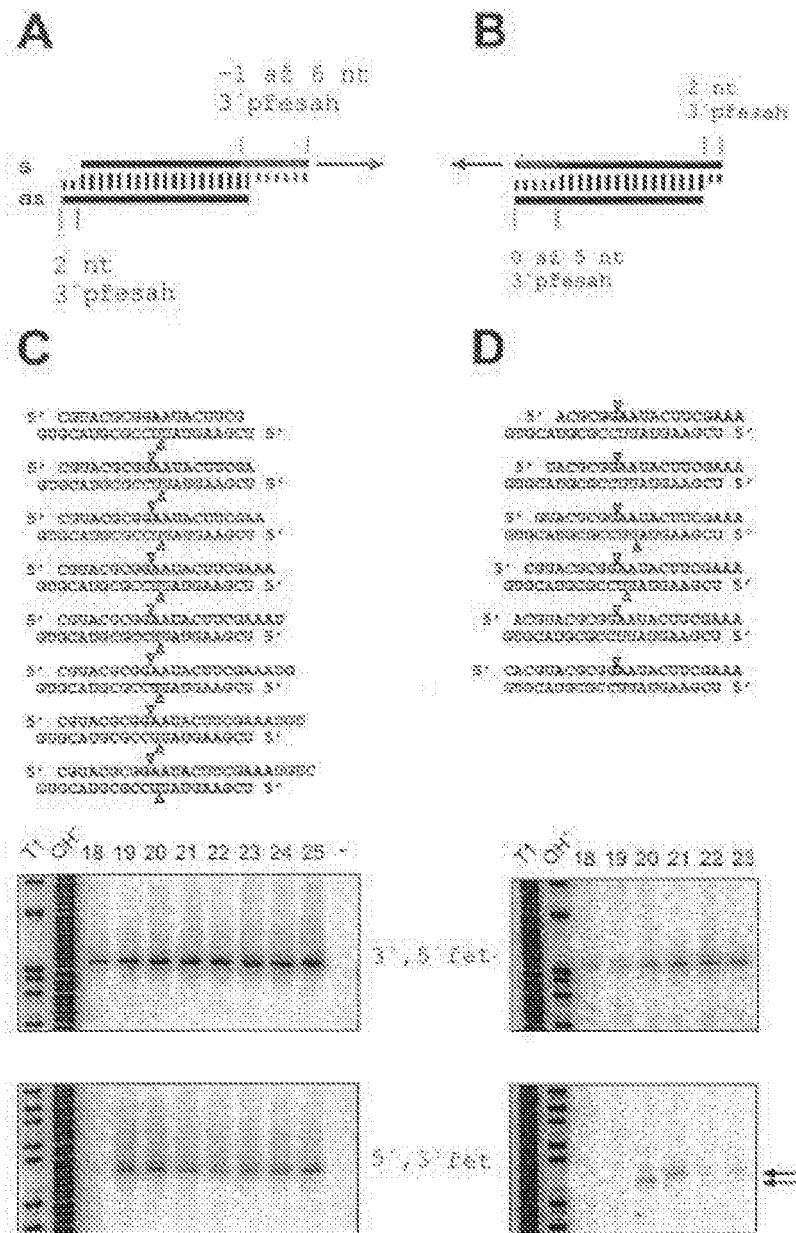
Obr. 13



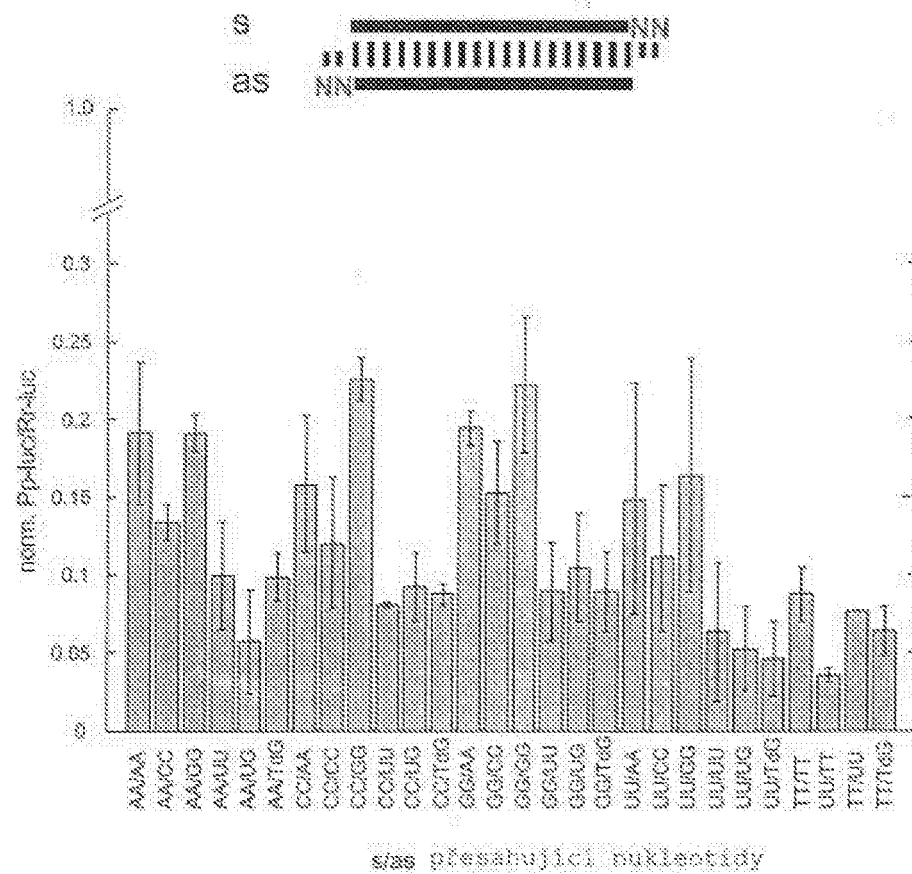
Obr. 14



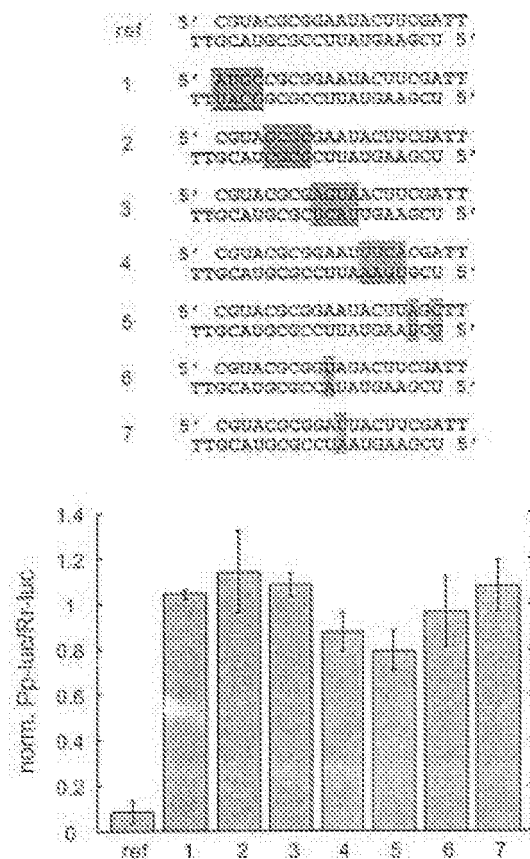
Obr. 15



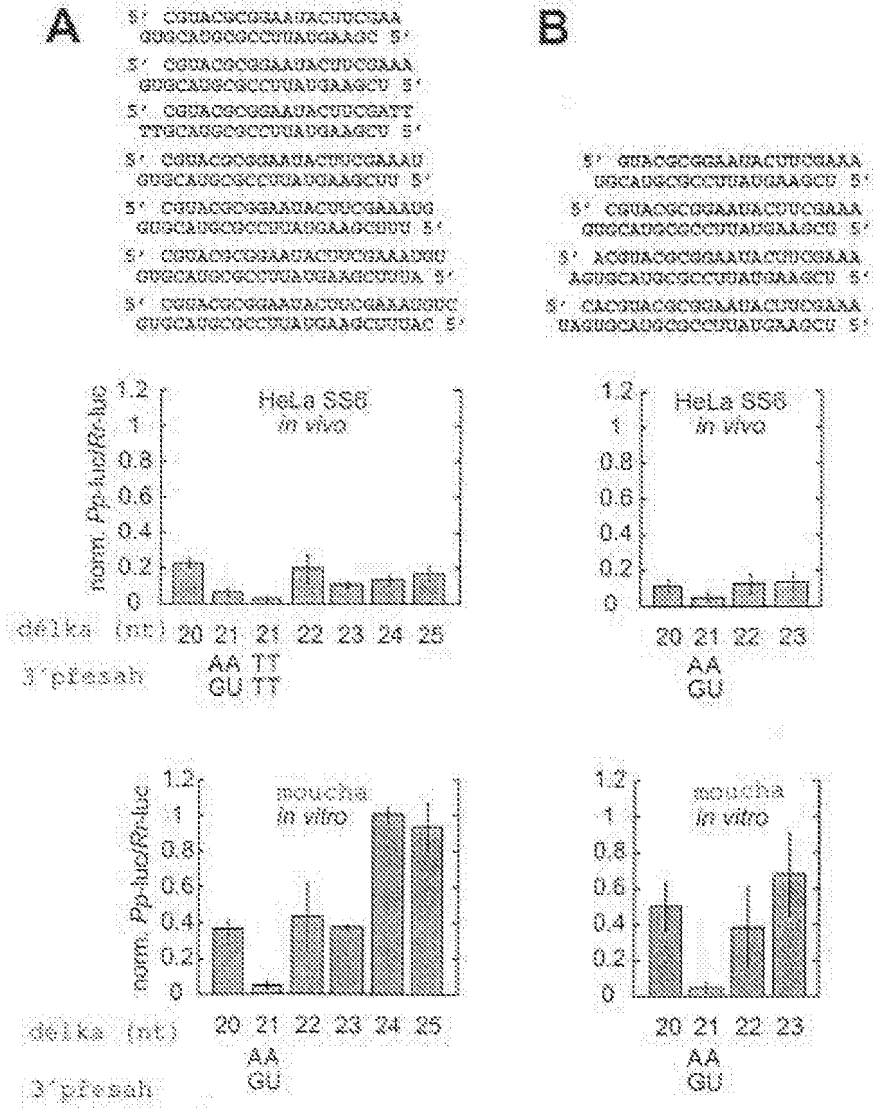
Obr. 16



Obr. 17



Obr. 18



Obr. 19