



(12) PATENT

(19) NO

(11) 333713

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20032464	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.11.29 PCT/EP2001/13968
(22)	Inng.dag	2003.05.30	(85)	Videreføringsdag	2003.05.30
(24)	Løpedag	2001.11.29	(30)	Prioritet	2000.12.01, EP, 00126325 2001.03.30, US, 279661
(41)	Alm.tilgj	2003.07.21			
(45)	Meddelt	2013.09.02			
(73)	Innehaver	Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften eV, Hofgartenstrasse 8, DE-80539 MÜNCHEN, Tyskland Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL), Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, DE-, Tyskland			
(72)	Oppfinner	Winfried Lendeckel, Blinde Gasse 52, DE-37318 HOHENGANDERN, Tyskland Matthias Wilm, c/o University College Dublin, Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, Room F054, IE- BELFIELD, 4 DUBLIN, Irland Thomas Tuschl, 682 St. Marks Avenue, US-NY11216-3605 BROOKLYN, USA Sayda Mahgoub Elbashir, 12 Grozier Road, US-MA02138 CAMBRIDGE, USA Reinhard Lührmann, Baurat-Gerber-Str. 8, DE-37073 GÖTTINGEN, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Isolert, dobbelttrådet RNA-molekyl og dets anvendelse, fremgangsmåte for dets fremstilling, in vitro fremgangsmåte for mediering av målspesifikke RNA interferenser og dens anvendelse, samt farmasøytisk sammensetning			
(56)	Anførte publikasjoner	wo 0175164 a2 Wo 0175164 A2 Bass B.L. Double ζ stranded RNA as a template for gene silencing. Cell, 2000, Vol. 101, Side 235-238. Parrish s. et al. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. Mol Cell. 2000, Vol. 6, side 1077-87. WO 0044895 A1			
(57)	Sammendrag				

Dobbelttrådet RNA (dsRNA) induserer sekvensspesifikk posttranskripsjonell geninaktivering i mange organismer med en prosess kjent som RNA-interferens (RNAi). Ved å anvende et Drosophila in vitro-system demonstrerer vi at 19-23 nt korte RNA-fragmenter er de sekvensspesifikke mediatorene av RNAi. De korte, interfererende RNA'ene (siRNA'ene) genereres ved en RNase III-lignende prosesseringsreaksjon fra langt dsRNA. Kjemisk syntetiserte siRNA-duplekser med overhengende 3'ender medierer effektiv mål-RNA kutting i lysatet, og kuttetsetet er lokalisert nær senteret til regionen dekket av guide-siRNA'et. Videre tilveiebringer vi bevis for at dsRNA-prosesseringsretningen avgjør hvorvidt sens- eller antisens mål-RNA kan bli kuttet med det dannede siRNP-komplekset.

Foreliggende oppfinnelse angår sekvens- og strukturelle egenskaper til dobbelttrådede (ds) RNA-molekyler som er nødvendige for å mediere målspesifikke nukleinsyremodifiseringer slik som RNA-interferens.

Oppfinnelsen angår således et isolert, dobbelttrådet RNA-molekyl og dets anvendelse, en fremgangsmåte for dets fremstilling, in vitro fremgangsmåte for mediering av målspesifikke RNA interferenser og dens anvendelse, samt
5 farmasøytisk sammensetning, som angitt i innledningen til de selvstendige patentkravene.

Betegnelsen "RNA-interferens" (RNAi) oppstod etter oppdagelsen av at injeksjon av dsRNA inn i nematoden *C. elegans* fører til spesifikk inaktivering av gener som
10 har høy sekvenshomologi med det leverte dsRNA'et (Fire et al., 1998). RNAi ble deretter også observert i insekter, frosker (Oelgeschlager et al., 2000) og andre dyr inkludert mus (Svoboda et al., 2000; Wianny og Zernicka-Goetz, 2000) og forekommer også trolig i menneske. RNAi er nært koblet til den posttranskripsjonelle geninaktiverings (PTGS) -mekanismen for kosuppresjon i
15 planter og undertrykking i sopp (Catalanotto et al., 2000; Cogoni og Macino, 1999; Dalmay et al., 2000; Ketting og Plasterk, 2000; Mourrain et al., 2000; Smardon et al., 2000) og noen komponenter i RNAi-maskineriet er også nødvendige for posttranskripsjonell inaktivering ved kosuppresjon (Catalanotto et al., 2000; Dernburg et al., 2000; Ketting og Plasterk, 2000). Temaet har også blitt beskrevet
20 nylig (Bass, 2000; Boshier og Labouesse, 2000; Fire, 1999; Plasterk og Ketting, 2000; Sharp, 1999; Sijen og Kooter, 2000), se også hele nummeret av Plant Molecular Biology, vol. 43, utgave 2/3, (2000).

WO 01/75164 beskriver flere typer av RNAi molekyler som er blitt betraktet å være
25 involvert i forskjellige stadier av RNAi sporet. Disse RNAi molekyler er enkelttrådet, korte molekyler, dobbelttrådet lange molekyler og buttendet, dobbelttrådet korte molekyler.

Bass (Cell, vol. 101, side 235-238, 2000) er en artikkel som omtaler en rekke
30 vitenskapelige publikasjoner om RNA interferens (RNAi).

Parrish et. al (Molecular Cell, vol. 6, side 1077-1087, 2000) beskriver de ulike krav til trigger tråder i RNA interferens.

WO 00/44895 A1 angår et medikament som inneholder minst ett dobbelttrådet
5 oligoribonukleotid (dsRNA) designet til å inhibere ekspresjon av et målgen.

I planter kan innførte transgener, i tillegg til PTGS, også føre til transkripsjonell
geninaktivering via RNA-styrt DNA-metylering av cytosiner (se referanser i
Wassenegger, 2000). Genomiske mål som er så korte som 30 bp metyleres i
10 planter på en RNA-styrt måte (Pelissier, 2000). DNA-metylering foreligger også i
pattedyr.

Den naturlige funksjonen av RNAi og kosuppresjon ser ut til å være beskyttelse av
genomet mot invasjon av mobile genetiske elementer slik som retrotransposoner
15 og virus som produserer avvikende RNA eller dsRNA i vertscellen når de blir
aktive (Jensen et al., 1999; Ketting et al., 1999; Ratcliff et al., 1999; Tabara et al.,
1999). Spesifikk mRNA-nedbrytning hindrer transposon og virusreplikasjon, selv
om noen virus kan overvinne eller hindre denne prosessen ved ekspresjon av
proteiner som undertrykker PTGS (Lucy et al., 2000; Voinnet et al., 2000).

20

dsRNA utløser den spesifikke nedbrytningen av homologe RNA'er bare i regionen
som har likhet med dsRNA'et (Zamore et al., 2000). dsRNA'et prosesseres til 21-
23 nt RNA-fragmenter og mål-RNA kuttetene er atskilt 21-23 nt fra hverandre.
Det har derfor blitt indikert at 21-23 nt fragmentene er guide-RNA'ene for
25 målgjenkjennelse (Zamore et al., 2000). Disse korte RNA'ene ble også detektert i
ekstrakter fremstilt fra *D. melanogaster* Schneider 2-celler som ble transfektert
med dsRNA før cellelysering (Hammond et al., 2000), fraksjonene som hadde
sekvensspesifikk nukleaseaktivitet inneholdt imidlertid også en stor fraksjon av
residualt dsRNA. Rollen 21-23 nt fragmentene har i å guide mRNA-kutting er
30 videre støttet av observasjonen av at 21-23 nt fragmenter isolert fra prosessert
dsRNA i en viss grad kan mediere spesifikk mRNA-nedbrytning (Zamore et al.,
2000). RNA-molekyler med lignende størrelse akkumulerer også i plantevev som
har PTGS (Hamilton og Baulcombe, 1999).

Her anvender vi det etablerte *Drosophila in vitro*-systemet (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000) for å videre undersøke mekanismen til RNAi. Vi demonstrerer at korte 21 og 22 nt RNA'er, når de er baseparet med 3' overhengende ender, virker som guide-RNA'ene for sekvensspesifikk mRNA-nedbrytning. Korte 30 bp dsRNA'er kan ikke mediere RNAi i dette systemet, fordi de ikke lenger
5 prosesseres til 21 og 22 nt RNA'er. Videre definerte vi mål-RNA kuttasetene i forhold til de 21 og 22 nt korte, interfererende RNA'ene (siRNA'er) og gir bevis for at retningen av dsRNA-prosessering avgjør hvorvidt et sense eller et antisense mål-RNA kan bli kuttet av det dannede siRNP-endonukleasekomplekset. Videre
10 kan siRNA'ene også være viktige verktøy for transkripsjonell modulering, f.eks. inaktivering, av mammalske gener ved å guide DNA-metylering.

Videre eksperimenter i humane *in vivo*-cellekultursystemer (HeLa-celler) viser at dobbelttrådede RNA-molekyler med en lengde på fortrinnsvis fra 19-23 nukleotider
15 har RNAi-aktivitet.

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe nye agenser som kan mediere målspesifikk RNA-interferens, der nevnte agenser har en forbedret effektivitet og sikkerhet sammenlignet med tidligere agenser på området.

20

Løsningen på dette problemet er tilveiebrakt ved et isolert dobbelttrådet RNA-molekyl, hvor hver RNA-tråd har en lengde fra 19-23 nukleotider og hvor minst én tråd har et 3' overheng med fra 1-3 nukleotider, hvor nevnte RNA-molekyl er i stand til målspesifikk RNA-interferens. Minst én tråd har som nevnt et 3' overheng
25 med fra 1-3 nukleotider, og mest foretrukket 2 nukleotider. Den andre tråden kan være buttendet eller har opp til 6 nukleotider i 3' overheng.

RNA-molekylet er fortrinnsvis et syntetisk RNA-molekyl som er vesentlig fri for kontaminanter forekommende i celleekstrakter, f.eks. fra *Drosophila*-embryoer.
30 Videre er RNA-molekylet fortrinnsvis vesentlig fri for enhver ikke-mål-spesifikk kontaminant, spesielt ikke-mål-spesifikke RNA-molekyler f.eks. fra kontaminanter forekommende i celleekstrakter.

Videre angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å fremstille et dobbeltrådet RNA-molekyl ifølge oppfinnelsen, som omfatter trinnene:

- 5 a) syntetisere to RNA-tråder som hver har en lengde fra 19-23 nukleotider og hvor minst én har et 3' overheng med fra 1-3 nukleotider, der nevnte RNA-tråder kan danne et dobbeltrådet RNA-molekyl,
- b) kombinere de syntetiserte RNA-trådene under betingelser der et dobbeltrådet RNA molekyl dannes som er i stand til målspesifikk RNA interferens.

- 10 Videre angår foreliggende oppfinnelse en in vitro fremgangsmåte for mediering av målspesifikke RNA interferenser i en eukaryot celle, som omfatter trinnene:

- a) la nevnte celle komme i kontakt med det dobbeltrådede RNA-molekylet ifølge oppfinnelsen under betingelser der målspesifikke RNA interferenser kan forekomme, og
- 15 b) mediere en målspesifikk RNA interferens utført av det dobbeltrådede RNA'et mot en målnukleinsyre som har en sekvensdel som svarer i alt vesentlig til det dobbeltrådede RNA'et.

- Videre angår foreliggende oppfinnelse anvendelse av in vitro fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for å bestemme funksjonen til et gen i en celle, og angår også anvendelse av in vitro fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for modulering av funksjonen til et gen i en celle.
- 20

- Videre angår oppfinnelsen anvendelse av et dobbeltrådet RNA molekyl ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for å modulere funksjonen til et patogen-assosiert gen som er et viralt gen, og angår også anvendelse av et dobbeltrådet RNA molekyl ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for å modulere funksjonen til henholdsvis et tumor-assosiert gen og til et gen assosiert med en autoimmun sykdom.
- 25

30

Videre angår oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning som inneholder minst ett dobbeltrådet RNA-molekyl ifølge oppfinnelsen som et aktivt stoff og en farmasøytisk bærer.

Disse og ytterligere trekk ved oppfinnelsen er angitt ved de i kravene anførte trekk.

Overraskende ble det funnet at syntetiske, korte, dobbelttrådede RNA-molekyler med overhengende 3' ender er sekvensspesifikke mediatorer av RNAi og
 5 medierer effektiv mål-RNA kutting, der kuttesetet er lokalisert nær senteret til regionen dekket av det guidende, korte RNA'et.

Fortrinnsvis har hver tråd av RNA-molekylet en lengde fra 20-22 nukleotider, der lengden av hver tråd kan være lik eller forskjellig. Lengden av 3' overhenget er fra
 10 1-3 nukleotider, der lengden av overhenget kan være lik eller forskjellig for hver tråd. RNA-trådene har fortrinnsvis 3' hydroksylgrupper. 5'-terminalen omfatter fortrinnsvis en fosfat-, difosfat-, trifosfat- eller hydroksylgruppe. De mest effektive dsRNA'ene er sammensatt av to 21 nt tråder som er paret slik at 1-3, spesielt 2 nt 3' overheng er til stede på begge endene av dsRNA'et.

15 Mål-RNA kuttereaksjonen guidet av siRNA'er er svært sekvensspesifikk. Ikke alle posisjonene til et siRNA bidrar imidlertid like mye til målgjenkjennelse. Feilmatch i senteret av siRNA-dupleksen er mest kritisk og opphever praktisk talt mål-RNA kutting. Derimot bidrar ikke 3' nukleotidet til siRNA-tråden (f.eks. posisjon 21) som
 20 er komplementært til det enkelttrådede mål-RNA'et til spesifisitet av målgjenkjennelsen. Videre er ikke sekvensen til det uparede 2-nt 3' overhenget til siRNA-tråden med den samme polariteten som mål-RNA'et kritisk for mål-RNA kutting, ettersom bare antisense siRNA-tråden guider målgjenkjennelse. Fra de enkelttrådede overhengende nukleotidene trenger derfor bare den nest siste
 25 posisjonen i antisense-siRNA'et (f.eks. posisjon 20) å matche det målrettede sense mRNA'et.

Overraskende har de dobbelttrådede RNA-molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse høy *in vivo*-stabilitet i serum eller i vekstmedium for cellekulturer. For
 30 videre og øke stabiliteten, kan 3' overhengene bli stabilisert mot nedbrytning, f.eks. kan de bli valgt slik at de består av purinnukleotider, spesielt adenosin- eller guanosinnukleotider. Alternativt tolereres substitusjon av pyrimidinnukleotider med modifiserte analoger, f.eks. substitusjon av uridin 2 nt 3' overheng med 2'-deoksytymidin, og affiserer ikke effektiviteten til RNA-interferens. Fraværet av en

2' hydroksyl øker nukleaseresistensen til overhenget i vevsdyrkningsmedium signifikant.

I en spesielt foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse kan RNA-
5 molekylet inneholde minst én modifisert nukleotidanalogue. Nukleotidanalogene kan bli plassert i posisjoner hvor den målspesifikke aktiviteten, f.eks. den RNAi-medierende aktiviteten, ikke blir vesentlig påvirket, f.eks. i en region på 5'-enden og/eller 3' enden av det dobbelttrådede RNA-molekylet. Spesielt kan overhengene bli stabilisert ved å inkorporere modifiserte nukleotidanaloger.

10

Foretrukne nukleotidanaloger velges fra sukker- eller ryggradmodifiserte ribonukleotider. Det bør imidlertid bli registrert at også nukleobasemodifiserte ribonukleotider, dvs. ribonukleotider, inneholdende en ikke-naturlig forekommende nukleobase i stedet for en naturlig forekommende nukleobase slik som uridiner
15 eller cytidiner modifisert på 5-posisjonen, f.eks. 5-(2-amino)propyluridin, 5-bromuridin; adenosiner og guanosiner modifisert på 8-posisjonen, f.eks. 8-bromguanosin; deazanukleotider, f.eks. 7-deaza-adenosin; O- og N-alkylerte nukleotider, f.eks. N6-metyladenosin, er egnet. I foretrukne sukkermodifiserte ribonukleotider byttes 2' OH-gruppen med en gruppe valgt fra H, OR, R, halo, SH,
20 SR, NH₂, NHR, NR₂ eller CN, der R er C₁-C₆ alkyl, alkenyl eller alkynyl og halo er F, Cl, Br eller I. I foretrukne ryggradmodifiserte ribonukleotider byttes fosfoestergruppen koblet til tilgrensende ribonukleotider ut med en modifisert gruppe, f.eks. av fosfotioatgruppe. Det bør bli registrert at modifiseringene ovenfor kan bli kombinert.

25

Sekvensen til det dobbelttrådede RNA-molekylet ifølge foreliggende oppfinnelse må ha en tilstrekkelig likhet med et nukleinsyremålmolekyl for å mediere målspesifikk RNAi. Fortrinnsvis har sekvensen en likhet på minst 70 % med det
ønskede målmolekylet i den dobbelttrådede delen av RNA-molekylet. Mer
30 foretrukket er likheten minst 85 % og mest foretrukket 100 % i den dobbelttrådede delen av RNA-molekylet. Likheten av et dobbelttrådet RNA-molekyl med et forhåndsbestemt nukleinsyremålmolekyl, f.eks. et mRNA-målmolekyl, kan bli bestemt som følger:

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

der I er likheten i prosent, n er antallet identiske nukleotider i den dobbelttrådede delen av dsRNA'et og målet, og L er lengden av sekvensoverlappingen mellom den dobbelttrådede delen av dsRNA'et og målet.

Alternativt kan likheten av det dobbelttrådede RNA-molekylet i forhold til målsekvensen også bli definert inkludert 3' overhenget, spesielt et overheng med en lengde fra 1-3 nukleotider. I dette tilfellet er sekvenslikheten fortrinnsvis minst minst 70 % og mest foretrukket minst 85 % i forhold til målsekvensen. For eksempel kan nukleotidene fra 3' overhenget og opp til 2 nukleotider fra 5' og/eller 3' terminalen av dobbelttråden bli modifisert uten signifikant tap av aktivitet.

Fremgangsmåter for syntetisering av RNA-molekyler er kjent på området. I denne konteksten henvises det spesielt til kjemiske syntesefremgangsmåter som er beskrevet i Verma og Eckstein (1998).

De enkelttrådede RNA'ene kan også bli fremstilt med enzymatisk transkripsjon fra syntetiske DNA-templater eller fra DNA-plasmider isolert fra rekombinante bakterier. Typisk anvendes fag RNA-polymeraser slik som T7, T3 eller SP6 RNA-polymerase (Milligan og Uhlenbeck (1989)).

Fortrinnsvis omfatter kontakttrinnet (a) i in vitro fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen innføring av det dobbelttrådede RNA-molekylet i en eukaryot målcelle, f.eks. en isolert eukaryot målcelle, f.eks. i cellekultur. Mer foretrukket omfatter innføringstrinnet en bærermediert levering, f.eks. med liposomale bærere eller med injeksjon.

In vitro fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt for å bestemme funksjonen til et gen i en celle eller til og med for modulering av funksjonen til et gen i en celle, som kan mediere RNA-interferens. Cellen er en eukaryot celle eller en cellelinje, f.eks. en plantecelle eller en dyrecelle, slik som

en mammalsk celle, f.eks. en embryonal celle, en pluripotent stamcelle, en tumorcelle, f.eks. en teratokarsinomcelle, eller en virusinfisert celle.

Målgenet som RNA-molekylet ifølge foreliggende oppfinnelse er rettet mot kan
 5 være assosiert med en patologisk tilstand. For eksempel kan genet være et patogenassosiert gen, f.eks. et viralt gen, et tumorassosiert gen eller et gen assosiert med autoimmun sykdom. Målgenet kan også være et heterologt gen uttrykt i en rekombinant celle eller en genetisk modifisert organisme. Ved å bestemme eller modulere, spesielt inhibere, funksjonen til et slikt gen, kan verdifull
 10 informasjon og terapeutiske fordeler i landbruket eller i medisin eller veterinærmedisin bli fremskaffet.

dsRNA'et administreres vanligvis som en farmasøytisk sammensetning. Administreringen kan bli utført med kjente fremgangsmåter, der en nukleinsyre
 15 innføres i en ønsket målcelle *in vitro* eller *in vivo*. Mye anvendte genoverføringsteknikker omfatter kalsiumfosfat, DEAE-dekstran, elektroporering og mikroinjeksjon og virale metoder (Graham, F. L. og van der Eb, A. J. (1973) Virol. 52, 456; McCutchan, J. H. og 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.
 20 Biol. Chem. 255, 10431; Capecchi, M. R. (1980), Cell 22, 479). Et nytt tillegg til dette arsenalet av teknikker for innføring av DNA i celler er anvendelse av kationiske liposomer (Felgner, P. L. et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 7413). Kommersielt tilgjengelige kationiske lipidformuleringer er f.eks. Tfx 50 (Promega) eller Lipofectamin2000 (Life Technologies).

25 Derfor angår oppfinnelsen også som nevnt ovenfor en farmasøytisk sammensetning inneholdende minst ett dobbelttrådet RNA-molekyl som beskrevet ovenfor som et aktivt stoff og en farmasøytisk bærer. Sammensetningen kan bli anvendt for diagnostiske og terapeutiske applikasjoner innen human medisin eller
 30 innen veterinærmedisin.

For diagnostiske eller terapeutiske applikasjoner kan sammensetningen være i form av en løsning, f.eks. en injiserbar løsning, en krem, salve, tablett, suspensjon eller lignende. Sammensetningen kan bli administrert på enhver egnet måte, f.eks.

med injeksjon, med oral-, topisk-, nasal- og rektal applikasjon osv. Bæreren kan være enhver egnet farmasøytisk bærer. Fortrinnsvis anvendes en bærer som kan øke RNA-molekylenes evne til å gå inn i målcellene. Egnede eksempler på slike bærere er liposomer, spesielt kationiske liposomer. En videre foretrukket administreringsmåte er injeksjon.

En annen anvendelse av RNAi-fremgangsmåten som er beskrevet er en funksjonell analyse av eukaryote celler eller eukaryote ikke-humane organismer, fortrinnsvis mammalske celler eller organismer og mest foretrukket humane celler, f.eks. cellelinjer slik som HeLa eller 293, eller gnagere, f.eks. rotter og mus. Ved transfeksjon med egnede dobbelttrådede RNA-molekyler som er homologe med et forutbestemt målgen eller DNA-molekyler som koder for et egnet dobbelttrådet RNA-molekyl, kan en spesifikk knockout-fenotype bli oppnådd i en målcelle, f.eks. i cellekultur eller i en målorganisme. Det er overraskende blitt funnet at nærvær av korte, dobbelttrådede RNA-molekyler ikke resulterer i en interferonrespons fra vertscellen eller vertsorganismen.

Derfor er det ytterligere beskrevet en eukaryot celle eller en eukaryot ikke-human organisme som har en målgenspesifikk knockout-fenotype omfattende en minst delvis defekt ekspresjon av minst ett endogent målgen, der nevnte celle eller organisme er transfektert med minst ett dobbelttrådet RNA-molekyl som kan inhibere ekspresjon av minst ett endogent målgen eller med et DNA som koder for minst ett dobbelttrådet RNA-molekyl som kan inhibere ekspresjon av minst ett endogent målgen. Det bør bli registrert at det tillates en målspesifikk knockout av flere ulike endogene gener pga. spesifisiteten til RNAi.

Genspesifikke knockout-fenotyper av celler eller ikke-humane organismer, spesielt av humane celler eller ikke-humane pattedyr, kan bli anvendt i analytiske prosedyrer, f.eks. i den funksjonelle og/eller fenotypiske analysen av komplekse fysiologiske prosesser, slik som analyse av genekspresjonsprofiler og/eller proteomer. For eksempel kan man fremstille knockout-fenotypene av humane gener i dyrkede celler som er antatt å være regulatorer av alternative spleiseprosesser. Blant disse genene er spesielt medlemmene av SR-spleisefaktorfamilien, f.eks. ASF/SF2, SC35, SRp20, SRp40 eller SRp55. Videre

kan effekten av SR-proteiner på mRNA-profilene av forutbestemte alternativt spleisede gener slik som CD44 bli analysert. Fortrinnsvis utføres analysen med høykapasitetsfremgangsmåter ved å anvende oligonukleotidbaserte brikker.

5 Ved anvendelse av RNAi-baserte knockout-teknologier, kan ekspresjonen av et endogent målgen bli inhibert i en målcelle eller en målorganisme. Det endogene genet kan bli komplementert med en eksogen målnukleinsyre som koder for målproteinet eller en variant eller mutert form av målproteinet, f.eks. et gen eller et cDNA, som eventuelt kan bli koblet til ytterligere en nukleinsyresekvens som koder
10 for et detekterbart peptid eller polypeptid, f.eks. en affinitetsmarkør, spesielt en multippel affinitetsmarkør. Varianter eller muterte former av målgenet er forskjellige fra det endogene målgenet ved at de koder for et genprodukt som er forskjellig fra det endogene genproduktet på aminosyrenivået med substitusjoner, insersjoner og/eller delesjoner av enkle eller multiple aminosyrer. Variantene eller
15 de muterte formene kan ha den samme biologiske aktiviteten som det endogene målgenet. På den annen side kan varianten eller det muterte målgenet også ha en biologisk aktivitet som er forskjellig fra den biologiske aktiviteten til det endogene målgenet, f.eks. en delvis deletert aktivitet, en fullstendig deletert aktivitet, en økt aktivitet osv.

20

Komplementasjonen kan bli utført med koekspresjon av polypeptidet kodet av den eksogene nukleinsyren, f.eks. et fusjonsprotein omfattende målproteinet og affinitetsmarkøren og det dobbelttrådede RNA-molekylet for delesjon av det endogene genet i målcellen. Denne koekspresjonen kan bli utført ved å anvende
25 en egnet ekspresjonsvektor som uttrykker både polypeptidet kodet av den eksogene nukleinsyren, f.eks. det markørmodifiserte målproteinet og det dobbelttrådede RNA-molekylet eller alternativt ved å anvende en kombinasjon av ekspresjonsvektorer. Proteiner og proteinkomplekser som syntetiseres *de novo* i målcellen vil inneholde det eksogene genproduktet, f.eks. det modifiserte
30 fusjonsproteinet. For å unngå suppresjon av den eksogene genprodukt-ekspresjonen med RNAi-dupleksmolekylet, kan nukleotidsekvensen som koder for den eksogene nukleinsyren bli endret på DNA-nivået (med eller uten å forårsake mutasjoner på aminosyrenivået) i delen av sekvensen som er homolog med det

dobbeltrådede RNA-molekylet. Alternativt kan det endogene målgenet bli komplementert med tilsvarende nukleotidsekvenser fra andre arter, f.eks. fra mus.

Foretrukne anvendelser for cellen eller organismen er analysen av
5 genekspresjonsprofiler og/eller proteomer. Spesielt foretrukket utføres en analyse av en variant eller mutant form av ett eller flere målproteiner, der nevnte variant eller mutante former reinnføres i cellen eller organismen med en eksogen målnukleinsyre som beskrevet ovenfor. Kombinasjonen av delesjon av et endogent gen og opprettholdelse ("rescue") ved å anvende mutert mål, f.eks.
10 delvis deletert eksogent mål, har fordeler sammenlignet med anvendelse av en knockout-celle. Videre er denne fremgangsmåten spesielt egnet for identifisering av funksjonelle domener til målproteinet. Ytterligere foretrukket utføres en sammenligning f.eks. av genekspresjonsprofiler og/eller proteomer og/eller fenotypiske karakteristika til minst to celler eller organismer. Disse organismene
15 velges fra:

- (i) en kontrollcelle eller kontrollorganisme uten målgeninhibisjon,
- (ii) en celle eller organisme med målgeninhibisjon og
- (iii) en celle eller organisme med målgeninhibisjon pluss
målgenkomplementasjon med en eksogen målnukleinsyre.

20

Fremgangsmåten og cellen er også egnet i en prosedyre for identifisering og/eller karakterisering av farmakologiske agenser, f.eks. identifisering av nye farmakologiske agenser fra en samling av testsubstanser og/eller karakterisering av virkningsmekanismer og/eller bivirkninger av kjente farmakologiske agenser.

25

Et system for identifisering og/eller karakterisering av farmakologiske agenser som virker på minst ett målprotein er beskrevet som omfatter:

- (a) en eukaryot celle eller en eukaryot ikke-human organisme som kan uttrykke minst ett endogent målgen som koder for nevnte målprotein,
- 30 (b) minst ett dobbeltrådet RNA-molekyl som kan inhibere ekspresjon av nevnte minst ene endogene målgen, og
- (c) en testsubstans eller en samling av testsubstanser der farmakologiske egenskaper til nevnte testsubstans eller nevnte samling skal bli identifisert og/eller karakterisert.

Videre omfatter systemet beskrevet ovenfor fortrinnsvis:

- (a) minst én eksogen målnukleinsyre som koder for målproteinet eller en variant eller mutert form av målproteinet, der nevnte eksogene målnukleinsyre er
 5 forskjellig fra det endogene målgenet på nukleinsyrenivået, slik at ekspresjon av den eksogene målnukleinsyren blir vesentlig mindre inhibert av det dobbelttrådede RNA-molekylet enn ekspresjon av det endogene målgenet.

Videre kan fremgangsmåten for RNA-knockoutkomplementasjon bli anvendt for å
 10 lette opprensing, f.eks. for affinitetsrensing av proteiner eller proteinkomplekser fra eukaryote celler, spesielt mammalske celler og mer spesielt humane celler. I denne utførelsesformen ifølge foreliggende oppfinnelse koder den eksogene målnukleinsyren fortrinnsvis for et målprotein som er koblet til en affinitetsmarkør.

- 15 Fremgangsmåten for å lette opprensingen kan bli anvendt for rensing av høymolekylære proteinkomplekser som fortrinnsvis har en masse på ≥ 150 kD og mer foretrukket på ≥ 500 kD og som eventuelt kan inneholde nukleinsyrer slik som RNA. Spesifikke eksempler er det heterotrimere proteinkomplekset bestående av 20 kD, 60 kD og 90 kD proteinene til U4/U6 snRNP-partikkelen, spleisefaktoren
 20 SF3b fra 17S U2 snRNP bestående av fem proteiner med molekylvekt på 14, 49, 120, 145 og 155 kD og 25S U4/U6/U5 tri-snRNP-partikkelen inneholdende U4, U5 og U6 snRNA-molekylene og ca. 30 proteiner med en molekylvekt på ca. 1,7 MD.

Denne fremgangsmåten er egnet for funksjonell proteomanalyse i mammalske
 25 celler, spesielt humane celler.

Videre er foreliggende oppfinnelse forklart i mer detalj i de følgende figurene og eksemplene.

30 **Figurtekst**

Figur 1: Dobbelttrådet RNA så kort som 38 bp kan mediere RNAi. (A) Grafisk presentasjon av dsRNA'er anvendt for å binde Pp-luc mRNA. Tre serier med rettendede dsRNA'er som dekker et område på 29 til 504 bp ble fremstilt.

Posisjonen til det første nukleotidet på sensestråden til dsRNA'et er vist i forhold til startkodonet i Pp-luc mRNA (p1). (B) RNA-interferenstest (Tuschl et al., 1999). Forhold mellom mål Pp-luc og kontroll Rr-luc aktivitet ble normalisert i forhold til en bufferkontroll (sort stolpe). dsRNA'er (5 nM) ble preinkubert i *Drosophila*-lysat i 15 min ved 25 °C før tilsetning av 7-metyl-guanosin-cap (cap er en beskyttende gruppe på 5' merket ende) Pp-luc og Rr-luc mRNA'er (~ 50 pM). Inkuberingen fortsatte i ytterligere en time og deretter analysert med dual luciferasetest (Promega). Resultatene er gjennomsnittet fra minst fire uavhengige eksperimenter $\pm$ standardavvik.

10

Figur 2: Et 29 bp dsRNA blir ikke lenger prosessert til 21-23 nt fragmenter. Tidsforløp for 21-23 mer dannelse fra prosessering av internt ^{32}P -merkede dsRNA'er (5 nM) i *Drosophila*-lysatet. Lengden og kilden til dsRNA'et er angitt. En RNA-størrelsesmarkør (M) har blitt tilsatt i det venstre sporet og fragmentstørrelsene er antydnet. Doble bånd på tid null skyldes ufullstendig denaturert dsRNA.

15

Figur 3: Korte dsRNA'er kutter mRNA-målmolekylet bare én gang. (A) Denaturerende gelelektroforeser av de stabile 5' kutteproduktene dannet med 1 times inkubering av 10 nM sense- eller antisense-RNA ^{32}P -merket cap med 10 nM dsRNA'er av p133 serien i *Drosophila*-lysat. Lengdemarkører ble generert ved delvis nuklease T1-kutting og delvis alkalisk hydrolyse (OH) av det cap-merkede mål-RNA'et. Regionene bundet av dsRNA'ene er indikert som sorte streker på begge sider. Sekvensen på 20-23 nt mellom de dominerende kuttsetene for det 111 bp lange dsRNA'et er vist. Den horisontale pilen indikerer uspesifikk kutting som ikke skyldes RNAi. (B) Posisjon av kuttsetene på sense og antisense mål-RNA'er. Sekvensene til 177 nt sense og 180 nt antisense mål-RNA'ene som har cap er vist i antiparallell retning, slik at komplementære sekvenser står ovenfor hverandre. Regionen bundet av de ulike dsRNA'ene er antydnet med forskjellige fargede streker plassert mellom sense- og antisensemålsekvenser. Kuttseter er indikert med sirkler: stor sirkel for sterk kutting, liten sirkel for svak kutting. Den ^{32}P -radioaktivt merkede fosfatgruppen er merket med en stjerne.

20

25

30

Figur 4: 21 og 22 nt RNA-fragmenter genereres med en RNase III-lignende mekanisme. (A) Sekvenser på ~21 nt RNA'er etter dsRNA-prosessering. ~21 nt RNA-fragmenter generert ved dsRNA-prosessering ble klonet i en bestemt retning og sekvensert. Oligoribonukleotider som kom fra sensestråden til dsRNA'et er vist som blå linjer, de som kom fra antisensestråden som røde linjer. Tykke streker anvendes hvis den samme sekvensen var til stede i multiple kloner, der antallet til høyre indikerer frekvensen. Mål-RNA kuttetene medierte av dsRNA'et er vist som oransje sirkler, stor sirkel for sterk kutting, liten sirkel for svak kutting (se Figur 3B). Sirkler på toppen av sensestråden antyder kuttetene i sensemålet, og sirkler på bunnen av dsRNA'et indikerer kuttetene i antisensemålet. Opp til fem ekstra nukleotider ble identifisert i ~21 nt fragmenter avledet fra 3' endene til dsRNA'et. Disse nukleotidene er tilfeldige kombinasjoner av hovedsakelig C-, G- eller A-rester og ble mest sannsynlig tilsatt på en tilfeldig måte (uten templat) i løpet av T7-transkripsjon av trådene som utgjør dsRNA. (B) Todimensjonal TLC-analyse av nukleotidsammensetningen til ~21 nt RNA'er. ~21 nt RNA'ene ble generert ved inkubering av internt radioaktivt merket 504 bp Pp-luc dsRNA i *Drosophila*-lysat, gelrenset og deretter kuttet til mononukleotider med nuklease P1 (øverste rad) eller ribonuklease T2 (nederste rad). dsRNA'et ble radioaktivt merket internt ved transkripsjon i nærvær av én av de indikerte α - ^{32}P nukleosidtrifosfatene. Radioaktivitet ble detektert med fosforbildeanalyse. Nukleosid 5'-monofosfater, nukleosid 3'-monofosfater, nukleosid 5',3'-difosfater og uorganisk fosfat er indikert som henholdsvis pN, Np, pNp og p_i. Sorte sirkler indikerer UV-absorberende flekker fra ikke-radioaktive bærernukleotider. 3',5'-bisfosfatene (røde sirkler) ble identifisert med migrasjon sammen med radioaktivt merkede standarder fremstilt med 5'-fosforylering av nukleosid 3'-monofosfater med T4-polynukleotidkinase og γ - ^{32}P -ATP.

Figur 5: Syntetiske 21 og 22 nt RNA'er medierer mål-RNA kutting. (A) Grafisk presentasjon av kontroll 52 bp dsRNA og syntetiske 21 og 22 nt dsRNA'er. Sensestråden til 21 og 22 nt korte, interfererende RNA'er (siRNA'er) er vist i blått, antisensestråden i rødt. Sekvensene til siRNA'ene ble avledet fra de klonede fragmentene til 52 og 111 bp dsRNA'er (Figur 4A), bortsett fra 22 nt antisensestråden til dupleks 5. siRNA'ene i dupleks 6 og 7 var unike for den 111 bp

dsRNA-prosesseringsreaksjonen. De to 3' overhengende nukleotidene indikert i grønt foreligger i sekvensen til den syntetiske antisensetråden til dupleks 1 og 3. Begge trådene til kontroll 52 bp dsRNA'et ble fremstilt med *in vitro*-transkripsjon, og en fraksjon av transkripter kan inneholde vilkårlig 3' nukleotidtilsetning. Mål-

5 RNA kuttesetene styrt av siRNA-dupleksene er indikert som oransje sirkler (se tekst til Figur 4A) og ble bestemt som vist i Figur 5B. (B) Posisjon til kuttesetene på sense og antisense mål-RNA'er. Mål-RNA sekvensene er som beskrevet i Figur 3B. Kontroll 52 bp dsRNA (10 nM) eller 21 og 22 nt RNA-dupleksene 1-7 (100 nM) ble inkubert med mål-RNA i 2,5 t ved 25 °C i *Drosophila*-lysat. De stabile

10 5' kutteproduktene ble bestemt på gelen. Kuttesetene er indikert i Figur 5A. Regionen bundet av 52 bp dsRNA'et eller sense (s) eller antisense (as) trådene er indikert med de sorte strekene ved siden av gelen. Kuttesetene er alle lokalisert i regionen som er identisk med dsRNA'ene. For nøyaktig bestemmelse av kuttesetene for antisensetråden ble en gel med lavere prosent anvendt.

15

Figur 6: Lange 3' overheng på korte dsRNA'er inhiberer RNAi. (A) Grafisk presentasjon av 52 bp dsRNA-konstruksjoner. 3' forlengelsene av sense- og antisensetråd er indikert i henholdsvis blått og rødt. De observerte kuttesetene på mål-RNA'ene er vist som oransje sirkler analogt til Figur 4A og ble bestemt som

20 vist i Figur 6B. (B) Posisjon av kuttesetene på sense og antisense mål-RNA'er. Mål-RNA sekvensene er som beskrevet i Figur 3B. dsRNA (10 nM) ble inkubert med mål-RNA i 2,5 t ved 25 °C i *Drosophila*-lysat. De stabile 5' kutteproduktene ble bestemt på gelen. Hovedkuttsetene er indikert med en horisontal pil og er også vist i Figur 6A. Regionen bundet av 52 bp dsRNA'et er vist som sort strek på

25 begge sider av gelen.

Figur 7: Foreslått modell for RNAi. RNAi er antatt å begynne med prosessering av dsRNA (sensetråd i sort, antisensetråd i rødt) til hovedsakelig 21 og 22 nt korte, interfererende RNA'er (siRNA'er). Korte overhengende 3' nukleotider, hvis de

30 foreligger på dsRNA'et, kan være fordelaktige for prosessering av korte dsRNA'er. De dsRNA-prosesserende proteinene, som trenger å bli karakterisert, er vist som grønne og blå ovaler og sammenstilt på dsRNA'et på asymmetrisk måte. I vår modell er dette vist ved binding av et hypotetisk blått protein eller proteindomene med siRNA-tråden i 3' til 5' retning, mens det hypotetisk grønne proteinet eller

proteindomenet alltid er bundet til den motstående siRNA-tråden. Disse proteinene eller en undergruppe forblir assosiert med siRNA-dupleksen og bevarer dens retning som er bestemt ved retningen til dsRNA-prosesseringsreaksjonen. Kun siRNA-sekvensen assosiert med det blå proteinet kan guide kutting av mål-RNA.

5 Endonukleasekomplekset henvises til som lite, interfererende ribonukleoproteinkompleks eller siRNP. Det er antatt heri at endonukleasen som kutter dsRNA'et også kan kutte mål-RNA'et, trolig ved midlertidig fjerning av den passive siRNA-tråden som ikke er anvendt for målgjenkjennelse. Mål-RNA'et kuttet deretter i senteret av regionen gjenkjent av det sekvenskomplementære

10 guide-siRNA'et.

Figur 8: Rapportørkonstruksjoner og siRNA-duplekser. (a) Ildflue (Pp-luc) og *Renilla reniformis* (Rr-luc) luciferaserapportørgenregionene fra plasmidene pGL2-kontroll, pGL-3-kontroll og pRL-TK (Promega) er vist. SV40-regulatorelementer, HSV-tymidinkinasepromoteren og to introner (linjer) er indikert. Sekvensen til GL3-luciferase er 95 % identisk med GL2, men RL er fullstendig ubeslektet med begge. Luciferaseekspressjon fra pGL2 er omtrent 10 ganger lavere enn fra pGL3 i transfekterte mammalske celler. Regionen bundet av siRNA-dupleksene er indikert som sort strek under den kodende regionen til luciferasegenene. (b)

15 Sense (øvre) og antisense (nedre) sekvenser til siRNA-dupleksene som binder GL2-, GL3- og RL-luciferase er vist. GL2 og GL3 siRNA-dupleksene er bare forskjellige i 3 enkle nukleotids substitusjoner (grå boks). Som uspesifikk kontroll ble en dupleks med den inverterte GL2-sekvensen, invGL2, syntetisert. 2 nt 3' overhenger til 2'-deoksytymidin er indikert som TT; uGL2 ligner på GL2 siRNA,

20 men inneholder ribouridin 3' overheng.

25

Figur 9: RNA-interferens med siRNA-duplekser. Forhold av målkontrolluciferase ble normalisert i forhold til en bufferkontroll (bu, sorte stolper); grå stolper indikerer forhold av *Photinus pyralis* (Pp-luc) GL2- eller GL3-luciferase til *Renilla reniformis* (Rr-luc) RL-luciferase (venstre akse), hvite stolper indikerer RL til GL2 eller GL3 forhold (høyre akse). Panel a, c, e, g og i beskriver eksperimenter utført med kombinasjonen av pGL2-kontroll og pRL-TK rapportørplasmider, panel b, d, f, h og j med pGL3-kontroll og pRL-TK rapportørplasmider. Cellelinjen anvendt for interferensforsøket er indikert på toppen av hvert stolpediagram. Forholdene av

30

Pp-luc/Rr-luc for bufferkontrollen (bu) varierte mellom henholdsvis 0,5 og 10 for pGL2/pRL og mellom 0,03 og 1 for pGL3/pRL før normalisering og mellom de ulike cellelinjene som ble testet. De plottede resultatene er gjennomsnitt fra tre uavhengige eksperimenter $\pm$ SD.

5

Figur 10: Effekter av 21 nt siRNA, 50 bp og 500 bp dsRNA'er på luciferaseekspressjon i HeLa-celler. Den nøyaktige lengden av de lange dsRNA'ene er indikert under stolpene. Panel a, c og e beskriver eksperimenter utført med pGL2-kontroll og pRL-TK rapportørplasmider, panel b, d og f med pGL3-kontroll og pRL-TK rapportørplasmider. Resultatene er gjennomsnitt fra to uavhengige eksperimenter $\pm$ SD. (a), (b) Absolutt Pp-luc ekspressjon, plottet i arbitrære luminescensenheter. (c), (d) Rr-luc ekspressjon, plottet i arbitrære luminescensenheter. (e), (f) Forhold av normaliserte mål i forhold til kontrolluciferase. Forhold av luciferaseaktivitet for siRNA-duplekser ble normalisert i forhold til en bufferkontroll (bu, sorte stolper); luminescensforholdene for 50 eller 500 bp dsRNA'er ble normalisert i forhold til de respektive forholdene observert for 50 og 500 bp dsRNA fra humanisert GFP (hG, sorte stolper). Det bør bli registrert at de totale forskjellene i sekvenser mellom de 49 og 484 bp dsRNA'ene som binder GL2 og GL3 ikke er tilstrekkelig for å gi spesifisitet mellom GL2- og GL3-mål (43 nt sammenhengende likhet i 49 bp segment, 239 nt lengste sammenhengende likhet i 484 bp segment).

Figur 11: Variasjon av 3' overhenget til duplekser av 21-nt siRNA'er. (A) Oversikt over den eksperimentelle strategien. Sense mål-mRNA'et som er polyadenylert og har cap er vist, og de relative posisjonene til sense- og antisense-siRNA'er er vist. Åtte serier av duplekser, i henhold til de åtte ulike antisensetrådene, ble fremstilt. siRNA-sekvensene og antallet overhengende nukleotider ble forandret i 1-nt trinn. (B) Normalisert relativ luminescens av målluciferase (*Photinus pyralis*, Pp-luc) i forhold til kontrolluciferase (*Renilla reniformis*, Rr-luc) i *D. melanogaster*-embryolysat i nærvær av 5 nM rettendede dsRNA'er. Luminescensforholdene bestemt i nærvær av dsRNA ble normalisert til forholdet fremskaffet for en bufferkontroll (bu, sort stolpe). Normaliserte forhold mindre enn 1 indikerer spesifikk interferens. (C-J) Normaliserte interferensforhold for åtte serier av 21-nt siRNA-duplekser. Sekvensene til siRNA-duplekser er vist over

stolpediagrammene. Hvert panel viser interferensforholdet for et sett av duplekser dannet med et gitt antisenseguide-siRNA og 5 ulike sense-siRNA'er. Antall overhengende nukleotider (3' overheng, positive tall; 5' overheng, negative tall) er indikert på x-aksen. Datapunkter er gjennomsnitt fra minst 3 uavhengige eksperimententer, feilstørrelser representerer standardavvik.

Figur 12: Variasjon av lengden til sensetråden av siRNA-duplekser. (A) Grafisk presentasjon av forsøket. Tre 21-nt antisensetråder ble parett med åtte sense-siRNA'er. siRNA'ene ble forandret i lengde på deres 3' ende. 3' overhenget til antisense-siRNA'et var 1-nt (B), 2-nt (C) eller 3-nt (D), mens sense siRNA-overhenget varierte for hver serie. Sekvensene til siRNA-dupleksene og de tilsvarende interferensforholdene er indikert.

Figur 13: Variasjon av lengden til siRNA-duplekser med preserveerte 2-nt 3' overheng. (A) Grafisk presentasjon av forsøket. 21-nt siRNA-dupleksen er identisk i sekvens til den som er vist i Figur 11H eller 12C. siRNA-dupleksene ble forlenget til 3' siden av sense siRNA'et (B) eller 5' siden av sense siRNA'et (C). siRNA-duplekssekvensene og de respektive interferensforholdene er antydet.

Figur 14: Substitusjon av 2'-hydroksylgruppene til siRNA-riboserestene. 2'-hydroksylgruppene (OH) i trådene til siRNA-duplekser ble byttet ut med 2'-deoksy (d) eller 2'-O-metyl (Me). 2-nt og 4-nt 2'-deoksysubstitusjoner på 3' endene er indikert som henholdsvis 2-nt d og 4-nt d. Uridinrester ble byttet ut med 2'-deoksy tymidin.

Figur 15: Kartlegging av sense og antisense mål-RNA kutting med 21-nt siRNA-duplekser med 2-nt 3' overheng. (A) Grafisk presentasjon av 32P (stjerne) cap-merkede sense og antisense mål-RNA'er og siRNA-duplekser. Posisjonen til sense og antisense mål-RNA kutting er indikert med trekanter henholdsvis over og under siRNA-dupleksene. (B) Kartlegging av mål-RNA kutteteser. Etter 2 t inkubering av 10 nM mål med 100 nM siRNA-dupleks i *D. melanogaster*-embryolysat ble det 5' cap-merkede substratet og 5' kutteproduktene bestemt på sekvenseringsgeler. Lengdemarkører ble generert ved delvis RNase T1-kutting (T1) og delvis alkalisk hydrolyse (OH-) av mål-RNA'ene. De tykke strekene til

venstre for bildene indikerer regionen dekket av siRNA-trådene 1 og 5 med den samme retningen som målet.

Figur 16: 5' enden av et guide-siRNA definerer posisjonen for mål-RNA kutting.

- 5 (A, B) Grafisk presentasjon av den eksperimentelle strategien. Antisense-siRNA'et var den samme i alle siRNA-duplekser, men sensestråden varierte mellom 18 til 25 nt ved å forandre 3' enden (A) eller 18 til 23 nt ved å forandre 5' enden (B). Posisjonen til sense og antisense mål-RNA kutting er indikert med trekanter henholdsvis over og under siRNA-dupleksene. (C, D) Analyse av mål-RNA kutting
- 10 ved å anvende cap-merkede sense (øverste panel) eller antisense (nederste panel) mål-RNA'er. Kun de cap-merkede 5' kutteproduktene er vist. Sekvensene til siRNA-dupleksene er indikert, og lengden til sense siRNA-trådene er angitt på toppen av panelet. Kontrollsporet merket med en tankestrek i panel (C) viser mål-RNA inkubert i fravær av siRNA'er. Markører var som beskrevet i Figur 15. Pilene i
- 15 (D), nederste panel, indikerer mål-RNA kuttasetene som er forskjellige med 1 nt.

Figur 17: Sekvensvariasjon av 3' overhenget til siRNA-duplekser. 2-nt 3' overhenget (NN, i grått) ble forandret i sekvens og sammensetning som indikert (T, 2'-deoksytymidin, dG, 2'-deoksyguanosin; stjerne, villtype siRNA-dupleks).

- 20 Normaliserte interferensforhold ble bestemt som beskrevet i Figur 11. Villtypesekvensen er den samme som vist i Figur 14.

Figur 18: Sekvensspesifisitet av målgjenkjennelse. Sekvensene til de feilmatchedde siRNA-dupleksene er vist, modifiserte sekvenssegmenter eller enkle

25 nukleotider er farget i grått. Referansedupleksen (ref) og siRNA-dupleksene 1 til 7 inneholder 2'-deoksytymidin 2-nt overheng. Inaktiveringseffektiviteten til den tymidinmodifiserte referansedupleksen var sammenlignbar med villtypesekvensen (Figur 17). Normaliserte interferensforhold ble bestemt som beskrevet i Figur 11.

- 30 **Figur 19:** Variasjon av lengden til siRNA-duplekser med preserveerte 2-nt 3' overheng. siRNA-dupleksene ble forlenget til 3' siden av sense siRNA'et (A) eller 5' siden av sense siRNA'et (B). siRNA-duplekssekvensene og de respektive interferensforholdene er indikert. For HeLa SS6-celler ble siRNA-duplekser (0,84 µg) som binder GL2-luciferase kotransfektet med pGL2-kontroll og pRL-TK

plasmider. For sammenligning er *in vitro* RNAi-aktivitetene til siRNA-duplekser testet i *D. melanogaster*-lysatsat vist.

Eksempel 1

5 RNA-interferens mediert med små, syntetiske RNA'er

1.1 Eksperimentelle fremgangsmåter

1.1.1 *In vitro*-RNAi

10 *In vitro*-RNAi og lysatfremstillinger ble utført som tidligere beskrevet (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Det er avgjørende å anvende ferskt, oppløst kreatinkinase (Roche) for optimal ATP-nydannelse. RNAi-translasjonstestene (Figur 1) ble utført med dsRNA-konsentrasjoner på 5 nM og en forlenget preinkuberingsperiode på 15 min ved 25 °C før tilsetning av *in vitro*-transkriberte, 15 5' cap-merkede og polyadenylerte Pp-luc og Rr-luc rapportør mRNA'er. Inkuberingen fortsatte i 1 time, og den relative mengden av Pp-luc og Rr-luc protein ble analysert ved å anvende dual luciferasetest (Promega) og et Monolight 3010C luminometer (PharMingen).

20 1.1.2 RNA-syntese

Standard fremgangsmåter ble anvendt for *in vitro*-transkripsjon av RNA fra PCR-templater som bærer T7- eller SP6-promotersekvenser, se for eksempel (Tuschl et al., 1998). Syntetisk RNA ble fremstilt ved å anvende Expedite RNA-fosforamiditter (Proligo). 3' adapteroligonukleotidet ble syntetisert ved å anvende 25 dimetoksytrityl-1,4-benzendimetanol-suksinyl-aminopropyl-CPG. Oligoribonukleotidene fikk fjernet beskyttelsen i 3 ml av 32 % ammoniakk/etanol (3/1) i 4 timer ved 55 °C (Expedite RNA) eller 16 timer ved 55 °C (3' og 5' adapter DNA/RNA kimæriske oligonukleotider) og deretter desilylert og gelrenset som tidligere beskrevet (Tuschl et al., 1993). RNA-transkripter for dsRNA-fremstilling 30 omfattende lange 3' overheng ble generert fra PCR-templater som inneholdt en T7-promoter i sense- og en SP6-promoter i antisenseretning. Transkripsjonstemplatet for sense og antisense mål-RNA ble PCR-amplifisert med GCGTAATACGACTCACTATAGAACAAATTGCTTTTACAG (understreket, T7-promoter) som 5' primer og ATTTAGGTGACACTATAGGCATAAAGAATTGAAGA

(understreket, SP6-promoter) som 3' primer og det lineariserte Pp-luc plasmidet (pGEM-luc sekvens) (Tuschl et al., 1999) som templat; det T7-transkriberte sense-RNA'et var 177 nt langt med Pp-luc sekvensen mellom posisjon 113-273 i forhold til startkodonet og etterfulgt av 17 nt av komplementet til SP6-promotersekvensen på 3' enden. Transkripter for buttendet dsRNA-dannelse ble fremstilt med

5 transkripsjon fra to ulike PCR-produkter som bare inneholdt en enkel promotersekvens.

dsRNA-hybridisering ble utført ved å anvende en fenol/kloroform ekstraksjon.

10 Ekvimolar konsentrasjon av sense- og antisense-RNA (50 nM til 10 μ M, avhengig av lengden og tilgjengelig mengde) i 0,3 M NaOAc (pH 6) ble inkubert i 30 s ved 90 °C og deretter ekstrahert ved romtemperatur med et like stort volum av fenol/kloroform, etterfulgt av en kloroformekstraksjon for å fjerne residual fenol. Det resulterende dsRNA'et ble presipitert ved tilsetning av 2,5-3 volumer av

15 etanol. Pelleten ble løst i lyseringsbuffer (100 mM KCl, 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 2 mM Mg (OAc)₂) og kvaliteten av dsRNA'et ble verifisert med standard agarosegelelektroforeser i 1 x TAE-buffer. 52 bp dsRNA'ene med 17 nt og 20 nt 3' overhengene (Figur 6) ble hybridisert ved inkubering i 1 min ved 95 °C, deretter raskt avkjølt til 70 °C og etterfulgt av sakte avkjøling til romtemperatur over en 3 t

20 periode (50 μ l hybridiseringsreaksjon, 1 μ M trådkonsentrasjon, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). dsRNA'ene ble deretter fenol/kloroform ekstrahert, etanolpresipitert og løst i lyseringsbuffer.

Transkripsjon av internt ³²P-radioaktivt merket RNA anvendt for dsRNA-fremstilling

25 (Figur 2 og 4) ble utført ved å anvende 1 mM ATP, CTP, GTP, 0,1 eller 0,2 mM UTP og 0,2-0,3 μ M -³²P-UTP (3000 Ci/mmol) eller det respektive forholdet for andre radioaktivt merkede nukleosidtrifosfater enn UTP. Merking av cap til mål-RNA'ene ble utført som tidligere beskrevet. Mål-RNA'ene ble gelrenset etter cap-merking.

30

1.1.3 Kuttsetekartlegging

Standard RNAi-reaksjoner ble utført med preinkubering av 10 nM dsRNA i 15 min etterfulgt av tilsetning av 10 nM cap-merket mål-RNA. Reaksjonen ble stoppet

etter ytterligere 2 t (Figur 2A) eller 2,5 t inkubering (Figur 5B og 6B) med proteinase K-behandling (Tuschl et al., 1999). Prøvene ble deretter analysert på 8 eller 10 % sekvenseringsgeler. De 21 og 22 nt syntetiske RNA-dupleksene ble anvendt ved 100 nM endelig konsentrasjon (Figur 5B).

5

1.1.4 Kloning av ~21 nt RNA'er

21 nt RNA'ene ble dannet med inkubering av radioaktivt merket dsRNA i *Drosophila*-lysat i fravær av mål-RNA (200 µl reaksjon, 1 t inkubering, 50 nM dsP111, eller 100 nM dsP52 eller dsP39). Reaksjonsblandingen ble deretter

10 behandlet med proteinase K (Tuschl et al., 1999) og dsRNA-prosesseringsproduktene ble separert på en denaturerende 15 % polyakrylamidgel. Et bånd, inkludert et størrelsesområde på minst 18 til 24 nt, ble skjært ut, eluert inn i 0,3 M NaCl natten over ved 4 °C og i silikonrør. RNA'et ble isolert med etanolutfelling og defosforylert (30 µl reaksjon, 30 min, 50 °C, 10 U

15 alkalisk fosfatase, Roche). Reaksjonen ble stoppet med fenol/kloroform ekstraksjon, og RNA'et ble etanolpresipitert. 3' adapteroligonukleotidet (pUUUaaccgcctctctcx: stor bokstav, RNA; liten bokstav, DNA; p, fosfat; x, 4-hydroksymetylbenzyl) ble deretter ligert til det defosforylerte ~21 nt RNA'et (20 µl reaksjon, 30 min, 37 °C, 5 µM 3' adapter, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂,

20 0,2 mM ATP, 0,1 mg/ml acetylt BSA, 15 % DMSO, 25 U T4 RNA-ligase, Amersham-Pharmacia) (Pan og Uhlenbeck, 1992). Ligeringsreaksjonen ble stoppet ved tilsetning av et like stort volum av 8 M urea/50 mM EDTA-stoppløsning og direkte satt på en 15 % gel. Ligeringsutbytter var større enn 50 %. Ligeringsproduktet ble isolert fra gelen og 5'-fosforylert (20 µl reaksjon, 30 min,

25 37 °C, 2 mM ATP, 5 U T4-polynukleotidkinase, NEB). Fosforyleringsreaksjonen ble stoppet med fenol/kloroform ekstraksjon, og RNA ble isolert med etanolutfelling. Deretter ble 5' adapteren (tactaatacgactcactAAA: stor bokstav, RNA; liten bokstav, DNA) ligert til det fosforylerte ligeringsproduktet som beskrevet ovenfor. Det nye ligeringsproduktet ble gelrenset og eluert fra gelbiten i nærvær av

30 revers transkripsjonsprimer (GACTAGCTGGAATTCAAGGATGCGGTAAA: fet skrift, EcoRI-sete) anvendt som bærer. Revers transkripsjon (15 µl reaksjon, 30 min, 42 °C, 150 U Superscript II revers transkriptase, Life Technologies) ble etterfulgt av PCR ved å anvende CAGCCAACGGAATTCATACGACTCACTAAA

(fet skrift, EcoRI-sete) som 5' primer og 3' RT-primeren. PCR-produktet ble rensset med fenol/kloroform ekstraksjon og etanolpresipitert. PCR-produktet ble deretter kuttet med EcoRI (NEB) og konkatamerisert ved å anvende T4 DNA-ligase (høy konsentrasjon, NEB). Konkatamerer av en størrelse på 200 til 800 bp ble separert
 5 på en agarosegel med lavt smeltepunkt, isolert fra gelen med en standard smeltings- og fenolekstraksjonsfremgangsmåte og etanolpresipitert. De uparede endene ble fylt i ved inkubering med Taq-polymerase under standard betingelser i 15 min ved 72 °C, og DNA-produktet ble ligert direkte inn i pCR2.1-TOPO vektoren ved anvendelse av TOPO TA-kloningstestsettet (Invitrogen). Kolonier ble screenet
 10 ved anvendelse av PCR og M13-20 og M13 reverse sekvenseringsprimere. PCR-produkter ble sendt direkte til sekvensering (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Tyskland). Gjennomsnittlig ble fire til fem 21mer sekvenser fremskaffet pr. klon.

15 1.1.5 2D-TLC analyse

Nuklease P1-kutting av radioaktivt merkede, gelrensedede siRNA'er og 2D-TLC ble utført som beskrevet (Zamore et al., 2000). Nuklease T2-kutting ble utført i 10 µl reaksjoner i 3 t ved 50 °C i 10 mM ammoniumacetat (pH 4,5) ved anvendelse av 2 µg/µl bærer tRNA og 30 U ribonuklease T2 (Life Technologies). Migrasjonen av
 20 ikke-radioaktive standarder ble bestemt med UV-lys. Identiteten av nukleosid-3',5'-disfosfater ble bekreftet med migrasjon av T2-kutteproduktene sammen med standarder fremstilt med 5'-³²P-fosforylering av kommersielle nukleosid 3'-monofosfater ved anvendelse av γ-³²P-ATP og T4-polynukleotidkinase (resultater er ikke vist).

25

1.2 Resultater og diskusjon

1.2.1 Lengdekrav for prosessering av dsRNA til 21 og 22 nt RNA-fragmenter

Lysat fremstilt fra *D. melanogaster* syncytiale embryoer rekapitulerer RNAi *in vitro*
 30 og tilveiebringer et nytt verktøy for biokjemisk analyse av mekanismen for RNAi (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). *In vitro*- og *in vivo*-analyse av lengdekravene til dsRNA for RNAi har vist at korte dsRNA'er (< 150 bp) er mindre effektive enn lengre dsRNA'er i degradering av mål-mRNA (Caplen et al., 2000;

Hammond et al., 2000; Ngo et al., 1998; Tuschl et al., 1999). Årsakene for reduksjon i mRNA-degraderende effektivitet er ikke kjent. Vi undersøkte derfor det nøyaktige lengdekravet til dsRNA for mål-RNA nedbrytning under optimaliserte betingelser i *Drosophila*-lysatet (Zamore et al., 2000). Flere serier av dsRNA'er ble syntetisert og rettet mot ildflueluciferase (Pp-luc) rapportør RNA. Den spesifikke suppresjonen av mål-RNA ekspresjon ble monitorert med dual luciferasetest (Tuschl et al., 1999) (Figur 1A og 1B). Vi detekterte spesifikk inhibisjon av mål-RNA ekspresjon for dsRNA'er så korte som 38 bp, men dsRNA'er på 29 til 36 bp var ikke effektive i denne prosessen. Effekten var uavhengig av målposisjonen og graden av inhibisjon av Pp-luc mRNA-ekspresjon korrelert med lengden til dsRNA'et, dvs. lange dsRNA'er var mer effektive enn korte dsRNA'er.

Det har blitt antydnet at 21-23 nt RNA fragmentene generert ved prosessering av dsRNA'er er mediatorene av RNA-interferens og kosuppresjon (Hamilton og Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Vi analyserte derfor hastigheten til 21-23 nt fragmentdannelse for en undergruppe av dsRNA'er som varierte i størrelse mellom 501 til 29 bp. Dannelse av 21-23 nt fragmenter i *Drosophila*-lysat (Figur 2) var enkel å detektere for 39 til 501 bp lange dsRNA'er, men ble signifikant forsinket for 29 bp dsRNA'et. Denne observasjonen sammenfaller med en rolle for 21-23 nt fragmenter i guiding av mRNA-kutting og gir en forklaring for mangelen på RNAi med 30 bp dsRNA'er. Lengdeavhengigheten for 21-23 mer dannelse reflekterer trolig en biologisk relevant kontrollmekanisme for å hindre den uønskede aktiveringen av RNAi med korte, intramolekylære, baseparede strukturer av ordinære cellulære RNA'er.

25

1.2.2 39 bp dsRNA medierer mål-RNA kutting på et enkelt sete

Tilsetning av dsRNA og 5' cap-merket mål-RNA til *Drosophila*-lysatet resulterer i sekvensspesifikk nedbrytning av mål-RNA'et (Tuschl et al., 1999). Mål-mRNA'et kuttes bare i regionen som har likhet med dsRNA'et, og mange av målkuttesetene var separert med 21-23 nt (Zamore et al., 2000). Derfor var antallet kutteseter for et gitt dsRNA forventet omtrentlig å tilsvare lengden av dsRNA'et dividert med 21. Vi kartla målkuttesetene på et sense- og et antisense mål-RNA som var 5' cap radioaktivt merket (Zamore et al., 2000) (Figur 3A og 3B). Stabile 5' kutteprodukter ble separert på en sekvenseringsgel, og kutteposisjonen ble bestemt ved

sammenligning med en delvis RNase T1 og en alkalisk hydrolysestige fra mål-RNA'et.

I overensstemmelse med den tidligere observasjonen (Zamore et al., 2000) ble
 5 alle mål-RNA kuttsetter lokalisert i regionen som har likhet med dsRNA'et. Sense-
 eller antisensemålet ble bare kuttet én gang med 39 bp dsRNA. Hvert kuttsete
 ble lokalisert 10 nt fra 5' enden av regionen bundet av dsRNA'et (Figur 3B). 52 bp
 dsRNA'et, som har samme 5' ende som 39 bp dsRNA'et, danner det samme
 kuttsetet på sensemålet, lokalisert 10 nt fra 5' enden til regionen som har likhet
 10 med dsRNA'et, i tillegg til to svakere kuttsetter 23 og 24 nt nedstrøms for det
 første setet. Antisensemålet ble bare kuttet én gang, igjen 10 nt fra 5' enden til
 regionen bundet av dens respektive dsRNA. Kartlegging av kuttsetene for 38 til
 49 bp dsRNA'ene vist i Figur 1 viste at det første og dominerende kuttsetet alltid
 var lokalisert 7 til 10 nt nedstrøms for regionen bundet av dsRNA'et (resultater er
 15 ikke vist). Dette antyder at punktet for mål-RNA kutting bestemmes av enden til
 dsRNA'et og kan antyde at prosessering til 21-23 mer starter fra endene til
 duplekse.

Kuttsetter på sense- og antisensemål for det lengre 111 bp dsRNA'et var mye
 20 mer frekvent enn forventet, og de fleste av dem forekommer i clusterer separert
 med 20 til 23 nt (Figur 3A og 3B). Som for de kortere dsRNA'ene er det første
 kuttsetet på sensemålet 10 nt fra 5' enden til regionen dekket av dsRNA'et; og
 det første kuttsetet på antisensemålet er lokalisert 9 nt fra 5' enden til region
 bundet av dsRNA'et. Det er ukjent hva som forårsaker denne uregelmessige
 25 kuttingen, men én mulighet kan være at lengre dsRNA'er ikke bare kan bli
 prosessert fra endene, men også internt, eller det fins noen
 spesifisitetsdeterminanter for dsRNA-prosessering som vi enda ikke kjenner til.
 Noen uregelmessigheter for mellomrommet på 21-23 nt har også blitt beskrevet
 tidligere (Zamore et al., 2000). For å bedre forstå det molekylære grunnlaget for
 30 dsRNA-prosessering og mål-RNA gjenkjennelse, bestemte vi oss for å analysere
 sekvensene til 21-23 nt fragmentene generert ved prosessering av 39, 52 og 111
 bp dsRNA'er i *Drosophila*-lysatet.

1.2.3 dsRNA prosesseres til 21 og 22 nt RNA'er med en RNase III-lignende mekanisme

For å karakterisere 21-23 nt RNA-fragmentene undersøkte vi 5' og 3' terminalene til RNA-fragmentene. Periodatoksidasjon av gelrensedde 21-23 nt RNA'er etterfulgt
 5 av β -eliminering antydte nærvær av en terminal 2' og 3' hydroksylgruppe. 21-23 mer var også mottakelige for alkalisk fosfatasebehandling, som indikerer nærvær av en 5' terminal fosfatgruppe. Nærværet av 5' fosfat- og 3' hydroksylterminaler antyder at dsRNA'et kan bli prosessert av en lignende enzymatisk aktivitet som *E. coli* RNase III (for oversiktsartikler se (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982)).
 10

Retningsbestemt kloning av 21-23 nt RNA-fragmenter ble utført ved ligering av et 3' og 5' adapteroligonukleotid til renset 21-23 mer ved anvendelse av T4 RNA-ligase. Ligeringsproduktene ble revers transkribert, PCR-amplifisert,
 15 konkatamerisert, klonet og sekvensert. Over 220 korte RNA'er ble sekvensert fra dsRNA-prosesseringsreaksjoner av 39, 52 og 111 bp dsRNA'ene (Figur 4A). Vi fant den følgende lengdefordelingen: 1 % 18 nt, 5 % 19 nt, 12 % 20 nt, 45 % 21 nt, 28 % 22 nt, 6 % 23 nt og 2 % 24 nukleotider. Sekvensanalyse av 5' terminalnukleotidet til de prosesserte fragmentene antydte at oligonukleotider med
 20 en 5' guanosin var underrepresentert. Denne skjevheten ble mest sannsynlig innført av T4 RNA-ligase som diskriminerer mot 5' fosforylert guanosin som donoroligonukleotid; ingen signifikant sekvensskjevhet ble observert på 3' enden. Mange av ~21 nt fragmentene avledet fra 3' endene til sense- eller antisensetråden av dupleksene omfatter 3' nukleotider som er avledet fra vilkårlig
 25 tilsetning av nukleotider i løpet av RNA-syntese ved anvendelse av T7 RNA-polymerase. Interessant ble et signifikant antall endogene *Drosophila* ~21 nt RNA'er også klonet, noen av dem fra LTR og ikke-LTR retrotransposoner (resultater er ikke vist). Dette sammenfaller med en mulig rolle for RNAi i transposoninaktivering.

30

~21 nt RNA'ene forekommer i grupper (Figur 4A) som dekker hele dsRNA-sekvensene. Tilsynelatende kutter prosesseringsreaksjonen dsRNA'et ved å etterlate seg ujevne 3' ender, en annen karakteristikk for RNase III kutting. For 39

bp dsRNA'et ble to clusterer av ~21 nt RNA'er funnet fra hver dsRNA-tråd omfattende overhengende 3' ender, fortsatt ble bare ett kuttsete detektert på sense- og antisensemålet (Figur 3A og 3B). Hvis ~21 nt fragmentene var til stede som enkeltrådede guide-RNA'er i et kompleks som medierer mRNA-nedbrytning, kunne det antas at minst to målkuttseter forekommer, men dette var ikke tilfelle. Dette antyder at ~21 nt RNA'ene kan foreligge i dobbelttrådet form i endonukleasekomplekset, men at bare én av trådene kan bli anvendt for gjenkjennelse og kutting av mål-RNA. Anvendelse av bare én av ~21 nt trådene for målkutting kan bli bestemt av retningen som ~21 nt duplekse er bundet til nukleasekomplekset. Denne retningen er definert av retningen som det opprinnelige dsRNA'et ble prosessert i.

~21mer clusterer for 52 bp og 111 bp dsRNA'et er mindre godt definert sammenlignet med 39 bp dsRNA'et. Clusterne er spredt over regioner på 25 til 30 nt som mest sannsynlig representerer flere tydelige subpopulasjoner av ~21 nt duplekser og guider derfor målkutting på flere nærliggende seter. Disse kutteregionene er fortsatt vesentlig separert med 20 til 23 nt intervaller. Reglene som bestemmer hvor ordinært dsRNA kan bli prosessert til ~21 nt fragmenter er fortsatt ikke kjent, men det ble tidligere observert at avstanden mellom kuttseter på ca. 21-23 nt kan bli endret med en kjøring av uridiner (Zamore et al., 2000). Spesifisiteten til dsRNA-kutting med *E. coli* RNase III ser ut til å være kontrollert hovedsakelig av antideterminanter, dvs. unntatt noen spesifikke basepar i gitte posisjoner i forhold til kuttsetet (Zhang og Nicholson, 1997).

For å teste om sukker-, base- eller cap-modifisering var til stede i prosesserte ~21 nt RNA-fragmenter, inkuberte vi radioaktivt merket 505 bp Pp-luc dsRNA i lysat i 1 time, isolerte ~21 nt produktene og kuttet den med P1- eller T2-nuklease til mononukleotider. Nukleotidblandingen ble deretter analysert med 2D tynnsjiktskromatografi (Figur 4B). Ingen av de fire naturlige ribonukleotidene var modifisert som antydte med P1- eller T2-kutting. Vi har tidligere analysert adenosin- til inosinkonversjon i ~21 nt fragmentene (etter en 2 t inkubering) og detekterte et lite omfang (< 0,7 %) av deaminering (Zamore et al., 2000); kortere inkubering i lysat (1 time) reduserte denne inosinfraksjonen til knapt detekterbare

nivåer. RNase T2, som kutter 3' i forhold til fosfodiesterkoblingen, dannet nukleosid 3' fosfat og nukleosid 3',5'-difosfat, og antyder dermed nærvær av et 5'-terminalt monofosfat. Alle fire nukleosid 3',5'-difosfatene ble detektert og antyder at internukleotidkoblingen ble kuttet med liten eller ingen sekvensspesifisitet. Altså
 5 er ~21 nt fragmentene ikke modifisert og ble generert fra dsRNA slik at 5' monofosfater og 3'-hydroksyler var til stede på 5'-enden.

1.2.4 Syntetiske 21 og 22 nt RNA'er medierer mål-RNA kutting

Analyse av produktene ved dsRNA-prosessering antydte at ~21 nt fragmentene
 10 genereres ved en reaksjon med alle karakteristikaene til en RNase III-kuttreaksjon (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982). RNase III lager kutt med overheng i dsRNA'et og etterlater seg et 3' overheng på ca. 2 nt. Vi syntetiserte kjemisk 21 og 22 nt RNA'er, som er identiske i sekvens til noen av de klonede ~21 nt fragmentene, og testet dem for deres evne til å
 15 mediere mål-RNA nedbrytning (Figur 5A og 5B). 21 og 22 nt RNA-dupleksene ble inkubert ved 100 nM konsentrasjoner i lysatet, en 10 ganger høyere konsentrasjon enn 52 bp kontroll-dsRNA'et. Under disse betingelsene er mål-RNA kutting enkel å detektere. Senkning av konsentrasjonen av 21 og 22 nt dupleksene fra 100 til 10 nM forårsaker fortsatt mål-RNA kutting. Økning av duplekskonsentrasjonen fra 100
 20 nM til 1000 nM øker imidlertid ikke videre målkutting, trolig pga. en begrensende proteinfaktor i lysatet.

I motsetning til 29 eller 30 bp dsRNA'er som ikke medierte RNAi, medierte 21 og 22 nt dsRNA'ene med overhengende 3' ender på 2 til 4 nt effektiv nedbrytning av
 25 mål-RNA (dupleksene 1, 3, 4, 6, Figur 5A og 5B). Rettendede 21 eller 22 nt dsRNA'er (dupleksene 2, 5 og 7, Figur 5A og 5B) ble redusert i deres evne til å degradere målet og indikerer at overhengende 3' ender er kritiske for rekonstitusjon av RNA-proteinnukleasekomplekset. De enkelttrådede overhengene kan være nødvendige for høyaffinitetsbinding av ~21 nt dupleksen til
 30 proteinkomponentene. Et 5' terminalt fosfat, selv om det var til stede etter dsRNA-prosessering, var ikke nødvendig for å mediere mål-RNA kutting og var fraværende i de korte, syntetiske RNA'ene. De syntetiske 21 og 22 nt dupleksene guidet kutting av sense- så vel som antisensemål i regionen bundet av den korte dupleksen. Dette er et viktig resultat tatt i betraktning at et 39 bp dsRNA, som

danner to par clustere av ~21 nt fragmenter (Figur 2), kuttet sense- eller antisensemål bare én gang og ikke to ganger. Vi tolker dette resultatet ved å antyde at bare én av to tråder foreliggende i ~21 nt duplekse kan guide mål-RNA kutting og at retningen til ~21 nt duplekse i nukleasekomplekset blir bestemt av den opprinnelige retningen til dsRNA-prosessering. Presentasjonen av en allerede perfekt prosessert ~21 nt dupleks for *in vitro*-systemet tillater imidlertid dannelse av det aktive sekvensspesifikke nukleasekomplekset med to mulige retninger av den symmetriske RNA-dupleksen. Dette resulterer i kutting av sense- så vel som antisensemål i regionen som har likhet med 21 nt RNA-dupleksen.

10

Målkuttesetet er lokalisert 11 eller 12 nt nedstrøms for det første nukleotidet som er komplementært til 21 eller 22 nt guidesekvensen, dvs. kuttasetet er nær senter av regionen bundet av 21 eller 22 nt RNA'ene (Figur 4A og 4B). Forskyving av sensetråden til en 22 nt dupleks med to nukleotider (sammenligne dupleks 1 og 3 i Figur 5A) forskyv bare kuttasetet til antisensemålet med to nukleotider.

15

Forskyving av både sense- og antisensetråd med to nukleotider flyttet begge kuttasetet med to nukleotider (sammenligne dupleks 1 og 4). Vi spår at det vil bli mulig å utforme et par av 21 eller 22 nt RNA'er for å kutte et mål-RNA på nesten enhver gitt posisjon.

20

Spesifisiteten til mål-RNA kutting guidet av 21 og 22 nt RNA'er synes høy ettersom ingen avvikende kuttasetet er detektert (Figur 5B). Det bør imidlertid bli registrert at nukleotidene foreliggende i 3' overhenget til 21 og 22 nt RNA-dupleksen kan bidra mindre til substratgjenkjennelse enn nukleotidene nær kuttasetet. Dette er basert på observasjonen av at det 3' ytterste nukleotidet i 3' overhenget til de aktive dupleksene 1 eller 3 (Figur 5A) ikke er komplementært til målet. En detaljert analyse av spesifisiteten til RNAi kan nå bli enkelt gjennomført ved anvendelse av syntetiske 21 og 22 nt RNA'er.

25

30

Basert på beviset at syntetiske 21 og 22 nt RNA'er med overhengende 3' ender medierer RNA-interferens, foreslår vi å kalle ~21 nt RNA'ene for "korte, interfererende RNA'er" eller siRNA'er og det respektive RNA-proteinkomplekset for "en liten, interfererende ribonukleoproteinpartikkel" eller siRNP.

1.2.5 3' Overheng av 20 nt på korte dsRNA'er inhiberer RNAi

Vi har vist at korte, rettendede dsRNA'er blir prosessert fra endene til dsRNA'et. I løpet av vår studie av lengdeavhengigheten til dsRNA i RNAi har vi også analysert dsRNA'er med 17 til 20 nt overhengende 3' ender, og til vår overraskelse fant vi at de var mindre effektive enn rettendede dsRNA'er. Den inhibitoriske effekten av lange 3' ender var spesielt uttalt for dsRNA'er opp til 100 bp, men var mindre dramatisk for lengre dsRNA'er. Effekten skyldtes ikke ufullkommen dsRNA-dannelse basert på nativ gelanalyse (resultater er ikke vist). Vi testet om den inhibitoriske effekten av lange, overhengende 3' ender kunne bli anvendt som et verktøy til å styre dsRNA-prosessering til bare én av de to endene av en kort RNA-dupleks.

Vi syntetiserte fire kombinasjoner av 52 bp modell-dsRNA'et, buttendet, 3' forlengelse på bare sensetråden, 3' forlengelse på bare antisensetråden og dobbel 3' forlengelse på begge trådene og kartla mål-RNA kuttasetene etter inkubering i lysat (Figur 6A og 6B). Det første og dominerende kuttasetet til sensemålet ble tapt når 3' enden av antisensetråden til dupleksen ble forlenget og vice versa, det sterke kuttasetet til antisensemålet ble tapt når 3' enden av sensetråden til dupleksen ble forlenget. 3' forlengelser på begge trådene gjorde 52 bp dsRNA'et praktisk talt inaktivt. Én forklaring for dsRNA-inaktivering ved ~20 nt 3' forlengelser kan være assosieringen av enkelttrådede RNA-bindende proteiner som kan interferere med assosieringen av én av de dsRNA-prosesserende faktorene på denne enden. Dette resultatet er også i samsvar med vår modell der bare én av trådene til siRNA-dupleksen i sammensatt siRNP kan guide mål-RNA kutting. Retningen på tråden som guider RNA-kutting er definert av retningen til dsRNA-prosesseringsreaksjonen. Det er sannsynlig at nærvær av 3' ender med overheng kan lette monteringen av prosesseringskomplekset. En blokk på 3' enden av sensetråden vil bare tillate dsRNA-prosessering fra den motstående 3' enden av antisensetråden. Dette igjen genererer siRNP-komplekser der bare antisensetråden til siRNA-dupleksen kan guide kutting av sense mål-RNA. Det samme gjelder for den resiproke situasjonen.

Den mindre uttalte inhibitoriske effekten av lange 3' forlengelser i tilfellet med lengre dsRNA'er (≥ 500 bp, resultater er ikke vist) indikerer at lange dsRNA'er

også kan inneholde interne dsRNA-prosesseringssignaler eller kan bli prosessert samtidig pga. assosieringen av multiple kuttefaktorer.

1.2.6 En modell for dsRNA-styrt mRNA-kutting

5 De nye biokjemiske resultatene oppdaterer modellen for hvordan dsRNA binder mRNA for nedbrytning (Figur 7). Dobbeltrådet RNA blir først prosessert til korte RNA-duplekser som hovedsakelig er 21 og 22 nt lange og har 3' ender med overheng som tilsvarer en RNase III-lignende reaksjon (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1982). Basert på 21-23 nt lengden til de prosesserte RNA-fragmentene har det allerede blitt spekulert i at en RNase III-lignende aktivitet kan
10 være involvert i RNAi (Bass, 2000). Denne hypotesen støttes videre ved nærvær av 5' fosfater og 3' hydroksyler på terminalene til siRNA'ene som er observert i RNase III-reaksjonsprodukter (Dunn, 1982; Nicholson, 1999). Bakteriell RNase III og de eukaryote homologene Rnt1p i *S. cerevisiae* og Pac1p i *S. pombe* har blitt
15 vist å delta i prosessering av ribosomalt RNA så vel som snRNA og snoRNA'er (se for eksempel Chanfreau et al., 2000).

Lite er kjent om biokjemien til RNase III-homologer fra planter, dyr eller menneske. To familier av RNase III-enzymmer har blitt identifisert hovedsakelig med
20 databaseguidet sekvensanalyse eller kloning av cDNA'er. Den første RNase III-familien er representert ved det 1327 aminosyre lange *D. melanogaster*-proteinet drosha (Acc. AF116572). C-terminalen er sammensatt av to RNase III og ett dsRNA-bindende domene og N-terminalen har ukjent funksjon. Nære homologer er også funnet i *C. elegans* (Acc. AF160248) og menneske (Acc. AF189011)
25 (Filippov et al., 2000; Wu et al., 2000). Drosha-lignende human RNase III ble nylig klonet og karakterisert (Wu et al., 2000). Genet er uttrykt i alle humane vev og cellelinjer, og proteinet er lokalisert i kjernen og kjernelegemet i cellen. Basert på resultater fra antisenseinhibisjonsstudier ble det antydnet en rolle for dette proteinet i rRNA-prosessering. Den andre klassen er representert av *C. elegans*-genet
30 K12H4.8 (Acc. S44849) som koder for et protein som er 1822 aminosyrer langt. Dette proteinet har et N-terminalt RNA-helikasemotiv som er etterfulgt av 2 RNase III-katalytiske domener og et dsRNA-bindende motiv, lignende drosha RNase III-familien. Det er nære homologer i *S. pombe* (Acc. Q09884), *A. thaliana* (Acc. AF187317), *D. melanogaster* (Acc. AE003740) og menneske (Acc. AB028449)

(Filippov et al., 2000; Jacobsen et al., 1999; Matsuda et al., 2000). Kanskje er K12H4.8 RNase III/helikasen den sannsynlige kandidaten som er involvert i RNAi.

Genetiske screeningar i *C. elegans* identifiserte rde-1 og rde-4 som essensielle
 5 for aktivering av RNAi utan en effekt på transposonmobilisering eller kosuppresjon
 (Dernburg et al., 2000; Grishok et al., 2000; Ketting og Plasterk, 2000; Tabara et
 al., 1999). Dette førte til hypotesen om at disse genene er viktige for dsRNA-
 prosessering, men ikke er involvert i mRNA-målnedbrytning. Funksjonen til begge
 genene er fortsatt ukjent, rde-1 genproduktet er et medlem av en familie med
 10 proteiner som ligner på kaninproteinet eIF2C (Tabara et al., 1999), og sekvensen
 til rde-4 har enda ikke blitt beskrevet. Fremtidig biokjemisk karakterisering av disse
 proteinene bør avsløre deres molekylære funksjon.

Prosessering til siRNA-dupleksene ser ut til å starte fra endene til begge
 15 rettendede dsRNA'er eller dsRNA'er med korte (1-5 nt) 3' overheng, og fortsetter i
 bortimot 21-23 nt trinn. Lange (~20 nt) 3' overhengende ender på korte dsRNA'er
 undertrykker RNAi, muligens via interaksjon med enkelttrådede RNA-bindende
 proteiner. Undertrykkelsen av RNAi med enkelttrådede regioner som flankerer kort
 dsRNA og mangelen på siRNA-dannelse fra korte 30 bp dsRNA'er kan forklare
 20 hvorfor strukturerte regioner som ofte er i mRNA'er ikke fører til aktivering av
 RNAi.

Uten ønske om å være bundet av teori, antar vi at dsRNA-
 prosesseringsproteinene eller en undergruppe av disse forblir assosiert med
 25 siRNA-dupleksen etter prosesseringsreaksjonen. Retningen til siRNA-dupleksen i
 forhold til disse proteinene avgjør hvilken av de to komplementære trådene som
 guider mål-RNA nedbrytning. Kjemisk syntetiserte siRNA-duplekser guider kutting
 av sense- så vel som antisense mål-RNA ettersom de kan assosiere med
 proteinkomponentene i hver av de to mulige retningene.

30

Bemerkelsesverdig funn av at syntetiske 21 og 22 nt siRNA-duplekser kan bli
 anvendt for effektiv mRNA-nedbrytning tilveiebringer nye verktøy for
 sekvensspesifikk regulering av genekspresjon i funksjonell genteknologi, så vel
 som biomedisinske studier. siRNA'ene kan være effektive i mammalske systemer,

der lange dsRNA'er ikke kan bli anvendt pga. aktiveringen av PKR-responsen (Clemens, 1997). Derfor representerer siRNA-dupleksene et nytt alternativ til antisense- eller ribozymterapeutika.

5 **Eksempel 2**

RNA-interferens i humane vevskulturer

2.1 Fremgangsmåter

10 **2.1.1 RNA-fremstilling**

21 nt RNA'er ble syntetisert kjemisk ved anvendelse av Expedite RNA-fosforamiditter og tymidinfosforamiditt (Proligo, Tyskland). Syntetiske oligonukleotider fikk fjernet beskyttelsen og gelrenset (Eksempel 1), etterfulgt av Sep-Pak C18 kassett (Waters, Milford, MA, USA) rensing (Tuschl, 1993). siRNA-sekvensene rettet mot GL2- (Acc. X65324) og GL3-luciferase (Acc. U47296) svarte til de kodende regionene 153-173 i forhold til det første nukleotidet i startkodonet, siRNA'er rettet mot RL (Acc. AF025846) svarte til region 119-129 etter startkodonet. Lengre RNA'er ble transkribert med T7 RNA-polymerase fra PCR-produkter, etterfulgt av gel- og Sep-Pak rensing. De 49 og 484 bp GL2 eller GL3 dsRNA'ene svarte til henholdsvis posisjon 113-161 og 113-596 i forhold til translasjonsstart; de 50 og 501 bp RL dsRNA'ene svarte til henholdsvis posisjon 118-167 og 118-618. PCR-templater for dsRNA-syntese rettet mot humanisert GFP (hG) ble amplifisert fra pAD3 (Kehlenbach, 1998), hvorved 50 og 501 bp hG dsRNA svarte til henholdsvis posisjon 118-167 og 118-618 i forhold til startkodonet.

For hybridisering av siRNA'er ble 20 μ M enkelttråder inkubert i hybridiseringsbuffer (100 mM kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH ved pH 7,4, 2 mM magnesiumacetat) i 1 min ved 90 °C etterfulgt av 1 time ved 37 °C. 37 °C inkuberingstrinnet ble forlenget natten over for 50 og 500 bp dsRNA'ene, og disse hybridiseringsreaksjonene ble utført ved trådkonsentrasjoner på henholdsvis 8,4 μ M og 0,84 μ M.

2.1.2 Cellekultur

S2-celler ble ekspandert i Schneiders *Drosophila*-medium (Life Technologies) supplert med 10 % FBS, 100 enheter/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin ved 25 °C. 293, NIH/3T3, HeLa S3, COS-7 celler ble dyrket ved 37 °C i Dulbeccos modifiserte Eagles-medium supplert med 10 % FBS, 100 enheter/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin. Celler ble regelmessig fortynnet og dyrket videre for å opprettholde eksponentiell vekst. 24 timer før transfeksjon ved ca. 80 % sammenhengende dekke av celler ble mammalske celler trypsinert og fortynnet 1:5 med ferskt medium uten antibiotika ($1-3 \times 10^5$ celler/ml) og overført til 24-brønners plater (500 µl/brønn). S2-celler ble ikke trypsinert før fortynning.

Transfeksjon ble utført med Lipofectamin2000-reagens (Life Technologies) som beskrevet av produsenten for adherente cellelinjer. 1,0 µg pGL2-kontroll (Promega) eller pGL3-kontroll (Promega), 0,1 µg pRL-TK (Promega) og 0,28 µg siRNA-dupleks eller dsRNA, formulert inn i liposomer, ble tilsatt pr. brønn; det endelige volumet var 600 µl pr. brønn. Celler ble inkubert 20 t etter transfeksjon og fremstod sunne deretter. Luciferaseekspressjon ble deretter monitorert med dual luciferasetest (Promega). Transfeksjonseffektivitet ble bestemt med fluorescensmikroskopi for mammalske cellelinjer etter kotransfeksjon av 1,1 µg hGFP-kodende pAD3 og 0,28 µg invGL2 inGL2 siRNA og var 70-90 %.

Rapportørplasmider ble amplifisert i XL-1 Blue (Stratagene) og rensset ved anvendelse av Qiagen EndoFree Maxi Plasmid-testsettet.

2.2 Resultater og diskusjon

For å teste om siRNA'er også kan mediere RNAi i vevskultur, syntetiserte vi 21 nt siRNA-duplekser med symmetriske 2 nt 3' overheng rettet mot rapportørgener som koder for *Renilla reniformis* og to sekvensvarianter av ildflue (*Photinus pyralis*, GL2 og GL3) luciferaser (Figur 8a, b). siRNA-dupleksene ble kotransfektet med rapportørplasmidkombinasjonene pGL2/pRL eller pGL3/pRL inn i *D. melanogaster* Schneider S2-celler eller mammalske celler ved anvendelse av kationiske liposomer. Luciferaseaktiviteter ble bestemt 20 t etter transfeksjon. I alle cellelinjer som ble testet observerte vi spesifikk reduksjon av ekspresjonen av rapportørgenene i nærvær av beslektede siRNA-duplekser (Figur 9a-j). De absolutte luciferaseekspressionsnivåene var bemerkelsesverdig upåvirket av ikke-beslektede siRNA'er, hvilket indikerer fravær av skadelige bivirkninger med 21 nt

- RNA-duplekser (f.eks. Figur 10a-d for HeLa-celler). I *D. melanogaster* S2-celler (Figur 9a, b) var den spesifikke inhibisjonen av luciferaser komplett. I mammalske celler, der rapportørgenene ble uttrykt 50- til 100 ganger sterkere, var den spesifikke suppresjonen mindre komplett (Figur 9c-j). GL2-ekspresjon ble redusert
- 5 3- til 12-fold, GL3-ekspresjon 9- til 25-fold og RL-ekspresjon 1- til 3-fold i respons til de beslektede siRNA'ene. For 293-celler var binding av RL-luciferase med RL-siRNA'er ineffektiv, selv om GL2- og GL3-mål responderte spesifikt (Figur 9i, j). Mangelen på reduksjon av RL-ekspresjon i 293-celler kan skyldes dens 5- til 20-fold høyere ekspresjon sammenlignet med enhver annen testet mammalsk
- 10 cellelinje og/eller begrenset tilgjengelighet av målsekvensen pga. RNA-sekundær struktur eller assosierte proteiner. Ikke desto mindre indikerte spesifikk binding av GL2- og GL3-luciferase med de beslektede siRNA-dupleksene at RNAi også virker i 293-celler.
- 15 2 nt 3' overhenget i alle siRNA-duplekser, bortsett fra uGL2, bestod av (2'-deoksy) tymidin. Substitusjon av uridin med tymidin i 3' overhenget ble godt tolerert i *D. melanogaster in vitro*-systemet, og sekvensen til overhenget var ikke kritisk for målgjenkjennelse. Tymidinoverhenget ble valgt fordi det angivelig skal øke nukleaseresistens til siRNA'er i vevsdyrkningsmediet og i transfekterte celler.
- 20 Faktisk var det tymidinmodifiserte GL2 siRNA'et litt mer effektiv enn det ikke-modifiserte uGL2 siRNA'et i alle cellelinjer som ble testet (Figur 9a, c, e, g, i). Det er tenkelig at videre modifiseringer av de 3' overhengende nukleotidene kan gi ekstra fordeler til levering og stabilitet av siRNA-duplekser.
- 25 I kotransfeksjonseksperimenter ble 25 nM siRNA-duplekser med hensyn til det endelige volumet med vevsdyrkningsmedium anvendt (Figur 9, 10). Økning av siRNA-konsentrasjonen til 100 nM økte ikke de spesifikke inaktiveringseffektene, men begynte å affisere transfeksjonseffektivitet pga. konkurranse for liposominnkapsling mellom plasmid-DNA og siRNA (resultater er ikke vist).
- 30 Reduksjon av siRNA-konsentrasjonen til 1,5 nM reduserte ikke den spesifikke inaktiveringseffekten (resultater er ikke vist), selv om siRNA'ene nå bare var 2- til 20-fold mer konsentrert enn DNA-plasmidene. Dette antyder at siRNA'er er usedvanlig kraftige reagenser for mediering av geninaktivering og at siRNA'er er effektive ved konsentrasjoner som er flere størrelsesordener under

konsentrasjonene anvendt i konvensjonelle antisense- eller ribozymgenrettede eksperimenter.

For å monitorere effekten av lengre dsRNA'er på mammalske celler, ble 50 og 500
5 bp dsRNA'er beslektet med rapportørgenene fremstilt. Som uspesifikk kontroll ble
dsRNA'er fra humanisert GFP (hG) (Kehlenbach, 1998) anvendt. Når dsRNA'er
ble kotransfektet i identiske mengder (ikke konsentrasjoner) som siRNA-
dupleksene, ble rapportørgenekspressjonen redusert sterkt og uspesifikt. Denne
effekten er vist for HeLa-celler som et representativt eksempel (Figur 10a-d). De
10 absolutte luciferaseaktivitetene ble uspesifikt redusert henholdsvis 10- til 20-fold
med 50 bp dsRNA og 20- til 200-fold med 500 bp dsRNA-kotransfeksjon.
Lignende uspesifikke effekter ble observert for COS-7 og NIH/3T3 celler. For 293-
celler ble en 10- til 20-fold uspesifikk reduksjon bare observert for 500 bp
dsRNA'er. Uspesifikk reduksjon i rapportørgenekspressjon med dsRNA > 30 bp var
15 forventet som del av interferonresponsen.

Overraskende, til tross for den sterke, uspesifikke reduksjonen i
rapportørgenekspressjon, detekterte vi reproducerbart ekstra sekvensspesifikk,
dsRNA-mediert inaktivering. De spesifikke inaktiveringseffektene var imidlertid
20 bare åpenbar når de relative rapportørgenaktivitetene ble normalisert i forhold til
hG dsRNA-kontrollene (Figur 10e, f). En 2- til 10-fold spesifikk reduksjon i respons
til beslektet dsRNA ble observert, også i de andre tre mammalske cellelinjene som
ble testet (resultater er ikke vist). Spesifikke inaktiveringseffekter med dsRNA'er
(356-1662 bp) ble tidligere rapportert i CHO-K1 celler, men mengdene av dsRNA
25 som var nødvendige for å detektere en 2- til 4-fold spesifikk reduksjon var ca. 20-
fold høyere enn i våre eksperimenter (Ui-Tei, 2000). Også CHO-K1 celler ser ut til
å mangle interferonresponsen. I en annen rapport ble 293, NIH/3T3 og BHK-21
celler testet for RNAi ved anvendelse av luciferase/lacZ rapportørkombinasjoner
og 829 bp spesifikt lacZ- eller 717 bp uspesifikt GFP-dsRNA (Caplen, 2000). Det
30 mislykkede forsøket på å detektere RNAi i dette tilfellet kan skyldes den mindre
sensitive luciferase/lacZ-rapportørtesten og lengdeforskjellene mellom mål og
kontroll-dsRNA. Samlet antyder våre resultater at RNAi er aktiv i mammalske
celler, men at inaktiveringseffekten er vanskelig å detektere, hvis
interferonsystemet er aktivert av dsRNA > 30 bp.

I korthet har vi for første gang demonstrert siRNA-mediert geninaktivering i mammalske celler. Anvendelsen av korte siRNA'er er lovende for inaktivering av genfunksjon i human vevskultur og utvikling av genspesifikke terapeutika.

5

Eksempel 3

Spesifikk inhibisjon av genekspresjon med RNA-interferens

3.1 Materialer og fremgangsmåter

10

3.1.1 RNA-fremstilling og RNAi-test

Kjemisk RNA-syntese, hybridisering og luciferasebaserte RNAi-tester ble utført som beskrevet i Eksempel 1 eller 2 eller i tidligere publikasjoner (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Alle siRNA-duplekser var rettet mot ildflueluciferase, og luciferase mRNA-sekvensen var avledet fra pGEM-luc (GenBank acc. X65316) som beskrevet (Tuschl et al., 1999). siRNA-dupleksene ble inkubert i *D. melanogaster* RNAi/translasjonsreaksjon i 15 min før tilsetning av mRNA'er. Translasjonsbaserte RNAi-tester ble minst utført i triplikater.

For kartlegging av kutting av sense mål-RNA, ble et 177-nt transkript generert, som svarer til ildflueluciferasesekvensen mellom posisjon 113-273 i forhold til startkodonet, etterfulgt av 17-nt komplementet til SP6-promotersekvensen. For kartlegging av antisense mål-RNA kutting, ble et 166-nt transkript dannet fra et templat, som ble amplifisert fra plasmidsekvens med PCR ved anvendelse av 5' primer TAATACGACTCACTATAGAGCCCATATCGTTTCATA (T7-promoter understreket) og 3' primer AGAGGATGGAACCGCTGG. Målsekvensen svarer til komplementet til ildflueluciferasesekvensen mellom posisjon 50-215 i forhold til startkodonet. Guanylyltransferasemerking ble utført som tidligere beskrevet (Zamore et al., 2000). For kartlegging av mål-RNA kutting ble 100 nM siRNA-dupleks inkubert med 5 til 10 nM mål-RNA i *D. melanogaster*-embryolysat under standard betingelser (Zamore et al., 2000) i 2 t ved 25 °C. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 8 volumer av proteinase K-buffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2 vektprosent/volum natriumdodecylsulfat). Proteinase K (E. M. Merck, løst i vann) ble satt til en endelig konsentrasjon på 0,6 mg/ml.

Reaksjonene ble deretter inkubert i 15 min ved 65 °C, ekstrahert med fenol/kloroform/isoamylalkohol (25:24:1) og presipitert med 3 volumer av etanol. Prøver ble overført til 6 % sekvenseringsgeler. Lengdestandarder ble generert ved delvis RNase T1-kutting og delvis basehydrolyse av cap-merkede sense- eller antisense mål-RNA'er.

3.2 Resultater

3.2.1 Variasjon av 3' overhenget i duplekser av 21-nt siRNA'er

Som beskrevet ovenfor var 2 eller 3 uparede nukleotider på 3' enden av siRNA-duplekser mer effektive i mål-RNA nedbrytning enn de respektive rettendede dupleksene. For å utføre en mer omfattende analyse av funksjonen til de terminale nukleotidene, syntetiserte vi fem 21-nt sense-siRNA'er, hver forskjøvet med ett nukleotid i forhold til mål-RNA'et, og åtte 21-nt antisense-siRNA'er, hver forskjøvet med ett nukleotid i forhold til målet (Figur 11A). Ved å kombinere sense- og antisense-siRNA'er ble åtte serier av siRNA-duplekser med syntetisk overhengende ender generert som dekker et område på 7-nt 3' overheng til 4-nt 5' overheng. Interferensen av siRNA-duplekser ble målt ved anvendelse av dual luciferasetest (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). siRNA-duplekser var rettet mot ildflueluciferase-mRNA, og *Renilla reniformis* luciferase-mRNA ble anvendt som intern kontroll. Luminescensforholdet mellom mål- og kontrolluciferaseaktivitet ble bestemt i nærvær av siRNA-dupleks og ble normalisert til forholdet observert i fravær av dsRNA. For sammenligning er interferensforholdet av lange dsRNA'er (39 til 504 pb) vist i Figur 11B. Interferensforholdene ble bestemt ved konsentrasjoner på 5 nM for lange dsRNA'er (Figur 11A) og ved 100 nM for siRNA-duplekser (Figur 11C-J). 100 nM konsentrasjonene av siRNA'er ble valgt, fordi fullstendig prosessering av 5 nM 504 bp dsRNA ville resultere i 120 nM totale siRNA-duplekser.

Evnen 21-nt siRNA-duplekser har til å mediere RNAi er avhengig av antallet overhengende nukleotider eller basepar dannet. Duplekser med fire til seks 3' overhengende nukleotider kunne ikke mediere RNAi (Figur 11C-F), hvilket også var tilfelle for duplekser med to eller flere 5' overhengende nukleotider (Figur 11 G-J). Dupleksene med 2-nt 3' overheng var mest effektive til å mediere RNA-

interferens, skjønt effektiviteten til inaktivering også var sekvensavhengig, og forskjeller opp til 12-fold ble observert for ulike siRNA-duplekser med 2-nt 3' overheng (sammenligne Figur 11 D-H). Duplekser med rette ender, 1-nt 5' overheng eller 1- til 3-nt 3' overheng var enkelte ganger funksjonelle. Den lille
 5 inaktiveringseffekten observert for siRNA-dupleksen med 7-nt 3' overheng (Figur 11C) kan skyldes en antisenseeffekt av det lange 3' overhenget i stedet for RNAi. Sammenligning av effektiviteten til RNAi mellom lange dsRNA'er (Figur 11B) og de mest effektive 21-nt siRNA-dupleksene (Figur 11E, G, H) antyder at en enkel siRNA-dupleks ved konsentrasjon på 100 nM kan være like effektiv som 5 nM 504
 10 bp dsRNA.

3.2.2 Lengdevariasjon av sense-siRNA'et paret til et uforandret 21-nt antisense-siRNA

For å utforske effekten av siRNA-lengde på RNAi, fremstilte vi tre serier av siRNA-
 15 duplekser, ved å kombinere tre 21-nt antisensetråder med åtte, 18- til 25-nt sense tråder. 3' overhenget til antisense-siRNA'et ble bestemt til 1, 2 eller 3 nt i hver siRNA-dupleksserie, mens sense-siRNA'et ble variert på dets 3' ende (Figur 12A). Uavhengig av lengden til sense-siRNA'et fant vi at duplekser med 2-nt 3' overheng av antisense-siRNA (Figur 12C) var mer aktive enn de med 1- eller 3-nt 3'
 20 overheng (Figur 12B, D). I den første serien med 1-nt 3' overheng av antisense-siRNA var duplekser med et 21- og 22-nt sense-siRNA, som henholdsvis bærer et 1- og 2-nt 3' overheng av sense-siRNA, mest aktive. Duplekser med 19- til 25-nt sense-siRNA'er var også i stand til å mediere RNA, men i en mindre grad. Likeledes, i den andre serien med 2-nt overheng av antisense-siRNA, var 21-nt
 25 siRNA-dupleksen med 2-nt 3' overheng mest aktiv, og enhver annen kombinasjon med de 18- til 25-nt sense-siRNA'ene var aktiv til en signifikant grad. I den siste serien med 3-nt antisense-siRNA 3' overheng var bare dupleksen med et 20-nt sense-siRNA og 2-nt sense 3' overhenget i stand til å redusere mål-RNA ekspresjon. Samlet antyder disse resultatene at siRNA-lengden, så vel som
 30 lengden av 3' overhenget, er viktig og at duplekser av 21-nt siRNA'er med 2-nt 3' overheng er optimale for RNAi.

3.2.3 Lengdevariasjon av siRNA-duplekser med et konstant 2-nt 3' overheng

Vi undersøkte deretter effekten av samtidig forandring av lengden til begge siRNA-tråder ved å opprettholde symmetriske 2-nt 3' overheng (Figur 13A). To serier av siRNA-duplekser ble fremstilt inkludert 21-nt siRNA-dupleksen i Figur 11H som referanse. Lengden på dupleksene ble variert mellom 20 til 25 bp, ved å forlenge
 5 det baseparede segmentet på 3' enden av sense-siRNA'et (Figur 13B) eller på 3' enden av antisense-siRNA'et (Figur 13C). Duplekser av 20 til 23 bp forårsaket spesifikk suppresjon av målluciferaseaktivitet, men 21-nt siRNA-dupleksen var minst 8 ganger mer effektiv enn hvilken som helst av de andre dupleksene. 24- og 25-nt siRNA-duplekser resulterte ikke i noen detekterbar interferens.
 10 Sekvensspesifikke effekter var underordnet ettersom variasjoner på begge endene av dupleksen førte til lignende effekter.

3.2.4 2'-Deoksy- og 2'-O-metyl-modifiserte siRNA-duplekser

For å vurdere viktigheten av siRNA-riboserestene for RNAi, ble duplekser med 21-
 15 nt siRNA'er og 2-nt 3' overheng med 2'-deoksy- eller 2'-O-metyl-modifiserte tråder undersøkt (Figur 14). Substitusjon av 2-nt 3' overhengene med 2'-deoksynukleotider hadde ingen effekt, og til og med utbyttingen av to ekstra ribonukleotider nær overhengene i den parede regionen dannet signifikant aktive siRNA'er. Således ble 8 av 42 nt i en siRNA-dupleks byttet ut med DNA-rester
 20 uten tap av aktivitet. Fullstendig substitusjon av én eller begge siRNA-trådene med 2'-deoksyrester fjernet imidlertid RNAi, hvilket også var tilfelle for substitusjon med 2'-O-metylrester.

3.2.5 Definisjon av mål-RNA kutteteser

25 Mål RNA-kutteposisjoner ble tidligere bestemt for 22-nt siRNA-duplekser og for en 21-nt/22-nt dupleks. Det ble funnet at posisjonen for mål-RNA kuttingen var lokalisert i senteret av regionen bundet av siRNA-dupleksen, 11 eller 12 nt nedstrøms for det første nukleotidet som var komplementært til 21- eller 22-nt siRNA-guidesekvensen. Fem forskjellige 21nt siRNA-duplekser med 2-nt 3'
 30 overheng (Figur 15A) ble inkubert med 5' cap-merket sense eller antisense mål-RNA i *D. melanogaster*-lysat (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). 5' kutteproduktene ble bestemt på sekvenseringsgeler (Figur 15B). Mengden av kuttet sense mål-RNA korrelerer med effektiviteten til siRNA-duplekser bestemt i den translasjonsbaserte testen, og siRNA-dupleksene 1, 2 og 4 (Figur 15B og

11H, G, E) kutter mål-RNA raskere enn dupleksene 3 og 5 (Figur 15B og 11F, D). Summen av radioaktivitet til 5' kutteproduktet og det tilsatte mål-RNA'et var ikke konstant over tid, og 5' kutteproduktene akkumulerte ikke. Antakelig blir kutteproduktene, når de er frigjort fra siRNA-endonukleasekomplekset, raskt degradert fordi de mangler enten poly(A) halen eller 5'-cap.

Kuttesetene for både sense og antisense mål-RNA'er ble lokalisert i midten av regionen dekket av siRNA-dupleksene. Kuttesetene for hvert mål dannet med de 5 ulike dupleksene varierte med 1-nt i henhold til 1-nt forskyvningen av dupleksene langs målsekvensene. Målet ble kuttet nøyaktig 11 nt nedstrøms for målposisjonen komplementær til det 3' ytterste nukleotidet av det sekvenskomplementære guide-siRNA'et (Figur 15A, B).

For å avgjøre hvorvidt 5' eller 3' enden til guide-siRNA'et bestemmer mål-RNA kutting, tenkte vi ut den eksperimentelle strategien beskrevet i Figur 16A og B. Et 21-nt antisense-siRNA, som ble holdt uforandret for denne studien, ble paret med sense-siRNA'er som var modifisert på enten deres 5' eller 3' ender. Posisjonen til sense og antisense mål-RNA kutting ble bestemt som beskrevet ovenfor.

Forandringer i 3' enden av sense-siRNA'et, monitorert for 1-nt 5' overheng til 6-nt 3' overheng, påvirket verken posisjonen til sense eller antisense mål-RNA kutting (Figur 16C). Forandringer i 5' enden av sense-siRNA'et affiserte ikke sense mål-RNA kuttingen (Figur 16D, øverste panel), som var forventet fordi antisense-siRNA'et var uforandret. Imidlertid var antisense mål-RNA kuttingen affisert og sterkt avhengig av 5' enden til sense-siRNA'et (Figur 16D, nederste panel).

Antisensemålet ble bare kuttet når sense-siRNA'et var 20 eller 21 nt langt og kutteposisjonen forskjellig med 1-nt, hvilket antyder at 5' enden til det målgjenkjennende siRNA'et bestemmer mål-RNA kutting. Posisjonen lokaliseres mellom nukleotid 10 og 11 når man teller i oppstrøms retning fra målnukleotidet paret til det 5' ytterste nukleotidet av guide-siRNA'et (se også Figur 15A).

30

3.2.6 Sekvenseffekter og 2'-deoksysubstitusjoner i 3' overhengen

Et 2-nt 3' overheng er foretrukket for siRNA-funksjon. Vi ønsket å vite om sekvensen til de overhengende nukleotidene bidrar til målgjenkjennelse eller om det bare er en egenskap som er nødvendig for rekonstitusjon av

endonukleasekomplekset (RISC eller siRNP). Vi syntetiserte sense- og antisense-siRNA'er med AA, CC, GG, UU og UG 3' overheng og inkluderte 2' deoksymodifiseringene TdG og TT. Villtype-siRNA'ene inneholdt AA i sense 3' overhenget og UG i antisense 3' overhenget (AA/UG). Alle siRNA-dupleksene var funksjonelle i interferenstesten og reduserte målekspresjon minst 5-fold (Figur 17). De mest effektive siRNA-dupleksene som reduserte målekspresjon mer enn 10-fold var av sekvenstypen NN/UG, NN/UU, NN/TdG og NN/TT (N, hvilket som helst nukleotid). siRNA-duplekser med et antisense-siRNA 3' overheng av AA, CC eller GG var en faktor 2 til 4 mindre aktiv sammenlignet med villtypesekvensen UG eller mutanten UU. Denne reduksjonen i RNAi-effektivitet skyldes sannsynligvis bidraget av det nest siste 3' nukleotidet til sekvensspesifikk målgjenkjennelse, ettersom det 3' terminale nukleotidet ble forandret fra G til U uten effekt.

Forandringer i sekvensen til 3' overhenget av sense-siRNA'et viste ikke noen sekvensavhengige effekter, som var forventet fordi sense-siRNA'et ikke må bidra til sense mål-mRNA gjenkjennelse.

3.2.7 Sekvensspesifisitet for målgjenkjennelse

For å undersøke sekvensspesifisiteten for målgjenkjennelse, innførte vi sekvensforandringer i de parede segmentene av siRNA-duplekser og bestemte effektiviteten til inaktivering. Sekvensforandringer ble innført ved å invertere korte segmenter med 3- eller 4-nt lengde eller som punktmutasjoner (Figur 18). Sekvensforandringene i én siRNA-tråd ble kompensert i den komplementære siRNA-tråden for å unngå og bringe forstyrrelse i den baseparede siRNA-dupleksstrukturen. Sekvensen til alle 2-nt 3' overhengene var TT (T, 2'-deoksytymidin) for å redusere syntesekostnader. TT/TT referanse siRNA-dupleksen var sammenlignbar i RNAi med villtype siRNA-dupleksen AA/UG (Figur 17). Evnen til å mediere rapportør mRNA-nedbrytning ble kvantifisert ved anvendelse av den translasjonsbaserte luminescenstesten. Duplekser av siRNA'er med inverterte sekvenssegmenter viste dramatisk redusert evne for binding av ildflueluciferaserapportør (Figur 18). Sekvensforandringene lokalisert mellom 3' enden og midten av antisense-siRNA'et fjernet fullstendig mål-RNA gjenkjennelse, men mutasjoner nær 5' enden av antisense-siRNA'et har en liten grad av inaktivering. Transversjon av A/U baseparet lokalisert direkte ovenfor det antatte

mål-RNA kuttasetet, eller ett nukleotid lenger vekk fra det antatte setet, hindret mål-RNA kutting, og indikerer derfor at enkel mutasjon i senteret av en siRNA-dupleks skjeller mellom feilmatchede mål.

5 **3.3 Diskusjon**

siRNA'er er verdifulle reagenser for inaktivering av genekspresjon, ikke bare i insektceller, men også i mammalske celler, med et stort potensial for terapeutisk anvendelse. Vi har systematisk analysert de strukturelle determinantene til siRNA-duplekser som er nødvendig for å fremme effektiv mål-RNA nedbrytning i *D.*

10 *melanogaster*-embryolysat, og tilveiebringer derfor regler for utformingen av de mest effektive siRNA-dupleksene. En perfekt siRNA-dupleks kan inaktivere genekspresjon med en effektivitet som er sammenlignbar med et 500 bp dsRNA, gitt at sammenlignbare mengder av totalt RNA blir anvendt.

15 **3.4 siRNA-brukerveiledning**

Effektivt inaktiverende siRNA-duplekser er fortrinnsvis sammensatt av 21-nt antisense-siRNA'er og bør bli valgt for å danne en 19 bp dobbeltheliks med 2-nt 3' overhengende ender. 2'-deoksysubstitusjoner av 2-nt 3' overhengende ribonukleotider affiserer ikke RNAi, men bidrar til å redusere kostnadene av RNA-syntese og kan øke RNase-resistens av siRNA-duplekser. Mer omfattende 2'-deoksy- eller 2'-O-metylmodifiseringer reduserer imidlertid evnen siRNA'er har til å mediere RNAi, trolig ved å interferere med proteinassosiering for siRNAP-montering.

25 Målgjenkjennelse er en svært sekvensspesifikk prosess mediert av siRNA'et som er komplementært til målet. Det 3' ytterste nukleotidet til guide-siRNA'et bidrar ikke til spesifisitet av målgjenkjennelse, mens det nest siste nukleotidet av 3' overhenget påvirker mål-RNA kutting, og en mismatch reduserer RNAi 2- til 4-fold. 5' enden av et guide-siRNA virker også mer avgjørende for feilmatchet mål-RNA

30 gjenkjennelse sammenlignet med 3' enden. Nukleotider i senteret av siRNA'et, lokalisert ovenfor mål-RNA kuttasetet, er viktige spesifisitetsdeterminanter, og til og med enkle nukleotidforandringer reduserer RNAi til ikke-detekterbart nivå. Dette antyder at siRNA-duplekser kan være i stand til å skjelne mutante eller

polymorfe alleler i genmålrettede eksperimenter, som kan bli en viktig egenskap for fremtidige terapeutiske fremskritt.

Sense og antisense-siRNA'er, når de er assosiert med proteinkomponentene i endonukleasekomplekset eller dets "commitment"-kompleks, ble antydnet å spille forskjellige roller; den relative retningen til siRNA-dupleksen i dette komplekset definerer hvilken tråd som kan bli anvendt for målgjenkjennelse. Syntetiske siRNA-duplekser har dyadisk symmetri med hensyn til den dobbeltheliske strukturen, men ikke med hensyn til sekvens. Assosieringen av siRNA-duplekser med RNAi-proteinene i *D. melanogaster*-lysatet vil føre til dannelse av to asymmetriske komplekser. I slike hypotetiske komplekser er det kirale miljøet forskjellig for sense- og antisense-siRNA og dermed deres funksjon. Forutsigelsen gjelder opplagt ikke for palindrome siRNA-sekvenser eller RNAi-proteiner som kan assosiere som homodimerer. For å begrense sekvenseffekter, som kan affisere forholdet mellom sense- og antisensebindende siRNP'er, foreslår vi å anvende siRNA-sekvenser med identiske 3' overhengende sekvenser. Vi anbefaler å justere sekvensen til overhenget av sense-siRNA'et til den antisense 3' overhenget har, fordi sense-siRNA'et ikke har et mål i typiske geninaktiveringseksperimenter. Asymmetri i rekonstitusjon av sense- og antisensekuttende siRNP'er kan være (delvis) ansvarlig for variasjonen i RNAi-effektivitet observert for ulike 21-nt siRNA-duplekser med 2-nt 3' overheng anvendt i denne studien (Figur 14). Alternativt kan nukleotidsekvensen til målsetet og/eller tilgjengeligheten av mål-RNA strukturen være ansvarlig for variasjonen i effektivitet for disse siRNA-dupleksene.

25

Referanser

30

Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238.

Bosher, J. M., og Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* 2, E31-36.

- Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A., og 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.
- 5 Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., og Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245.
- Chanfreau, G., Buckle, M., og Jacquier, A. (2000). Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* Rnase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3142-3147.
- 10 Clemens, M. J. (1997). PKR -- a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 945-949.
- 15 Cogoni, C., og 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., og 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.
- 20 Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M. P., og Villeneuve, A. M. (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Dev.* 14, 1578-1583.
- Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. I *The enzymes*, vol 15, del B, P. D. Boyer, red. (New York: Academic Press), s. 485-499.
- 30 Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., og Gill, S. S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.
- Fire, A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., og Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- 5 Grishok, A., Tabara, H., og Mello, C. C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497.
- Hamilton, A. J., og Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA
10 in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., og Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- 15 Jacobsen, S. E., Running, M. P., og 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.
- 20 Jensen, S., Gassama, M. P., og Heidmann, T. (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat. Genet.* 21, 209-212.
- Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A. & Gerace, L. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT in vitro.
25 *J. Cell Biol.* 141, 863-874.
- Kennerdell, J. R., og Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- 30 Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G., og 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.

- Ketting, R. F., og Plasterk, R. H. (2000). A genetic link between cosuppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296-298.
- Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., og Ding, S. W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. EMBO J. 19, 1672-1680.
- Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S., og Hamaguchi, M. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim. Biophys. Acta* 31, 1-2.
- Milligan, J. F., og Uhlenbeck, O. C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51-62.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A., og Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., og Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14687-14692.
- Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371-390.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D., og De Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signaling. *Nature* 405, 757-763.
- Pan, T., og Uhlenbeck, O. C. (1992). In vitro selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb^{2+} . *Biochemistry* 31, 3887-3895.

- Pelissier, T., og Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed methylation. *RNA* 6, 55-65.
- Plasterk, R. H., og Ketting, R. F. (2000). The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 562-567.
- Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., og Baulcombe, D. C. (1999). Gene Silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1216.
- Robertson, H. D. (1990). *Escherichia coli* ribonuclease III. *Methods Enzymol.* 81, 189-202.
- Robertson, H. D. (1982). *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell* 30, 669-672.
- Romaniuk, E., McLaughlin, L. W., Nelson, T., og Romaniuk, P. J. (1982). The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction. *Eur J Biochem* 125, 639-643.
- Sharp, P. A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes & Dev.* 13, 139-141.
- Sijen, T., og Kooter, J. M. (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22, 520-531.
- Smardon, A., Spoerke, J., Stacey, S., Klein, M., Mackin, N., og 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.
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., og Schutz, R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., og Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.

5 Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benseler, F., og Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658-11668.

10 Tuschl, T., Sharp, P. A., og Bartel, D. P. (1998). Selection in vitro of novel ribozymes from a partially randomized U2 and U6 snRNA library. *EMBO J.* 17, 2637-2650.

15 Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., og Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191-3197.

20 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.

Verma, S., og Eckstein, F. (1999). Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 99-134.

25 Voinnet, O., Lederer, C., og Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.

Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* 43, 203-220.

30 Wianny, F., og Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Bio.* 2, 70-75.

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., og Crooke, S. T. (2000). Human RNase III is a 160 kDa Protein Involved in Preribosomal RNA Processing. *J. Biol. Chem.* 17, 17.

5 Yang, D., Lu, H. og Erickson, J. W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in drosophila embryos. *Curr. Biol.*, 10, 1191-1200.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., og Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23
10 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zhang, K., og Nicholson, A. W. (1997). Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13437-13441.

PATENTKRAV

1. Isolert dobbelttrådet RNA-molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at hver RNA-tråd har en lengde fra 19-23 nukleotider og hvor minst én tråd har et 3'-overheng
5 med fra 1-3 nukleotider, der nevnte RNA-molekyl er i stand til målspesifikk RNA interferens.
2. RNA-molekyl ifølge krav 1, hvor hver tråd har en lengde fra 20-22 nukleotider.
10
3. RNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 1 eller 2, hvor 3'-overhenget er stabilisert mot nedbrytning.
4. RNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 1-3, som inneholder minst én
15 modifisert nukleotidanalogue.
5. RNA-molekyl ifølge krav 4, hvor den modifiserte nukleotidanalogen velges fra sukker- eller ryggradmodifiserte ribonukleotider.
- 20 6. RNA-molekyl ifølge krav 4 eller 5, hvor nukleotidanalogen er et sukkermodifisert ribonukleotid, der 2'-OH gruppen er byttet ut med en gruppe valgt fra H, OR, R, halo, SH, SR¹, NH₂, NHR, NR₂ eller CN, der R er C₁-C₆ alkyl, alkenyl eller alkynyl og halo er F, Cl, Br eller I.
- 25 7. RNA-molekyl ifølge krav 4 eller 5, hvor nukleotidanalogen er et ryggradmodifisert ribonukleotid inneholdende en fosfotioatgruppe.
8. RNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 1-7, som har en sekvens som har en likhet på minst 70 prosent i forhold til et forutbestemt mRNA-målmolekyl.
30
9. Fremgangsmåte for å fremstille et dobbelttrådet RNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 1-8, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene:

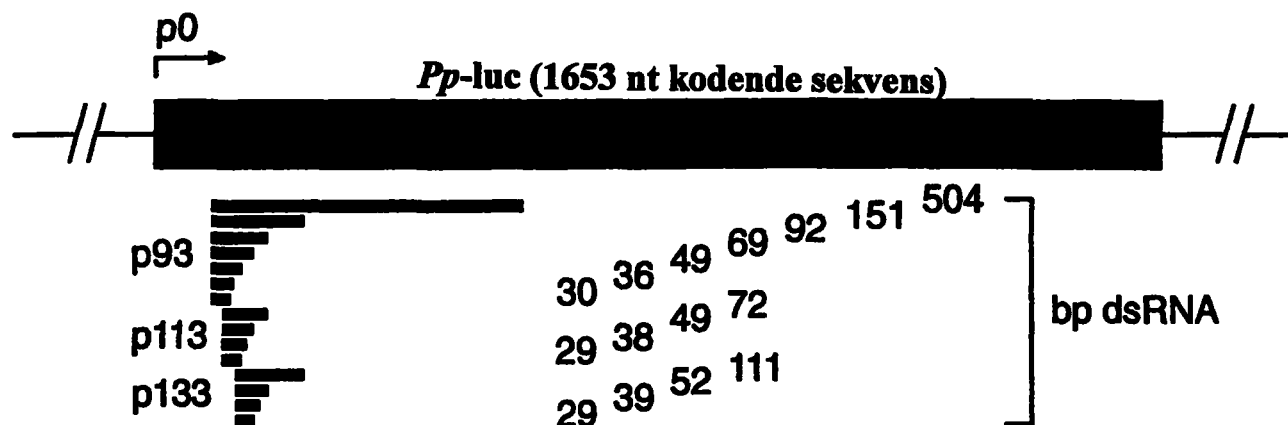
- a) syntetisere to RNA-tråder som hver har en lengde fra 19-23 nukleotider og hvor minst én har et 3'-overheng med fra 1-3 nukleotider, der nevnte RNA-tråder kan danne et dobbeltrådet RNA-molekyl,
- 5 b) kombinere de syntetiserte RNA-trådene under betingelser der et dobbeltrådet RNA molekyl dannes som er i stand til målspesifikk RNA interferens.
- 10 10. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvor RNA-trådene syntetiseres kjemisk.
11. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvor RNA-trådene syntetiseres enzymatisk.
12. In vitro fremgangsmåte for mediering av målspesifikke RNA interferenser i en eukaryot celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene:
 - 15 a) la nevnte celle komme i kontakt med det dobbeltrådede RNA-molekylet ifølge ethvert av kravene 1-8 under betingelser der målspesifikke RNA interferenser kan forekomme, og
 - b) mediere en målspesifikk RNA interferens utført av det dobbeltrådede RNA'et mot en målnukleinsyre som har en sekvensdel som svarer i alt

20 vesentlig til det dobbeltrådede RNA'et.
13. Anvendelse av in vitro fremgangsmåten ifølge krav 12 for å bestemme funksjonen til et gen i en celle.
- 25 14. Anvendelse av in vitro fremgangsmåten ifølge krav 12 for modulering av funksjonen til et gen i en celle.
15. Anvendelse ifølge krav 13 eller 14, der genet er assosiert med en patologisk tilstand.
- 30 16. Anvendelse av et dobbeltrådet RNA molekyl ifølge ethvert av kravene 1-8 for fremstilling av et medikament for å modulere funksjonen til et patogen-assosiert gen som er et viralt gen.

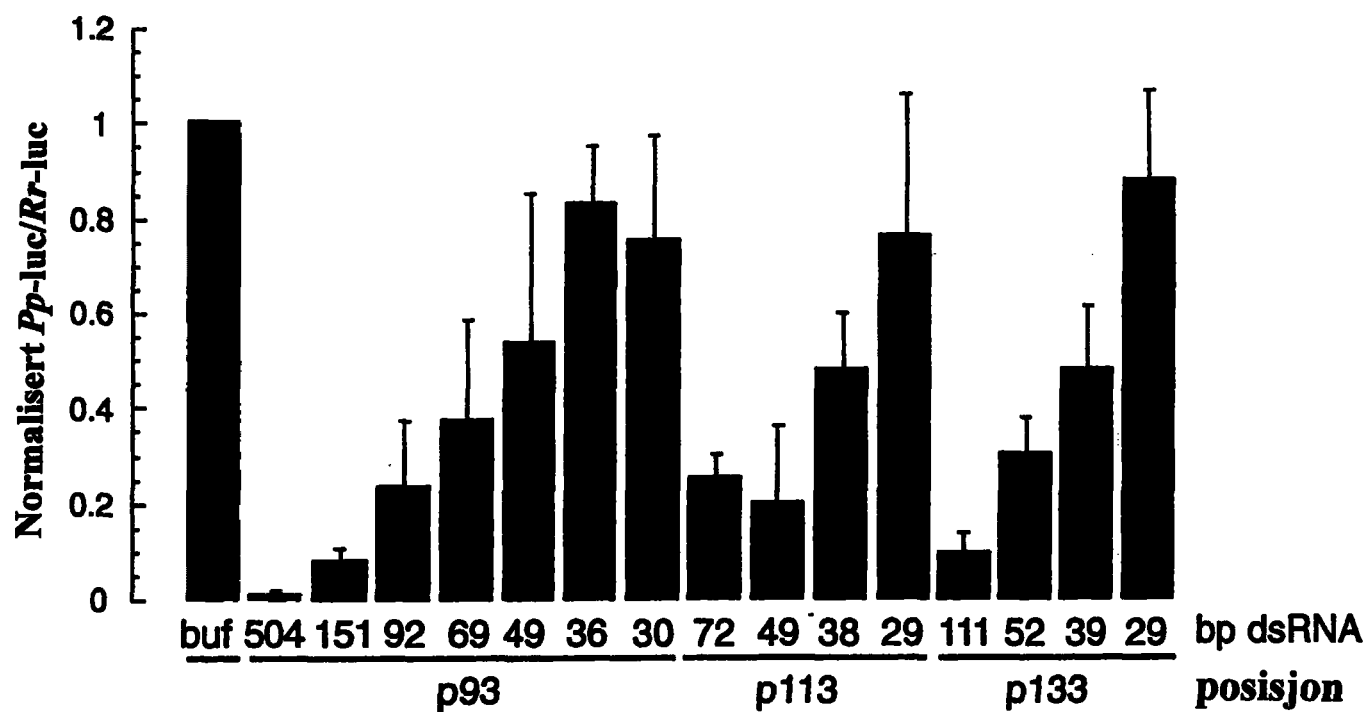
17. Anvendelse av et dobbeltrådet RNA molekyl ifølge ethvert av kravene 1-8 for fremstilling av et medikament for å modulere funksjonen til et tumor-assosiert gen.
- 5 18. Anvendelse av et dobbeltrådet RNA molekyl ifølge ethvert av kravene 1-8 for fremstilling av et medikament for å modulere funksjonen til et gen assosiert med en autoimmun sykdom.
- 10 19. Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder minst ett dobbeltrådet RNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 1-8 som et aktivt stoff og en farmasøytisk bærer.
20. Sammensetning ifølge krav 19, som er for diagnostiske applikasjoner.
- 15 21. Sammensetning ifølge krav 19, som er for terapeutiske applikasjoner.

1/23

Figur 1A

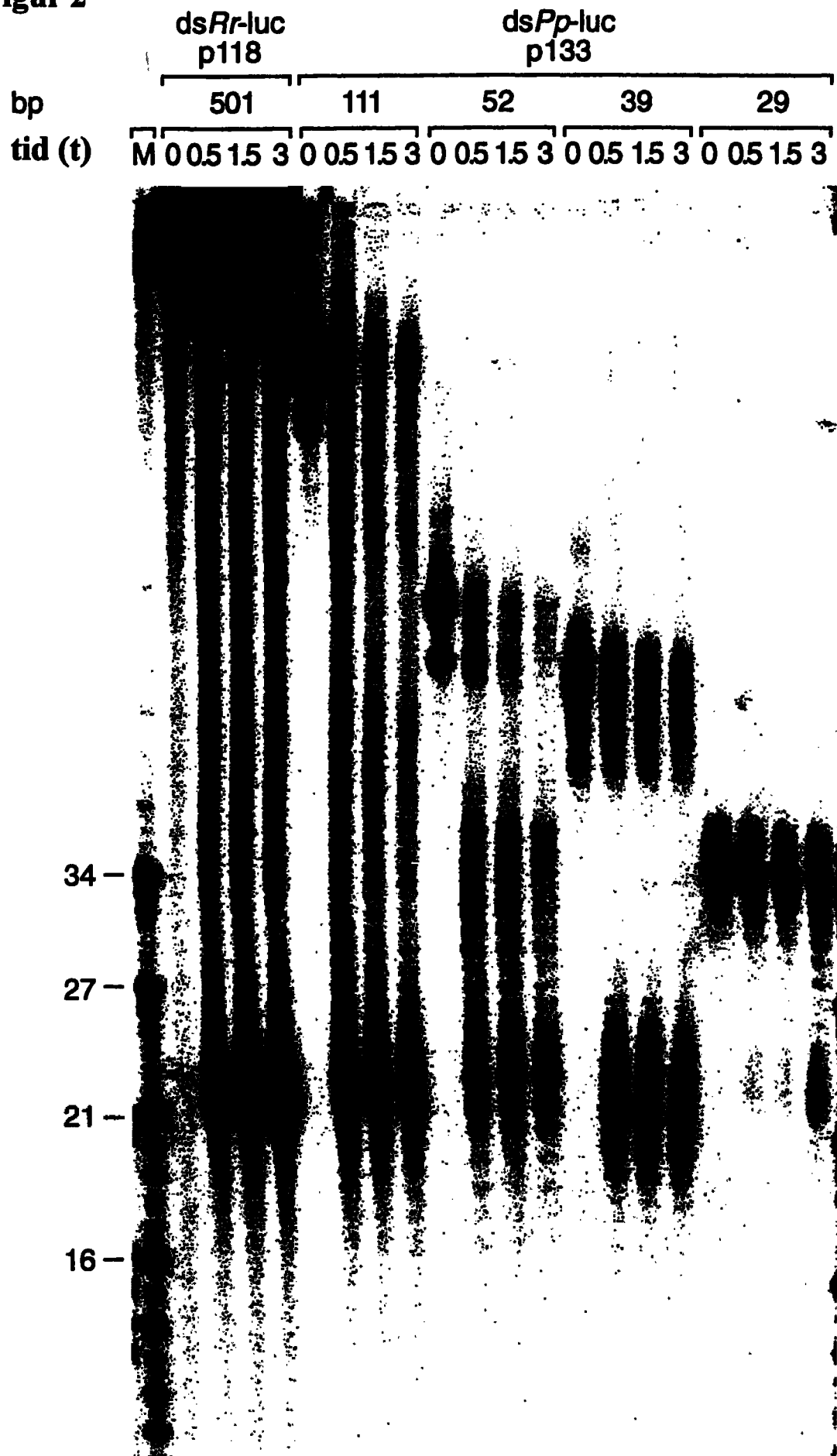


Figur 1B



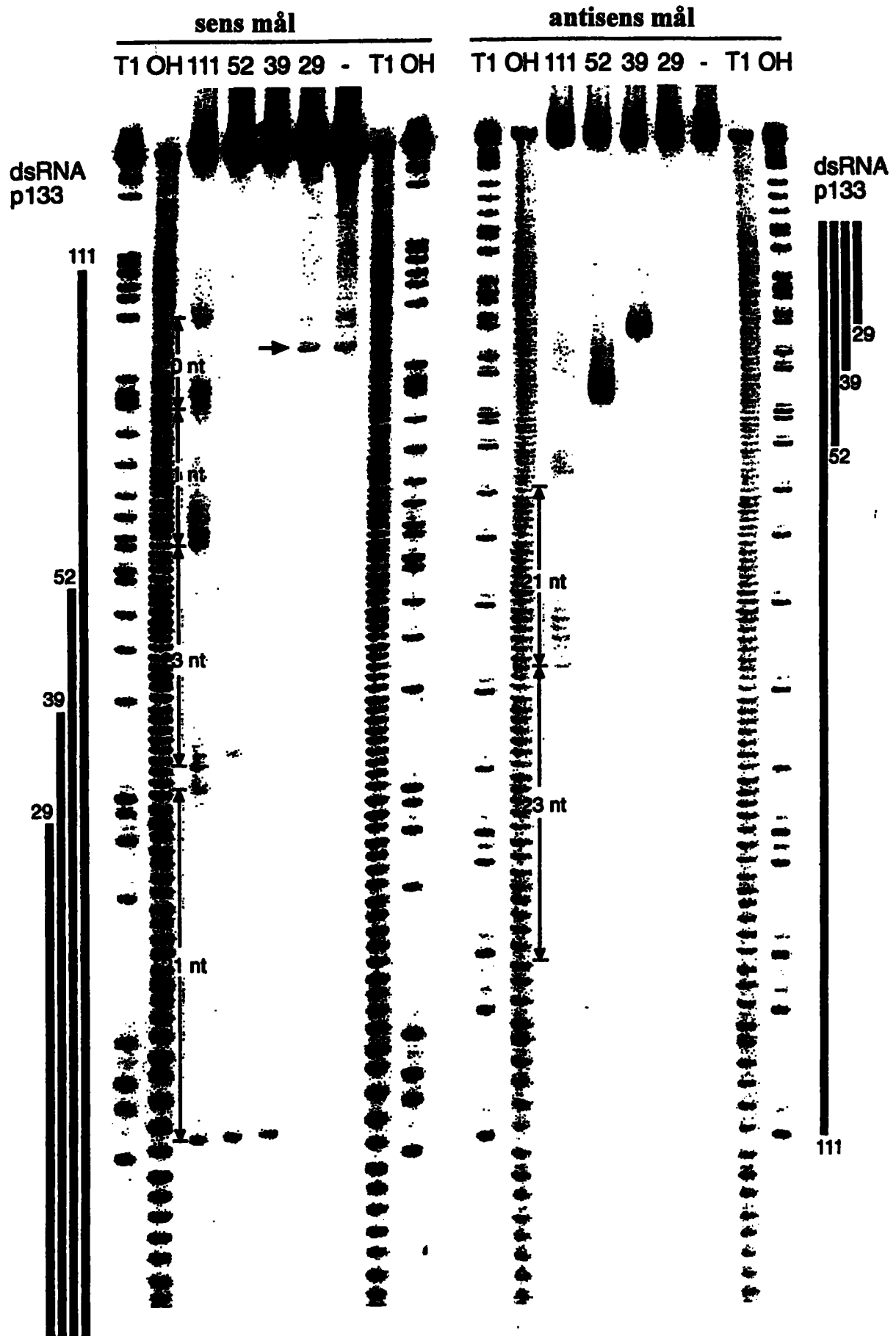
Figur 2

2/23



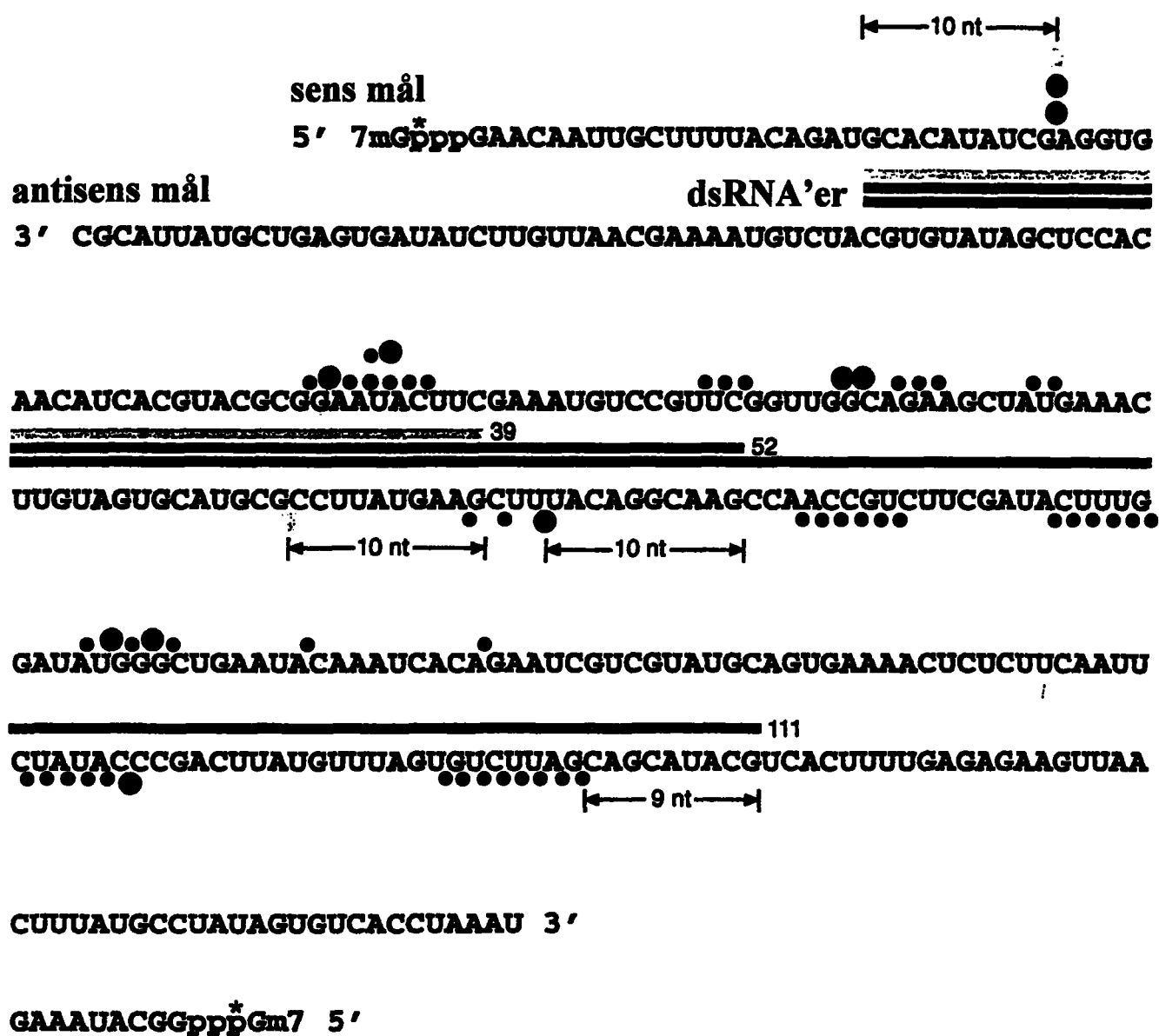
Figur 3A

3/23



4/23

Figur 3B



5/23

Figur 4A

39 bp ds*Pp*-luc p133

5' GCACAUAUCGAGGUGAACAUACAGUACGCGGAAUACUUC
 3' CGUGUAUAGCUCCACUUGUAGUGCAUGCGCCUUAUGAAG

52 bp ds*Pp*-luc p133

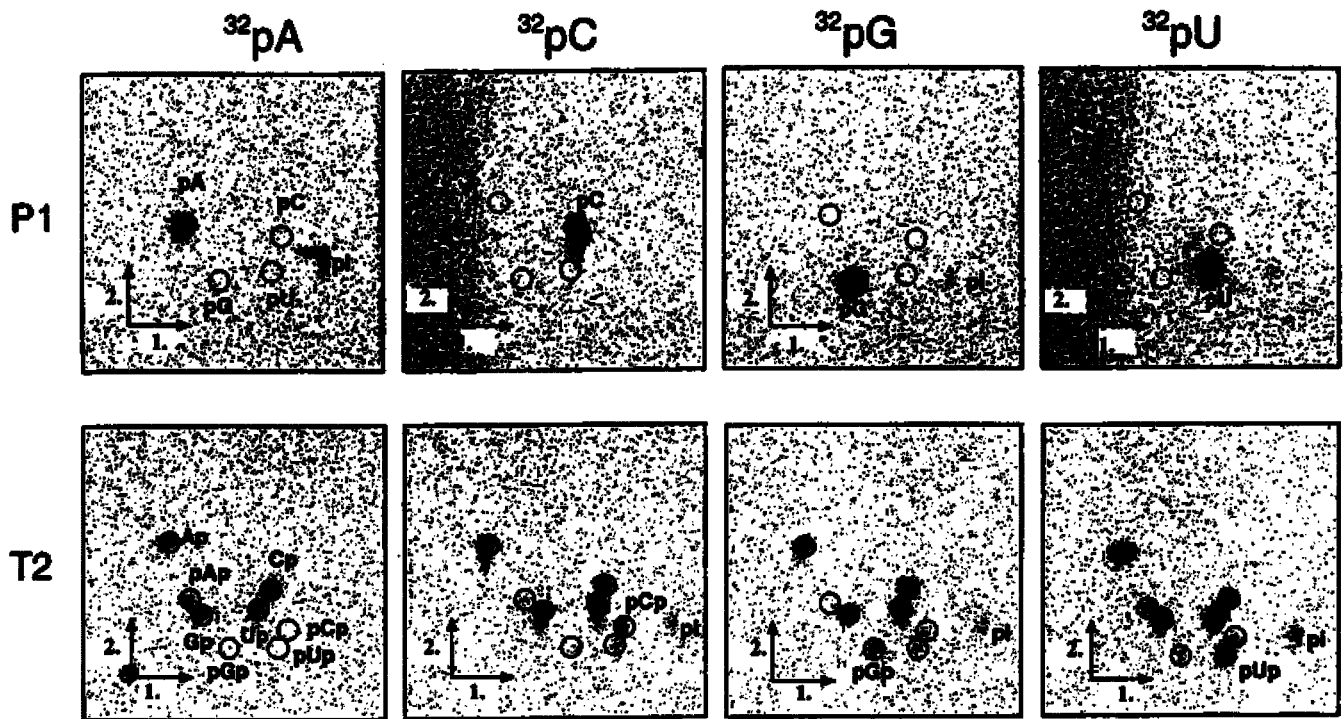
5' GCACAUAUCGAGGUGAACAUACAGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUCCGUUC
 3' CGUGUAUAGCUCCACUUGUAGUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUACAGGCAAG

111 bp ds*Pp*-luc p133

5' GCACAUAUCGAGGUGAACAUACAGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUCCGUUCGGU
 3' CGUGUAUAGCUCCACUUGUAGUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUACAGGCAAGCCA

UGGCAGAAGCUAUGAAACGAUAUGGGCUGAAUAACAAUCACAGAAUCGUCGUAUGC
 ACCGUCUUCGAUACUUGCUAUACCCGACUUAUGUUUAGUGUCUUAAGCAGCAUACG

6/23

Figur 4B

7/23

Figur 5A

siRNA'er/
dsRNAds52
(kontroll)5' GCACAUATCGAGGUGAACAUACGUAACGCGGAUACUUCGAAAUGUCCGUUC
3' CACGUGUAUAGCUCCACUUGUAGUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUACAGGCAAG

1

2

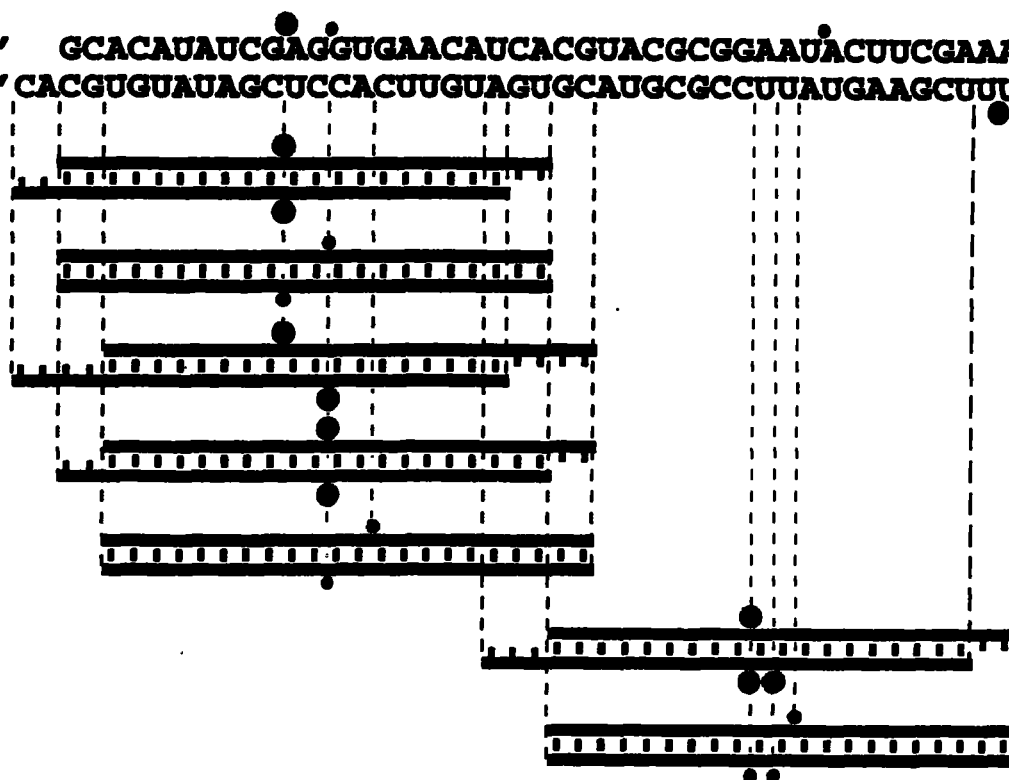
3

4

5

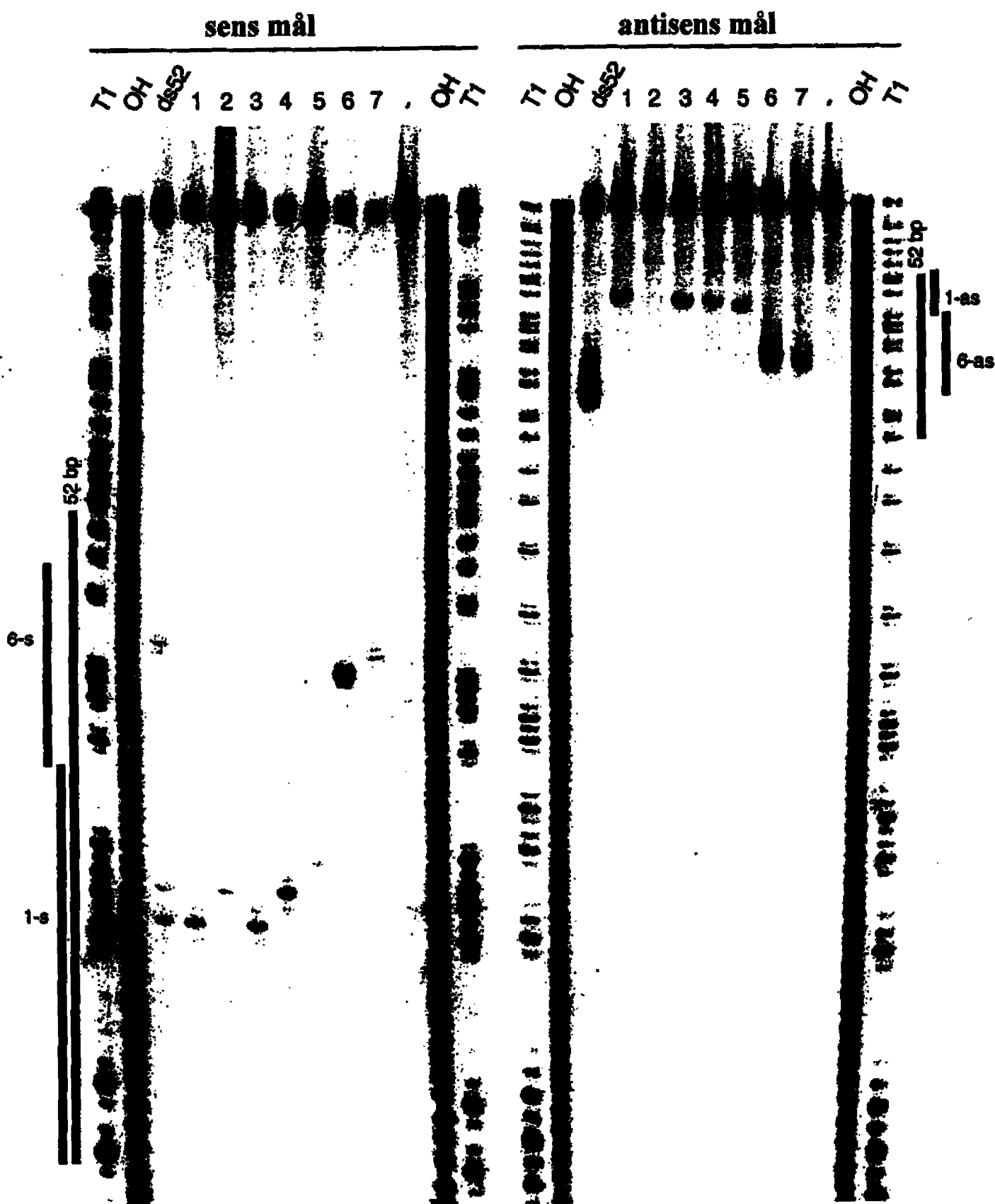
6

7



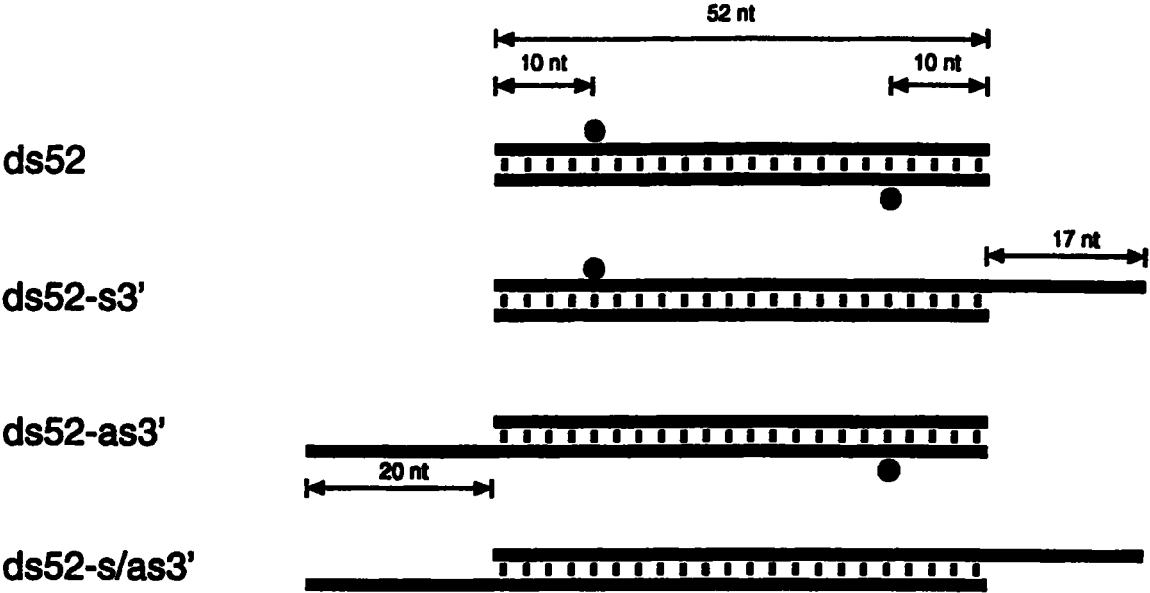
8/23

Figur 5B



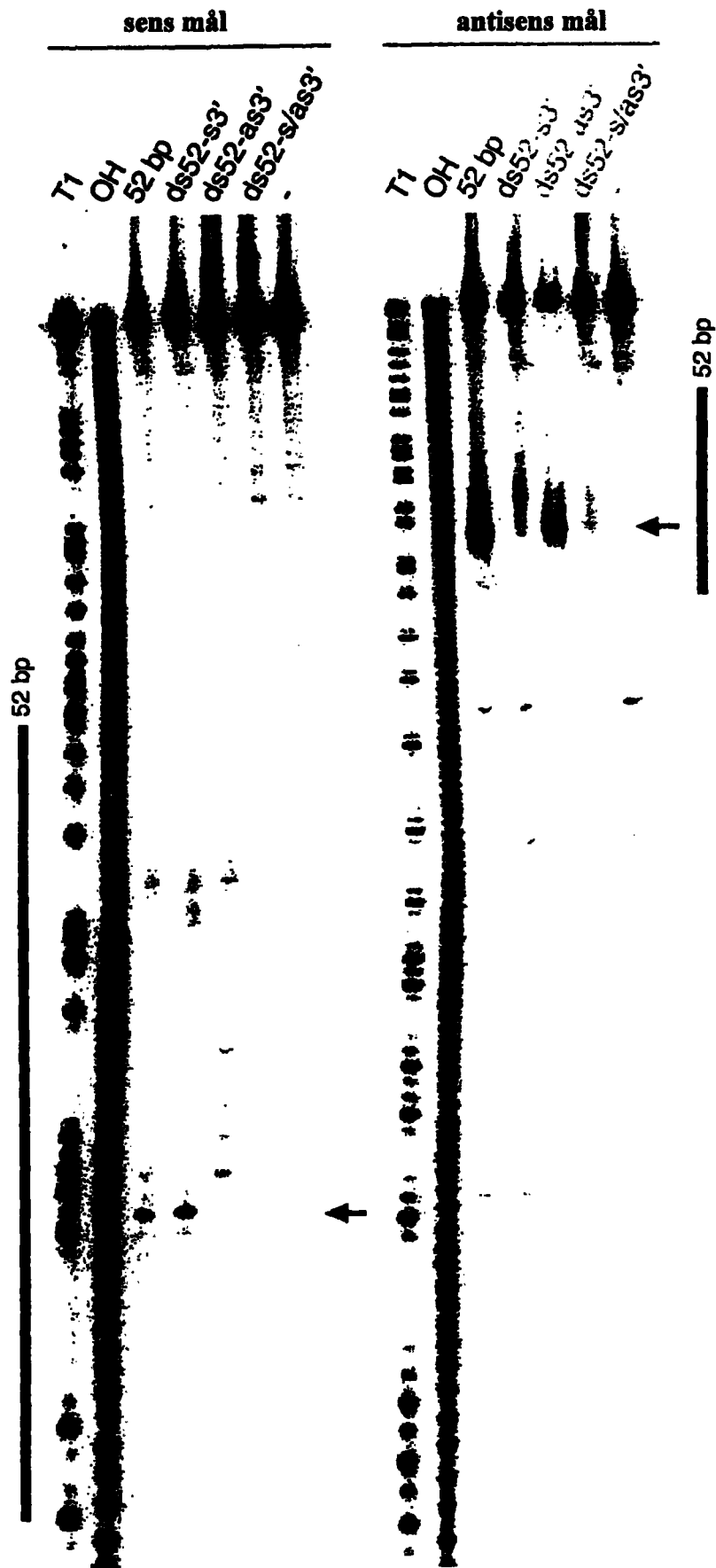
9/23

Figur 6A

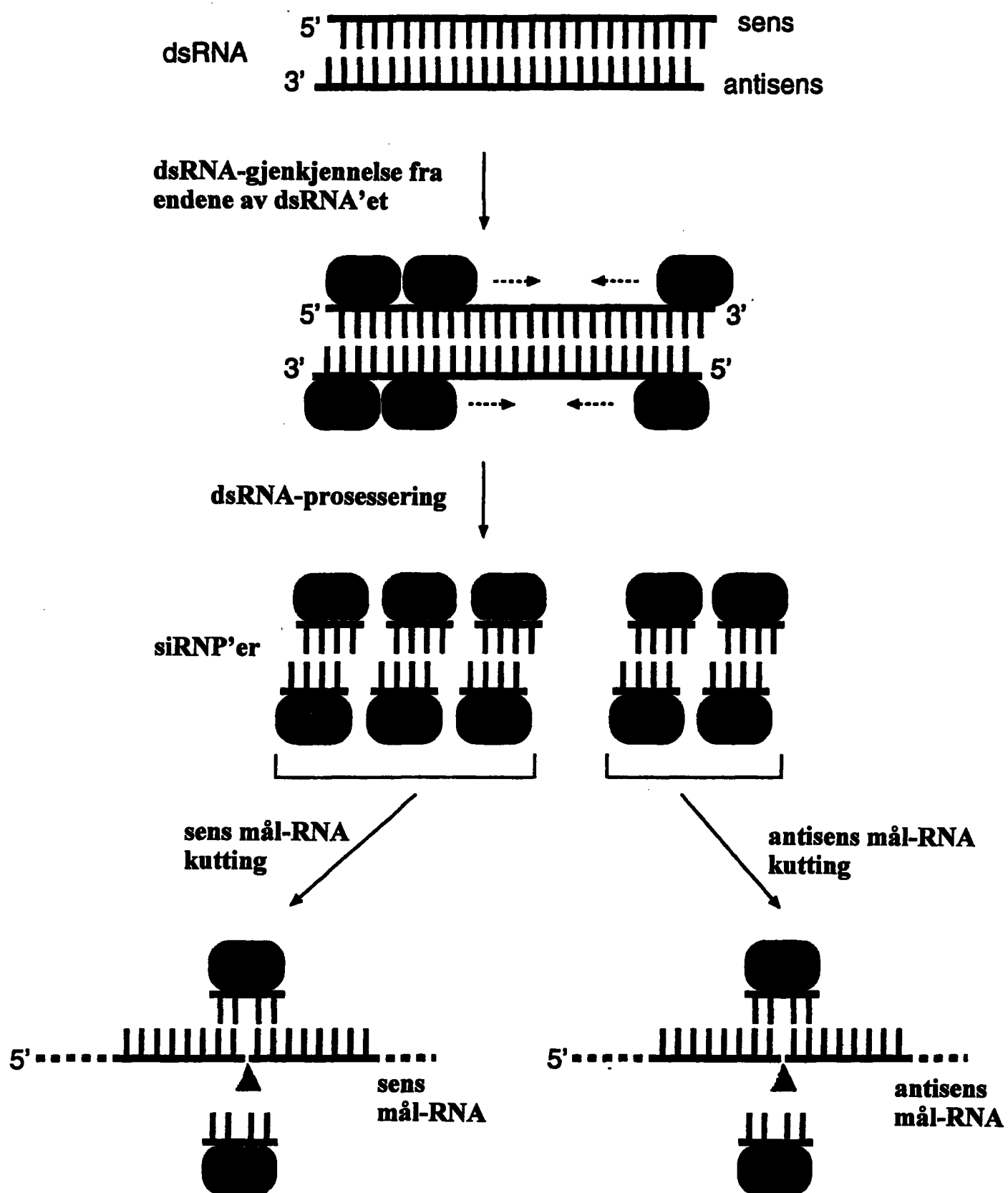


10/23

Figur 6B



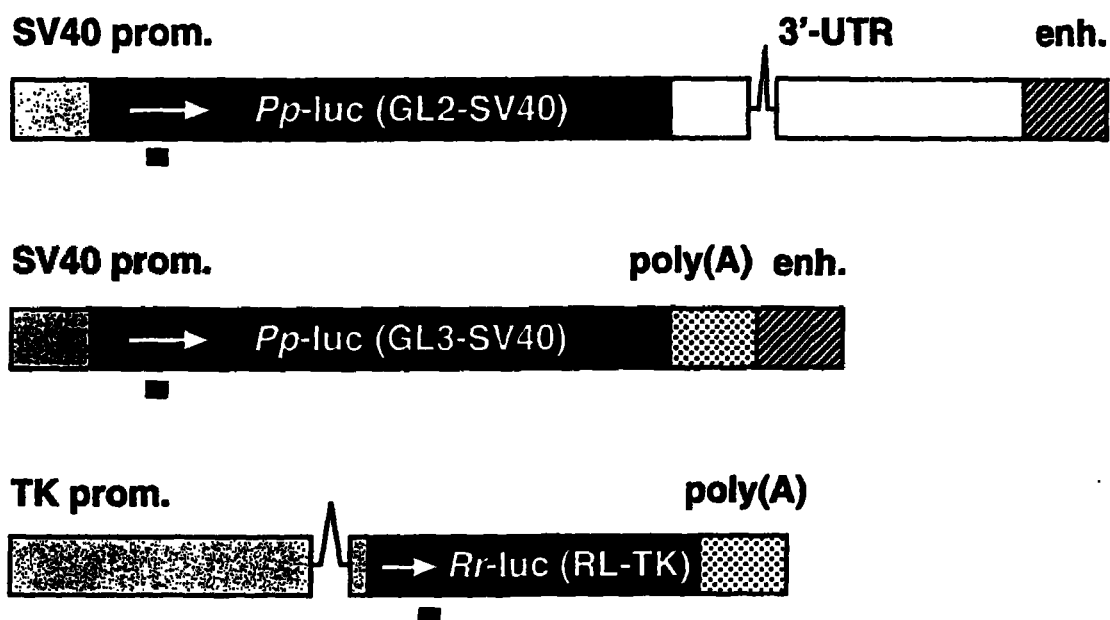
11/23

Figur 7

12/23

Figur 8

a

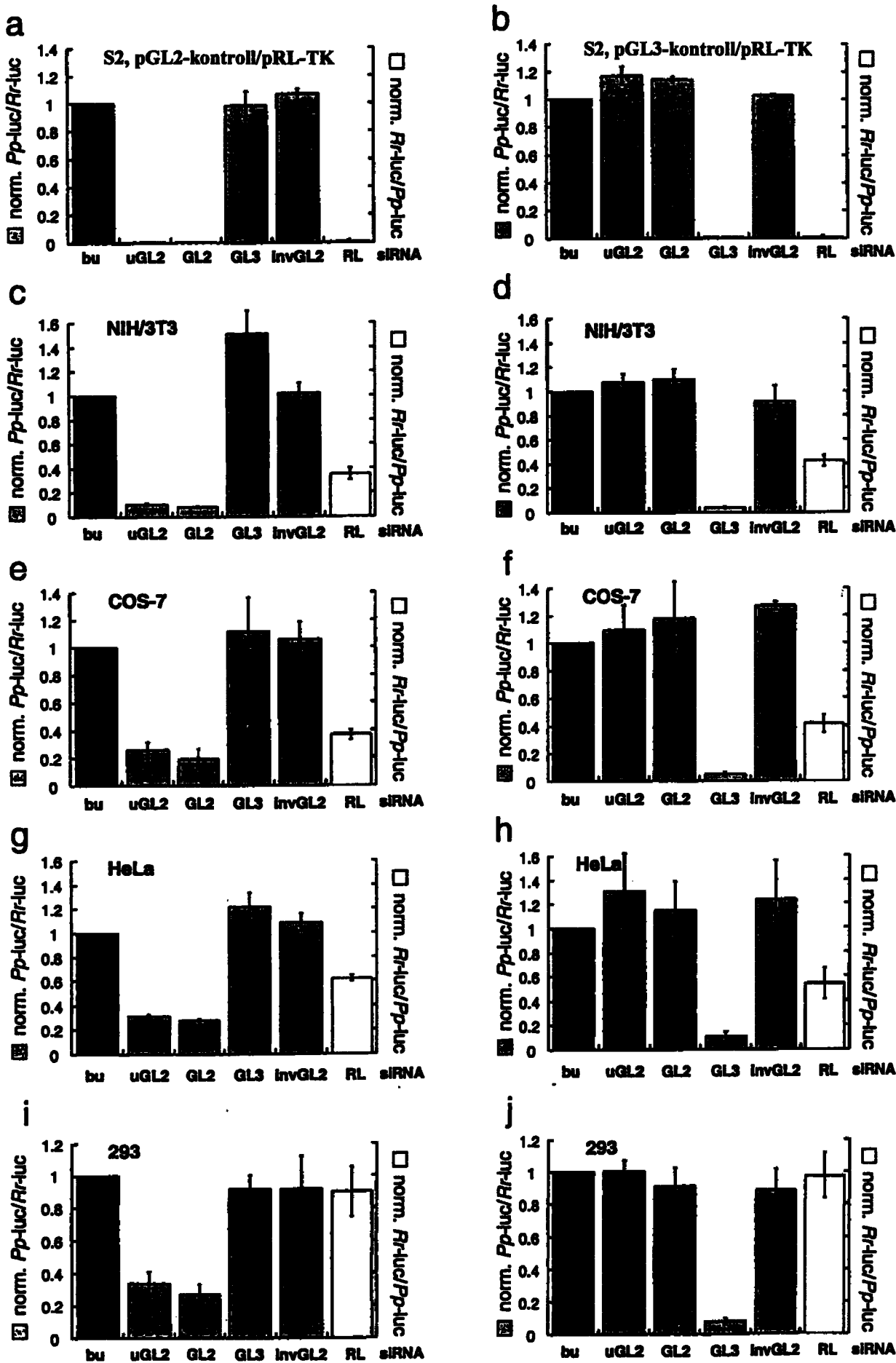


b

siRNA-
dupleks

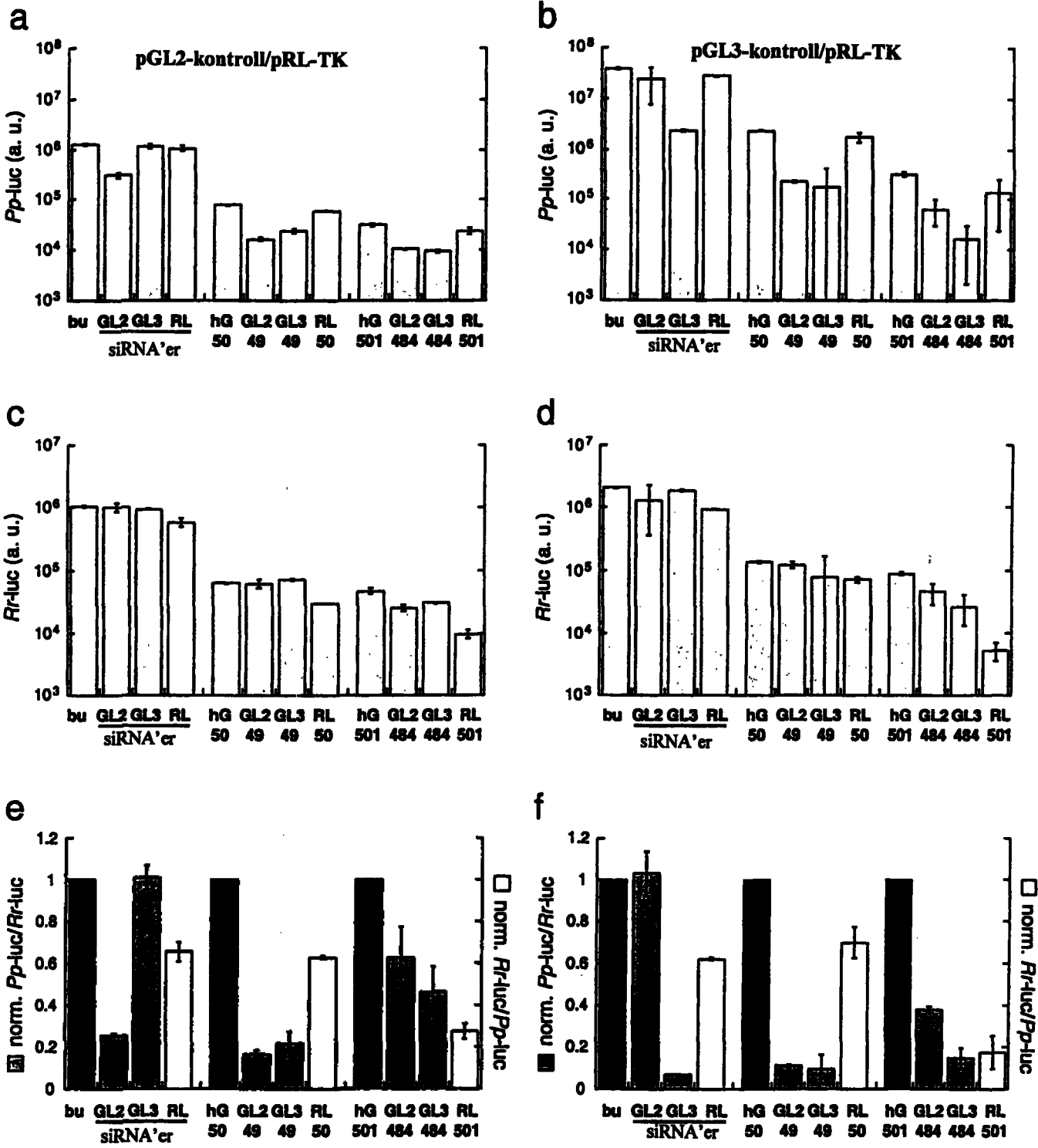
uGL2	5' C U A C G C G A A U A C U U C G A U U 3' U U G C A U G C G C U U A G A A G C U U 5'
GL2	5' C U A C G C G A A U A C U U C G A T T 3' T T G C A U G C G C U U A G A A G C U U 5'
GL3	5' C U A C G C G A A U A C U U C G A T T 3' T T G C A U G C G C U U A G A A G C U U 5'
InvGL2	5' A G C U C A U A A G G C G C A U G C T T 3' T T U C G A A G U A U C C G C G U A C G 5'
RL	5' A A A C A U G C A G A A A A U G C U G T T 3' T T U U U G U A C G U C U U U A C G A C 5'

Figur 9



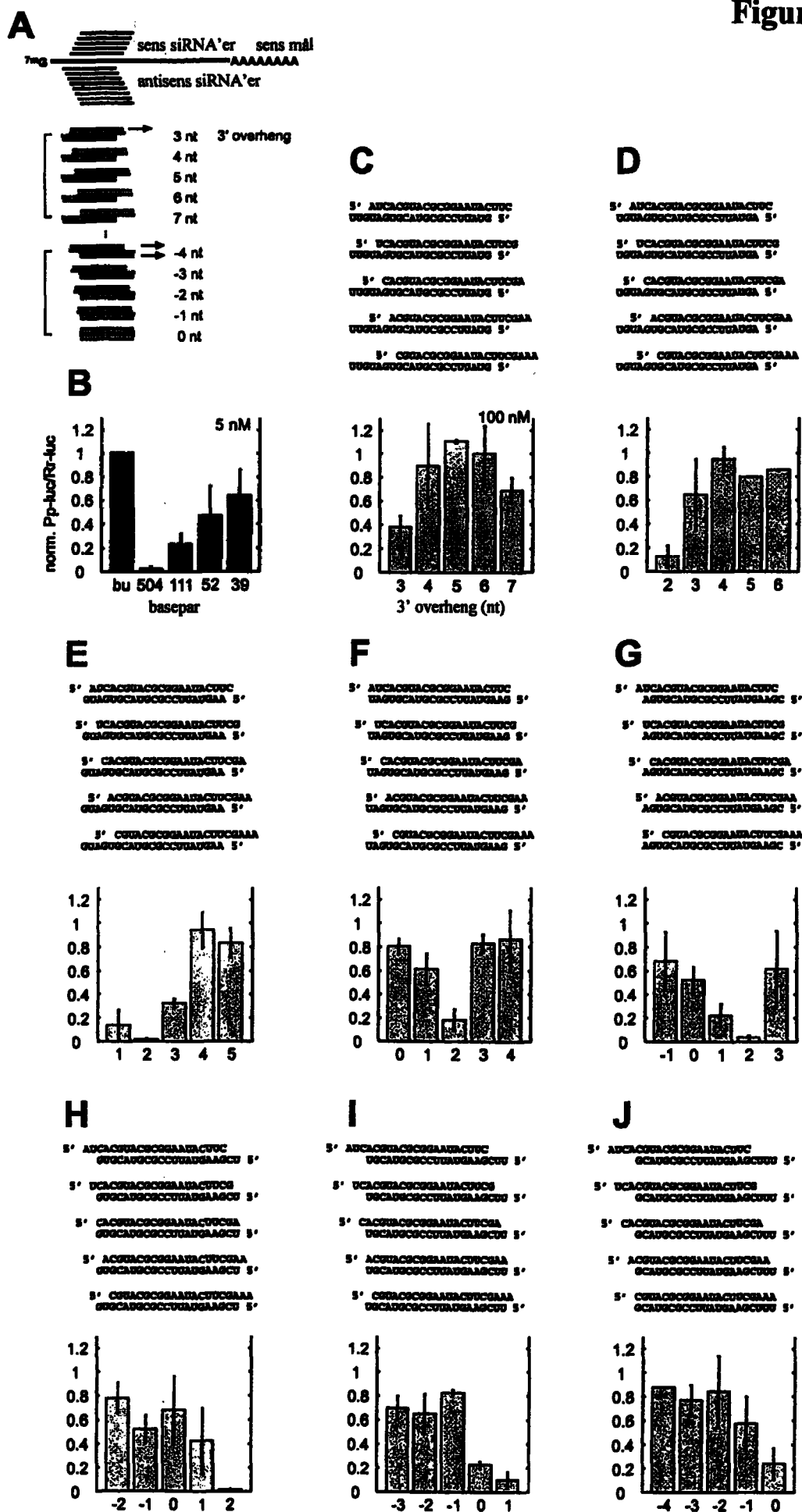
14/23

Figure 10

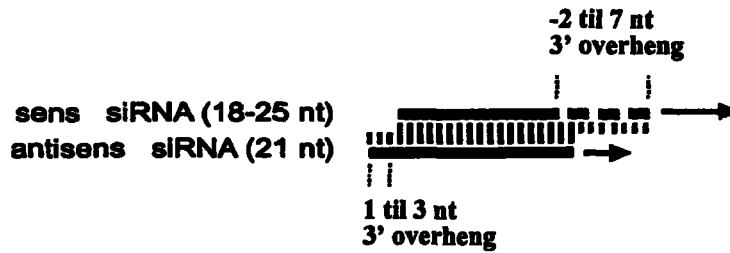


15/23

Figur 11



Figur 12

A**B**

5' CGUACGCGGAUAUCUUCG
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

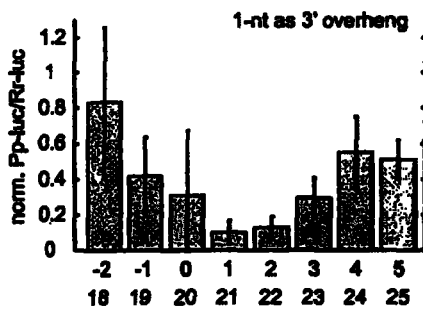
5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

**C**

5' CGUACGCGGAUAUCUUCG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

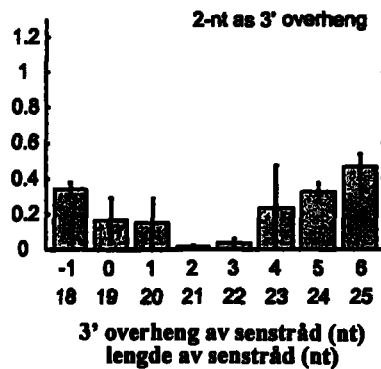
5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

**D**

5' CGUACGCGGAUAUCUUCG
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

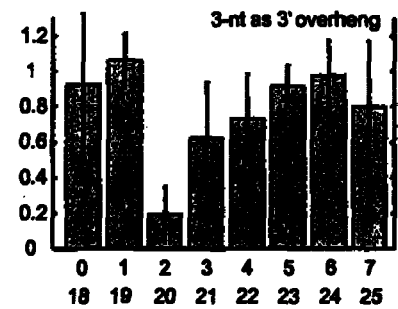
5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

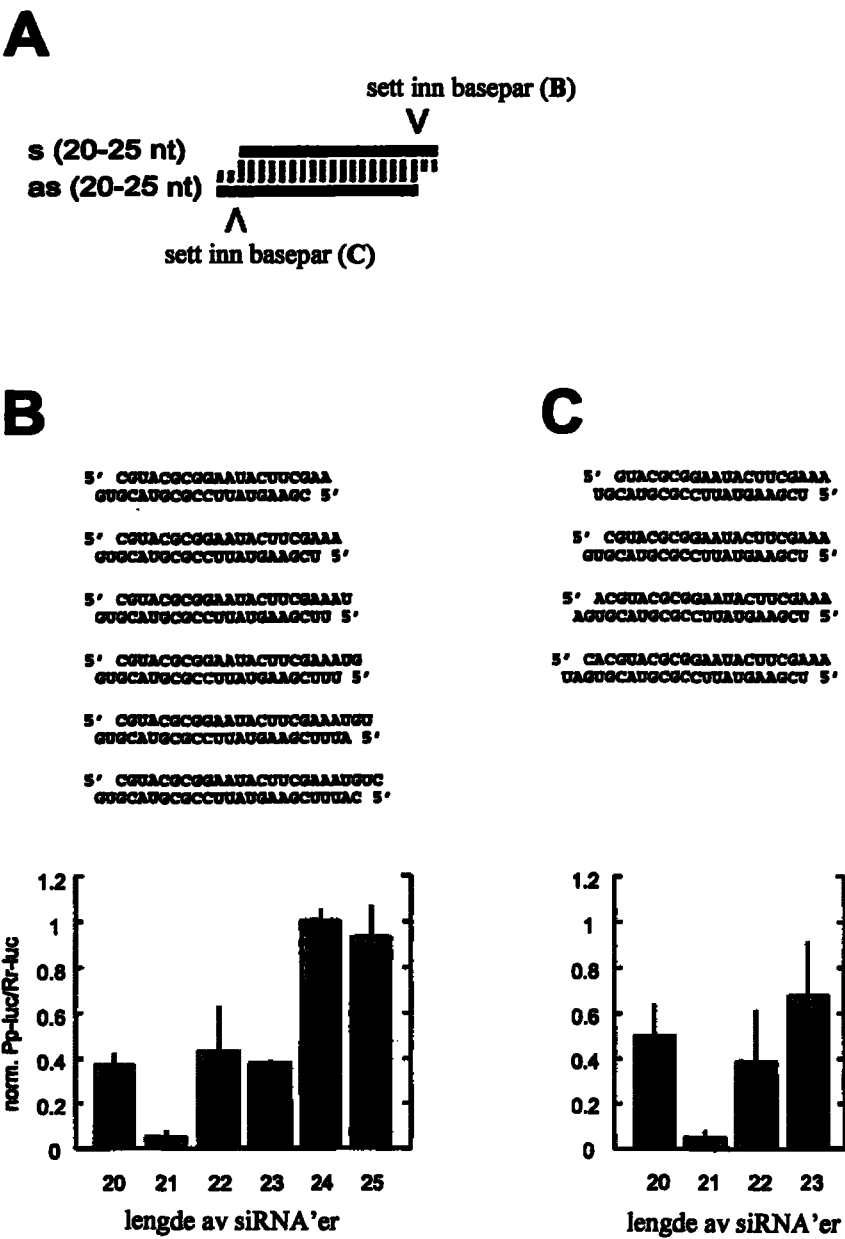
5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

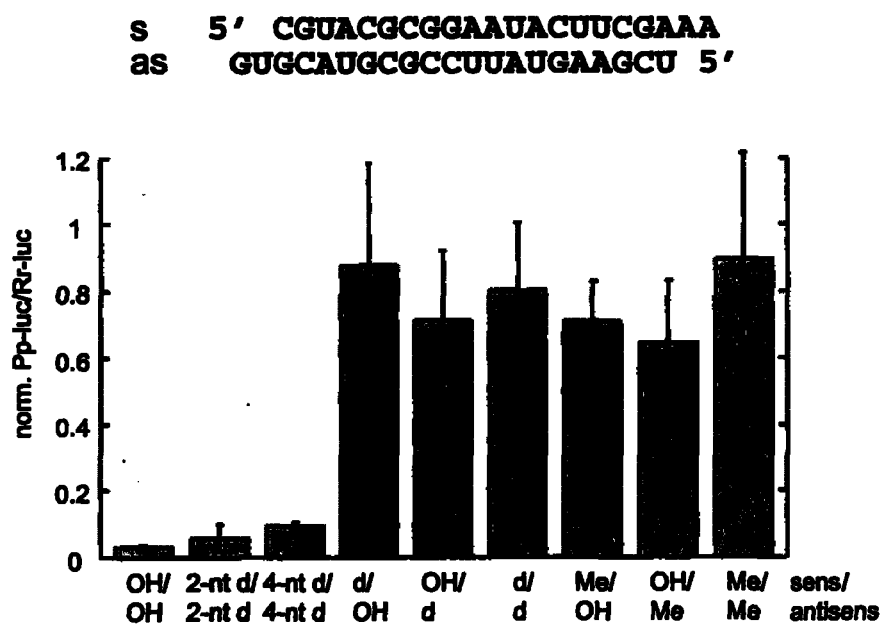
5' CGUACGCGGAUAUCUUGAAAU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'



Figur 13

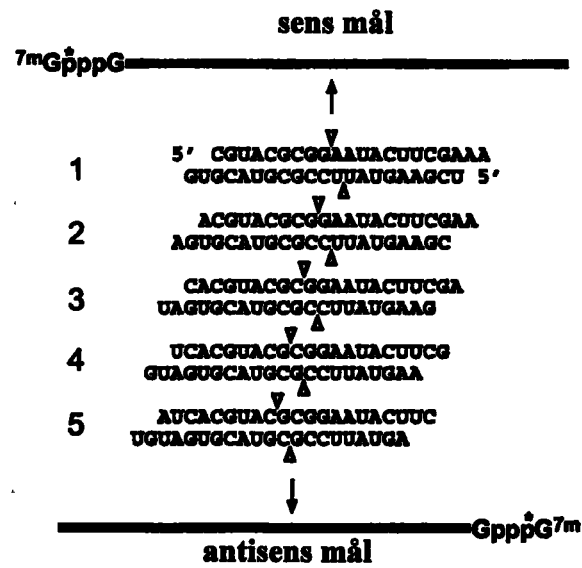
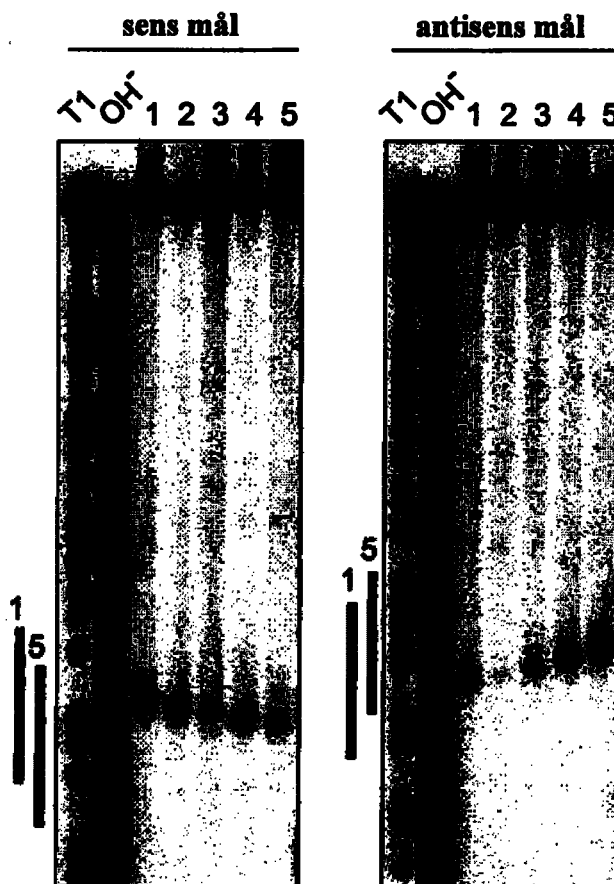


18/23

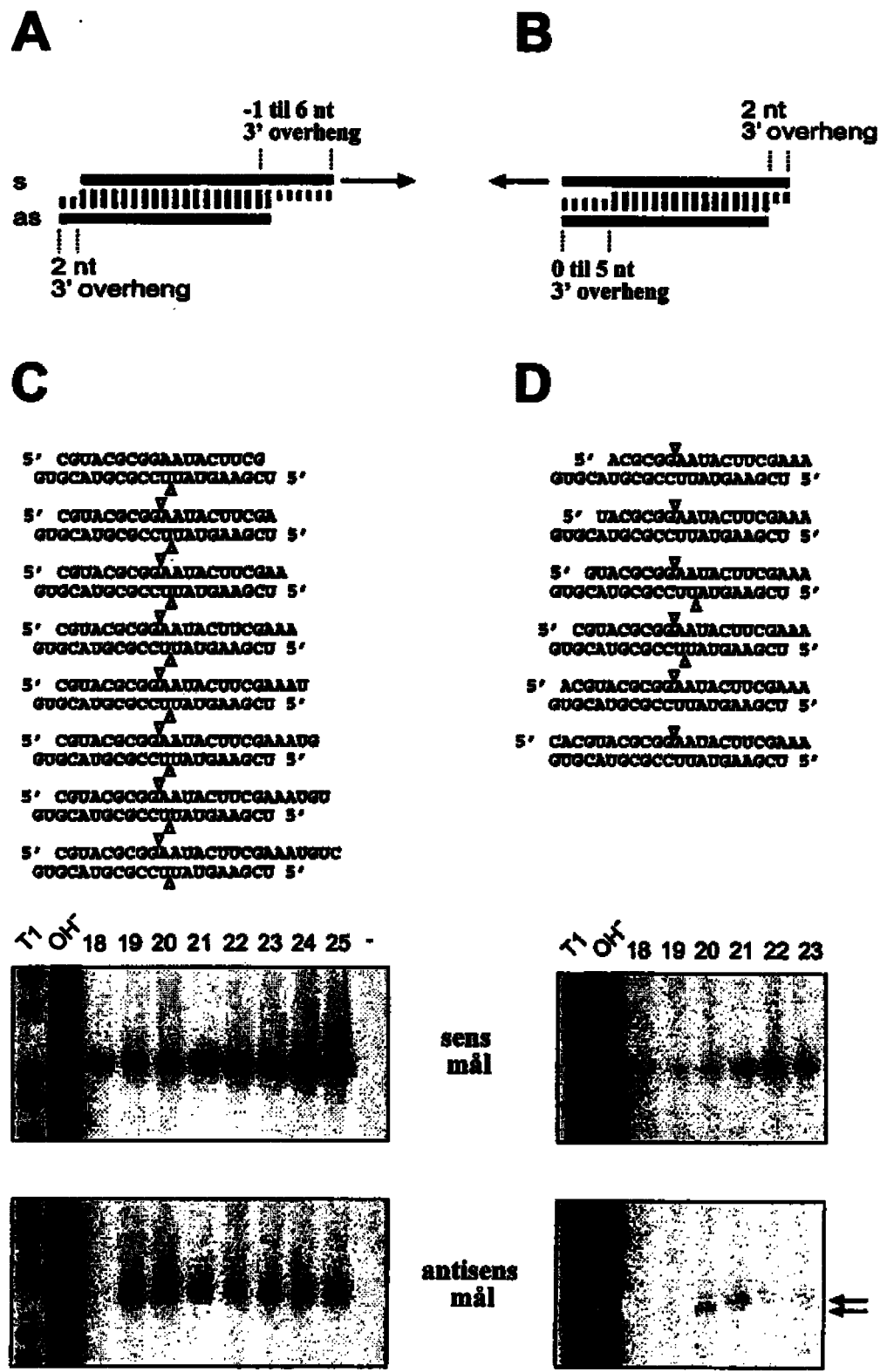
Figur 14

19/23

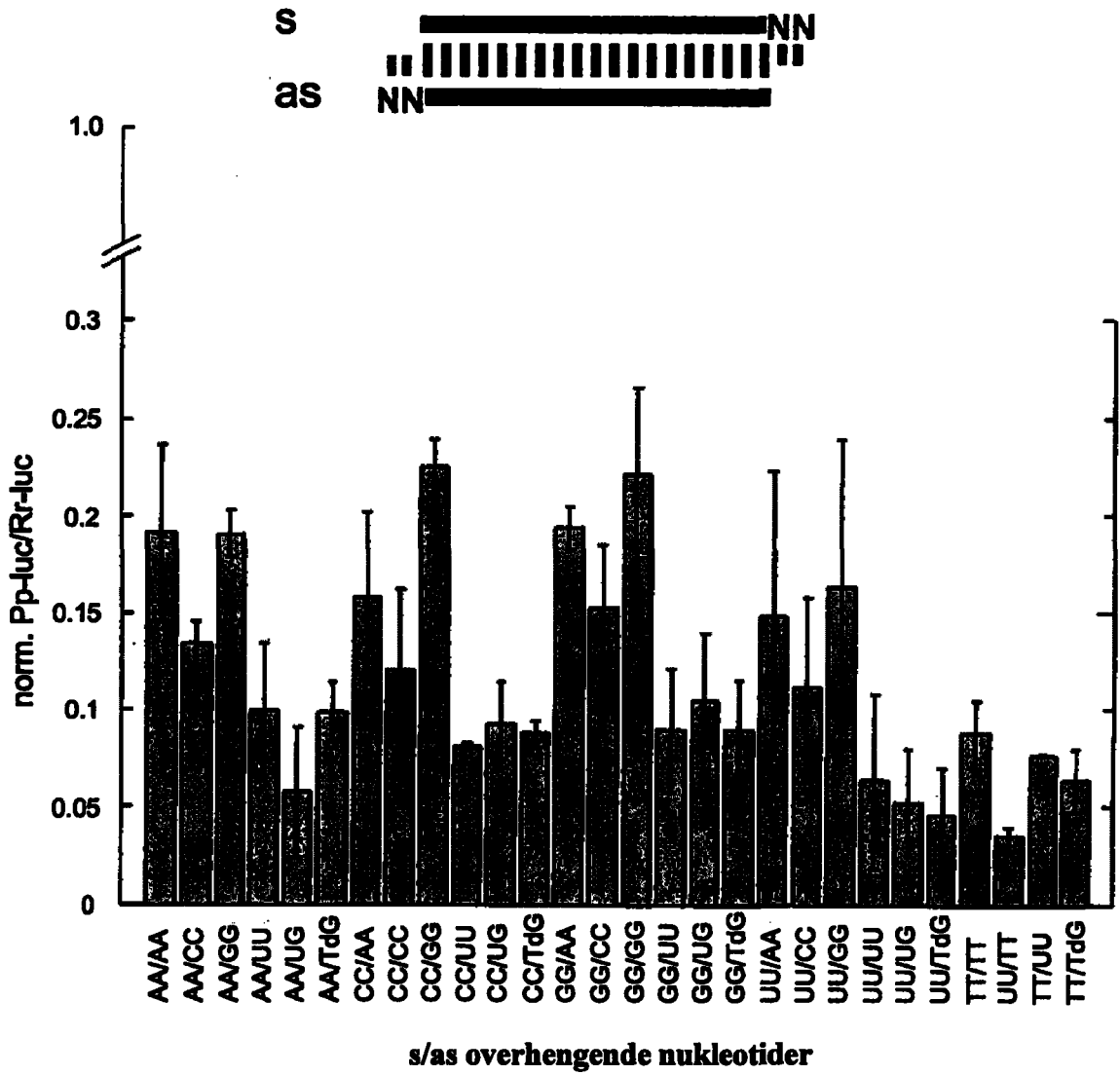
Figur 15

A**B**

Figur 16



Figur 17



22/23

Figur 18

ref 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

1 5' [REDACTED]CGCGGAUACUUCGATT
TT[REDACTED]CGCCUUAUGAAGCU 5'

2 5' CGUA[REDACTED]GAUACUUCGATT
TTGCAU[REDACTED]CUUAUGAAGCU 5'

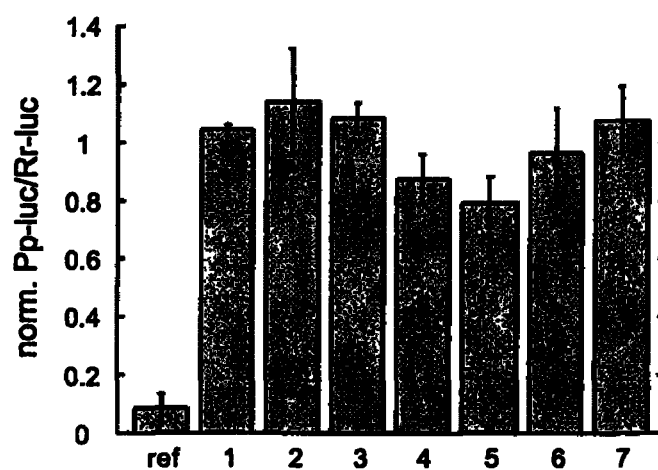
3 5' CGUACGCG[REDACTED]ACUUCGATT
TTGCAUGCGC[REDACTED]UGAAGCU 5'

4 5' CGUACGCGGAU[REDACTED]CGATT
TTGCAUGCGCCUUA[REDACTED]GCU 5'

5 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

6 5' CGUACGCGG[REDACTED]AUACUUCGATT
TTGCAUGCGCC[REDACTED]UAUGAAGCU 5'

7 5' CGUACGCGGA[REDACTED]UACUUCGATT
TTGCAUGCGCCU[REDACTED]AUGAAGCU 5'



Figur 19

